

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA VARIACIÓN DE CIERTOS PARÁMETROS DEL CULTIVO BIOTECNOLÓGICO SOBRE LA COMPOSICIÓN Y LA POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE UN MACROMICETO

Diego Felipe Rubiano Flórez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2018

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA VARIACIÓN DE CIERTOS PARÁMETROS DEL CULTIVO BIOTECNOLÓGICO SOBRE LA COMPOSICIÓN Y LA POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE UN MACROMICETO

Diego Felipe Rubiano Flórez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias - Química

Directora:
Dr. Sci Carolina Chegwin Angarita

Grupo de Investigación:
Química de Hongos Macromicetos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2018

Capítulo 1

A mis padres, por su apoyo, paciencia y confianza.

Agradecimientos

A la profesora Ivonne Nieto departamento de Química por su constante apoyo en el desarrollo de este trabajo y oportunidad de ingresar al Grupo de Investigación de Química de Hongos Macromicetos Colombianos.

Al Grupo de Investigación en Estudios Biológicos y Fisicoquímicos de líquenes Colombianos, dirigido por el Profesor José Leopoldo Rojas y la Profesora Norma Angélica Valencia, por su asesoría y apoyo en lo que respecta a los temas de actividad antioxidante.

Al Profesor Oscar Melo del departamento de Estadística por su asesoría y apoyo en el diseño experimental de este trabajo.

A todas las personas del Grupo de Investigación Química de Hongos Macromicetos Colombianos por brindarme su valioso apoyo, amistad y conocimiento.

Este trabajo se realizó en el laboratorio 212 y 126 del Departamento de Química y de la Universidad Nacional de Colombia

Resumen

La presente investigación se basó en el desarrollo de un proceso óptimo mediante la determinación de las condiciones más favorables relacionadas con la composición del medio de cultivo, aportado por fuentes de nutrientes no tradicionales, la cantidad del mismo y del inóculo, para la hiperproducción de metabolitos secundarios con potencial antioxidante, de un macromiceto obtenido por fermentación en estado líquido (FEL). En la primera fase se seleccionó, con base en la producción de biomasa y la variabilidad de los metabolitos, *Hypsizigus tessulatus* y como fuentes de nutrientes salvado de trigo y harina de trigo integral. Posteriormente, a través del estudio de la cinética y la composición de la biomasa a lo largo de la fermentación, se estableció el tiempo ideal del cultivo en nueve días. Después, aplicando un diseño central compuesto rotatable, se determinó la interacción entre los factores evaluados, encontrándose un efecto positivo de la proporción de fuente de nutrientes sobre la cantidad de biomasa para las dos fuentes de nutrientes, con un aumento en la variabilidad estructural de compuestos triterpenoidales al emplear salvado de trigo. Finalmente, la evaluación de la actividad antioxidante de las biomasas, permitió determinar que el salvado de trigo es el componente del medio más apropiado para la FEL, pues proporciona el producto biotecnológico deseado.

Palabras clave: Cultivo sumergido, hongos comestibles, micelio, actividad antioxidante, esteroides

Abstract

Using liquid fermentation, an edible macromycetes species and two nutrients sources of low cost and easy acquisition were selected, based on the production of biomass and variability of the metabolites of half polarity. It was evaluated *Grifola frondosa*, *Flammulina velutipes* and *Hypsizigus tessulatus*, selecting the latter, not only for the previous parameters, but due to few studies related to its production of biomass using liquid fermentation. Similarly, wheat bran and whole wheat flour are selected as a source of nutrients due to greater variability of compounds. Therefore, we were looking for to optimize the cultivation parameters of *H. tessulatus* growing in wheat bran and whole wheat, particularly, the amount of nutrient source and inoculum, using a rotary composite central design. The design results indicate a positive effect of the increase in the amount of nutrient source in biomass production with a maximum of 4.654 g/L and 14.540 g/L for wheat bran and whole wheat bran, respectively. It also point out greater variability in triterpenoid compounds using wheat bran. Likewise, the biomass grown in this nutrient source shows positive results in tests of antioxidant activity. For this reason, wheat bran is highlighted as a source of nutrients with potential, since the point of view, of the structural variability of triterpenoidal compounds and antioxidant activity, so as perspective, it is propose to evaluate different parameters to increase its biomass production.

Keywords: Submerged culture, edible fungi, mycelium, antioxidant activity, sterols.

Contenido

Resumen	I
Contenido	I
Lista de figuras	IV
Lista de tablas.....	VI
Introducción	1
1 CAPITULO 1 Efecto de la fuente de nutrientes sobre la producción de biomasa y composición de la misma de tres macromicetos comestibles cultivados.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.1.1 Hongos macromicetos.	2
1.1.2 Características generales de las especies <i>Grifola frondosa</i> , <i>Flammulina velutipes</i> e <i>Hypsizigus tessullatus</i>	3
1.1.3 Metabolitos secundarios de origen fúngico.	6
1.1.4 Metodologías de cultivo de hongos macromicetos.....	10
1.2 Materiales y métodos.....	13
1.2.1 Material fúngico	13
1.2.2 Fuentes de nutrientes	13
1.2.3 Cultivo por fermentación superficial (FeSup)	13
1.2.4 Cultivo por fermentación en estado líquido	14
1.2.5 Determinación de la composición de las biomásas obtenidas por FEL.	14
1.2.6 Análisis estadístico	15
1.3 Resultados y discusión	15
1.3.1 Caracterización de las fuentes de nutrientes	15
1.3.2 Fermentación superficial.....	16
1.3.3 Fermentación en estado líquido.....	20
1.4 Conclusiones	32
2 CAPÍTULO 2 Optimización de la cantidad de fuente de nutrientes e inóculo para la fermentación en estado líquido de <i>Hypsizigus tessullatus</i>	33
2.1 Antecedentes.....	33

Capítulo 1

2.1.1	Influencia de las condiciones de cultivo en la FEL.....	33
2.1.2	Diseños experimentales para la optimización de procesos.....	40
2.2	Materiales y métodos.....	43
2.2.1	Cinética de crecimiento.....	43
2.2.2	Diseño experimental.....	43
2.2.3	Análisis estadístico.....	44
2.3	Resultados y discusión.....	44
2.3.1	Cinética de crecimiento.....	45
2.3.2	Composición de la biomasa a lo largo de la cinética de crecimiento.....	46
2.3.3	Optimización de los factores del proceso fermentativo para la obtención de biomasa.....	52
2.3.4	Composición de la biomasa para los diferentes tratamientos en el proceso de optimización.....	56
2.4	Conclusiones.....	61
3	CAPITULO 3 Determinación de la incidencia de las condiciones de cultivo en la actividad antioxidante de <i>Hypsizigus tessulatus</i>	63
3.1	Antecedentes.....	63
3.1.1	Actividad biológica de los macromicetos.....	63
3.1.2	Los macromicetos y su actividad antioxidante.....	65
3.1.3	Metodologías para la determinación de la actividad antioxidante.....	66
3.1.4	Actividad antioxidante de <i>Hypsizigus tessulatus</i>	70
3.2	Materiales y métodos.....	71
3.2.1	Preparación de los extractos.....	71
3.2.2	Ensayos de actividad antioxidante.....	71
3.2.3	Análisis estadístico.....	74
3.3	Resultados y discusión.....	74
3.3.1	Bioautografía con el radical libre 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH•).....	74
3.3.2	Cuantificación del poder captador del radical libre DPPH de los extractos.....	79
3.3.3	Inhibición de la peroxidación lipídica con el modelo del ácido linoléico.....	80
3.4	Conclusiones.....	83
4	Perspectivas.....	84
	Referencias.....	86
5	Anexo 5-1 Cromatogramas de especies evaluadas.....	104

Capítulo 1

Anexo 5-2 Cromatogramas de la cinética de crecimiento para salvado de trigo y harina de trigo integral.....	107
Anexo 5-3 Compuestos determinados por CG-EM en la cinética y proceso de optimización	109
Anexo 5-4 Cromatogramas de los diferentes tratamientos del proceso de optimización para salvado de trigo (ST).....	111
Anexo 5-5 Cromatogramas de los diferentes tratamientos del proceso de optimización para harina de trigo integral (HTI).	113

Lista de figuras

Figura 1-1 Cuerpos fructíferos de: A, <i>Grifola frondosa</i> ; B, <i>Flammulina velutipes</i> ; C, <i>Hypsizigus tessullatus</i>	5
Figura 1-2 Estructura del isopreno.....	7
Figura 1-3. Núcleos de triterpenos más comunes en hongos macromicetos. A) Ergosta, B) Estigmasta y C) Lanosta.....	8
Figura 1-4. Proceso involucrado en la obtención de cuerpos fructíferos por cultivo tradicional.....	11
Figura 1-5. Efecto de la especie y de la fuente de nutrientes sobre el crecimiento radial.	17
Figura 1-6. Efecto de la fuente de nutrientes sobre el crecimiento radial medio.....	18
Figura 1-7. Variabilidad en el crecimiento radial de las especies a lo largo de 11 días según las fuentes de nutrientes.	19
Figura 1-8. Variación sobre la producción de biomasa con diferentes fuentes de nutrientes empleando fermentación en estado superficial.	19
Figura 1-9. Producción de biomasa por fermentación líquida de las especies <i>Flammulina velutipes</i> , <i>Grifola frondosa</i> e <i>Hypsizigus tessullatus</i> en las diferentes fuentes de nutrientes.	21
Figura 1-10. Porcentaje de fuente de nutrientes efectiva en medio de cultivo después del proceso de filtración.....	22
Figura 1-11. Cromatografía en capa fina de extractos en diclorometano de biomasa obtenida por cultivo en las fuentes de nutrientes.	25
Figura 1-12. Variabilidad de compuestos determinados por CG-EM para cada especie empleando las fuentes de nutrientes evaluadas.	31
Figura 2-1. Cinética de crecimiento de <i>Hypsizigus tessullatus</i> empleando salvado de trigo y harina de trigo integral como fuente de nutrientes.	46
Figura 2-2 Abundancia relativa de los ácidos grasos determinados a partir de los días 6, 9, 12 y 15 de la FEL con las dos fuentes de nutrientes.	48
Figura 2-3 Abundancia relativa de los compuestos triterpenoidales determinados en los días 6, 9, 12 y 15 de la FEL con las dos fuentes de nutrientes.	50
Figura 2-4 Variedad de compuestos triterpenoidales determinados por CG-EM en los días 6, 9, 12 y 15 de la FEL con las dos fuentes de nutrientes.....	51
Figura 2-5 Efecto de la cantidad de fuente de nutrientes y de inóculo en la producción de biomasa de <i>H. tessullatus</i> . A. Gráficas de contorno y B. Superficie de respuesta.....	55
Figura 2-6 Abundancia relativa de los ácidos grasos obtenidos en cada uno de los tratamientos de optimización.	58
Figura 2-7 Abundancia relativa de triterpenoides obtenida a partir de los distintos tratamientos de optimización.	59
Figura 3-1 Mecanismos de reacción entre el antioxidante y el radical libre.....	67
Figura 3-2 Mecanismo de reacción propuesto entre el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y un antioxidante.....	68
Figura 3-3 Reacción de formación del radical hidroxiperóxido a partir del ácido linoléico.	69

Capítulo 1

Figura 3-4 Cromatogramas de los extractos de las biomásas de <i>H. tessulatus</i> cultivado bajo las condiciones del proceso de optimización desarrollados con Tol:AcOEt 4:1 (v/v), y visualizados con diferentes reveladores.....	77
Figura 3-5 Cromatogramas de los extractos de las biomásas del <i>H. tessulatus</i> cultivado bajo las condiciones del proceso de optimización, desarrolladas en el sistema tolueno:ácido acético 85:15 (v/v), y revelados con DPPH (bioautografía) y FeCl ₃	78
Figura 3-6 Porcentaje de peroxidación lipídica para los diferentes tratamientos de optimización.....	82

Lista de tablas

Tabla 1-1 Rango de valores nutricionales en hongos macromicetos.....	3
Tabla 1-2. Ubicación taxonómica de <i>Grifola frondosa</i> (Dicks.) Gray, 1821; <i>Flammulina velutipes</i> (Curtis) Singer, 1951; <i>Hypsizigus tessullatus</i> (Bull.) Singer, 1947.	4
Tabla 1-3. Clasificación de terpenos según número de unidades de isopreno.	7
Tabla 1-4. Triterpenoides identificados en distintas especies de hongos macromicetos	8
Tabla 1-5. Composición de las fuentes de nutrientes evaluadas.....	16
Tabla 1-6. Compuestos determinados por CG-EM en las biomásas de los tres macromicetos cultivados con las diferentes fuentes de nutrientes.	26
Tabla 1-7. Porcentaje de abundancia relativa de compuestos determinados por CG-EM	27
Tabla 1-8. Comparación de abundancia relativa de ácidos grasos con literatura.	29
Tabla 2-1 Efecto de algunos factores de cultivo en la producción de triterpenoides en macromicetos.	36
Tabla 2-2 Estudios relacionados con la optimización de factores para la obtención de diferentes productos a partir de hongos macromicetos.	42
Tabla 2-3 Variables empleadas en el diseño central compuesto, indicando la combinación de tratamientos.	44
Tabla 2-4 Abundancia relativa de ácidos grasos y triterpenoides determinados en los días 6, 9, 12, 15 de la FEL, de la biomasa cultivada en salvado de trigo y harina de trigo integral.....	48
Tabla 2-5 Producción de biomasa para cada combinación de tratamientos evaluada.....	52
Tabla 2-6 Análisis de varianza (ANOVA) del ajuste del modelo de regresión representando la producción de biomasa de <i>H. tessulatus</i>	53
Tabla 2-7 Coeficientes estimados por la regresión del modelo	53
Tabla 2-8 Coeficientes estimados por la regresión del modelo en cada uno de los tratamientos para las fuentes de nutrientes.	54
Tabla 2-9 Abundancia relativa de compuestos determinados en CG-EM para los distintos tratamientos de optimización	57
Tabla 3-1 Actividad biológica de triterpenoides de hongos macromicetos.....	64
Tabla 3-2 Actividad antioxidante de metabolitos biosintetizados por hongos macromicetos	66
Tabla 3-3 Cuantificación del poder captador del radical DPPH [*] para los extractos de <i>H. tessulatus</i>	79
Tabla 3-4 Valores de porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica de extractos etanólicos de <i>H. tessulatus</i> cultivado en salvado de trigo.	82

Introducción

En las últimas décadas a nivel mundial se ha incrementado la demanda de productos benéficos para la salud, llevando a una continua búsqueda de potenciales fuentes que permitan satisfacer esta necesidad. Dentro de las opciones se encuentran los macromicetos, usados tradicionalmente como alimento por sus propiedades organolépticas y valor nutricional. Adicionalmente, los metabolitos sintetizados por estos organismos han demostrado diversas actividades biológicas(1)(2)(3), atribuidas a la presencia de polisacáridos, proteínas, fenoles, policétidos, triterpenoides, esteroides, alcaloides nucleótidos, lactonas y ácidos grasos(4). Dentro de estos compuestos, los triterpenoides de origen fúngico, comprenden una amplia variedad de estructuras, a las cuales se les atribuye diversas actividades biológicas.

Sin embargo, es importante resaltar que en la mayoría de los casos, los metabolitos biológicamente activos son producidos en bajas concentraciones de manera natural por estos organismos, debido a esto, se requieren técnicas que incrementen no solo, la producción de biomasa, sino de los compuestos de interés.

En algunas culturas se ha desarrollado, a través de cientos de años, el cultivo tradicional de setas que permite la obtención de biomasa, proceso que presenta limitaciones tales como el tiempo requerido y el mantener la misma calidad de producto. Es por lo anterior que en los últimos años el interés por incrementar la producción de biomasa ha dirigido los esfuerzos hacia la obtención de micelio de los macromicetos, sustituyendo el cultivo tradicional por técnicas biotecnológicas que facilitan y, mediante la modificación en las condiciones de cultivo, estimulan la producción tanto de biomasa como de metabolitos.

La fermentación en estado líquido (FEL) o cultivo sumergido, ha sido la opción más comúnmente empleada, para el cultivo de biomasa en forma de micelio, por la eficiencia

Capítulo 1

del proceso, facilidad de recuperación de los productos, mantenimiento de la calidad del mismo y manejo de las condiciones del proceso (5).

Aunado a lo anterior, diversos estudios han demostrado que la variación de las condiciones de cultivo puede afectar desde la cantidad de biomasa y de metabolitos, hasta su variedad estructural. Particularmente, se ha determinado que la producción de triterpenos se ve influenciada por el tipo y la concentración de la fuente de carbono, nitrógeno, su relación, el uso de elicitores, el oxígeno disuelto, la temperatura y el pH, entre otros.

Por tal motivo, en el grupo de Química de Hongos Macromicetos Colombianos, se han venido realizando investigaciones enfocadas a determinar el efecto que la fuente de nutrientes del medio de cultivo presenta sobre la composición de la biomasa obtenida a través de FEL de macromicetos. Particularmente en este trabajo, se busca establecer, para una especie comestible, la incidencia del tipo fuente de nutrientes, la cantidad de este y de inóculos, sobre la producción de biomasa, su composición y potencial como antioxidante.

Como primer paso, es necesario realizar la selección de una especie de macromiceto y dos fuentes de nutrientes de bajo costo y fácil adquisición, con base tanto en la producción de biomasa, como en la variabilidad y cantidad de compuestos presentes en la misma. Esta selección se hizo, inicialmente, empleando fermentación superficial (FeSup) a través del seguimiento del crecimiento radial y la producción de biomasa, para posteriormente comparar los resultados con los obtenidos empleando fermentación en estado líquido, indicando un efecto diferenciado entre las dos técnicas, por lo cual la FeSup no es idónea en la selección del cultivo macromicetos por FEL.

Una vez establecidos estos factores es necesario determinar el día ideal del cultivo, que permita el equilibrio entre una alta producción de biomasa y una composición ideal, en términos tanto de cantidad como de variedad de compuestos, determinado a través del estudio de la cinética de crecimiento y la producción de metabolitos a lo largo de la fermentación.

Definido el tiempo ideal de fermentación, la especie de macromiceto y dos fuentes de nutrientes, se procedió a realizar un diseño experimental que permitiera evaluar el efecto de la cantidad de cada una de las fuentes seleccionadas y de inóculo, sobre las variables

Capítulo 1

de respuesta ya mencionadas como de interés. Se utiliza un diseño central compuesto rotatable para aplicar la metodología de superficie de respuesta. La evaluación realizada, permite establecer las condiciones idóneas en términos de cantidad de fuente de nutrientes e inóculo, para incrementar la producción de biomasa.

Por otro lado se sabe que el estrés oxidativo es el causante de enfermedades cardiovasculares, desórdenes neurológicos, envejecimiento prematuro e incluso algunos tipos de cáncer, lo que ha direccionado el esfuerzo de varios investigadores en la búsqueda de compuestos antioxidantes que permitan detener o retardar este tipo de procesos. Con esto en mente, las biomásas obtenidas del proceso de optimización, se usaron para evaluar su actividad antioxidante buscando determinar, si hay influencia de las variables objetivo, en la potencial bioacción de las biomásas cultivadas bajo dichas condiciones.

Hasta este punto el enfoque del estudio estaba guiado a los compuestos de mediana polaridad, especialmente, ácidos grasos y triterpenoides, componentes mayoritarios de este tipo de extractos de origen fúngico. Si bien a algunos triterpenoides se les han atribuido actividad antioxidante, otros grupos de compuestos y principalmente, los polifenoles, son los antioxidantes por excelencia, y siendo éstos de una mayor polaridad se procedió a comparar el potencial antioxidante de los extractos de alta y mediana polaridad.

Los aspectos anteriormente mencionados serán tratados de manera individual en cada uno de los capítulos que conforman el cuerpo del presente escrito.

...

1 CAPITULO 1 Efecto de la fuente de nutrientes sobre la producción de biomasa y composición de la misma de tres macromicetos comestibles cultivados

1.1 Antecedentes

Los hongos son un grupo de organismos pertenecientes al reino Fungi, con alrededor de 100.000 especies, compuesto por los filos Ascomycota, Basidiomycota, Quiritidomycota, Glomeromycota y Zigomicota(6). Se caracterizan por:

- Ser eucariotas, con niveles de organización unicelular, pluricelular o dimórfico.
- Tener un cuerpo vegetativo o talo constituido principalmente por un conjunto de filamentos, denominados hifas, que al agruparse recibe el nombre de micelio, aunque también se pueden encontrar unicelulares o plasmodiales.
- Presentar paredes celulares definidas compuestas principalmente por quitina y polisacáridos. Sin embargo, en algunos grupos, como los Oomicetes, la quitina es reemplazada por celulosa.
- Las sustancias de reserva son generalmente glicógeno y lípidos.
- Respiración fundamentalmente aerobia, aunque se dan casos de hongos microaerófilos o anaerobios facultativos como las levaduras y algunos mohos.
- Nutrición heterótrofa, requiriendo materia orgánica para su desarrollo, obtenida por absorción de los nutrientes, y por lo tanto realizada por osmosis u osmotrofia, dependiente de la digestión externa por enzimas secretadas al ambiente. No obstante, algunos grupos son fagótrofos.
- Reproducción asexual y sexual por la producción de esporas móviles (planosporas) o inmóviles (aplanosporas), frecuentemente producidas en las fructificaciones. Adicionalmente es común la multiplicación vegetativa por fragmentación de hifas, micelios, y gemación o ruptura de sus fructificaciones, lo cual favorece su distribución en la naturaleza(7).

Desde un punto de vista ecológico pueden ser saprófitos que se caracterizan por obtener los nutrientes a través de digestión externa de materia orgánica muerta; parásitos diferenciados por obtener nutrientes a partir de otros organismos con su posterior daño o

Capítulo 1

muerte(8) o simbióticos con la particularidad de crecer en asociación con otros organismos.

Dentro de los filos pertenecientes a este reino, los basidiomicetos y ascomicetos, forman parte de un grupo catalogado como macromicetos, han sido objeto de diferentes investigaciones, tanto desde el punto de vista biológico, como químico y por supuesto farmacológico, con base en una serie de particularidades que se describirán a lo largo de este manuscrito.

1.1.1 Hongos macromicetos.

Los hongos macromicetos o macromicetes, son aquellos que presentan órganos productores de esporas, denominadas ascocarpos o basidiocarpos correspondientes a los filos Ascomicota y Basidiomicota respectivamente. Estas fructificaciones, también se denominan cuerpo fructífero, carpóforo, esporóforo, esporocarpo(9) o seta(8). y está formado como resultado del crecimiento diferenciado y del entrelazamiento de las hifas, estas últimas de tipo generativo, caracterizadas por la presencia de fíbulas al ser dicarióticas, además de tener la capacidad de crecer y generar otras hifas(7). El cuerpo fructífero cumple la función reproductiva en el hongo macromiceto. En el marco de este trabajo se tomará la denominación de cuerpo fructífero.

La limitación del concepto hongo macromiceto está descrita por varios autores. Cuando sus cuerpos fructíferos son macroscópicos (visibles al ojo humano), nos referimos a hongos macromicetos. Esta división se basa en un principio fundamentalmente práctico, es decir es una clasificación artificial desde un punto de vista filogenético, y tiene en cuenta el tamaño del cuerpo fructífero para separar este grupo del resto. Para Arnolds(10) son aquellos hongos cuyos cuerpos fructíferos tienen tamaños mayores de 1 mm, mientras que para Villeneuve *et al.*(11) la separación se considera a partir de 1 cm. En otros casos, especies de tamaño inferior al establecido se consideran macromicetos, dado que su fructificación masiva los hace reconocibles(12). Pero esencialmente son aquellos que presentan cuerpo fructífero distintivo que puede ser hipógeno o epígeno dependiendo de si sobresale o no del suelo y debe ser observado con el ojo desnudo(8).

Las especies *Grifola frondosa*, *Flammulina velutipes* e *Hypsizygus tessullatus*, forman parte de los hongos macromicetos catalogados como comestibles. Estos organismos

serán empleados para la parte inicial del presente proyecto, con el objetivo de seleccionar uno de ellos para el proceso de optimización de las condiciones de cultivo. A continuación se describirán algunas de las generalidades de estos organismos.

1.1.2 Características generales de las especies *Grifola frondosa*, *Flammulina velutipes* e *Hypsizigus tessullatus*

Estas especies se caracterizan de manera general por: estar clasificadas como comestibles, con propiedades nutricionales de interés como alta cantidad de proteína y baja cantidad de grasa, características generales de los macromicetos comestibles como se puede observar en la Tabla 1-1; pertenecer taxonómicamente a la Clase Agaricomycetes (Tabla 1-2); ser ecológicamente xilófagos, y debido a su capacidad de degradar lignina, además de la celulosa, se denominan hongos de la pudrición blanca; ser considerados como hongos medicinales, debido a sus comprobadas actividades como antitumorales, inmunomoduladores, antioxidantes, trombolíticos, antibacteriales, antifúngicos y antivirales(13)(14). De las características antes mencionadas, sus propiedades nutricionales y medicinales junto a la inclusión al mercado nacional, son la razón para seleccionar a estas especies como los objetos de estudio del presente proyecto de investigación.

Tabla 1-1 Rango de valores nutricionales en hongos macromicetos comestibles

<i>Hongos macromicetos (100 g de peso seco)</i>	
Carbohidratos	35-70%
Proteínas	15-35%
Grasa	<5%
Fibra	4-13%
Vitaminas	Riboflavina (B ₂), tiamina niacina (B ₃), ácido ascórbico, biotina.

Modificado de Rathee et al.(15)

En cuanto a las especies seleccionadas, *Grifola frondosa* es un hongo Basidiomicete perteneciente a la familia Fomitopsidaceae, conocido como Maitake. Crece naturalmente en bosques de zonas templadas y nativos de regiones de China y Europa. Se encuentra en tocones o árboles moribundos, especialmente robles, olmos y arces(16). Desarrolla

Capítulo 1

cuerpos fructíferos anualmente, que pueden alcanzar dimensiones de entre 40-50 cm de ancho, incluso hasta 1 m de diámetro y hasta 18-20 kg peso húmedo, los cuales están ramificados y formados por un gran número de pequeños sombreros de unos 8 cm de diámetro, en forma de abanico, que se encuentran imbricados (Figura 1-1A). Son de color gris a pardo en la parte superior y en la inferior tienen pequeños poros de un color blanquecino(17).

Tabla 1-2. Ubicación taxonómica de *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray, 1821; *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer, 1951; *Hypsizigus tessullatus* (Bull.) Singer, 1947.

Reino	Fungi	Fwungi	Fungi
Subreino	Dikarya	Dikarya	Dikarya
División	Basidiomycota	Basidiomycota	Basidiomycota
Subdivisión	Agaricomycotina	Agaricomycotina	Agaricomycotina
Clase	Agaricomycetes	Agaricomycetes	Agaricomycetes
Orden	Polyporales	Agaricales	Agaricales
Familia	Fomitopsidaceae	Physalacriaceae	Tricholomataceae
Género	<i>Grifola</i>	<i>Flammulina</i>	<i>Hypsizigus</i>
Especie	<i>frondosa</i> (Dicks.) Gray	<i>velutipes</i> (Curtis) Singer	<i>tessullatus</i> (Bull.: Fr.) Sing.

Flammulina velutipes, taxonómicamente pertenece a la familia Physalacriaceae, es popularmente conocido como Enoki. El desarrollo de sus cuerpos fructíferos se da en la temporada de invierno, por tal motivo, se conoce como el hongo de invierno. En Japón ha sido usado como alimento por varios siglos, se cultiva artificialmente y es uno de los hongos más consumidos en Asia, no solo por sus propiedades culinarias sino por sus actividades biológicas(13). El sombrero tiene 2-3 cm de diámetro, convexo en estadios tempranos de su desarrollo y gradualmente plano mientras crece. Su superficie es viscosa cuando está húmeda, de color marrón oscuro o marrón amarillo, usualmente con un margen marrón claro. La carne es blanca al igual que las lamelas, que pueden variar a un color crema claro. El estípite es duro de 2-9 cm de largo y 2-8 mm de diámetro, con una coloración marrón oscuro en su parte baja(18) (Figura 1-1B).

Hypsizigus tessullatus, también conocido como hongo Shimeji, (Figura 1-1C) es un hongo que fructifica en otoño en las zonas frías de los países del norte, y lo hace en forma de racimo, cada uno con 15 a 50 individuos. Puede crecer individualmente presentando un píleo más grande. Este último es de forma hemisférica cuando está joven e involuto en los bordes, el color puede ser blanco, gris-café, con un diámetro de 4-15 cm. Sus láminas son

Capítulo 1

blanquecinas, aserradas y ligeramente esparcidas. El estípite tiene una longitud de 3-10 cm y diámetro de 0,3-0,6 cm. Las esporas presentan forma ovoidal, translucidas bajo el microscopio. Tiene un micelio blanco en forma de plúmula y no presenta exudados líquidos.

Figura 1-1 Cuerpos fructíferos de: A, *Grifola frondosa*; B, *Flammulina velutipes*; C, *Hypsizigus tessullatus*



En los trabajos relacionados con las especies objeto de estudio, los esfuerzos se han enfocado en la evaluación de sustratos o fuentes de nutrientes para aumentar la producción de biomasa o metabolitos(19–25); aislamiento, purificación e identificación de compuestos a partir de cuerpo fructíferos(26–29) o micelio obtenido por fermentación en estado líquido (FEL)(30–32); optimización de parámetros, ya sea, para mejorar la extracción de polisacáridos(33) o para aumentar la producción de metabolitos(13,34), evaluación de bioactividades (23,29,35–41) y desarrollo de nuevas cepas tolerantes a mayores temperaturas(42).

Concerniente a la evaluación de sustratos o fuente de nutrientes, los trabajos antes indicados se han enfocado en el empleo de medios químicamente definidos (sintético), es decir, medios en los que se conoce su composición química exacta. Sin embargo, de manera general los costos asociados a estas son altos. Por tal motivo, evaluar fuentes de nutrientes alternas de bajo costo y fácil adquisición, que le provean a los organismos todos los componentes necesarios para su crecimiento, permitiría incentivar la obtención de biomasa con una alto potencial en bioprospección por medio de la FEL.

Aunado a lo anterior se encuentra el hecho de que las cualidades anteriormente descritas de los macromicetos en general, han incentivado su comercialización en forma de

novedosos productos, que reciben diferentes denominaciones como: suplementos dietarios, alimentos funcionales, nutricéuticos, micofarmacéuticos o alimentos diseñados, incluyendo probióticos o prebióticos, los cuales producen con su consumo diario un beneficio para la salud (43). El aumento en la publicación de artículos enfocados en el estudio de los macrohongos, señalan el esfuerzo por el conocimiento de sus metabolitos, que pueden ser extraídos del cuerpo fructífero, micelio o medio de cultivo, así como de los efectos benéficos que estos organismos pueden brindar. En seguida se discutirá sobre dichos compuestos.

1.1.3 Metabolitos secundarios de origen fúngico.

Los metabolitos secundarios de origen fúngico son compuestos orgánicos sintetizados por el hongo sin un rol directo sobre el crecimiento o reproducción del mismo. Estos pertenecen a distintos grupos, como son aquellos de magnitud molecular grande entre los que se encuentran los polisacáridos, las proteínas y sus complejos, además de metabolitos de bajo peso molecular como fenoles, flavonoides, policétidos, triterpenoides, esteroides, alcaloides nucleótidos, lactonas y ácidos grasos(4), entre otros.

En cuanto a la producción biotecnológica y específicamente desde el punto de vista de la FEL, los polisacáridos son el grupo de compuestos que más atención han recibido. Diversos autores han evaluado la capacidad de producción de polisacáridos a partir de estos organismos sumando un total de 56 especies(4), y sus resultados indican que la mayoría de organismos evaluados, son potenciales productores de exopolisacáridos. Adicionalmente, se ha determinado que la producción de polisacáridos es una característica ampliamente distribuida por varios grupos taxonómicos, y tienen el rol de adhesión al sustrato por parte del hongo, inmovilización de enzimas extracelulares, prevención de la deshidratación de las hifas, almacenamiento del exceso de nutrientes y participación en el degradación de la lignina(44).

Ahora bien, otro grupo de metabolitos que merecen especial atención son los triterpenos, dentro de los cuales se encuentran los triterpenoides. El interés por este grupo de compuestos se ha incrementado debido a la diversidad de actividades biológicas que han sido determinadas y al alto contenido de los mismos en los macromicetos, razón por la cual se profundizará en lo correspondiente a estos fungimetabolitos.

Capítulo 1

1.1.3.1 Terpenos y triterpenos.

Los terpenos son un grupo de compuestos que derivan de una unidad común, constituida por cinco átomos de carbono denominada isopreno (Figura 1-2). Esta relación entre el isopreno es una unión virtual, ya que, este nunca ha sido aislado como producto natural. Sin embargo, la asunción del isopreno como componente de la estructura de los terpenos y el número de unidades de este, por los cuales están constituidos, ha sido de ayuda en la elucidación de sus estructuras. Con base en lo anterior se ha formulado la regla del isopreno, la cual indica que un terpeno debe ser formalmente divisible en diferentes unidades isoprenoides, lo que lleva a la clasificación con base en los múltiplos de este (Tabla 1-3).

Figura 1-2 Estructura del isopreno

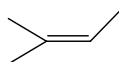


Tabla 1-3. Clasificación de terpenos según número de unidades de isopreno.

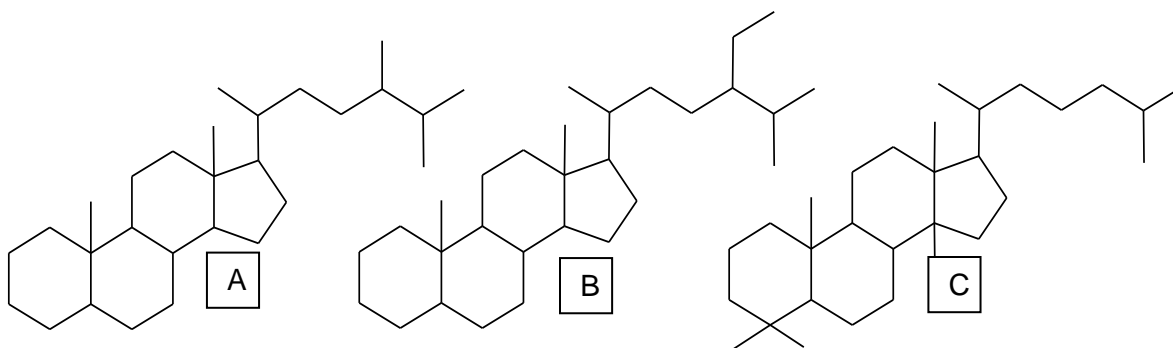
Nombre	Formula	Número de unidades de isopreno
Monoterpenos	C ₁₀ H ₁₆	2
Sesquiterpenos	C ₁₅ H ₂₄	3
Diterpenos	C ₂₀ H ₃₂	4
Sesterpenos	C ₂₅ H ₄₀	5
Triterpenos	C ₃₀ H ₄₈	6
Tetraterpenos	C ₄₀ H ₆₄	8
Politerpenos	C _{5n} H _{8n}	n

Los triterpenos se caracterizan por tener una estructura básica compuesta por 30 átomos de carbono. Son sintetizados a partir del escualeno, triterpeno precursor de los esteroides. Se denominan triterpenoides cuando se presentan grupos funcionales oxigenados como sustituyentes en su estructura. Desde el punto de vista estructural se pueden encontrar triterpenos acíclicos o cíclicos y dentro de estos últimos están los tetracíclicos y los pentacíclicos.

1.1.3.2 Triterpenoides en hongos macromicetos.

Los hongos macromicetos tienen la capacidad de biosintetizar una amplia diversidad estructural relacionada con este grupo de metabolitos. Los esqueletos más comunes son los tetracíclicos de tipo ergosta, estigmasta y lanosta (Figura 1-3), con variaciones en el tipo de sustituyentes, el número y la posición de las insaturaciones.

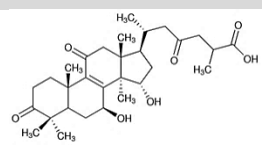
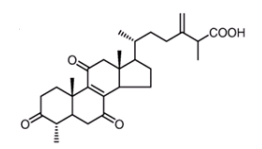
Figura 1-3. Núcleos de triterpenos más comunes en hongos macromicetos. A) Ergosta, B) Estigmasta y C) Lanosta



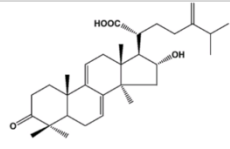
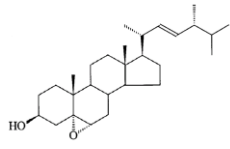
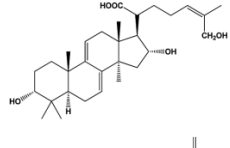
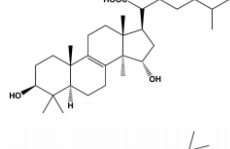
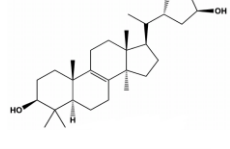
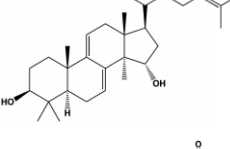
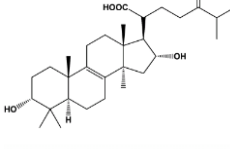
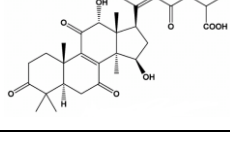
Entre los hongos macromicetos más estudiados se encuentra el género *Ganoderma sp.*, reconocido por su alto contenido de este grupo de metabolitos, a partir del cual se han aislado más de 316 triterpenos, obtenidos de cuerpos fructíferos, esporas, himenio, y micelio(2). De este género, *Ganoderma lucidum*, es considerado el hongo de la longevidad y ha sido usado por más de 2000 años en la medicina tradicional China como promotor de la buena salud. El grupo de triterpenos más estudiado en esta especie son los ácidos ganodéricos (AG), caracterizado por presentar un núcleo lanostano y destacados por la variedad de actividades biológicas comprobadas, como se discutirá en el capítulo 3.

En la Tabla 1-4 se muestran las estructuras de algunos triterpenoides aislados de macromicetos, ilustrando la diversidad estructural encontrada en este grupo de organismos.

Tabla 1-4. Triterpenoides identificados en distintas especies de hongos macromicetos

ESPECIE	NOMBRE DEL COMPUESTO	ESTRUCTURA	REF.
<i>Ganoderma lucidum</i>	Ácido ganodérico A		(2)
<i>Antrodia cinnamomea</i>	Antcina B (ácido zhankuic A)		(45)

Capítulo 1

ESPECIE	NOMBRE DEL COMPUESTO	ESTRUCTURA	REF.
<i>Fomitopsis rosea</i>	Ácido poli-porenico C		(46)
<i>Cordyceps sinensis</i>	5 α ,6 α -epoxi-24(R)-metil colest-7,22-dien-3 β -ol		(47)
<i>Poria cocos</i>	Ácido 16 α ,27- dihidroxidehidrotrametenico		(3)
<i>Laetiporus sulphureus</i>	Ácido sulfurénico		(3)
<i>Inonotus obliquus</i>	Inonotsuoxido A		(3)
<i>Antrodia camphorata</i>	Ácido 3 β ,15 α - dihidroxilanosta-7,9(11),24-trien-21-oico		(3)
<i>Daedalea dickinsii</i>	Ácido daedaleanico B		(3)
<i>Elfvíngia applanata</i>	Ácido elfvíngico A		(3)

1.1.3.2.1 Estudios sobre triterpenoides en el grupo de investigación de Química de Hongos Macromicetos.

Relacionado con procesos de bioprospección de triterpenoides, el grupo de Química de Hongos Macromicetos, ha evaluado diversos factores involucrados en la producción de estos compuestos. Uno de los trabajos evaluó el efecto de la técnica de secado de la biomasa del hongo macromiceto *Ganoderma lucidum*, sobre la producción de triterpenos, empleando tratamientos de 40 °C y 80 °C, encontrando una influencia del calentamiento, relacionado con una menor cantidad de triterpenoides al aumentar la temperatura(48).

Otra investigación se enfocó en evaluar la composición de triterpenoides en el micelio y el cuerpo fructífero de *Lentinula edodes*, encontrándose una mayor producción de triterpenoides en este último. Adicionalmente, se ha evaluado la composición de metabolitos tanto en hongos nativos(49)(50)(51)(52)(53), así como en hongos obtenidos a través de cultivo tradicional(54) y por FEL(54)(55)(56), permitiendo determinar que el tipo de sustrato y la composición del medio de cultivo, presentan un efecto directo sobre la producción de triterpenoides.

1.1.4 Metodologías de cultivo de hongos macromicetos.

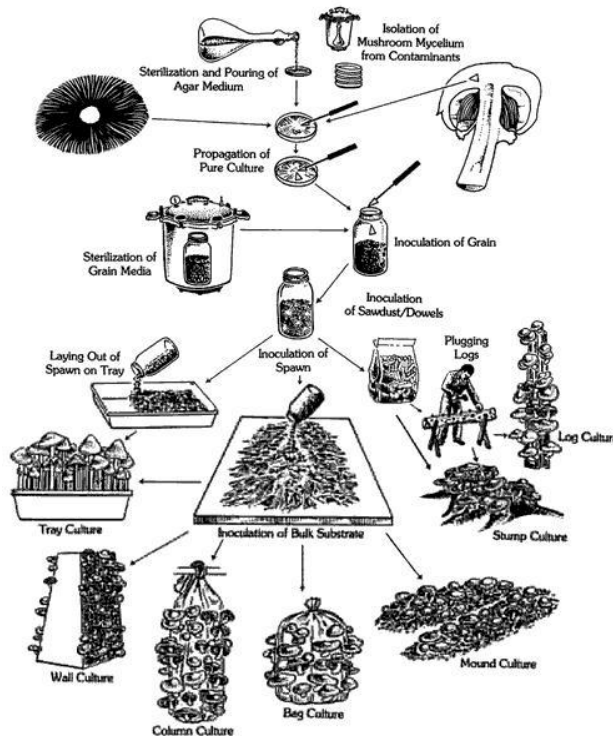
Los estudios hasta aquí presentados reafirman el potencial de los hongos, hecho que ha estimulado la búsqueda de herramientas que permitan la obtención de una mayor cantidad de biomasa, a través del empleo tanto de técnicas tradicionales como de procesos biotecnológicos de cultivo.

1.1.4.1 Cultivo tradicional.

Con esta metodología se busca obtener la mayor cantidad de biomasa (cuerpo fructífero) con las características homogéneas y organolépticas requeridas para su comercialización como alimento, siendo este el principal objetivo. El proceso se compone, en términos generales, de las siguientes etapas, que pueden variar dependiendo de los requerimientos particulares de cada hongo: elección de la cepa, preparación del sustrato, inoculación, incubación, y fructificación (Figura 1-4). Generalmente se utilizan residuos de la industria agrícola como sustratos, aprovechando la cualidad que tienen los hongos de degradar, a través del empleo de enzimas, una amplia gama de constituyentes de esta clase de materiales.

Para obtener biomasa fúngica, se ha optado principalmente por el cultivo tradicional, del cual el producto final son los cuerpos fructíferos. La eficiencia de este proceso es alta, en términos de la cantidad del organismo obtenida, sin embargo, se requiere gran cantidad de tiempo para la producción, entre otras desventajas(21), por lo cual recientes esfuerzos se han enfocado en el uso de tecnologías de fermentación, aprovechando el micelio del hongo como fuente de biomasa.

Figura 1-4. Proceso involucrado en la obtención de cuerpos fructíferos por cultivo tradicional



Tomado de Staments(16)

1.1.4.2 Fermentación en estado sólido.

Este tipo de cultivo se caracteriza por el desarrollo de microorganismos en sustratos sólidos húmedos, que además de ser utilizados como soporte del micelio, son fuente de nutrientes. Se debe resaltar que la aplicación de técnicas de fermentación implica la obtención de micelio como producto, en contraste con el cultivo tradicional, en el cual se busca obtener cuerpos fructíferos. El proceso se lleva a cabo en ausencia de agua libre, lo cual se traduce en una importante ventaja relacionada con la similitud de las condiciones en las cuales se desarrolla el hongo en su ambiente natural, a las cuales está adaptado. Otra diferencia con el cultivo tradicional, es el control de las condiciones de manera más exacta debido al uso de biorreactores, que permiten definir las condiciones de cultivo ideales. No obstante, este tipo de fermentación tiene poco alcance para su aplicación en la producción de enzimas o metabolitos secundarios, debido a que presenta varios inconvenientes entre ellos, la dificultad en el control de los gradientes de temperatura, pH, humedad, oxígeno y concentración de nutrientes(57). Por tal motivo la FEL ha tenido un uso más amplio para la obtención de biomasa y metabolitos.

Capítulo 1

En cuanto al cultivo en cajas de Petri, que comparte características con el cultivo en estado sólido y que será denominado en este trabajo fermentación superficial (FeSup), se ha empleado como herramienta para seleccionar especies de hongos macromicetos o medios de cultivo que generen el mayor crecimiento o producción de biomasa(58,59).

1.1.4.3 Fermentación en estado líquido.

La fermentación en estado líquido o cultivo sumergido, es una alternativa eficiente para la producción de biomasa y metabolitos de hongos macromicetos. Las ventajas de esta técnica sobre la producción en sustrato sólido o tradicional son: Mayor producción de biomasa o metabolitos biológicamente activos, control sobre las condiciones de cultivo, fácil recuperación del producto, proceso fermentativo en un espacio más reducido, menor tiempo de producción, menores costos, y baja probabilidad de contaminación(21). Adicionalmente asegura una producción estándar en términos de calidad y composición del producto. El proceso de FEL se realiza en matraces, o biorreactores dependiendo de la escala requerida y en el caso de estos últimos con la posibilidad de controlar condiciones como la aireación, pH o nutrientes en el transcurso del proceso, siendo más comunes las fermentaciones tipo lote y lote alimentado(60). El efecto de las diversas condiciones de cultivo sobre el producto biotecnológico, serán analizados en el capítulo 2.

A pesar que, el cultivo de hongos en Colombia, comparado con los países orientales e incluso algunos de nuestra latitud, no ha tenido mucho desarrollo, el consumo de estos se ha incrementado debido a sus cualidades nutricionales. Sin embargo, las especies generalmente consumidas corresponden a los cuerpos fructíferos de los géneros *Pleurotus sp.* (orellanas), *Agaricus sp* (champiñón) y *Lentinula edodes* (Shiitake) que como se indicó anteriormente, puede variar su calidad por el poco control de las condiciones para su producción, así como incrementar el tiempo de cultivo.

Teniendo esto en cuenta, una alternativa es emplear el micelio como fuente de biomasa, así pues, el estudio del efecto de fuentes de nutrientes alternativas a las tradicionales para la producción de macromicetos de reciente inclusión en el mercado nacional, como son *G. frondosa*, *F. velutipes* e *H. tessulatus*, permitirá determinar las mejores condiciones de producción de biomasa, además del efecto en su composición.

Con base en lo anterior, el objetivo de este capítulo es la presentación de los resultados que permitieron determinar y comparar la interrelación entre de la FEL y la FeSup como técnicas de producción de biomasa de las tres especies de macromicetos anteriormente

mencionadas, así como evaluar el efecto de distintas fuentes de nutrientes sobre la producción del micelio obtenido por FEL y la composición de su fracción de mediana polaridad, para finalmente seleccionar una especie y dos fuentes de nutrientes, que serán usadas en el proceso de optimización.

1.2 Materiales y métodos

1.2.1 Material fúngico

Las cepas de *G. frondosa*, *H. tessulatus* y *F. velutipes*, fueron donadas por la empresa Setas Exóticas de Colombia S.A.S. Se activaron empleando medio PDA, oscuridad, pH 6,00, temperatura de 25°C durante 12 días, y posteriormente se mantuvieron a 4°C hasta su uso (cepas madre).

1.2.2 Fuentes de nutrientes

El contenido de C y N de las fuentes de nutrientes empleadas fue determinado en un analizador elemental Thermo FLASH 2000 Organic Elemental Analyzer. Dichas fuentes fueron seleccionadas con base en una relación C/N alta, media y baja(55), de la siguiente manera: a) Baja - Harina de soja (SY); b) Media - harina de trigo integral (HTI), semillas de linaza molida (LZ) y c) Alta - harina de maíz blanco (HMB) y harina de maíz amarillo precocido (HMA). Sumado a estas, se utilizó salvado de trigo, debido a que ya había sido empleado en estudios previos, dando excelentes resultados en términos de la variedad estructural de compuestos triterpenoidales que genera su uso como fuente de nutrientes para el cultivo de tres especies del género *Pleurotus* en FEL(55).

1.2.3 Cultivo por fermentación superficial (FeSup)

A partir de las cepas madre de cada especie, se tomaron inóculos de ~0,5 cm de diámetro, compuestos de agar y micelio, que fueron ubicados en el centro de una caja de Petri en un medio con la siguiente composición (g/L): fuente de nutrientes 30; extracto de levadura 5, sacarosa 5 y agar 23,5. El pH se ajustó a 6,00 y se encubaron a 25°C en oscuridad. Se tomaron medidas diarias del crecimiento en cuatro radios marcados sobre

la caja de Petri, hasta colonización total, con triplicados de cada tratamiento. Para posteriormente determinar la biomasa, se separó el medio de cultivo del micelio a través de calentamiento, disolución en agua del agar y filtración. El micelio se sometió a un proceso de secado en horno a 45°C hasta peso constante, para determinación de su biomasa expresada como biomasa seca/L.

1.2.4 Cultivo por fermentación en estado líquido

Matraces de 100 mL con 25 mL de un medio compuesto por NaNO_3 (80 mg/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (20 mg/L), KH_2PO_4 (30 mg/L), KCl 10 (mg/L)(55), fueron suplementados con 30 g/L de las fuentes de nutrientes. Los medios de cultivo fueron llevados a un pH de 6,00 y posteriormente esterilizados. Como inóculo se utilizaron 4 discos de 0,5 cm de diámetro compuestos de micelio y agar. Los matraces se llevaron a un agitador orbital a 100 rpm, durante 11 días a 25°C, tiempo después del cual la biomasa se filtró y secó hasta peso constante expresándola como biomasa seca/L. Todos los reactivos empleados fueron marca Acumedia.

1.2.5 Determinación de la composición de las biomásas obtenidas por FEL.

Se realizó la extracción asistida con ultrasonido de las biomásas secas empleando CH_2Cl_2 a temperatura ambiente. Los extractos se desecaron con Na_2SO_4 anhidro y se llevaron a sequedad en rotaevaporador. Posteriormente fueron caracterizados por CG-EM en un cromatógrafo marca Hewlett Packard 6890 con una columna capilar ZB-5 (30 m, 0,25 mm D.I., 0,25 μm), acoplado a un espectrómetro de masas Hewlett Packard 5973 con fuente de ionización de 70 eV, bajo las siguientes condiciones: Helio 1,1 mL/min; modo Splitless; temperatura del inyector 300 °C; rampa de calentamiento 60 °C 1 min: 7,4 °C/min hasta 310 °C - 10 min. Los componentes de cada extracto fueron determinados mediante comparación con la base de datos NIST, y por medio del análisis del patrón de fragmentación dado por los espectros de masas. Los porcentajes de área relativa para cada uno de los metabolitos determinados, fueron calculados a partir de los TIC.

De igual los extractos fueron analizados por CCD empleando como fase móvil tolueno:acetato de etilo (8:2) en cromatoplasas Alugram SIL G/UV₂₅₄ Macherey Nagel,

como revelador universal UV a 254 y 365 nm y específico para núcleos esteroidales una solución de $ZnCl_2$ al 30% con posterior calentamiento(61).

1.2.6 Análisis estadístico

Los resultados de la producción de biomasa seca obtenida por FeSup fueron expresados como el promedio de 3 réplicas y los resultados de la producción de biomasa seca obtenida por FEL como el promedio de 2 réplicas. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, empleando el programa estadístico R-project(62) (R Development Core Team, 2017). Un valor de $P < 0,05$ se consideró como significativo.

1.3 Resultados y discusión

Con el objetivo de determinar el efecto de la variación de algunas condiciones de cultivo sobre la producción de biomasa seca y la composición de la misma, se cultivaron los hongos seleccionados empleando seis fuentes de nutrientes no tradicionales como los componentes principales del medio de cultivo y los únicos proveedores de nutrientes para dichos organismos. Esta primera fase de la investigación se adelantó empleando dos técnicas de cultivo: FeSup y FEL, con el objetivo de determinar si la primera de ellas podría ser empleada como una herramienta rápida y con resultados confiables de *screening* preliminar, como ya ha sido reportado por otros autores(58,59).

1.3.1 Caracterización de las fuentes de nutrientes

Es ya conocido que la producción de macromicetos, independientemente del tipo de cultivo usado, es fuertemente influenciada por la composición del sustrato o el medio empleado, razón por la cual se hace necesario conocer algunas características de la composición de la fuente de nutrientes empleada, dentro de las cuales merecen especial atención la relación C/N, el contenido de carbohidratos y grasas. En la Tabla 1-5, se encuentran resumidos los resultados de la determinación de C y N, reportado para las harinas empleadas como fuentes de nutrientes en este estudio. De su análisis se puede deducir que hay diferencias mayoritariamente asociadas con el contenido de grasas, carbohidratos, N y por ende proteína. Se destaca la harina de soya por su alto contenido de N y proteína, la linaza por el alto contenido de grasas y las harinas de maíz blanco y

amarillo por el alto contenido de carbohidratos y bajo de N y proteína. En contraste, la harina de trigo integral presenta un bajo contenido de grasas y la linaza de carbohidratos.

Tabla 1-5. Composición de las fuentes de nutrientes evaluadas

Fuente de nutrientes*	%C(63)	%N(63)	C/N(63)	Grasa	Carbohidratos	Proteína
Soya	46,64	5,27	8,84	21	32	38
Linaza	54,80	2,65	20,64	42	29	18
Trigo integral	40,81	2,26	18,01	2,5	72	13
Salvado de trigo	41,54	2,73	15,22	4,3	65	16
Maíz blanco	41,51	1,15	36,07	3,9	77	6,9
Maíz amarillo	40,25	0,97	41,14	3,9	77	6,9

* Harinas de cereales y leguminosas

Una vez caracterizadas las fuentes de nutrientes, se procedió con el cultivo empleando FeSup.

1.3.2 Fermentación superficial

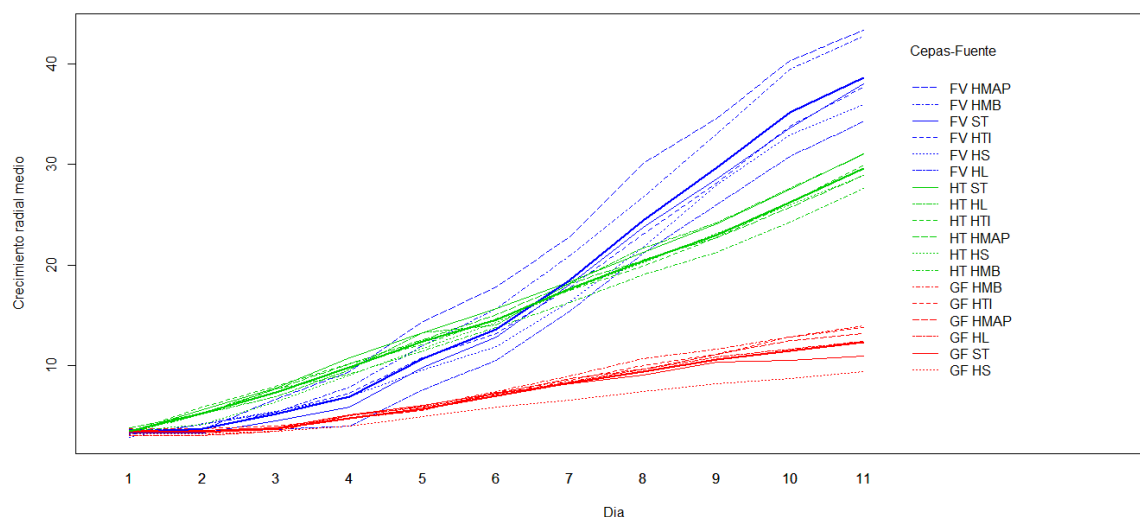
En la FeSup, el desarrollo del micelio por parte del hongo se puede dar de dos maneras: el micelio vegetativo, el cual se relaciona con la obtención de nutrientes del medio y es determinado por medio del crecimiento radial; y el micelio aéreo, desarrollado por algunas especies para favorecer el proceso respiratorio al incrementar la difusión del oxígeno y así generar la energía necesaria para mantener el metabolismo celular(65). El desarrollo de micelio aéreo se observó en los tres hongos estudiados independientemente de la fuente de nutrientes empleada, por tal motivo, además de un seguimiento al crecimiento radial en cada caso, se realizó la medición de la biomasa obtenida, lo cual brinda una medida más exacta del desarrollo de estos organismos en cada tratamiento.

En lo que respecta al efecto de la especie sobre el crecimiento micelial, los resultados (Figura 1-5), permiten observar que *G. frondosa*, presenta un menor crecimiento comparado con las demás especies, indistintamente de la fuente de nutrientes. Lo anterior, puede ser explicado desde un punto de vista biológico, teniendo en cuenta que, aunque los hongos estudiados presentan la misma estrategia trófica de saprofitismo para la obtención de nutrientes, tienen un comportamiento característico debido a sus diferentes procesos de aclimatación al medio(66) relacionado con variaciones genéticas entre especies(67).

Capítulo 1

En cuanto al efecto de la fuente de nutrientes sobre el crecimiento radial de cada organismo, del análisis de la Figura 1-5 se evidencia un efecto diferenciado, dependiente de la especie cultivada, ratificando el resultado discutido anteriormente, el cual es similar al obtenido por Zăgrean *et al.*(67), donde incluso cuatro diferentes cepas de *Pleurotus eryngii*, cultivadas en el mismo medio, presentaron diferencias en el crecimiento.

Figura 1-5. Efecto de la especie y de la fuente de nutrientes sobre el crecimiento radial.



FV: *Flammulina velutipes*, HT: *Hypsizigus tessulatus*, GF: *Grifola frondosa*. HL: Linaza, HMAP: harina de maíz amarillo pre-cocido, HMB: harina maíz blanco, HS: harina de soya, HTI: harina de trigo integral y ST: salvado de trigo. n = 3

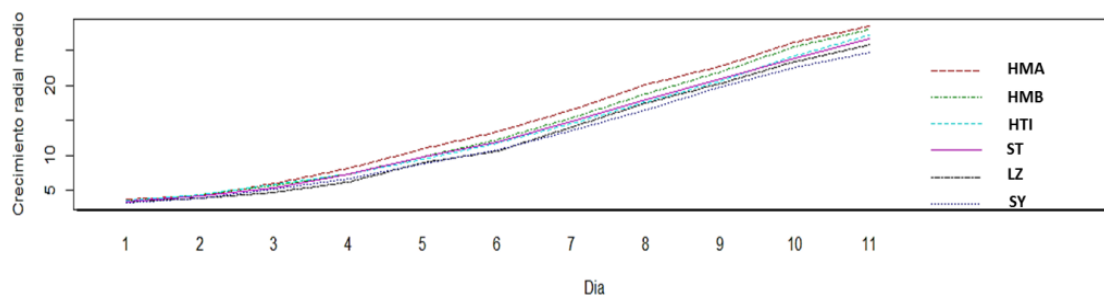
Adicionalmente se evidencia que para *H. tessulatus* y *F. velutipes* a partir del día 7, hay un cambio en la tendencia que hasta ese momento tenía el primero de ellos de presentar el mayor crecimiento radial, siendo finalmente *F. velutipes* el hongo que mayor crecimiento tuvo independientemente de la composición del medio.

En cuanto al efecto de la fuente de nutrientes sobre el crecimiento de las especies evaluadas, en la Figura 1-6 se encuentra graficado la media de los valores de crecimiento radial para las tres especies, de cuyo análisis se puede concluir que no hay un efecto marcado de éstas sobre el crecimiento en caja de Petri, a pesar de presentar diferencias en la composición de las mismas, tal como se describió en el numeral 1.3.1. Tal es el caso del contenido proteico, una de las variables que se ha clasificado como determinante en los procesos de cultivo de cualquier organismo y de la cual se conoce, que para el

Capítulo 1

caso particular de los hongos, un aumento de la misma en el medio incrementa la biomasa obtenida(68). La harina de soya y el salvado de trigo tienen contenidos proteicos de 38 % y 16 % respectivamente(64), razón por la que se esperarían diferencias entre los crecimientos radiales, tendencia que no se da en este caso.

Figura 1-6. Efecto de la fuente de nutrientes sobre el crecimiento radial medio

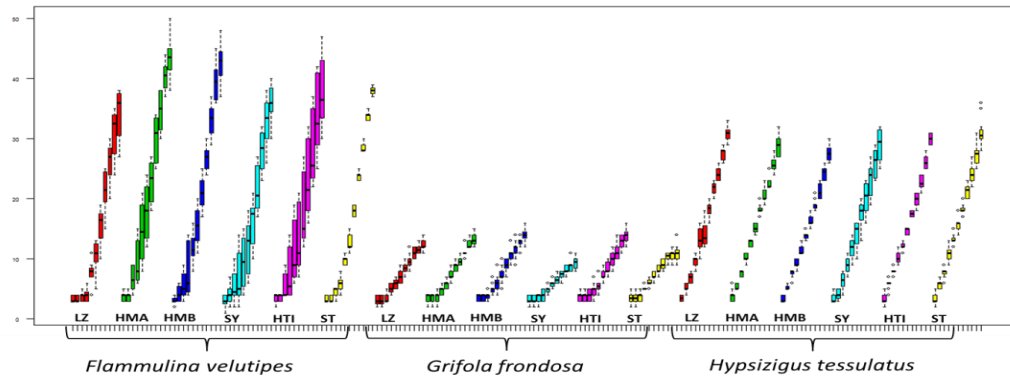


LZ (Linaza), HMA (harina de maíz amarillo pre-cocido), HMB (harina maíz blanco), SY (harina de soya), HTI (harina de trigo integral) y ST (salvado de trigo). n = 3

Otro fenómeno observado entre especies, es la variabilidad del crecimiento radial en cada uno de los días evaluados (Figura 1-7), siendo *F. velutipes* la que presenta la mayor variabilidad. Este factor, llama la atención por el hecho de que hay un aumento de la misma en el transcurso del tiempo, llegando a un punto en el cual, no se observa diferencia estadística entre especies, comportamiento que permite optar por especies que presenten un crecimiento radial estable o con poca variabilidad dentro de las mediciones, como es el caso del *H. tessulatus*.

Una vez evaluado el efecto de la fuente de nutrientes y del hongo empleado sobre el crecimiento radial es necesario, antes indicado, establecer el efecto sobre la cantidad de biomasa obtenida empleando este tipo de cultivo. Del análisis estadístico (Figura 1-8) se puede evidenciar que *G. frondosa*, independiente de la fuente de nutrientes, es la especie de menor producción (entre 0,58 y 1,04 g/L de biomasa seca), concordante con el crecimiento radial antes descrito, contrario a las demás especies con las que se obtienen entre 3,00 y 7,00 g/L de biomasa seca. Las fuentes de nutrientes de mayor producción son harina de maíz blanco para *F. velutipes* (HMB.FV) y harina de soya para *H. tessulatus* (SY.HT). Para los demás casos no hay un comportamiento diferente. Además, es importante resaltar que en fermentación superficial y para las especies estudiadas, la producción de biomasa no presenta un patrón dependiente de la fuente de nutrientes.

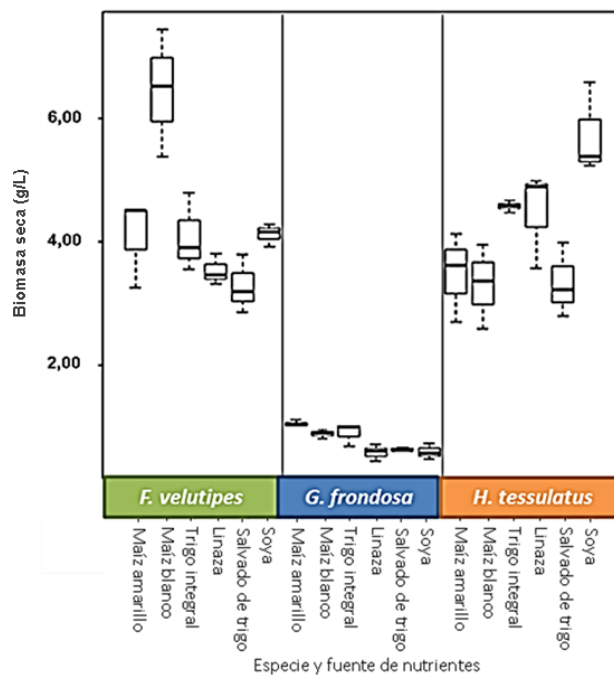
Figura 1-7. Variabilidad en el crecimiento radial de las especies a lo largo de 11 días según las fuentes de nutrientes.



LZ (Linaza), HMA (harina de maíz amarillo pre-cocido), HMB (harina maíz blanco), SY (harina de soya), HTI (harina de trigo integral) y ST (salvado de trigo).

Se debe destacar que este es el primer estudio enfocado al crecimiento de estas especies en FeSup empleando fuentes de nutrientes alternativas, por ende no se puede comparar con reportes previos. No obstante, en estudios hechos en el grupo de Química de Hongos Micromicetos, se han observado estas diferencias en el comportamiento entre especies, particularmente en el género *Pleurotus* (69).

Figura 1-8. Variación sobre la producción de biomasa seca con diferentes fuentes de nutrientes empleando fermentación en estado superficial.



Capítulo 1

FV: *Flammulina velutipes*; GF: *Grifola frondosa*; HT: *Hypsizygus tessulatus*; LZ: Linaza; HMA: harina de maíz amarillo pre-cocido; HMB: harina maíz blanco; SY: harina de soya, HTI: harina de trigo integral; ST: salvado de trigo. n=3

Una vez determinado el comportamiento de los tres hongos en las diferentes fuentes de nutrientes al emplear FeSup, se procedió al cultivo con el uso de FEL, para comparar las tendencias obtenidas por las dos técnicas.

1.3.3 Fermentación en estado líquido

A diferencia del resultado obtenido con FeSup, la biomasa seca producida a partir de la FEL (Figura 1-9), no muestra un comportamiento diferencial entre los hongos. Así mismo, se evidencia para todos los organismos un aumento en la producción de micelio, particularmente con *G. frondosa*, mostrando un claro efecto negativo de las condiciones de cultivo (aireación, disponibilidad de nutrientes, etc.) al emplear FeSup sobre su producción de biomasa, bajo las condiciones evaluadas. Por tal razón se descarta el uso de la FeSup como una herramienta de selección de especie y/o de fuente de nutrientes debido a la diferencia en las tendencias de producción de biomasa obtenidas.

Contrario a los resultados obtenidos en FeSup sobre el efecto de las especies en la cantidad de micelio producida, desde el punto de vista de las fuentes de nutrientes, si se evidencian claras diferencias que incluso permiten definir las siguientes agrupaciones: alta (12 - 10 g/L), media (10 – 5 g/L) y baja (5 – 3 g/L), donde en términos generales, la harina de soya se encuentra conformando el grupo de mayor producción, seguido por harina de trigo integral, maíz amarillo y blanco en el rango medio, y finalmente linaza y salvado de trigo en el bajo. Inicialmente, se observa que la C/N del medio de cultivo no tiene influencia en la producción de biomasa para las especies evaluadas, resultado que ya ha sido observado por otros autores y que al parecer depende del organismo objeto de estudio(54).

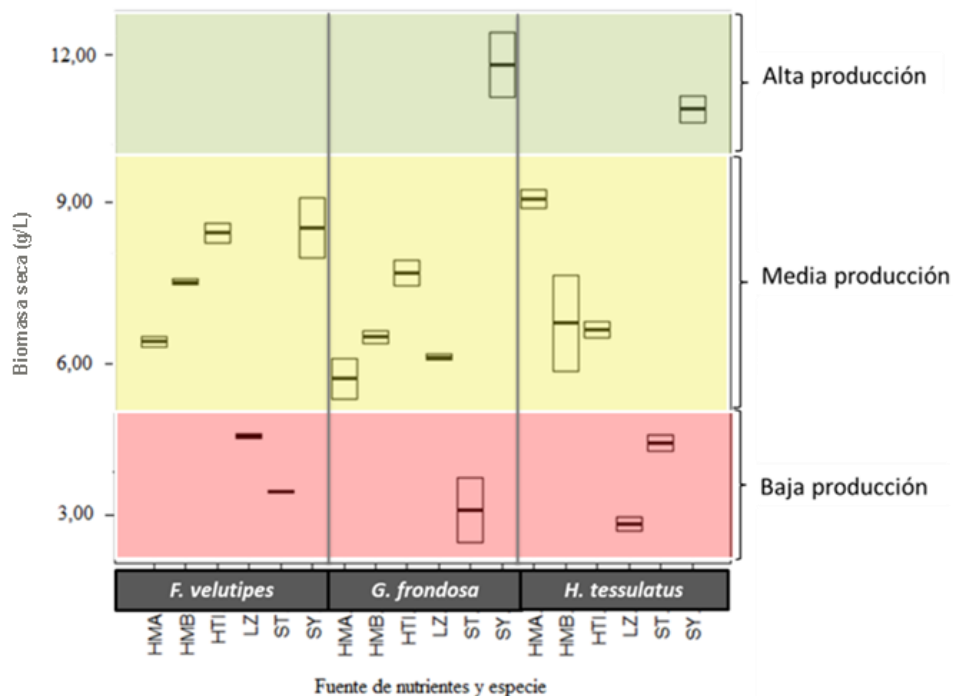
Por otro lado, la alta producción de biomasa obtenida empleando harina de soya, puede estar relacionada con el mayor contenido de proteína de esta fuente(64), que aumenta la disponibilidad de nitrógeno en el medio para el crecimiento de las especies, parámetro ya reportado por otros autores(70) como determinante para el cultivo fúngico. En cuanto a la composición de la LZ y el ST y su efecto sobre la baja producción de biomasa, estas tienen diferencias entre sus contenidos de grasas (41 g y 4,3 g respectivamente) y

Capítulo 1

carbohidratos (29 g y 65 g respectivamente), pero similitudes en su contenido de N y proteína (2,65 % y 2,73 % y 16 y 18% respectivamente), ratificando un preponderante efecto del aporte de estos últimos componentes de la fuente de nutrientes, sobre la producción de biomasa en FEL, resaltando que hay efecto diferenciado para *G. frondosa* en LZ.

Además, otra posible explicación a este comportamiento, estaría relacionada con la cantidad efectiva de fuente de nutrientes que queda en el medio después de realizar el proceso de filtrado. En la Figura 1-10, se evidencia que al emplear el salvado de trigo, la cantidad de este disponible para ser utilizada por el hongo, es inferior comparada con las fuentes de nutrientes restantes, lo que puede generar disminución en el crecimiento del hongo, debido a la menor disponibilidad de nutrientes aportada por el medio de cultivo.

Figura 1-9. Producción de biomasa seca por fermentación líquida de las especies *Flammulina velutipes*, *Grifola frondosa* e *Hypsizigus tessulatus* en las diferentes fuentes de nutrientes.

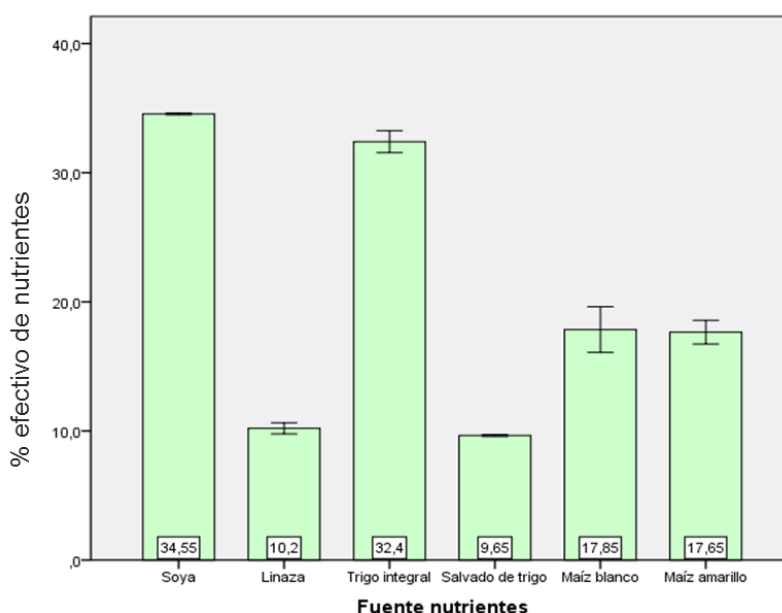


Especies: FV (*Flammulina velutipes*), GF (*Grifola frondosa*), HT (*Hypsizigus tessulatus*), Fuentes de nutrientes: LZ (Linaza), HMA (harina de maíz amarillo precocido), HMB (harina maíz blanco), SY (harina de soya), HTI (harina de trigo integral) y ST (salvado de trigo). n=2.

Capítulo 1

Cabe resaltar, que al comparar la cantidad de biomasa obtenida por FEL vs FeSup, no hay similitud entre las tendencias de producción de biomasa con estas dos técnicas, resultando ser la FEL más eficiente. Lo anterior puede atribuirse a la fuerte influencia de parámetros ambientales o de cultivo, incluyendo la composición del medio(66), así como la disponibilidad de nutrientes y oxígeno(71), tanto sobre la producción de biomasa como la biosíntesis de metabolitos. En consecuencia, la agitación empleada en la FEL permitiría mejorar la disponibilidad, no solo de los nutrientes, sino del oxígeno, situación que no ocurre en la fermentación superficial, obteniendo así comportamientos diferenciados de una técnica a otra.

Figura 1-10. Porcentaje de fuente de nutrientes efectiva en medio de cultivo después del proceso de filtración. n = 2.



De manera particular para *F. velutipes* la mayor producción de biomasa seca se obtiene empleando harina de soya y harina de trigo integral con 8,4860 y 8,3840 g/L respectivamente. Estos resultados son cercanos a los obtenidos por otros autores como Mau y Ma(72) quienes reportan una producción de 9,4 y 13,5 g/L en 10 y 12 días de cultivo con un medio compuesto principalmente de glucosa, extracto de maíz líquido, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y otras sales. Otros autores obtuvieron una menor producción empleando glucosa, entre otras fuentes de nutrientes: Maziero *et al.*(73) 4,86 g/L después de 7 días y 8,28 g/L después de 14 días; Kim *et al.*(34) 3,37 – 4,4 g/L después de 10 días; Diamantopoulou *et al.*(66) 7,0 g/L en el día 12; Hassan *et al.*(13) ~ 4,30 g/L al día 10 de

Capítulo 1

cultivo. Con los resultados arrojados por la presente investigación, se pone de manifiesto el potencial de emplear fuentes de nutrientes alternativas que aportan, además de carbohidratos y proteínas, sales que pueden favorecer la producción de biomasa para esta especie.

Para *G. frondosa* la mayor producción se obtuvo con harina de soya (11,4620 g/L), seguido de harina trigo integral (7,6520 g/L), resultados por debajo de lo conseguido por Zapata *et al.*(20) con 19,21 g/l en el día 10, quienes de manera similar emplearon un medio compuesto de harinas junto a peptona, licor de maíz y sales. Entre otros trabajos en los que emplean en común glucosa y varían la fuente de nitrógeno, se encuentran el de Lee *et al.*(36) con 17,0 g/L el día 9; Cui *et al.*(74) quienes obtuvieron un máximo de 16,69 g/l, el día 7; Chimilovski *et al.*(23) con 19,11 g/L y Tao *et al.*(75) 12,5 g/l en 6 días. Estos resultados indican, ya sea que, el medio compuesto únicamente de harinas no es benéfico para la producción de biomasa de *G. frondosa* o que la cepa estudiada produce un menor rendimiento, comparada con las empleadas en los demás trabajos.

Finalmente con *H. tessulatus* se obtuvo la máxima producción de biomasa seca empleando harina de soya, seguido de harina de maíz amarillo con 10,6480 y 9,0020 g/L respectivamente. Hay pocos reportes con respecto a la producción de micelio de esta especie, sin embargo, Wang *et al.*(76) obtuvieron 16,2 g/L a los 8 días de cultivo con un medio compuesto de glucosa, almidón de maíz, extracto de frijol y MgSO₄. Se hace importante anotar que los autores realizan un proceso de optimización que les permite evaluar diversas condiciones, enfocado a aumentar la producción de biomasa, lo cual se refleja en sus resultados.

Habiendo establecido que no hay una correlación entre los resultados obtenidos por FeSup y por FEL y después de determinar el efecto que tiene la fuente de nutrientes sobre la cantidad de biomasa obtenida por esta última técnica, es importante definir la influencia sobre la composición del micelio del hongo, teniendo en cuenta que la actividad biológica se relaciona con los compuestos presentes, lo cual es una herramienta que permitirá definir una especie para el posterior proceso de optimización con miras a la bioprospección.

1.3.3.1 Composición de la biomasa cultivada por FEL.

La fracción de mediana polaridad de las macromicetos, indistintamente de la procedencia de la biomasa estudiada, está mayoritariamente constituida por ácidos grasos, sus

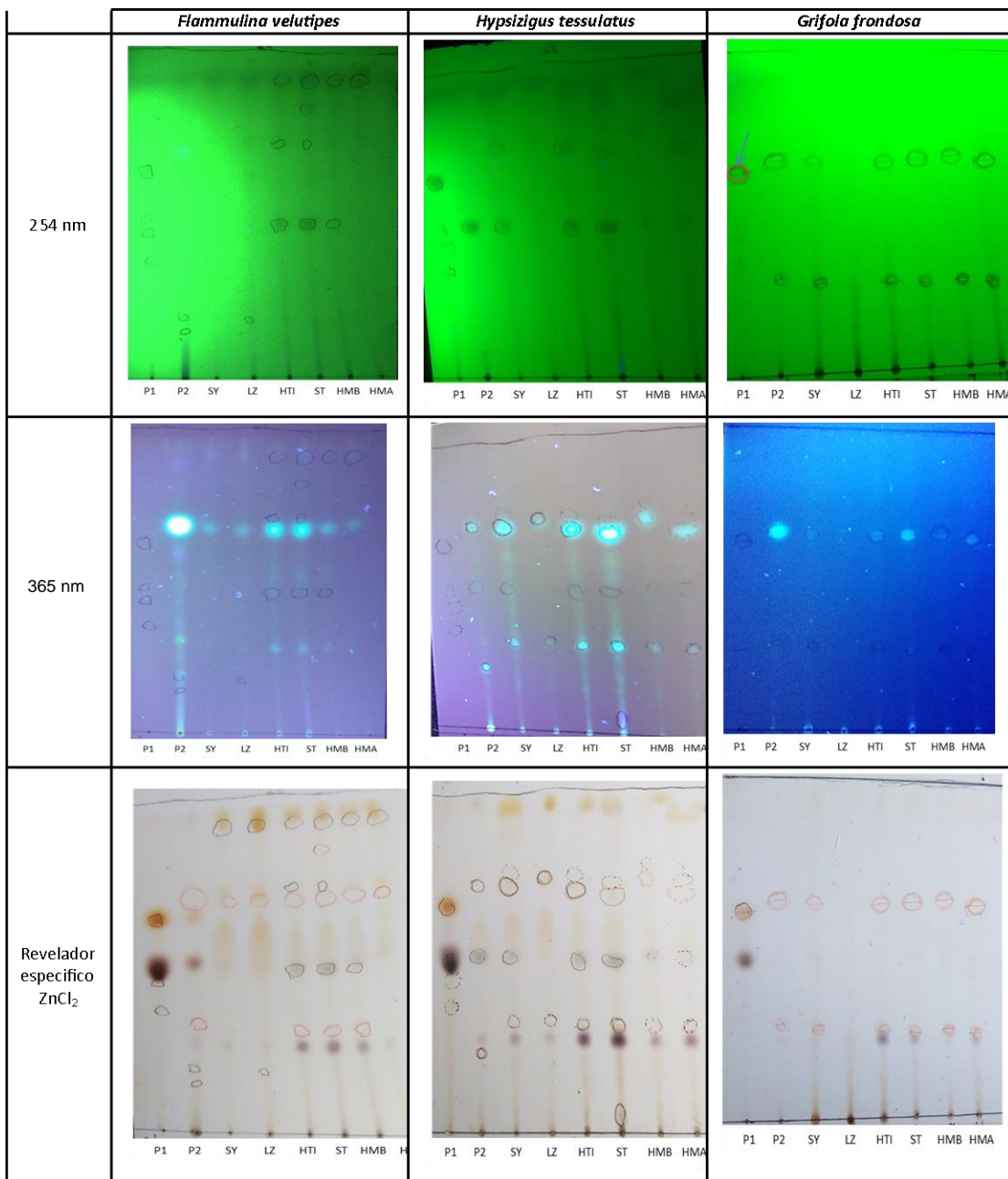
Capítulo 1

esteres y compuestos triterpenoidales, caracterizados por ser junto con los polisacáridos, los responsables de la mayoría de actividades atribuidas a este grupo de organismos, tema que se profundizará en el capítulo 3. Para el caso de las biomásas cultivadas por FEL de las tres especies objeto de estudio, al analizar los resultados de las placas obtenidas por CCD (Figura 1-11), se evidencia que hay diferencias en su contenido dependientes tanto de la fuente de nutrientes como del macromiceto cultivado. La intensidad de las manchas es menor para *G. frondosa* independientemente de la composición del medio y del revelador usado. Para el caso de *H. tessulatus* y *F. velutipes*, la composición es similar, tanto en términos del número de manchas como en la intensidad de las mismas, a excepción de la harina de maíz amarillo, en donde su uso parece aumentar la concentración de algunos metabolitos de alta polaridad. En cuanto a los compuestos con núcleos esteroidales, al emplear harina trigo integral y salvado de trigo como componentes del medio de cultivo, sin distinción de la especie, se favorece la biosíntesis de metabolitos pertenecientes a este grupo (R_f 0,26 y 0,52), con polaridades similares o mayores que las del ergosterol y el estigmasterol.

Estos resultados son concordantes con los análisis hechos por CG-EM (Anexo 5-1), en los que se diferencian tres zonas: entre 0 y 19 min eluyen los compuestos de menor peso y volátiles fijos, entre 20 y 34 min los ácidos grasos y sus ésteres y finalmente los triterpenoides junto a los demás compuestos catalogados en el grupo denominado otros. En la Tabla 1-6 se encuentran señalados estos compuestos con su tiempo de retención (tr), ion molecular (M^+) y pico base y se relaciona con la Tabla 1-7 en la cual se indica la especie y fuente de nutrientes en la que se determinó el compuesto dado. De manera general, los cromatogramas de los extractos de las biomásas cultivadas con harina de soya y linaza, contrastan con los obtenidos al emplear las demás fuentes de nutrientes, presentando un menor número de picos, particularmente en la zona de los triterpenos, indicativo de la disminución de la diversidad de compuestos biosintetizados por los hongos bajo estas condiciones.

Capítulo 1

Figura 1-11. Cromatografía en capa fina de extractos en diclorometano de biomasa obtenida por cultivo en las fuentes de nutrientes.



P1, patrón estigmasterol –lanosterol; P2, extracto de *P. ostreatus* enriquecido en ergosterol ; SY, harina de soya; LZ, linaza; HTI, trigo integral; ST, salvado de trigo; HMB, maíz blanco; HMA, maíz amarillo. Tolueno:AcOEt 4:1 (V/V).

Tabla 1-6. Compuestos determinados por CG-EM en las biomásas de los tres macromicetos cultivados con las diferentes fuentes de nutrientes.

No.	Compuesto	tr	M ⁺	Pico base
1	Ácido n-hexanoico	5,35	116	60
2	2,4-heptadienal	5,78	110	81
3	Ácido octanoico	9,01	144	60
4	Ácido nonanoico	10,85	158	60
5	2,4-decadienal	11,78	152	81
6	Bicicloelemeno	12,25	204	121
7	Biclogermacreno	15,04	204	121
8	4-etoxi-benziloato de etilo	15,39	194	121
9	Ácido dodecanoico	15,92	200	73
10	Espatulenol	16,35	220	205
11	Ácido tetradecanoico	18,91	228	73
12	Tetradecanoato de 2-propilo	19,84	270	43
13	Ácido pentadecanoico	20,32	242	73
14	Ciclohexadecano	20,60	224	55
15	Ácido hexadecanoico	21,73	256	73
16	9-octadecenoato de metilo	23,47	256	55
17	Ácido 9,12-octadecadienóico	24,02	280	81
18	Ácido 9-octadecenoico	24,07	282	55
19	Pentacosano	24,20	352	57
20	Ácido octadecanoico	24,24	284	73
21	Linoleato de etilo	26,47	308	67
22	9-octadecenamida	26,53	281	59
23	Erucamida	30,86	337	59
24	Escualeno	31,28	410	69
25	Tricosano	31,88	280	57
26	Octadecano	33,90	254	57
27	Ergosta – 5,7,9(11),22 – tetraen-3 – ol	34,47	394	251
28	Ergosta – 5,8,22-trien – 3 – ol*	34,55	396	363
29	Ergosta – 5,7,22-trien – 3 – ol*	34,82	396	363
30	Colesta – 4-en – 3-ol	35,19	384	124
31	Ergosta – 5,8-dien – 3 – ol	35,35	398	365
32	Ergosta – 7 – en – 3 – ol	35,47	400	400
33	Estigmasta – 5 – en – 3 – ol	35,48	400	400
34	Estigmasta – 3 – ona	36,32	414	231
35	Estigmasta – 4 – en – 3 – ona	37,22	412	124

*compuestos que no pueden ser diferenciados con certeza por la metodología usada.

Capítulo 1

Tabla 1-7. Porcentaje de abundancia relativa de compuestos determinados por CG-EM

Compuesto	<i>Flammulina velutipes</i>						<i>Grifola frondosa</i>						<i>Hypsizygus tessulatus</i>					
	SY	LZ	HTI	ST	HMB	HMA	SY	LZ	HTI	ST	HMB	HMA	SY	LZ	HTI	ST	HMB	HMA
Ácidos grasos																		
Ácido hexanoico						0,85	1,31						NC	NC	NC	NC	NC	NC
Ácido octanoico				0,32		0,36		0,57						0,19	NC	NC		
Ácido nonanoico						0,39											NC	
Ácido dodecanoico		NC	0,68	1,71	NC										NC	NC		1,95
Ácido tetradecanoico		NC	0,28	0,29	NC										NC	NC		
Ácido pentadecanoico			0,30	0,60	NC										NC	NC		
Ácido hexadecanoico	13,8	10,70	14,50	13,00	15,30	17,50	19,80	14,34	34,75	17,90	19,60	16,80	17,00	7,83	13,10	21,14	7,41	14,9
Ácido 9,12-octadecadienoico	52,0	55,40	32,00	33,00	45,70	43,90	5,70	15,40	8,86	11,30	15,50	8,49	47,60	46,50	45,80	14,90	22,00	23,6
Ácido 9-octadecenoico	26,0	21,00	13,10	14,40	20,10	20,40	31,20	30,30	34,90	20,30	26,50	23,10	27,20	22,60	23,10	27,31	15,00	19,7
Ácido octadecanoico	6,33	11,50	2,23	3,07	4,95	4,95	6,12	11,10	5,45	2,86	4,90	2,20	4,90	8,79	2,49	5,54	2,37	3,17
Esteres																		
4-etoxi-benziloato de etilo			0,32															
Tetradecanoato de 2-propilo			0,40												NC	0,09		
9-octadecenoato de metilo													0,45					
9,12-octadecadienoato de etilo																	0,27	
Esteroles																		
Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol			0,52	0,50	0,52	0,56									NC	1,17		
Ergosta-5,8,22-trien-3-ol			0,35	0,29	0,12	1,00									NC	NC		
Ergosta-5,7,22-trien-3-ol	NC	NC	7,66	11,60	6,39					NC					8,77	4,68		
Colesta-4-en-3-ol				0,43														

Capítulo 1

Tabla1-7:(Continuación)

Compuesto	<i>Flammulina velutipes</i>						<i>Grifola frondosa</i>						<i>Hypsizygus tessulatus</i>					
	SY	LZ	HTI	ST	HMB	HMA	SY	LZ	HTI	ST	HMB	HMA	SY	LZ	HTI	ST	HMB	HMA
Ergosta – 5,8-dien – 3 – ol			1,08	2,26	0,33	0,33									NC			
Ergosta – 7 – en – 3 – ol			0,52	1,97	0,34	0,77				NC	NC				NC	1,08	NC	
Estigmasta – 5 – en – 3 – ol				1,02											NC	0,69	1,25	3,17
Estigmasta – 3 – ona				1,38	1,50	1,06			NC	NC	1,87	1,32			NC	0,87		NC
Estigmasta – 4 – en – 3 – ona	1,23	NC	0,74	0,73	2,96	2,78			NC	NC	1,45	1,49	0,04		NC	0,59	0,76	
Aldehidos																		
2,4-heptadienal														0,39				
2,4-decadienal	NC	NC	NC	NC	0,86	0,86	1,26	0,62	2,79	NC	0,68	NC	0,66	0,57	NC	1,14	0,53	4,14
Hidrocarburos																		
Bicicloelemeno			0,47	0,23														
Biclogermacreno			0,29	0,22														
Supraeno (escualeno)				0,20						NC					2,02	0,68		
Tricosano										1,07								
Ciclohexadecano			0,32													0,20		
Octadecano										1,02								
Otros																		
Oleamida			1,13							2,42	1,84	1,28		0,65			1,19	
Erucamida		0,83	17,5	0,14				1,38		19,7	9,33	28,80		0,12	1,46	1,53	31,00	
Espatulenol					1,71													

SY, harina de soya; LZ, linaza; HTI, trigo integral; ST, salvado de trigo; HMB, maíz blanco; HMA, maíz amarillo. NC no cuantificable.

Capítulo 1

En cuanto a la variación presentada en los perfiles cromatográficos consecuencia del uso de los tres hongos, se encuentra que al igual que lo observado por CCD, *F. velutipes* e *H. tessulatus* tienen composiciones similares, con una mayor variación en términos de cantidad y variedad estructural comparados con *G. frondosa*.

Relacionado con las particularidades de los metabolitos determinados, dentro de los ácidos grasos de mayor porcentaje de abundancia relativa (Tabla 1-8) se encuentran el palmítico (C16:0), oleico (C18:1 ω 9) y linoleico (C18:2 ω 6). Al comparar estos resultados con los obtenidos para otras especies (Tabla 1-8), se observa que su contenido varía ampliamente dependiendo del tipo de hongo, como ya ha sido reportado por otros autores(77).

Adicionalmente, los porcentajes de ácidos grasos insaturados predominan sobre los saturados, excepto en *G. frondosa*, concordante con lo reportado por Barros *et al.*(78). Lo anterior es de interés, debido a que particularmente el ácido linoleico se considera un ácido graso esencial, al no ser sintetizado por los humanos(79), y estar relacionado con la disminución del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, hipertensión, artritis, y bajos niveles de triglicéridos(80). En cuanto a la presencia de ésteres de ácidos grasos (Tabla 1-7), estos ya se han reportado en hongos (Kanagasabapathy *et al.*(81)), no obstante, su contenido es menor a lo mencionado por Chegwin y Nieto(55) empleando fuentes de nutrientes similares, quienes indican que son los compuestos mayoritarios en *Pleurotus ostreatus* cultivados de igual manera empleando harinas de cereales.

Tabla 1-8. Comparación de abundancia relativa de ácidos grasos con literatura.

Especie	% abundancia relativa			Autor
	C16:0	C18:1 ω 9	C18:2 ω 6	
<i>F. velutipes</i>	10,7 a 17,5	13,1 a 26,0	32,0 a 55,4	Este trabajo
<i>G. frondosa</i>	14,3 a 19,8	20,3 a 31,2	5,7 a 15,5	Este trabajo
<i>H. tessulatus</i>	7,4 a 17,0	13,1 a 27,2	22,0 a 47,6	Este trabajo
<i>Cantharellus cibarius</i>	13,08	10,78	53,59	Barros <i>et al.</i> (78)
<i>Calocybe gambosa</i>	18,10	15,16	57,7	Barros <i>et al.</i> (78)
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	13,9	16,4	53,8	Kavishree <i>et al.</i> (77)
<i>Termitomyces mummiformis</i>	16,0	18,2	58,0	Kavishree <i>et al.</i> (77)
<i>Agaricus arvensis</i>	14,55	15,46	56,11	Barros <i>et al.</i> (82)
<i>Laetiporus sulphureous</i>	10,80	13,91	57,00	Sinanoglou <i>et al.</i> (83)

Capítulo 1

Con respecto a los esteroides, el ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol) se detectó en la mayoría de tratamientos de *F. velutipes*, debido a que es el principal componente de las membranas celulares en los basidiomicetos(84). Sin embargo, en *G. frondosa* y *H. tessulatus* los resultados son inesperados ya que este se determinó únicamente con salvado de trigo y harina de trigo integral como fuentes de nutrientes, por lo cual se presume que su presencia se debe encontrar en cantidades no detectables con la técnica empleada. Aunado a lo anterior, en aquellos casos en los cuales se cuantifico su contenido, este se encuentra entre el 50% y 70% del total de esteroides y está de acuerdo con lo establecido por Niemenmaa *et al.*(85) (40% y 85% del total de esteroides).

Por otro lado, para *F. velutipes*, la presencia de ergosterol o ergosta-5,8,22-trien-3 β -ol y ergosta-5,7-dien-3 β -ol concuerda con lo obtenido por Yi *et al.*(86) para esta especie. Estigmasta-4-en-3-ona, presente en la mayoría de tratamientos, se reporta comúnmente en plantas y líquenes y se le atribuye actividad hipoglicemiante(87). En macromicetos se ha reportado únicamente en *Antrodia camphorata*(88) y *Pleurotus sp.*(54).

Con respecto a las amidas, la oleamida es un compuesto encontrado naturalmente en plantas y hongos (89) (90). La erucamida, conocida por estimular la angiogénesis(91), no se ha reportado en hongos, pero si su ácido correspondiente, el ácido erúico(92,93).

En relación a los aldehídos 2,4-heptadienal y 2,4-decadienal, en literatura se definen como componentes aromáticos relacionados con el sabor de diversos alimentos, entre estos los hongos comestibles y derivan de productos de degradación u oxidación de lípidos(94). Particularmente el 2,4-decadienal, se detectó en todos los tratamientos y posiblemente deriva del éster del ácido linoleico(95).

Dentro de los hidrocarburos el biciclogermacreno, el cual ha presentado un efecto larvicida en mosquitos vectores de malaria y dengue(96), únicamente fue determinado en *F. velutipes*, también se ha reportado en hongos y es atribuido a una respuesta al estrés biótico. El escualeno, compuesto precursor de los triterpenoides(97), se detectó al emplear salvado de trigo para todas las especies. Finalmente, el tricosano y octadecano se han reportado para *F. velutipes* y otras especies(98), a pesar que en este trabajo se detecta únicamente en salvado de trigo para *G. frondosa*.

En la Figura 1-12 se presentan de forma gráfica los resultados anteriormente descritos obtenidos de los análisis de los cromatogramas para los distintos casos estudiados, los

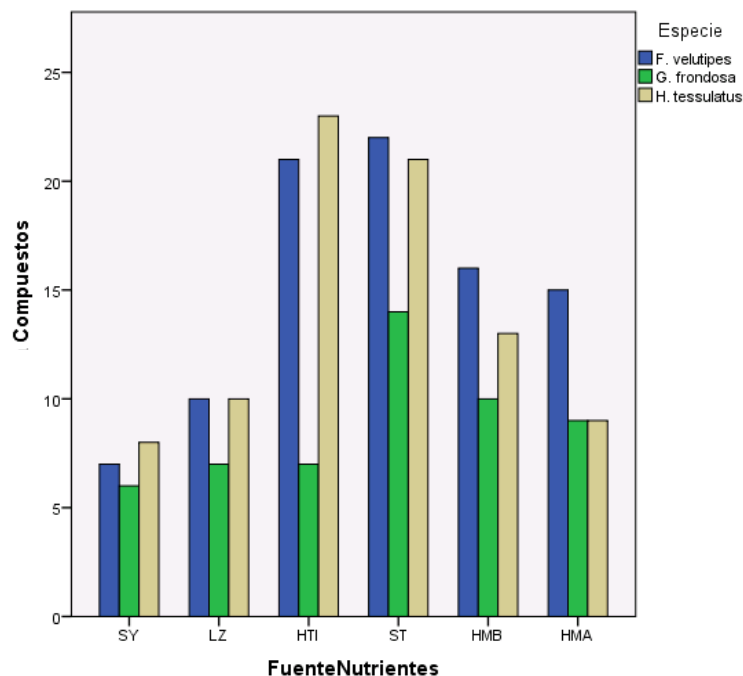
Capítulo 1

cuales permiten seleccionar a la harina de trigo integral y el salvado de trigo, con base, en la variabilidad estructural así como en la abundancia relativa de los metabolitos determinados, para continuar la siguiente fase del proyecto.

Por otro lado, los resultados no facilitan la elección de una especie entre *F. velutipes* y *H. tessulatus*, así que su selección se realizó con base en un comparativo de los reportes encontrados que se enfocan en el cultivo sumergido de estas especies, indicando que *H. tessulatus* presenta pocos estudios particularmente en este tema, hecho que abre la puerta para posibles resultados prometedores enfocados a la investigación y bioprospección de los macromicetos.

De igual forma es importante resaltar, que los resultados obtenidos en esta investigación, no se pueden correlacionar con reportes previos, debido a que los trabajos hechos por otros autores, están enfocados a otro tipo de metabolitos como son los polisacáridos, no se comparan las tres especies y mucho menos el empleo de fuentes de nutrientes alternativas como las descritas en el presente estudio.

Figura 1-12. Variabilidad de compuestos determinados por CG-EM para cada especie empleando las fuentes de nutrientes evaluadas.



1.4 Conclusiones

Bajo las condiciones empleadas en este estudio, la FeSup no es una herramienta eficaz que permita la selección de un macromiceto o fuente de nutrientes que favorezca mayor producción de micelio, con miras a su posterior cultivo por FEL.

De igual forma se determinó que para la cepa de *G. frondosa* estudiada y bajo las condiciones de cultivo evaluadas, no hay un efecto positivo de las fuentes de nutrientes sobre la producción de biomasa y su composición.

Los resultados descritos en este capítulo permitieron determinar que al emplear FEL para el cultivo de *H. tessulatus*, *G. frondosa* y *F. velutipes*, se evidencia un efecto tanto de la fuente de nutrientes como de la especie en la producción de biomasa y en su composición. Con el uso de harina de trigo integral se presenta una producción media de biomasa, diferente al salvado de trigo que genera una baja cantidad. No obstante, estas dos fuentes de nutrientes incentivan la maquinaria biosintética de las especies evaluadas. En lo referente a los resultados, con salvado de trigo como fuente de nutrientes, es de interés realizar un proceso de optimización de las condiciones del cultivo, teniendo en cuenta que a pesar de la baja producción, la composición de la biomasa obtenida con su empleo, resalta sobre los resultados obtenidos con otras fuentes de nutrientes.

La selección de la especie *H. tessulatus* para realizar el proceso de optimización, se realizó con base en su comportamiento en términos de la cantidad de biomasa y la composición de la misma, aunado al bajo número de estudios enfocados en su cultivo por FEL.

2 CAPÍTULO 2 Optimización de la cantidad de fuente de nutrientes e inóculo para la fermentación en estado líquido de *Hypsizygus tessulatus*.

2.1 Antecedentes

Los hongos macromicetos, así como la mayoría de los organismos vivos, tienen la habilidad de responder a alteraciones ambientales, generando cambios fisiológicos(99). Esta característica es aprovechada en los procesos biotecnológicos en los que, a través de cambios en las variables del proceso, se obtienen comportamientos diferentes en el hongo, lo que conlleva a obtener modificaciones en el producto final, tanto en el crecimiento como en la producción de metabolitos. Las condiciones óptimas de fermentación dependen de la naturaleza del producto deseado es decir, si es biomasa o un metabolito en especial (polisacáridos, enzimas, triterpenoides, etc.)(100). Los factores que influyen en la eficiencia del bioproceso se agrupan de acuerdo a las tres propiedades del sistema: físicas, químicas y biológicas. Entre estos factores se encuentran la composición del medio de cultivo, pH, aireación, agitación, temperatura, presencia de elicitores, y cantidad de inóculo, entre otros. De esta forma, el manejo de cada uno de estos factores durante el proceso, permite direccionar el cultivo biotecnológico hacia un objetivo determinado.

2.1.1 Influencia de las condiciones de cultivo en la FEL.

2.1.1.1 Fuente de carbono nitrógeno y su relación

Con respecto a la composición del medio, el carbono es el elemento estructural mayoritario empleado por los hongos para la biosíntesis de los diferentes metabolitos, así como la fuente de energía requerida para sus procesos metabólicos(8) , representa la mitad del peso seco de un hongo y por todas estas razones está catalogado como un macronutriente. Como fuente de carbono, el carbohidrato más comúnmente usado en la FEL es la glucosa y su transferencia al interior de la célula se realiza vía transporte activo o difusión facilitada. Otros tipos de fuentes de carbono pueden ser la lignina, celulosa o hemicelulosa, obtenidas por la acción de exoenzimas que degradan estos sustratos,

Capítulo 2

adicionalmente, lípidos, proteínas, ácidos orgánicos, polisacáridos, manosa, fructosa y disacáridos, entre otros pueden ser usados como fuente de carbono(9).

El suministro de nitrógeno es necesario para la síntesis de todos los compuestos que contienen dicho elemento, como las proteínas, purinas, pirimidinas y quitina (N-acetilglucosamina)(8). Las fuentes de nitrógeno pueden ser inorgánicas u orgánicas. Entre las inorgánicas encontramos las sales de nitrato, nitrito o del ion amonio, pudiendo ser este último empleado por la mayoría de hongos como única fuente de nitrógeno. En cuanto a las fuentes orgánicas son relevantes los aminoácidos, a partir de los cuales los hongos pueden sintetizar por transaminación todos aquellos compuestos que necesiten para sus procesos bioquímicos(9).

Estudios relacionados con la optimización de la producción de hongos macromicetos, han demostrado que las fuentes de carbono (FC) y de nitrógeno (FN) son los factores más importantes a tener en cuenta para la producción de biomasa y metabolitos biológicamente activos (MBA)(70). Xu *et al.*(68) compararon el uso de FC con composición definida (glucosa o fructosa) y complejas (harina de maíz y soya), reportando que con estas últimas hay una mayor producción de ácidos ganodéricos en *Ganoderma lucidum*. En un estudio similar pero con *Antrodia camphorata*, Shih *et al.*(68,101) observaron que altas concentraciones de glucosa benefician la formación del micelio, mientras que la harina de maíz favorece la producción de triterpenos. Los autores atribuyen este comportamiento a las FC complejas, las cuales pueden beneficiar la producción de metabolitos secundarios, debido a que se evita la represión catabólica, generada por altas concentraciones de glucosa u otros sustratos fácilmente metabolizables.

En lo concerniente al efecto de diferentes FN se ha establecido que las complejas (harina de soya y salvado de trigo) aumentan el contenido de ácidos ganodéricos comparado con urea, $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ y NH_4NO_3 para *G. lucidum*. Adicionalmente los autores indican que el uso de FN orgánico incrementa el contenido de dichos metabolitos comparado con las fuentes inorgánicas(68), resultados que son consistentes con los obtenidos por Shih *et al.*(101)

De otra parte, el valor de la relación C/N se reconoce como una de las variables imprescindibles que rige la producción de metabolitos y biomasa, como se refleja en la investigación adelantada por Zhang *et al.*(102) en *G. lucidum*. Sin embargo, también se ha reportado que esta relación no influye directamente en la biosíntesis de triterpenoides, en

Capítulo 2

3 especies de *Pleurotus sp.*(54). Lo anterior indica que el efecto de la C/N puede ser dependiente de las especies evaluadas.

En la Tabla 2-1 se consignan algunos de los resultados más destacados en la evaluación del efecto de la FC, FN y la relación C/N de los mismos sobre la producción de triterpenos en macromicetos, en donde se puede observar que el uso de FC de difícil metabolización, tienen potencial sobre el aumento de la producción de triterpenoides. La mayoría de basidiomicetes presentan mayor producción de biomasa y MBA con FN orgánicas complejas, comportamiento explicable por la escasa síntesis de algunos aminoácidos esenciales al usar fuentes inorgánicas(68,101).

2.1.1.2 Efecto del pH en el cultivo por FEL de macromicetos.

En relación al pH del medio, esta condición tiene un marcado efecto sobre la velocidad de crecimiento, la permeabilidad de las membranas, el transporte de nutrientes, la solubilidad de los mismos, la eficiencia de las reacciones enzimáticas, la función de la membrana celular, la morfología y la estructura celular, el estado iónico de los sustratos, la fijación de varios nutrientes y la biosíntesis(103). La mayoría de los hongos, con algunas excepciones, presentan un mejor crecimiento vegetativo a pH ligeramente ácido.

En cuanto al estudio de su efecto sobre la producción de metabolitos secundarios y específicamente de ácidos ganodéricos, Fang y Zhong(103) reportaron que la producción máxima de biomasa en matraz se da entre pH 5,5 y 6,5 para *G. lucidum*. Adicionalmente los autores mencionan que el pH inicial del medio presenta variación con el transcurso de los días: Inició con el descenso a 3,2 (hasta el día 8) y luego de 10 días el pH se elevó a 7,0, momento en el que la glucosa residual disminuye. Este fenómeno está relacionado con el consumo del monosacárido durante el crecimiento del hongo, dando lugar a la producción de ciertos ácidos orgánicos de cadena corta. En consecuencia la acumulación de estos últimos puede estar relacionada con la máxima producción de ácidos ganodéricos en el día 8 de cultivo. El decline del pH causado por la producción de ácidos orgánicos, resulta ser un patrón observado en otros estudios(101).

Tabla 2-1 Efecto de algunos factores de cultivo en la producción de triterpenoides en macromicetos.

Especie(s)	Compuesto objetivo	Variable(s) estudiada(s)	Resumen
Efecto de fuente de carbono, nitrógeno y relación C/N			
<i>Ganoderma lucidum</i>	Ácidos ganodéricos	Efecto de FC complejas(104)	Se determinó que la harina de cebada y avena tienen efecto positivo sobre la acumulación de ácidos ganodéricos, consecuencia de los ácidos grasos insaturados, proteínas, vitaminas presentes en la semilla de las cuales se
		Relación C/N(102)	Usando lactosa (FC), peptona y extracto de levadura (FN), evaluaron diferentes valores de C/N, determinando que la relación con mayor proporción de N (20:10) es la más óptima. El N requerido por el organismo es el ideal a esta concentración
		Efecto de FC, FN(105)	Determinan mayor producción con el mosto de la cebada (FC), obteniendo triterpenoides del 24% por encima del control, y de extracto de levadura (FN) 46% por encima. Los componentes de las FC y FN seleccionadas, aportan los
		Efecto de la limitación de FN(1)	Evaluaron las FN: Sulfato de amonio, glutamina y asparagina, determinando un mayor incremento del contenido de ácidos ganodéricos con la limitación de nitrógeno, debido a inducción de los genes biosintetizadores, como respuesta al
<i>Agaricus bisporus</i>	Esteroles	Efecto de distintos sustratos (FC), comparación de FEL y cultivo tradicional (106)	La combinación entre sustrato de malta y FEL permitió la mayor producción de esteroles. Sin embargo todos los sustratos mostraron potencial (malta, trigo, pulpa de manzana, uva, piña y cáscara de manzana, uva y piña).
<i>Pleurotus sp.</i>	Triterpenos	Efecto de FC no convencionales(54)	Se determina que el tipo de FC (harinas de cereal) tiene impacto en la producción de triterpenos y se refleja en la cantidad y variedad estructural de los triterpenos.
<i>Agaricus brasiliensis</i>	Ergosterol	Efecto de FC y concentración inicial de glucosa(107).	La glucosa benefició la producción de ergosterol, comparada con otras FC de fácil metabolización. Adicionalmente, alta concentración inicial de glucosa resulta no ser favorable para la producción de ergosterol.
<i>Hypocreales sp.</i>	Triterpenoides y esteroides polihidroxilados	Efecto de FC y FN.(108)	Evalúan diferentes fuentes de carbono y nitrógeno y determinan que sacarosa y extracto de levadura muestran la máxima producción de los metabolitos evaluados.

Tabla 2-2 Continuación

Especie(s)	Compuesto objetivo	Variable(s) estudiada(s)	Resumen
Efecto de pH			
<i>Ganoderma lucidum</i>	Ácidos ganodéricos	pH inicial(103).	Obtuvieron valores de 5,5 y 6,0 como óptimos.
<i>Ganoderma lucidum</i>	Ácidos ganodéricos	pH inicial(105)	Determinan pH de 5,4 como favorable para la producción de ácidos ganodéricos.
Efecto de elicitores			
<i>Ganoderma lucidum</i>	Ácidos ganodéricos	Efecto de CaCl ₂ (109)	La adición al medio del ion calcio incrementa la producción de ácidos ganodéricos , debido a la activación transcripción de los genes involucrados en la biosíntesis de ácidos ganodéricos
<i>Ganoderma lucidum</i>	Ácidos ganodéricos	Celulasa(102)	La adición de celulasa incrementó el contenido de ácidos ganodéricos un 36% comparado con el control, asociado a la degradación de la pared celular, lo que conlleva a una reacción del sistema de defensa del hongo.
<i>Cordyceps militaris</i>	Ergosterol (vitamina D)	Irradiación UV-B(110)	Luego de dos horas de irradiación UV-B sobre el micelio del hongo, se incrementa el contenido de vitamina D ₂ y disminuye el ergosterol.
<i>Antrodia cinnamomea</i>	Triterpenoides	Adición de monoterpenos al medio(111)	Demostraron que la adición de limoneno en etanol incrementa el contenido de triterpenoides, comportamiento relacionado con la incorporación del monoterpeno en el citoplasma y posterior aumento de la síntesis de triterpenoides.
<i>Antrodia cinnamomea</i>	Triterpenoides	Efecto de elicitores químicos y físicos(112)	Evalúan el efecto de quitosan, ion calcio y fluctuaciones de temperatura. El aumento en la producción de triterpenoides se relaciona con el desencadenamiento de respuestas fisiológicas, lo que genera reacciones
<i>Inonotus obliquus</i>	Triterpenoides	Efecto de ácidos grasos y metil jasmonato(113)	La adición de ácido linoleico o metil jasmonato con Tween-80 aumentan la producción de triterpenoides. El primero relacionado con la permeabilidad de la membrana celular por la presencia de ácidos grasos poliinsaturados, y el segundo
<i>Hypocreales sp .</i>	Triterpenoides y esteroides polihidroxilados	Adición de ácidos grasos y quitosan(108)	Determinan el efecto positivo en la producción de triterpenos del ácido linoleico. Además la adición de quitosan incrementa la producción de triterpenos un 71% comparada con otros elicitores como CaCl ₂

Capítulo 2

Than *et al.*(99) realizaron el cultivo de *G. lucidum* en bioreactor de 5,5 L, en el cual es posible controlar el pH en el transcurso del cultivo, determinando que mantener el medio con un pH constante de 3,0, permitía obtener la mayor producción de ácidos ganodéricos. Adicionalmente evaluaron una nueva estrategia para estimular la producción de dichos metabolitos, dividiendo el tiempo de cultivo en dos fases. La primera de ellas a un pH de 3,0 hasta el 4 día y la segunda desde el día 4 hasta el 16 con tratamientos de pH a 3,0, 4,5 y 5,0, obteniendo la máxima cantidad de los triterpenoides a pH de 4,5 en la segunda fase, demostrando que cambios de este factor en el transcurso del cultivo, mejoran la producción de los MBA. La Tabla 2-1 presenta de forma resumida los estudios relacionados con la influencia del pH en la obtención de triterpenos.

2.1.1.3 La oxigenación y la temperatura en la FEL de macromicetos.

El componente gaseoso de la atmósfera con mayor influencia sobre los hongos es el oxígeno. La mayoría de estos organismos son aerobios, por lo tanto la presencia de dicho elemento para su desarrollo es determinante, debido a que en sus procesos metabólicos lo usan como aceptor final de electrones, generando un metabolismo oxidativo(9). Adicionalmente, este elemento es constituyente de varios compuestos importantes en la nutrición, incluyendo carbohidratos, alcoholes, ácidos, aminoácidos, entre otros(8). La principal fuente de oxígeno para los hongos aerobios es la atmosfera, sin embargo, también pueden obtenerlo junto con el hidrógeno a partir de la molécula de agua, que puede resultar bien sea del metabolismo de algunos compuestos orgánicos o de la presente en el medio(114).

En cultivo sumergido, Tang y Zhong(115), demostraron que el suministro del oxígeno afectó el tamaño de los pellets de *G. lucidum*, observando que al incrementar la cantidad del mismo, el tamaño del pellet aumentó, limitando la presencia del elemento dentro de este. Como resultado la producción de biomasa disminuyó, pero el contenido de ácidos ganodéricos se incrementó. Xu y Yun(116) encontraron que la aireación afecta significativamente las características moleculares de los exopolisacáridos obtenidos a partir de *Paecilomyces tenuipes* durante la FEL, indicando que se puede generar confusiones en el control de calidad de estos compuestos al variar las condiciones de aireación. Oh *et al.*(117) evaluaron el proceso de obtención de un exobiopolimero a partir de *Cordyceps sphecocephala* empleando biorreactor, demostrando la importancia del control no solo de la tasa de aireación, sino de la agitación, ya que permite obtener pellets de morfología específica que conllevan un incremento en la producción del

Capítulo 2

exobiopolímero objetivo. Los anteriores trabajos indican la importancia de la disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo, afectando el crecimiento celular, morfología, tasa de asimilación de nutrientes y de la biosíntesis de metabolitos(100).

Por otro lado, se sabe que en la naturaleza la temperatura define la distribución en las especies de hongos, y en consecuencia su sobrevivencia(8), debido a su influencia directa sobre la tasa metabólica, específicamente en la actividad enzimática, y en consecuencia, en la síntesis de vitaminas, aminoácidos y otros metabolitos. Los hongos macromicetos tienen la capacidad de crecer en un amplio rango de temperaturas(118), no obstante, la mayoría se clasifican como mesófilos, los cuales pueden crecer en un intervalo entre 10 - 35°C. En un proceso de fermentación, el organismo tendrá una temperatura óptima en la cual la producción de diferentes metabolitos se incrementa y que corresponde a la temperatura ideal de desarrollo por parte del hongo, no siendo este el único factor de incidencia, ya que la temperatura presenta también influencia sobre la solubilidad del oxígeno en el medio.

Para la producción de triterpenos, el efecto de la temperatura no ha sido sistemáticamente estudiado. No obstante, con base en la escasa información de literatura(103)(115)(112), el rango comúnmente usado para favorecer su obtención, se encuentra entre 25 y 30°C, temperaturas que coinciden con las requeridas para el crecimiento de forma tanto natural como por cultivo tradicional. Por otro lado se reporta(112), que fluctuaciones de temperatura (25°C por 10h y 10°C por 14h) pueden incrementar la producción de triterpenos en *Antrodia cinnamomea*. Esta variación puede desencadenar respuestas fisiológicas, que llevan al hongo a sintetizar metabolitos secundarios como respuesta al estrés producido por la disminución de la temperatura.

2.1.1.4 Cantidad de inóculo y uso de elicitores en el cultivo por FEL de macromicetos.

Otra condición de cultivo de importancia es la densidad de inoculación o la cantidad de inóculo. Es así como se ha demostrado que este parámetro puede influir en la producción de compuestos de *G. lucidum*, al igual que en la morfología del pellet. Al respecto, Fang *et al.*(119) evaluaron el efecto de la adición de distintas densidades de inóculo (70, 170, 330 y 670 mg peso seco/L), encontrando que una baja cantidad de inóculo (70 mg peso seco/L) es más favorable para el contenido de ácidos ganodéricos (26% mayor producción). Adicionalmente, determinaron que una alta densidad de inóculo producía pellets de menor tamaño, mientras que una baja desarrolla pellets de mayor tamaño. Esto tiene gran relevancia, debido a que pellets de mayor tamaño presentan limitación de

Capítulo 2

oxígeno en su centro, lo que incrementa la producción de polisacáridos y ácidos ganodéricos.

2.1.1.5 Efecto de los elicitores en el cultivo por FEL de macromicetos

En lo referente a los elicitores, éstos pueden ser químicos cuando se refiere a compuestos que estimulan la producción de metabolitos en organismos(120) o físicos como la luz. La presencia de elicitores en el bioproceso incide en la biosíntesis de metabolitos. Como ejemplos se tienen quitosan y CaCl_2 (Ca^+) que han sido usados como elicitores químicos(112), incrementando 20% y 10%, respectivamente, la producción de triterpenos. El efecto del quitosan se atribuye a su actividad antimicrobiana y el de la adición de Ca^+ está relacionado con el cambio en la permeabilidad de la membrana celular y el control de la actividad de las enzimas fúngicas involucradas en la expansión de la pared celular del hongo(112,121), desempeñando un papel como factor de estrés. La Tabla 2-1 recopila los estudios relacionados con el efecto de elicitores sobre la producción de triterpenos.

Todo lo anterior resalta la importancia del manejo de las condiciones de cultivo para la obtención tanto de un mayor título de biomasa como de la mejor composición de la misma.

No obstante, se debe tener en cuenta, que para el análisis del efecto de dos o más de los factores antes indicados, los diseños factoriales son más eficientes que el método de análisis de factores uno a la vez, esto en términos de las observaciones necesarias y en consecuencia el tiempo y los recursos requeridos. Adicionalmente, los diseños factoriales permiten evaluar la interacción, si la hay, de los factores estudiados para así evitar conclusiones erróneas, relacionadas con el efecto de esta interacción. A continuación, se describen los diseños factoriales comúnmente usados para la optimización de factores.

2.1.2 Diseños experimentales para la optimización de procesos.

La metodología de superficie de respuesta (MSR), es un diseño factorial que ha sido ampliamente aplicado para la optimización de la composición de medios de cultivo usados para la obtención de diferentes organismos, entre ellos los macromicetos(122). Es una colección de técnicas estadísticas que se emplean para el diseño experimental, desarrollo

Capítulo 2

de modelos, evaluación de factores y búsqueda de condiciones óptimas(123). Hay dos tipos principales de diseños de superficie de respuesta: Diseños centrales compuestos y diseños de Box-Behnken.

Los diseños centrales compuestos pueden ajustarse a un modelo cuadrático completo y son los experimentos diseñados de superficie de respuesta que más se utilizan. Suelen usarse cuando el plan del diseño requiere de un experimento secuencial, debido a que pueden incluir información de un experimento factorial planificado correctamente. Es un diseño factorial o factorial fraccionado con puntos centrales, ampliado con un grupo de puntos axiales (también denominados puntos de estrella) que permiten estimar la curvatura. Los diseños centrales compuestos son especialmente útiles en los experimentos secuenciales, porque frecuentemente permiten ampliar experimentos factoriales anteriores al agregar puntos axiales y centrales. Una variación de este tipo de diseño factorial es el uso de diseños rotables, los cuales ofrecen varianza de predicción constante en todos los puntos que están equidistantes del centro del diseño.

En cuanto a los diseños de Box-Behnken, por lo general tienen menos puntos de diseño que los centrales compuestos y, por consiguiente, resulta menos costoso ejecutarlos con el mismo número de factores. Pueden estimar eficientemente los coeficientes de primer y segundo orden; sin embargo, no pueden incluir corridas de un experimento factorial. Los diseños de Box-Behnken siempre tienen 3 niveles por factor, a diferencia de los diseños centrales compuestos, que pueden tener hasta 5.

En la Tabla 2-2 se resumen los resultados de diferentes trabajos enfocados en la optimización de variables del cultivo de macromicetos, de donde se puede concluir que la fuente de nutrientes es uno de los parámetros de mayor interés por tener un efecto preponderante sobre la producción de micelio y su composición. La evaluación de dicho efecto se ha enfocado principalmente en los géneros *Pleurotus*(56,123), *Agaricus*(124), *Antrodia*(125) y las especies *Ganoderma lucidum*(68,99), *Cordyceps militaris*(122), *Morchella esculenta*(126), dejando de lado el estudio de otras especies de hongos de interés comercial con comprobadas propiedades nutricionales y metabolitos poseedores de bioactividad, como son: *Grifola frondosa*, *Flammulina velutipes* e *Hypsizygus tessulatus*(127–129).

Tabla 2-2 Estudios relacionados con la optimización de factores para la obtención de diferentes productos a partir de hongos macromicetos.

ESPECIE	OBJETIVO DEL ESTUDIO	FACTORES EVALUADOS	HERRAMIENTA DE OPTIMIZACIÓN	REF.
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Biomasa, polisacáridos	Fuente de carbono y nitrógeno	Optimización de superficie de respuesta	(123)
<i>Agrocybe cylindracea</i>	Biomasa, exopolisacáridos	Fuente de carbono y nitrógeno, pH, temperatura, minerales	Diseño central compuesto rotatable	(121)
<i>Antrodia cinnamomea</i>	Biomasa	Fuente de carbono y nitrógeno, pH, agitación,	Diseño central compuesto rotatable	(125)
<i>Ganoderma lucidum</i> <i>Pleurotus cystidiosus</i> <i>Volvariella volvacea</i> <i>Schizophyllum commune</i>	Lípidos	Medio de cultivo, pH, temperatura, agitación	Factor por factor	(130)
<i>Hericium erinaceum</i>	Biomasa polisacáridos	Fuente de carbono y nitrógeno, pH, minerales, vitaminas.	Optimización de superficie de respuesta	(131)
<i>Inonotus obliquus</i>	Betulina	Fuente de carbono, nitrógeno y minerales. pH inicial y temperatura	Factor por factor Diseño central compuesto rotatable	(132)
<i>Flammulina velutipes</i>	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.	Fuente de carbono y nitrógeno, pH, temperatura.	Factor por factor	(34)
<i>Agaricus brasiliensis</i>	Biomasa, exopolisacáridos	Fuente de carbono, vitamina B ₁	Factor por factor	(124)
<i>Hericium erinaceus</i>	Biomasa, exopolisacáridos	Fuente de carbono y nitrógeno y minerales	Diseño central compuesto rotatable	(133)
<i>Morchella esculenta</i>	Biomasa, polisacáridos	Fuente de carbono y nitrógeno, vitaminas	Diseño central compuesto rotatable	(126)
<i>Cordyceps militaris</i>	Cordicepina	Fuente de carbono, concentración inicial de glucosa y relación C/N	Optimización de superficie de respuesta	(122)
<i>Fomes fomentarius</i>	Biomasa, polisacáridos	Fuente de carbono y nitrógeno, relación C/N, minerales, vitaminas, pH inicial, temperatura, agitación, volumen de inóculo	Diseño central compuesto rotatable	(70)

Con base en lo expuesto anteriormente, se propuso como objetivo de este capítulo, realizar un proceso de optimización, empleando un diseño factorial compuesto rotatable, que permitiera evaluar el efecto de la variación tanto de la cantidad de fuente de nutrientes como del inóculo usado, en distintos niveles y la interacción entre estos, sobre la producción tanto de biomasa de *Hypsizigus tessulatus*, como de su composición, cultivada empleando salvado de trigo y harina de trigo integral como fuentes de nutrientes.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Cinética de crecimiento.

H. tessulatus fue cultivado por FEL, siguiendo las condiciones descritas en el numeral 1.2.4, empleando matraces de 250 mL con 100 mL, como fuentes de nutrientes salvado de trigo (ST) y harina de trigo integral (HTI) y 8 discos de 0,5 cm de diámetro compuestos de micelio y agar como inóculo. Para evaluar la producción de biomasa seca en el tiempo, cada tres días se midió la cantidad de micelio obtenida por medio de su peso seco (g/L), por triplicado. En cuanto a su composición, se siguió la metodología descrita en el numeral 1.2.5.

La determinación de la tasa de crecimiento específica (α) se realizó según Trinci(134):

Ecuación 2-1
$$\alpha = \ln 2 / t_d$$

donde, t_d es el tiempo de duplicación o el tiempo en cual se duplica la biomasa y se determina a partir de datos experimentales con la siguiente ecuación:

Ecuación 2-2
$$t/t_d = \frac{\ln x - \ln x_0}{\ln 2}$$

Donde, x es la cantidad final de biomasa seca, x_0 es cantidad inicial de biomasa seca, t es el tiempo en la fase exponencial y t_d es el tiempo de duplicación.

2.2.2 Diseño experimental

Para el proceso de optimización se establecieron dos variables independientes por medio de la metodología de superficie de respuesta empleando un diseño central compuesto rotatable, generando nueve combinaciones de tratamientos posibles. La Tabla 2-3 indica las diferentes combinaciones de tratamientos empleadas, con siete repeticiones realizadas en el centro del diseño (tratamiento 9). Este tratamiento es el punto de partida para la optimización, teniendo en cuenta que son las condiciones normalmente empleadas en el grupo de investigación Química de Hongos Macromicetos. El diseño está representado por una regresión polinómica, tal como parece en la Ecuación 2-3 para generar las gráficas de contorno:

Ecuación 2-3

$$Y = 0,765 \beta_0 + 0,323 \beta_1 x_1 + 0,059 \beta_4 x_1^2 + 0,043 \beta_5 x_1^2 + 0,474 \beta_6 Fuente(ST) + 0,229 \beta_7 Fuente(ST) * x_1 + 0,051 \beta_7 Fuente(ST) * x_1^2$$

Tabla 2-3 Variables empleadas en el diseño central compuesto, indicando la combinación de tratamientos.

Tratamiento	Valores codificados		(X ₁)	(X ₂)
	X ₁	X ₂	Cantidad de fuente de nutrientes (g/L)	Cantidad de inóculo (Número de discos)
1	1	-1	45,00	8
2	1,68	1,08	40,61	11
3	0	1	30,00	12
4	-1,68	1,08	19,39	11
5	-1	0	15,00	8
6	-1,68	-1,08	19,39	5
7	0	-1	30,00	4
8	1,68	-1,08	40,61	5
9	0	0	30,00	8

X₁ = cantidad de fuente de nutrientes. X₂ = cantidad de inóculo

2.2.3 Análisis estadístico

Para la cinética de crecimiento se realizaron tres replicas, se compararon los datos de promedio por prueba *t* Student para determinar diferencias significativas con valor *P* de 0,05 empleando el software IBM SPSS Statistics(135).

Para el proceso de optimización los datos fueron analizados por técnicas de análisis de varianza (ANOVA) con valor *P* de 0,05, empleado el software estadístico R(62).

2.3 Resultados y discusión.

Una vez seleccionada el *H. tessulatus* como la especie a estudiar y el salvado de trigo y la harina de trigo integral como las dos fuentes de nutrientes más promisorias, por su producción de biomasa seca y la composición de la misma, era necesario determinar el tiempo ideal de cultivo con base en los mismos criterios.

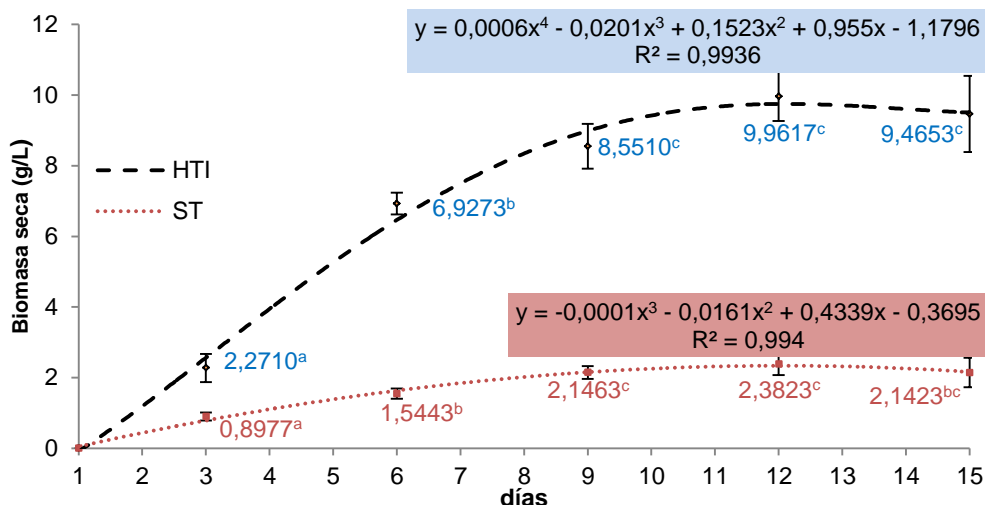
2.3.1 Cinética de crecimiento.

El análisis de la producción de biomasa seca, esquematizada en la Figura 2-1, permitió concluir, que ésta es mayor empleando harina de trigo integral, comparada con el salvado de trigo. El modelo indica el crecimiento exponencial esperado desde el día 1 hasta el día 9, con una tasa de crecimiento (μ) de 0,0051 g/h para HTI y 0,0023 g/h para ST y un tiempo de duplicación de 1,8979 días para HTI y 4,0258 días para ST. Este último parámetro indica la velocidad con la que un organismo crece, y si se incrementa el tiempo de duplicación, el valor de μ se reduce⁽¹³⁶⁾. Esta relación es claramente observable: con el salvado de trigo hay un mayor tiempo de duplicación y valores bajos de μ .

En términos de la menor producción de biomasa seca observada en ST comparada con el HTI, los resultados son concordantes con lo reportado para *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* y *P. sajor-cajú* cultivados en las mismas fuentes de nutrientes (137), comportamiento que, según los autores, varía dependiendo de la especie cultivada y no está relacionado con la proporción C/N, el contenido de grasas o lípidos de los medios. Sin embargo, es importante recordar que, como se discutió en el capítulo 1, el salvado de trigo es la fuente de nutrientes con la que se obtiene el contenido más bajo en peso, lo cual puede ser debido a que en el proceso de preparación del medio de cultivo en donde se realiza decocción y filtrado de la fuente de nutrientes, de los 30 g/L de salvado que se pesan inicialmente, únicamente el 10% está efectivamente disponible para el hongo, razón por la que tanto su producción de biomasa seca como su tasa de crecimiento en este medio es más baja y el tiempo de duplicación por ende es mayor.

Por otro lado, tanto para el ST como para la HTI, a partir del día 9 inicia la fase estacionaria que va hasta el día 15 del ensayo, por lo tanto desde el punto de vista de la producción de biomasa seca, la selección de este día como tiempo total de cultivo es la apropiada, debido a que no se ve un cambio significativo en producción de biomasa seca en los siguientes días del proceso. Cabe aquí anotar que, como se ha reportado por diferentes investigadores, no hay una relación directa entre la producción de biomasa y la biosíntesis de metabolitos⁽¹⁰¹⁾, se hace necesario evaluar la composición del micelio para verificar el efecto del tiempo en la producción de éstos a lo largo de la cinética de crecimiento y verificar si, con base en estas 2 variables, la selección del día 9 es o no el más adecuado.

Figura 2-1. Cinética de crecimiento de *Hypsizigus tessulatus* empleando salvado de trigo y harina de trigo integral como fuente de nutrientes.



ST: Salvado de trigo. HTI: harina de trigo integral (HTI).
 Superíndices diferentes indican diferencia entre resultados. $\alpha=0,05$, $n=2$.

2.3.2 Composición de la biomasa a lo largo de la cinética de crecimiento.

La determinación de la producción de metabolitos a lo largo de la fermentación se realizó mediante el análisis de los cromatogramas de gases (Anexo 5-2) de los extractos correspondientes a los días 6-15 con las dos fuentes de nutrientes evaluadas. Los compuestos determinados y sus abundancias relativas se consignan en la Tabla 2-4. De manera similar como se discutió en el capítulo 1, se evaluó el efecto del tiempo del cultivo sobre los principales grupos de compuestos: ácidos grasos (20 –25 min) y triterpenoides (entre 34 - 38 min).

Al analizar los cromatogramas se refleja que, el emplear salvado de trigo como fuente de nutrientes, durante los días 9 y 12, genera una menor proporción de ácidos grasos en las biomásas del *H. tessulatus* comparado con los triterpenoides, disminución que no es tan drástica para el caso de la harina de trigo integral. En el día 15 la proporción de ácidos grasos supera la de los compuestos triterpenoidales, para las dos fuentes de nutrientes evaluadas, con una disminución en la variedad de componentes al emplear harina de trigo integral, manteniéndose lo ya reportado para el caso del empleo de salvado de trigo como

Capítulo 2

componente del medio, como es el incentivar la biosíntesis de compuestos triterpenoidales.

Estos resultados se pueden analizar de una forma más cuantitativa con base en los datos consignados en la Tabla 2-4 y representados gráficamente en la Figura 2-2. Su análisis permite observar una diferencia en los resultados obtenidos con las dos fuentes de nutrientes: al emplear salvado de trigo hay una disminución de la abundancia relativa de los ácidos grasos después del día 6, pero independiente de esto, el ácido linoléico siempre es el constituyente mayoritario dentro de este grupo de compuestos. En cuanto al efecto del uso de la harina de trigo integral, la disminución en el contenido de ácidos grasos ocurre, pero de manera menos drástica comparado con el salvado de trigo, y durante los días 6 y 9 los porcentajes relativos de ácido linoleico y palmítico son cercanos (30,29 – 23,94 el día 6 y 19,96 – 22,11 el día 9, respectivamente).

Con base en lo reportado por Diamantopoulou *et al.*(66) quienes indican la disminución con el tiempo en el contenido de los ácidos grasos a lo largo del cultivo sumergido en basidiomicetos, específicamente para *Volvariella volvacea* y *Pleurotus sajor-caju*, este comportamiento es similar a lo observado en el presente trabajo. Los autores además mencionan que esto no está relacionado con la disminución de glucosa o carbohidratos similares en el medio, y que altas cantidades de lípidos fueron sintetizadas al inicio de las fases de crecimiento, mientras que se daba la movilización y degradación de lípidos al final de la misma y puede ocurrir después del agotamiento o disminución de la obtención de nutrientes del medio de cultivo por parte del organismo, lo que lleva al consumo de sus propias reservas de lípidos aportando la energía necesaria para su crecimiento y mantenimiento (138).

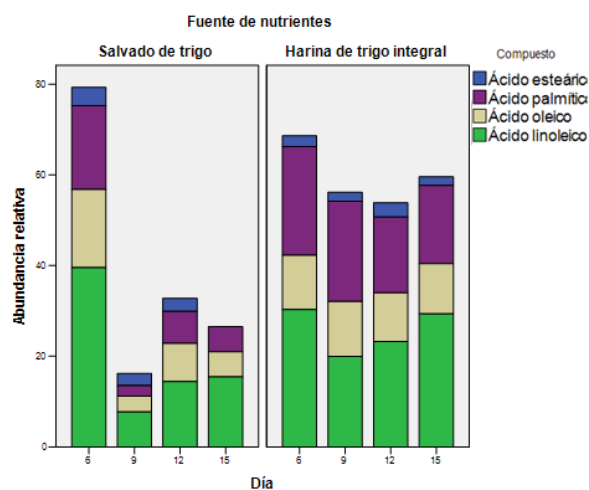
En lo que respecta a la disminución del contenido del ácido linoleico en la fase de crecimiento, este resultado de igual forma ya se había reportado en el cultivo sumergido de *Flammulina velutipes* y *Ganoderma applanatum*. En contraste, para *Pleurotus pulmonarius*, el contenido de dicho ácido se incrementaba a lo largo del cultivo(66). Es bien conocido que distintas especies de hongos tienen diversos comportamientos bajo las mismas condiciones de cultivo, y para el caso de las abundancia relativas de los ácidos grasos también están influenciadas por la fase de crecimiento y la composición del medio(66), razón por la cual los resultados diferirán entre especies. Pese a esto, se mantiene la característica de que los ácidos grasos insaturados predominan sobre los saturados, concordante con los resultados del presente trabajo.

Tabla 2-4 Abundancia relativa de ácidos grasos y triterpenoides determinados en los días 6, 9, 12, 15 de la FEL, de la biomasa cultivada en salvado de trigo y harina de trigo integral.

Compuestos	Salvado de trigo				Harina trigo integral			
	6 ^a	9 ^a	12 ^a	15 ^a	6 ^a	9 ^a	12 ^a	15 ^a
Ácido palmítico	18,52	2,30	7,11	5,51	23,94	22,11	16,70	17,25
Ácido linoleico	39,52	7,68	14,41	15,42	30,29	19,96	23,25	29,34
Ácido oleico	17,27	3,52	8,40	5,59	12,01	12,13	10,72	11,11
Ácido esteárico	4,03	2,73	2,87		2,40	1,96	3,20	1,90
Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol		2,18	2,00	2,72		1,42	1,46	
Ergosta-5,8,22-trien-3-ol	1,72	2,69	1,05	5,16				
Ergosta-5,7,22-trien-3-ol	3,75	38,17	19,78	28,70	2,30	20,18	15,43	20,01
Ergosta-5-en-3-ol							1,97	
Ergosta-5,8-dien-3-ol		2,79	2,14		23,00	0,79		
Ergosta-7-en-3-ol		2,14	1,49			1,43	1,74	
Estigmasta-5-en-3-ol		3,14	2,46			2,90	4,01	
Estigmasta-3-ona				1,86				
Estigmasta-4-en-3-ona			0,87			1,49	1,03	

^a Resultado de análisis por triplicado en cada día analizado

Figura 2-2 Abundancia relativa de los ácidos grasos determinados a partir de los días 6, 9, 12 y 15 de la FEL con las dos fuentes de nutrientes.



Acerca de los compuestos triterpenoidales, del análisis de los cromatogramas se puede concluir que, sin distinción de las dos fuentes de nutrientes evaluadas, en el día 6 la presencia de compuestos triterpenoidales en las biomásas es baja. En el día 9 se incrementa la biosíntesis de este grupo de compuestos, tanto en proporción como en variedad estructural, comportamiento relacionado con la fase de incremento de la biomasa en la cinética de crecimiento. Esta respuesta permanece durante el día 12 utilizando salvado de trigo como fuente de nutrientes, pero en el 15 se comienza a

Capítulo 2

evidenciar una disminución, esta última más evidente para el caso de la harina de trigo integral.

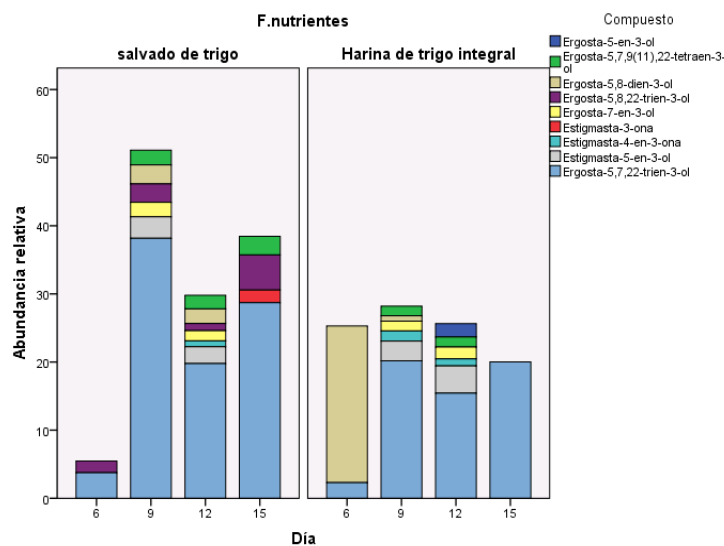
Sobre la abundancia relativa de los triterpenoides (Figura 2-3 y Tabla 2-4), al emplear salvado de trigo se da un aumento después del día 6 de cultivo de este grupo de compuestos, concordante con el incremento de la biomasa seca, resultados análogos a lo obtenido por Feng *et al.*, quienes evalúan un modelo de cinética para la obtención de triterpenoides totales de *Ganoderma lucidum* e indican que la producción de este grupo de compuestos se correlaciona con el aumento de la biomasa, por tanto le atribuyen el producto de la biosíntesis al crecimiento celular(139).

La variedad de compuestos triterpenoidales determinados en las biomásas cultivadas con las dos fuentes de nutrientes, es mayor en los días 9 y 12 comparada con el día 15, sumado a un incremento de las abundancias relativas de estos compuestos (Figura 2-3). Lo anterior indica que en estos días de la FEL la biosíntesis de triterpenoides se incentiva, relacionado también con el inicio de la fase estacionaria. Para explicar esto se debe tener en cuenta que la fase estacionaria se define por una disminución en la disponibilidad de nutrientes del medio o una acumulación de sustancia tóxicas para el organismo, y en cualquiera de los casos el hongo se encontrará en un proceso de estrés, razón por la cual la biosíntesis de ergosterol y sus derivados se incrementa, debido a que se ha demostrado que están involucrados en la resistencia a la peroxidación de los lípidos de membrana(140), además de incrementar la resistencia mecánica de las células(141). Lo anterior indicaría una respuesta al estrés del organismo que conlleva a la biosíntesis de este tipo de compuestos(142).

Aunado a lo anterior al emplear salvado de trigo y en los distintos días de muestreo, se determinó en mayor abundancia relativa el ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3-ol), comparado con los demás triterpenoides (Figura 2-3), comportamiento que es lo esperado debido a que es el esteroles más abundante reportado en los basidiomicetos (26).

En el mismo sentido, se evidencia una variación en la abundancia de este esteroles con el transcurso de los días, particularmente, en el día 6 en el que se presenta una baja abundancia relativa comparado con los siguientes días, comportamiento que ya ha sido reportado por Shao *et al.*(143), como consecuencia de la variación dependiente de la fase de crecimiento, indicado anteriormente, y del estado nutricional del hongo.

Figura 2-3 Abundancia relativa de los compuestos triterpenoidales determinados en los días 6, 9, 12 y 15 de la FEL con las dos fuentes de nutrientes.



Para los demás triterpenoides no hay un patrón similar observado. Con el uso de la harina de trigo integral, el comportamiento es análogo al obtenido con salvado de trigo, siendo el ergosterol el triterpenoide mayoritario determinado, excepto en el día 6 y con la particularidad adicional de que en el día 15, fue el único encontrado en la biomasa.

El anterior resultado es interesante, teniendo en cuenta lo establecido previamente donde un alto contenido de ergosterol es ideal, desde el punto de vista de su contribución a potenciales beneficios para la salud y funciones fisiológicas significativas, como la actividad antitumoral, relacionada con la inhibición directa de la angiogénesis inducida por tumores, además su efecto antiinflamatorio, antimicrobial y antioxidante(143), lo que permite catalogar a este compuesto como de gran potencial desde una perspectiva medicinal y alimenticia, por ende de las biomasa obtenida a partir del día 9 de la FEL.

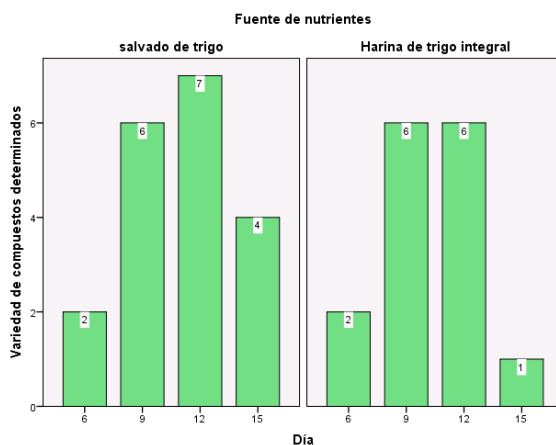
En la literatura, ya se ha evaluado el efecto de las harinas como fuente de nutrientes en la composición de la biomasa de especies como *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Pleurotus djamor*(55), obteniendo un mayor porcentaje de compuestos triterpenoidales al emplear salvado de trigo como fuente de nutrientes. Estos resultados concuerdan con lo obtenido en la presente investigación para *H. tessulatus*, donde el uso del salvado de trigo favorece la biosíntesis tanto en términos de cantidad como de variedad estructural comparado con la harina de trigo integral (Figura 2-3), permitiendo ratificar el potencial que tiene el uso del salvado de trigo, como una fuente de nutrientes promisoría para la

Capítulo 2

producción de biomasa con mayor diversidad estructural de compuestos triterpenoidales. De lo anterior se debe aclarar que salvado de trigo presenta baja producción de biomasa, razón por la cual se propone un proceso de optimización en la búsqueda de incrementar esta biomasa seca obtenida.

En resumen, como se puede observar del análisis de la Figura 2-4, indistintamente de la fuente de nutrientes usada, durante los días 9 y 12 se biosintetiza una mayor variedad de triterpenoides.

Figura 2-4 Variedad de compuestos triterpenoidales determinados por CG-EM en los días 6, 9, 12 y 15 de la FEL con las dos fuentes de nutrientes



Al comparar los resultados discutidos en el numeral 2.3.1, en los que se determinó que la producción de biomasa seca no presenta diferencias significativas desde el día 9 (Figura 2-1), con la composición de las biomásas a lo largo de la fermentación, se corrobora que la selección de este día es la apropiada para proceder con el proceso de optimización y determinar la cantidad de fuente de nutrientes e inóculos ideales, buscando obtener un equilibrio entre la cantidad de biomasa y la mayor variedad estructural de metabolitos de interés, con la finalidad de obtener una biomasa con buen potencial de aplicación en bioprospección, bien sea por las propiedades biológicas reportadas ya para los compuestos constituyentes de la misma o por el posible potencial que como antioxidante pueda presentar.

2.3.3 Optimización de los factores del proceso fermentativo para la obtención de biomasa.

Por medio de la MSR se evaluó en primera medida, el efecto sobre la producción de biomasa seca consecuencia de la variación en la cantidad de fuente de nutrientes y de inóculos empleados para la FEL con el salvado de trigo y la harina de trigo integral (Tabla 2-5).

Tabla 2-5 Producción de biomasa seca para cada combinación de tratamientos evaluada.

Tratamiento	Cantidad de fuente de nutrientes (g/L)	Cantidad de inóculo (número de discos)	Producción de biomasa seca (g/L)	
			Harina de trigo integral	Salvado de trigo
1	45,00	8	14,540	4,654
2	40,61	11	11,252	3,384
3	30,00	12	7,375	2,482
4	19,39	11	5,100	1,690
5	15,00	8	3,830	1,632
6	19,39	5	4,174	1,515
7	30,00	4	6,907	1,901
8	40,61	5	10,259	3,522
9*	30,00	8	7,642 ±0,520	2,916 ±0,295

*centro del diseño

Inicialmente, se realizó el análisis de varianza (Tabla 2-6 y Tabla 2-7) para evaluar el modelo empleado, indicando que es apropiado para ajustar la biomasa seca como respuesta en función de la cantidad de fuentes de nutrientes y de inóculos (valor $P = 0.146946$), interactuando con los dos tipos de fuentes de nutrientes (HTI y ST). El coeficiente de variación ($R^2 = 0,9814$) indica alta correlación entre los valores experimentales y los predichos por el modelo. Los coeficientes de regresión se consideran estadísticamente significativos para la cantidad de fuente de nutrientes (X_1) debido al valor P , que se encuentra por debajo de 0,05 (Tabla 2-7). Sin embargo, la cantidad de inóculo (X_2) y la interacción entre los factores no presenta significancia. Adicionalmente, no se rechaza la hipótesis de homocasticidad (valor $P = 0,8514$) ni normalidad (valor $P = 0,1456$).

Tabla 2-6 Análisis de varianza (ANOVA) del ajuste del modelo de regresión representando la producción de biomasa seca de *H. tessulatus*

	GL	SC	CM	Valor F	Valor P
Lineal(X_1, X_2^2)	2	0.78879	0.39439	202.2224	1.907e-14
Interacción (X_1, X_2^2)	1	0.00008	0.00008	0.0388	0.8457662
Cuadrática (X_1, X_2^2)	2	0.04593	0.02296	11.7738	0.0003721
Fuente	1	1.91223	1.91223	980.4806	< 2.2e-16
Fuente: X_1	1	0.23542	0.23542	120.7103	3.638e-10
Fuente: $l(X_1^2)$	1	0.01278	0.01278	6.5542	0.0182373
Residuales	21	0.04096	0.00195		
Ausencia de ajuste	3	0.01032	0.00344	2.0215	<u>0.1469460</u>
Error puro	18	0.03064	0.00170		

Coefficiente de correlación $R^2 = 0,9814$. GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios. X_1 = cantidad de fuente de nutrientes. $P=0,05$

Tabla 2-7 Coeficientes estimados por la regresión del modelo

Variab independientes	Coefficiente	Error estándar	Valor t	Valor P
Intercepto	0.7654663	0.0154935	49.4055	< 2.2e-16
X_1	0.3226572	0.0147184	21.9221	5.941e-16
X_2	0.0222000	0.0113606	1.9541	0.0641344
X_1^2	0.0591711	0.0141140	4.1924	0.0004102
X_2^2	-0.0425654	0.0122342	-3.4792	0.0022394
$X_1: X_2$	-0.0028982	0.0147160	-0.1969	<u>0.8457662</u>

X_1 = cantidad de fuente de nutrientes. X_2 = cantidad de inóculo. $P=0,05$

De manera particular, para cada uno de los tipos de fuente de nutrientes (ST y HTI) (Tabla 2-8), la cantidad de las mismas (X_1) tiene mayor influencia sobre la producción de biomasa comparado con la cantidad de inóculo (X_2), donde ST presenta valor $P = 2,589 \times 10^{-06}$ y HTI con valor $P = 5.783 \times 10^{-08}$, indicando significancia estadística. Adicionalmente, no se presenta interacción entre la cantidad de fuente de nutrientes y de inóculo al emplear ST ($P = 0.5780$) y HTI ($P = 0.9565$).

En la Figura 2-5 se encuentran las gráficas de contornos y de superficie de respuesta obtenidas, las cuales indican el efecto de la cantidad de fuente de nutrientes (CFN) y de inóculo (CI) en la producción de biomasa seca de *H. tessulatus*. Este resultado demuestra que en la superficie de respuesta hay un incremento en la cantidad de biomasa a medida que aumenta la cantidad de fuente de nutrientes. Por otro lado, la cantidad de inóculos

Capítulo 2

presenta un efecto menos marcado, aun así, con la adición de 8 inóculos se observa una mayor producción de biomasa seca.

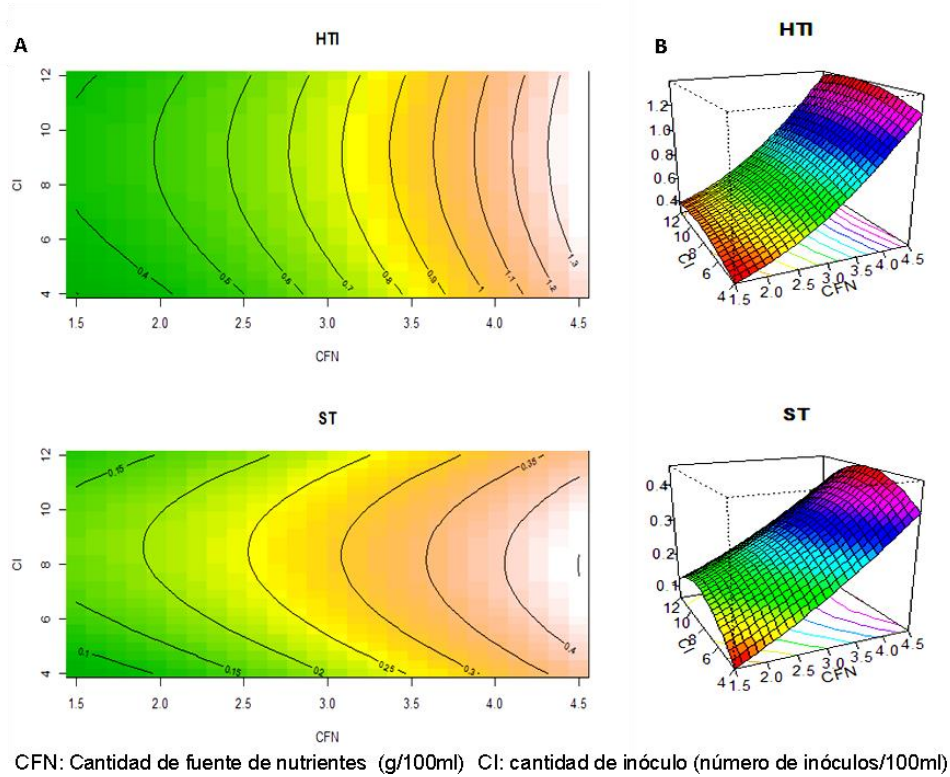
Tabla 2-8 Coeficientes estimados por la regresión del modelo en cada uno de los tratamientos para las fuentes de nutrientes.

Variables independientes	Coeficiente	Error estándar	Valor t	Valor P
Salvado de trigo (ST)				
Intercepto	0.2917299	0.0102459	28.4728	3.957e-10
X_1	0.0939672	0.0090394	10.3953	<u>2.589e-06</u>
X_2	0.0107426	0.0098673	1.0887	0.304572
X_1^2	0.0080673	0.0086682	0.9307	0.376312
X_2^2	-0.0436206	0.0106260	-4.1051	0.002656
$X_1:X_2$	-0.0073751	0.0127816	-0.5770	0.578077
Harina de trigo integral (HTI)				
Intercepto	0.7649327	0.0225807	33.8755	8.395e-11
X_1	0.3226572	0.0199217	16.1963	5.783e-08
X_2	0.0336574	0.0217462	1.5477	0.15609
X_1^2	0.0591745	0.0191037	3.0975	0.01277
X_2^2	-0.0415101	0.0234183	-1.7726	0.11006
$X_1:X_2$	0.0015787	0.0281690	0.0560	0.95653

X_1 = cantidad de fuente de nutrientes. X_2 = cantidad de inóculo. $P=0,05$

Es importante resaltar que el modelo indica un incremento de la biomasa obtenida al aumentar la cantidad de fuente de nutrientes en el medio, y esto se ajusta a salvado de trigo y trigo integral, por lo cual se propone como perspectiva evaluar el incremento de este factor más allá del rango evaluado en este trabajo. Esto permitirá predecir de manera exacta la cantidad de fuente de nutrientes necesaria para obtener la máxima producción de biomasa bajo los parámetros acá evaluados.

Figura 2-5 Efecto de la cantidad de fuente de nutrientes y de inóculo en la producción de biomasa seca de *H. tessulatus*. A. Gráficas de contorno y B. Superficie de respuesta.



Con base en los parámetros evaluados, los valores de biomasa seca obtenidos después de la optimización fueron 14,540 g/L y 4,654 g/L, usando 45,00 g/L de harina de trigo y salvado de trigo, respectivamente, y 8 inóculos en ambas fuentes de nutrientes. Estos valores reflejan un aumento de 1,9 y 1,6 veces al comparar con el medio empleado en el punto central del diseño, resultados que corroboran la importancia de realizar procesos de optimización y que además abren la puerta para futuras investigaciones en las que se estudie el efecto de otras variables del cultivo que permitan incrementar aún más la biomasa obtenida.

Realizar una comparación de estos datos con lo obtenido por otros autores, resulta difícil debido a que son pocos los estudios enfocados particularmente en el *H. tessulatus* y más aún en fuentes de nutrientes como las empleadas en la investigación. A pesar de esto, hay reportes de estudios que han usado otro tipo de basidiomicetos como es el caso de Shah y Modi(144) quienes evaluaron el efecto de variar el pH inicial, la temperatura, las fuentes de carbono, y de nitrógeno y la cantidad del inóculo (entre el 3% y el 7% v/v) sobre la producción de biomasa de *Ganoderma lucidum* cultivado por FEL. Los autores

mencionan que la cantidad ideal de inóculo es del 6% (v/v), con el que se obtienen 274 mg/100mL, mientras que al utilizar 7% (v/v), se genera una reducción en la producción a 219 mg/100ml. Los autores evaluaron el efecto de factor por factor y luego combinaron los mejores niveles de cada factor con lo que lograron obtener $368 \pm 3,71$ mg/100mL de biomasa. Estos resultados concuerdan con lo observado para el *H. tessulatus*, en el que se evidenció que no hay una relación directa entre el aumento de la cantidad de inóculos sobre la producción de biomasa. Sin embargo, es importante mencionar que para confirmar esta hipótesis, se podrían hacer otros ensayos a altas concentraciones de fuente de nutrientes, por ejemplo a la determinada como la ideal (45 g/L), incrementando el número de inóculo usado y analizar el efecto sobre la cantidad de biomasa generada.

Como se ha discutido a lo largo de este trabajo, es importante determinar el efecto de las variables tanto en la producción de biomasa como sobre su composición. A continuación, se realiza el análisis de los principales grupos de compuestos determinados de la fracción de mediana polaridad.

2.3.4 Composición de la biomasa para los diferentes tratamientos en el proceso de optimización.

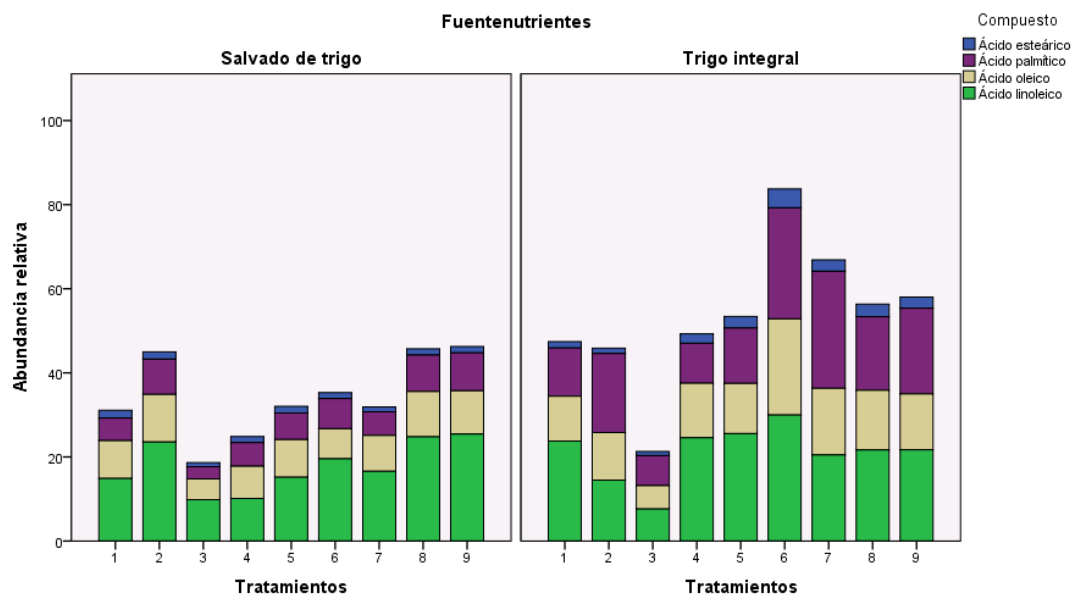
La abundancia relativa de los triterpenoides y ácidos grasos determinados en los distintos tratamientos por CG-EM se encuentra en la Tabla 2-9. En la Figura 2-6, están representadas gráficamente las abundancias relativas de los ácidos grasos mayoritarios. En términos generales, su abundancia relativa difiere en cada uno de los ensayos evaluados, con algunas singularidades, como los resultados del uso de salvado de trigo que indican una mayor abundancia relativa en los tratamientos 2, 8 y 9 y menor abundancia en el tratamiento 3. Para la biomasa seca cultivada con harina de trigo integral, la mayor abundancia se observa en el tratamiento 6 y la menor el tratamiento 3.

Referente a los compuestos triterpenoidales (Figura 2-7 y Tabla 2-9), con salvado de trigo como fuente de nutrientes hay mayor abundancia en el tratamiento 3 y una variedad estructural más amplia con respecto a los demás tratamientos; con el tratamiento 1 se genera una menor variedad estructural y con el 4 una menor abundancia. En contraste, con este último tratamiento, empleando harina de trigo de integral, se genera tanto la mayor variedad estructural como la mayor abundancia relativa y menor abundancia en los tratamientos 2, 6 y 7.

Tabla 2-9 Abundancia relativa de compuestos determinados en CG-EM para los distintos tratamientos de optimización

Compuestos	Tratamientos empleando salvado de trigo									Tratamientos empleando trigo integral								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ácido Palmítico	5,35	8,38	2,92	5,60	6,31	7,17	5,63	8,67	9,01	11,49	18,81	7,13	9,48	13,15	26,43	27,82	17,47	20,39
Ácido Linoleico	14,90	23,60	9,85	10,10	15,20	19,60	16,60	24,80	25,50	23,80	14,48	7,64	24,56	25,60	30,00	20,50	21,70	21,70
Ácido Oleico	9,01	11,33	4,92	7,68	8,96	7,15	8,51	10,80	10,30	10,67	11,31	5,55	12,98	11,93	22,85	15,85	14,18	13,27
Ácido Esteárico	1,87	1,71	0,95	1,46	1,60	1,44	1,16	1,50	1,51	1,50	1,26	1,00	2,27	2,78	4,50	2,73	3,03	2,64
Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol			1,52	2,00	1,68	0,69	0,69	0,97	0,43	1,64	0,36	3,69	2,24	1,61			1,96	0,86
Ergosta-5,7,22-trien-3-ol	21,50	22,60	23,60	6,39	21,24	15,62	24,18	9,48	11,66	25,71	5,05	22,48	27,21	20,10	5,11	4,60	17,87	10,91
Ergosta-5-en-3-ol		1,16	3,11	3,11		1,37		1,43	1,64	1,77			1,81					
Ergosta-3-ol		0,88							1,43									
Ergosta-5,8-dien-3-ol			1,46		1,50	0,56	2,19	0,42	0,70	2,69		2,53	2,45	1,80			1,26	
Ergosta-3-ona	1,96	0,93	0,68	0,60	1,86	0,80	1,31											
Ergosta-7-en-3-ol			0,74										2,40	1,38				
Estigmasta-5-en-3-ol	4,50	3,77	3,14	2,25	0,72	3,97	0,73	4,08	4,24	3,35		3,32	3,27	3,27				
Estigmasta-3-ol		1,23	1,44	0,81	1,23	1,44		0,82	0,48									
Estigmasta-3-ona	1,85	0,64	0,80	0,90	1,75	1,75	0,89	0,39	0,48									
Estigmasta-4-en-3-ona	1,93	1,56	1,41	1,19	3,45	1,04	2,15	0,98	1,14	0,46	0,89	0,52	1,17	2,42	2,42		2,97	1,73

Figura 2-6 Abundancia relativa de los ácidos grasos obtenidos en cada uno de los tratamientos de optimización.

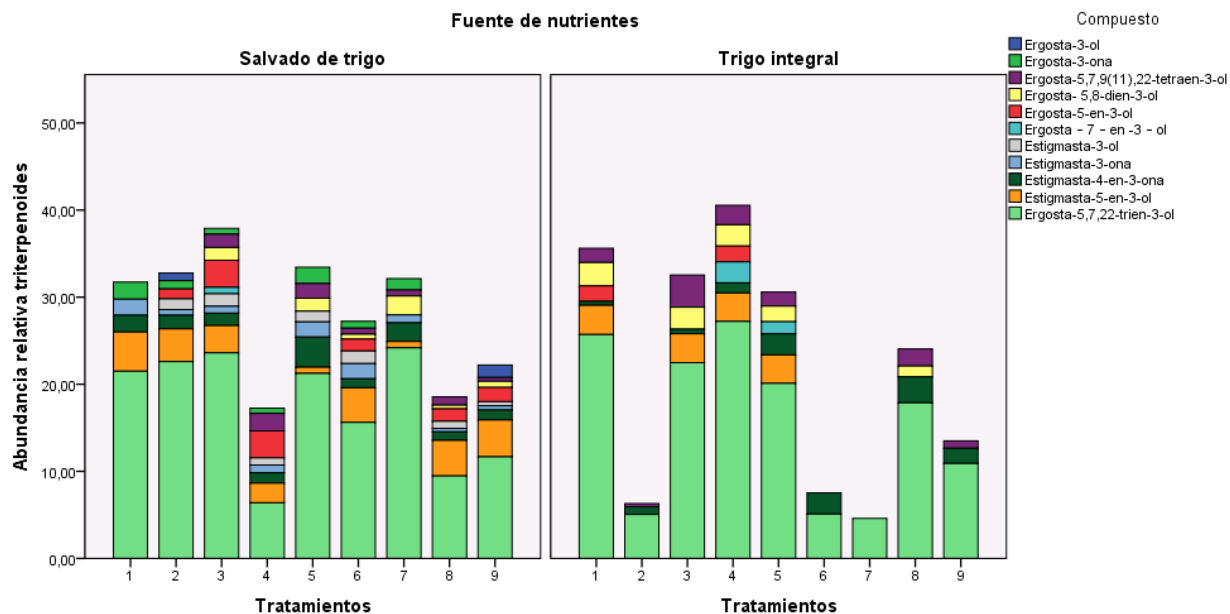


Como ya se había mencionado anteriormente, el componente mayoritario indistintamente de la fuente de nutrientes o del tratamiento, es el ergosterol debido a que es el esteroide más común de los basidiomicetos y hace parte de su pared celular.

Al analizar este comportamiento con las condiciones de los tratamientos empleados, los resultados no parecen estar asociados, ya sea, al aumento en la cantidad de fuente de nutrientes o de inóculos. Se observan algunas singularidades como el caso del tratamiento 1 usando salvado de trigo, con el que se genera la menor variabilidad de compuestos triterpenoidales y que podría estar asociado a una mayor cantidad de fuente de nutrientes y una mayor producción de biomasa, como se determinó en el numeral 2.3.3. Sin embargo la abundancia de estos, no es la más alta.

Relacionado con los ácidos grasos, el aumento en el número de inóculos (tratamiento 3) conlleva a una disminución en la producción de estos metabolitos con el salvado de trigo como fuente de nutrientes, pero no es claro un efecto del aumento en la cantidad de la misma. Un comportamiento similar se evidencia con la harina de trigo integral.

Figura 2-7 Abundancia relativa de triterpenoides obtenida a partir de los distintos tratamientos de optimización.



A diferencia del efecto causado sobre la producción de biomasa, en el que se observaba una clara tendencia del aumento de la cantidad de la fuente de nutrientes sobre la biomasa producida, el efecto no es tan claro para el caso de la composición de la misma y no se pueden generalizar una serie de condiciones que permitan una mayor producción de los metabolitos de mediana polaridad.

En conclusión si se pretende obtener una biomasa seca que tenga un alto contenido de ácidos grasos, se debe optar por utilizar 19,39 g/L de harina de trigo y 5 inóculos para el cultivo por FEL de *H. tessulatus*, con la salvedad de que la cantidad de biomasa seca generada va a ser baja (1,515 g/L). Si se quiere aumentar la producción de biomasa seca (3,522 g/L), se deben emplear los mismos 5 inóculos pero 40 g/L de la harina. Por otro lado si el objetivo está más dirigido a la biosíntesis de triterpenoides, se debe optar por el uso de salvado de trigo en una cantidad de 30 g/L con 12 inóculos con lo cual se generará una cantidad de biomasa intermedia (7,375 g/L), que se puede aumentar (11.252 g/L de biomasa), sin disminuir de una forma drástica el contenido y la variedad de triterpenoides, usando 40 g/L del salvado y 11 inóculos.

Claramente no hay una condición que permita obtener una alta producción de biomasa que tenga adicionalmente un alto contenido de ácidos grasos y de triterpenos,

Capítulo 2

confirmando la hipótesis planteada por varios autores de la ausencia de una relación entre estas características del producto biotecnológico(54).

Es importante resaltar que los resultados de la presente investigación, constituyen el primer reporte enfocado en optimizar las condiciones de cultivo, específicamente en la cantidad de fuente de nutrientes y de inóculo, sobre la biomasa y la composición de su fracción de mediana polaridad de *H. tessulatus* cultivado con salvado de trigo y harina de trigo integral. No obstante, como se mencionó en los antecedentes de este capítulo, otros investigadores han realizado estudios enfocados en procesos de optimización con objetivos como la estandarización de condiciones de extracción de triterpenos de cuerpos fructíferos de *Ganoderma lucidum*(145,146)

Trabajos semejantes al realizado en la presente investigación, optimizaron la producción biomasa y de triterpenos, cuantificados por un método espectrofotométrico, de *Antrodia cinnamomea* cultivada en FEL, variando los componentes del medio (almidón de maíz, salvado de trigo, MgSO₄), el pH inicial y el tiempo de cultivo en diez niveles(147). Los autores observaron que las condiciones para mayor cantidad de biomasa son diferentes a los necesarios para aumentar la producción de triterpenos, resultados que son concordantes con lo indicado en este trabajo.

Lu *et al.*(148) empleando *Antrodia camphorata*, cultivada en FEL, optimizaron el tamaño del inóculo (cantidad de arthroconidias) y los componentes del medio (glucosa, peptona y harina de soya), para la producción de biomasa y de intratriterpenoides cuantificados por un método espectrofotométrico. Los autores mencionan que la máxima producción de triterpenoides se alcanza con una concentración de arthroconidias de $1,78 \times 10^5$ /ml y como componentes del medio glucosa (25,25 g/L), peptona (4,48 g/L) y harina de soya (2,74 g/L).

Lo anterior indica un efecto de la cantidad de inóculo empleado, contrario a lo obtenido en este trabajo, razón por la cual, se propone evaluar este factor en concentraciones mayores de fuente de nutrientes para evitar la posible influencia de este factor en la baja o nula influencia de la cantidad de inóculos, junto a una modificación de la metodología de adición de inóculo, debido a que, adicionalmente los autores, indican diferencias en el tipo de inóculo empleado (artrosporas, micelio) obteniendo mejor control del tamaño del inóculo y crecimiento de *A. camphorata* en la fermentación al usar artrosporas, comparado con micelio. Esto relacionado, principalmente, con la búsqueda de pellets

resultantes de menor tamaño y evitar problemas en la transferencia de oxígeno y nutrientes al interior de este.

Chang *et al.*(149) investigaron el efecto de diferentes fuente de carbono (glucosa, sacarosa y fructosa) y de nitrógeno (extracto de levadura, extracto de malta y peptona), sobre la producción de biomasa y triterpenoides (calculados como peso de extracto en AcOEt) de *Antrodia cinnamomea* en FEL. Por medio de la MSR determinan la composición más eficiente, comprobando un incremento de la biomasa del 1,18% (p/p) a 3,20 % (p/p) e incremento de triterpenoides de 16,7 a 31.8 mg/g. Comportamiento concordante con el aumento de biomasa logrado en la presente investigación para las dos fuentes de nutrientes, junto a la abundancia relativa de triterpenoides (Figura 2-7) en el tratamiento 1 y tratamiento 9 (control). Adicionalmente, Chang *et al.*(149) resaltan la importancia de optimizar la composición del medio, para incrementar la producción de biomasa y triterpenoides, debido a que la composición de este y las condiciones del cultivo pueden afectar el crecimiento del hongo y alterar la producción de estos metabolitos, efecto igualmente observado en este trabajo.

Xiang *et al.*(150) optimizan la producción de biomasa y triterpenos de *Inonotus obliquus* por MSR evaluando diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, indicando un incremento de la biomasa, además de triterpenoides de 1,4 veces comparada con el medio basal. Los anteriores trabajos señalan la utilidad de la MSR como una herramienta en el análisis del efecto de condiciones de cultivo en maromicetos y se corrobora en este trabajo con resultados promisorios con respecto a la producción de biomasa de la especie evaluada.

2.4 Conclusiones

Por medio del análisis de la cinética de crecimiento de *H. tessulatus* en FEL, se determinó que el día 9 de cultivo es el tiempo ideal para la producción no solo de biomasa seca sino de compuestos triterpenoidales, tanto con salvado de trigo como harina de trigo integral.

Se empleó un diseño central compuesto rotatable con la metodología de superficie de respuesta para llevar a cabo la optimización de dos factores claves en la FEL de *H. tessulatus*, obteniendo un incremento en la producción de biomasa seca comparado con el control, y resaltando la alta influencia de la cantidad de fuente de nutrientes sobre la

Capítulo 2

biomasa obtenida, contrario a la cantidad de inóculo, el cual no presenta una diferencia sobre la biomasa producida.

A comparar entre el uso de la harina de trigo integral y el salvado de trigo, con esta última se incrementa la variabilidad de compuestos triterpenoidales en la biomasa seca de *H. tessulatus*, sin embargo, su producción de biomasa es baja.

3 CAPITULO 3 Determinación de la incidencia de las condiciones de cultivo en la actividad antioxidante de *Hypsizigus tessulatus*

3.1 Antecedentes

3.1.1 Actividad biológica de los macromicetos.

El ser humano ha usado los hongos como medicina por cerca de 5000 años o más(151). A modo de ejemplo se puede citar algunos estudios en los cuales los hongos o sus extractos se han empleado para el tratamiento de varias afecciones como es el caso de la *Antrodia cinnamomea*, un hongo parásito de plantas, reconocido en la medicina tradicional China y comúnmente usado para el control de la hipertensión, dolor abdominal, intoxicación por alcohol o alimentos y cáncer(101); *Poria cocos*, un hongo saprofito que crece en diversas especies vegetales del género *Pinus*, del cual su esclerocio es usado en China y Japón por sus efectos tónicos; *Laetiporus sulphureus*, un hongo comestible de la familia Poliporaceae, empleado en tratamientos antitumorales, antivirales e inmnomoduladores; *Inonotus obliquus*, un hongo medicinal, conocido como Chaga, usado en la medicina tradicional de Rusia, Polonia y países Bálticos, como agente antiparasitario; para citar tan sólo unos pocos.

Dentro de los grupos de compuestos responsables de estas actividades, se encuentran los triterpenoides, metabolitos con actividades comprobadas como antitumoral, antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, antiviral, antihipertensiva, antiangiogénica e inmunomoduladora. Como se mencionó en capítulos anteriores, los estudios relacionados con este tema se han enfocado a *Ganoderma sp.*, con escasos trabajos en otras especies, hecho que incentiva a continuar las investigaciones, no solo de este grupo de metabolitos, sino de la composición en general de otras especies de hongos, las cuales podrían presentar dentro de sus constituyentes compuestos bioactivos hasta ahora no aprovechados.

Tabla 3-1 Actividad biológica de triterpenoides de hongos macromicetos.

GÉNERO / ESPECIE	COMPUESTO(S)	ACTIVIDAD BIOLÓGICA
<i>Ganoderma sp.</i>	+316 triterpenos ganodéricos. Triterpenoides tipo Ergosta y Lanosta	Antitumoral Anti-VIH-1 Antihipertensiva Antiangiogénica Inmunomoduladora Antihepatitis B Antioxidante Antimicrobiana(2)
<i>Antrodia sp.</i>	Triterpenoides tipo Ergosta y Lanosta	Antioxidante(112)(3) Antitumoral(152)(3)(45) Antiinflamatoria(45)
<i>Agaricus blazei</i>	Ergosterol	Antitumoral(153)
<i>Fomitopsis sp.</i>	Triterpenoides tipo Lanosta	Antimicrobiana(46) Antiinflamatoria
<i>Poria cocos</i>	+50 derivados lanostanoides Ácido paquimico	Antitumoral Antiandrogénica(3)
<i>Laetiporus sulphureus</i>	Triterpenoides tipo Lanosta	Antimicrobiana Antiviral Antioxidante Anti-inflamatoria Inmunomoduladora(3)
<i>Daedalea dickinsii</i>	Triterpenoides tipo Lanosta	Antitumoral(3)
<i>Cordyceps sinensis</i>	Esteroles	Antitumoral(47)
<i>Inonotus obliquus</i>	Triterpenoides tipo Lanosta	Antitumoral Antimicrobiana Antioxidante(3)

En la Tabla 3-1, se consignan algunas actividades biológicas de los triterpenoides de origen fúngico, que como ya se ha discutido en los capítulos anteriores, es el grupo de constituyentes mayoritarios de mediana polaridad de la biomasa de hongos. Dentro de estas actividades, llama la atención la antioxidante, ya que estos compuestos podrían constituirse en nuevos agentes exógenos que permitirían contribuir a minimizar los problemas de salud actuales producto del efecto de las especies reactivas de oxígeno (ERO). Estas especies, producidas no sólo en el metabolismo normal de los organismos, sino como resultado de factores ambientales, conllevan al estrés oxidativo(154) y por ende a la degeneración del organismo.

El estrés oxidativo, causado por un desbalance metabólico y un exceso de las ERO, que originan radicales libres, puede llevar a un amplio rango de patologías relacionadas con

enfermedades cardiovasculares, desórdenes neurológicos como Alzheimer y Parkinson, envejecimiento prematuro y algunos tipos de cáncer(155).

Los radicales libres son generados como subproductos del metabolismo en un amplio rango de reacciones y aunque los organismos poseen mecanismos de defensa antioxidante, estos pueden llegar a ser insuficientes para proteger totalmente del daño. Por esta razón, además de mecanismos endógenos de defensa, la ingesta a través de la dieta es otra fuente de antioxidantes que puede contribuir a la homeostasis oxidativa(156).

Hoy en día se ofrecen suplementos dietarios, empleados para mantener la salud, así como para prevenir o controlar diversas enfermedades. Este aspecto aumenta el interés general por los antioxidantes, y en consecuencia por la búsqueda de compuestos efectivos, no tóxicos y de origen natural(154), siendo los macromicetos, un grupo de organismos con el potencial para la búsqueda de este tipo de compuestos

3.1.2 Los macromicetos y su actividad antioxidante.

Se ha reportado el potencial antioxidante, de extractos acuosos, metanólicos, polisacáridos y fenoles de macromicetos(4) (Tabla 3-2) dejando de lado otros fungimetabolitos que bien se podrían desempeñar como antioxidantes.

Poco se conoce sobre la actividad antioxidante de los componentes lipofílicos de macromicetos, de los cuales ya se han demostrado resultados positivos empleando cuerpos fructíferos, como lo reportado por Shao *et al.*(143) quienes indican la importancia del ergosterol, obtenido a partir de extractos de hexano, en la actividad antioxidante de fracciones de baja polaridad de *Agaricus bisporus*. Adicionalmente, Smina *et al.*(157) determinaron la habilidad de los triterpenos totales de *Ganoderma lucidum* para la captura de radicales libres y el fortalecimiento del sistema defensivo del cuerpo contra ellos, indicando que este grupo de compuestos presenta una alta eficiencia como antioxidantes. Estos resultados son similares a los obtenidos por Guzmán *et al.*(158) para *Ganoderma applanatum*.

La Tabla 3-2 ilustra los diferentes ensayos empleados para la determinación de la actividad antioxidante. La selección entre uno u otro se realiza con base en el tiempo del ensayo y en el tipo de compuestos a evaluar. A continuación, se describen algunas de las metodologías usuales.

Tabla 3-2 Actividad antioxidante de metabolitos biosintetizados por hongos macromicetos

ESPECIE	COMPUESTOS Y/O EXTRACTO EVALUADO	MECANISMO ANTIOXIDANTE EVALUADO
<i>Agaricus brasiliensis</i>	Polisacáridos y proteínas con selenio	Poder captador de radicales libres (DPPH e hidroxilo)
<i>Cortinarius purpurascens</i>	Rufoolivacina, rufoolivacina C, rufoolivacina D y leucorufoolivacina	Poder captador de radicales libres (DPPH)
<i>Ramaria flava</i>	Compuestos fenólicos	Poder captador de radicales libres (DPPH e hidroxilo)
<i>Phellinus baumii Pilat</i>	Polisacáridos	Poder captador de radicales libres (DPPH, hidroxilo y anión radical superóxido)
<i>Cordyceps taii</i>	Polisacáridos	Poder captador de radicales libres (DPPH, hidroxilo y anión radical superóxido)
<i>Agaricus bisporus</i>	Polisacáridos, polifenoles.	Poder captador de radicales libres (DPPH, hidroxilo y anión radical superóxido)
<i>Ganoderma lucidum</i>	Triterpenos	Poder captador de radicales libres (DPPH, ABTS+ y anión radical superóxido)
<i>Inonotus obliquus</i>	Triterpenoides	Poder captador de radicales libres (DPPH, anión radical superóxido y AAPH)(159)
<i>Agaricus bisporus</i>	Hexano	Poder captador de radicales libres (DPPH)(143)

Modificado de Zhang et al.(151)

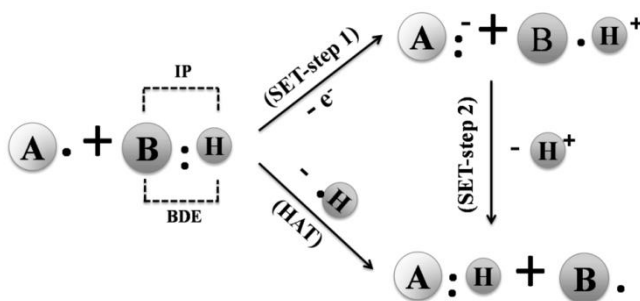
3.1.3 Metodologías para la determinación de la actividad antioxidante.

En general, existen varias aproximaciones para la clasificación de métodos para medir actividad antioxidante. Una de ellas se basa en clasificar los métodos como directos e indirectos, mientras que otra los clasifica de acuerdo con el mecanismo mediante el cual sucede el proceso antioxidante. En los métodos indirectos se estudia la habilidad del antioxidante para estabilizar algún radical libre, de hecho, se ha popularizado el uso de algunos radicales libres metaestables, con fuerte absorción en el espectro visible, como

herramienta para determinar actividad estabilizadora de radicales libres (Ej. DPPH, ABTS). Por su parte, los métodos directos están basados en el estudio del efecto de un antioxidante sobre la degradación oxidativa de sistemas como: proteínas, ácidos nucleicos, plasma sanguíneo, grasas, lipoproteínas, membranas biológicas, entre otros; los lípidos constituyen el sistema más frecuente debido a la importancia de su oxidación en el desarrollo de enfermedades, así como en el deterioro de la calidad de los alimentos(160).

Los antioxidantes reaccionan con los radicales libres por diferentes mecanismos, como son la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), transferencia de electrones (SET) o la combinación de ambos (Figura 3-1). En el mecanismo de HAT el radical libre remueve un átomo de hidrógeno del antioxidante, y el parámetro que se evalúa es la entalpía de disociación (BDE). Para el mecanismo de SET el antioxidante dona un electrón transformándose en un catión radical, y en este caso el potencial de ionización (IP) del antioxidante, es el factor más importante en la evaluación de la actividad. No es fácil distinguir entre los dos mecanismos y en muchos casos las reacciones se dan simultáneamente(157). Ejemplos de ensayos basados en el mecanismo HAT incluyen los métodos usualmente empleados ABTS y ORAC y entre los basados en SET están DPPH y FRAP.

Figura 3-1 Mecanismos de reacción entre el antioxidante y el radical libre



A· = radical; B:H = antioxidante; A:H = radical reducido; IP = potencial de ionización; BDE = entalpía de disociación; SET: transferencia de electrones; HAT: transferencia de átomos de hidrógeno(157)

3.1.3.1 Modelo del radical libre 1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH·) para la medición del poder captador de radicales libres

El DPPH es un radical libre con un máximo de absorción a 515 nm en etanol y un color púrpura que disminuye en función del tiempo luego de su reducción(157). El mecanismo se ilustra en la Figura 3-2. Se debe aclarar que el ensayo DPPH está basado,

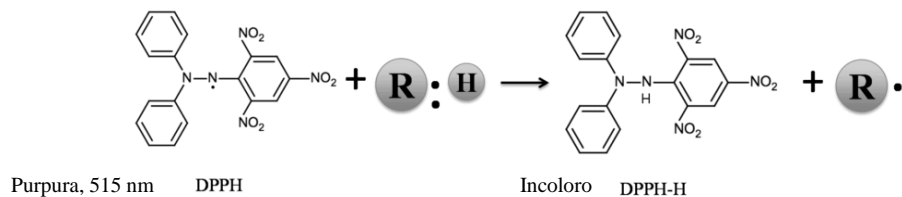
Capítulo 3

conjuntamente, en las reacciones de HAT y SET, a pesar, que normalmente se clasifica en esta última(157).

Entre las ventajas de DPPH^{*} se encuentra la ausencia de dimerización en su estado sólido o en solución; puede aceptar electrones o átomos de hidrogeno pero es difícilmente oxidado; la solución de DPPH^{*} es coloreada y relativamente estable; el ensayo es simple, ya que se basa en la medida de la perdida de absorbancia de DPPH^{*} luego de su reacción con el compuesto y/o extracto evaluado, requiriendo únicamente un espectrofotómetro para su medición(157).

Entre las limitaciones del método están su insolubilidad en agua, por lo cual se debe usar o una mezcla de agua – metanol (1:1 v/v) , metanol o etanol; los impedimentos estéricos impuestos por el radical pueden afectar su reactividad; compuestos coloreados afectaran las mediciones(161). Finalmente, a pesar de las limitaciones el ensayo DPPH se mantiene como uno de los más usados para obtener información de la actividad antioxidante en etapas iniciales de estudio.

Figura 3-2 Mecanismo de reacción propuesto entre el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y un antioxidante



R:H = antioxidante. R = radical antioxidante.(157)

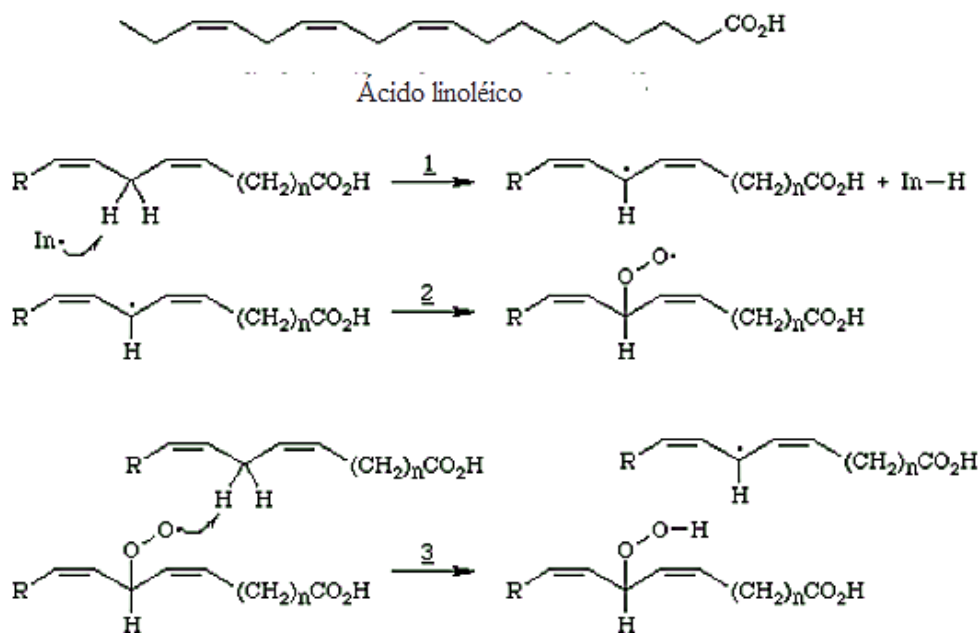
3.1.3.2 Modelo del ácido linoleico para la medición del poder inhibitor de la peroxidación lipídica.

La determinación del porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica del ácido linoléico, es un método cuantitativo que mide la capacidad que posee un antioxidante para inhibir la formación de radicales peroxilo (ROO•), los cuales se forman fácilmente en los alimentos, como producto de su degradación y también en las membranas biológicas cuando son sometidas a estrés oxidativo. Estos radicales se generan durante las reacciones en cadena cuando se presenta oxidación lipídica. Una gran parte de estas reacciones es causada por las especies reactivas de oxígeno(156).

Capítulo 3

En la Figura 3-3 se resumen las características principales en el proceso de auto-oxidación del ácido linoléico. En el paso 1, se forma el radical libre alquilo (R[•]) con doble cadena alílica, permitiendo que sea el radical con más probabilidad de producirse. Una vez formado, éste reacciona con oxígeno molecular en el paso 2 para producir el radical peroxilo (ROO[•]), a su vez este radical capta un átomo de hidrógeno de otra molécula de ácido linoléico en el paso 3, lo que produce un peróxido orgánico o hidroperóxido (ROOH) y un nuevo radical libre, propagando así la reacción en cadena de oxidación.

Figura 3-3 Reacción de formación del radical hidroxiperóxido a partir del ácido linoléico.



La sigla In[•] representa la especie que inicia la reacción en cadena de oxidación.

La cantidad de hidroperóxido (ROOH) producido durante el proceso de peroxidación lipídica se evalúa a partir de la reacción de ROOH con el ion ferroso Fe⁺², con la consecuente producción del ión férrico Fe⁺³ que en presencia del anión tiocianato (SCN⁻) da lugar a la formación de un complejo de coloración roja ([Fe(SCN)₂]⁺) cuantificable espectrofotométricamente a 500 nm(162).

De manera general, los anteriores ensayos se usan, para distintos organismos, dentro de los macrohongos particularmente para *H. tessulatus* empleando algunas de las metodologías antes mencionadas, como se describe a continuación.

3.1.4 Actividad antioxidante de *Hypsizigus tessulatus*

Aunque los estudios con *H. tessulatus* se han enfocado en las actividades antitumoral, antifúngica o antiproliferativa(163), es poca la información sobre sus propiedades antioxidantes, especialmente de compuestos de mediana polaridad obtenidos del micelio cultivado en FEL.

Dentro de los trabajos reportados, se encuentran ensayos *in vivo* como el de Yoshino *et al.*(164), quienes evalúan la actividad antioxidante de extractos etanólicos de cuerpos fructíferos de *H. tessulatus* en suero sanguíneo de ratones afectados por alergia tipo IV inducida con oxazolona, demostrando un efecto de supresión del estrés oxidativo inducido por especies reactivas de oxígeno.

Ahora bien, relacionado con trabajos *in vitro*, Li *et al.*(165) y Liu *et al.*(166) determinan la actividad antioxidante a partir de polisacáridos aislados de cuerpos fructíferos mostrando resultados positivos con valores por encima del patrón evaluado butirato de hidroxitolueno (BHT) indicando el potencial de este tipo de compuestos. Lee *et al.*(163) evaluaron la actividad de los extractos en etanol, agua fría y caliente de los cuerpos fructíferos de *H. tessulatus* donde a 5 mg/mL del extracto etanólico, la capacidad captadora del radical DPPH por parte del extracto fue de 59,7%, comparado con el patrón de ácido ascórbico de 82,4% y una CE₅₀ de 4,19 mg/mL.

Por otro lado, Chowdhury *et al.*(128) reportan CE₅₀ de 0,105 mg/mL empleando extractos en metanol de los cuerpos fructíferos de *H. tessulatus*, y Lee *et al.*(167) evaluaron la actividad en cuerpos fructíferos y biomasa obtenida por FEL, usando como medio de cultivo extracto de malta y una cepa mutante de *H. tessulatus*, hallando en ambos casos, una capacidad de captar el radical libre de 75,5%, con diferencias en la CE₅₀ donde en el primero fue de 3,30 mg/mL y en el segundo de 2,85 mg/mL. La investigación de dichos autores es la única en la que se evalúa la actividad antioxidante de micelio obtenido por FEL del *H. tessulatus*, con resultados similares a los hallados para la fructificación, razón por la cual, se plantea el cultivo sumergido como una fuente de biomasa con una potencial actividad antioxidante y con las ventajas citadas anteriormente (capítulo 1) para su obtención, frente al cultivo tradicional.

Con base en los antecedentes anteriormente descritos, se hace evidente la importancia no sólo de determinar la actividad antioxidante del hongo seleccionado, sino de explorar si

hay un efecto relacionado con la variación de las condiciones de cultivo, particularmente, de la cantidad de fuente de nutrientes y de inóculos, en la actividad antioxidante de los extractos en diclorometano, constituidos mayoritariamente por triterpenos y ácidos grasos, de la biomasa obtenida de *H. tessulatus*, empleando como fuente de nutrientes salvado de trigo y harina de trigo integral. Por otro lado, es relevante evaluar el potencial antioxidante del extracto etanólico, debido a que como se ha mencionado, este puede estar constituido por compuestos polifenólicos reconocidos por su actividad antioxidante(155).

3.2 Materiales y métodos.

3.2.1 Preparación de los extractos

Las biomásas secas obtenidas del *H. tessulatus* cultivadas con los distintos tratamientos empleados en el proceso de optimización, usando como fuente de nutrientes salvado de trigo y harina de trigo integral (1.2.5), se extrajeron con asistencia de ultrasonido en EtOH y CH₂Cl₂ a temperatura ambiente.

3.2.2 Ensayos de actividad antioxidante

3.2.2.1 Bioautografía con el radical libre 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH•)

Para la determinación de la actividad captadora del radical DPPH por bioautografía(168), se desarrollaron las cromatoplasas en dos sistemas cromatográficos: Tolueno : Acetato de etilo (4:1) y Tolueno : Ácido acético (85:15), este último con doble recorrido, empleando cromatofolios Alugram SIL G/UV₂₅₄ Macherey Nagel. Se sembraron aproximadamente 30 µL de una solución de 6 mg/mL de cada uno de los extractos.

Los cromatogramas se revelaron por aspersion con una disolución al 0,1 % (p/v) del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) en metanol. Transcurridos 30 min la presencia de manchas amarillas en una base violeta fue indicativa de un resultado positivo para agentes antioxidantes en la muestra. Como patrón se empleó una solución de trolox en metanol (1 mg/mL).

Capítulo 3

De manera simultánea, se corrieron placas testigo que fueron reveladas con vapores de yodo, cloruro de zinc y vainillina. Adicionalmente, las placas eluidas en el sistema tolueno y ácido acético (85:15), se revelaron con cloruro férrico acuoso para evidenciar la presencia de compuestos polifenólicos.

El cloruro de zinc se preparó al 30% (p/v) en metanol del 96% y las placas asperjadas se llevaron a 100°C hasta la aparición de manchas de color azul, morado, verde o rojo, indicando la presencia de esteroides. Para el revelador vainillina – ácido sulfúrico se disolvió 1% de vainillina en 5% H₂SO₄ y 95% EtOH, las placas asperjadas se calentaron a 120°C hasta que las manchas alcanzaran la máxima intensidad, indicando la presencia de alcoholes superiores, fenoles, esteroides y aceites esenciales. Para el revelador de cloruro férrico se empleó una solución de la sal al 5% en ácido clorhídrico 0,5 M, calentando posteriormente las placas a 100°C indicando para la presencia de ácidos hidroxámicos coloración roja o para fenoles coloración azul o verdosa(61).

3.2.2.2 Cuantificación del poder captador del radical libre DPPH de los extractos

La capacidad de captación del radical DPPH'(169) por parte de los extractos se cuantificó a través de la determinación de la concentración efectiva 50 (CE₅₀), la cual define la concentración de extracto necesaria para reducir en un cincuenta por ciento la concentración inicial del radical libre. La concentración del radical libre DPPH', se determinó espectrofotométricamente a partir de medidas de absorbancia leídas a una longitud de onda a 515 nm. Previamente se construyó una curva de calibración a partir de datos de absorbancia vs concentración de radical libre DPPH a una temperatura controlada de 25,00 ± 0,01°C, en un rango de 2,0 -100 µM.

Para la determinación de la CE₅₀ únicamente se empleó el extracto etanólico de la biomasa seca del *H. tessulatus*, cultivada con salvado de trigo bajo las condiciones de la optimización correspondientes a los tratamientos 1, 3, 5, 7 y 9 (Tabla 2-3), siendo estos últimos puntos intermedios de los totalidad de los tratamientos empleados. Se preparó una solución patrón en etanol de éstos a una concentración de 1016 µg/mL. Adicionalmente, se preparó una solución patrón de DPPH' con una concentración aproximada de 45 µg/mL. Se hizo la corrección de la concentración de la solución stock de DPPH' a partir de la curva de calibración previamente construida. Finalmente se preparó un blanco de reactivos y se realizó un barrido espectral (absorbancia vs longitud de onda), para verificar que no hay absorción de esta solución, a la longitud de onda en que absorbe el radical libre DPPH' (515 nm).

Capítulo 3

La reacción entre el extracto y el radical DPPH[•] tuvo lugar en un tubo de ensayo provisto de tapa rosca, para ello se prepararon 12 mezclas en diferentes relaciones de concentración extracto/DPPH[•] según se describe a continuación: de la solución patrón del extracto se prepararon por dilución 12 soluciones, en un rango de concentraciones de 2 a 116 µg/mL. Después, se tomaron alícuotas de cada una de estas soluciones y se mezclaron con 0,8 mL de solución patrón de DPPH[•], posteriormente se completó a un volumen de 3 mL con EtOH. A continuación, se midió la absorbancia para cada una de las mezclas hasta que los valores fueran estables.

Para cada mezcla de reacción se graficó la variación del porcentaje remanente de DPPH[•] en función del tiempo y a partir de esta gráfica se determinó el porcentaje remanente en el estado estacionario del radical (estado en que no cambia el % remanente de DPPH[•] con el tiempo). Este último valor se obtuvo por extrapolación.

El porcentaje remanente en el estado estacionario tomado a cada concentración, se graficó en función de cada una de las relaciones de concentración evaluadas (Extracto/DPPH[•]). A partir de esta gráfica se determinó por interpolación el valor de CE₅₀ del extracto (mg de extracto / mg de DPPH[•]). Los valores obtenidos se compararon con los patrones de BHT y ácido ascórbico.

3.2.2.3 Determinación del porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica en el modelo del ácido linoléico.

Se prepararon soluciones de 1 mg/mL en etanol de los extractos indicados en el numeral anterior. A partir de estas soluciones patrón se prepararon cinco diluciones de 10, 50, 250, 500 µg/mL por triplicado(170). Se tomaron 0,5 mL de cada una de ellas y se les adicionó una solución buffer de fosfatos (2 mL a pH de 7,0) junto a una emulsión de ácido linoléico (2,5 mL que contenían 0,28 g de tween-40, 0,28 g de ácido linoléico disuelto en solución de buffer de fosfatos (0,05 M a pH de 7,0)). Se preparó un control negativo o blanco que contenía la emulsión de ácido linoléico (2,5 mL) y la solución buffer de fosfatos (2 mL – 0,04 M a pH 7,0). Paralelamente se preparó un control positivo con BHT. Cada una de las mezclas fue incubada a 37,00 ± 0,01 °C durante 72 horas. Se tomó 0,1 mL de la mezcla incubada, en intervalos de 24 h y se les adicionó: solución de etanol (4,7 mL al 75% (v/v)), solución de tiocianato de amonio (0,1mL al 30 % (p/v)) y solución de cloruro férrico (0,1 mL, 1% en HCl al 3,5 %). Se midió la absorbancia a 500 nm. El porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica fue calculado usando Ecuación 3-1

Ecuación 3-1
$$\% \text{ de inhibición} = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) * 100$$

Donde A_0 es la absorbancia del blanco y A_1 es la absorbancia de la muestra en presencia del extracto.

3.2.3 Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos de diferencia de medias en la inhibición de la peroxidación lipídica se empleó un ANOVA de una vía con $\alpha = 0,05$, empleando el software estadístico IBM SPSS(135).

3.3 Resultados y discusión

A lo largo de los capítulos 1 y 2 se ha discutido acerca del potencial que tienen los macromicetos como productores de una amplia variedad de metabolitos con actividades biológicas comprobadas. En este capítulo y con base en los resultados de la composición de las biomásas secas cultivadas bajo las diferentes condiciones del proceso de optimización, se pretende evaluar el potencial como antioxidante de los extractos de mediana polaridad del *H. tessulatus*. Así mismo y con base en los reportes de este tipo de actividad en fracciones de alta polaridad, se determinó el potencial antioxidante de los extractos etanólicos. Para tal fin, se emplearon técnicas basadas en la evaluación de su capacidad de captación de radical DPPH[•] y el poder de inhibición de la peroxidación lipídica, en el modelo del ácido linoléico.

3.3.1 Bioautografía con el radical libre 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH[•])

La bioautografía con DPPH es una técnica que permite hacer de una forma cualitativa, relativamente fácil y en corto tiempo, una evaluación de la potencial capacidad captadora de radicales libres.

En la Figura 3-4, está el registro fotográfico de las placas desarrolladas con la fase móvil de mediana polaridad y asperjadas con la solución de DPPH. De su análisis se puede concluir que, indistintamente de las condiciones empleadas en la optimización, hay una

Capítulo 3

respuesta positiva en el extracto en CH_2Cl_2 de la biomasa cultivada en salvado de trigo, evidenciado por el viraje de coloración (violeta a amarillo claro) de la mancha correspondiente a un R_f de 0,45. Adicionalmente, su extracto en etanol, presenta resultados positivos para los tratamientos 1, 2, 6, 7, 8 y 9 con compuestos que exhiben un R_f de 0,33. Contrario a este resultado ninguno de los extractos de las biomásas cultivadas con harina de trigo integral, evidenciaron tener un potencial como captadores del radical DPPH.

Con el objetivo de hacer un acercamiento a los grupos de compuestos que puedan ser responsables de dicha actividad, las placas se revelaron con diferentes agentes químicos, ampliamente conocidos.

Inicialmente con el cloruro de zinc, revelador específico para compuestos esteroidales, se observa que en los extractos en DCM obtenidos a partir de la biomasa cultivada en salvado de trigo (Figura 3-4), se revelan manchas de mayor intensidad en un R_f de 0,45 y 0,19, similar a lo observado con harina de trigo integral pero con una menor intensidad. Por otro lado en los tratamientos 4 y 5 de los extractos con salvado de trigo en CH_2Cl_2 se ve una menor intensidad que en los demás. Contrariamente los extractos etanólicos de las biomásas con las dos fuentes de nutrientes presentan baja o nula presencia de compuestos con núcleo esteroideal.

Para la vainillina, nuevamente los extractos con salvado de trigo en DCM generan una mayor intensidad y variedad de manchas de coloración azul, indicando la presencia de alcoholes superiores, fenoles, esteroides o aceites esenciales que coinciden con el R_f de 0,45 y 0,19 revelados con ZnCl_2 y adicionalmente otras a R_f de 0,67 y 0,54. La presencia de estas manchas es la misma al emplear la harina de trigo integral, pero con una menor intensidad. Se debe resaltar en la placa del extracto etanólico de salvado de trigo la presencia de manchas a R_f de 0,33, con mayor intensidad en los tratamientos 1, 2, 6, 7 y 8, coincidentes con la respuesta positiva al emplear DPPH.

Estos resultados permiten plantear que la respuesta positiva en bioautografía generada por los extractos de las biomásas cultivadas con salvado de trigo, podrían estar asociadas a un compuesto o grupo de compuestos de tipo esteroideal. Según indican Maestro y Borja(171), a la presencia de esteroides tanto 4-metil como 17-etilideno ($\text{H}_3\text{C}-\text{HC}=\text{}$) le puede ser atribuida la capacidad captadora de radicales libres, debido a que estos esteroides reaccionan rápidamente con los radicales para producir otros radicales,

Capítulo 3

relativamente estables, actuando como antioxidantes, ya que pueden interrumpir la reacción en cadena del estrés oxidativo. Así mismo, los autores resaltan que se puede alcanzar una eficiencia mayor con la presencia de uno o más dobles enlaces endocíclicos, lo cual concuerda con lo indicado por Shao *et al.*(143) quienes mencionan que el doble enlace conjugado del ergosterol contribuye a la actividad antioxidante.

Este tipo de estructuras fueron determinadas en los extractos de las biomásas obtenidas con los distintos tratamientos (capítulo 2), en las que se encontraron dos compuestos con las características estructurales anteriormente descritas (ergosta-5,7,22-trien-3-ol (ergosterol) y ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol), confirmando que los esteroides con un grupo etilideno en la cadena lateral y dobles enlaces en los núcleos, son eficaces como captadores de los radicales DPPH.

Con respecto a la polaridad de los compuestos con posible actividad, presentan similitud con el estigmasterol (Estigmasta-5,22-dien-3-ol), esteroide tomado como patrón y que presenta un R_f 0,43, revelado con vainillina y cloruro de zinc.

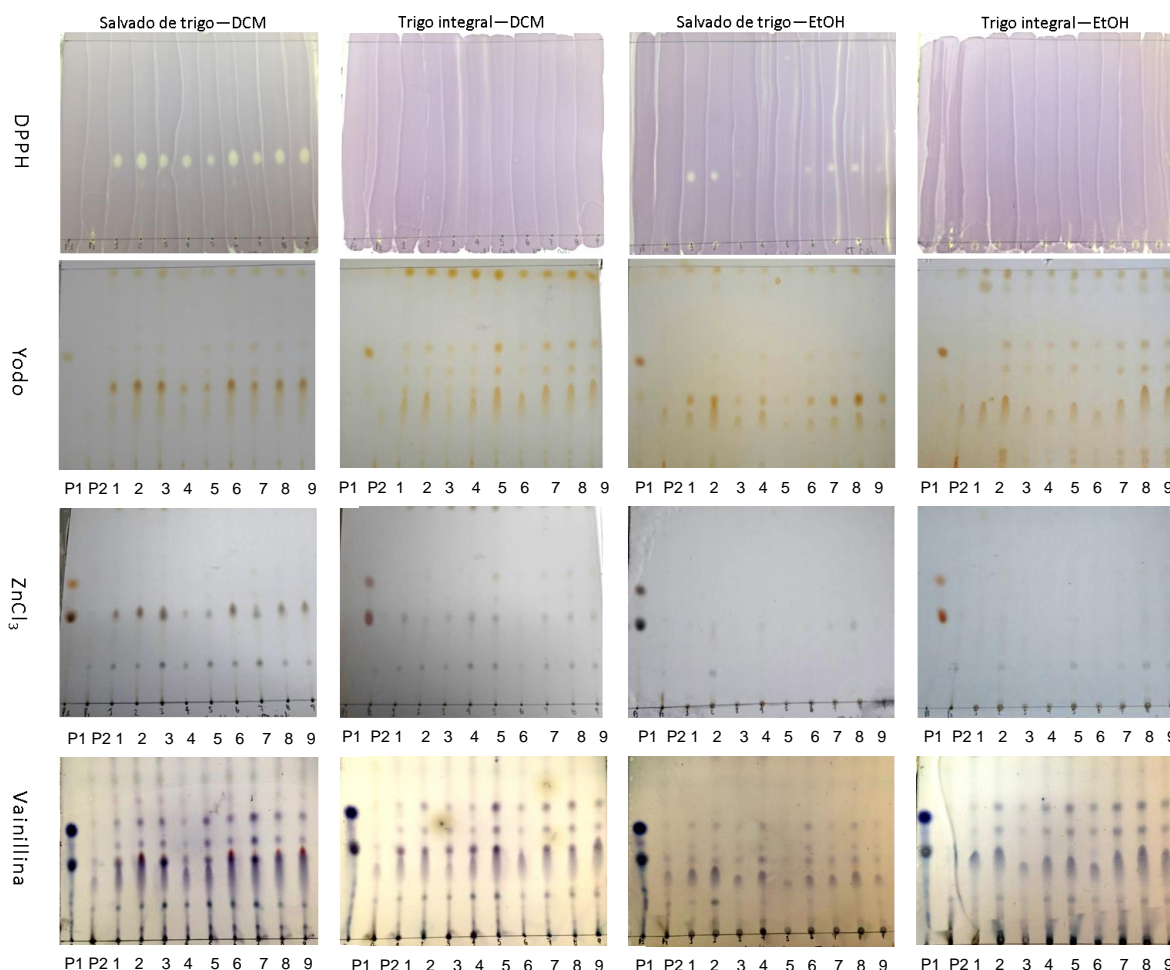
Ahora bien, debido a que comúnmente se atribuye la acción antioxidante, principalmente, a compuestos de tipo polifenólico(155), entre otros(167), se evaluó su presencia en los extractos, desarrollando las placas con una mezcla de disolventes comúnmente utilizado para este tipo de compuestos(61) y revelando con $FeCl_3$, además de la determinación de la capacidad de captación de $DPPH^{\bullet}$, obteniendo los resultados ilustrados en la Figura 3-5.

Del análisis de esta figura, se puede evidenciar, para los extractos en CH_2Cl_2 y salvado de trigo una respuesta positiva con el revelador específico para los distintos tratamientos de la optimización, apareciendo manchas a R_f de 0,95, 0,83, 0,66, 0,64, 0,56 y 0,39, y un resultado positivo para la capacidad captadora de $DPPH^{\bullet}$ correspondiente a la mancha con un R_f de 0,56. No obstante, llama la atención el hecho de que se revelen esa amplia variedad de manchas con el cloruro férrico, reactivo específico para componentes polares, como los fenoles que no serían extraídos con un disolvente como el diclorometano. Para dar una explicación a este comportamiento, se hicieron diversos ensayos en CCD con patrones de triterpenoides y extractos enriquecidos en este grupo de compuestos, en los que se pudo evidenciar que el $FeCl_3$ en medio ácido, genera manchas de color que varían entre rojo, azul y verde para este grupo de compuestos y por ende se puede concluir que

Capítulo 3

los constituyentes de estos extractos eluidos con el sistema Tolueno:ácido acético y revelados con FeCl_3 , corresponden a núcleos triterpenoidales.

Figura 3-4 Cromatogramas de los extractos de las biomásas de *H. tessulatus* cultivado bajo las condiciones del proceso de optimización desarrollados con Tol:AcOEt 4:1 (v/v), y visualizados con diferentes reveladores.



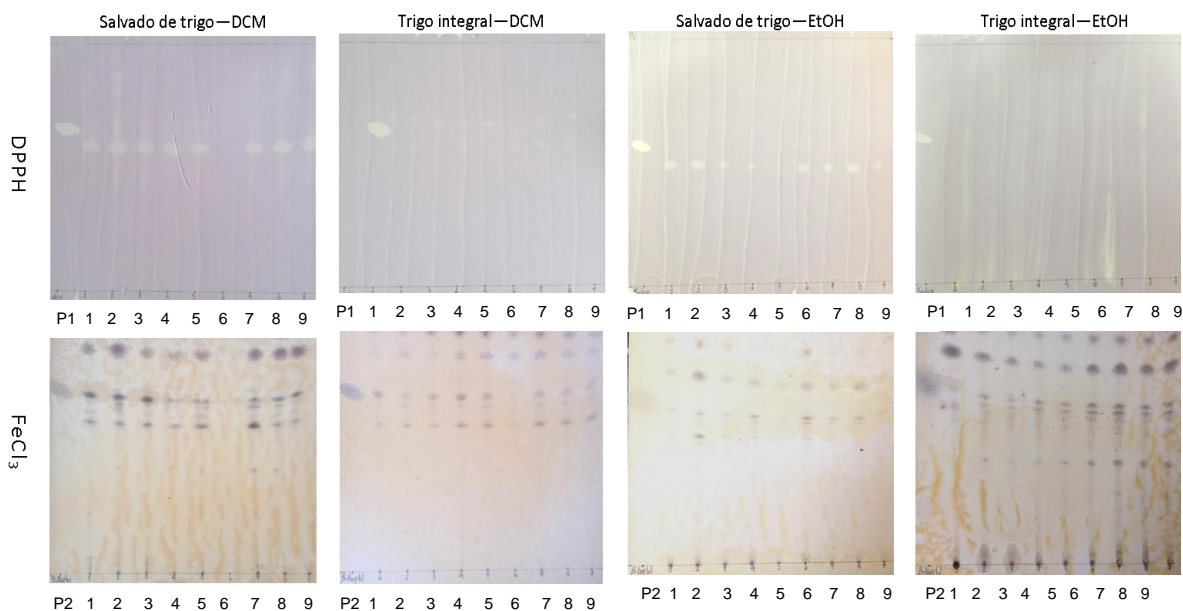
P1, patrón estigmasterol –lanosterol; P2, extracto de *P. ostreatus* enriquecido en ergosterol; cada uno de los números representa un tratamiento definido en el proceso de optimización (capítulo 2).

De manera similar para los extractos en etanol y salvado de trigo como fuente de nutrientes, se obtuvieron para todos los tratamientos manchas reveladas con el FeCl_3 en R_f de 0,85, 0,73, 0,59, 0,57 y 0,53, coincidiendo, esta última con una respuesta positiva para la capacidad captadora de DPPH^{\cdot} , aunque con menor intensidad en el tratamiento 5. Lee *et al.*(163) reportan que altos contenidos de fenoles totales fueron los responsables de las propiedades antioxidantes efectivas del extracto etanólico en cuerpos fructíferos de *H. tessulatus*. Por lo tanto, en el extracto etanólico de micelio obtenido en este trabajo los compuestos de tipo fenólico o polifenólico podrían ser los responsables de esta actividad,

Capítulo 3

aunque de igual manera habría un aporte importante de los compuestos triterpenoidales tal como se mencionó en el párrafo anterior.

Figura 3-5 Cromatogramas de los extractos de las biomásas del *H. tessulatus* cultivado bajo las condiciones del proceso de optimización, desarrolladas en el sistema tolueno:ácido acético 85:15 (v/v), y revelados con DPPH (bioautografía) y FeCl₃



P1: β -Naftol; P2: Trolox. Cada uno de los números representa un tratamiento definido en el proceso de optimización (capítulo 2).

Para poder confirmar qué grupo de compuestos son los responsables del poder captador de radicales DPPH, sería necesario realizar una cuantificación de los fenoles y de los triterpenoides y relacionar estos resultados con los obtenidos para las bioautografías, buscar un revelador más selectivo para los fenoles.

Con respecto a los tratamientos cultivados con harina de trigo integral, ya sea en extractos de DCM o etanol, la capacidad captadora de DPPH^{*} es mínima o nula, mostrando con esto un mayor potencial antioxidante para la biomasa de *H. tessulatus* obtenida empleando salvado de trigo como fuente de nutrientes, resultado concordante con lo descrito en el capítulo 2. Con base en esto, se procedió a cuantificar en dicha biomasa su capacidad captadora de DPPH^{*} por medio de la CE₅₀ y a evaluar su potencial para la inhibición de la peroxidación lipídica.

En este punto, se debe aclarar que se usó el extracto etanólico, ya que, a lo largo del estudio de los compuestos antioxidantes, los polifenoles han tenido un papel

preponderante sobre dicha actividad incluyendo los mecanismos de captación de radicales libres e inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LBD), entre otras(155).

3.3.2 Cuantificación del poder captador del radical libre DPPH de los extractos

Inicialmente, se cuantificó la capacidad captadora de los radicales DPPH^{*} de los extractos etanólicos de las biomásas obtenidas por los tratamientos de optimización 1, 3, 5, 7, 9 (capítulo 2), obteniendo como resultado la siguiente escala con base en su potencial para captar el radical: Ácido ascórbico>BHT>1>9>7>3>5 (Tabla 3-3).

Los patrones comerciales presentan una mayor actividad que los distintos tratamientos. El extracto con la mayor capacidad de captar el radical es el tratamiento 1, el cual se relaciona con la mayor cantidad de salvado de trigo adicionado al medio de cultivo, que además de incentivar la biosíntesis de compuestos y aumentar la producción de biomasa, como se concluyó anteriormente, también se asocia con manchas reveladas con FeCl₃ (Figura 3-5) de una mayor intensidad, comparado con el tratamiento 5, que presenta la mayor CE₅₀. Este resultado concuerda con lo indicado por Loganayaki *et al.*(172), quienes relacionan la capacidad de captación de los radicales DPPH^{*} con la concentración de los compuestos fenólicos, debido a la habilidad de éstos para contribuir a la transferencia de electrones o donación de hidrógenos, así como a la contribución de los triterpenoides presentes en el extracto.

Tabla 3-3 Cuantificación del poder captador del radical DPPH^{*} para los extractos de *H. tessulatus*.

Tratamientos de optimización	CE ₅₀ DPPH [*] (mg muestra/mg DPPH [*])
1	10,49
3	17,95
5	19,27
7	15,34
9	13,54
Ácido ascórbico	0,21
BHT	0,41

Sin embargo, es importante aclarar que otros tipos de compuestos, como los flavonoides también poseen alta actividad antioxidante debido a los dobles enlaces presentes en el anillo C(167). Por esta razón, en futuros trabajos, se podría cuantificar la presencia de este tipo de compuestos en los extractos.

Para finalizar con la evaluación de la actividad antioxidante de los extractos, se complementó el análisis empleando un método directo, basado en el estudio del potencial efecto de los extractos para reducir la cantidad de peróxidos lipídicos.

3.3.3 Inhibición de la peroxidación lipídica con el modelo del ácido linoléico.

El porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica de los extractos etanólicos de *H. tessulatus* cultivado en salvado de trigo bajo las diferentes condiciones de la optimización, así como del patrón BHT se ilustran en la Figura 3-6. En la Tabla 3-4 se resumen los valores del porcentaje de inhibición de estos mismos extractos en función del tiempo para el periodo de uno y dos días.

Del análisis de la Figura 3-6 se observa que para la mayoría de los casos, en el primer día de evaluación, los extractos de las biomásas indistintamente de las condiciones del cultivo, presentan un incremento en el porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica al aumentar la concentración del extracto. Sin embargo, únicamente con las condiciones de cultivo del tratamiento 1 a las diferentes concentraciones evaluadas, se evidencia una diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos en este mismo día. Adicionalmente, con este tratamiento se obtuvo el mayor porcentaje de inhibición (34,34%) a una concentración de 500 µg/mL, indicando un efecto positivo generado por la mayor cantidad de salvado de trigo presente en el medio (45 g/L).

En el segundo día de medición no hay un efecto significativo de la concentración en el porcentaje de inhibición, lo cual indica que la principal influencia del extracto en la inhibición se da principalmente en el primer día del ensayo, disminuyendo su actividad en los días consecutivos.

En cuanto a la comparación de los valores con el patrón de BHT este presenta un porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica superior en las diferentes concentraciones y días evaluados, que oscila entre 72-80%, mostrando una diferencia

Capítulo 3

significativa con los extractos analizados, indicando una baja actividad de los compuestos presentes en estos.

En resumen, el mayor potencial de inhibición de los extractos obtenidos en cada tratamiento se obtuvo en el día 1 a 500 ug/ml y presenta el siguiente orden: 1>9>3>7>5. Esta inhibición de la peroxidación lipídica puede estar relacionada con la habilidad de donar hidrógenos por parte de derivados fenólicos y la subsecuente estabilización del radical libre, como lo indica Loganayaki *et al.*(172), quien ya ha sido referenciado a lo largo de la presente investigación. De esta forma se observa una concordancia entre los compuestos polifenólicos revelados con FeCl_3 para el extracto de las biomásas cultivadas con salvado de trigo- y extraídas en EtOH (Figura 3-5), en donde las manchas son menos intensas para el tratamiento 5 y se refleja un incremento en esta intensidad para los demás tratamientos.

Sumado a lo anterior, este comportamiento también puede estar asociado con la presencia de compuestos triterpenoidales de naturaleza apolar, los cuales pueden ser extraídos al emplear etanol, tal como se confirmó con el revelado de las placas de dicho extracto usando una solución de ZnCl_2 .

Por otro lado, al comparar los resultados obtenidos con estudios similares, Lee *et al.* (163) determinaron un 56,4% de inhibición a 5 mg/mL de extracto etanólico, concentración más alta que la evaluada en este trabajo, sin embargo, la metodología empleada presenta algunas diferencias con la acá desarrollada, discrepando en la metodología de medir los cambios en la inhibición de la peroxidación. A pesar de lo anterior se podría inferir que incrementar la concentración de los extractos evaluados, permitiría mejorar los resultados de inhibición de la peroxidación lipídica.

Es importante anotar que los diferentes reportes de actividad antioxidante se enfocan a extractos obtenidos a partir de cuerpos fructíferos de *H. tessulatus* y como se muestra en los antecedentes solo un trabajo se ha enfocado en la evaluación del micelio, y en este emplean fuentes de nutrientes de composición conocida(167), así que los resultados de este trabajo aportan al conocimiento sobre el efecto de la cantidad de fuente de nutrientes alternativas en la actividad antioxidante de la biomasa obtenida por fermentación en estado líquido.

Figura 3-6 Porcentaje de peroxidación lipídica para los diferentes tratamientos de optimización.

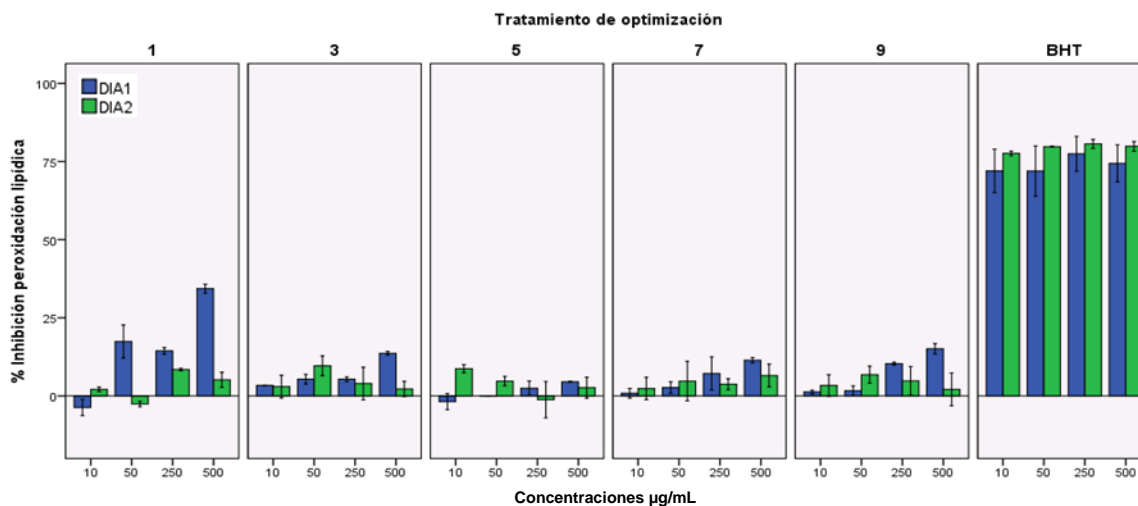


Tabla 3-4 Valores de porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica de extractos etanólicos de *H. tessulatus* cultivado en salvado de trigo.

Tratamiento de optimización	Día	Concentración de extracto (µg/mL)			
		10	50	250	500
BHT	1	72,0 ±6,95 ^a	72,0 ±8,05 ^a	77,5 ±5,59 ^a	74,4 ±5,94 ^a
	2	77,6 ±0,73 ¹	79,8 ±0,13 ¹	80,6 ±1,45 ¹	79,9 ±1,55 ¹
1	1	-3,70 ±2,60 ^a	17,43 ±5,30 ^b	14,43 ±1,06 ^b	34,34 ±1,45 ^b
	2	2,12 ±0,75 ²	-2,58 ±0,84 ²	8,47 ±0,37 ²	5,16 ±2,43 ²
3	1	3,39 ±0,10 ^a	5,36 ±1,54 ^{bc}	5,36 ±0,77 ^c	13,68 ±0,58 ^c
	2	2,98 ±3,65 ²	9,66 ±3,18 ²	3,97 ±5,24 ²	2,25 ±2,43 ²
5	1	-1,80 ±2,60 ^a	0,05 ±0,00 ^c	2,50 ±2,31 ^c	4,55 ±0,19 ^c
	2	8,73 ±1,31 ²	4,76 ±1,50 ²	-1,19 ±5,80 ²	2,65 ±3,36 ²
7	1	0,86 ±1,54 ^a	2,70 ±1,83 ^c	7,20 ±5,30 ^c	11,43 ±0,87 ^c
	2	2,38 ±3,55 ²	4,76 ±6,36 ²	3,77 ±1,78 ²	6,55 ±3,65 ²
9	1	1,27 ±0,58 ^a	1,68 ±1,54 ^c	10,34 ±0,48 ^c	14,95 ±1,19 ^c
	2	3,37 ±3,46 ²	9,46 ±6,45 ²	4,83 ±4,58 ²	2,12 ±5,24 ²

Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos para una concentración dada en el día 1. Números diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos para una concentración dada en el día 2 ($P=0,05$)

Finalmente, del análisis general de la evaluación de actividad antioxidante, se observa resultados positivos cualitativos, con respecto al salvado de trigo al evaluar su acción en cromatoplasmas. Sin embargo, al cuantificar esta actividad resulta un bajo potencial de *H. tessulatus* comparado con el patrón comercial, en relación a la producción de metabolitos antioxidantes obtenidos por FEL, donde el empleo de esta fuente de nutrientes no parece favorecer la cantidad de este tipo de compuestos. En lo referente al efecto de las condiciones de la optimización sobre la actividad antioxidante, el aumento en la cantidad

de salvado de trigo (tratamiento 1) contribuye a incrementar el potencial tanto para la captación del radical DPPH como para la inhibición de la peroxidación lipídica.

3.4 Conclusiones

El análisis cualitativo indicó una capacidad captadora del radical DPPH por parte de los extractos en DCM y EtOH de la biomasa de *H. tessulatus* cultivada en salvado de trigo, contrario a lo obtenido con la harina de trigo integral. Los constituyentes relacionados con esta actividad son en su mayoría metabolitos triterpenoidales, sin descartar la presencia de otros componentes.

La cuantificación de la actividad antioxidante permitió determinar que el extracto etanólico de la biomasa obtenida en salvado de trigo tiene un bajo potencial comparada con patrones comerciales.

En cuanto al efecto de los diferentes tratamientos de optimización, las condiciones de mayor cantidad de fuente de nutrientes incentivan la biosíntesis de compuestos con potencial antioxidante.

4 Perspectivas

- Con el objetivo de explicar el hecho de que la cantidad efectiva de fuentes de nutrientes en el medio, afecta la producción de biomasa seca, se debe determinar la composición del filtrado.
- Los resultados de producción de biomasa seca de *Grifola frondosa* estuvieron muy por debajo de los obtenidos por Zapata *et al.*(20) a pesar de emplear fuentes de nutrientes similares a la empleadas en este trabajo, sin embargo, los autores reportan un medio enriquecido, por lo cual, se propone evaluar el mismo medio reportado para confirmar que esta variación es dependiente de la cepa empleada.
- Es importante realizar el cultivo de las especies evaluadas en medios comúnmente empleados o enriquecidos, permitiendo así, comparar de manera más exacta los resultados obtenidos a partir de las fuentes de nutrientes acá evaluadas.
- Algunos autores resaltan la importancia del control del tamaño y la morfología del pellet obtenido en la FEL, indicando una serie de características específicas para hacer más eficiente la producción de biomasa seca o metabolitos, entonces, investigar el proceso que permita de manera eficaz controlar estas características, aportará a la optimización del cultivo.
- A partir del modelo de optimización empleado, se logró incrementar la producción de biomasa seca de *H. tessulatus*, no obstante, otras condiciones pueden influenciar la producción de biomasa, además presentar un comportamiento sinérgico entre estas. Por tal razón, es clave incluir la evaluación de condiciones adicionales del proceso.
- Aunado a lo anterior, el modelo empleado mostro una tendencia al incremento de la producción de biomasa seca en el punto máximo de fuente de nutrientes evaluado. Este resultado hace necesario usar mayores cantidades de fuentes de nutrientes para establecer el punto máximo de producción de biomasa.
- Se propone determinar de manera más exacta la cantidad de inóculo adicionado al medio, con el empleo de pre inóculos o solución de esporas asexuales, lo cual dependerá de la especie y condiciones empleadas.

Perspectivas

- Para tener certeza de los componentes responsables de la actividad antioxidante exhibida por la biomasa de *H. tessulatus* es necesario cuantificar los triterpenoides, flavonoides y fenoles totales presentes en los extractos.

Referencias

- (1) Zhao, W.; Xu, J. W.; Zhong, J. J. Enhanced production of ganoderic acids in static liquid culture of *ganoderma lucidum* under nitrogen-limiting conditions. *Bioresour Technol.* 2011, pp 8185–8190.
- (2) Xia, Q.; Zhang, H.; Sun, X.; Zhao, H.; Wu, L.; Zhu, D.; Yang, G.; Shao, Y.; Zhang, X.; Mao, X.; et al. A comprehensive review of the structure elucidation and biological activity of triterpenoids from *ganoderma* spp. *Molecules* **2014**, *19* (11), 17478–17535.
- (3) Ríos, J. L.; Andújar, I.; Recio, M. C.; Giner, R. M. Lanostanoids from fungi: a group of potential anticancer compounds. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75* (11), 2016–2044.
- (4) Elisashvili, V. Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products (review). *Int. J. Med. Mushrooms* **2012**, *14* (3), 211–239.
- (5) Zhong, J.-J.; Xiao, J. J.-H. Secondary metabolites from higher fungi: discovery, bioactivity, and bioproduction. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2009**, *113*, 79–150.
- (6) Ruggiero, M. A.; Gordon, D. P.; Orrell, T. M.; Bailly, N.; Bourgoin, T.; Brusca, R. C.; Cavalier-Smith, T.; Guiry, M. D.; Kirk, P. M. A higher level classification of all living organisms. *PLoS One* **2015**, *10* (4), 1–60.
- (7) Herrera, T.; Ulloa, M. *El reino de los hongos. micología básica aplicada.*, 2nd ed.; FCE, IB, UNAM: México D.F., 2013.
- (8) Miles, P. G.; Chang, S.-T. *Biología de la setas. fundamentos básicos y acontecimientos actuales*, 1st ed.; Instituto Zeri para Latinoamerica: Santafé de Bogotá D.C. Colombia, 1992.
- (9) Cepero García, M. C.; Restrepo, S. R.; Franco Molano, A. E.; Cárdenas Toquica, M.; Vargas Estupiñán, N. *Biología de hongos*, 1st ed.; Panamericana Formas e Impresos S.A.: Bogotá, 2015.
- (10) Arnolds, E. Introduction and synecology. *cramer, vaduz, liechtenstein*. In *Ecology and Coenology of Macrofungi in Grasslands and Moist Heathlands in Drenthe, the Netherlands.*; 1981.

Referencias

- (11) Grandtner, M.; Andre, J. The coenological organization of ectomycorrhizal macrofungi in the laurentide mountains of quebec. *Can. J. Bot.* **1991**, *69*, 2215–2224.
- (12) Sarrionadia, A. E. Sarrionandia areitio, e., 2006. estudio de las micocenosis de macromicetos de los encinares del país vasco., Universidad del País Vasco, 2006.
- (13) Hassan, F. R. H.; Medany, G. M.; El-Kady, A. T. M. Mycelial biomass production of enoke mushroom (*flammulina velutipes*) by submerged culture. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* **2012**, *6* (7), 603–610.
- (14) Chang, S. T.; Buswell, J. a. Mushroom nutraceuticals. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, *12* (5), 473–476.
- (15) Rathee, S.; Rathee, D.; Rathee, D.; Kumar, V.; Rathee, P. Mushrooms as therapeutic agents. *Brazilian J. Pharmacogn.* **2012**, *22* (2), 459–474.
- (16) Stamets, P. *Growing gourmet and medicinal mushrooms*, 1st ed.; Ten Speed Press: Berekely, CA, 1993.
- (17) Illana, C. El hongo maitake (*grifola frondosa*) y su potencial terapéutico. *Rev. Iberoam. Micol.* **2008**, *25*, 141–144.
- (18) Chang, S. T.; Hayes, W. A. *The biology and cultivation of edible mushrooms*, 2nd ed.; Academic Press, INC., 1978.
- (19) Hanai, H.; Ishida, S.; Saito, C.; Maita, T.; Kusano, M.; Tamogami, S.; Noma, M. Stimulation of mycelia growth in several mushroom species by rice husks. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69* (1), 123–127.
- (20) Zapata, P.; Rojas, D.; Fernández, C.; Ramírez, D.; Restrepo, G.; Orjuela, V.; Arroyave, M.; Gómez, T.; Atehortúa, L. Producción de biomasa y exopolisacáridos de *grifola frondosa* bajo cultivo sumergido utilizando fuentes de carbono no convencionales. *EIA - Esc. Ing. Antioquia* **2007**, *7* (Junio), 137–144.
- (21) Hsieh, C.; Wang, H. L.; Chen, C. C.; Hsu, T. H.; Tseng, M. H. Effect of plant oil and surfactant on the production of mycelial biomass and polysaccharides in submerged culture of *grifola frondosa*. *Biochem. Eng. J.* **2008**, *38* (2), 198–205.

Referencias

- (22) Lee, B. C.; Bae, J. T.; Pyo, H. B.; Choe, T. B.; Kim, S. W.; Hwang, H. J.; Yun, J. W. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible basidiomycete *grifola frondosa*. *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, *35* (5), 369–376.
- (23) Chimilovski, J. S.; Habu, S.; Teixeira, R. F. B.; Thomaz-Soccol, V.; Nosedá, M. D.; Medeiros, A. B. P.; Pandey, A.; Soccol, C. R. Antitumour activity of *grifola frondosa* exopolysaccharides produced by submerged fermentation using sugar cane and soy molasses as carbon sources. *Food Technol. Biotechnol.* **2011**, *49* (3), 359–363.
- (24) Bespalova, L. A.; Makarov, O. E.; Antonyuk, L. P.; Ignatov, V. V. Lipogenesis in the basidiomycetes *pleurotus ostreatus* and *flammulina velutipes* cultivated on different media. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2002**, *38* (4), 349–354.
- (25) Harith, N.; Abdullah, N.; Sabaratnam, V. Cultivation of *flammulina velutipes* mushroom using various agro-residues as a fruiting substrate. *Pesqui. Agropecu. Bras.* **2014**, *49* (3), 181–188.
- (26) Cai, H.; Liu, X.; Chen, Z.; Liao, S.; Zou, Y. Isolation, purification and identification of nine chemical compounds from *flammulina velutipes* fruiting bodies. *Food Chem.* **2013**, *141* (3), 2873–2879.
- (27) Sari, M.; Prange, A.; Lelley, J. I.; Hambitzer, R. Screening of beta-glucan contents in commercially cultivated and wild growing mushrooms. *Food Chem.* **2017**, *216*, 45–51.
- (28) Yang, W.; Yu, J.; Pei, F.; Mariga, A. M.; Ma, N.; Fang, Y.; Hu, Q. Effect of hot air drying on volatile compounds of *flammulina velutipes* detected by hs-spme-gc-ms and electronic nose. *Food Chem.* **2016**, *196*, 860–866.
- (29) Shi, M.; Yang, Y.; Guan, D.; Zhang, Y.; Zhang, Z. Bioactivity of the crude polysaccharides from fermented soybean curd residue by *flammulina velutipes*. *Carbohydrate Polymers.* 2012, pp 1268–1276.
- (30) Liu, G. Q.; Han, W. J.; Zhang, H. Y.; Jin, X. C. Polysaccharides extraction from submerged-cultured mycelium of *grifola frondosa*. In *ICBBT 2010 - 2010 International Conference on Bioinformatics and Biomedical Technology*; 2010; Vol. 20, pp 111–114.

Referencias

- (31) Kim, S. W.; Hwang, H. J.; Lee, B. C.; Yun, J. W. Submerged production and characterization of grifola frondosa polysaccharides - a new application to cosmeceuticals. *Food Technol. Biotechnol.* **2007**, *45* (3), 295–305.
- (32) Shin, K. S.; Yu, K. W.; Lee, H. K.; Lee, H.; Cho, W. D.; Suh, H. J. Production of anti-complementary exopolysaccharides from submerged culture of flammulina velutipes. *Food Technol. Biotechnol.* **2007**, *45* (3), 319–326.
- (33) Zhang, B. Z.; Yan, P. S.; Chen, H.; He, J. Optimization of production conditions for mushroom polysaccharides with high yield and antitumor activity. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87* (4), 2569–2575.
- (34) Kim, J. J. M.; Ra, K. S. K.; Noh, D. O. DO; Suh, H. J. H. Optimization of submerged culture conditions for the production of angiotensin converting enzyme inhibitor from flammulina velutipes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *29* (5), 292–295.
- (35) Yi, C.; Sun, C.; Tong, S.; Cao, X.; Feng, Y.; Firempong, C. K.; Jiang, X.; Xu, X.; Yu, J. Cytotoxic effect of novel flammulina velutipes sterols and its oral bioavailability via mixed micellar nanoformulation. *Int. J. Pharm.* **2013**, *448* (1), 44–50.
- (36) Lee, B. C.; Bae, J. T.; Pyo, H. B.; Choe, T. B.; Kim, S. W.; Hwang, H. J.; Yun, J. W. Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible basidiomycete grifola frondosa. *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *32* (5), 574–581.
- (37) Yang, B. K.; Gu, Y. A.; Jeong, Y. T.; Jeong, H.; Song, C. H. Chemical characteristics and immuno-modulating activities of exo-biopolymers produced by grifola frondosa during submerged fermentation process. *Int. J. Biol. Macromol.* **2007**, *41* (3), 227–233.
- (38) Shih, I. L.; Chou, B. W.; Chen, C. C.; Wu, J. Y.; Hsieh, C. Study of mycelial growth and bioactive polysaccharide production in batch and fed-batch culture of grifola frondosa. *Bioresource Technology*. 2008, pp 785–793.
- (39) Bae, J. T.; Sim, G. S.; Lee, D. H.; Lee, B. C.; Pyo, H. B.; Choe, T. B.; Yun, J. W. Production of exopolysaccharide from mycelial culture of grifola frondosa and its inhibitory effect on matrix metalloproteinase-1 expression in uv-irradiated human dermal fibroblasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *251* (2), 347–354.

Referencias

- (40) Lee, K. H.; Cho, C. H.; Rhee, K.-H. Synergic anti-tumor activity of gamma-irradiated exo-polysaccharide from submerged culture of *grifola frondosa*. *J. Med. Plants Res.* **2011**, 5 (11), 2378–2386.
- (41) Lin, L.; Cui, F.; Zhang, J.; Gao, X.; Zhou, M.; Xu, N.; Zhao, H.; Liu, M.; Zhang, C.; Jia, L. Antioxidative and renoprotective effects of residue polysaccharides from *flammulina velutipes*. *Carbohydr. Polym.* **2016**, 146, 388–395.
- (42) Lin-Zhi, K.; Fei, H.; Jun-Fang, L.; Li-Qiong, G.; Wei-Fang, B. Breeding of new high-temperature-tolerant strains of *flammulina velutipes*. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **2013**, 151, 97–102.
- (43) Wasser, S. P. Medicinal mushroom science: current perspectives, advances, evidences, and challenges. *Biomed. J.* **2014**, 37 (6), 345–356.
- (44) Vesentini, D.; Dickinson, D. J.; Murphy, R. J. The protective role of the extracellular mucilaginous material (ecmm) from two wood-rotting basidiomycetes against copper toxicity. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2007**, 60 (1), 1–7.
- (45) Lu, M. C.; El-Shazly, M.; Wu, T. Y.; Du, Y. C.; Chang, T. T.; Chen, C. F.; Hsu, Y. M.; Lai, K. H.; Chiu, C. P.; Chang, F. R.; et al. Recent research and development of *antrodia cinnamomea*. *Pharmacol. Ther.* 2013, pp 124–156.
- (46) Popova, M.; Trusheva, B.; Gyosheva, M.; Tsvetkova, I.; Bankova, V. Antibacterial triterpenes from the threatened wood-decay fungus *fomitopsis rosea*. *Fitoterapia* **2009**, 80 (5), 263–266.
- (47) Bok, J. W.; Lerner, L.; Chilton, J.; Klingeman, H. G.; Towers, G. H. N. Antitumor sterols from the mycelia of *cordyceps sinensis*. *Phytochemistry* **1999**, 51 (7), 891–898.
- (48) Jaramillo, M. L. Determinación estructural y de actividad antimicrobiana de intra y exometabolitos secundarios triterpenoidales de *ganoderma lucidum* obtenido en cultivo sumergido, Universidad Nacional de Colombia, 2007.
- (49) Coy, E.; Nieto, I. J. Metabolitos de núcleo esteroidal del hongo comestible *laetiporus sulphureus*. *Fac. Cien. Basic.* **2011**, 7 (2), 298–307.
- (50) Coy, E.; Nieto, I. Sterol composition of the macromycete fungus *laetiporus*

Referencias

- sulphureus. *Chem. Nat. Compd.* **2009**, *45* (2), 193–196.
- (51) Nieto, I. J.; Ávila, I. Determinación de ácidos grasos y compuestos triterpenoides del cuerpo fructífero de *suillus luteus*. *Rev. Colomb. Quim.* **2008**, *37* (3), 297–304.
- (52) Nieto, I. J.; Cucaita, E. Ácidos grasos, ésteres y esteroides del cuerpo fructífero del hongo *laccaria laccata*. *Rev. Colomb. Quim.* **2007**, *36* (3), 277–284.
- (53) Rivera, A.; Nieto, I. J.; Valencia, M. a. Composición y cuantificación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de la fracción esterólica de once hongos colombianos. *Rev. Colomb. Quim.* **2002**, *31* (2), 95–102.
- (54) Chegwin-Angarita, C.; Nieto-Ramírez, I. J.; Chegwin, C.; Nieto, I. J. Effect of non-conventional carbon sources on the production of triterpenoids in submerged cultures of *pleurotus macrofungi*. *J. Chil. Chem. Soc.* **2014**, *59* (1), 2287–2293.
- (55) Chegwin A., C.; Nieto R., I. J. Influencia del medio de cultivo en la producción de metabolitos secundarios del hongo comestible *pleurotus ostreatus* cultivado por fermentación en estado líquido empleando harinas de cereales como fuente de carbono. *Rev. Mex. Micol.* **2013**, *37*, 01–09.
- (56) Nieto, I. J.; Carolina, C. A. The effect of different substrates on triterpenoids and fatty acids in fungi of the genus *pleurotus*. *J. Chil. Chem. Soc.* **2013**, *58* (1), 1580–1583.
- (57) Hölker, U.; Höfer, M.; Lenz, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *64* (2), 175–186.
- (58) Arana-Gabriel, Y.; Burrola-Aguilar, C.; Garibay-Orijel, R.; Franco-Maass, S. Obtención de cepas y producción de inóculo de cinco especies de hongos silvestres comestibles de alta montaña en el centro de México. *Rev. Chapingo, Ser. Ciencias For. y del Ambient.* **2014**, *20* (3), 213–226.
- (59) Talamantes, C. D.; Burrola-Aguilar, C.; Aguilar-Miguel, X.; Mata, G. Crecimiento miceliar in vitro de hongos comestibles silvestres de alta montaña en el centro de México. *Rev. Chapingo, Ser. Ciencias For. y del Ambient.* **2017**, *23* (2), 369–383.
- (60) Chegwin-Angarita, C.; Nieto-Ramírez, I. J.; Atehortúa, L.; Sepúlveda, L. J. Las

Referencias

- estatinas: actividad biológica y producción biotecnológica. *Rev. Colomb. Biotecnol.* **2012**, XIV (2), 157–178.
- (61) Merck, D. *Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography*, 1st ed.; Merck: Alemania, 1980.
- (62) R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing, r foundation for statistical computing. Vienna, Austria. 2017.
- (63) Chegwin, C.; Nieto, I. J. Effect of non-conventional carbon sources on the production of triterpenoids in submerged cultures of pleurotus macrofungi. *J. Chil. Chem. Soc.* **2014**, 59 (1), 2287–2293.
- (64) Instituto Colombiano de Bienestar Familiar, I. *Tabla de composición de alimentos colombianos*; 2015.
- (65) Rahardjo, Y. S. P.; Weber, F. J.; Paul Le Comte, E.; Tramper, J.; Rinzema, A. Contribution of aerial hyphae of aspergillus oryzae to respiration in a model solid-state fermentation system. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, 78 (5), 539–544.
- (66) Diamantopoulou, P.; Papanikolaou, S.; Komaitis, M.; Aggelis, G.; Philippoussis, A. Patterns of major metabolites biosynthesis by different mushroom fungi grown on glucose-based submerged cultures. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2014**, 37 (7), 1385–1400.
- (67) Zăgrean, V.; Sbîrciog, G.; Buzatu, M.; Mândru, I. Effect of nutritive media and ph on mycelial growth of some pleurotus eryngii strains in vitro. *Bull. UASVM Hort.* **2016**, 73 (2), 1–3.
- (68) Xu, P.; Ding, Z.; Qian, Z.; Zhao, C.; Zhang, K. Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of ganoderma lucidum sb97 using complex media. *Enzyme Microb. Technol.* **2008**, 42 (4), 325–331.
- (69) Bravo, L. A. Determinación de la correlación tiempo de fermentación-características estructurales y cantidad de bioactivos, de pleurotus cultivados por fel y su incidencia en el potencial antibiótico del producto biotecnológico, Universidad Nacional de Colombia, 2017.
- (70) Chen, W.; Zhao, Z.; Chen, S. F.; Li, Y. Q. Optimization for the production of

Referencias

- exopolysaccharide from *fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect in vitro. *Bioresour. Technol.* **2008**, 99 (8), 3187–3194.
- (71) Zhong, J.-J.; Tang, Y.-J. Submerged cultivation of medicinal mushrooms for production of valuable bioactive metabolites. *Adv Biochem Engin/Biotechnol* **2004**, No. 87, 25–59.
- (72) Mau, J.; Ma, J. Effect of 10-oxo-trans-8-decenoic acid on growth of several mushroom mycelia. *Fung. Sci* **2001**, 16 (3), 1–12.
- (73) Maziero, R.; Cavazzoni, V.; Bononi, V. L. R. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. *Rev. Microbiol.* **1999**, 30, 77–84.
- (74) Cui, F. J.; Li, Y.; Xu, Z. H.; Xu, H. Y.; Sun, K.; Tao, W. Y. Optimization of the medium composition for production of mycelial biomass and exo-polymer by *grifola frondosa* gf9801 using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* **2006**, 97 (10), 1209–1216.
- (75) Tao, T. L.; Cui, F. J.; Chen, X. X.; Sun, W. J.; Huang, D. M.; Zhang, J.; Yang, Y.; Wu, D.; Liu, W. M. Improved mycelia and polysaccharide production of *grifola frondosa* by controlling morphology with microparticle talc. *Microb. Cell Fact.* **2018**, 17 (1), 1–10.
- (76) Wang, P.; Shi, J.; Zhu, Y.; Yang, B.; Du, S. Optimal conditions for the growth and polysaccharide production by *hypsizigus marmorens* in submerged culture. *J. Food Process. Preserv.* **2009**, 33 (4), 454–472.
- (77) Kavishree, S.; Hemavathy, J.; Lokesh, B. R.; Shashirekha, M. N.; Rajarathnam, S. Fat and fatty acids of indian edible mushrooms. *Food Chem.* **2008**, 106 (2), 597–602.
- (78) Barros, L.; Cruz, T.; Baptista, P.; Estevinho, L. M.; Ferreira, I. C. F. R. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, 46 (8), 2742–2747.
- (79) La Guardia, M.; Giammanco, S.; Di Majo, D.; Tabacchi, G.; Tripoli, E.; Giammanco, M. Omega 3 fatty acids: biological activity and effects on human health. *Panminerva*

Referencias

- Med* **2005**, *47* (4), 245–257.
- (80) Wang, L.; Folsom, A.; Eckfeldt, J. Plasma fatty acid composition and incidence of coronary heart disease in middle aged adults : the atherosclerosis risk in communities (aric) study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **2003**, No. 13, 256–266.
- (81) Kanagasabapathy, G.; Malek, S. N. A.; Kuppusamy, U. R.; Vikineswary, S. Chemical composition and antioxidant properties of extracts of fresh fruiting bodies of pleurotus sajor-caju (fr.) singer. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (6), 2618–2626.
- (82) Barros, L.; Baptista, P.; Correia, D. M.; Casal, S.; Oliveira, B.; Ferreira, I. C. F. R. Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from northeast portugal. *Food Chem.* **2007**, *105* (1), 140–145.
- (83) Sinanoglou, V. J.; Zoumpoulakis, P.; Heropoulos, G.; Proestos, C.; Ćirić, A.; Petrovic, J.; Glamoclija, J.; Sokovic, M. Lipid and fatty acid profile of the edible fungus laetiporus sulphurous. antifungal and antibacterial properties. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52* (6), 3264–3272.
- (84) Weete, J. D.; Abril, M.; Blackwell, M. Phylogenetic distribution of fungal sterols. *PLoS One* **2010**, *5* (5), 3–8.
- (85) Niemenmaa, O.; Galkin, S.; Hatakka, A. Ergosterol contents of some wood-rotting basidiomycete fungi grown in liquid and solid culture conditions. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2008**, *62* (2), 125–134.
- (86) Yi, C.; Fu, M.; Cao, X.; Tong, S.; Zheng, Q.; Firempong, C. K.; Jiang, X.; Xu, X.; Yu, J. Enhanced oral bioavailability and tissue distribution of a new potential anticancer agent, flammulina velutipes sterols, through liposomal encapsulation. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (25), 5961–5971.
- (87) Alexander-Lindo, R. L.; Morrison, E. Y. S. A.; Nair, M. G. Hypoglycaemic effect of stigmast-4-en-3-one and its corresponding alcohol from the bark of anacardium occidentale (cashew). *Phyther. Res.* **2004**, *18* (5), 403–407.
- (88) Chen, J.; Lin, W.; Liao, C.; Shieh, P. Anti-inflammatory benzenoids from antrodia camphorata. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 989–992.
- (89) Zaher, A. M.; Moharram, A. M.; Davis, R.; Panizzi, P.; Makboul, M. A.; Calderón, A.

Referencias

- I. Characterisation of the metabolites of an antibacterial endophyte botryodiplodia theobromae pat. of dracaena draco l. by lc-ms/ms. *Nat. Prod. Res.* **2015**, 29 (24), 2275–2281.
- (90) Parmar, R.; Kumar, D. Study of chemical composition in wild edible mushroom pleurotus cornucopiae (paulet) from himachal pradesh , india by using fourier transforms infrared spectrometry (ftir), gas chromatography-mass spectrometry (gcms) and x-ray fluorescence (xrf). *Biol. Forum – An Int. J.* **2015**, 7 (2), 1057–1066.
- (91) Farrell, E. K.; Chen, Y.; Barazanji, M.; Jeffries, K. A.; Cameroamortegui, F.; Merkler, D. J. Primary fatty acid amide metabolism: conversion of fatty acids and an ethanolamine in *n₁₈ tg₂* and scp cells. *J. Lipid Res.* **2012**, 53 (2), 247–256.
- (92) Günç Ergönül, P.; Akata, I.; Kalyoncu, F.; Ergönül, B. Fatty acid compositions of six wild edible mushroom species. *Sci. World J.* **2013**, 163964, 1–4.
- (93) Yilmaz, N.; Solmaz, M.; Turkekul, I.; Elmastas, M. Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle black sea region of turkey. *Food Chem.* **2006**, 99, 168–174.
- (94) Zhou, J.; Feng, T.; Ye, R. Differentiation of eight commercial mushrooms by electronic nose and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Sensors* **2015**, 1, 1–14.
- (95) Ho, C.-T.; Chen, Q. Lipids in food flavors. *Lipids Food Flavors* **1994**, 558, 2–14.
- (96) Li, H.-P.; Yang, W.-J.; Qu, S.-X.; Pei, F.; Luo, X.; Mariga, A. M.; Ma, L. Variation of volatile terpenes in the edible fungi mycelia flammulina velutipes and communications in fungus-mite interactions. *Food Res. Int.* **2018**, 103, 150–155.
- (97) Schmidt D., C. Biosynthesis of terpenoid natural products in fungi. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **2015**, 148, 19–61.
- (98) Kurashov, E.; Academy, R. Composition of low molecular weight organic compounds of trametes pubescens and flammulina velutipes mycelium. *Russ. Acad. Sci.* **2012**, 46 (2), 156–164.
- (99) Tang, Y. J.; Zhang, W.; Zhong, J. J. Performance analyses of a ph-shift and dot-

Referencias

- shift integrated fed-batch fermentation process for the production of ganoderic acid and ganoderma polysaccharides by medicinal mushroom ganoderma lucidum. *Bioresour Technol.* 2009, pp 1852–1859.
- (100) Fazenda, M. L.; Seviour, R.; McNeil, B.; Harvey, L. M. Submerged culture fermentation of “higher fungi”: the macrofungi. *Adv. Appl. Microbiol.* **2008**, 63 (07), 33–103.
- (101) Shih, I. L.; Pan, K.; Hsieh, C. Influence of nutritional components and oxygen supply on the mycelial growth and bioactive metabolites production in submerged culture of antrodia cinnamomea. *Process Biochem.* **2006**, 41 (5), 1129–1135.
- (102) Zhang, J.; Zhong, J. J.; Geng, A. Improvement of ganoderic acid production by fermentation of ganoderma lucidum with cellulase as an elicitor. *Process Biochem.* **2014**, 49 (10), 1580–1586.
- (103) Fang, Q. H.; Zhong, J. J. Effect of initial ph on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of ganoderma lucidum. *Process Biochem.* **2002**, 37 (7), 769–774.
- (104) Zapata, P. A.; Rojas, D. F.; Atehortua, L. Production of biomass, polysaccharides, and ganoderic acid using non-conventional carbon sources under submerged culture of the lingzhi or reishi medicinal mushroom, ganoderma lucidum (w.curt.:fr.)p. karst. (higher basidiomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms* **2012**, 14 (2), 197–203.
- (105) Cui, M.-L.; Yang, H.-Y.; He, G.-Q. Submerged fermentation production and characterization of intracellular triterpenoids from ganoderma lucidum using hplc-esi-ms. *J. Zhejiang Univ. Biomed. Biotechnol.* **2015**, 16 (12), 998–1010.
- (106) Mokochinski, J. B.; Sovrani, V.; Dalla Santa, H. S.; Felsner, M. L.; Sawaya, A. C. H. F.; González-Borrero, P. P.; Bataglion, G. A.; Eberlin, M. N.; Torres, Y. R. Biomass and sterol production from vegetal substrate fermentation using a garicus brasiliensis. *J. Food Qual.* **2015**, 38 (3), 221–229.
- (107) Zou, X. Fed-batch fermentation for hyperproduction of polysaccharide and ergosterol by medicinal mushroom agaricus brasiliensis. *Process Biochem.* 2006, pp 970–974.

Referencias

- (108) Yeh, C. W.; Kan, S. C.; Lin, C. C.; Shieh, C. J.; Liu, Y. C. Polyhydroxylated steroids and triterpenoids from an entophytic fungus, *hypocreales* sp. nchu01 isolated from tuber *magnatum*. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2016**, *64*, 22–30.
- (109) Xu, Y. N.; Zhong, J. J. Impacts of calcium signal transduction on the fermentation production of antitumor ganoderic acids by medicinal mushroom *ganoderma lucidum*. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30* (6), 1301–1308.
- (110) Huang, S.-J.; Lin, C.-P.; Mau, J.-L.; Li, Y.-S.; Tsai, S.-Y. Effect of uv-b irradiation on physiologically active substance content and antioxidant properties of the medicinal caterpillar fungus *cordyceps militaris* (ascomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms* **2015**, *17* (3), 241–253.
- (111) Ma, T. W.; Lai, Y.; Chen, L. T.; Yang, F. C. The cultivation strategy of enhancing triterpenoid production in submerged cultures of *antrodia cinnamomea* by adding monoterpenes. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2016**, *58*, 210–218.
- (112) Liu, C. J.; Chiang, C. C.; Chiang, B. H. The elicited two-stage submerged cultivation of *antrodia cinnamomea* for enhancing triterpenoids production and antitumor activity. *Biochemical Engineering Journal*. 2012, pp 48–54.
- (113) Xu, X.; Zhang, X.; Chen, C. Stimulated production of triterpenoids of *inonotus obliquus* using methyl jasmonate and fatty acids. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *85*, 49–57.
- (114) Moore Landecker, E. *Fundamentals of the fungi.*, 4th ed.; Prentice hall: New Jersey E.U., 1996.
- (115) Tang, Y. J.; Zhong, J. J. Role of oxygen supply in submerged fermentation of *ganoderma lucidum* for production of *ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *32* (3–4), 478–484.
- (116) Xu, C. P.; Yun, J. W. Influence of aeration on the production and the quality of the exopolysaccharides from *paecilomyces tenuipes* c240 in a stirred-tank fermenter. *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, *35* (1), 33–39.
- (117) Oh, J.; Cho, E.; Nam, S.; Choi, J.-W.; Yun, J. W. Production of polysaccharide – peptide complexes by submerged mycelial culture of an entomopathogenic fungus *cordyceps sphecocephala*. *Process Biochem.* **2007**, *42*, 352–362.

Referencias

- (118) Suárez Arango, C.; Nieto, I. J. Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Rev. Iberoam. Micol.* **2013**, *30* (1), 1–8.
- (119) Fang, Q. H.; Tang, Y. J.; Zhong, J. J. Significance of inoculation density control in production of polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of *ganoderma lucidum*. *Process Biochem.* **2002**, *37* (12), 1375–1379.
- (120) Vasconsuelo, A.; Boland, R. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Sci.* **2007**, *172* (5), 861–875.
- (121) Kim, H. O.; Lim, J. M.; Joo, J. H.; Kim, S. W.; Hwang, H. J.; Choi, J. W.; Yun, J. W. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *agroclybe cylindracea*. *Bioresour Technol.* 2005, pp 1175–1182.
- (122) Mao, X. B.; Eksriwong, T.; Chauvatcharin, S.; Zhong, J. J. Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *cordyceps militaris*. *Process Biochem.* **2005**, *40* (5), 1667–1672.
- (123) Papaspyridi, L. M.; Katapodis, P.; Gonou-Zagou, Z.; Kapsanaki-Gotsi, E.; Christakopoulos, P. Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibres content by *pleurotus ostreatus athum* 4438 under submerged culture. *Biochem. Eng. J.* **2010**, *50* (3), 131–138.
- (124) Shu, C. H.; Xu, C. J. Medium optimization for producing bioactive exopolysaccharides by *agaricus brasiliensis* s. wasser et al. (=a. blazei murrill ss. heinem) in submerged culture. *Food Technol. Biotechnol.* **2007**, *45* (3), 327–333.
- (125) Yang, F. C.; Huang, H. C.; Yang, M. J. The influence of environmental conditions on the mycelial growth of *antrodia cinnamomea* in submerged cultures. *Enzyme and Microbial Technology.* 2003, pp 395–402.
- (126) Meng, F.; Liu, X.; Jia, L.; Song, Z.; Deng, P.; Fan, K. Optimization for the production of exopolysaccharides from *morchella esculenta* so-02 in submerged culture and its antioxidant activities in vitro. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *79* (3), 700–704.

Referencias

- (127) Tinao, M. J. M.; Miranda, H. P.; Sumulong, E. L. L.; Medalla, A. P. Cultural and antibacterial studies of *hypsizygus tessulatus* (buna-shimeji). *Int. J. Microbiol.* **2015**, *1* (3), 1–5.
- (128) Chowdhury, M.; Kubra, K.; Ahmed, S. Screening of antimicrobial, antioxidant properties and bioactive compounds of some edible mushrooms cultivated in bangladesh. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2015**, *14* (1), 8.
- (129) Wong, F.-C.; Chai, T.-T.; Tan, S.-L.; Yong, A.-L. Evaluation of bioactivities and phenolic content of selected edible mushrooms in malaysia. *Trop. J. Pharm. Res.* **2013**, *12* (6), 1011–1016.
- (130) Dulay, R. M. R.; Ray, K.; Hou, C. T. Optimization of liquid culture conditions of philippine wild edible mushrooms as potential source of bioactive lipids. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2015**, *4* (3), 409–415.
- (131) Malinowska, E.; Krzyczkowski, W.; Łapienis, G.; Herold, F. Improved simultaneous production of mycelial biomass and polysaccharides by submerged culture of *hericium erinaceum*: optimization using a central composite rotatable design (ccrd). *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *36* (12), 1513–1527.
- (132) Bai, Y.; Feng, Y.; Mao, D.; Xu, C. Optimization for betulin production from mycelial culture of *inonotus obliquus* by orthogonal design and evaluation of its antioxidant activity. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2012**, *43* (5), 663–669.
- (133) Cui, F.; Liu, Z.; Li, Y.; Ping, L.; Ping, L.; Zhang, Z.; Lin, L.; Dong, Y.; Huang, D. Production of mycelial biomass and exo-polymer by *hericium erinaceus* cz-2: optimization of nutrients levels using response surface methodology. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2010**, *15* (2), 299–307.
- (134) Trinci, A. P. J. A kinetic study of the growth of fatty acid vesicles. *J. gen. Microbiol.* **1969**, No. 57, 11–24.
- (135) Software IBM, C. IBM spss statistics for windows. IBM Corp.: Armonk, NY 2013.
- (136) Macias de la cerda, G.; Veana, F.; Contreras, J. C.; Noé, C.; Herrera, R. Cinética de crecimiento de *fusarium oxysporum* cultivado en diferentes niveles de glucosa y pectina. *Investig. Cienc.* **2016**, *24* (67), 33–37.

Referencias

- (137) Chegwin Angarita, C. Incidencia del medio y de las condiciones de cultivo en el potencial como nutriceútico de tres especies del genero pleurotus., Universidad Nacional de Colombia, 2014.
- (138) Papanikolaou, S.; Aggelis, G. Lipids of oleaginous yeasts. part i: biochemistry of single cell oil production. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2011**, *113*, 1031–1051.
- (139) Feng, J.; Zhang, J.; Jia, W.; Yang, Y.; Liu, F.; Lin, C. An unstructured kinetic model for the improvement of triterpenes production by ganoderma lucidum g0119 based on nitrogen source effect. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2014**, *732*, 727–732.
- (140) Wiseman, H. Vitamin d is a membrane antioxidant ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol , ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* **1993**, *326*, 285–288.
- (141) Dupont, S.; Beney, L.; Ritt, J.; Lherminier, J.; Gervais, P. Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798* (5), 975–985.
- (142) Miles, P. G.; Chang, S.-T. *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*, 2nd ed.; CRC PRESS: New York, NY, 2004.
- (143) Shao, S.; Hernandez, M.; Kramer, J. K. G.; Rinker, D. L.; Tsao, R. Ergosterol profiles, fatty acid composition, and antioxidant activities of button mushrooms as affected by tissue part and developmental stage. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (22), 11616–11625.
- (144) Shah, P.; Modi, H. A. Optimization of culture conditions for biomass production of *ganoderma lucidum* . *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2018**, *7* (2), 1882–1889.
- (145) Oludemi, T.; Barros, L.; Prieto, M. A.; Heleno, S. A.; Barreiro, M. F.; Ferreira, I. C. F. R. Extraction of triterpenoids and phenolic compounds from ganoderma lucidum: optimization study using the response surface methodology. *Food Funct.* **2018**, *9*, 1–41.
- (146) Ruan, W.; Lim, A. H. H.; Huang, L. G.; Popovich, D. G. Extraction optimisation and isolation of triterpenoids from ganoderma lucidum and their effect on human carcinoma cell growth. *Nat. Prod. Res.* **2014**, *28* (24), 2264–2272.

Referencias

- (147) He, Y. H. K.; Pu, Q. Optimization of cultivating conditions for triterpenoids production from *antrodia cinnmomea*. **2012**, *52* (4), 648–653.
- (148) Lu, Z.; Lei, J.; Xu, H. Optimization of fermentation medium for triterpenoid production from *antrodia camphorata* atcc 200183 using artificial intelligence-based techniques. *Appl Microbiol Biotechnol* **2011**, *92*, 371–379.
- (149) Chang, C.; Lee, C.; Pan, T. Statistical optimization of medium components for the production of *antrodia cinnamomea* ac0623 in submerged cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* **2006**, *72*, 654–661.
- (150) Xiang, C.; Xu, X.; Zhu, L. Submerged culture optimization for triterpenoids production by *inonotus obliquus* using response surface methodology. *Adv. Mater. Res.* **2012**, *560–561*, 784–790.
- (151) Zhang, J. J.; Li, Y.; Zhou, T.; Xu, D. P.; Zhang, P.; Li, S.; Li, H. Bin. Bioactivities and health benefits of mushrooms mainly from china. *Molecules* **2016**, *21* (7), 1–16.
- (152) Yen, G.-C.; Song, T.-Y. Antioxidant properties of *antrodia camphorata* in submerged culture. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3322–3327.
- (153) Takaku, T.; Kimura, Y.; Okuda, H. Isolation of an antitumor compound from *agaricus blazei murill* and its mechanism of action. *J. Nutr.* **2001**, *131* (5), 1409.
- (154) Smina, T. P.; Mathew, J.; Janardhanan, K. K.; Devasagayam, T. P. A. Antioxidant activity and toxicity profile of total triterpenes isolated from *ganoderma lucidum* (fr.) p. karst occurring in south india. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2011**, *32* (3), 438–446.
- (155) Keleş, A.; Koca, İ.; Gençcelep, H. Antioxidant properties of wild edible mushrooms. *Food Process Technol* **2011**, *2* (6), 1–6.
- (156) Halliwell, B. Reactive species and antioxidants . redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* **2006**, *141*, 312–322.
- (157) Liang, N.; Kitts, D. D. Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanism of action. *Molecules* **2014**, *19* (11), 19180–19208.
- (158) Guzman, M. S.; Santafé, G.; Salcedo, M.; Angulo, A.; Torres, O. Estudio químico y

Referencias

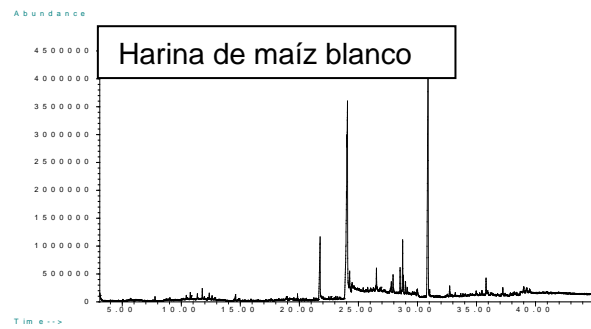
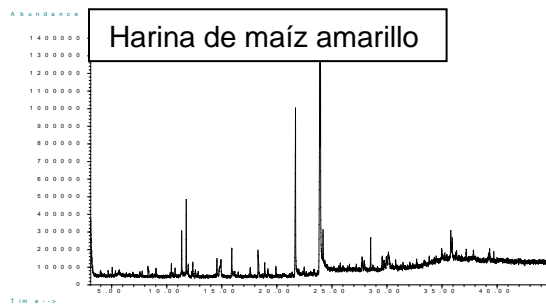
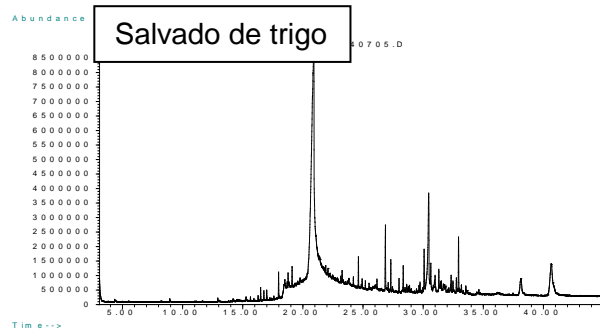
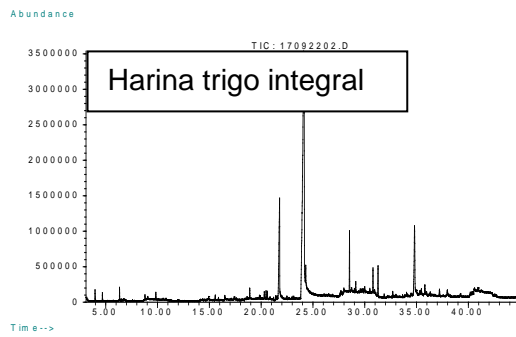
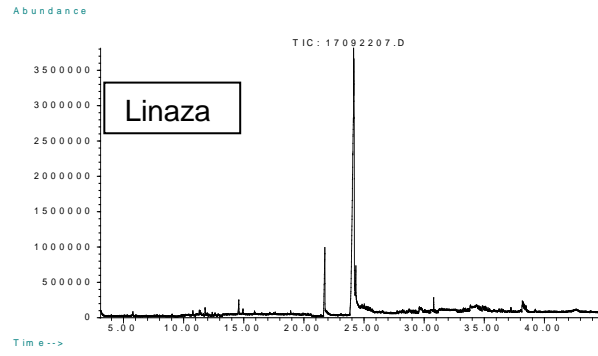
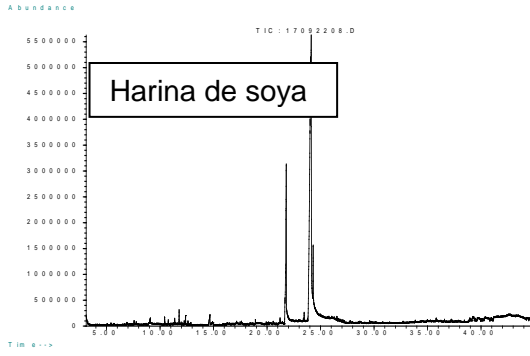
- actividades antioxidante y bactericida de ganoderma applanatum. *Biotechnol. en el Sect. Agropecu. y Agroindustrial* **2013**, 11 (1), 88–94.
- (159) Cui, Y.; Kim, D. S.; Park, K. C. Antioxidant effect of inonotus obliquus. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, 96 (1–2), 79–85.
- (160) Asatiani, M. D.; Elisashvili, V.; Songulashvili, G.; Reznick, A. Z.; Wasser, S. P. Higher basidiomycetes mushrooms as a source of antioxidants. In *Progress in Mycology*; Rai, M., Ed.; Springer: New York, NY, 2010; pp 311–326.
- (161) Nenadis, N.; Tsimidou, M. Z. Assessing the activity of natural food antioxidants. In *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications*; Woodhead Publishing Limited: Cambridge, UK., 2010; p 333.
- (162) Leal Alturo, A. C. Determinación del potencial antioxidante y evaluación del coeficiente de reparto a 25,00 °c de metabolitos secundarios de una especie de liquen colombiano del género hypotrachyna, Universidad Nacional de Colombia, 2012.
- (163) Lee, Y.; Yen, M.; Mau, J. Antioxidant properties of various extracts from hypsizigus marmoreus. *Food Chem.* **2007**, 104, 1–9.
- (164) Yoshino, K.; Nishimura, M.; Watanabe, A.; Saito, S.; Sano, M. Preventive effects of edible mushroom (hypsizigus marmoreus) on mouse type iv allergy: fluctuations of cytokine levels and antioxidant activities in mouse sera. *J. Food Sci.* **2008**, 73 (3), 1–5.
- (165) Li, X.; Wang, Z.; Wang, L.; Walid, E.; Zhang, H. In vitro antioxidant and anti-proliferation activities of polysaccharides from various extracts of different mushrooms. **2012**, 5801–5817.
- (166) Liu, H.; Wang, L.; Sun, Z.; Pang, L.; Jia, M.; Wu, S.; Sun, X.; Hao, L.; Gao, S.; Jia, S.; et al. Production and antioxidant activity of intracellular polysaccharide by hypsizyigus marmoreus sk-01. *BioResources* **2012**, 7 (4), 5879–5893.
- (167) Lee, Y. L.; Jian, S. Y.; Lian, P. Y.; Mau, J. L. Antioxidant properties of extracts from a white mutant of the mushroom hypsizigus marmoreus. *J. Food Compos. Anal.* **2008**, 21 (2), 116–124.

Referencias

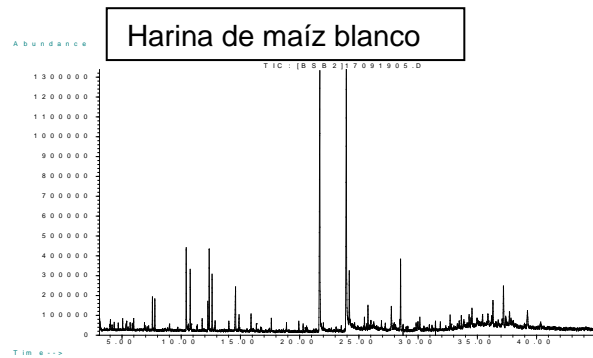
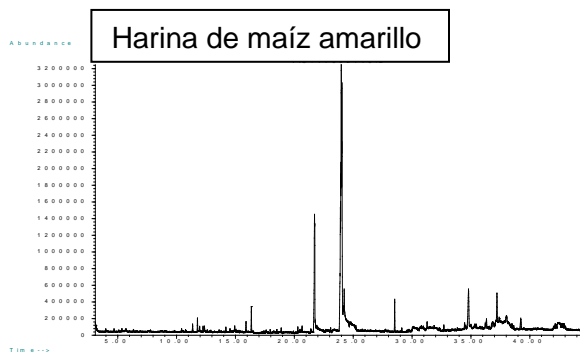
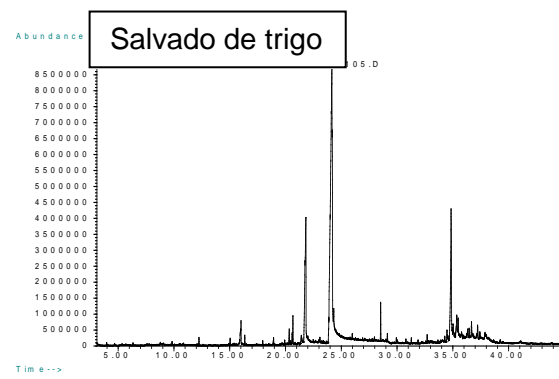
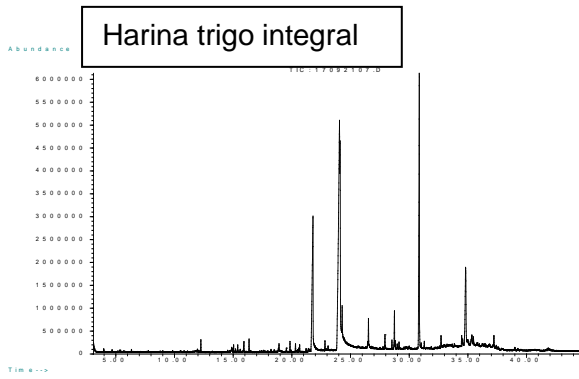
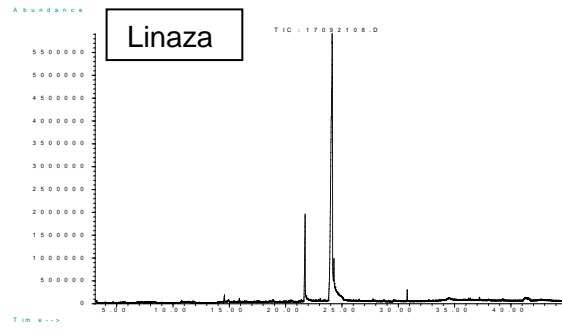
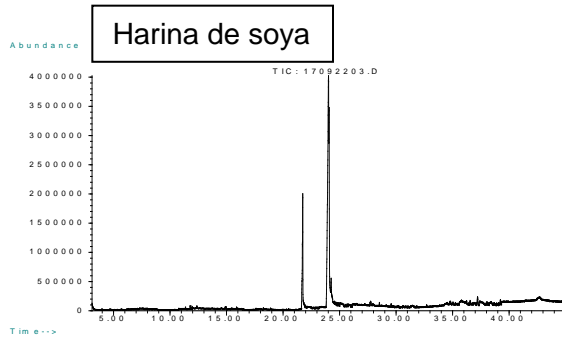
- (168) Cuendet, M.; hostettmann, K.; Potterat, O. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *fagraea blumei*. *Helv. Chim.* **1997**, *80*, 1144–1152.
- (169) Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Leb. Wiss Technol* **1995**, *28*, 25–30.
- (170) Mitsuda, H.; Yuasumoto, K.; Iwami, K. Antioxidant action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyoto Shokuryo* **1996**, *19*, 210–214.
- (171) Maestro Durán, R.; Borja Padilla, R. Actividad antioxidante de esteróles y ácidos orgánicos naturales. *grasas y aceites* **1993**, *44*, 208–212.
- (172) Loganayaki, N.; Siddhuraju, P.; Manian, S. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of phenolic extracts from *helicteres isora* l. and *ceiba pentandra* l. *J. Food Sci. Technol.* **2013**, *50* (4), 687–695.
- (173) Nieto, I. J.; Carolina Chegwin, A. Triterpenoids and fatty acids identified in the edible mushroom *pleurotus sajor-cajú*. *J. Chil. Chem. Soc.* **2008**, *53* (2), 1515–1517.
- (174) Chegwin Angarita, C. Empleo de leds como elicitores para activar producción de triterpenoides en *pleurotus* cultivados por fel. *Rev. Latinoam. Química* **2014**, *42* (1), 15–26.

5 Anexo 5-1 Cromatogramas de especies evaluadas

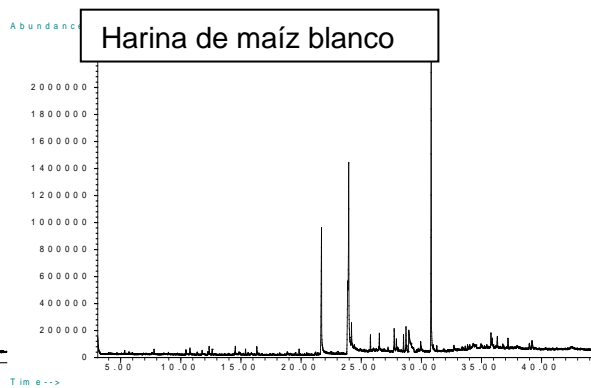
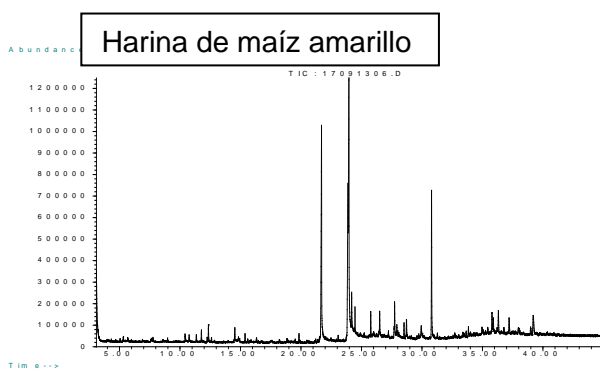
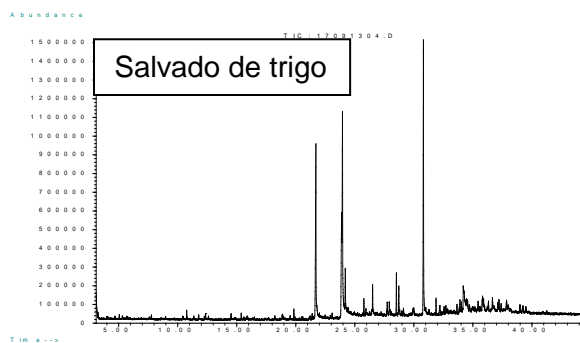
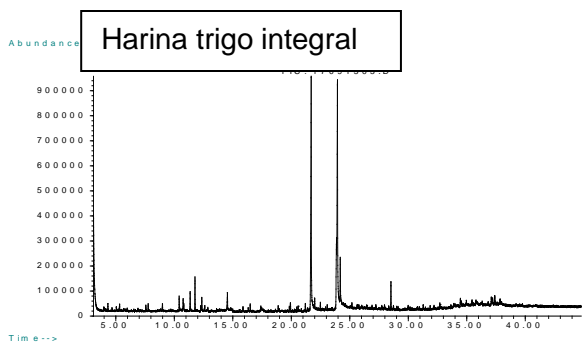
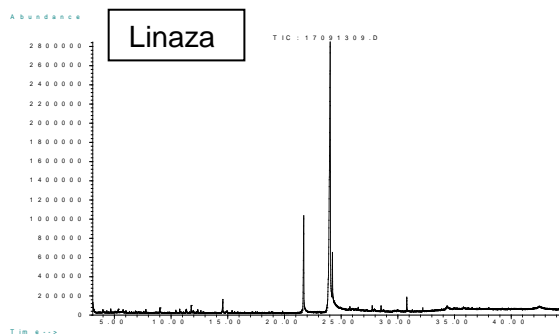
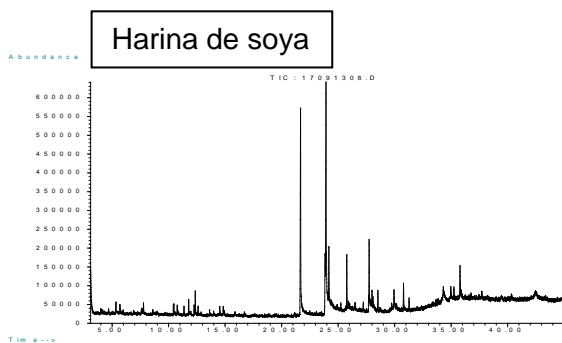
Cromatogramas de *Hypsizigus tessulatus*



Cromatogramas de *Flammulina velutipes*

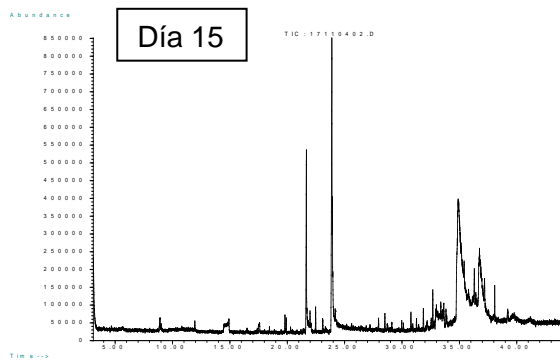
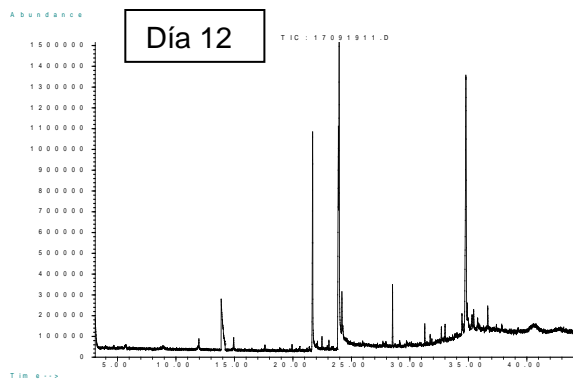
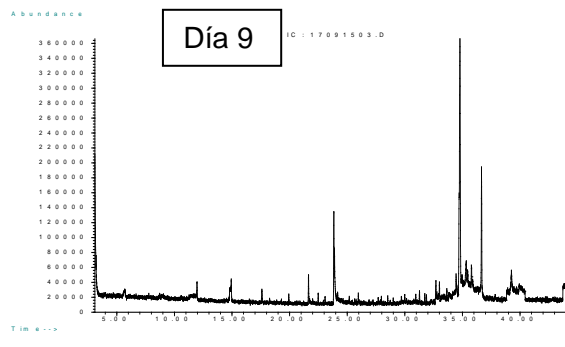
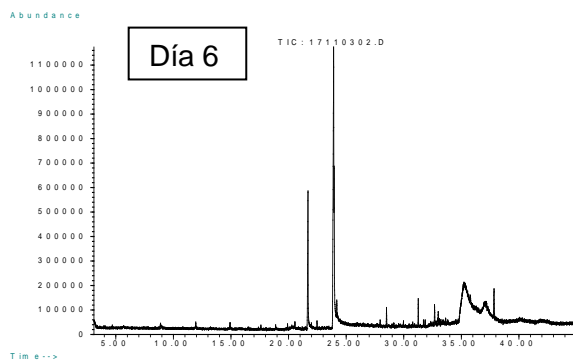


Cromatogramas de *Grifola frondosa*

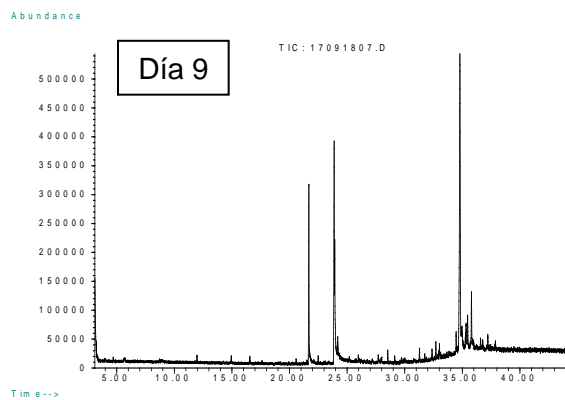
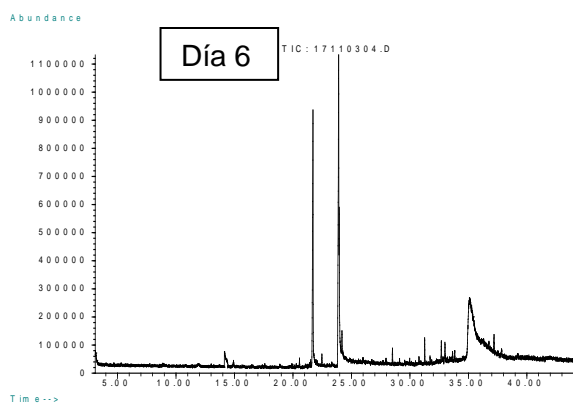


Anexo 5-2 Cromatogramas de la cinética de crecimiento para salvado de trigo y harina de trigo integral

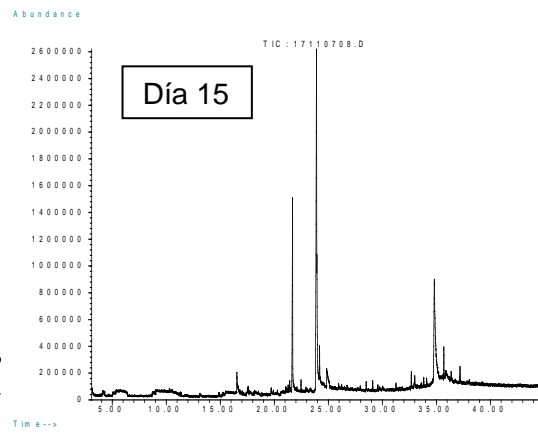
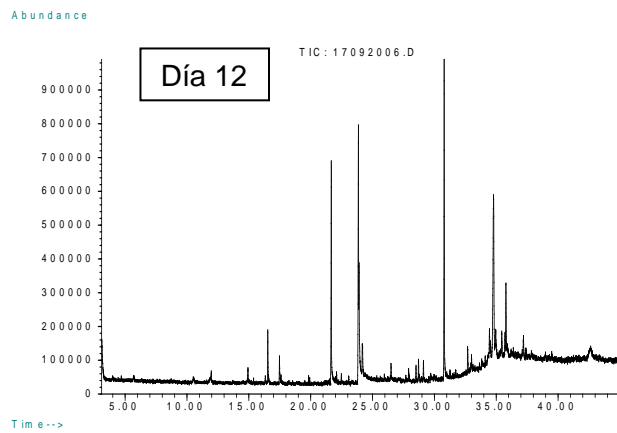
SALVADO DE TRIGO



HARINA DE TRIGO INTEGRAL



Anexos



Anexos

Anexo 5-3 Compuestos determinados por CG-EM en la cinética y proceso de optimización

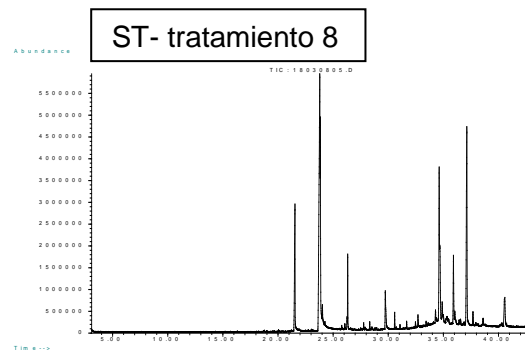
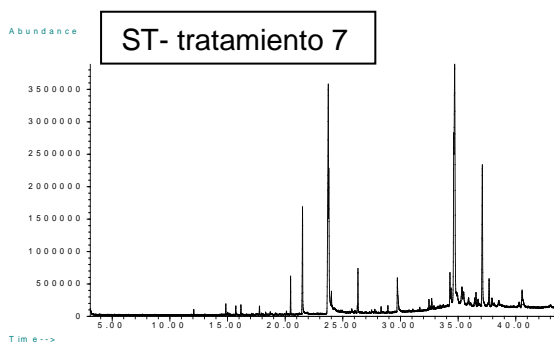
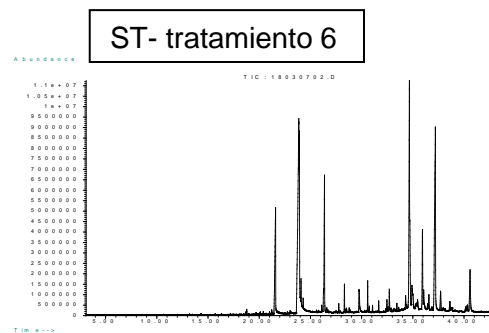
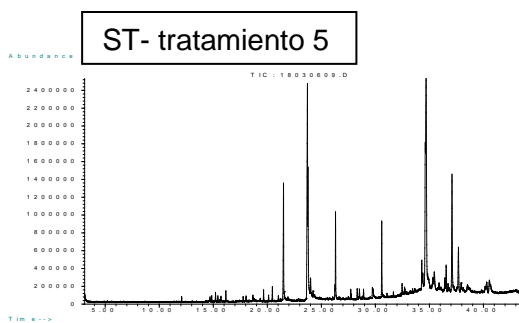
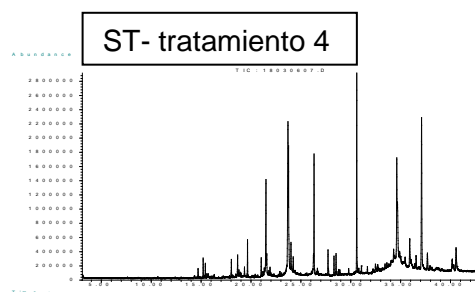
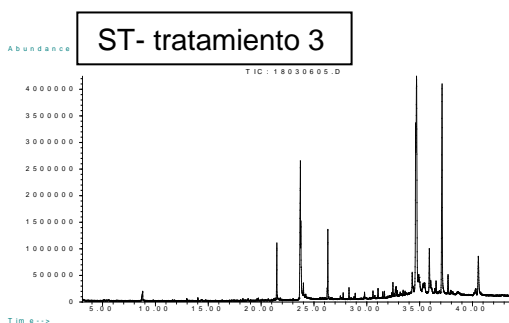
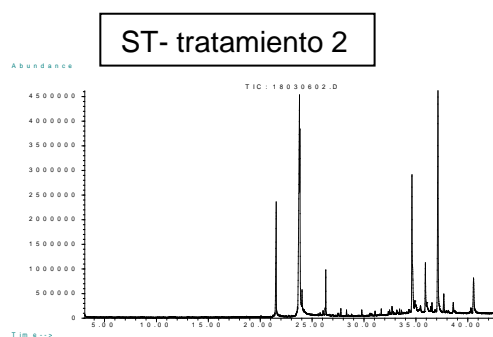
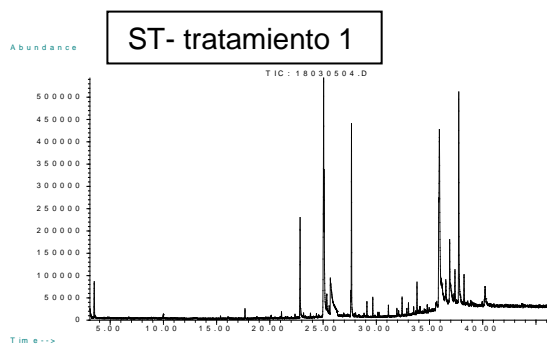
	Compuesto	tr	M ⁺	Pico base	Fragmentos característicos
1	Biciclogermacreno	14,86	204	161	189 (M ⁺ -CH ₃), 165 (M ⁺ -C ₃ H ₃), 163 (M ⁺ -C ₃ H ₅), 161 (M ⁺ -C ₃ H ₅)
2	Ácido dodecanoico (laúrico)	15,74	200	73	Rearreglo Mc-Lafferty m/z 73, picos a m/z 29, 43, 57, 71, 85 producidos por pérdidas sucesivas de 14.
3	Ácido tetradecanoico	18,73	228	73	
4	Ácido pentadecanoico	19,63	242	73	
5	Ácido hexadecanoico	21,73	256	73	
6	Ácido heptadecanoico	22,30	270	73	
7	Ácido 9,12-octadecadienóico	23,73	280	81	
8	Ácido 9-octadecenoico	23,79	282	55	
9	Ácido octadecanoico	24,02	284	73	
10	Espatulanol	16,17	220	205	205 (M ⁺ -CH ₃), 202 (M ⁺ -H ₂ O), 187 (M ⁺ -CH ₃ -H ₂ O), 177 (M ⁺ -43), 159 (M ⁺ -C ₃ H ₉ O)
11	9-octadecenamida (oleamida)	26,37	281	59	m/z 59 McLafferty, M ⁺ -C ₉ H ₇ ,
12	Erucamida	30,59	337	59	
13	Supraeno (escualeno)	31,08	410	69	341 (M ⁺ -69), m/z 69 C ₅ H ₉ , m/z 81 C ₆ H ₉
14	Octadecano	31,68	254	57	Grupo de picos a C _n H _{2n+1} por perdidas de CH ₃ , C ₂ H ₅ , C ₃ H ₇
15	Ergosta – 5,7,9(11),22 – tetraen-3 – ol	34,30	394	251	379 (M ⁺ -CH ₃), 376 (M ⁺ -H ₂ O), 361 (M ⁺ -CH ₃ -H ₂ O), 269 (M ⁺ -CL), 251 (M ⁺ -CL-H ₂ O), 209 (M ⁺ -CH ₃ -Fisión anillo D) (173)
16	Ergosta – 5,7,22-trien – 3 – ol*	34,82	396	363	381 (M ⁺ -CH ₃), 378 (M ⁺ -H ₂ O), 363 (M ⁺ -CH ₃ -H ₂ O), 337 -C ₄ H ₁₁), 271 (M ⁺ -CL), 253 (M ⁺ -CL-H ₂ O), 229 (M ⁺ -Fisión anillo D-H ₂ O), 211 (M ⁺ -CH ₃ - Fisión anillo D), 159 (M ⁺ -Fisión anillo C- H ₂ O), 143 (M ⁺ -Fisión anillo C- H ₂ O-CH ₃), 128 (M ⁺ -Fisión anillo C- H ₂ O-2CH ₃)(52)
17	Ergosta – 5,8,22-trien – 3 – ol*	34,55	396	363	
18	Ergosta-5-en-3-ol	34,92	400	43	400[M ⁺], 382 (M ⁺ -H ₂ O), 315 (M ⁺ -C ₆ H ₁₃), 367 (M ⁺ -H ₂ O-CH ₃), 273 (M ⁺ -cadena lateral), 213 (M ⁺ -H ₂ O-CH ₃ -fisión de anillo D)(174).
19	Ergosta- 5,7-dien-3-ol	35,12	398	365	
21	Ergosta- 5,8-dien-3-ol	35,37	398	365	
20	Ergosta-3-ol	35,00	402	215	
22	Ergosta-3-ona	35,47	400	231	385 (M ⁺ -CH ₃), 273 (M ⁺ -CL), 246 (M ⁺ -Fisión anillo D), 231 (M ⁺ -Fisión anillo D-CH ₃), 217 (M ⁺ -Fisión anillo D-CO-H), 163 (M ⁺ -Fisión anillo C-CH ₃) (174).

Anexos

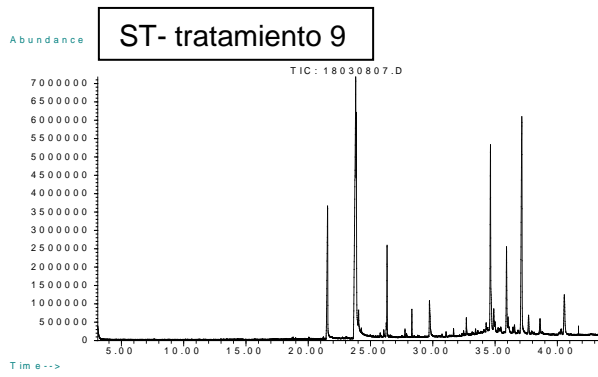
23	Ergosta – 7 – en – 3 – ol	35,49	400	400	400 [M ⁺], 383 (M ⁺ -CH ₃), 380 (M ⁺ -H ₂ O), 365 (M ⁺ - H ₂ O - CH ₃), 337, 273, 246(52)
24	Estigmasta – 5 – en – 3 – ol	35,48	414	43	399 (M ⁺ -CH ₃), 396 (M ⁺ - H ₂ O), 381 (M ⁺ -CH ₃ -H ₂ O), 273 (M ⁺ -CL), 255 (M ⁺ -CL-H ₂ O), 246 (M ⁺ -Fisión anillo D), 213 (M ⁺ -Fisión anillo D-H ₂ O-CH ₃), 163 (M ⁺ -Fisión anillo C-CH ₃), 145 (M ⁺ - Fisión anillo C-H ₂ O-CH ₃) (52)
25	Estigmasta-3-ol	36,04	416	215	401 (M ⁺ -CH ₃), 398 (M ⁺ -H ₂ O), 383 (M ⁺ -CH ₃ -H ₂ O), 275 (M ⁺ -CL), 273 (M ⁺ -CL-2H), 257 (M ⁺ -CL-H ₂ O), 233 (M ⁺ -Fisión anillo D-CH ₃), 215 (M ⁺ -Fisión anillo D-H ₂ O), 180, 147 (174).
26	Estigmasta – 3 – ona	36,32	414	231	399 (M ⁺ -CH ₃), 273 (M ⁺ -CL), 246 (M ⁺ -Fisión anillo D), 231 (M ⁺ -Fisión anillo D-CH ₃), 217 (M ⁺ -CO-H) (54)
27	Estigmasta – 4 – en – 3 – ona	37,22	412	124	397 (M ⁺ -CH ₃), 370 (M ⁺ -C ₃ H ₆), 355 (M ⁺ -C ₃ H ₆ -CH ₃), 314 (M ⁺ -C ₃ H ₆ -CH ₃ -CO-CH), 271 (M ⁺ -CL), 229 (M ⁺ -Fisión anillo D), 124 (54)

Anexos

Anexo 5-4 Cromatogramas de los diferentes tratamientos del proceso de optimización para salvado de trigo (ST).

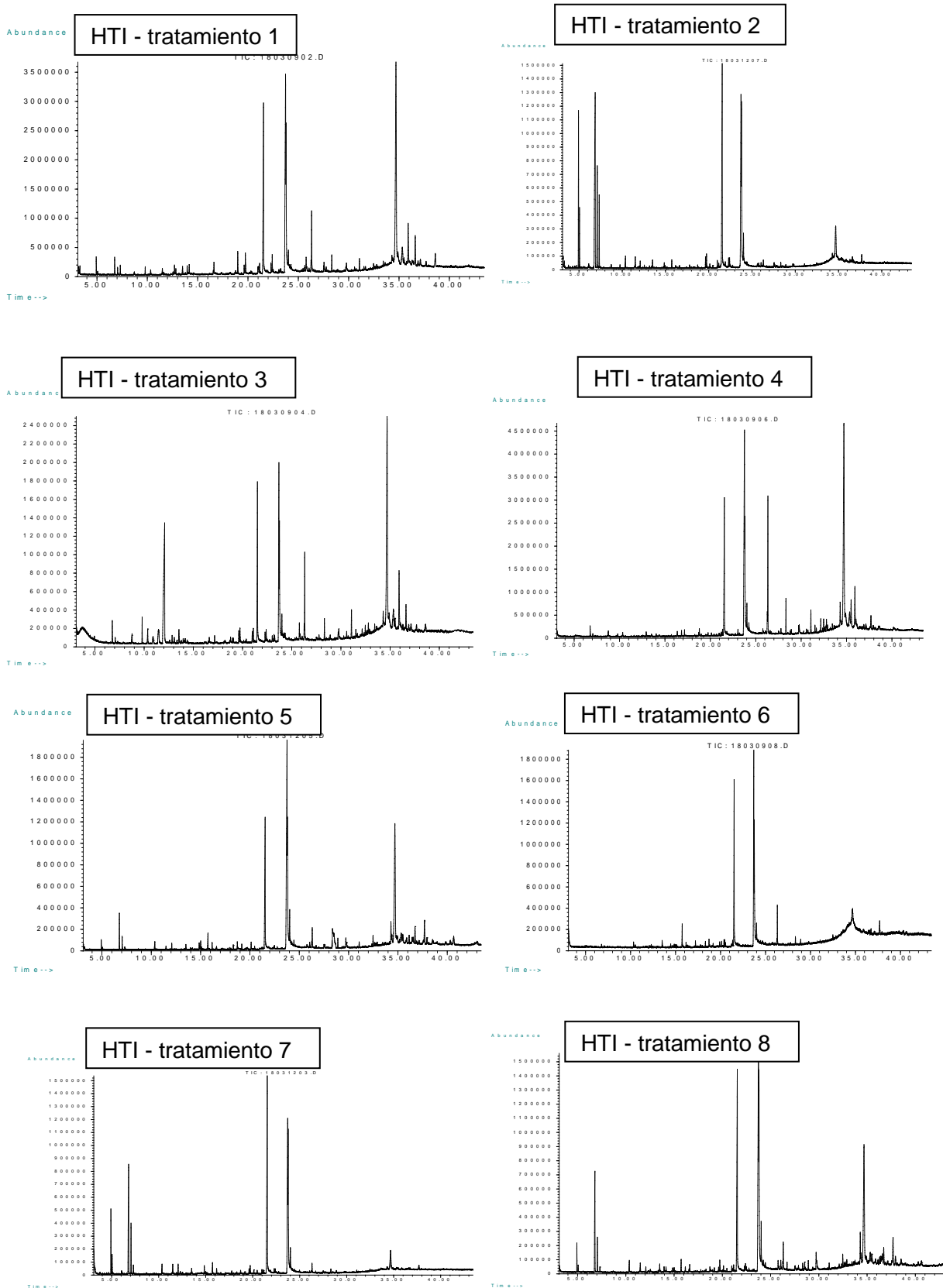


Anexos



Anexos

Anexo 5-5 Cromatogramas de los diferentes tratamientos del proceso de optimización para harina de trigo integral (HTI).



Anexos

