



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Cultivo de *Lentinus crinitus* (L.) Fr sobre residuos agroindustriales y evaluación de la bioactividad de sus extractos

Lina Rocío Dávila Giraldo

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá, Colombia

2017

Cultivo de *Lentinus crinitus* (L.) Fr sobre residuos agroindustriales y evaluación de la bioactividad de sus extractos

Lina Rocío Dávila Giraldo

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Director:

Ph.D. Walter Murillo Arango

Codirector:

Ph.D. Héctor Suárez Mahecha

Línea de Investigación:

Sustancia bioactivas para aplicaciones agrícolas, farmacéuticas, cosméticas y
Nutricionales

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Química de Productos Naturales- GIPRONUT

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá, Colombia

2017

A mis padres, hermanos y amigos

Agradecimientos

A Dios, fuente de energía, sabiduría y amor.

A mis padres, por su dedicación, motivación y apoyo incondicional. A mi madre, cuyo vivir y amor me ha mostrado que para buscar el verdadero camino es necesario la fortaleza para aceptar las dificultades y derrotar los miedos.

A mis hermanos, Ana maría y Álvaro Alexander, por su paciencia y ayuda en esta travesía y que, de forma incondicional entendieron mis ausencias y malos ratos.

A Yenny Alexandra, por ser la luz en mi camino.

Al profesor John Jairo Méndez, por su amistad, tiempo y visión crítica para mi formación profesional y humana.

Al Profesor Walter Murillo Arango, quien ha confiado en mi palabra y ha fortalecido los conocimientos necesarios para investigar.

Al Profesor Héctor Suárez Mahecha por su apoyo incondicional en la búsqueda del conocimiento.

Al profesor Gian Carlos, por ser la luz y la fortaleza en este trasegar de la investigación. Por su sincera amistad y las buenas risas.

A la Profesora Elizabeth Murillo por enseñarme el significado de la dedicación, respeto y el valor de la amistad.

Al Profesor Gerardo Robledo por enseñarme el gran misterio de los hongos poliporos. Por su sinceridad, confianza, apoyo y amistad.

A mis amigos fúngicos Cristian Zambrano, Daniela Varón y Xiomara quienes con su cariño, amor y paciencia me ayudaron a construir estos sueños esporádicos y fúngicos.

A Nathalie Guarnizo y Diego Oliveros, por ser incondicionales, visibles y cercanos.

A los integrantes del grupo de investigación en Productos Naturales GIPRONUT y al Laboratorio de Servicios de Extensión LASEREX: Laura, Camila Olaya, Jennifer, Camila, Yalile, Edgar Villanueva, Adriana, Diana, Luis oveimar por la compañía, calidad humana, comentarios y cooperación en las actividades de laboratorio.

A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia por la financiación del proyecto a través de la convocatoria No 1: "Apoyo a la financiación de proyectos para fortalecer y consolidar programas de doctorado y maestría de la Facultad de Ciencias Agrarias de la sede Bogotá".

A la beca otorgada por el Proyecto Formación de Talento Humano de Alto Nivel, convocatoria N°2 Maestrías, doctorados y posdoctorados 2014, por darme la oportunidad de realizar mis estudios.

Gracias a todos, los que se asomaron a mi vida para hacerme compañía con sus palabras, sonrisas de ánimo y consejos de vida.

Resumen

Para reciclar los residuos agroindustriales generados de diversas actividades, una alternativa es el empleo de hongos de pudrición blanca como *Lentinus crinitus* (L.) Fr, el cual no es comercialmente cultivado, dado que es una especie silvestre y por ende poco se conoce sobre su valor nutricional, propiedades biológicas y potencial bioactivo. Este desconocimiento llevó a realizar bioprospección de basidiomas colectados de *L. crinitus*, así como el aislamiento de micelio para su cultivo mediante fermentación sólida (FES) y líquida (FEL), con el fin de obtener biomasa micelial para la evaluación de la producción de compuestos bioactivos como polisacáridos totales, β -glucanos, así como pruebas antimicrobianas y efecto prebiótico de extractos acuosos. La evaluación preliminar del crecimiento micelial de *L. crinitus* sobre sustratos agroindustriales evaluados evidenció que su crecimiento se ve afectado por la relación C/N. El micelio obtenido por FEL, basidiomas y residuos agotados mediante FES, mostraron un contenido de proteína entre 10.77-14.42% y de β -glucanos entre 9-67 %, los cuales dependieron del tratamiento utilizado. Extractos acuosos obtenidos mediante FEL y de basidiomas colectados generaron una estimulación en el crecimiento de *Lactobacillus paracasei* de 68.56-54.29%, respectivamente, así como un efecto inhibitorio de bacterias patógenas como *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*. Estos avances resultan ser prometedores para la utilización de metabolitos de hongos con fines médicos y agrícolas, el cultivo de dicho hongo para la generación de alimentos funcionales y como alternativa para darle valor agregado a residuos agroindustriales.

Palabras clave: Basidiomicetos, Fermentación, Residuos agroindustriales, β -glucanos, Prebióticos, Actividad antimicrobiana

Abstract

To recycle agro-industrial waste generated from various activities, an alternative is the use of white rot fungi as *Lentinus crinitus* (L.) Fr, which is not commercially grown, because it is a wild species and therefore little is known about its nutritional value, biological properties and bioactive potential. This lack of knowledge led to preliminary tests of biological activities with basidiomes collected from *L. crinitus*, as well as the isolation of mycelium for Solid-State (SSF) and Sumerged Liquid Fermentation (SLF), in order to obtain mycelial biomass for the evaluation of the production of bioactive compounds as total polysaccharides, β -glucans, antimicrobial activity and prebiotic effect. The preliminary evaluation of *L. crinitus* mycelial growth on agro-industrial substrates evaluated showed that their growth is affected by the C/N ratio. The mycelium obtained by SLF, basidiomes and spent mushroom substrates by SSF, showed a protein content between 10.77-14.42% and β -glucans between 9-67%, which depended on the treatment used. Aqueous extracts obtained by SLF and basidiomas generated a growth stimulation of *L. paracasei* of 68.56-54.29%, respectively; and an inhibitory effect of pathogenic bacteria such as *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. These advances are promising for the use of fungus metabolites for medical and agricultural purposes, the cultivation of this fungus for the generation of functional foods and as an alternative to add value to agro-industrial residues.

Key words: Basidiomycetes, Fermentation, Agro-industrial waste, β -glucans, Prebiotics, Antimicrobial activity.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	VI
Abstract	VII
Contenido	VIII
Lista de figuras	XI
Lista de tablas.....	XIII
Lista de Símbolos y abreviaturas	XV
Introducción	1
Objetivos	4
1. Cultivo de Macromicetos para la producción de compuestos bioactivos y otros productos de alto valor agregado: Review	5
1.1 Introducción.....	5
1.2 El reino Fungí: “Los Macromicetos”	6
1.2.1 Los basidiomicetos y ascomicetos	8
1.3 Cultivo de macromicetos	11
1.3.1 Cultivo de macromicetos en Colombia.....	13
1.4 Aislamiento y mantenimiento de cepas	15
1.5 Técnicas para el cultivo de macromicetos	16
1.5.1 Fermentación en estado Sólido (FES)	18
1.5.2 Fermentación en estado líquido (FEL)	19
1.6 Valor nutricional de macromicetos.....	21
1.7 Compuestos bioactivos de macromicetos.....	21
1.7.1 Compuestos Heterocíclicos	22
1.7.2 Policétidos	22
1.7.3 Terpenos	23
1.7.4 Polisacáridos	24
1.7.4.1 Obtención de β -D-glucanos de macromicetos	26
1.7.4.2 Métodos convencionales de extracción	27
1.7.4.3 Técnicas de Cuantificación	28
1.8 Aplicaciones de β -glucanos en la industria de alimentos	29
1.8.1 β - glucanos como fibra dietética	30
2. <i>Lentinus crinitus</i> (L.) Fr y su potencial biotecnológico	34
2.1 Resumen.....	34

2.2	INTRODUCCIÓN.....	36
2.3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
2.3.1	Colecta de basidiomas.....	38
2.3.2	Aislamiento de micelio.....	39
2.3.3	Identificación molecular de basidiomas y de micelio aislado.....	39
2.3.3.1	Extracción de ADN.....	39
2.3.3.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	40
2.3.4	Extracto etanólico de basidiomas colectados.....	40
2.3.5	Identificación de grupos funcionales de metabolitos.....	40
2.3.6	Actividad preliminar de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de basidiomas de <i>L. crinitus</i>	41
2.3.6.1	Actividad antibacteriana.....	41
2.3.6.2	Actividad antifúngica.....	41
2.3.7	Evaluación preliminar del crecimiento micelial de <i>L. crinitus</i> sobre los sustratos.....	42
2.3.7.1	Sustratos.....	42
2.3.7.2	Determinación del crecimiento micelial sobre residuos agroindustriales.....	43
2.3.8	Cultivo de <i>L. crinitus</i> mediante fermentación sólida y líquida.....	43
2.3.9	Análisis proximal.....	44
2.3.10	Análisis estadístico.....	45
2.4	RESULTADOS.....	45
2.4.1	Descripción taxonómica de los basidiomas.....	45
2.4.2	Morfología del micelio obtenido.....	46
2.4.3	Confirmación molecular de basidiomas y micelio de <i>L. crinitus</i>	47
2.4.4	Identificación de grupos de metabolitos.....	47
2.4.5	Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de basidiomas colectados.....	48
2.4.6	Evaluación preliminar del crecimiento micelial de <i>L. crinitus</i> sobre los sustratos.....	49
2.4.7	Análisis proximal de las combinaciones de residuos agroindustriales y correlación con la velocidad de crecimiento micelial.....	52
2.4.8	Cultivo de <i>L. crinitus</i> mediante fermentación sólida y líquida.....	53
2.4.8.1	Fermentación sólida (FES).....	53
2.4.8.2	Fermentación líquida (FEL).....	55
2.4.9	Análisis proximal de basidiomas colectados, micelio obtenido por FEL y de residuos degradados por <i>L. crinitus</i> mediante FES.....	56
2.5	DISCUSIÓN.....	58
2.6	CONCLUSIÓN.....	63
3.	Evaluación preliminar del potencial prebiótico y actividad antimicrobiana de polisacáridos extraídos de <i>Lentinus crinitus</i> (L.) Fr.....	65
3.1	Resumen.....	65
3.2	INTRODUCCIÓN.....	66
3.3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
3.3.1	Material de trabajo.....	67
3.3.2	Extracción de polisacáridos.....	¡Error! Marcador no definido.
3.3.3	Determinación del contenido de polisacáridos totales.....	68
3.3.4	Determinación del contenido de β -glucanos.....	68
3.3.5	Actividad antibacteriana.....	69

3.3.6	Actividad antifúngica	70
3.3.7	Condiciones de crecimiento y mantenimiento de <i>Lactobacillus paracasei</i>	70
3.3.8	Determinación preliminar de los polisacáridos en la estimulación de crecimiento del probiótico	70
3.3.9	Análisis estadístico	71
3.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
3.4.1	Contenido de polisacáridos totales y de β -glucanos	71
3.4.2	Actividad antimicrobiana	73
3.4.3	Efecto preliminar prebiótico.....	81
3.5	CONCLUSIÓN	82
4.	Conclusiones y recomendaciones	84
4.1	Conclusiones.....	84
4.2	Recomendaciones.....	85
A.	Anexo: Secuencia consenso del basidioma	86
B.	Anexo: Secuencia consenso del micelio	87
C.	Anexo: Curva de calibración para polisacáridos totales	88
D.	Anexo: Curva de calibración para β-glucanos.....	89
E.	Anexo: Actividad antimicrobiana de extractos acuosos obtenidos.....	90
	Bibliografía	103

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Partes generales de un hongo superior	8
Figura 1-2: Ciclo de vida esquemático de un basidiomiceto	10
Figura 1-3: Formación de ascos, en ascomicetos.....	11
Figura 1-4: Contexto y mapa esporádico de un basidioma	16
Figura 1-5: Regiones de un pellet de hongo	20
Figura 1-6: Antraquinonas aisladas de <i>Cortinarius purpurascens</i>	23
Figura 1-7: Molécula de Ergosterol.....	24
Figura 1-8: El lentinano, un β -glucano aislado de <i>L. edodes</i>	25
Figura 2-1: Basidiomas de <i>L. crinitus</i> creciendo sobre troncos muertos	46
Figura 2-2: Micelio aislado de basidiomas colectados	46
Figura 2-3: Porcentaje de inhibición fúngica a generada por el extracto etanólico de basidiomas colectados de <i>L. crinitus</i>	48
Figura 2-4: Porcentaje de inhibición bacteriana generada por el extracto etanólico de basidiomas colectados de <i>L. crinitus</i>	49
Figura 2-5: Crecimiento micelial de <i>L. crinitus</i> en los tratamientos. Los datos son reportados como la media \pm DE (ANOVA $p < 0.05$).....	50
Figura 2-6: Crecimiento micelial de <i>L. crinitus</i> a las 72 horas en cada uno de los tratamientos	50
Figura 2-7: Obtención de semilla de <i>L. crinitus</i>	54
Figura 2-8: Invasión de <i>L. crinitus</i> mediante FEL a diferentes tiempos de colonización. 54	
Figura 2-9: Fermentación líquida de <i>L. crinitus</i> en los tres tratamientos	55
Figura 2-10: Obtención de biomasa micelial de <i>L. crinitus</i> mediante FEL. Los datos son reportados como la media \pm DE (ANOVA $p < 0.05$).....	56
Figura 3-1: Porcentaje de inhibición de <i>R. oryzae</i> por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con <i>L. crinitus</i> . Los datos son reportados como la media \pm DE (ANOVA $p < 0.05$).....	76
Figura 3-2: Porcentaje de inhibición de <i>Penicillium sp</i> por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con <i>L. crinitus</i> . Los datos son reportados como la media \pm DE (ANOVA $p < 0.05$).....	77

Figura 3-3: Porcentaje de inhibición de <i>F. oxysporum</i> por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con <i>L. crinitus</i> . Los datos son reportados como la media \pm DE (ANOVA $p < 0.05$).	77
Figura 3-4: Porcentaje de inhibición de <i>A. niger</i> por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con <i>L. crinitus</i> . Los datos son reportados como la media \pm DE (ANOVA $p < 0.05$).	78
Figura 3-5: Porcentaje de inhibición de <i>S. typhimurium</i> por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con <i>L. crinitus</i> . Los datos son reportados como la media \pm DE (ANOVA $p < 0.05$).	79
Figura 3-6: Porcentaje de inhibición de <i>S. aureus</i> por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con <i>L. crinitus</i> . Los datos son reportados como la media \pm DE (ANOVA $p < 0.05$).	80
Figura 3-7: Porcentaje de inhibición de <i>E. coli</i> por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con <i>L. crinitus</i> . Los datos son reportados como la media \pm DE (ANOVA $p < 0.05$).	80
Figura 3-8: Crecimiento de <i>L. paracasei</i> en medio MRS suplementado con extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con <i>L. crinitus</i> . Los datos son reportados como la media \pm DE (ANOVA $p < 0.05$).	81

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Algunas empresas de Colombia, dedicadas a la producción de hongos comestibles y productos derivados.....	14
Tabla 1-2: Comparación entre Fermentación líquida y sólida.....	17
Tabla 1-3: Contenido de β -glucanos y porcentajes de acuerdo a la solubilidad en especies de <i>Pleurotus</i> y <i>Lentinus</i>	26
Tabla 1-4: Actividades biológicas de β - glucanos aislados de macromicetos.....	29
Tabla 1-5: Composición de fibra dietética y relación de contenido de β -glucanos (peso seco) en algunos macromicetos.	31
Tabla 1-6: Patentes relacionadas con la adición de β -glucanos en matrices alimentarias	32
Tabla 2-1: Diferentes combinaciones de los sustratos	42
Tabla 2-2: Resumen de los resultados del BLAST.....	47
Tabla 2-3: Prueba fitoquímica del extracto etanólico de los basidiomas colectados de <i>L. crinitus</i>	47
Tabla 2-4: Pendientes e interceptos para cada curva de crecimiento micelial de <i>L. crinitus</i> en los tratamientos evaluados	51
Tabla 2-5: Comparación múltiple de Bonferroni para cada tratamiento en la cinética de crecimiento.....	51
Tabla 2-6: Análisis proximal de las combinaciones de residuos agroindustriales usadas para la evaluación preliminar del crecimiento micelial de <i>L. crinitus</i>	52
Tabla 2-7: Correlación entre la velocidad de crecimiento y variables de la composición del sustrato	53
Tabla 2-8: Comparación múltiple de Bonferroni para cada tratamiento en la ganancia de biomasa micelial en FES.	55
Tabla 2-9: Análisis proximal del residuos agroindustriales degradado por <i>L. crinitus</i> mediante FES	57
Tabla 2-10: Análisis proximal de basidiomas colectados y micelio obtenido mediante FEL	57

Tabla 3-1: Contenido de polisacáridos y de β -glucanos en los extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con <i>L. crinitus</i>	73
Tabla 3-2: Concentración inhibitoria (CI_{50}) de extractos obtenidos para inhibir <i>R. oryzae</i>	75
Tabla 4-1: Velocidad de crecimiento y porcentaje de inhibición de <i>R. oryzae</i> por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con <i>L. crinitus</i>	90
Tabla 4-2: Velocidad de crecimiento y porcentaje de inhibición de <i>Penicillium sp</i> por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con <i>L. crinitus</i>	91
Tabla 4-3: Velocidad de crecimiento y porcentaje de inhibición de <i>F. oxysporum</i> por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con <i>L. crinitus</i>	93
Tabla 4-4: Velocidad de crecimiento y porcentaje de inhibición de <i>A. niger</i> por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con <i>L. crinitus</i>	94
Tabla 4-5: Velocidad de crecimiento y porcentaje de inhibición de <i>S. aureus</i> por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con <i>L. crinitus</i>	95
Tabla 4-6: Velocidad de crecimiento y porcentaje de inhibición de <i>S. typhimurium</i> por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con <i>L. crinitus</i>	97
Tabla 4-7: Velocidad de crecimiento y porcentaje de inhibición de <i>E. coli</i> por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con <i>L. crinitus</i>	98
Tabla 4-8: Velocidad de crecimiento y porcentaje de inhibición de <i>B. cereus</i> por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con <i>L. crinitus</i>	99
Tabla 4-9: Crecimiento de <i>L. paracasei</i> en medio MRS suplementado con extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con <i>L. crinitus</i>	100

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
%	Porcentaje	W/W, W/W, v/v	Representa una cantidad dada como una fracción en 100 partes iguales.
ppm	Partes por millón	mg/L	
V	Volumen	ml, L	
W	Peso	g, kg	

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
β	Beta		
μ	Micra		

Abreviaturas

Abreviatura	Término
°C	Grados centígrados
a	Anillo
Abs	Absorbancia
ABTS	Radical Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
AS	Agar Saboraud
AW	Actividad agua
C/N	Relación Carbono/Nitrógeno
Ca	Calcio

Abreviatura	Término
Cl ₅₀	Concentración que inhibe el 50 % de crecimiento bacteriano o fúngico
cm	Centímetros
Cu	Cobre
DE	Desviación estandar
DPPH	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
e	Estípite
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMA	Agar con Extracto de malta
Fe	Hierro
FEL	Fermentación en estado líquido
FES	Fermentación en estado sólido
g	Gramos
h	Horas
HCL	Ácido clorhídrico
I+D	Investigación y Desarrollo
K	Potasio
KOH	Hidróxido de potasio
l	Lamelas
<i>L. crinitus</i>	<i>Lentinus crinitus</i> (L.) Fr.
lb	Libras
M	Molar
mg	Miligramos
min	Minutos
mm	Milímetros
mM	Milimolar
Mn	Magnesio
N	Nitrógeno
Na	Sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanómetros
NP	No presenta
P	Fósforo
p	Píleo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar papa Dextrosa
PVC	Policloruro de vinilo
R	Región
RNAsa	Ribonucleasa A
rpm	Revoluciones por minutos
SDS	Dodecilsulfato sódico
T1	Tratamiento 1: salvado
T2	Tratamiento 2: Cáscara de Naranja
T3	Tratamiento 3: Cascarilla de arroz
T4	Tratamiento 4: Cascarilla de arroz y salvado de arroz

Abreviatura	Término
T5	Tratamiento 5: Cascarilla de arroz y naranja
T6	Tratamiento 6: Cáscara de naranja y salvado
T7	Tratamiento 7: Cascarilla de arroz, cáscara de naranja y salvado.
UFC	Unidades formadoras de colonia
v	Velo
VC	Velocidad de crecimiento
Zn	Zinc

Introducción

El cultivo de macromicetos es una industria biotecnológica en continuo proceso de expansión y que va cobrando mayor importancia en el ámbito económico de muchos países como alternativa para la producción de una variedad de aromas, pigmentos, antibióticos, suplementos y compuestos de interés para el sector industrial y como fuente alimenticia dado a su valor nutricional (alto valor proteico, la concentración de vitaminas, minerales, fibra dietética, bajos niveles de sodio y grasas insaturadas) (Feeney & Miller, 2014; Heleno et al., 2015). Por lo tanto, los macromicetos se reconocen como fábricas celulares que producen una gran diversidad de compuestos bioactivos, producto de su metabolismo primario y secundario (Liu, 2007).

Dentro del metabolismo secundario fúngico, se reportan una gran variedad de compuestos tales como policétidos, terpenoides y compuestos heterocíclicos, que presentan diversas acciones con potencial uso dado a su actividad antibiótica, anticancerígena, antifúngica, así como propiedades inmunosupresoras (Schuffler & Anke, 2009). Un hecho interesante indica que la mayoría de metabolitos secundarios aislados de macromicetos han presentado características químicas similares a ciertos fármacos o actúan basados en su acción farmacológica, por lo tanto pueden convertirse en una importante biblioteca de compuestos naturales para el descubrimiento de nuevos medicamentos contra bacterias y hongos patógenos (J. Zhong & Hui, 2009), que constituye una amenaza creciente para la salud pública y la seguridad alimentaria (FAO, 2010).

Los polisacáridos aunque no provienen del metabolismo secundario de hongos, son considerados como compuestos activos y promisorios, para los cuales se ha demostrado actividad antitumoral, antimicrobiana y antioxidante (W. T. Chou, Sheih, & Fang, 2013). Estos compuestos son uno de los mayores componentes de la pared celular fúngica y su contenido en diversos hongos va del 35 a 70% en materia seca (Cheung, 2013). Muchos de los carbohidratos de macromicetos son carbohidratos no digeribles incluyendo la

trehalosa y componentes de la pared celular como quitina, mananos y β -glucanos (Cheung, 2013). Estos últimos compuestos se postulan como una nueva fuente de fibra y se consideran como seguros para ser adicionados en una amplia gama de productos alimenticios para el fomento de la salud (FDA, 2011), cuya ingesta en las cantidades adecuadas podría ayudar a prevenir enfermedades cardiovasculares u otras enfermedades como diabetes, cáncer y obesidad (Cohen, Persky, & Hadar, 2002).

Estos compuestos provenientes del metabolismo primario y secundario de los macromicetos pueden ser obtenidos por procesos biotecnológicos como fermentación en estado líquido (FEL) y sólido (FES), para lo cual se usan residuos lignocelulósicos producto de las actividades del sector agroindustrial (Espinosa-Ortiz, Rene, Pakshirajan, van Hullebusch, & Lens, 2015). Los sustratos lignocelulósicos agotados después del crecimiento fúngico mediante FES son además otro de los productos de valor agregado, que puede ser usados en generación de abonos orgánicos, acondicionares de suelos y producción de humus que reducen el impacto negativo y promueven el uso racional de los residuos (Cohen et al., 2002). Se ha comprobado que el producto de la biodegradación de diversos residuos por parte de hongos comestibles muestran altos porcentajes de nutrientes primarios (N, P y K) útiles para ser aprovechados como fertilizantes (Fontalvo, Córdoba, Gil, & Romero, 2013). Esto mitiga en parte, la problemática de uso de fertilizantes químicos, los cuales generan la compactación del suelo y limitan el crecimiento de raíces, un drenaje deficiente y erosión, conllevando a la disminución de la absorción de nutrientes y agua por parte de las plantas, e incrementando los gases de efecto invernadero y la contaminación de los cuerpos de agua (Massah & Azadegan, 2016).

Si bien las investigaciones realizadas sobre el potencial bioactivo de macromicetos se han incrementado durante los últimos años, los mismos se han centrado en hongos de mayor consumo y comercio dejando de lado aquellos menos conocidos y que podrían posicionarse como materia prima para la generación de nuevos productos. Esto se debe en gran parte, porque en Colombia, las exploraciones micológicas se han desarrollado en bosques montanos y la mayoría de registros corresponden a unos pocos departamentos de la región Andina (Franco-Molano & Uribe, 2000). Para el Tolima existen pocos registros citados en la literatura, los cuales hacen parte de unas escasas zonas de este departamento. Este hecho permite predecir que para Ibagué, Tolima los inventarios son pocos; problema generado por las pocas exploraciones realizadas y desconocimiento total de este reino. Este poco conocimiento de la microbiota en esta región se suma a la falta de

herramientas biotecnológicas para su cultivo y conservación *in vitro*, que permitan la creación de bancos de germoplasma con el fin de mantener la diversidad genética de macromicetos en cualquiera de sus formas reproductivas (esporas, micelio o basidiomas) y así, optimizar los recursos genéticos para la identificación de compuestos bioactivos con aplicaciones biológicas, que ayuden a solucionar problemas de seguridad alimentaria y relacionados con enfermedades crónicas no transmisibles (Gargano et al., 2017) .

Tal podría ser el caso *Lentinus crinitus*, un hongo silvestre del Tolima, cuyo potencial nutricional y acciones biológicas antimicrobianas podrían sentar las bases para la extracción de nuevos componentes bioactivos, generación de productos funcionales y componentes de interés alimentario. Por lo tanto, este documento presenta una revisión sobre generalidades biológicas de los macromicetos, su cultivo y diferentes técnicas biotecnológicas para la obtención de compuestos bioactivos para diferentes usos, haciendo énfasis en la aplicación de polisacáridos, específicamente de tipo β -glucano en la industria de alimentos, así como los resultados de investigación sobre la bioprospección de basidiomas y micelio de *L. crinitus*; y su cultivo mediante fermentación en estado líquido (FEL) y sólida (FES) utilizando residuos agroindustriales con miras en obtener diferentes productos de valor agregado como obtención de polisacáridos con actividad antimicrobiana y su efecto prebiótico. Además, del análisis del potencial uso de los residuos agroindustriales agotados, como mejoradores de suelos o como fuente de alimento animal.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Cultivar *Lentinus crinitus* (L.) Fr sobre residuos agroindustriales y evaluar la bioactividad de sus extractos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar los residuos agroindustriales del Tolima como sustratos para el crecimiento de *Lentinus crinitus* (L.) Fr.
2. Determinar las características bromatológicas de los basidiomas y micelio obtenido de *L. crinitus* cultivado sobre residuos agroindustriales.
3. Cuantificar el contenido de polisacáridos (β -glucanos) en los basidiomas y micelio obtenido de *L. crinitus* cultivado sobre residuos agroindustriales.
4. Evaluar la actividad antimicrobiana y el efecto prebiótico del extracto crudo de los basidiomas y del micelio obtenido de *L. crinitus* cultivado sobre residuos agroindustriales.

1.Cultivo de Macromicetos para la producción de compuestos bioactivos y otros productos de alto valor agregado: Revisión

1.1 Introducción

La bioconversión de residuos lignocelulósicos por parte del cultivo de hongos comestibles, es uno de los procesos más viables económicamente dado a que los residuos y sus derivados pueden transformarse en productos de alto valor agregado (Lin et al., 2016; Nadhim, Ali, Salahuddin, & Al-saeedi, 2017). Dentro de estos productos de valor agregado se destacan la obtención de basidiomas o setas, las cuales presentan altos valores nutricionales representados por el alto contenido de proteínas, vitaminas, minerales, fibra dietaria y bajos niveles de sodio y grasas insaturadas, considerando el cultivo de setas como una fuente barata de alimento generadas en un corto tiempo, a bajo costo y en áreas reducidas (Carrasco-González, Serna-Saldívar, & Gutiérrez-Uribe, 2017). Además, estas características nutricionales de los basidiomas junto con diversas propiedades medicinales comprobadas como efectos analgésicos, antiinflamatorios, antivirales, hipoglucemiantes, antioxidantes, antitumorales, antimicrobianas e inmunomoduladores, convierten a los macromicetos en excelentes nutraceuticos, los cuales aparte de nutrir generan beneficios a la salud (Roncero-ramos & Delgado-andrade, 2017). Estos efectos multifuncionales son producto de compuestos bioactivos presentes en los basidiomas o micelio de macromicetos, los cuales dependen principalmente a las formas de nutrición y las condiciones físicas donde se desarrollan, postulándolos como una fuente de metabolitos bioactivos para diferentes usos (J. Zhong & Hui, 2009). Por lo tanto, en este capítulo se

presenta una revisión a partir de información recolectada en diferentes bases de datos, sobre generalidades biológicas de los macromicetos, técnicas para su cultivo y diferentes herramientas biotecnológicas para la obtención de compuestos bioactivos para diferentes usos, haciendo énfasis en la aplicación de polisacáridos (β -glucanos) en la industria de alimentos. Para realizar la búsqueda, se utilizaron los descriptores como: “Beta-glucans of fungi”, “Glucans of mushrooms”, “Fiber dietary of mushrooms” , “Polysaccharide of fungi”, “Culture liquid mushrooms”, “Solid-state fermentation mushrooms”, “Metabolite mushrooms”, “mushrooms waste”, “Spent mushroom” en diferentes bases de datos electrónicas como American Chemical Society, E-Libro Catedra, Jstor-Journal Storage, Medline, Nature, Pubmed, Redalyc, Scielo, Science Direct, Springer Journal, Google Patent, Patentscope, Wiley Online Library, Scopus y Web of Science.

1.2 El reino Fungi: “Los Macromicetos”

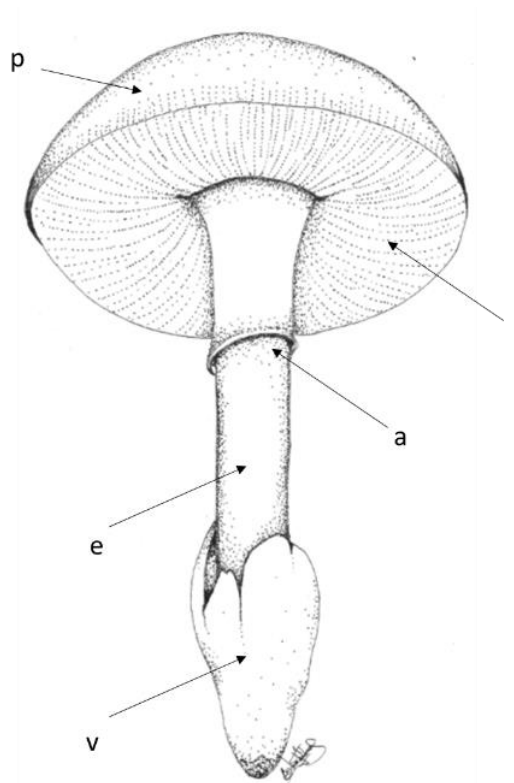
Los hongos son organismos muy comunes en la naturaleza y están presentes en todos los ecosistemas, en las aguas, en el suelo, en el aire, en los prados y en los bosques (Furci, 2007), siendo el segundo grupo de organismos más diverso después de los insectos, con aproximadamente 1.5 millones de especies, de los cuales sólo se conoce el 4.5% (Mueller et al., 2006). Antiguamente se consideraban parte del reino vegetal pero ya hace más de treinta años se reconocen como un reino independiente formando el llamado Reino Fungi o Reino de los hongos según la clasificación de los seres vivos creada por Whittaker (1969). A nivel celular, los hongos presentan características morfológicas y funcionales, que los diferencia de los demás organismos (Robledo, 2015; Webster & Weber, 2007), tales como: contener ergosterol en sus membranas celulares, presentar paredes celulares compuestas de quitina, un grado de organización celular diferente al de plantas y animales, carecer de clorofila, su reproducción considera etapas sexuales o asexuales, almacenan su energía en forma de trehalosa y glucógeno (Moore, Robson, & Trinci, 2011). Las características morfológicas y las estrategias ecológicas presentes en este reino han delimitado los esfuerzos para deducir sus relaciones filogenéticas (McLaughlin, Hibbett, Lutzoni, Spatafora, & Vilgalys, 2009); en especial, porque tradicionalmente las especies de hongos han sido separadas en función de la morfología. Sin embargo, este enfoque no suele distinguir entre homologías y analogías y por tanto, las técnicas moleculares han

permitido generar árboles filogenéticos para la clasificación, con una comparación más objetiva de los taxones (Hibbett et al., 2007).

Esta transición de taxonomía basada en morfología a una taxonomía basada en biología molecular se ha apoyado con el desarrollo de nuevos métodos estadísticos y nuevos avances de la tecnología computacional que han permitido construir su posible evolución (Yang, 2011). Dado a estos avances, existen diversas propuestas de clasificación, cada una de ellas siendo una hipótesis sistemática (Robledo, 2015). Por ejemplo, la realizada por Hibbett et al., 2007, la cual acepta un reino, un subreino, siete filos, diez subfilos, 35 clases, 129 subclases, 129 órdenes. Esta clasificación de los hongos, utilizando las técnicas moleculares ha permitido una estimación mayor de 5.1 millones de especies, comparadas con las estimaciones hechas por Hawksworth, 1991 (Blackwell, 2011).

Existe una clasificación sencilla de los hongos que los agrupa en micromicetos y macromicetos, de acuerdo con la presencia o ausencia de cuerpos fructíferos grandes que constituyen lo que comúnmente se conoce como hongo, pero en realidad, solo es considerada la parte reproductiva del hongo (Velásquez, Saldarriaga, García, & Pineda, 1998). Cuando esta estructura reproductiva es visible a simple vista, se habla de hongos macroscópicos, macrohongos o macromicetos y su generación obedece a ciertas temporadas y características ambientales. Este cuerpo fructífero es denominado ascocarpo o basidiocarpo respectivamente para Basidiomicetes y Ascomycetes, o de una manera general como esporocarpo, seta o cuerpo reproductivo (Mueller et al., 2006). Muchos de los cuerpos fructíferos de los hongos que se colectan en la naturaleza pueden ser divididos en tres partes (píleo, himenio y estípite) (Figura 1-1); sin embargo algunas de esas partes podría no estar presente, o bien tratarse de cuerpos fructíferos totalmente diferentes, esto dependiendo del grupo de hongos que se haya recolectado. La otra parte del hongo se encuentra en el sustrato como filamentos o hifas, que forman una red o micelio (Furci, 2007), siendo este micelio el verdadero “cuerpo” del organismo con una apariencia algodonosa o afelpada de color blanquecino y de forma radial (Robledo, 2015).

Figura 1-1: Partes generales de un hongo superior ¹



Fuente: Autor

1.2.1 Los basidiomicetes y ascomicetos

Los hongos superiores, con micelio tabicado y esporas asexuales exógenas, se clasifican en dos grupos, Ascomycetes y Basidiomycetes, sobre la base de sus desarrollo sexual; después de la formación del cigoto en estos hongos, hay inmediatamente una división meiótica seguida de la formación de cuatro u ocho esporas sexuales haploides que nacen dentro o sobre estructuras conocidas como ascas o basidios, respectivamente para cada

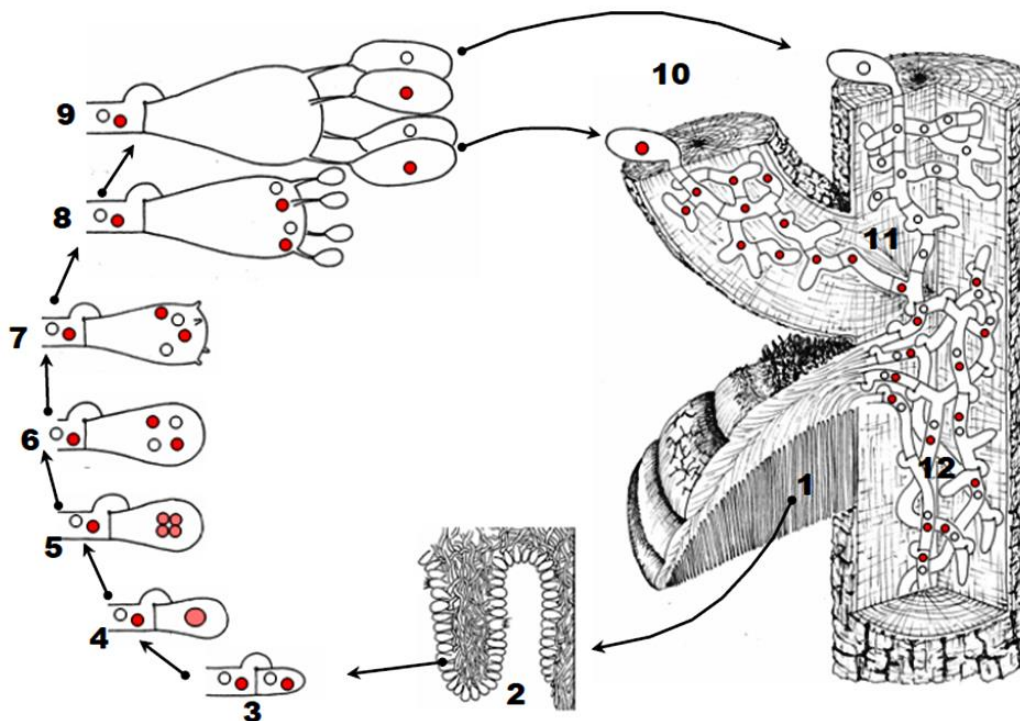
¹ El píleo (p) o también llamado sombrero se ha abierto completamente y muestra, en la cara inferior, sus lamelas típicas (l); el velo parcial (v) se ha roto y solo queda de él un anillo (a), pegado en su tercio superior a un largo pie o estípite (e), y en parte basal del estípite, unida la volva (v).

grupo (Roger Y. Stanier, 2005). Los basidiomicetos forman un grupo de hongos muy grande y diverso que se caracteriza porque produce esporas sexuales en cuerpos fructíferos llamados basidiocarpos, también conocidos como basidiomas o basidiomas (del griego basidion=base pequeña, basidio + karpos=fruto), el cual porta estructuras especializadas conocidas como basidios (Sánchez & Royse, 2001). “La mayoría de estos hongos produce un micelio bien desarrollado, con septos simples o doliporo, dependiendo del orden taxonómico. Usualmente es blanco, amarillo brillante o naranja, y a menudo se dispersa hacia el frente, creciendo en forma de abanico, puede entretrejerse formando estructuras parecidas a cuerdas o raíces llamadas rizomorfos, resistentes a condiciones adversas como la falta de nutrientes o la humedad. En este grupo se incluyen royas y carbones causantes de enfermedades en plantas cultivadas que llegan a destruir las cosechas de un gran número de ellas. Parásitos de árboles forestales como las especies del género *Ganoderma*, destructores de la madera y las setas, en donde se encuentran las formas que comúnmente conocemos como hongos comestibles” (Sánchez & Royse, 2001; Webster & Weber, 2007).

El ciclo de vida de un basidiomiceto involucra diferentes procesos (Figura 1-2): “El basidioma (1), es el lugar donde se desarrolla el himenio, cubriendo la superficie de tubos o lamelas, según sea el caso (2). Es en el himenio donde se formarán los basidios que darán origen a las basidioesporas. Los núcleos de una hifa terminal (3) van a sufrir cariogamia, es decir que se van a fusionar (4). Posteriormente por el proceso de meiosis se originarán 4 núcleos de distinta polaridad, que serán los núcleos de las 4 esporas (5-6). El basidio empieza a formar los esterigmas (7) por donde migran los núcleos a las basidioesporas cuando estas empiecen a formarse (8). Cuando las basidioesporas están maduras (9) son liberadas por los poros o lamelas y dispersadas por el viento. Cuando llegan al sustrato y las condiciones de humedad y temperatura son adecuadas germinan (10) generando una hifa que posteriormente desarrolla un micelio. Este micelio monocariótico (mono=uno, carión=núcleo), llamado haploide, crece y se desarrolla degradando el sustrato (11). Pero en esta condición no puede fructificar. Las hifas del micelio monocariótico necesitan fusionarse con hifas de otro micelio monocariótico para generar un micelio dicariótico (di=dos, carión=núcleo) llamado diploide (12). No cualquier par de micelio monocarióticos puede fusionarse, solo puede hacerlo aquellas que tengan distinta polaridad y que sean compatibles. Es decir que sus cargas genéticas tienen que ser compatibles para la unión. El micelio dicariótico, se desarrolla, crece y cuando se

encuentra en condiciones necesarias (humedad, temperatura) desarrolla un basidioma. Este tipo de basidioma que produce esporas por división sexual se dice que es el estado perfecto de hongo o Telomorfo” Robledo, 2015

Figura 1-2: Ciclo de vida esquemático de un basidiomiceto

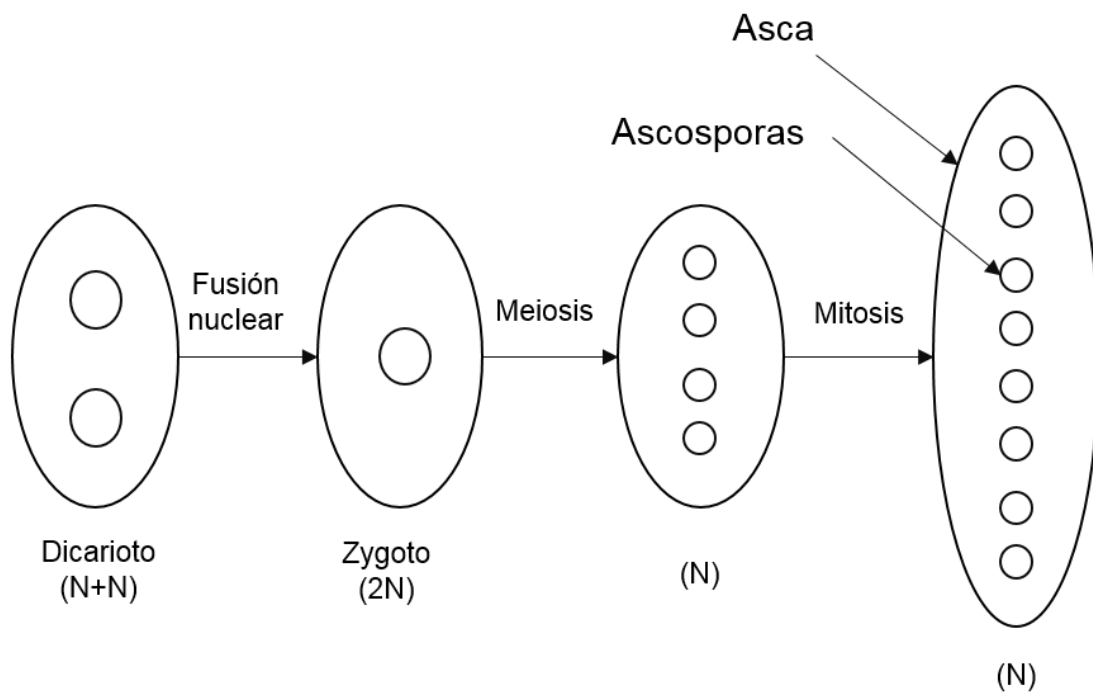


Tomado de Robledo, 2015.

Los ascomicetos crecen fácilmente en cultivos y cubren un amplio rango en el modo de vida, los hay saprobios, simbios, parásitos o patógenos. Producen ascosporas en el estado teleomórfico y conidios en el anamórfico. Se suele llamar moniliáceos a los mohos con conidios hialinos y dematiáceos si tienen conidios o micelio oscuro. Los ascomicetos son el grupo de hongos que reúne el mayor número de especies, con 3.409 géneros y 32.739 especies. Entre los ascomicetos se encuentran las levaduras, mohos negros y verdes azulados, las colmenillas y las trufas. Estas últimas son muy apreciadas dado a su intenso sabor y constituyen uno de los productos biológicos más costosos del mundo. La reproducción sexual en los ascomicetos implica la formación de un asco (pequeña bolsa o saco). Según la especie, la formación de ascos está precedida por la fusión de gametangios o hifas no especializadas provenientes de cepas con apareamiento

complementario. Los núcleos se disponen en pares, dicariones, que se dividen en forma sincrónica a medida que crece la hifa. Finalmente, algunos núcleos se fusionan, esta es la única etapa verdaderamente diploide del ciclo de vida. Los núcleos diploides de inmediato experimentan meiosis y producen cuatro núcleos haploides que luego, se dividen por mitosis y originan ocho núcleos haploides. Cada uno de estos núcleos se rodea de una pared rígida y forma un ascocarpo, con ocho ascosporas (Figura 1-3)” (Curtis & Barnes, 2001).

Figura 1-3: Formación de ascos, en ascomicetos.



Fuente: Autor

1.3 Cultivo de macromicetos

Los hongos silvestres comestibles han sido colectados y consumidos por el ser humano durante millones de años para la alimentación como para el tratamiento de diferentes enfermedades, siendo los países asiáticos los mayores productores y consumidores más habituales (S. Wasser, 2003). Durante los últimos años y dado a la comprobación de diversas actividades biológicas exhibidas por el metabolismo secundario y primario de macromicetos, se ha intensificado a nivel mundial no solo el cultivo, sino el consumo de

este tipo de hongos, el estudio de sus bioactivos y la actividad comercial relacionada con los suplementos dietéticos, y con los demás productos que son “simplemente algo más que un alimento” (S. P. Wasser, Sokolov, Reshetnikov, & Timor-Tismenetsky, 2000); o también llamados “Alimentos funcionales”.

La Investigación y Desarrollo (I+D), en términos de mercado de macromicetos se proyecta con una cifra de \$50.034.12 millones para el 2019, siendo los países asiáticos como Japón y china los mayores productores (Markets, 1AD). Este crecimiento está relacionado con la reciente aplicación de técnicas modernas sobre la extracción, purificación y la comprobación científicamente de las propiedades funcionales de los macromicetos. Sin embargo, el cultivo de hongos en Iberoamérica es una actividad tecnológica y económica con menos de un siglo, y en algunos países no se ha establecido (Suárez & Nieto, 2013).

Esta situación actual, regida por una economía globalizada, que exige innovación en las actividades productivas y que plantea la búsqueda de alimentos más sanos y la existencia de consumidores más informados, presenta una oportunidad para obtener diferentes beneficios en la producción y conservación de la micota silvestre de una región. Sin embargo, dado a los esfuerzos en ciencia y tecnología de hongos comestibles o con un posible potencial, la producción alcanzada en Latinoamérica es reducida si se compara con las logradas por otras regiones del mundo como Asia, Europa y EE. UU (Andrade Gallegos & Mata, 2012); donde su producción fue de 2.6 millones de toneladas para el año 2000 e incrementando en 30.8% para el 2007 (FAO, 2008). No obstante, estas cifras corresponden a la producción de especies comerciales como *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach, *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler y *Pleurotus sp* que representan más o menos el 75% de especies cultivadas del mundo (R. Chang, 1996) y donde el 5% corresponde a otros 200 géneros, con 1.200 especies, las cuales son comestibles y medicinales en 85 países (Boa, 2005a). Sin embargo, estos datos difieren de un país a otro, dado a las diferencias culturales y tradicionales, pues el número de especies consumidas es solo una pequeña fracción de todas las especies disponibles.

Dentro de los macromicetos de mayor consumo y distribución en el mundo se encuentran hongos como: *Ganoderma lucidum* (Lingzhi), especies de *Cordyceps*, *Lentinula edodes* (Shitake), *Piptoporus betulins* (Birch polypore), *Innotes obliquus* (chaga) y especies de *Agaricus* (Champiñón) (Masé & Ahg, n.d.; S. P. Wasser et al., 2000). Sin embargo, el G.

lucidum es el hongo más conocido y popular en la medicina tradicional China, considerado como el hongo de la inmortalidad y sus productos son vendidos como suplementos dietéticos y su impacto en la economía mundial radica en unos 2.5 millones de dólares anuales (Bishop et al., 2015).

Existe un gran número de productos de este y otros hongos que se encuentran disponibles y que varían tanto en el procesado, método de extracción así como del modo de circulación en el mercado como tónicos, píldoras o polvos (Zhou et al., 2007). Por ejemplo *G. lucidum* es adicionado al té verde con el objetivo de promover los efectos anticancerígenos sobre las células proliferativas (Thyagarajan, Zhu, & Sliva, 2007). Además los β -glucanos extraídos de esta misma especie, se consideran como seguros mediante una notificación GRAS, y se ha adicionado en una gran variedad de alimentos desde frutas hasta sopas (FDA, 2011). Otro ejemplo, es la producción de cultivos artificiales de especies de *Cordyceps*, para generar diversos productos del micelio y del cuerpo fructífero (Chiang, Liang, Wang, & Liang, 2017; Suh et al., 2017). Este hongo se ha utilizado en el oriente, para tratar enfermedades del riñón, pulmón y corazón, para la disfunción sexual masculina y femenina, y para aliviar el dolor y los síntomas de tuberculosis y hemorroides; además para promover la longevidad y salud en general (Holliday, Matt claver, & Wasser, 2005).

Otro hongo, de gran importancia es el Shitake (*Lentinus edodes*). Este hongo, es el segundo más producido en el mundo, y existe un gran número de investigaciones, donde destacan los efectos inmonomoduladores producto de un polisacárido denominado Lentinano que permite prolongar la expectativa de vida de los pacientes con cáncer y mejorar su calidad de vida (Rop, Mlcek, & Jurikova, 2009) así como el reporte del contenido de β -glucanos (Zhuang et al., 2017) y su valor nutricional y antioxidante (Roncero-Ramos, Mendiola-Lanao, Pérez-Clavijo, & Delgado-Andrade, 2017).

1.3.1 Cultivo de macromicetos en Colombia

En Colombia el cultivo de hongos comestibles comenzó en 1950, con la producción de champiñón, *Agaricus bisporus* en Cundimarca, en el Municipio de Cajicá, cerca de Bogotá, por el alemán Alfredo Beck, quien trajo el inoculo al país y años más tarde, diversificó la producción con el cultivo de Shittake (*Lentinus edodes*) con el fin de producir micofarina que se vende actualmente en el mercado (Reina, 2003). Hasta mediados de la década de los 1970s, la mayor parte del champiñón consumido en Colombia era importado, hecho

que generó interés por la producción local de champiñones, surgiendo pequeños cultivadores locales (Chávez & Metodología, 2010). Desde 1975 hasta 2002, la producción de champiñones incrementó de 180 hasta 4.050 toneladas anuales, respectivamente, generando un consumo *per cápita* de 0.22 kg por año (Boa, 2005a). Estos sucesos aumentaron la producción masiva de macromicetos y creación de empresas las cuales, actualmente se dedican a un gran número de productos derivados y la utilización de diversos residuos industriales (Tabla 1-1). Sin embargo, la producción y la diversidad de hongos cultivados no se comparan con el mercado europeo, asiático y norte americano. Esta falta de información sobre el aprovechamiento de los recursos genéticos fúngicos que tiene Colombia, genera un campo poco explorado y a la vez, una alternativa de alimentación a bajo costo y nuevos productos para el mercado.

Tabla 1-1: Algunas empresas de Colombia, dedicadas a la producción de hongos comestibles y productos derivados

Empresa	Productos
Setas de la sabana	Conserva y antipastos de Orellanas, Shiitake, enokii y Eryngii.
Setas Colombianas S.A	Producción de champiñón blanco, portobello, crimini, oyster y shiitake.
Setas de Cuiva	Champiñón fresco y en conserva
Setas doradas	Champiñón blanco, portobello, crimini fresco y en conserva
Setas Colombia	Producción de setas comestibles, los cuales involucran a las poblaciones en situación de pobreza en la cadena productiva.
Cenicafé	Cultivo de <i>Ganoderma lucidum</i> y otras especies de hongos comestibles
Gano excel	Suplementos dietarios: Ganocafé, Ganochocolate, capsulas y otros productos de <i>Ganoderma lucidum</i>
One colombia	Café con <i>Grifola frondosa</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Cordyceps sinensis</i> .
Ganoderma in Colombia	Distribuidores de capsulas de <i>Ganoderma lucidum</i>

Juan Valdez	Cultivo de hongos Orellana, hongos <i>Ganoderma lucidum</i> y abonos orgánicos.
--------------------	---

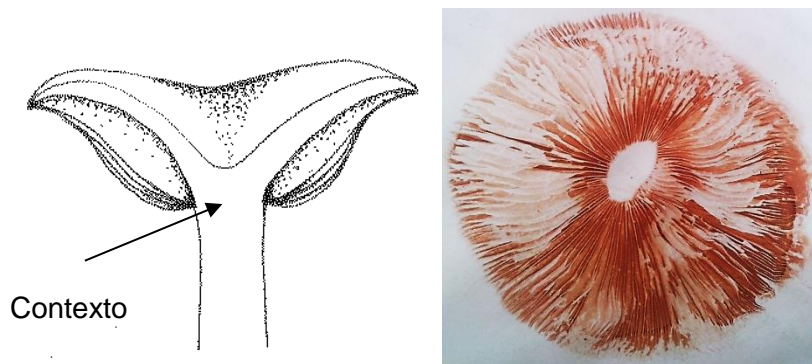
1.4 Aislamiento y mantenimiento de cepas

Existen diferentes metodologías propuestas para el aislamiento de cepas de hongos silvestres. Una cepa es equivalente al micelio y es considerado como un organismo que mantiene constante su pureza genética y fisiológica, y del cual se pueden obtener muchas replicas (Trujillo, 2004). Se destaca el aislamiento por medio de: tejido, esporas, sustratos invadidos con micelio, agregaciones miceliales vegetativas tales como rizomorfos, cordones miceliales, esclerotios y vainas ectomicorrízicas (Ainsworth, 1995). Sin embargo, el aislamiento vegetativo y multiespórico, son los más usados. Algunas de estas metodologías, involucran la previa desinfección con el fin de obtener cultivos puros, ya que al coleccionar cuerpos fructíferos en campo, estos vienen contaminados de otros microorganismos, especialmente de bacterias que se desarrollan con mayor rapidez en el medio, inhibiendo el desarrollo del hongo (R. Rios & Ruiz, 1993). La aplicación de estas técnicas, permite la disposición del micelio en cualquier época del año, lo cual facilita su manejo y aplicación (Reyes & Campos, 2013). Antes de realizar el aislamiento del micelio, se debe tener preparado los medios de cultivo, sobre los cuales se sembrarán las esporas, el tejido o una agregación micelial. Estos medios, les proporcionan a los hongos, los nutrimentos necesarios para su desarrollo. Los medios más empleado son el Agar papa Dextrosa (PDA), Agar con Extracto de malta (EMA) y el Agar Sabouraud (AS). Sin embargo se han planteado otros tipos de medios de cultivo alternativos, los cuales resultan más efectivos para su crecimiento (Arana gabriel, Burrola aguilar, Garibay orijel, & Franco maass, 2014; M. Rios, Hoyos, & Mosquera, 2010).

El aislamiento por tejido es una de las formas más simples de obtener una cepa y el resultado es una copia idéntica del hongo del cual se ha obtenido el tejido (Gaitan-Hernandez, Salmones, Perez Melo, & Mata, 2006). El aislamiento por tejido puede realizarse de diversas maneras. Se realiza un corte longitudinal del cuerpo fructífero, se toma la parte del contexto (Figura 1-4) del hongo, y dado a que este no está expuesto al ambiente, se puede sembrar directamente a un medio de cultivo, en condiciones asépticas (Gregory M. Mueller, Bills, & Foster, 2004). Otra manera, consiste en tomar alguna parte

del tejido del cuerpo fructífero y desinfectar con hipoclorito de sodio al 5%, alcohol etílico al 70% y agua destilada estéril (Chaparro, Rosas, & Varela, 2009), y sembrar dicho tejido desinfectado en un medio sólido o en una cámara húmeda (Gilchrist et al., 2005). El aislamiento multiespórico consiste en aislar esporas del propio hongo y suspenderlas en una solución para ser adicionadas en cajas de Petri con los medios de cultivo (Trujillo, 2004). Las esporas se obtienen realizando un mapa esporádico (Figura 1-4), el cual se obtiene colocando el sombrero (píleo) hacia abajo, sobre un papel blanco estéril, por un tiempo de 6 a 8 horas y se tapa con un recipiente limpio y estéril (Gaitan-Hernandez et al., 2006).

Figura 1-4: Contexto y mapa esporádico de un basidioma



Fuente: Autor

1.5 Técnicas para el cultivo de macromicetos

Las actividades biológicas que han sido reportadas para macromicetos están directamente relacionados con su composición química y el sustrato donde se desarrollan, lo que ha conllevado hacia el desarrollo de técnicas de cultivo para la producción industrial bien sea de compuestos bioactivos o la generación de basidiomas como fuente de alimento (Chegwin A. & Nieto R., 2013). Dentro de las técnicas para el cultivo de hongos se destacan dos: La fermentación en estado sólido y líquido (Tabla 1-2). En ambas técnicas el crecimiento del hongo es diferente, pero en ambos casos suelen presentar un desarrollo típico, similar al presentado por otros organismos, y que consta de las siguientes fases: latencia, exponencial, declinación, estacionaria y muerte (Sánchez & Royse, 2001). Sin embargo, en la fermentación en estado sólido, en lugar de fase exponencial se presenta

una fase de crecimiento más o menos lineal y si se trata de un basidiomiceto, además puede presentarse, según las condiciones, una etapa de fructificación (Sánchez & Royse, 2001). En ambas técnicas, el crecimiento y desarrollo de los hongos se ve afectado por varios factores como: temperatura, pH, sustrato, carbono, nitrógeno, relación C/N, minerales, vitaminas, aireación, luz, entre otros factores (Pandey, 2003).

Tabla 1-2: Comparación entre Fermentación líquida y sólida

FACTOR	Fermentación líquida	Fermentación sólida
Sustrato	Solubles (Azúcares) y poliméricos	Polímeros insolubles
Sub sustratos	-	Almidón, celulosa, pectina, lignina, minerales
Condiciones asépticas	Esterilización por calor y control de asepsia	Tratamiento con vapor, condiciones no estériles
Agua	Altos volúmenes en el consumo de agua y de efluentes descartados	Limitado consumo de agua, bajo AW, no efluentes
Calor metabólico	Fácil control de temperatura	Baja capacidad de transferencia de calor.
Aireación	Fácil control de pH	Sustrato sólidos con capacidad buffer
Control de pH	Altos niveles de aireación	Fácil aireación y amplia superficie de intercambio aire/sustrato
Agitación mecánica	Buena homogenización	Se prefieren condiciones estáticas
Escalamiento	Disponibilidad de equipos industriales	Inoculación con esporas, fermentación batch
Consideraciones energéticas	Alto consumo de energía	Bajo consumo de energía
Volumen del equipo	Altos volúmenes y tecnologías de alto costo	Bajos volúmenes y bajo costo de equipos

Contaminación	Riesgo de contaminación bacteriano	Riesgo de contaminación
----------------------	------------------------------------	-------------------------

Fuente: Raimbault, 1998 (Raimbault, Soccol, & Chuzel, 1998)

1.5.1 Fermentación en estado Sólido (FES)

En sus siglas en ingles SSF (Solid-State Fermentation), se define como la fermentación que involucra sólidos en ausencia (casi ausencia) de agua libre, pero el sustrato debe poseer suficiente humedad para apoyar el crecimiento y el metabolismo del organismo (Pandey, 2003). La palabra “Fermentación” dentro del término “Fermentación en estado sólido”, tiene un sentido más amplio y no implica que los microorganismos usen vías metabólicas fermentativas, sino la utilización de sustratos sólidos como soporte para su crecimiento y otro tipo de procesos (Mitchell, de Lima Luz, Krieger, & Berovic, 2011). Es probable, que este método sea el más antiguo usado por el hombre para hacer que los microorganismos, en especial hongos, transformen los residuos agroindustriales para la producción de bioenergéticos, elaboración de nuevas formulaciones de alimentos, como sustrato para la producción fermentativa de metabolitos de interés, como mejoradores o acondicionadores de suelos o para la producción de diversas enzimas (Dinis et al., 2009; Mazzeo, León, Mejía, Guerrero, & Botero, 2010; Thomas, Larroche, & Pandey, 2013). Esta técnica ofrece notables ventajas biotecnológicas como la alta concentración de metabolitos obtenidos, estabilidad de los productos y adaptabilidad de los microorganismos, especialmente los hongos (Granda, Amanda mejia, & Jiménez, 2005). Para el cultivo de hongos comestibles utilizando FES, se consideran varias etapas (S. Chang, 2009; Gaitan-Hernandez et al., 2006; Sánchez & Royse, 2001):

- **Elaboración del inóculo:** Es la expansión de masa de micelio, obtenida a partir de cultivos puros que se mantienen conservados en Agar, y busca potenciar metabólicamente al hongo para que se encuentre en condiciones ideales y así poder crecer eficientemente en los sustratos de producción. Es una etapa de adaptación (**fase de latencia**) en la que no hay crecimiento aparente, sino más bien síntesis de los componentes celulares necesarios para iniciar la elongación celular. La preparación del inóculo consiste en propagar el micelio en granos de gramíneas,

principalmente sorgo o trigo, u otros como centeno, cebada, avena mijo y arroz, los cuales son lavados y auto clavados en frascos de vidrio o bolsas de polietileno.

- **Selección de sustratos:** Los sustratos son la fuente de nutrientes que el hongo va a necesitar para un buen desarrollo. Algunos de los sustratos más utilizados son las pajas de cebada, trigo, centeno, avena, y otros como residuos de la agroindustria como cascarilla de café, cacao, entre otros. Esta etapa se realiza diferentes combinaciones de los sustratos para incrementar la producción de hongos. Estos sustratos son empaquetados en bolsas de polietileno y son esterilizados mediante vapor o por inmersión en agua caliente. Una vez esterilizado el sustrato, estará listo para ser sembrado con la semilla.
- **Inoculación:** Consiste en adicionar la semilla del hongo al sustrato ya preparado y estéril.
- **Incubación:** Es la etapa donde el micelio invade totalmente el sustrato en condiciones de oscuridad, temperatura alrededor de 23-28°C, humedad de 70-80%, características que pueden variar dependiendo de la especie. En esta etapa se presente una **fase de crecimiento lineal**, donde el hongo después de que se ha adaptado al medio, se encuentra en la capacidad de aprovechar al máximo las condiciones que el sustrato le da. Esta etapa es utilizada para medir cualitativamente el crecimiento micelial del hongo y comparar diversos sustratos con diferentes formulaciones de carbono, nitrógeno y otras variables.
- **Fructificación:** Una vez el micelio invade el sustrato, se observará primordios, los cuales formarán el basidioma. Para esta fase, es necesario cambiar las condiciones de cultivo, aumentando la humedad relativa y las condiciones de luminosidad para inducir la formación de basidiomas o setas. En esta fase se puede calcular el rendimiento del sistema de cultivo de hongos comestibles, así como la eficacia biológica y la tasa de producción.
- **Cosecha:** Es la etapa donde se realiza la recolección de los cuerpos fructíferos o basidiomas. Habitualmente, se recogen mínimo tres cosechas.

1.5.2 Fermentación en estado líquido (FEL)

Los microorganismos se desarrollan flotando en el medio de cultivo y en el caso de los hongos, estos pueden formar pequeñas esferas de micelio denominadas «pellets» cuando hay agitación, de otra forma, crecen en la superficie. “En hongos, estos pellet son masas

esféricas o elipsoides, los cuales presentan cuatro regiones: i) Una región central compacta, que presenta un medio semi-anaerobio con muy poca viabilidad (R1), ii) Una capa que rodea la región central, con hifas de pared irregular (R2), iii) Una región de hifas huecas con claros signos de autólisis (R3) y iv) una zona peluda externa de hifas, las cuales son viables y metabólicamente activas (R3)” (Espinosa-Ortiz et al., 2015) (Figura 1-5). El control de la morfología de los pellets es indispensable, para la producción de metabolitos, por ejemplo, para la producción de penicilina por parte de hongos microscópicos, es indispensable micelios libres o para la producción de ácido cítrico se prefieren pellets o células inmovilizadas (Papagianni, 2004). Por lo tanto, la FEL se ha utilizado para la producción de una variedad de compuestos como polisacáridos intra o extra celulares, terpenos u otros compuestos (S. N. Chen, 2009; Shiono, Hiramatsu, Murayama, Koseki, & Funakoshi, 2008) y su producción y rendimiento dependerán de las características del micelio así como del sustrato en donde se desarrolle. Además, La FEL se ha utilizado para la producción de micelio, en un periodo más corto y con mayor rendimiento, para sustituir la etapa de elaboración de semilla en la FES (Abdullah, Ismail, Johari, & Annuar, 2013). En la FEL el desarrollo del organismo se presenta de una forma típica, dando origen a una fase de latencia, una de crecimiento (fase logarítmica), una fase estacionaria y, la última, la fase de muerte. La FEL a su vez puede dividirse en continua, por lote, y alimentada, según la entrada y salida tanto del sustrato como del producto, respectivamente (Papagianni, 2004).

Figura 1-5: Regiones de un pellet de hongo



Tomado de Espinosa-Ortiz et al. 2015

1.6 Valor nutricional de macromicetos

El valor nutricional de los hongos comestibles ha generado un interés particular para la optimización de su cultivo, con el fin de proporcionar alternativas alimenticias libres de fertilizantes y conservantes; así como una alta producción de proteínas, nutrientes importantes para el enriquecimiento de la dieta humana y la constitución de los tejidos de cuerpo. Según reportes, el contenido proteico de los hongos va de 3- 7% (frescos) a 25-40 % (secos), valores muy parecidos al maíz, la leche y legumbres (Cardona et al., 2002; Tibäck & Tibäck, 2016), lo que los hace un gran sustituto de la carne cuando la dieta no incluye mucha proteína animal. Además contienen lípidos y cenizas en valores de 20-30 y 80-120 g/kg en materia seca, respectivamente (Feeney & Miller, 2014). Uno de los minerales más representativo es el potasio (Heleno et al., 2015) y el contenido de grasa es bajo, en un rango de 20 y 30 g/kg . Varios ácidos grasos han sido identificados en macromicetos, representados por el ácido oleico y linoleico. Este último, precursor de compuestos volátiles que genera una variedad de aromas característicos en estos organismos (Hung, Lee, & Bennett, 2015). Estos compuesto volátiles utilizados como marcadores quimiotaxonómicos o como compuestos bioidénticos en la industria de alimentos. Además, presentan un contenido de ácido ascórbico de 150-300 mg/kg y otras vitaminas del grupo B (Kalač, 2013).

1.7 Compuestos bioactivos de macromicetos

Los macromicetos, entre los diversos organismos, son una fuente importante de metabolitos secundarios activos (Liu, 2007). Entre la diversidad de especies, los basidiomicetos se consideran la mayor fuente de productos naturales biológicamente activos. Dada a la adaptabilidad que han tenido a los diferentes climas, hábitats y sustratos han desarrollado una diversidad química de metabolitos, por lo que existe una diferencia biogenética con los metabolitos producidos por los actinomicetos o mixobacterias (Schuffler & Anke, 2009). Pero existe alguna similitud con los productos de las plantas, especialmente con respecto a algunos policétidos, acetilenos y sesquiterpenoides. Dentro de los metabolitos secundarios de macromicetos se destacan los policétidos, terpenoides y compuestos heterocíclicos (jian jiang Zhong and Xiao 2009). Los polisacáridos, aunque no son metabolitos secundarios se consideran como compuesto activos con una gran variedad de efectos comprobados.

1.7.1 Compuestos Heterocíclicos

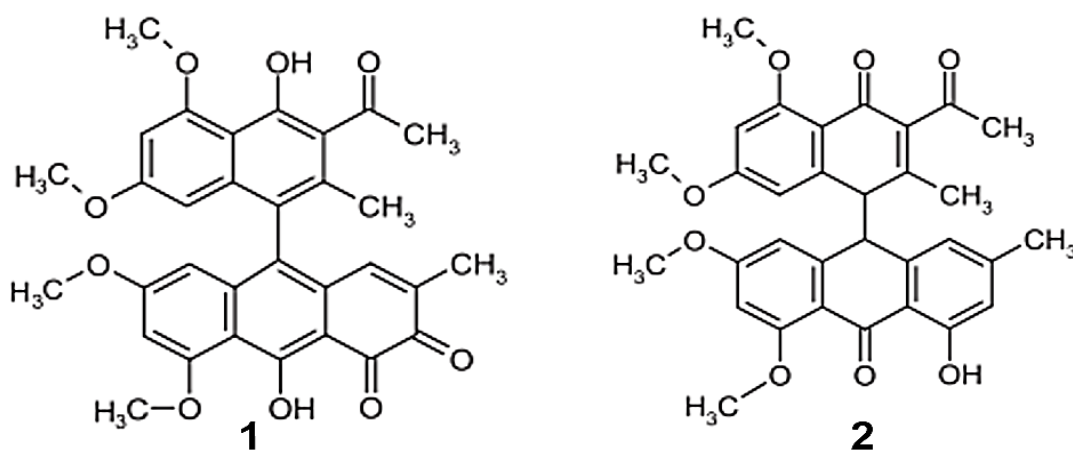
Son compuestos cíclicos, cuyos anillos están formados por uno o más átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre. Constituyen un tercio del número total de productos orgánicos naturales conocidos, tales como vitaminas, antibióticos, alcaloides, así como productos farmacéuticos, herbicidas, colorantes y otros productos de importancia técnica (Dyker, 2002; J. Zhong & Hui, 2009). De *Daldinia concentrica*, se ha aislado un nuevo compuesto llamado Concentricolide, el cual exhibe una actividad significativa antiviral contra VHI-1 (C. W. Chang & Chein, 2011). Muchos otros compuestos aislados de hongos como *Suillus granulatus*, *Xilaria sp*, *Tuber indicum*, *Lactarius rufus*, *Paxillus pamoides*, *Poria cocos*, presentan actividad antioxidante, anticancerígena, antiviral, antibacteriana y antifúngica (J. Zhong & Hui, 2009).

1.7.2 Policétidos

Estos compuestos son una familia de productos naturales hechos por la condensación modular de monómeros de acil-CoA, como acetil-CoA o propionil-CoA o metilmalonil-CoA, cuya descarboxilación induce la reacción de condensación. El nombre de condensación surge porque los productos de condensación primaria tienen grupos funcionales β -ceto (Ridley & Khosla, 2009). Los productos de esta vía, incluye compuestos de origen de ácidos grasos y tetra, hepta, octa y cétidos superiores (Velíšek & Cejpek, 2011). Para los cétidos aromáticos, la cadena en crecimiento se estabiliza por las reacciones de ciclación y reducción parcial, mientras que para los ácidos grasos, los grupos carbonilo de la cadena se reducen antes de la fijación del siguiente grupo carbono dos. Sin embargo, un estudio muestra cómo se producen este tipo de compuestos, pues poco se sabe sobre la biosíntesis de policétidos en basidiomicetes (Lackner, Bohnert, Wick, & Hoffmeister, 2015). Los hongos contienen una gama de pigmentos de origen octacétido (por ejemplo, antraquinonas), y en muchos casos estas antraquinonas se encuentran de la forma reducida (antranol, antranona, antrahidroquinona y derivados de oxantrona) (Velíšek & Cejpek, 2011). Estos compuestos son una de las fuentes medicinales más abundantes que muestran un gran potencial uso para efectos terapéuticos así como antibióticos, anticancerígenos, antifúngico, hipolipidémico e inmunosupresivos. Una investigación reciente del extracto de acetato de etilo del macrohongo *Cortinarius purpurascens*, permitió

la identificación de nueve antraquinonas-pigmentos, de los cuales dos compuestos Rufoolivacin C y Verbindung cr11 (Figura 1-6), exhibieron potencial antioxidante con el radical DPPH y mostraron una IC50 en un rango de 3-8 µg/ml (Bai, Wang, Zong, Lei, & Gao, 2013). Otro compuesto es la lovastatina, el cual se ha logrado extraer de dos especies comerciales de *Pleurotus*, y su producción depende de diferentes factores como temperatura, pH, periodo y medio de incubación.

Figura 1-6: Antraquinonas aisladas de *Cortinarius purpurascens*.



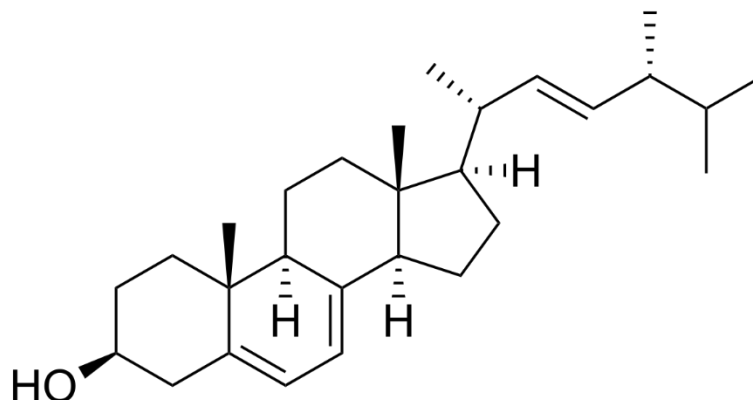
Rufoolivacin C (1), Verbindung cr11 (2). Tomado de Bai, Wang, Zong, Lei, & Gao, 2013

1.7.3 Terpenos

Estos compuestos son conocidos como una importante variedad de metabolitos bioactivos de origen natural producido por muchas especies de macrohongos, especialmente diterpenos, triterpenos y sesquiterpenos (Schuffler & Anke, 2009). Muchos de estos han sido detectados y aislados en diferentes screening, dado a sus actividades antibióticas y citotóxicas. Un ejemplo de ello, son los protoiludanos, como el ácido lentinélico producido por *Lentinus omphalodes* y *L. ursinus*, para el cual se ha demostrado actividad bactericida (Leon, 2004). Del cultivo en medio líquido de micelio de *Coltricia sideroides* mediante extracción con acetato de etilo se han aislado tres nuevos sesquiterpenos, los cuales mostraron citotoxicidad en líneas celulares cancerígenas (Hu et al., 2015). La Erygiolide A, un diterpenoide macrocíclico aislado del cultivo sólido de *Pleurotus eryngii*, mostró actividad citotóxica sobre dos líneas celulares cancerígenas (S. Wang et al., 2012).

También, del cultivo en medio líquido de una especie de *Armillaria sp*, dos compuestos de tipo terpenoide aislados mostraron actividad antimicrobiana (Kobori et al., 2015). Dentro de este grupo, también se encuentran los esteroides, los cuales derivan del 1.2-ciclopentano-fenanreno con diferentes esteroquímicas en las uniones de sus anillos. Tienen funciones estructurales como constituyentes de las membranas celulares, precursores de otros esteroides, transducción de señales y lipidación de proteínas. Los esteroides fúngicos se caracterizan por tener un sustituyente 3β hidroxilo, un grupo β -metil en C-10 y otro en C-13; y una cadena lateral de 8 a 10 átomos de carbono en el C-17. El núcleo es plano y rígido con su cadena lateral flexible en configuración (Landa, 2013). El principal esteroide en hongos es el Ergosterol (Figura 1-7), precursor de la vitamina D2 y utilizado en la producción de cortisona y progesterona (Jasinghe & Perera, 2005).

Figura 1-7: Molécula de Ergosterol



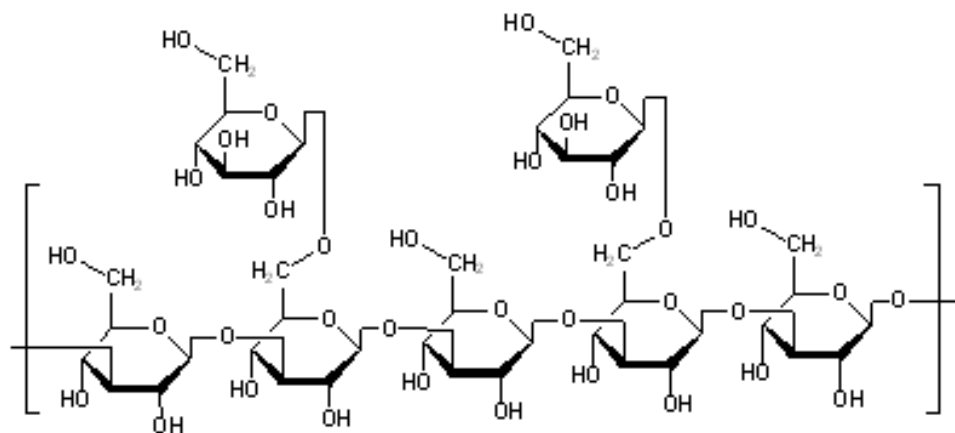
Tomado de Jasinghe & Perera, 2005

1.7.4 Polisacáridos

La pared celular de los hongos, es una matriz extracelular, que cumple la función de protección ante los cambios osmóticos y el estrés ambiental; y determina la forma de la célula fúngica. La glucosa es el carbohidrato más abundante y ampliamente distribuido en las paredes celulares fúngicas, y su organización en bloques puede generar la formación de diferentes heteropolisacáridos y homopolisacáridos que reciben el nombre genérico de glucanos (Ruiz-herrera, 1991). Estos componentes junto con las glicoproteínas y la quitina dan la rigidez de la pared celular fúngica.

Los glucanos de hongos han sido clasificados en dos grupos, de acuerdo al tipo de enlace: β y α glucanos. Los α -D- glucanos presentan enlaces de tipo (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6) y (1 \rightarrow 4). El rol de estos α glucanos en la biología de los hongos superiores es totalmente desconocido. Sin embargo, se sabe que la exposición de α (1 \rightarrow 3) glucanos durante la formación de conidios de *A. fumigatus*, un hongo microscópico; promueve la agregación y desarrollo de los tubos germinales (Bergter & Figueiredo, 2014). La estructura química de los alfa-D- glucanos pueden ser variables, y no sólo han sido aislado de hongos microscópicos sino se ha reportado en el micelio y cuerpos fructíferos de varias especies de macromicetos como: *Ganoderma tsugae*, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus eryngii*, *Lentinula edodes*, *Piptoporus betulinus*, entre otros (Synytsya & Novák, 2013). Sin embargo, son los β - glucanos los más estudiados dados a sus efectos inmunomoduladores. Estos pueden estar en forma lineal o no lineal mediante enlaces β (1 \rightarrow 3) o β (1 \rightarrow 4). El lentinano (Figura 1-8), aislado de *Lentinus edodes* es uno de los compuestos más representativos de este grupo. Su estructura primaria es un (1 \rightarrow 3) β -glucano que consta de cinco residuos de (1 \rightarrow 3) β - glucosa en una unión lineal y dos (1 \rightarrow 6) β -glucopiranosido en las cadenas laterales que le dan un forma de triple hélice (Zhu, Du, Bian, & Xu, 2015).

Figura 1-8: El lentinano, un β -glucano aislado de *L. edodes*



Tomado de Zhu, Du, Bian, & Xu, 2015

Las características fisicoquímicas exhibidas por los β -glucanos se basan en la naturaleza y la estabilidad de su conformación estructural (Antony bacic, Fincher, & Stone, 2012). Estos β -glucanos exhiben una amplia gama de actividades que dependen de la química y el tamaño molecular, su origen biológico y la metodología de extracción. Esta combinación de variables junto con las diferencias en el tipo de enlace y de ramificación, influencia el

tamaño de la moléculas, su estructura terciaria, su carga eléctrica, su conformación en solución (hélice triple o simple, o espiral aleatoria y sus propiedades de solubilidad que conduce a una diversidad de comportamiento y debates sobre las propiedades físicas y químicas que han de considerarse (Antony bacic et al., 2012). La solubilidad en agua de estos componentes está asociada a su estructura, aumenta con la temperatura y la introducción de grupos iónicos con grados de sustitución apropiados, tiene influencia directa sobre las bio-actividades reportadas (Zhu et al., 2015). Por ejemplo, el rango 2:3 de enlaces 1→3 y 1→6, de un β-glucano aislado de *Acremonium*, afecta su solubilidad haciéndolo insoluble en agua, mientras que otros como esquizofilano, escleroglucano y lentinano (β-glucanos aislado de macromicetos) con una proporción de 1:3 de esos enlaces, son solubles en agua (Antony bacic et al., 2012). Los β-glucanos unidos a proteína son insolubles, y después de la hidrólisis parcial estos pueden producir geles. Sin embargo, se puede decir que los β-glucanos encontrados en macrohongos presentan en parte β-glucanos solubles y parcialmente insolubles (Rop et al., 2009) (Tabla 1-3).

Tabla 1-3: Contenido de β-glucanos y porcentajes de acuerdo a la solubilidad en especies de *Pleurotus* y *Lentinus*.

Macromiceto	Contenido total de β-glucanos	β-glucanos Solubles %	β-glucanos Insolubles %
<i>Pleurotus ostreatus</i>	38	37.8	62.2
<i>Pleurotus eryngii</i>	38	16.8	83.2
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	53	18.7	81.3
<i>Lentinus edodes</i>	22	46.1	53.9

Tomada de Rop, Mlcek, and Jurikova 2009

1.7.4.1 Obtención de β-D-glucanos de macromicetos

Los β-D-glucanos producidos por los macromicetos se han obtenido de las paredes celulares tanto de los basidiomas, los cuales han sido recolectados en su ambiente natural o cultivado en sustratos sólidos agroindustriales; del micelio cultivado en medio líquido o recuperados del medio líquido (exopolisacáridos). Diversas investigaciones reportan la producción de β-D-glucanos tanto en medio sólido como líquido, dado a que una eficiente

producción de biomasa y de los metabolitos de interés depende en gran medida de las fuentes de nutrientes, su composición y un adecuado balance entre las mismas (Torres López, Quintero Díaz, & Atehortua Garcés, 2011). La relación de carbono-nitrógeno (C/N) afecta directamente la formación de micelio y del basidioma; diversos estudios proponen que la relación C/N óptimo depende de cada especie de hongo. Niveles altos de nitrógeno pueden afectar la producción de basidiomas. Otras variables pueden afectar la producción de basidiomas y micelio como la temperatura, pH, humedad, aireación y luz (S. Chang, 2009). Sobre el efecto del sustrato en la producción de metabolitos de interés, se reporta que no existen efectos para la producción de intra y exopolisacáridos (Vieira, Liebl, Tavares, Paulert, & Smânia, 2008), sin embargo otros autores proponen que si existe una variabilidad en el rendimiento de estos compuestos frente a la fuente de carbono utilizada (Zapata et al., 2007). Otros reportes indican que la producción de metabolitos dependerá de la cepa utilizada, y de la edad del basidioma evaluado. Por lo tanto, diversas técnicas para la obtención de β -glucanos se han estandarizado con el fin de obtener estos compuestos de una manera eficiente y con actividad biológica.

1.7.4.2 Métodos convencionales de extracción

La identificación, caracterización, purificación y aislamiento de β -glucanos de los basidiomas o biomasa micelial de macromicetos involucra una serie de pre-tratamientos y métodos convencionales o avanzados para su extracción y caracterización. Tanto los basidiomas como el micelio, son secados a temperatura de 30°C y liofilizados. El material se tritura en partículas muy finas para permitir una mejor extracción con el disolvente. Se realiza un desengrase de la muestra mediante solventes apolares para una mejor extracción de los componentes de interés, en especial facilita la completa separación de polisacáridos de otros compuestos que pueden estar presentes (Villares, Mateo-Vivaracho, & Guillamón, 2012). La metodología de extracción se basa en la solubilidad de β -glucanos en agua y en soluciones alcalinas.

La extracción de la fracción de polisacáridos puede realizarse mediante Soxhlet o percolación. Sin embargo, otras metodologías se han utilizado como ultrasonido, fluidos supercríticos y extracción asistida por microondas (Zhu et al., 2015). Se reporta la utilización de solventes polares como agua a temperatura ambiente o caliente y etanol para la extracción de la fracción de polisacáridos. Dependiendo del objetivo de estudio, esta

extracción se realiza varias veces hasta agotamiento de la muestra. Después, se realiza una centrifugación y el sobrenadante se extrae con agua fría. Esta extracción con agua fría permite separar otros compuestos como fenoles, heteropolisacáridos y glicógenos. El residuo se extrae con agua hirviendo y nuevamente se realiza la centrifugación (Ruthes, Smiderle, & Iacomini, 2015). Sin embargo, Mizuno y colaboradores en Japón (Mizuno et al., 1984), desarrollaron un procedimiento para la extracción de polisacáridos. En general, se propone la eliminación de sustancias de bajo peso molecular del material fúngico utilizando etanol a 80%, seguida de extracciones sucesivas con agua a 100°C, 3h y luego extracción alcalina (S. Wasser, 2003). El residuo que queda de la extracción acuosa posteriormente puede ser extraída con soluciones acuosas básicas como NaOH o KOH a 100°C; sin embargo, estas condiciones pueden variar, por ejemplo Mizuno (Mizuno et al., 1984), propone 2% de oxalato de amonio (100°C, 6h) y 5% de hidróxido de sodio (80°C, 6h). El residuo se separa por centrifugación y el sobrenadante da lugar al extracto alcalino (polisacáridos insolubles).

1.7.4.3 Técnicas de Cuantificación

Existen diversas técnicas para cuantificar el contenido de β -glucanos. Entre estas técnicas se encuentra: el método enzimático o de McCleary (Kit Megazyme); el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas mediante ELISA; método fluorimétrico con azul de anilina (microensayo por fluorescencia para cuantificar beta-glucanos con enlaces tipo 1 \rightarrow 3 comparado con un estándar 1,3 β -glucano) y el método colorimétrico con Rojo Congo. Inicialmente se puede realizar la determinación del contenido total de polisacáridos usando el método de Antrona de un extracto acuoso (Ko & Lin, 2004; Synytsya et al., 2009; S. Wasser, 2003; Zhang, Li, Wang, Zhang, & Cheung, 2011). Pese a una variedad de métodos existentes, cada uno presenta limitantes y ventajas. Por ejemplo, el método inmunológico, presenta una fuerte limitación dado a que los anticuerpos no reconocen al β -D-glucanos de cepas de macromicetos, debido a que son muy específicos para el antígeno; y algunos de los métodos anteriormente mencionados presentan poca reproducibilidad y especificidad (Magda C Semedo & Karmali, 2015).

1.8 Aplicaciones de β -glucanos en la industria de alimentos

Dado a las propiedades físicas y de inocuidad de β -glucanos de macromicetos como la solubilidad en agua, viscosidad y gelación, se ha incrementado su uso para la industria de alimentos (Zhu, Du, & Xu, 2016a) como agentes texturizantes, espesantes, con efectos prebióticos y como fibra en una variedad de alimentos, lo que indica que estos componentes desempeñarán un papel importante en la alimentación dado a las diversas propiedades biológicas que presentan (Tabla 1-4).

Tabla 1-4: Actividades biológicas de β - glucanos aislados de macromicetos

Actividad biológica	β - glucanos de macromicetos	Macromicetos	Referente
Citotoxicidad en linfocitos de sangre humana	β -glucano (PS-I)	<i>Termitomyces heimii</i>	(Manna et al., 2015)
Inmunoterapéutica	Fracción D-glucanos	<i>Grifola frondosa</i>	(Masuda, Nawa, Nakayama, Konishi, & Nanba, 2015)
Modulación de Colesterol	β -glucano	<i>Pleurotus ostreatus</i>	(Caz et al., 2015)
Inmonomoduladora	β -glucano	<i>Ganoderma lucidum</i> y <i>Antrodia camphorata</i>	(W. Wang, Wu, Chen, Liu, & Chen, 2015)
Actividad antioxidante e inmunológica	β -glucano	<i>Entoloma lividoalbum</i>	(Maity et al., 2015)
Propiedades antiinflamatorias	β -D-glucano	<i>Cordyceps militaris</i>	(Smiderle et al., 2014)
antiinflamatoria	β -D-glucano	<i>Pleurotus sajor-caju</i>	(Silveira et al., 2014)
Inhibición de tumores	β -D-glucano	<i>Ganoderma lucidum</i>	(S.-N. Chen et al., 2014)

Antioxidante e inmunoestimulante	β -D-glucano	<i>Russula albonigra</i>	(Nandi et al., 2014)
Antitumoral	Esquizofilano	<i>Schizophyllum commune</i>	(K. Zhong et al., 2013)
Radioprotectivo	β -D-glucano	<i>Ganoderma lucidum</i>	(Pillai, Maurya, Salvi, Janardhanan, & Nair, 2014)
Antialérgico	Pleurano	<i>Pleurotus ostreatus</i>	(Jesenak, Hrubisko, Majtan, Rennerova, & Banovcin, 2014)
Efecto preventivo contra la arterioesclerosis	Ganoderano	<i>Ganoderma lucidum</i>	(Feng, Fang, Qian, & Rong, 2014)
Antitumoral	Grifolano	<i>Grifola frondosa</i>	(Ishibashi, Miura, Adachi, Ohno, & Yadomae, 2001)
Antiviral	Lentinano	<i>Lentinus edodes</i>	(J. Wang, Wang, Xia, Li, & Wang, 2013)
Anticancerígeno	crestina	<i>Trametes versicolor</i>	(Price, Wenner, Sloper, Slaton, & Novack, 2010)
Antitumoral	β -D-glucano	<i>Auricularia auricula-judae</i>	(Misaki, Kakuta, Sasaki, Tanaka, & Miyaji, 1981)

1.8.1 β - glucanos como fibra dietética

La fibra dietética y alimentos ricos en fibra han atraído gran atención dado a sus beneficios para la salud de los consumidores. Los β -glucanos junto con la quitina y otros polisacáridos (mananos) de macromicetos se postulan como nuevas fuentes de fibra dietética, dado a que son carbohidratos no digeribles resistentes a las enzimas humanas y que se encuentran en las paredes celulares de los basidiomas o micelio (Li, Andrews, & Pehrsson,

2002). Existe una gran variación en el contenido de fibra dietética entre diferentes especies de hongos (Tabla 1-5), que son catalogados como comestibles y son cultivados en todo el mundo (Boa, 2005b). La fibra dietética en macromicetos muestra niveles más altos de fibra insoluble (2.28-8.99 g/100 peso seco) que de fibra soluble (0.32-2.20 g/100 peso seco) y los β -glucanos representan del 4% al 13% de la fibra total, que depende de la especie de macromiceto, de la parte del basidioma analizado y la metodología de extracción (Cheung, 2013). Se reporta que el consumo de macromicetos como parte de la dieta podría generar el 25% de los requerimientos nutricionales establecidos para el consumo de fibra dietaría (Cheung, 2008).

Tabla 1-5: Composición de fibra dietética y relación de contenido de β -glucanos (peso seco) en algunos macromicetos.

Macromiceto	Fibra dietaría total (%)	β -glucanos (%)	Referente
Micelio de <i>Ganoderma australe</i>	34.1	8.3	(Papaspnyridi, Katapodis, Gonou-Zagou, Kapsanaki-Gotsi, & Christakopoulos, 2011)
Basidioma de <i>Ganoderma australe</i>	68.9	7.4	
Píleo de <i>P. ostreatus</i>	63.1- 34.5	39.2-27.4	(Synytsya, Míčková, Jablonský, Sluková, & Čopíková, 2008)
Estípote de <i>P. ostreatus</i>	64.8-38.9	50-32.5	
Píleo de <i>P. eryngii</i>	36.7	20.4	
Estípote de <i>P. eryngii</i>	45.7	39.1	
<i>Boletus seco</i>	7.04	0.358	(Manzi, Marconi, Aguzzi, & Pizzoferrato, 2004)
<i>Boletus congelado</i>	2.60	0.245	
<i>Agrocybe aegerita</i>	5.07	0.302	
<i>Pleurotus eryngii</i>	4.64	0.413	
<i>Agaricus bisporus</i>	8.7	0.004	(Manzi, Aguzzi, & Pizzoferrato, 2001)
<i>Pleurotus tuberregium</i>	81.7-96.3	89 -94.5	(Wong & Cheung, 2005)
<i>Polyporus rhinocerus</i>			
<i>Wolfiporia cocos</i>			

La fibra dietética proveniente de macromicetos se ha incorporado en numerosos alimentos por las características deseables que proporciona (textura, gelificante, emulsificante y estabilizante) y con el fin de prevenir ciertas enfermedades. Una reciente Notificación GRAS para la determinación de β -glucanos derivados del hongo *Ganoderma Lucidum*, confirma su uso como ingrediente alimentario en productos horneados, mezclas para hornear, bebidas, cereales, productos lácteos, productos de proteínas vegetales, frutas procesadas, zumos de frutas, caramelos y sopas, con una dosis de 150 mg del extracto de este hongo (FDA, 2011). Dentro de las aplicaciones de β -glucanos como fibra dietética (Tabla 1-6), se destacan diferentes matrices alimentarias las cuales se han adicionado dichos compuestos tales como: snacks (Brennan, Derbyshire, Tiwari, & Brennan, 2013), alimentos sin gluten (Ojico, Ernando, & Ombardia, 2005) bebidas (Pinzon, 2014) y productos cárnicos (Rosli & Maihiza, 2015).

Tabla 1-6. Patentes relacionadas con la adición de β -glucanos en matrices alimentarias

Patente	Autor	Título	Año
ES 2315836	Gabrizova, Leona	Método de preparación de un hidrogel de pleurano	2009
CN102835703	Xu Sixin	Bebida nutritiva: Jugo de fresa (Lentinano)	2012
CN02835702	Xu Sixin	Bebida nutritiva: Jugo de calabaza (Lentinano)	2012
CN102813098	Lin Mingchuan	Jalea picante y método de preparación (Lentinano)	2012
CN102835624	Yin Xinbo	Fideos con Ganoderano	2012
CN103392980	Zhang Xiuping	Pulpa de fruta de Arroz y método de preparación (Ganoderano)	2013
CN 103518842	Lin Mingchuan	Yogurt con miel, <i>Ganoderma lucidum</i> (Ganoderano), frutas y vegetales	2014
CN 104188889	Li Ye	Pasta de dientes con <i>Ganoderma lucidum</i>	2014

CN 103965369	Chen Zhifei	Ganoderma, extracción y método de purificación y aplicación como humectante tabaco	2014
CN 103125604	Liu Hongmei	Leche saludable-inhibición de cáncer (Grifolano)	2014
CN 104642603	Dong Shuge	Té verde con diferentes materiales (Ganoderano)	2015
CN104544088	Mo Chenpeng	Preparación de Coñac y poder del micelio de <i>Ganoderma lucidum</i>	2015
CN104543302	Ren Liangdong	Caramelos blandos enriquecidos con ganoderano	2015
CN 104522874	Lu Yuwen	Atomizador líquido con componentes de <i>Ganoderma lucidum</i>	2015
CN 104432048	Tang Jianfa	Método de preparación de tabletas bucales con <i>Ganoderma lucidum</i>	2015
CN 104432393	Tang Ling	Método de preparación de Bebidas con <i>Ganoderma lucidum</i>	2015
CN 104381717	Guo Junqing	Aditivo para la alimentación joven	2015
CN 104273340	Liang Xuewu	Preparación de Ganoderano para la regulación y el control de la microflora del rumen	2015
CN 104705761	Zhang Tao	Rica bebida con Lentinano	2015
CN 104542590	You Xiaoming	Microemulsión con Lentinano	2015
CN 104397701	Wei Xingping	Aditivo natural hipolipidémico (Lentinano)	2015
CN 104366505	Wei Xingping	Aditivo antioxidante con lentinano	2015

2. *Lentinus crinitus* (L.) Fr y su potencial biotecnológico

Lina R. Dávila G^{2,3}, Walter Murillo A², Jonh J. Méndez A², Héctor Suárez M⁴

2.1 Resumen

Los macromicetos se postulan como nuevas fuentes naturales de compuestos bioactivos como polisacáridos, glicoproteínas, terpenos, ácidos nucleicos y policétidos, de gran interés desde el punto de vista de la farmacoterapia para la prevención y tratamiento de muchas enfermedades, así como su potencial uso en la industria de alimentos, como agentes texturizaste, emulsificantes, con actividad antioxidante y sus efectos antimicrobianos (Koutrotsios, Kalogeropoulos, Stathopoulos, Kaliora, & Zervakis, 2017; Manzi et al., 2001; Zhu, Du, & Xu, 2016b). Además, han sido recolectados y consumidos por el ser humano durante millones de años para la alimentación dado a sus altos contenidos de proteína, fibra y minerales esenciales. Sin embargo, en Colombia, la tradición del consumo de hongos silvestres ha estado ausente en las áreas rurales; pero sobrevive en comunidades indígenas del medio Caquetá con las etnias Uitoto, Andoke y Muinane (Vasco-Palacios, Suaza, Castañó-Betancur, & Franco-Molano, 2008). Aunado a lo anterior, está el hecho de que, pese a la gran diversidad fúngica, la mayoría de los macromicetos colombianos no se conocen aún, ni desde el punto de vista taxonómico y mucho menos del químico y farmacológico, haciendo que todo su potencial, bien sea como alimento funcional o como simple hongo medicinal esté totalmente desapercibido y poco

² Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. Irdavilag@unal.edu.co

³Grupo de Investigación en Productos Naturales-GIPRONUT. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad del Tolima. Ibagué, Colombia

⁴ Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA), Universidad Nacional de Colombia. Bogotá (Colombia).

bioprospectado. Es por esto que se da la necesidad de realizar investigaciones en este campo tan poco explorado. Este trabajo se desarrolló con el propósito de generar nuevos datos sobre el conocimiento taxonómico tradicional y molecular del hongo *Lentinus crinitus* (L.) Fr, buscando conservar el material genético para evaluar su posible potencial biotecnológico. Por lo tanto, se realizó colecta de basidiomas de *L. crinitus* y se aisló micelio vegetativamente, los cuales fueron identificados mediante taxonomía tradicional y molecular. Los basidiomas colectados sirvieron de base para analizar su composición proximal y para realizar un extracto etanólico a una concentración de 2500 mg/L, con el fin de evaluar su potencial antimicrobiano contra agentes patógenos e infecciosos. Además, se evaluó el crecimiento micelial de la cepa obtenida de *L. crinitus*, sobre residuos agroindustriales de la región del Tolima y se realizó un análisis de correlación de Pearson para analizar el efecto de la composición de los residuos sobre la velocidad de crecimiento micelial. Se cultivó micelio mediante fermentación líquida (FEL) y sólida (FES), con el fin de evaluar las características nutricionales de los productos obtenidos (basidiomas, micelio y residuo agotado con micelio). Los resultados mostraron que basidiomas colectados de *L. crinitus* presentan contenidos de proteína de 14.42 %, y de fibra de 57.18%, similares a los contenidos en el micelio obtenido por FEL. No fue posible obtener basidiomas mediante FES. El extracto etanólico de basidiomas colectados evidenció actividad antifúngica con efectos inhibitorios de 60.50%, 48.30 % y 25.84% contra *Aspergillus niger*, *Penicillium sp*, y *Rhizopus oryzae*, respectivamente. Además dicho extracto presentó actividad inhibitoria contra cepas bacterianas como *Bacillus cereus* (48.79 %), *Escherichia coli* (24.56%), *Pseudomonas aeruginosa* (20.25 %) y *Salmonella typhimurium* (24.13%). La evaluación preliminar del crecimiento micelial de la cepa de *L. crinitus* permitió confirmar que puede crecer sobre sustratos agroindustriales y este crecimiento se ve afectado por la composición del sustrato. Los residuos agroindustriales agotados por el micelio mediante FES, aumentaron su contenido de proteína (10.5-11.22%), fibra (44.1-56%) y nitrógeno (1.64-1.28%). Estos avances resultan ser prometedores para la utilización de metabolitos de *L. crinitus* con fines médicos y agrícolas, y su posible utilización como degradador de sustratos agroindustriales para obtener diferentes productos de interés alimentario y agroindustrial.

Palabras clave: Macromicetos, Actividad antimicrobiana, residuos agroindustriales, Fermentación sólida, Fermentación líquida

2.2 INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años se ha incrementado un especial interés por investigar la biodiversidad de especies presentes en variados ecosistemas, con el fin de generar medidas para su conservación y posible uso en diferentes áreas, que aseguran el patrimonio biodiverso de cada nación y la subsistencia del ser humano. Los hongos son el segundo grupo de organismos más diverso después de los insectos, con aproximadamente 1.5 millones de especies, de los cuales sólo se conoce el 4.5% (Mueller et al., 2006) de las especies, por lo tanto, la gran mayoría y sobre todo en ecosistemas tropicales aún son desconocidos. Por ende, los macromicetos se postulan como nuevas fuentes naturales de compuestos bioactivos que se podrían aprovechar para el estudio de la actividad antitumoral, antimicrobiana y el contenido nutricional, generando un campo de gran importancia en el contexto industrial, farmacéutico y agroalimentario.

En Colombia las exploraciones micológicas se han desarrollado en bosques montanos y la mayoría de registros (aproximadamente 83% de las especies) corresponden a unos pocos departamentos de la región Andina (Franco, Corrales, & Palacios, 2010) ; sin embargo, para el Tolima existen pocos registros citados en la literatura (Franco-Molano, Aldana-Gómez, & Halling, 2000; Uribe-meléndez, 1978; Vasco-Palacios & Franco-Molano, 2013); los cuales hacen parte a unas escasas zonas de este departamento. A este poco conocimiento de la micobiota del Tolima se suma la total falta de información sobre sus constituyentes tanto nutricionales como bioactivos, así como la implementación de su cultivo biotecnológico, lo que permitiría encontrar nuevas fuentes alimenticias de bajos costos de producción y con excelentes cualidades, como por ejemplo, altos niveles de proteína que ayuden a solucionar la ingesta deficiente de proteínas de origen animal por parte de muchas de nuestras comunidades rurales o como alternativa para alimento de rumiantes. Cabe anotar que los hongos macromicetos son aportantes no sólo de un muy buen contenido de proteína, sino que la misma es de calidad superior ya que contiene todos los aminoácidos esenciales (Kalač, 2013). Igualmente proporcionan grasas insaturadas conocidas por sus propiedades protectoras del sistema cardiocirculatorio (Sinanoglou et al., 2015). Asociado a lo anterior, esta clase de hongos contienen una muy buena proporción de fibra, que a diferencia de los cereales y dada su estructura química,

exhiben actividad inmunoestimuladora y anticancerígena (Cheung, 2013; Deng, 2013; Lemieszek & Rzeski, 2012).

Este potencial se suma a que dentro de los macromicetos, se encuentran hongos de podredumbre blanca, los cuáles pueden degradar la lignina, dado a la presencia de enzimas como la peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasas (Goodell, Qian, & Jellison, 2008). Diversas investigaciones destacan la capacidad de estos hongos para colonizar una gran variedad de sustratos lignocelulósicos, sirviendo como alternativa para una disposición adecuada de dichos residuos, que en muchas ocasiones son arrojados a la intemperie o son quemados, y dado a su baja degradabilidad natural terminan por acumularse en el ambiente. Por ejemplo, el Tolima por su vocación agrícola es uno de los mayores generadores de residuos de lignocelulosa, siendo el cultivo de arroz el que presenta uno de los mayores aportes con aproximadamente 135.695 Toneladas al año. Además, las actividades residenciales, comerciales e institucionales generan aproximadamente 21.000 toneladas al día de residuos sólidos (Escalante, Orduz, Zapata, Cardona, & Duarte, 2011). La disposición inadecuada de estos residuos sólidos da origen a serios problemas de contaminación de los recursos hídricos y edáficos en los lugares donde se acumulan.

La degradación de residuos agroindustriales utilizando hongos, puede generar diversos productos de valor agregado como la producción de carpóforos o basidiomas, comúnmente llamados como setas (Pandey, 2003; Thomas et al., 2013; Yoon, Ang, Ngho, & Chua, 2014). Dicha producción de basidiomas podría ayudar a solucionar problemas de seguridad alimentaria y nutricional, en especial porque la transferencia de la tecnología puede realizarse a un bajo costo y con diversos beneficios. Por otra parte, los productos de la transformación de los residuos agroindustriales generados por los hongos, presentan un nivel de degradación parcial que facilita su reciclaje e incorporación al suelo, además poseen buen contenido de nitrógeno, fósforo y pH, por lo que pueden ser empleados como abonos orgánicos o como alimentos para animales (Bermúdez, García, Serrano, Rodríguez, & Mustelier, 2014).

A este grupo de hongos, pertenece *L. crinitus*, siendo un representante del grupo morfológico/ecológico “Los poliporos”, y del cual se ha demostrado su potencial como biorremediador de suelos contaminados por hidrocarburos en Sao Paulo, Brasil (K. M. G. Machado, Matheus, Rodrigues, & Bononi, 2006). El análisis proximal ha sido descrito de

basidiomas silvestres colectados en el departamento del Chocó, del cual se reporta y se destaca los porcentajes de proteína con 6.69% y un contenido de calcio de 0.12% (Rios Hurtado & Hicela Mosquera Mosquera, n.d.). Sin embargo, una investigación más reciente evaluó el crecimiento de este hongo sobre exocarpo de cacao (*Theobroma grandiflorum*) mezclado con salvado de arroz con el fin de investigar la composición nutricional y el potencial proteolítico del cuerpo fructífero cosechado (Rita et al., 2015). Pese a estas investigaciones, aún se desconoce, cuál podría ser la relación de la composición química de los sustratos para mejorar el crecimiento micelial, así como el potencial antimicrobiano de extractos crudos de basidiomas colectados y su posible cultivo utilizando técnicas biotecnológicas. Por lo tanto, la siguiente investigación tuvo como objetivo aportar al conocimiento desde la parte taxonómica, así como la información sobre el valor nutricional de basidiomas colectados, de basidiomas generados mediante FES, y micelio obtenido mediante FEL. Así como la transformación de residuos agroindustriales para la obtención de productos de valor agregado.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Colecta de basidiomas

Se realizó un muestreo de campo en un punto geográfico del Cañón del Combeima en el departamento del Tolima, Ibagué, con coordenadas de 4°33'41.68"N- 75°19'34.89"Oa 1900m.s.n.m, con el fin de colectar basidiomas de *L. crinitus* creciendo sobre troncos caídos. Los ejemplares fueron fotografiados *in situ* y retirados con un cuchillo o navaja. Luego, se depositaron en bolsas de papel con su respectivo número de recolecta; libres de detritus, tierra y otros residuos, pero conservando algo del sustrato en el cual crecieron. Se transportaron en canastos de mimbre a un lugar de trabajo cercano, con el fin de realizar la descripción macroscópica basada en guías micológicas (Largent, 1986; Mata & Rivarden, 2010; Rivarden, 1991; Robledo, 2015). Se anotaron datos del lugar como tipo de vegetación, lugar de colecta, fecha, colectores y color. Para este último, se utilizó la guía de colores de Kornerup & Wanscher, 1963. Para la obtención de la esporada se dejó el píleo sobre un papel blanco, con el himenoforo hacia abajo haciendo contacto con el papel, y se cubrió con un recipiente durante 24 horas. Además, se observó y anotó cambios

de color al realizar las pruebas macroquímicas de rutina con hidróxido de potasio (KOH) al 3% y reactivo de Melzer en el píleo, contexto, lamelas y estípites.

2.3.2 Aislamiento de micelio

De dichos basidiomas se obtuvo micelio por aislamiento vegetativo en medio PDA (Agar papa dextrosa) y se caracterizó morfológicamente la cepa teniendo en cuenta el color, textura, tipo de micelio, densidad y confirmación microscópica. La cepa fue almacenada a 4 °C para su posterior uso en la identificación molecular y evaluación de su cinética de crecimiento sobre diferentes residuos agroindustriales. Con el fin de la preservación de la cepa a largo plazo, esta fue guardada en tubos inclinados con medio PDA y agua destilada (Castellani, 1963).

2.3.3 Identificación molecular de basidiomas y de micelio aislado

2.3.3.1 Extracción de ADN

Del micelio obtenido en medio sólido y de basidiomas recolectados se realizó extracción y purificación del ADN. Se tomó 100mg del micelio y del basidioma, los cuales fueron macerados con nitrógeno líquido y depositados en tubos eppendorfs con 450 µl de buffer de lisis (200mM Tris 7.5, 250mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS), posteriormente se agregó 450 µl de cloroformo y se centrifugó a 14.000 rpm por cinco minutos. Se recuperó el sobrenadante y se adicionó 0,5 volúmenes de isopropanol. El contenido se mezcló por inversión durante 30 segundos y se almacenó a -20 °C por 20 minutos. Posteriormente se centrifugó a 14.000 rpm durante cinco minutos. La pastilla de ADN se lavó con 500 uL de etanol a 70%, se centrifugó a 14.000 rpm durante cinco minutos y fue secada a temperatura ambiente en cámara de flujo laminar por un espacio de media hora. El ADN extraído se resuspendió en 100 µl de buffer TE1X + RNAsa (0,75mg/ml) y se incubó durante una hora a 37 °C, seguido del almacenamiento de las muestras a -20 °C. La calidad y la cantidad de ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (w/v) y se visualizó con el colorante gel red en un transiluminador de luz UV, donde se calculó la concentración del ADN total con base a la concentración del ADN del bacteriófago lambda (Biolase).

2.3.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Verificado la pureza del ADN, se realizó reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los marcadores moleculares utilizados para este estudio fueron los ITS4 e ITS5, propuestos por (WHITE, BRUNS, LEE, & TAYLOR, 1990). La reacción y amplificación de los productos de PCR se realizó según lo recomendado por (Sartorato, Nechet, & Halfeld-Vieira, 2006). Los productos de PCR fueron secuenciados en ambas direcciones en la empresa a Macrogen (Corea). Las secuencias consenso (Anexo A y B) se obtuvieron a partir de las dos secuencias complementarias utilizando el programa Geneious®. Las secuencias consenso obtenidas fueron comparadas con las secuencias disponibles en el GenBank del NCBI, mediante el uso del algoritmo Blast N. Tanto la extracción de ADN y la PCR, se realizaron en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Manizales.

2.3.4 Extracto etanólico de basidiomas colectados

Los basidiomas colectados fueron lavados y sometidos a desecación en una estufa (Memmert) a 40 °C. Estos basidiomas se trituraron con nitrógeno líquido, se pesaron 10 g y se realizó desengrase con éter de petróleo. Luego, se realizó extracción mediante percolación, empleando etanol al 96%. A este extracto etanólico se le identificó cualitativamente grupos funcionales de metabolitos. El extracto obtenido se filtró y se concentró en un rotaevaporador (Buchi) a presión reducida hasta el mínimo volumen a 40°C y 60 rpm. Este extracto crudo se resuspendió en agua desionizada estéril y se preparó una concentración de 2500 mg/L con el objetivo de evaluar la actividad antimicrobiana.

2.3.5 Identificación de grupos funcionales de metabolitos

Del extracto etanólico obtenido de los basidiomas de *L. crinitus*, se les realizó pruebas químicas cualitativas preliminares, siguiendo las metodologías descritas por Murillo & Méndez, 2003, para identificar los principales grupos funcionales de metabolitos: carbohidratos, saponinas, polifenoles, taninos, flavonoides, antraquinonas, terpenos y alcaloides.

2.3.6 Actividad preliminar de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de basidiomas de *L. crinitus*

2.3.6.1 Actividad antibacteriana

Se utilizaron las cepas *Escherichia coli* (ATCC25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Bacillus cereus* (NCIMB7464) y *Salmonella typhimurium* (Salmonella entérica) (NCTC6017). La determinación se realizó por el método de microdilución en caldo nutritivo BHI (Merk®) (infusión cerebro-corazón) (CLSI, 2012). Se realizó una curva concentraciones con 6 réplicas por cada una, evaluando el efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano a través de una concentración (2500 mg/L) del extracto etanólico obtenido de basidiomas colectados de *L. crinitus*. Los ensayos se efectuaron en microplacas de 96 pozos. Para el llenado de cada pozo, se tomó 50 µL del inóculo del patógeno bacteriano ajustado a 0,5 en la escala de McFarland, 100 µL de medio líquido y 50 µL del extracto. Al control de crecimiento del patógeno (Control negativo) se adicionó, 100 µL de medio, 50 µL del inóculo y 50 µL de agua estéril. Se emplearon controles de contaminación, los cuales incluyeron 200 µL de medio. Finalmente todo se incubó a 37°C en un periodo de 24 Horas. El crecimiento bacteriano fue evaluado espectrofotométricamente, midiendo los valores de absorbancia cada 12 horas a 460nm mediante un lector de microplacas UV/VIS Multiskan® GO (Thermo scientific). Para determinar el % de inhibición del crecimiento, se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$\text{Tasa o velocidad de crecimiento (TC)} = \frac{\text{Abs Final} - \text{Abs Inicial}}{\text{Tiempo Final} - \text{Tiempo inicial}} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\% \text{ crecimiento} = \frac{\text{TC de la bacteria + extracto}}{\text{TC del control negativo}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \% \text{ de crecimiento} \quad \text{Ecuación 3}$$

2.3.6.2 Actividad antifúngica

Las cepas utilizadas para este ensayo fueron: *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* sp, *Rhizopus oryzae* y *Aspergillus niger*. La determinación se realizó por el método de microdilución (CLSI, 2009), teniendo en cuenta las mismas consideraciones que en el ítem anterior con algunas modificaciones: utilizando caldo Sabouraud (Merk®) para cada inóculo. Se prepararon suspensiones de esporas de los patógenos a una concentración

de 1×10^4 conidias/mL. El crecimiento micelial fue evaluado espectrofotométricamente, midiendo los valores de absorbancia cada 24 h, a una densidad óptica de 595 nm. El porcentaje de inhibición se realizó utilizando las formulas anteriores.

2.3.7 Evaluación preliminar del crecimiento micelial de *L. crinitus* sobre los sustratos

2.3.7.1 Sustratos

Se utilizaron tres tipos de sustratos generados de la agroindustria del Tolima: Cascarilla de arroz (CA), Cáscara de Naranja (CN) y Salvado de arroz (SA). Dichos sustratos fueron secados a 48 h, 40 °C (*Memmert*). Posteriormente se trituró cada uno de los materiales hasta obtener un tamaño de partícula de 0,1 mm de diámetro. Se realizaron siete tratamientos combinando dichos sustratos, para determinar el crecimiento micelial (Tabla 2-1).

Tabla 2-1: Diferentes combinaciones de los sustratos

Tratamiento	Sustrato
T1	Salvado (SA)
T2	Cáscara de Naranja (CN)
T3	Cascarilla de Arroz (CA)
T4	CA+ SA
T5	CA+ CN
T6	CN+ SA
T7	CA+ CN+ SA

2.3.7.2 Determinación del crecimiento micelial sobre residuos agroindustriales

De la cepa almacenada de *L. crinitus*, se repicó micelio en nuevo medio de PDA, con el objetivo de activar el micelio. El crecimiento micelial de la cepa se estudió sobre las combinaciones de sustratos anteriormente mencionadas. El ensayo consistió en utilizar 200 g del sustrato y 15 g de agar en un litro de agua desionizada con ajuste de pH 6. Los medios fueron autoclavados a 120 °C y 1 atm de presión, durante 20 min. Estos se sirvieron en cajas de Petri, con un volumen de 20 ml. Las cajas se inocularon con implantes de 5 mm de diámetro de micelio y se incubaron a 28 °C, hasta que el micelio invadió totalmente la caja. Los ensayos se realizaron por triplicado y el crecimiento de la cepa en los siete tratamientos y en cada una de sus réplicas, fue estimado en base a su diámetro a diferentes tiempos. El diámetro se midió en diferentes ángulos de 0°, 45°, 90° y 135°, tomando como intersección el centro del inóculo (Martínez et al., 2015).

2.3.8 Cultivo de *L. crinitus* mediante fermentación sólida y líquida

De la evaluación preliminar del crecimiento micelial de *L. crinitus* sobre los sustratos, se escogieron los tres mejores tratamientos, para realizar fermentación líquida y sólida.

2.3.8.1 Fermentación sólida

Se reactivó micelio de la cepa de *L. crinitus* en medio PDA, una vez invadido toda la caja, se tomaron tres discos de 5 mm y se inoculó asepticamente sobre granos de trigo, previamente lavados, hidratados y esterilizados en frascos con tapones. Los frascos fueron incubados a oscuridad a 25-28 °C, con humedad relativa entre 70-80%, hasta que el micelio invadió toda la semilla. Esta semilla, se utilizó como inóculo para ser sembrada sobre los sustratos. Se escogieron tres combinaciones del sustrato y se realizaron cuatro réplicas. Para cada combinación del sustrato se hicieron controles sin inocular el sustrato y se sometieron a las mismas condiciones experimentales. Estos sustratos fueron secados, y cortados a un tamaño de partícula de 2 cm. A los sustratos se les adicionó agua hasta alcanzar una humedad del 60%. Estos sustratos, 300 g de cada combinación, fueron empacados en bolsas de polipropileno y fueron autoclavados a 120 °C y 1 atm de presión, durante 120 min. Una vez las bolsas presentaron una temperatura de 28-30°C, se inocularon con 5% de la semilla de trigo invadida con la cepa de *L. crinitus*. Las bolsas

fueron cerradas, se les colocó un anillo de PVC con un tapón de algodón para permitir el intercambio gaseoso y fueron incubadas a total oscuridad, a 25-26°C (Gaitan-Hernandez et al., 2006; A. R. G. Machado, Teixeira, de Souza Kirsch, Campelo, & de Aguiar Oliveira, 2015; Nasehi, Torbatinejad, Zerehdaran, & Safaie, 2017; Sánchez & Royse, 2001). Una vez el micelio invadió totalmente el sustrato, las bolsas fueron llevadas a diferentes condiciones para estimular la fructificación, 85-95% humedad, con 12 horas de iluminación y temperatura de 15-18°C (Gaitan-Hernandez et al., 2006). Se evaluó la aparición o ausencia de basidiomas producidos en cada bolsa, con cada tratamiento y replica. El residuo agotado por el micelio de *L. crinitus*, fue almacenado a 4°C para su posterior uso.

2.3.8.2 Fermentación líquida

Se escogieron tres combinaciones de los sustratos, se realizaron dos replicas por cada tratamiento y tiempo para la cuantificación de biomasa micelial (4, 8,16 y 20 días), y se adicionó otro tratamiento el cual solo contenía caldo saboraud. Estos sustratos fueron triturados en un molino eléctrico, hasta obtener un tamaño de partícula de 0.1 µm. Se utilizaron erlenmeyer de 250 -300 ml, con 150 ml de agua estéril y 6 gramos para cada tratamiento, se ajustó el pH a 6.0. A estos frascos se les colocó tapones de algodón y fueron autoclavados a 15 lb, durante 60 minutos. Una vez presentaron una temperatura de 25 a 28°C, se inocularon 3 cuadrantes de 5 mm del micelio de *L. crinitus*. Estos frascos fueron agitados a 200 rpm, por 20 días. Se midió la producción de biomasa micelial durante 20 días, a diferentes tiempos. Dicha biomasa micelial, se cuantificó utilizando el método del peso seco. La biomasa micelial fue filtrada y el micelio fue lavado con abundante agua destilada para remover las partículas de material insoluble, después las muestras fueron depositadas en caja de petri y secadas en horno a una temperatura de 60 °C durante 72 horas hasta peso constante, los resultados fueron registrados en g (Zapata-ocampo & Rojas-vahos, 2010). Además, el micelio obtenido a los 20 días fue almacenado a 4°C para su posterior análisis.

2.3.9 Análisis proximal

A los basidiomas colectados, al micelio obtenido por fermentación líquida, al residuo agotado con el micelio, y a los residuos agroindustriales utilizados, se les realizó un análisis bromatológico mediante las determinaciones de ceniza, humedad, extracto etéreo,

proteína total, fibra cruda, minerales menores y mayores, en el laboratorio de servicios LASEREX de la Universidad del Tolima, siguiendo los protocolos de la AOAC.

2.3.10 Análisis estadístico

Para analizar la cinética preliminar de crecimiento micelial y la ganancia de biomasa micelial sobre cada uno de los tratamientos, se realizó un análisis múltiple de regresión lineal, para comparar las pendientes de cada tratamiento. Para comprobar diferencias significativas entre las medias de los tratamientos se utilizó la prueba de rangos múltiples Bonferroni. Para la determinación de la actividad antimicrobiana del extracto se determinó el % de inhibición, con su respectiva desviación estándar. Estos análisis se realizaron utilizando el programa Statgraphics centurión XVI.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Descripción taxonómica de los basidiomas

***Lentinus crinitus* (L.) Fr**

Syst. orb. veg. (Lundae) 1: 77 (1825)

= *Agaricus crinitus* L. 1763

Basidiocarpio de 1.2- 5 cm de diámetro, 1.1 -3 cm de longitud. Infundiliforme, depresso, superficie vilosa, de color naranja grisáceo (5B4) y en el centro vellosidades color café oscuro (6F7). Contexto <1 mm, color blanco, margen ondulado. Lamelas color naranja grisáceo (5B5) apretadas, decurrentes, onduladas. Estípite central 1.3- 4.5 cm de largo, 0.1-0.5 cm de diámetro con vellosidades a escamas, diferenciándose en puntos en los más viejos, de color café rojizo marrón (6F7).

Sistema hifal: dimitico, hifas generativas simples con septos fibulados de 3,16-4,59 μm de diámetro, hialinas. Hifas esqueletoligadoras, hialinas, de pared gruesa, de 4,17-7-19 μm de diámetro.

Cistidios: Queilocistidios presentes, sinuosos a nodulosos.

Basidios: Clavados, con 4 esterigmas.

Basidiosporas: Cilíndricas, hialinas y lisas. De 6,79 μm x 2,58 μm .

Ecología y distribución: Gregarios, creciendo sobre troncos muertos (Figura 2-1). Pudrición blanca.

Figura 2-1: Basidiomas de *L. crinitus* creciendo sobre troncos muertos



2.4.2 Morfología del micelio obtenido

El micelio obtenido mostró una textura algodonosa y compacta, de color blanco con tonos color café al pasar el tiempo, su densidad fue regular y con micelio aéreo ausente (Figura 2-2).

Figura 2-2: Micelio aislado de basidiomas colectados



2.4.3 Confirmación molecular de basidiomas y micelio de *L. crinitus*

El análisis con Blast, de las secuencias consenso obtenidas tanto del basidioma como del micelio, confirmaron la información dada por taxonomía tradicional, al obtener como primero hits los valores de identidad >98% y valores E: 0.0, correspondientes con secuencias de *L. crinitus* almacenadas en el GenBank (Tabla 2-2).

Tabla 2-2: Resumen de los resultados del BLAST

Muestra	Longitud de la secuencia (bp)	% Cobertura	Valores E	% Identidad (n° accesión)	Nombre identificado
Micelio	661	81	0.0	98 (GU207295.1)	<i>Lentinus crinitus</i>
Micelio	661	86	0.0	98 (KX065949.1)	<i>Lentinus crinitus</i>
Basidioma	695	94	0.0	98 (KX065949.1)	<i>Lentinus crinitus</i>
Basidioma	695	89	0.0	99 (GU207295.1)	<i>Lentinus crinitus</i>

2.4.4 Identificación de grupos de metabolitos

Al realizar el análisis fitoquímico del extracto etanólico de basidiomas colectados, se comprobó la presencia de carbohidratos, polifenoles, antraquinonas y terpenos (Tabla 2-3).

Tabla 2-3: Prueba fitoquímica del extracto etanólico de los basidiomas colectados de *L. crinitus*

Metabolito	Prueba	Basidiomas de <i>L. crinitus</i>
Carbohidratos	Molish	+
	Benedict	+
	Yodo	-
Saponinas	Espuma	-
	Rosenthaler	-
Polifenoles	FolinCiocalteu	+
Taninos	Cloruro Ferrico	+

Flavonoides	shinoda	-
Antraquinonas	Borntragner	+
Terpenos	Lieberma-Burchard	+
	Reactivo de Salkwoski	+
Alcaloides	Tanred	-
	Dragendorff	-
	Mayer	-
	Wagner	-
	Erlich	-

+ Presencia, - ausencia

2.4.5 Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de basidiomas colectados

El extracto etanólico de basidiomas colectados, a una concentración de 2500mg/L, evidenció actividad antifúngica con efectos inhibitorios de 60.50%, 48.30 %, 25.84% y 8.55% contra *A. niger*, *Penicillium sp*, *R. oryzae* y *F. oxysporum*, respectivamente (Figura 2-3). Además dicho extracto presentó actividad inhibitoria contra cepas bacterianas como *B. cereus* (48.79 %), *E. coli* (24.56%), *P. aeruginosa* (20.25 %) y *S. typhimurium* (24.13%) (Figura 2-4).

Figura 2-3: Porcentaje de inhibición fúngica a generada por el extracto etanólico de basidiomas colectados de *L. crinitus*

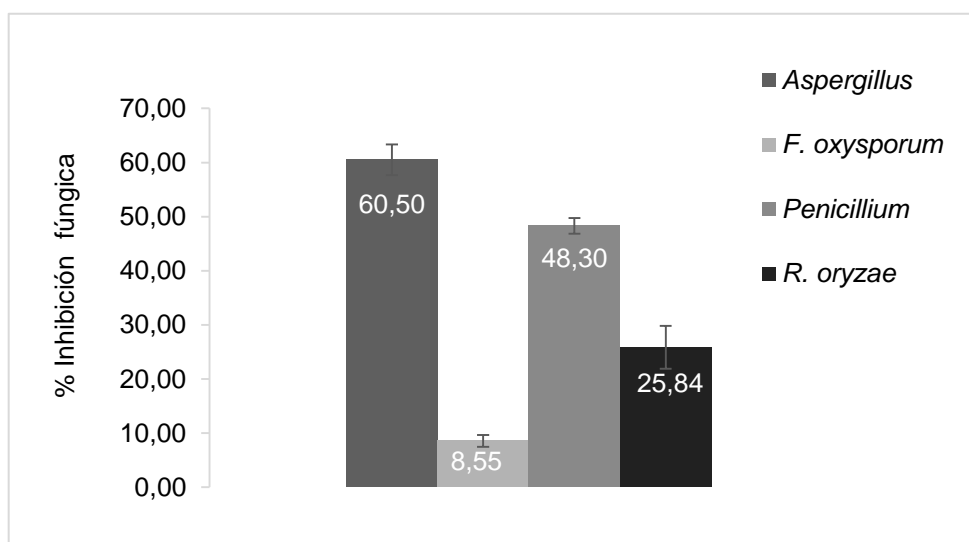
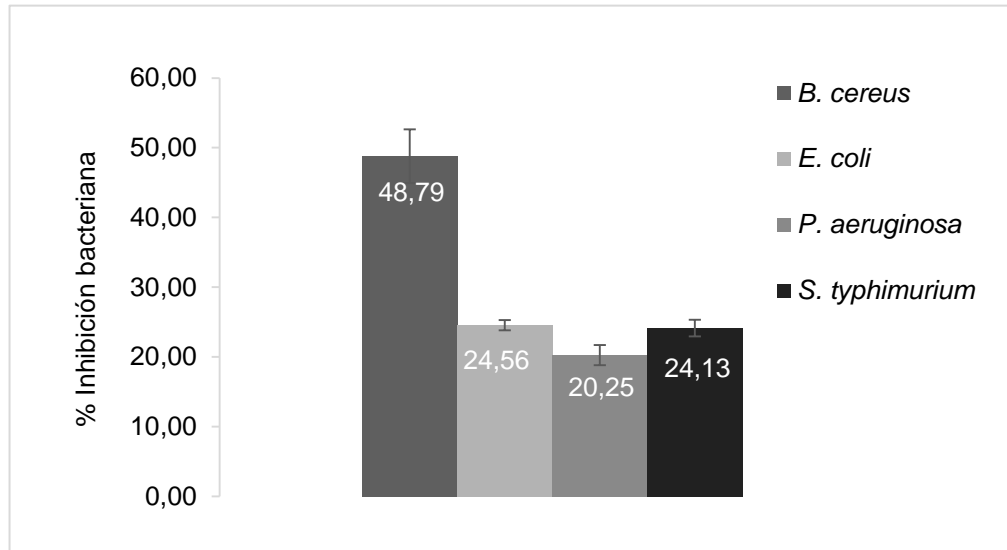


Figura 2-4: Porcentaje de inhibición bacteriana generada por el extracto etanólico de basidiomas colectados de *L. crinitus*



2.4.6 Evaluación preliminar del crecimiento micelial de *L. crinitus* sobre los sustratos

El análisis de regresión múltiple evidenció que existen correlación estadísticamente significativa entre las variables y hay diferencias en la velocidad de crecimiento (pendiente) de la cepa *L. crinitus* en los siete tratamientos (Figura 2-5). La figura 2-6, complementa esta información con el crecimiento de *L. crinitus* a las 72 horas. La cepa en los tratamientos T5, T6 y T7, presentó el mejor crecimiento con una velocidad de 0.0789 cm/h, 0.0753 cm/h y 0.0719 cm/h, respectivamente (Tabla 2-4). Para determinar cuáles medias en cada uno de los tratamientos, fueron significativamente diferentes de otras, se realizó un análisis de comparación múltiple con corrección de Bonferroni (Tabla 2-5). No existieron diferencias significativas entre los tratamientos, excepto para el tratamiento T3 y T2.

Figura 2-5: Crecimiento micelial de *L. crinitus* en los tratamientos. Los datos son reportados como la media \pm DE (ANOVA $p < 0.05$)

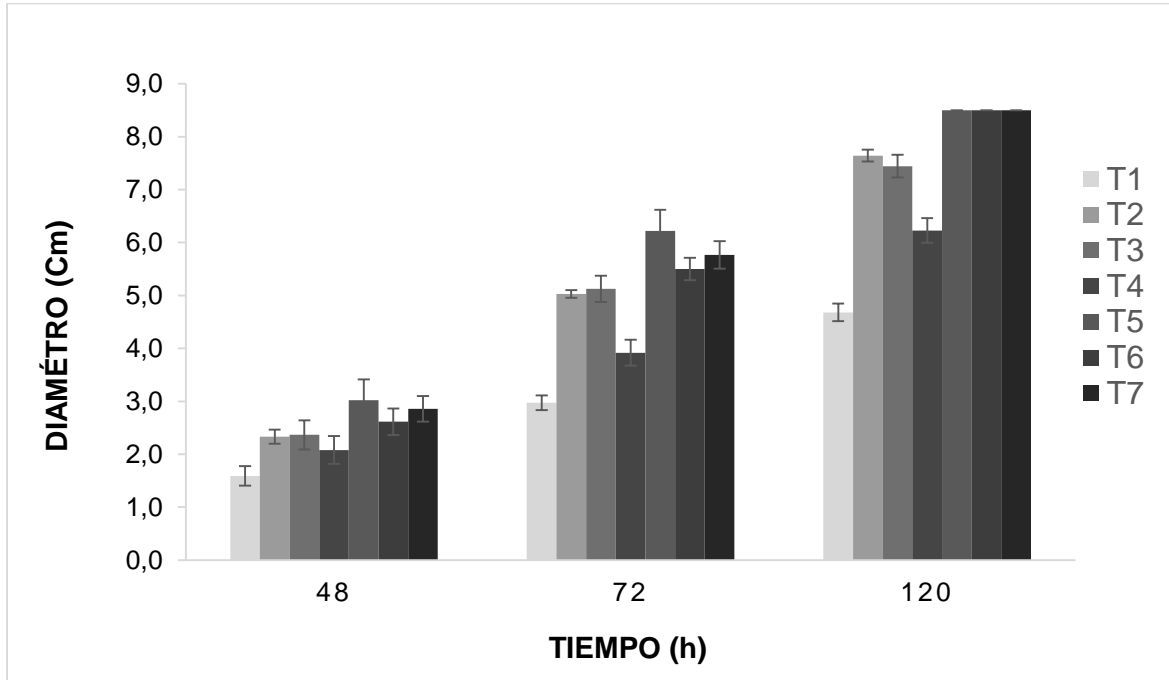


Figura 2-6: Crecimiento micelial de *L. crinitus* a las 72 horas en cada uno de los tratamientos

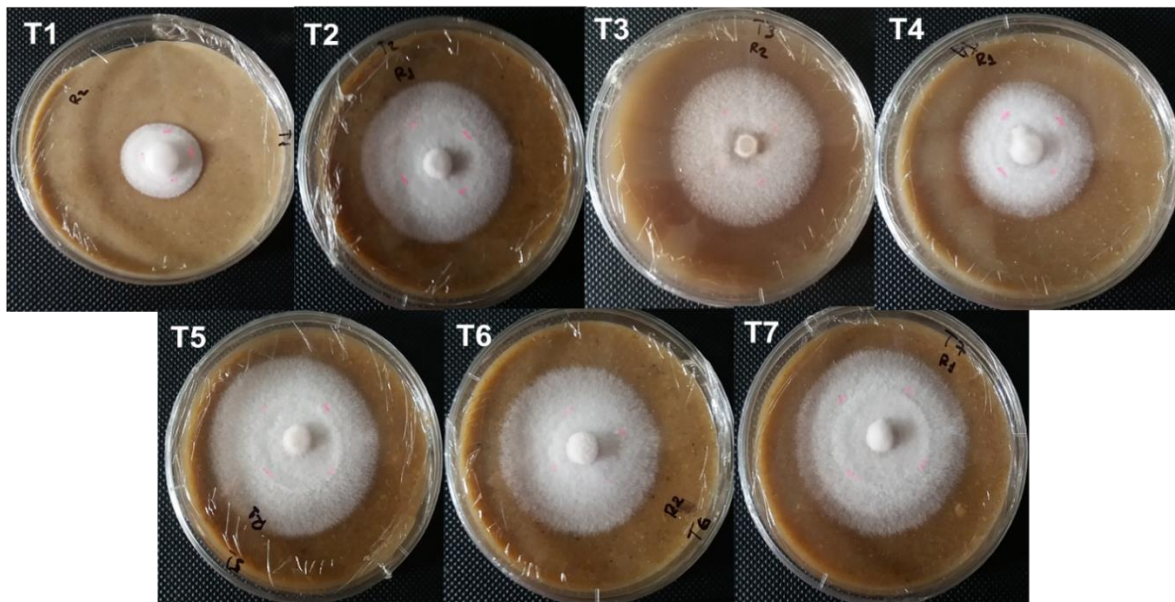


Tabla 2-4: Pendientes e interceptos para cada curva de crecimiento micelial de *L. crinitus* en los tratamientos evaluados

Tratamiento	Intercepto	Pendiente
T1	-0,2694	0,0419
T2	-0,6776	0,0710
T3	-0,4088	0,0673
T4	-0,4238	0,0563
T5	0,1558	0,0720
T6	-0,7816	0,0790
T7	-0,3170	0,0753

Tabla 2-5: Comparación múltiple de Bonferroni para cada tratamiento en la cinética de crecimiento

Tratamiento	Recuento	Media MC	Sigma MC	Grupos Homogéneos
T1	63	3,081	0,057	X
T4	63	4,076	0,057	X
T3	63	4,978	0,057	X
T2	63	5,002	0,057	X
T6	63	5,538	0,057	X
T7	63	5,708	0,057	X
T5	63	5,914	0,057	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

2.4.7 Análisis proximal de las combinaciones de residuos agroindustriales y correlación con la velocidad de crecimiento micelial

Dado a que el análisis proximal muestra una variabilidad de datos (Tabla 2-6), se realizó un análisis de correlación de Pearson, con el objetivo de evaluar que variables de la composición proximal del sustrato, están relacionadas con la velocidad de crecimiento micelial. La tabla 2-7, muestra los resultados de las variables que estuvieron relacionadas con la velocidad de crecimiento micelial, así como la correlación, el número de pares de datos utilizados para calcular cada coeficiente entre paréntesis y el Valor P, correspondiente al tercer número en cada bloque de la tabla. Este valor-P prueba la significancia estadística de las correlaciones estimadas. Valores-P abajo de 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%. Por lo tanto, existió una correlación entre la velocidad de crecimiento y la relación C/N, el % N y el % de P. Para las demás variables, no existió una correlación significativa con la velocidad de crecimiento micelial.

Tabla 2-6: Análisis proximal de las combinaciones de residuos agroindustriales usadas para la evaluación preliminar del crecimiento micelial de *L. crinitus*

Determinación	Tratamientos: Residuos agroindustriales						
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
% N	1,94	0,95	0,79	1,35	1,40	0,93	0,86
% Proteína	8,4	8,6	3,1	6,2	8,75	5,81	5,36
% Fibra	15,2	10,3	38,1	28	22,333	38,626	42,061
% Cenizas	32,25	28,33	34,09	33,22	46,66	47,51	57,51
% C	26,22	29,11	25,32	23,52	55,220	32,520	33,353
% P	2,84	0,224	0,32	1,58	0,96	0,254	0,73
% Ca	0,55	1,37	0,58	0,59	0,095	0,254	0,246
% Mg	0,11	0,21	0,12	0,14	0,237	0,216	0,398
% K	0,31	0,27	0,07	0,19	9,556	0,507	1,443
Mn (mg/kg)	47,8	29	24	35,9	29,963	25,107	89,330
Fe (mg/kg)	28,4	22,4	32,3	30,35	61,365	111,000	44,577

Zn (mg/kg)	63,5	15,5	29,6	46,55	38,711	9,892	33,925
Cu (mg/kg)	0,55	1,56	1,13	0,84	1,793	6,474	11,330
C/N	13,51	30,64	32,05	17,42	39,443	35,003	38,881

Tabla 2-7: Correlación entre la velocidad de crecimiento y variables de la composición del sustrato

	% N	C/N	Velocidad de crecimiento (cm/h)	% P
% N		-0,6996	-0,8315	0,9355
		(7)	(7)	(7)
		0,0802	0,0204	0,0020
C/N	-0,6996		0,9264	-0,7930
	(7)		(7)	(7)
	0,0802		0,0027	0,0334
Velocidad de crecimiento (cm/h)	-0,8315	0,9264		-0,9163
	(7)	(7)		(7)
	0,0204	0,0027		0,0037
% P	0,9355	-0,7930	-0,9163	
	(7)	(7)	(7)	
	0,0020	0,0334	0,0037	

2.4.8 Cultivo de *L. crinitus* mediante fermentación sólida y líquida

Los tres mejores resultados, de la anterior prueba: T5, T6 y T7, se escogieron para realizar FES y FEL.

2.4.8.1 Fermentación sólida (FES)

El micelio sembrado en 50 g de semillas de trigo, colonizó a los 15 días dicho material, sin problemas de contaminación por otros hongos, insectos o bacterias (Figura 2-7). Las bolsas preparadas con 300g de las tres diferentes combinaciones de sustratos e

inoculadas con dicha semilla, mostraron una invasión total de los residuos a los 40 días (Figura 2-8). Pese a los intentos de inducir fructificación en cada una de las bolsas, no fue posible obtener basidiomas.

Figura 2-7: Obtención de semilla de *L. crinitus*



Figura 2-8: Invasión de *L. crinitus* mediante FEL a diferentes tiempos de colonización



2.4.8.2 Fermentación líquida (FEL)

Para los cuatro tratamientos se evidenciaron diferencias en la obtención de biomasa micelial de *L. crinitus* (Figura 2-9). En el tratamiento T7, fue posible obtener mayor biomasa micelial a los 20 días de inoculado (4.69 g), en comparación con el caldo saboraud (0,599g), el T6 (2,37 g) y T5 (3,70 g) (Figura 2-10). Esto se complementa con la pendiente obtenida para cada tratamiento donde fue mayor para el T7 (0,9271 g/días), seguido de T5 (0,1658 g/días), T6 (0,117 g/días) y caldo saboraud (0,0273 g/días). Al analizar las medias de las pendientes obtenidas para cada tratamiento mediante la prueba de rangos múltiples de Bonferroni, no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos que comparte una misma columna de X's. (Tabla 2-8).

Figura 2-9: Fermentación líquida de *L. crinitus* en los tres tratamientos

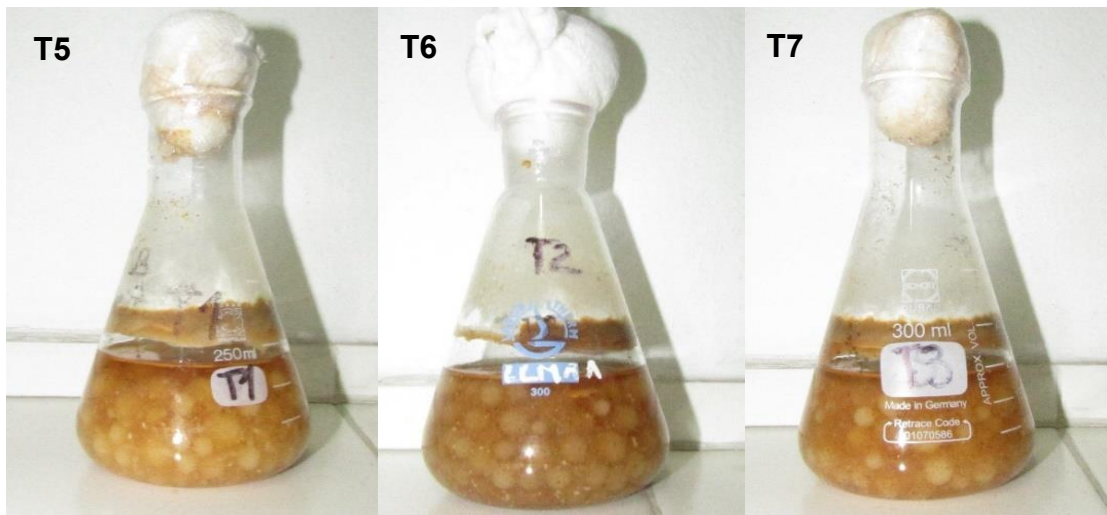
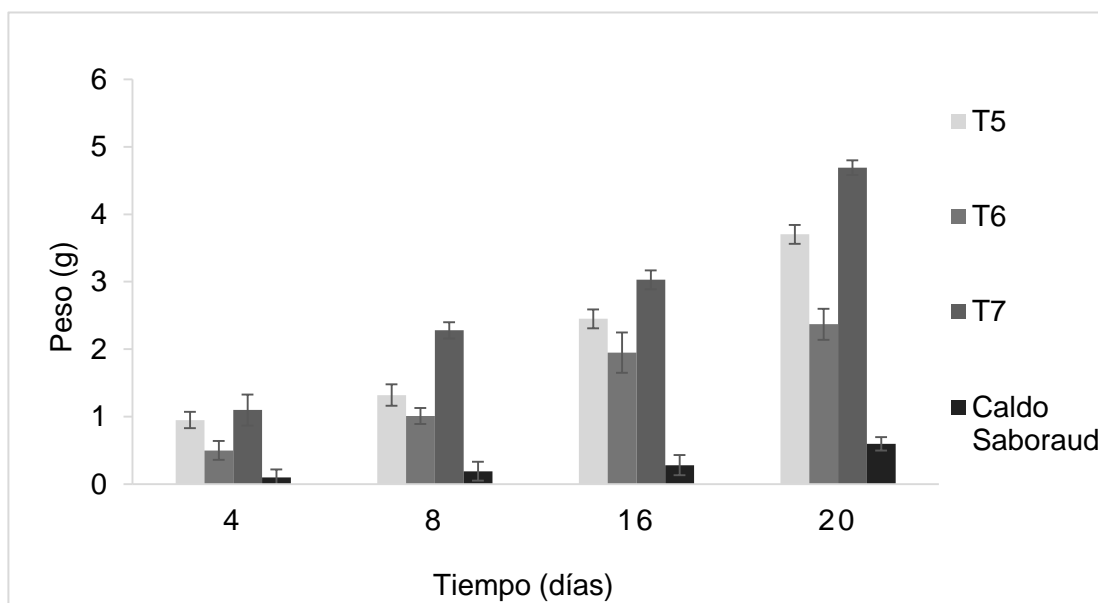


Tabla 2-8: Comparación múltiple de Bonferroni para cada tratamiento en la ganancia de biomasa micelial en FES.

Tratamiento	Pendiente (g/días)	Grupos Homogéneos
Caldo saboraud	0,0273 ± 0,003	X
T6	0,117 ± 0,021	X
T5	0,1852 ± 0,05	X
T7	0,9325 ± 0,03	X

Cada valor es expresado como media \pm desviación estándar ($n = 2$). Prueba de Rangos Múltiples de Bonferroni. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

Figura 2-10: Obtención de biomasa micelial de *L. crinitus* mediante FEL. Los datos son reportados como la media \pm DE (ANOVA $p < 0.05$)



2.4.9 Análisis proximal de basidiomas colectados, micelio obtenido por FEL y de residuos degradados por *L. crinitus* mediante FES.

Los residuos degradados con *L. crinitus*, evidenciaron mayores porcentajes en el contenido de proteína, nitrógeno y fibra, con respecto a los resultados obtenidos de los residuos agroindustriales sin adicionar el hongo (Tabla 2-9). Los demás valores fueron variables en cada tratamiento. Los basidiomas colectados de *L. crinitus*, evidenciaron contenidos de proteína de 14.42 % y fibra de 57.185%. El micelio en los cuatro tratamientos obtenido mediante FEL, mostró valores similares al de los obtenidos en los basidiomas colectados (Tabla 2-10).

Tabla 2-9: Análisis proximal del residuos agroindustriales degradado por *L. crinitus* mediante FES

	Residuos degradados con <i>L. crinitus</i> en la FES			Residuos agroindustriales (C-)		
	T5+ <i>L. crinitus</i>	T6+ <i>L. crinitus</i>	T7+ <i>L. crinitus</i>	T5	T6	T7
% N	1,69	1,80	1,72	1,40	0,93	0,86
% Proteína	10,54	11,28	10,77	8,75	5,81	5,36
% Fibra	44,11	56,33	56,17	22,333	38,626	42,061
% Cenizas	39,05	48,90	47,84	46,66	47,51	57,51
% C	35,35	29,64	30,25	55,220	32,520	33,353
% P	1,10	1,15	0,28	0,96	0,254	0,73
% Ca	0,014	0,007	0,005	0,095	0,254	0,246
% Mg	0,226	0,28	0,28	0,237	0,216	0,398
% K	0,701	8,75	4,28	9,556	0,507	1,443
Mn (mg/kg)	115,41	44,02	88,83	29,963	25,107	89,330
Fe (mg/kg)	71,03	78,76	99,00	61,365	111,000	44,577
Zn (mg/kg)	40,84	41,52	27,12	38,711	9,892	33,925
Cu (mg/kg)	93,25	10,99	7,21	1,793	6,474	11,330
Relación C/N	20,97	16,42	17,56	39,443	35,003	38,881

Tabla 2-10: Análisis proximal de basidiomas colectados y micelio obtenido mediante FEL

	Basidiomas colectados de <i>L. crinitus</i>	Micelio T5	Micelio T6	Micelio T7	Micelio Caldo
% N	2,31	1,51	1,62	1,58	1,31
% Proteína	14,42	12,3	12,8	13,12	13,15
% Fibra	57,18	54,21	52,89	53,21	54,24
% Cenizas	50,53	52,48	51,23	54,21	54,23
% C	28,69	23,45	25,25	28,47	26,41
% P	0,41	0,23	0,14	0,18	0,15

% Ca	0,25	0,12	0,147	0,18	0,12
% Mg	0,005	0,001	0,001	0,008	0,05
% K	4,04	2,03	4,05	3,26	5,03
Mn (mg/kg)	120,34	100,12	99,04	88,47	120,15
Fe (mg/kg)	129,26	115,27	114,89	108,27	101,12
Zn (mg/kg)	59,59	52,45	57,04	54,12	53,14
Cu (mg/kg)	11,23	9,87	8,74	8,79	8,99

2.5 DISCUSIÓN

El género *Lentinus* fue descrito por Fries y publicado válidamente en 1825, e incluido en el orden Agaricales, familia Pleurotaceae (Goday & Fr, 1975). Actualmente, este género pertenece al orden Poliporales, familia Polyporaceae (Mycobank), compuesto por dos subgéneros (*Lentinus*, *Panus*) basado en gran parte a la morfología de sus hifas esqueletoligativas encontradas en el píleo y la trama himenoforal (Pegler, 1983). Diversos estudios han identificado que existen problemas en la aplicación de observaciones morfológicas y por lo tanto se hace necesario su identificación utilizando herramientas moleculares (Hibbett et al., 2007; Taylor et al., 2000). En especial, porque dentro de este género, varias taxa de *Lentinus* sensu Pegler (1983), forman complejos de especies, que incluyen *L. crinitus*, donde sus basidioma son difíciles de distinguir o separar entre sí, dado a que algunos miembros de tales complejos pueden cruzarse y generar morfotipos ligeramente diferentes (Grand, Hughes, & Petersen, 2011).

Este género, está distribuido a nivel mundial, pero especies del subgénero *Lentinus*, específicamente *L. crinitus*, está distribuido en las Américas (Justo, Nagy, Grand, Redhead, & Hibbett, 2015). Para Colombia, según el último reporte realizado por Vasco-Palacios and Franco-Molano 2013, *L. crinitus*, se reporta distribuido en Amazonas, Antioquía, Caquetá, Cesar, Choco, Cundinamarca y Valle del Cauca, a una elevación de 50-2800 m.s.n.m. Por lo tanto, los basidiomas colectados y micelio obtenido, e identificados por taxonomía tradicional y molecular como *L. crinitus*, son un nuevo reporte para el Tolima.

Este nuevo aporte al conocimiento de la diversidad micológica, se suma a sus posibles aplicaciones biotecnológicas evaluadas en esta investigación. Así, basidiomas colectados de *L. crinitus* presentaron contenidos de proteína de 14.42 % y de fibra de 57.18%, valores superiores a los reportados por Rios Hurtado and Hicela Mosquera Mosquera 2015. Este contenido de proteína puede ser comparado con productos que se encuentran en la canasta familiar como frijol, maíz, arroz y trigo, que contienen valores de proteína de 28%, 10.2%, 7.6% y 14,3%, respectivamente (Chapingo et al., 2006; Koziol, 1992). Por otro lado, la fracción etanólica obtenida de basidiomas colectados de *L. crinitus*, presenta una variedad de grupo de metabolitos como carbohidratos, polifenoles, antraquinonas y terpenos que pueden estar generando un efecto inhibitorio de hongos y bacterias patógenas evaluadas, destacándose su efecto inhibitorio de 60.50 % contra *Aspergillus niger* y de 48.79 % contra *Bacillus cereus*, a una concentración de 2500 mg/L. Estos porcentajes de inhibición resultan ser prometedores en la utilización de extractos de basidiomas de *L. crinitus* para contrarrestar infecciones oportunistas generadas por *A. niger* como la onicomiosis (Guarro, 2012) o intoxicaciones alimentarias generadas por *B. cereus*, donde el vehículo implicado son las frutas y vegetales (INS, 2011).

En la literatura, solo existen dos reportes de la evaluación de metabolitos de *L. crinitus* con actividad antimicrobiana. Uno de ellos, corresponde al primer reporte de dicha actividad en el año 1994 (Abate & Abraham, 1994), en la cual, extractos con acetato de etilo obtenidos del cultivo de *L. crinitus* en Fermentación líquida y metabolitos aislados como 1-desoxihlfnofilina, mostraron actividad antimicrobiana contra patógenos como *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *A. niger*. Una investigación más reciente evaluó la actividad inhibitoria de *Fusarium sp* con extractos acuosos obtenidos de basidiomas de *L. crinitus*, demostrando que la utilización de extractos Alcohol:agua (1:1), inhibieron más del 92 % de la esporulación de conidios de *Fusarium sp* (Figueiredo & Silva, 2014). Aunque nuestro trabajo evaluó el efecto inhibitorio contra *F. oxysporum*, el extracto etanólico solo mostró inhibición del 8,5%. Estas diferencias se deben al solvente utilizado para la extracción y por lo tanto, para tener un perfil de metabolitos más detallado y una aproximación del tipo de estructura encargada del efecto, es necesario fraccionar la muestra.

La evaluación preliminar del crecimiento micelial de *L. crinitus* sobre residuos agroindustriales como cascarilla de arroz, cáscara de naranja y salvado de arroz, evidencia su capacidad para crecer sobre este tipo de residuos agroindustriales. Se ha demostrado que micelio de *L. crinitus* presenta altos porcentajes de biodegradación de lignina (54.4 %)

de paja de trigo (Hossain, Anantharaman, & Das, 2007), así como crecimiento micelial y la producción de basidiomas sobre exocarpo de cacao (*Theobroma grandiflorum*) (Granda et al., 2005). Sin embargo, es de aclarar que aparte del potencial degradador existe una interrelación entre la cepa-sustrato, la cual es específica para cada especie de hongo. Esta correlación puede ser medida mediante ensayos preliminares a la realización de FES, utilizando residuos agroindustriales en cajas de Petri, para determinar la velocidad de crecimiento micelial y así, seleccionar las combinaciones de cepas-sustratos más apropiadas para la bioconversión de residuos agroindustriales y la producción de basidiomas (Martínez et al., 2015; Motato R., Mejía G., & León P., 2006; Oviedo, Casas, & Valencia, 2016). Por lo tanto, la evaluación del crecimiento micelial sobre las diferentes combinaciones de residuos agroindustriales realizadas, demuestra que *L. crinitus* puede crecer sobre dichos tratamientos, y su crecimiento está correlacionado con la relación C/N, el contenido de fósforo, y de nitrógeno de los materiales lignocelulósicos evaluados. Las combinaciones de los sustratos (T5, T6 y T7) que presentaron relaciones de C/N de 39.44, 35.00 y 38.881, y contenidos de Fósforo de 0.96, 0.25 y 0.73 %, respectivamente, mostraron el mejor crecimiento de la cepa de *L. crinitus*, siendo el tratamiento T5, el que presentó la mejor velocidad de crecimiento, seguido de T6 y T7. Por lo tanto, a medida que aumentó la relación C/N y los contenidos de P, se presentó mayor velocidad de crecimiento micelial. Se ha demostrado que dicha relación C/N, es una de las variables principales que afecta el crecimiento micelial, y por ende el rendimiento y la productividad cuando se desea obtener basidiomas (López, Díaz, & Garcés, 2011).

Esta relación de C/N, es indispensable para el crecimiento del hongo, en especial porque para su crecimiento anaeróbico, es necesario altos contenidos de C y bajos contenidos de N, y su valor dependerá del tipo de cepa (Sánchez & Royse, 2001). Además, otros elementos como el azufre, fósforo, potasio y magnesio son esenciales para el crecimiento de los hongos ya que forman parte de la síntesis de aminoácidos, ácidos nucleicos, y ATP, y participan como cofactores en diversas reacciones enzimáticas entre otras muchas funciones (Gow & Gadd, 1995). A pesar, de que se evaluó la relación de otros componentes como calcio, magnesio, manganeso y otros, estos no mostraron una correlación con la velocidad de crecimiento y deben incluirse otras variables como el contenido de vitaminas y aminoácidos presentes en los residuos agroindustriales, los

cuales pueden influir en el crecimiento micelial (Marino, Dias de Abreu, Nascimento Pedra, & Mesquita, 2008)

Estos tres mejores tratamientos (T5, T6 y T7) se utilizaron para realizar fermentación sólida y líquida. A pesar de la expansión micelial sobre las tres combinaciones de residuos agroindustriales en la FES, no fue posible obtener basidiomas. Esto puede explicarse a varios factores, como la temperatura de inducción de fructificación así como la humedad relativa utilizada. Se ha demostrado que especies silvestres son más difíciles de acondicionar, en especial por que poco se conoce sobre las temperaturas óptimas, humedad relativa y otros factores ambientales y bioquímicos que están involucrados en el cultivo de los mismos (Sánchez & Royse, 2001). Por ejemplo, se ha demostrado que la presencia de saponinas triterpenoidales (Y. M. Magae & Hara, 2006) y tensioactivos naturales como 3-Ooctil-y 3-O-decil-D-glucosa h, están relacionados con la agregación hifal, formación de primordios y la obtención de basidiomas (Y. Magae, Nishimura, & Ohara, 2005). A parte de este tensioactivo, una fuente apropiada de nutrientes constituyen una base estructural necesaria para la inducción de fructificación de *Pleurotus ostreatus* (Berne, Pohleven, Turk, & Sepc, 2008). Otro de los factores importantes es el pH, en donde, el óptimo pH tanto para el desarrollo micelial como para la fructificación debe estar entre 6.5 -7.0 (Kalmis, 2008). Rango en el cuál, se encontraron las mezclas de los sustratos utilizados. Otros factores como la fuente de nitrógeno, las mezclas, los minerales, el tamaño de partícula, los niveles de inóculo, adición de surfactantes, la luminosidad, la temperatura, el envase, la aireación, pueden estar involucrados en el proceso de inducción de fructificación (Barba et al., 2016). Por lo tanto, se hace necesario realizar un estudio focalizado en estos parámetros para evaluar las mejores condiciones de fructificaciones para *L. crinitus*, así como los diferentes parámetros que pueden estar afectando esta inducción.

Los residuos agotados por *L. crinitus* obtenidos en la FES, aumentaron su contenido de proteína, fibra, nitrógeno, fósforo, manganeso, hierro, zinc y cobre, así como disminuyó el contenido de carbono, calcio, magnesio y calcio. Al comparar los valores obtenidos de proteína, de fibra y de nitrógeno, estos aumentaron en un 10-20% en comparación con los controles negativos. En cada uno de los tratamientos, los valores fueron similares y pueden ser comparados con otros residuos agotados con especies de *Pleurotus*, donde presentaron valores de proteína de 15.7-29 % (Pathmashini et al., 2008), así como sustratos degradados con *Agrocybe cylindracea* y *P. ostreatus*, con valores de proteína de

3.8- 15.7% y de fibra de 26.9 – 59.4% (Koutrotsios, Mountzouris, Chatzipavlidis, & Zervakis, 2014), similares a los obtenidos en esta investigación.

Estos aumentos en dicha composición de los sustratos, propone una alternativa de la biotransformación de residuos agroindustriales para la generación de productos agregados como fuente de proteína animal; en especial porque el uso de residuos agroindustriales para la alimentación animal, está limitado por la baja digestibilidad y la poca disponibilidad de nutrientes (Sánchez & Royse, 2001). Los tratamientos para reducir la lignina, y aumentar la digestibilidad de la celulosa remanente en dichos residuos, son altamente costosos (Pandey & Soccol, 2000). Esta biotransformación de los residuos por parte de macromicetos, se considera la única tecnología que permite obtener alimento humano y animal (Bermúdez et al., 2014).

La bioconversión de residuos agroindustriales por parte de macromicetos y el intento en aumentar el valor nutricional de los residuos para la alimentación animal, ha sido demostrada en diversas investigaciones. Un ejemplo de ello, es la utilización de *Pleurotus sajor-caju*, para la bioconversión de paja de arroz, donde se demuestra la disminución de celulosa de un 35,8 a 17,9%, y de lignina de 17,2 a 9.5 %, además los residuos degradados por el hongo, aumentaron el contenido de proteína y fibra (Bisaria, Madan, & Vasudevan, 1997). Por consiguiente, la proteína bruta, el contenido de grasa, de ceniza y de otros componentes como polisacáridos, vitaminas, y elementos menores, aumentan a medida que el hongo degrada el sustrato, concediendo enormes ventajas para la utilización de dichos residuos con hongos, como fuente de alimento para rumiantes. Estudios sobre la digestibilidad de paja de trigo con *Agaricus bisporus*, en experimentos con rumiantes, han demostrado que dichos residuos presentan alta cantidad de nitrógeno y puede ser utilizado como alimentos para rumiante, sin afectar la ingesta de nutrientes, la digestibilidad y el balance de nitrógeno (Fazaeli & Masoodi, 2004). También, se ha evaluado el efecto de la suplementación de sustratos agotados con hongos sobre la fermentación del rumen y los metabolitos de la sangre en bueyes de Hanwoo, encontrando que dichos sustratos pueden ser utilizados como forrajes (Oh, Lee, Choi, Kim, & Hong, 2010).

Otros estudios demuestran que residuos agotados por micelio de *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus eryngii*, poseen altos porcentajes de nutrientes primarios, útiles para ser aprovechados como fertilizantes o acondicionadores de suelos (Fontalvo et al., 2013). Esta

alternativa presenta una gran ventaja de contener los elementos necesarios para garantizar el equilibrio de la microbiota y la inducción de resistencia para las plantas. Por ejemplo, se ha evaluado sustratos agotados mediante *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus bisporus* como biofertilizantes de suelos para el crecimiento de plantas de ají (*Capsicum annuum* L), demostrando que dichos sustratos presentan un efecto positivo para el crecimiento de plantas, así como la movilización de fósforo del suelo, un aumento en el contenido de clorofila, y contenido de proteína en hojas y frutos (Roy, Barman, Chakraborty, & Chakraborty, 2015). El crecimiento de otras plantas ha sido evaluadas (*Cucumis sativus* y *Solanum lycopersicum*), utilizando residuos agotados de *Flammulina velutipes*, los tratamientos usados aumentaron la altura de las plantas, el área foliar y el índice de calidad de la planta (Run-hua, Zeng-qiang, & Zhi-guo, 2012). Este potencial de los residuos agotados con hongos, se debe a que agregan materia orgánica y mejoran la estructura del suelo, proporcionando los nutrientes necesarios para plantas. Por lo tanto, los resultados obtenidos de los residuos agotados con *L. crinitus*, propone un alternativa para la transformación de residuos agroindustriales del departamento del Tolima, en miras de generar productos de valor agregado. Dado a este potencial, es recomendable realizar otras pruebas que fortalezcan dicha utilización.

La biomasa micelial obtenida por FEL, fue diferente dependiendo del tratamiento utilizado. El análisis de la composición micelial obtenida en los tres tratamientos, fue similar a los valores obtenidos de basidiomas colectados. Esto supone una nueva alternativa en la transformación de residuos agroindustriales para la generación de biomasa micelial con el fin de producir encapsulados proteicos u otros productos de valor agregado como formulaciones de productos nutraceuticos (Cardoso et al., 2017), utilizando fermentación líquida. Además, nuevamente se evidencia que las características del sustrato y la técnica empleada de fermentación pueden intervenir en el crecimiento micelial y la obtención de biomasa.

2.6 CONCLUSIÓN

Basidiomas de *L. crinitus* se reportan por primera vez para el Tolima, con un gran potencial en el aprovechamiento biotecnológico, en especial por que dichos basidiomas pueden ser usados como fuente de alimento, dado a sus contenidos de proteína, fibra y minerales, nutricionales, así como su potencial uso contra agentes patógenos como *A. niger*,

Penicillium sp, *B. cereus* y *E. coli*. Además, dado a la capacidad que tiene el micelio de *L. crinitus* en transformar residuos agroindustriales con altos valores proteicos, de fibra y nitrógeno, estos pueden tener un potencial para ser utilizados como fuente de alimento animal y como acondicionadores de suelo, así como la posible utilización de micelio obtenido mediante FEL para la generación de encapsulados proteicos u otros productos de valor agregado. Estos contenidos nutricionales, la obtención de biomasa micelial y la velocidad de crecimiento, se ve afectada por la composición del sustrato y la técnica utilizada para la obtención de biomasa micelial.

3. Evaluación preliminar del potencial prebiótico y actividad antimicrobiana de polisacáridos extraídos de *Lentinus crinitus* (L.) Fr

Lina R. Dávila G^{5,6}, Walter Murillo A⁵, Jonh J. Méndez A⁵, Héctor Suárez M⁷

3.1 Resumen

Uno de los compuestos que se postulan como promisorios por ejercer diferentes efectos, entre los que se destacan inmunomoduladores, antidiabéticos y contra agentes infecciosos son los polisacáridos de macromicetos, específicamente los β -glucanos. Por lo tanto, la siguiente investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana y el efecto prebiótico de extractos acuosos obtenidos mediante fermentación líquida (FEL) de micelio de *Lentinus crinitus* (L.) Fr, así como de basidiomas colectados y residuos agotados con dicho hongo mediante FES. La FEL y la FES se llevó a cabo utilizando como sustratos, residuos agroindustriales de la Región del Tolima (Cáscara de naranja, Cascarilla y salvado de arroz), bajo tres tratamientos. Del micelio obtenido para cada tratamiento y de basidiomas, se realizó extracción acuosa y se determinó el contenido de polisacáridos totales y de β -glucanos. Además, se determinó la actividad antimicrobiana contra agentes patógenos e infecciosos. Los extractos acuosos obtenidos, mostraron contenidos de

⁵ Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. Irdavilag@unal.edu.co

⁶ Grupo de Investigación en Productos Naturales-GIPRONUT. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad del Tolima. Ibagué, Colombia

⁷ Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA), Universidad Nacional de Colombia. Bogotá (Colombia).

polisacáridos entre 10- 86% y de β -glucanos entre 9-67 %, los cuales variaron entre las muestras evaluadas. Los extractos acuosos obtenidos a las concentraciones evaluadas mostraron actividad inhibitoria entre el 10-70 % de *Rhizopus oryzae*, *Penicillium sp*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*; destacándose los extractos acuosos derivados de micelio obtenido por FEL. Además dichos extractos, mostraron potencial para estimular el crecimiento de *Lactobacillus paracasei*, en un medio basal, siendo el extracto de basidiomas a una concentración de 4250 mg/L y de micelio obtenido por FEL con el tratamiento 6 a una concentración de 2500 mg/L, los que presentaron mayores porcentajes de estimulación (68,58% y 71, 19%). Estos resultados sugieren el potencial biotecnológico de moléculas bioactivas producidas por los macromicetos, que podrían ser utilizadas para la generación de alimentos funcionales, así como el potencial como agentes antimicrobianos.

Palabras clave: Polisacáridos, Macromicetos, Prebióticos

3.2 INTRODUCCIÓN

Los prebióticos son ingredientes no digeribles de la dieta, que producen efectos beneficiosos estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de uno o más tipos de bacterias en el colon, las que tienen a su vez la propiedad de elevar el potencial de salud del hospedero (Reig & Anesto, 2002). Este potencial se ha evaluado con fracciones de β -glucanos del género *Pleurotus*, los cuales demuestran una estimulación selectiva de cepas de probióticas como *Lactobacillus*, *bifidobacterium* y *Enterococcus* (Synytsya et al., 2009), así como mejoras en la supervivencia de microorganismos en productos lácteos y en diferentes sistemas de cultivo durante los periodos de almacenamiento (W.-T. Chou, Sheih, & Fang, 2013). Estos polisacáridos de macromicetos, han mostrado tener efectos sinérgicos con péptidos y aminoácidos en condiciones *in vitro*, logrando efectos beneficiosos en el huésped, así como, la estimulación de la microbiota fecal de una manera positiva, bajando el pH y suprimiendo patógenos potenciales como *Clostridium spp.*, *Staphylococcus spp.* y *Enterococcus spp* (Yu, Liu, Mukherjee, & Newburg, 2013).

Estos efectos antimicrobianos sobre cepas transmitidas en alimentos, en especial *Salmonella* se asocian con enfermedades causadas por el consumo de aves de corral. Se

han desarrollado diversas estrategias de intervención antes del sacrificio de animales para reducir las fuentes de transmisión de patógenos. Nuevos enfoques en la utilización de prebióticos de macromicetos para disminuir estos patógenos son considerados como un nuevo campo de investigación, con el fin de promover la salud y seguridad de productos de pollos de engorde. En una investigación se evaluó la administración de extracto de macromicetos en pollos de engorde sobre las poblaciones de bifidobacterias y Salmonella, mostrando que el consumo del tratamiento con extracto de hongo por los pollos de engorde mejoraron la eliminación de bifidobacterias y disminuyeron las poblaciones de Salmonella (Willis, King, Iskhuehnen, & Ibrahim, 2009). Otro estudio valoró la morfología intestinal y las poblaciones de bacterias en pollos de engorde alimentados por seis semanas, con dietas que contenían diferentes cantidades de *Agaricus Bisporus* (Giannenas et al., 2010). Se reporta la utilización de polisacáridos de *Lentinus edodes* y *Tremella fuciformes* sobre los efectos de la microflora de pollos (Guo, Williams, Kwakkel, & Verstegen, 2003). Este potencial prebiótico de polisacáridos de macromicetos sumado a la actividad antimicrobiana contra patógenos, se postulan como nuevas fuentes y por ende un nuevo campo en la investigación para generar productos funcionales con las propiedades biológicas exhibidas de estos compuestos. Por lo tanto, el objetivo de la siguiente investigación fue evaluar el contenido de polisacáridos, de β -glucanos y la actividad antimicrobiana y efecto prebiótico de extractos acuosos obtenidos mediante fermentación líquida (FEL) de micelio de *Lentinus crinitus* (L.) Fr, así como de basidiomas colectados y residuos agotados con dicho hongo mediante FES.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Material de trabajo

Basidiomas colectados, micelio obtenido por fermentación líquida y residuos agotados con micelio de *L. crinitus* en tres tratamientos empleando residuos agroindustriales (Capítulo 2), fueron utilizados para la extracción de polisacáridos y evaluación de la actividad prebiótica y antimicrobiana, así como el contenido de polisacáridos totales y β -glucanos.

3.3.2 Determinación del contenido de polisacáridos totales

Los polisacáridos totales se cuantificaron por el método de fenol ácido sulfúrico, usando como solución estándar glucosa (Arzave, 1987; DuBois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956; Laboratory, 2012), con algunas modificaciones: se utilizó antrona al 0.2% en ácido sulfúrico, dicha solución se almacenó a 8°C. Se realizó por triplicado una curva patrón de glucosa de 0, 80, 100, 160, 200, 320, 400, 640, 800 mg/L (Anexo C) diluida en agua desionizada. Se adicionaron en tubos eppendorf 50 µl de dichos estándares y se llevaron a baño de hielo, durante 10 minutos. Pasado el tiempo, se adicionó 100 µl de la antrona, la cual fue agregada por las paredes del tubo lentamente, hasta formar una capa inferior amarilla y una superior lechosa. Se descartaron aquellos tubos donde no se separaron las capas, o los que se tornaron verde. Después de adicionar la antrona, estos permanecieron durante 5 minutos en baño de hielo. Pasado el tiempo, cada tubo se agitó vigorosamente en un vortex, hasta mezclar las dos capas. Una vez agitado todos los tubos, estos se transfirieron a un baño de agua a 100°C, durante 10 minutos. Luego, fueron llevados por 10 minutos a un baño de hielo. Una vez atemperados los tubos, se tomaron 100 µl de cada tubo y se agregaron al pozo de la caja de microplacas. Esta cuantificación se llevó a cabo mediante microplacas de 96 pozos, con una medición a una densidad óptica de 630 nm en lector de microplacas UV/VIS Multiskan® GO (ThermoScientific). Una vez construida la curva de calibración se determinó el contenido de polisacáridos totales de las muestras, interpolando el valor dado de la absorbancia y teniendo en cuenta el factor de dilución de las muestras.

3.3.3 Determinación del contenido de β -glucanos

Esta determinación se hizo mediante un método colorimétrico propuesto por Nitschke et al. 2011; Semedo, Karmali, and Fonseca 2014. Este método utiliza como complejante el Rojo Congo y como ligante el β -glucano. El complejo formado de dicha interacción genera un cambio batocrómico en el máximo de absorción del Rojo Congo. Esta metodología fue usada con algunas modificaciones: Se utilizó una concentración stock definida del patrón de β -glucano de Barley (Sigma-aldrich), el cual se preparó disolviéndolo en NaOH 1M, se neutralizó con HCL y fue aforado con agua desionizada. A partir de esta concentración, se realizó un rango de concentraciones de 48 a 192 mg/L, con el fin de construir la curva de

calibración. Para preparar el complejante se utilizó 100 ml de buffer fosfato salino (PBS) a pH 7.2 y se adicionó 0,017g de Rojo Congo. La reacción consistió en adicionar 180 μ L del Buffer PBS con Rojo congo y 120 μ L de la solución estándar de β -glucano de Barley a las diferentes concentraciones para un volumen final de 300 μ L. La curva de calibración se realizó por triplicado incluyendo el blanco, el cual contenía el buffer PBS con Rojo Congo, y la dilución en la que se preparó el β -glucano, pero sin este (Anexo D). Este ensayo fue realizado en microplacas de 96 pozos, con una medición a una densidad óptica de 523 nm en lector de microplacas UV/VIS Multiskan® GO (ThermoScientific). Además, a la concentración de 48 y 192 mg/L y al blanco, se les realizó un barrido en el espectro UV-VIS en el rango de 300 a 700 nm, con el fin de verificar el cambio batocrómico a 523 nm. Una vez construida la curva de calibración se determinó el contenido de β -glucanos de las muestras, interpolando el valor dado de la absorbancia y teniendo en cuenta el factor de dilución de las muestras.

3.3.4 Actividad antibacteriana

Se utilizaron las cepas *Escherichia coli* (ATCC25922), *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* (NCIMB7464) y *Salmonella typhimurium* (*Salmonella* entérica) (NCTC6017). La determinación se realizó por el método de microdilución en caldo nutritivo BHI (Merk®) (infusión cerebro-corazón) (CLSI, 2012). Se realizó una curva concentraciones con 6 réplicas por cada una, evaluando el efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano a través de concentraciones entre 312.5-17.000 mg/L de los extractos acuosos obtenidos, valorando la CI_{50} la cual reporta la concentración que inhibe el 50 % de crecimiento bacteriano. Los ensayos se efectuaron en microplacas de 96 pozos. Para el llenado de cada pozo, se tomó 50 μ L del inóculo del patógeno bacteriano ajustado a 0,5 en la escala de McFarland, 100 μ L de medio líquido y 50 μ L del extracto. Al control de crecimiento del patógeno (control negativo) se adicionó, 100 μ L de medio, 50 μ L del inóculo y 50 μ L de agua estéril. Se emplearon controles de contaminación, los cuales incluyeron 200 μ L de medio. Se utilizó como control positivo oxitetraciclina a 2000 mg/L. Finalmente todo se incubó a 37°C en un periodo de 24 Horas. El crecimiento bacteriano fue evaluado espectrofotométricamente, midiendo los valores de absorbancia cada 12 horas a 460nm mediante un lector de microplacas UV/VIS Multiskan® GO (Thermo scientific). Para determinar el % de inhibición del crecimiento, se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$\text{Tasa o velocidad de crecimiento (TC)} = \frac{\text{Abs Final} - \text{Abs Inicial}}{\text{Tiempo Final} - \text{Tiempo inicial}} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\% \text{ crecimiento} = \frac{\text{TC de la bacteria + extracto}}{\text{TC del control negativo}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \% \text{ de crecimiento} \quad \text{Ecuación 3}$$

3.3.5 Actividad antifúngica

Las cepas utilizadas para este ensayo fueron: *Fusarium* sp, *Penicillium* sp, *Rhizopus oryzae* y *Aspergillus niger*. Se utilizó la metodología CLSI 2009 teniendo en cuenta las mismas consideraciones que en el ítem anterior con algunas modificaciones: utilizando caldo Sabouraud (Merk®) para cada inóculo. Se prepararon suspensiones de esporas de los patógenos a una concentración de 1×10^4 conidias/mL. Se utilizó como control positivo ketoconazol a 2000 mg/L. El crecimiento micelial fue evaluado espectrofotométricamente, midiendo los valores de absorbancia cada 24 h, a una densidad óptica de 595 nm. El porcentaje de inhibición se realizó utilizando las formulas anteriores.

3.3.6 Condiciones de crecimiento y mantenimiento de *Lactobacillus paracasei*

Se utilizó la cepa del probiótico *Lactobacillus paracasei*, la cual fue activada en medio sólido MRS oxid. Una colonia de este medio fue llevada a medio líquido de Rogosa (MRS) con glucosa bajo condiciones anaeróbicas. El medio de Rogosa fue preparado a un pH=5.4 \pm 0.2 con la siguiente composición (-g/L): triptona-10; extracto de levadura-5; Tween-80; Fosfato de potasio-6; ácido cítrico-2; acetato de sodio-17; sulfato de magnesio-0.57; sulfato de manganeso-0.12; sulfato ferroso-0.034 y glucosa-20 (Nowak, Nowacka, Marek, & Anna, 2017).

3.3.7 Determinación preliminar de los polisacáridos en la estimulación de crecimiento del probiótico

La determinación se realizó por el método propuesto por Nowak et al., 2017; Su, Henriksson, & Mitchell, 2007, con algunas modificaciones. Se realizó una curva de concentraciones con 6 réplicas por cada una, evaluando la estimulación del crecimiento

del probiótico a través de concentraciones entre 312.5-17.000 mg/L de los extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con *L. crinitus*. Los ensayos se efectuaron en microplacas de 96 pozos. Para el llenado de cada pozo, se utilizó 100 μ L de caldo MRS sin glucosa, al cual se le adicionó 50 μ L del extracto, a cada una de las concentraciones y 50 μ L del inóculo de *L. paracasei*, ajustado a 0,5 en la escala de McFarland. Como control positivo se utilizó 100 μ L de medio MRS con glucosa al 1.5%, 50 μ L de agua estéril y 50 μ L del inóculo. Como control negativo se utilizó 100 μ L de medio MRS sin glucosa, 50 μ L de agua estéril y 50 μ L del inóculo. El crecimiento del probiótico fue evaluado espectrofotométricamente, midiendo los valores de absorbancia cada 24 horas a 600 nm mediante un lector de microplacas UV/VIS Multiskan® GO (Thermo scientific). Los resultados fueron presentados como porcentajes del crecimiento de *L. paracasei* en presencia de cada extracto acuoso en comparación con el crecimiento en el medio sin glucosa.

3.3.8 Análisis estadístico

Después de confirmar la normalidad y homogeneidad de los datos utilizando el programa Statgraphics centurión XVI, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), y los porcentajes de inhibición, de estimulación del probiótico y la composición de proteínas y de β -glucanos se presentaron con su respectiva desviación estándar. Para comprobar diferencias significativas entre las medias de los tratamientos se utilizó la prueba de rangos múltiples Bonferroni. Un p-valor menor que 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1 Contenido de polisacáridos totales y de β -glucanos

La tabla 3-1, muestra los contenidos de polisacáridos y de β -glucanos en los extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con *L. crinitus*. De acuerdo con la prueba de rangos múltiples de Bonferroni, el contenido de polisacáridos totales y de β -glucanos para cada una de las muestras analizadas y con letras iguales, no difieren estadísticamente. Por lo tanto, el

contenido de polisacáridos más bajo se presenta en el micelio obtenido en la FEL con el T7 y en el micelio obtenido en caldo saboraud, con porcentajes entre 10.45-20.30%. Los contenidos más altos de polisacáridos se encontraron en el micelio obtenido en la FEL con el T5, con un porcentaje de 74.02 %. Para el caso de los β -glucanos el contenido más alto de estos, se presentaron en los residuos agotados con *L. crinitus* mediante FES, utilizando el T5 y T6.

El contenido de polisacáridos y de β -glucanos fue diferente en las combinaciones de los residuos agroindustriales utilizados para obtener micelio, al igual que el tipo de metodología de fermentación empleada, así como de los basidiomas colectados. Investigaciones sugieren que el contenido de dichos compuestos, puede variar de acuerdo a las condiciones de cultivo en el que se ha sembrado la cepa del hongo, en especial la relación C/N, afecta la biosíntesis de polisacáridos en la pared celular fúngica (Bak, Park, Park, & Ka, 2014; Brauer, Kimmons, Phillips, & Brauer, 2010; Wu, Cheung, Wong, & Huang, 2004). Al relacionar los datos obtenidos con la relación C/N, determinada para cada tratamiento (Capítulo 2), se demuestra que a mayor relación de esta, existe un aumento en el contenido de polisacáridos y de β -glucanos, así como un aumento en la velocidad de crecimiento micelial mediante FES y un aumento de biomasa micelial mediante FEL. Los valores obtenidos en el contenido de β -glucanos se encuentran dentro de los rangos reportados en algunas especies cultivables y comestibles, como *Lentinula edodes* (25%), *Agaricus bisporus* (8.60%) y *Pleurotus ostreatus* (24.231%) (Sari, Prange, Lelley, & Hambitzer, 2017). Estos valores obtenidos sugieren el uso de la cepa de *L. crinitus* para la producción de dichos compuestos, los cuales han demostrado presentar diversas propiedades biológicas entre las que se incluyen su efecto prebiótico e inmunomodulador (W. Wang et al., 2015; Zhu et al., 2016b). Además, estos datos complementan los resultados obtenidos en el capítulo 2, con el fin de generar productos de valor agregado, pues los β -glucanos, hacen parte de lo que se conoce como fibra dietética y por ende presenta numerosos beneficios como la disminución del colesterol, regulación de los niveles de glucosa en sangre y prevención del síndrome metabólico (Andrade et al., 2015; Gründemann, Garcia-käufer, & Sauer, 2015).

Tabla 3-1: Contenido de polisacáridos y de β -glucanos en los extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con *L. crinitus*

Muestra	Polisacáridos totales (g/100 g muestra)	β -glucanos (g/100 g muestra)
Basidiomas de <i>L. crinitus</i>	63,34 \pm 4,26 cd	19,58 \pm 2,17 b
Micelio FEL T5	74,02 \pm 4,95 e	34,20 \pm 1,86 c
Micelio FEL T6	10,45 \pm 1,26 a	10,38 \pm 2,6 a
Micelio FEL T7	54,88 \pm 9,16 bcd	9,09 \pm 1,84 a
Micelio Caldo saboraud	20,30 \pm 2,70 a	21,58 \pm 1,50 b
Residuo agotado FES T5	65,15 \pm 2,76 de	54,196 \pm 2,39 e
Residuo agotado FES T6	86,02 \pm 5,95 f	56,96 \pm 0,726 f
EResiduo agotado FES T7	53,35 \pm 2,49 bc	40,77 \pm 3,48 d
Residuo T5	48,16 \pm 11,31 b	8,25 \pm 1,054 a
Residuo T6	55,434 \pm 5,96 bcd	11,127 \pm 1,56 a
Residuo T7	49,994 \pm 4,215 b	19,644 \pm 1,027 b

Cada valor es expresado como media \pm desviación estándar (n = 3) ((ANOVA $p < 0.05$). No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellas letras iguales, para cada columna. Prueba de Rangos Múltiples de Bonferroni.

3.4.2 Actividad antimicrobiana

De cada uno a uno de los extractos obtenidos se realizaron cuatro concentraciones que estuvieron en un intervalo de 78- 3593 mg/L, el cual varió para cada extracto obtenido. La velocidad de crecimiento y porcentajes de inhibición con su respectiva desviación estándar (DE) y el análisis de la prueba de múltiples rangos de Bonferroni para cada concentración de los extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL, de los residuos agotados con *L. crinitus* y de los controles de dichos residuos, se muestra en los Anexos E. De acuerdo con el ANOVA, se demuestra que dado a que el valor-P es menor que 0,05, la concentración presentó un efecto significativo sobre los % de inhibición generado por los extractos acuosos y para cada uno de los patógenos evaluados.

La figura 3-1, muestra los porcentajes de inhibición de *R. oryzae* generado por cada uno de los extractos obtenidos. El control positivo, mostró porcentajes de inhibición de 78.38 % a una concentración de 2500 mg/L. Los residuos agotados con *L. crinitus* utilizando el tratamiento 5 mediante FES, y micelio obtenido mediante FEL en los cuatro tratamientos

mostraron % de inhibición mayores al 50 % (Tabla 3-2). Por lo tanto se determinó, la concentración inhibitoria (CI_{50}) de los extractos, capaz de generar el 50% de la inhibición fúngica respecto al comportamiento del control negativo. El extracto obtenido de micelio saboraud con FEL, presentó la menor concentración (64.55 mg/L) capaz de generar el 50 % de inhibición de *R. oryzae*, seguida de extractos de micelio obtenido por FEL en el tratamiento 6, con una concentración de 145, 88 mg/L. Sólo extractos obtenidos del residuo agotado mediante FES del T6, mostraron un porcentaje de inhibición del 30-35% contra *Penicillium sp* (Figura 3-2). Los extractos acuosos del micelio obtenido por FEL en el T5, T6 y en medio saboraud, presentaron porcentajes de inhibición del 12 al 33% contra *F. oxysporum* (Figura 3-3). Para el caso de la inhibición de *A. niger*, extractos de micelio obtenido por FEL en caldo saboraud, generó los mayores porcentajes de inhibición (50-54%), así como extractos del micelio obtenido por FEL en el T5, T6 y T7, con porcentajes de 9-38% (Figura 3-4). Para todas las actividades antifúngicas, los controles negativos, los cuales corresponden solo a las combinaciones de residuos, sin inocular la cepa de *L. crinitus*, no mostraron porcentajes de inhibición contra los cuatro hongos patógenos evaluados.

Los residuos agotados con *L. crinitus* utilizando el tratamiento 7 mediante FES, mostraron un 13,3 % de inhibición contra *S. aureus* a una concentración de 2500 mg/L (Figura 3-6), al igual que mostraron los mayores porcentajes de inhibición (59,96%) contra *S. typhimurium* comparado con los demás extractos, y junto con los extractos de basidiomas, presentaron porcentajes de inhibición mayores al 50%, siendo la CE_{50} de 1823.45 mg/L, 3864.38 mg/L, respectivamente. Los demás extractos presentaron porcentajes de inhibición, a la mayor concentración evaluada entre 21-48 % (Figura 3-5). Solo extractos de basidiomas y de micelio obtenido por FEL en los cuatro tratamientos, mostraron porcentajes de inhibición entre 8.55-24.83%, en las mayores concentraciones evaluadas contra *E. coli* (Figura 3-7). Ningún extracto evaluado presentó actividad antibacteriana contra la cepa de *Bacillus cereus* (Tabla 4-8) (Anexo E). Para todas las actividades antibacterianas, los controles negativos, los cuales corresponden solo a las combinaciones de residuos, sin inocular la cepa de *L. crinitus*, no mostraron porcentajes de inhibición contra las bacterias patógenos evaluadas.

Estos resultados sugieren que extractos aislados mediante FEL, presentaron mayores porcentajes de inhibición contra hongos patógenos, en comparación de los extractos

obtenidos de los residuos agotados con *L. crinitus* mediante FES, los cuales presentaron los mejores porcentajes de inhibición contra las bacterias patógenas evaluadas. Dichos extractos, podrían usarse para combatir infecciones causada por dichas bacterias que se han vuelto resistentes a fármacos de uso habitual y convencional; convirtiéndose en un problema de salud pública a nivel mundial (Flores & Herrera, 2005), o su uso para contrarrestar agentes causales de la descomposición de alimentos causado por hongos fitopatógenos evaluados, los cuales pueden generar diferentes grados y tipos de pudrición a diversos cultivos (Maíz, papa, tomate, fresa), causando importantes daños económicos.

Además, también se sugiere que la bioactividad de los extractos acuosos obtenidos no está relacionada con la cantidad de biomasa micelial producida, ni con la cantidad de β -glucanos, ni de polisacáridos presentes. Por lo tanto, dicha actividad puede estar en función de otros parámetros, no estudiados, como el grado de ramificación y la solubilidad de dichos compuestos (Q. Wang et al., 2017).

Tabla 3-2: Concentración inhibitoria (CI_{50}) de extractos obtenidos para inhibir *R. oryzae*

Extracto	CI_{50} (mg/L)	Límites de Inferior	Predicción Superior
Micelio FEL T5	447,14	325,688	681,403
Micelio FEL T6	145,88	105,90	196,95
Micelio FEL T7	405,45	326,11	523,96
Micelio saboraud	64,55	44,59	96,48
Residuo agotado FES T5	685,073	366, 684	1271, 46

Figura 3-1: Porcentaje de inhibición de *R. oryzae* por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con *L. crinitus*. Los datos son reportados como la media \pm DE (ANOVA $p < 0.05$).

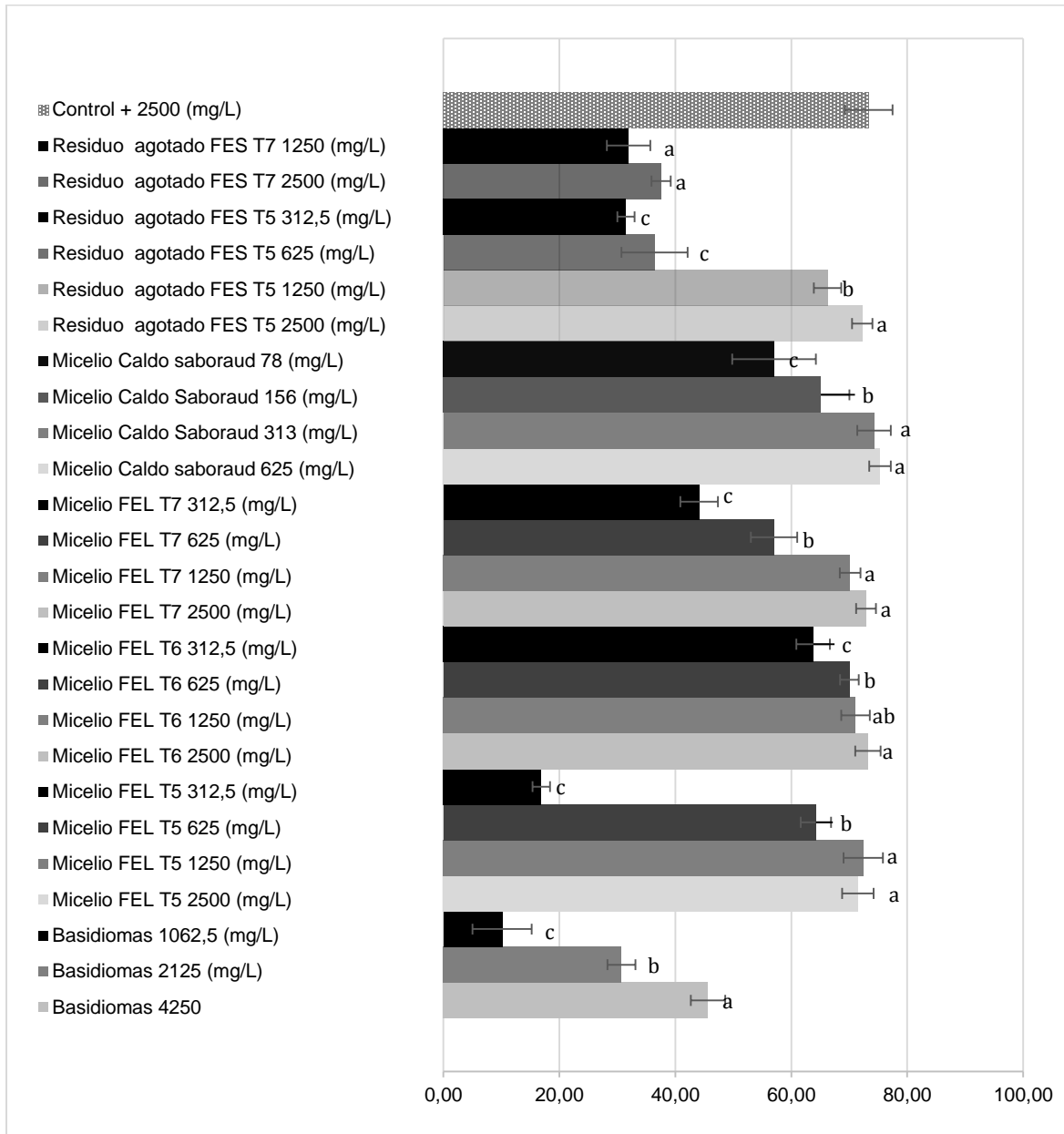


Figura 3-2: Porcentaje de inhibición de *Penicillium sp* por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con *L. crinitus*. Los datos son reportados como la media \pm DE (ANOVA $p < 0.05$)

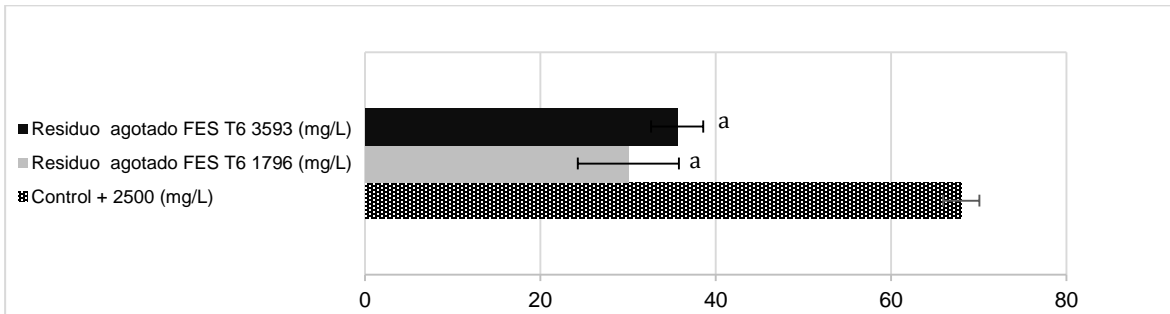


Figura 3-3: Porcentaje de inhibición de *F. oxysporum* por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con *L. crinitus*. Los datos son reportados como la media \pm DE (ANOVA $p < 0.05$).

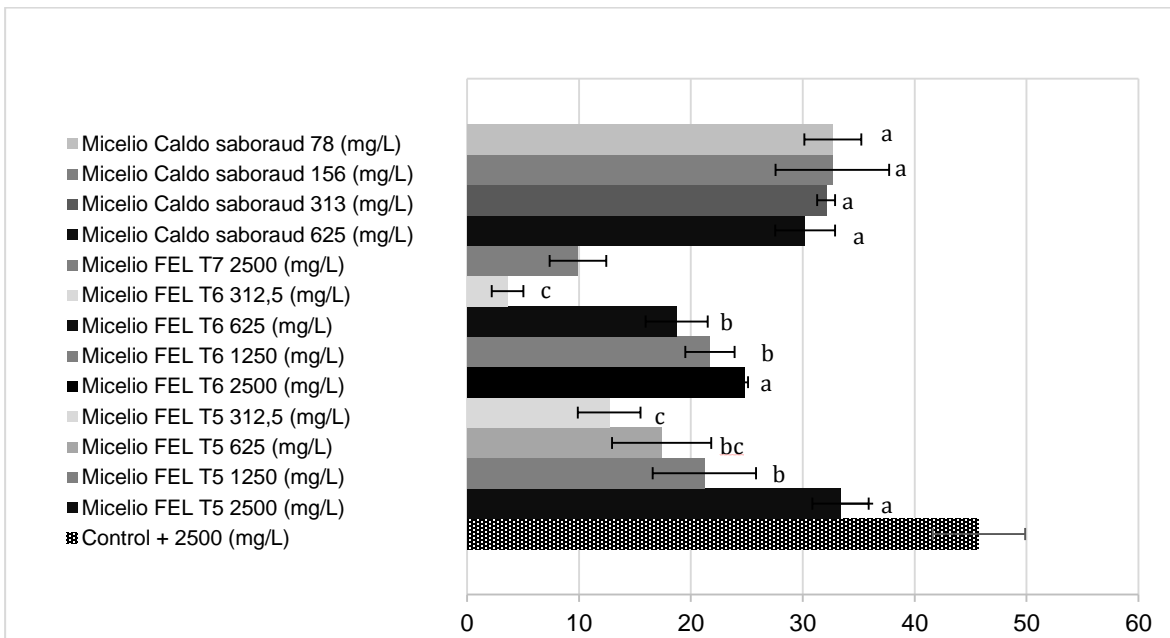


Figura 3-4: Porcentaje de inhibición de *A. niger* por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con *L. crinitus*. Los datos son reportados como la media \pm DE (ANOVA $p < 0.05$).

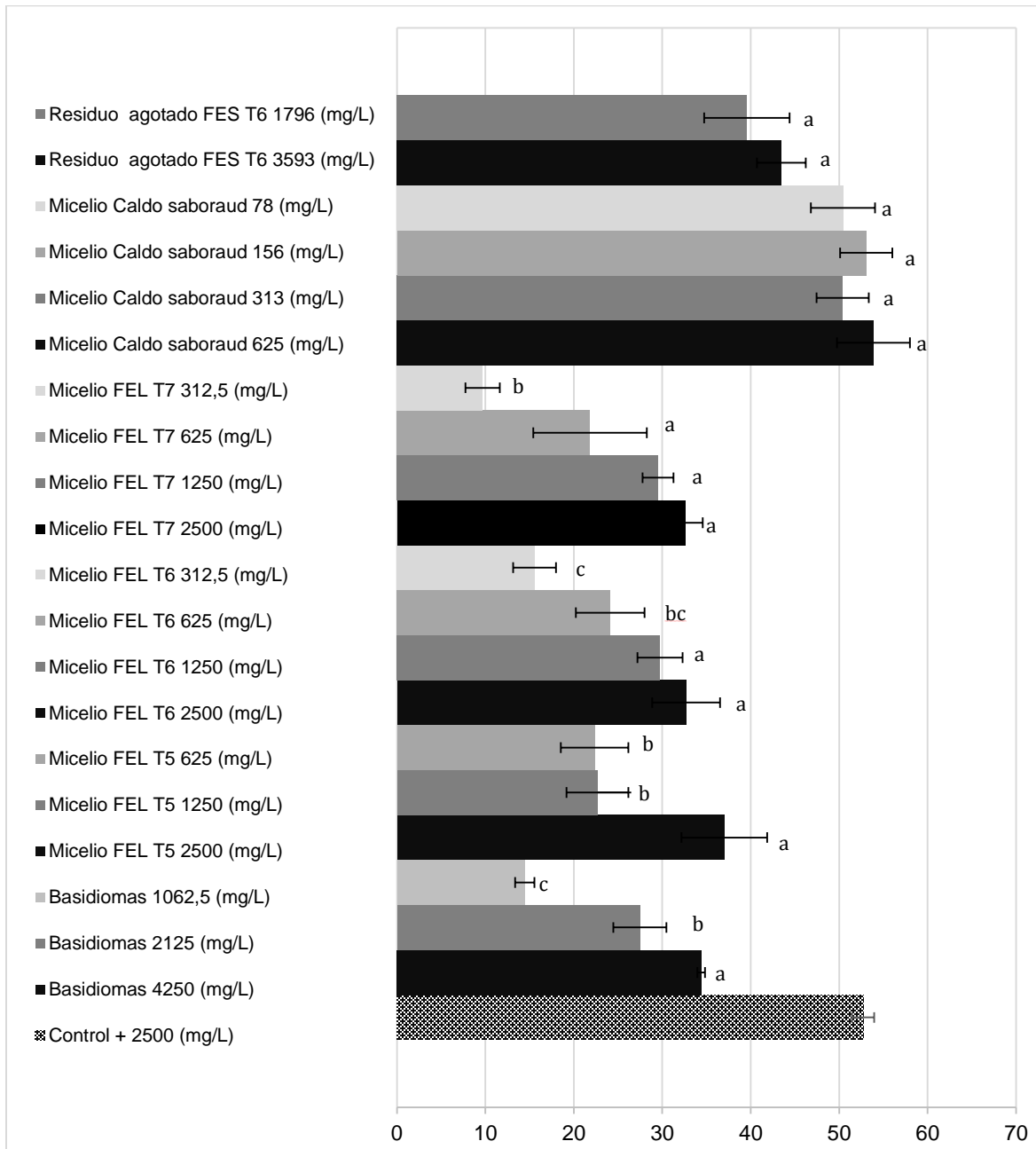


Figura 3-5: Porcentaje de inhibición de *S. typhimurium* por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con *L. crinitus*. Los datos son reportados como la media \pm DE (ANOVA $p < 0.05$).

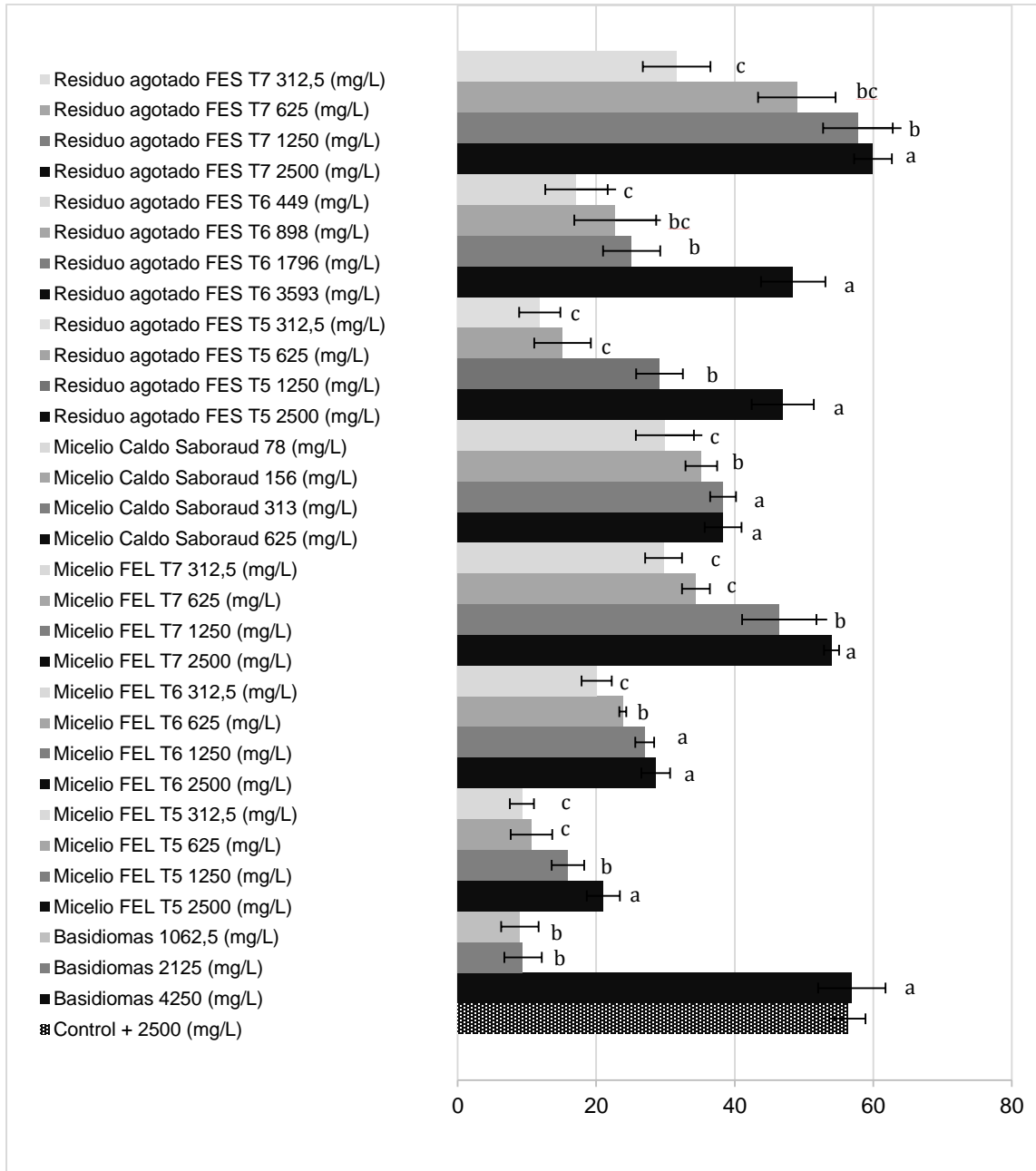


Figura 3-6: Porcentaje de inhibición de *S. aureus* por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con *L. crinitus*. Los datos son reportados como la media \pm DE (ANOVA $p < 0.05$).

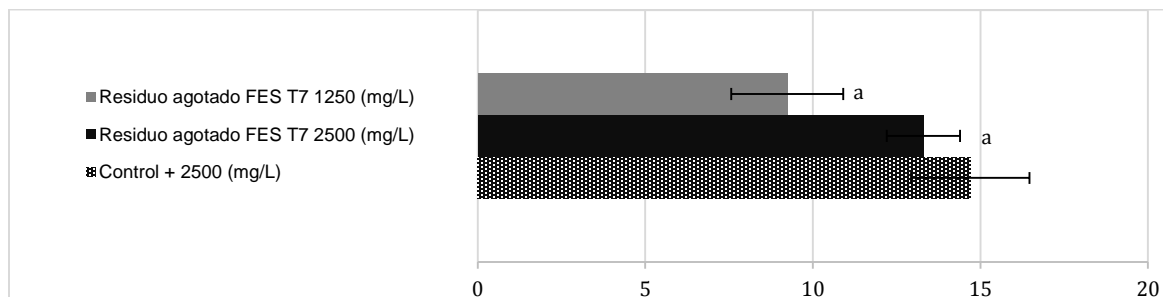
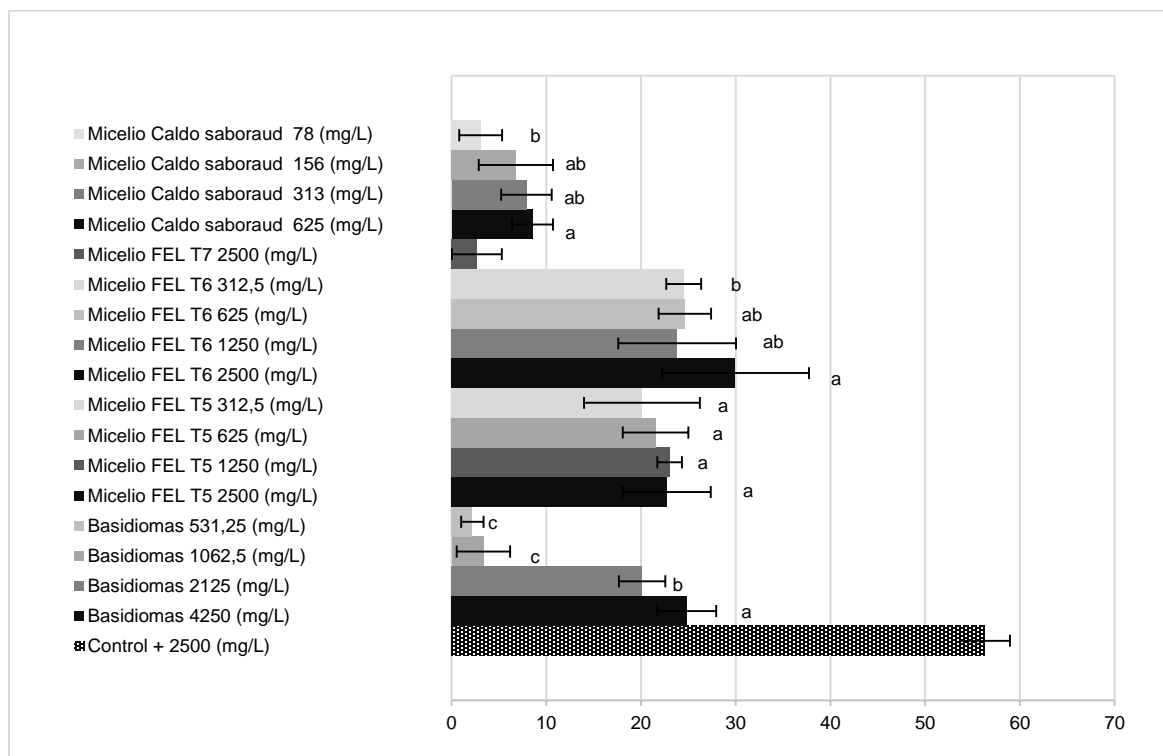


Figura 3-7: Porcentaje de inhibición de *E. coli* por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con *L. crinitus*. Los datos son reportados como la media \pm DE (ANOVA $p < 0.05$).



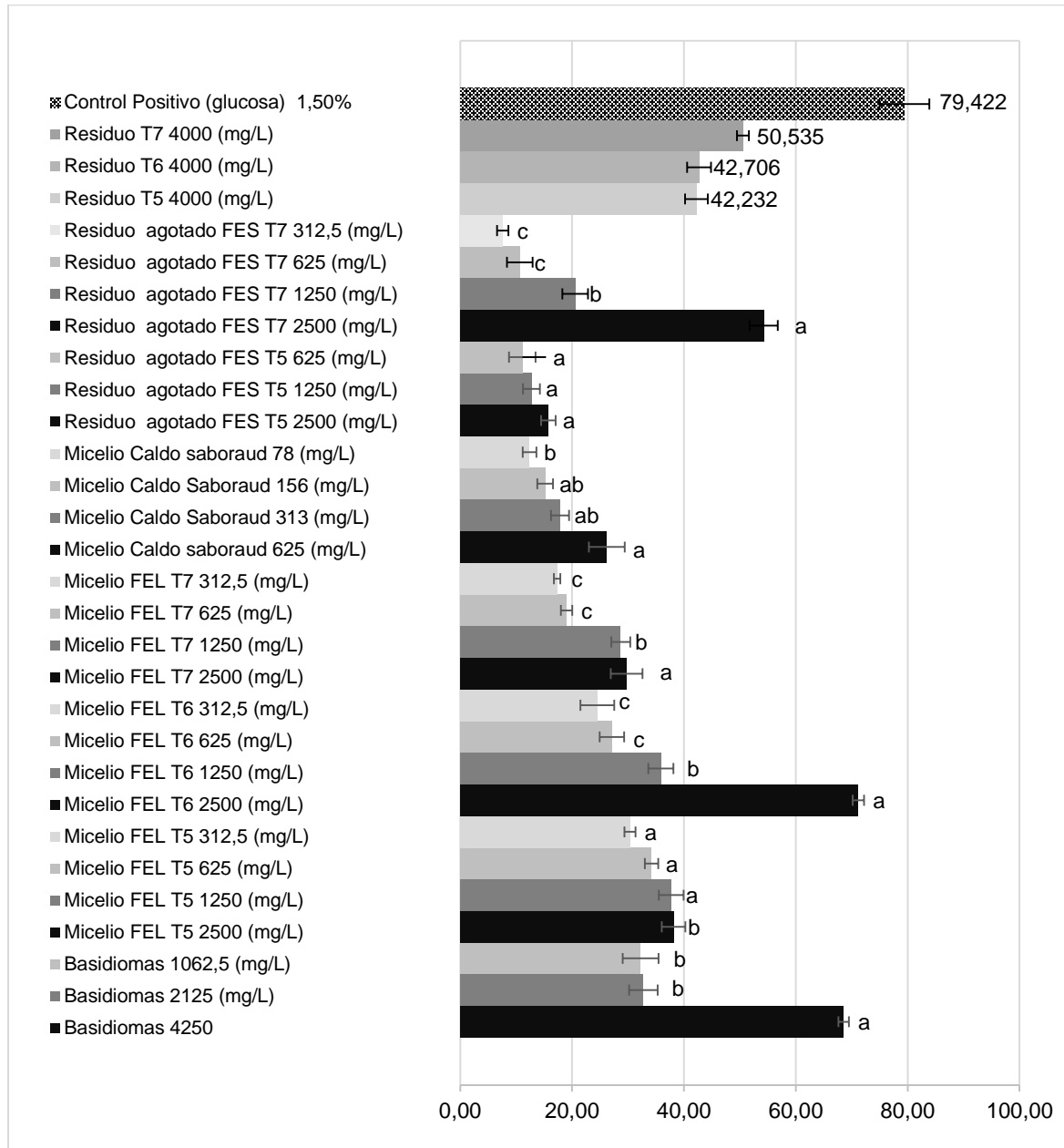
3.4.3 Efecto preliminar prebiótico

Los resultados del análisis estadístico se muestran en el Anexo E, tabla 4-9. La figura 3-8, muestra los porcentajes de estimulación de *L. paracasei* por parte de los extractos acuosos obtenidos. De acuerdo con el ANOVA realizado, se demuestra que existe un efecto significativo sobre el porcentaje de crecimiento generado por los extractos acuosos. Todos los extractos acuosos obtenidos a la mayor concentración, presentaron una estimulación del probiótico entre 15.77- 68.56 %, destacándose los extractos obtenidos de basidiomas colectados (68.56 %) y del micelio obtenido por FEL en los tratamientos T6 (47,416 %) y T7 (54,29 %), a las mayores concentraciones evaluadas.

A diferencia de las actividades antimicrobianas, los controles negativos, los cuales corresponden solo a las combinaciones de residuos, sin inocular la cepa de *L. crinitus*, mostraron porcentajes de estimulación entre 42.23-50.53%, lo cual puede estar relacionado con el contenido de polisacáridos presentes en las combinaciones de residuos empleados como la cascarilla de arroz, salvado de arroz y cáscara de naranja. Estos porcentajes de estimulación del probiótico evaluado generado por los extractos acuosos obtenidos, sugiere que el contenido de polisacáridos presentes en las muestras puede actuar como sustrato para el crecimiento de la bacteria evaluada. Además, también se sugiere que dichos extractos tienen gran potencial para ser utilizados como ingredientes en alimentos funcionales tales como productos dietarios, entre ellos jugos o cervezas (Arena, Russo, Fiocco, Capozzi, & Spano, 2016; W.-T. Chou et al., 2013; Esteban Boza, Ileana Morales, & Marjorie Henderson, 2010; Nowak et al., 2017; Rivera & Oesterling, 2010), dado a que incrementan la viabilidad de dicha bacteria. Además, los extractos que presentaron una mayor estimulación de *L. paracasei*, presentaron efectos inhibitorios de bacterias patógenas evaluadas como *S. typhimurium* y *E. coli*, por lo tanto estos extractos acuosos pueden estimular selectivamente el crecimiento de *L. paracasei*, un microorganismo de la microbiota intestinal. Sin embargo, dado a estos resultados es necesario evaluar de manera *in vitro* e *in vivo*, el potencial prebiótico de dichos extractos así como su posible efecto inmunomodulador u otras actividades biológicas.

Figura 3-8: Crecimiento de *L. paracasei* en medio MRS suplementado con extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por

FEL y de los residuos agotados con *L. crinitus*. Los datos son reportados como la media \pm DE (ANOVA $p < 0.05$).



3.5 CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos sugieren que existe una diferencia en el contenido de polisacáridos y de β -glucanos, dependiente de los tratamientos utilizados, así como de la

técnica empleada para la producción de micelio de *L. crinitus*. Extractos acuosos obtenidos mediante FEL y de basidiomas colectados generaron una estimulación en el crecimiento de *L. paracasei*, así como un efecto inhibitorio de bacterias patógenas como *S. typhimurium* y *E. coli*. En cambio, los extractos acuosos obtenidos mediante FES, mostraron los mayores porcentajes para inhibir patógenos fúngicos como *R. oryzae*. Además, estos resultados sugieren el potencial biotecnológico de moléculas bioactivas producidas por *L. crinitus*, para ser utilizadas como ingredientes en alimentos funcionales, así como su uso como agentes antimicrobianos.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

- La evaluación preliminar del crecimiento micelial de la cepa de *L. crinitus* permitió confirmar que puede crecer sobre sustratos agroindustriales y este crecimiento se ve afectado por la composición del sustrato, en especial por la relación C/N, el contenido de nitrógeno y fósforo. Así que el mejor tratamiento en el que se observó mayor velocidad micelial fue la combinación de sustrato compuesta por cascarilla de arroz y naranja. Sin embargo, al evaluar la obtención de biomasa micelial mediante FEL, se observó que en el tratamiento mixto (cascarilla de arroz, cáscara de naranja y salvado de arroz), fue posible obtener mayor biomasa micelial a los 20 días de inoculado. Esto sugiere que la velocidad de crecimiento en los residuos agroindustriales, depende de una relación de la cepa-sustrato, así como de la técnica empleada. Pese a que en el ensayo preliminar se logró obtener las mejores combinaciones de sustratos para realizar fermentación sólida, no fue posible obtener basidiomas, y por lo tanto, se deben evaluar otros parámetros para generar la producción de setas.
- Los basidiomas colectados, el micelio obtenido mediante FEL y el residuo agotado con *L. crinitus* mediante FES, mostraron altos contenidos de proteína, fibra, y minerales menores, sugiriendo el potencial que pueden tener como fuente alternativa de alimento animal y humano, y cuyos valores pueden ser comparados con legumbres y la carne de origen animal. Además, la utilización de los residuos agotados para alimento animal y dado a sus altos contenidos de nitrógeno, y minerales, su potencial uso como mejoradores de suelos.
- El contenido de polisacáridos y de β -glucanos varió dependiendo del sustrato, la composición de dicho sustrato y la técnica utilizada para la obtención de micelio, así como de los basidiomas colectados. Los datos obtenidos demuestran

contenidos de dichos compuestos, similares e incluso superiores a los reportados en algunas especies cultivables y comestibles. Pese que existe una variedad de métodos para la determinación de β -glucanos, se demostró que la técnica de rojo congo empleada, puede servir para la cuantificación de dichos compuestos, siendo una técnica reproducible y sencilla.

- Extractos acuosos obtenidos mediante FEL y de basidiomas colectados generaron una estimulación en el crecimiento de *L. paracasei*, así como un efecto inhibitorio de bacterias patógenas como *S. typhimurum* y *E. coli*. En cambio, los extractos acuosos obtenidos mediante FES, mostraron los mayores porcentajes para inhibir patógenos fúngicos como *R. oryzae*. Además, se sugiere que la bioactividad de dichos extractos, puede estar relacionada con otros parámetros no evaluados. Estos resultados sugieren el potencial biotecnológico para producir moléculas bioactivas (Polisacáridos y β -glucanos), que podrían ser utilizadas como ingredientes alimentarios o como agentes antimicrobianos.

4.2 Recomendaciones

- Es necesario utilizar otros tipos de solventes para extraer compuestos de diferentes polaridades y evaluar su bioactividad. Además, es necesario realizar identificación de estructuras químicas con técnicas más avanzadas que permitan elucidar los metabolitos activos, encargados de las posibles actividades biológicas.
- Se debe evaluar que otros parámetros pueden afectar la inducción de fructificación.
- Se recomienda evaluar con más detalle, diferentes técnicas para la obtención de la fracción de polisacáridos, así como de las metodologías para su cuantificación.
- Es necesario realizar otras pruebas que fortalezcan los resultados obtenidos de la actividad antimicrobiana y el efecto prebiótico.

A. Anexo: Secuencia consenso del basidioma

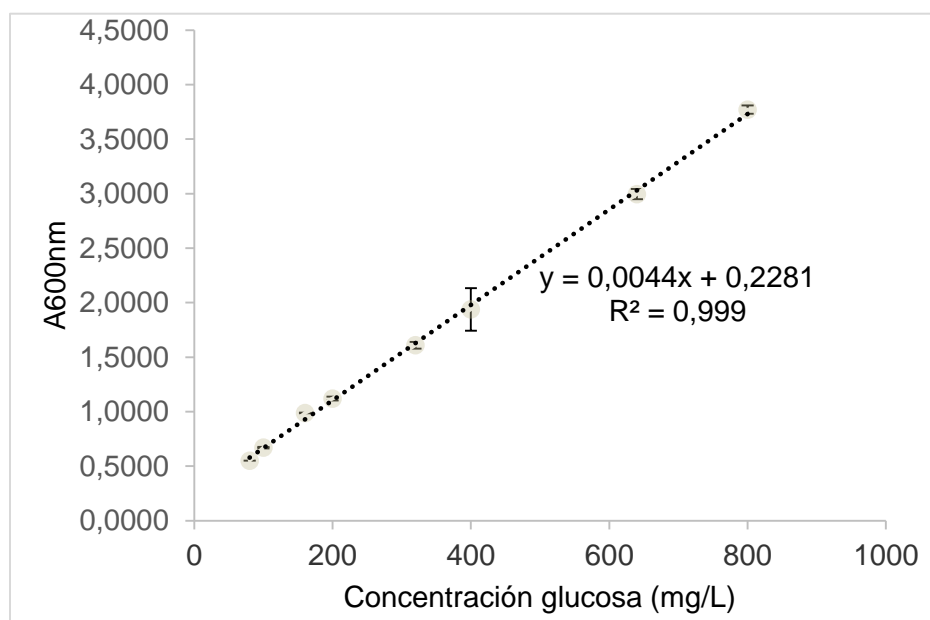
5'AGTAAAAATCGTACAAGGTTTCCGTAGGTGGACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGT
CTTGAAACGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATYCACT
CTACACCTGTGCACTTACTGTAGGCTTTCGGGAGCTTCGAAAGCAGAGGGGGCTGG
CCTTCACAAGCCGGTCTCTAATGCCTGTAGTTGTGACCGGGGCTTACGTCYTACCAC
AAACTCTTACAAGTATCAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTACATACAACTTTC
AGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTG
GTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGAAATTCTCAACCTAACGGGTTCT
TAACCGGACTTGCTTAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTGCGCTTTGCTTCTGGCATAA
GTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCGGATCGGCTCACGGTGTGAT
AATTGTCTACGCCGCGACCGTTGAAGCGTTTTAATGGGCCAGCTTCTAATCGTCTCT
TGCGAGACAACAYTCATCGAACTCTGACCTCAAATCAGGTGRGACTACCCGCTGAAC
TTAAGCTATATT3"

B. Anexo: Secuencia consenso del micelio

5"ATATAGCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCCACCTGATTTGAGGTCAGAGTTCGATGAA
TGTGTCTTGCAAGAGACGATTAGAAGCTGGCCATTAAAACGCTTCAACGGTCGCG
GCGTAGACAATTATCACACCGTGAGCCGATCCGCAAGGAACCAAGCTAATGCATTTA
AGAGGAGCCGACTTATGCCAGAAGCAAAGCCGACAAGCCTCCAAGTCCAAGCCTAA
GCAAGTCCGGTTAAGAACCCGTTAGGTTGAGAATTTTCATGACACTCAAACAGGCATG
CTCCTCGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAAT
TCTGCAATTCACACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAA
GAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTATGTAGATGCGTTACATCGCAATACACATTCTGATA
CTTGTAAGAGTTTGTGGTAAGACGTAAGCCCCGGTCACAACACTACAGGCATTAGAGAC
CGGCTTGTGAAGGCCAGCCCCCTCTGMKTTCRMAGTCCCGAAAGCCTACAGTATG
TGMACAKRYSTATMGTTGCTKMGSMMGGANNGCCCCGKGCACMTTGNGTGCCTCG
GAAGKCCAGSYACAAGCCGGGGGACCTTAASWCTTGT3'

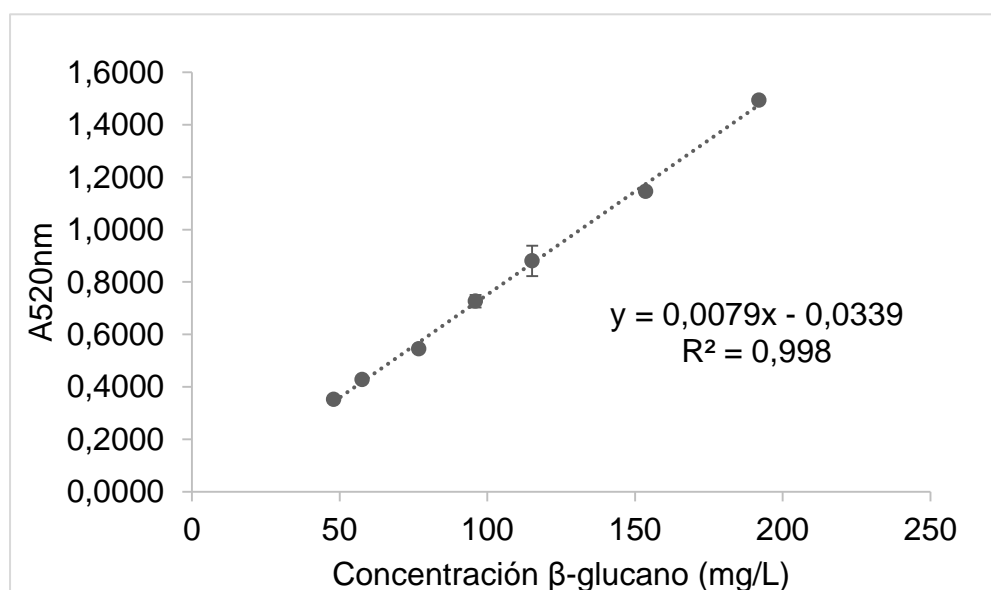
C. Anexo: Curva de calibración para polisacáridos totales

Concentraciones de Glucosa (mg/L)								
0	80	100	160	200	320	400	640	800
0,062	0,614	0,724	1,049	1,164	1,695	1,832	3,103	3,856
0,063	0,613	0,738	1,054	1,183	1,638	2,214	3,065	3,856
0,062	0,612	0,735	1,051	1,199	1,683	1,955	3,008	3,789
Promedio	0,613	0,732	1,052	1,182	1,672	2,000	3,059	3,834
Sin Blanco	0,550	0,672	0,989	1,137	1,620	1,892	2,946	3,727
Desviación	0,001	0,007	0,003	0,018	0,030	0,195	0,048	0,039



D. Anexo: Curva de calibración para β -glucanos

	Concentración de β -glucano Barley (mg/L)						
Concentración	48	57,6	76,8	96	115,2	153,6	192
	0,359	0,424	0,545	0,754	0,888	1,148	1,489
	0,341	0,435	0,546	0,713	0,819	1,143	1,494
	0,359	0,426	0,544	0,713	0,935	1,145	1,499
Promedio	0,353	0,428	0,545	0,727	0,881	1,145	1,494
Desviación	0,010	0,006	0,001	0,023	0,057	0,003	0,005



E. Anexo: Actividad antimicrobiana de extractos acuosos obtenidos

Tabla 4-1: Velocidad de crecimiento y porcentaje de inhibición de *R. oryzae* por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con *L. crinitus*

Muestra	Concentración (mg/L)	Tasa o velocidad de crecimiento	% inhibición
Control -		0,024 ± 0,002	
Control +	2500	0,0070 ± 0,0011	73,38 ± 4,08
Basidiomas	4250	0,013 ± 0,002	45,634 ± 2,98 a
	2125	0,019 ± 0,002	30,73 ± 2,417 b
	1062,5	0,024 ± 0,002	10,13 ± 5,09 c
	531,25	0,026 ± 0,006	NP
Micelio FEL T5	2500	0,0071 ± 0,0007	71,48 ± 2,72 a
	1250	0,0068 ± 0,0007	72,43 ± 3,39 a
	625	0,0090 ± 0,0007	64,25 ± 2,63 b
	312,5	0,0171 ± 0,0049	16,874 ± 1,49 c
Micelio FEL T6	2500	0,00797 ± 0,00378	73,23 ± 2,18 a
	1250	0,00708 ± 0,00061	71,08 ± 2,48 ab
	625	0,00769 ± 0,0010	70,015 ± 1,60 b
	312,5	0,0089 ± 0,0006	63,78 ± 2,89 c
Micelio FEL T7	2500	0,0074 ± 0,0004	72,89 ± 1,69 a
	1250	0,0072 ± 0,0012	70,15 ± 1,78 a
	625	0,0137 ± 0,0061	57,025 ± 4,00 b
	312,5	0,0139 ± 0,0036	44,104 ± 3,23 c

Micelio Saboraud	625,0	0,0061 ± 0,0005	75,30 ± 1,862 a
	312,5	0,0066 ± 0,0009	74,28 ± 2,911 a
	156,3	0,0078 ± 0,0017	65,12 ± 4,908 b
	78,1	0,0083 ± 0,0027	57,037 ± 7,23 c
Residuo agotado FES T5	2500	0,0073 ± 0,0062	72,25 ± 1,750 a
	1250	0,0086 ± 0,0077	66,26 ± 2,35 b
	625	0,0168 ± 0,0015	36,4 ± 5,7 c
	312,5	0,0172 ± 0,0035	31,47 ± 1,48 c
Residuo agotado FES T6	3593	0,0294 ± 0,0011	NP
	1796	0,0318 ± 0,0006	NP
	898	0,0262 ± 0,0012	NP
	449	0,0322 ± 0,0055	NP
Residuo agotado FES T7	2500	0,0192 ± 0,0043	37,55 ± 1,66 a
	1250	0,0172 ± 0,0020	31,95 ± 3,76 a
	625	0,0271 ± 0,0051	NP
	312,5	0,029 ± 0,0011	NP
ResiduoT5	4000	0,0221 ± 0,0020	16,51 ± 1,54
ResiduoT6	4000	0,0279 ± 0,0011	NP
ResiduoT7	4000	0,0344 ± 0,0011	NP

Cada valor es expresado como media ± desviación estándar (n = 7) (ANOVA p<0.05). No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellas letras iguales, para cada muestra.

Prueba de Rangos Múltiples de Bonferroni. NP: No presenta inhibición.

Tabla 4-2: Velocidad de crecimiento y porcentaje de inhibición de *Penicillium sp* por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con *L. crinitus*.

Muestra	Concentración (mg/L)	Tasa o velocidad de crecimiento	% inhibición
Control -		0,004 ± 0,003	
Control +	2500,0	0,0068 ± 0,0011	68,02 ± 2,05
Basidiomas	4250,0	0,0107 ± 0,0024	NP
	2125,0	0,0111 ± 0,0014	NP
	1062,5	0,0085 ± 0,0013	NP
	531,3	0,0161 ± 0,0079	NP

Micelio FEL T5	2500,0	0,0147 ± 0,0056	NP
	1250,0	0,0078 ± 0,0005	NP
	625,0	0,0068 ± 0,0017	NP
	312,5	0,0061 ± 0,0008	NP
Micelio FEL T6	2500,0	0,0099 ± 0,0013	NP
	1250,0	0,0082 ± 0,0025	NP
	625,0	0,0075 ± 0,0028	NP
	312,5	0,0069 ± 0,0006	NP
Micelio FEL T7	2500,0	0,0213 ± 0,0068	NP
	1250,0	0,0103 ± 0,0023	NP
	625,0	0,0071 ± 0,0006	NP
	312,5	0,0067 ± 0,0004	NP
Micelio Saboraud	625,0	0,0073 ± 0,0023	NP
	312,5	0,0068 ± 0,0026	NP
	156,3	0,0065 ± 0,0009	NP
	78,1	0,0064 ± 0,0012	NP
Residuo agotado FES T5	2500,0	0,0218 ± 0,0041	NP
	1250,0	0,0185 ± 0,0013	NP
	625,0	0,0172 ± 0,0043	NP
	312,5	0,0168 ± 0,0033	NP
Residuo agotado FES T6	3592,5	0,0045 ± 0,0023	35,61 ± 2,97 a
	1796,3	0,0049 ± 0,0026	30,04 ± 5,76 a
	898,1	0,0240 ± 0,0018	NP
	449,1	0,0242 ± 0,0114	NP
Residuo agotado FES T7	2500,0	0,0220 ± 0,0006	NP
	1250,0	0,0175 ± 0,0008	NP
	625,0	0,0158 ± 0,0011	NP
	312,5	0,0130 ± 0,0066	NP
ResiduoT5	4000,0	0,0274 ± 0,0058	NP
ResiduoT6	4000,0	0,0230 ± 0,0077	NP
ResiduoT7	4000,0	0,0211 ± 0,0038	NP

Cada valor es expresado como media \pm desviación estándar (n = 7) (ANOVA $p < 0.05$). No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellas letras iguales, para cada muestra.

Prueba de Rangos Múltiples de Bonferroni. NP: No presenta inhibición.

Tabla 4-3: Velocidad de crecimiento y porcentaje de inhibición de *F. oxysporum* por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con *L. crinitus*.

Muestra	Concentración (mg/L)	Tasa o velocidad de crecimiento	% inhibición
Control -		0,010 \pm 0,002	
Control +	2500	0,0045 \pm 0,0006	45,73 \pm 4,13
Basidiomas	4250	0,0218 \pm 0,0026	NP
	2125	0,0112 \pm 0,007	NP
	1062,5	0,0167 \pm 0,0096	NP
	531,25	0,0103 \pm 0,0007	NP
Micelio FEL T5	2500	0,0074 \pm 0,0011	33,37 \pm 2,52 a
	1250	0,0076 \pm 0,0005	21,21 \pm 4,62 b
	625	0,0079 \pm 0,0008	17,39 \pm 4,44 bc
	312,5	0,0089 \pm 0,0010	12,7 \pm 2,79 c
Micelio FEL T6	2500	0,0072 \pm 0,0003	24,8 \pm 0,31 a
	1250	0,0075 \pm 0,002	21,71 \pm 2,2 b
	625	0,0078 \pm 0,0003	18,74 \pm 2,78 b
	312,5	0,0092 \pm 0,0001	3,62 \pm 1,42 c
Micelio FEL T7	2500	0,0099 \pm 0,0025	9,91 \pm 2,54
	1250	0,0203 \pm 0,0053	NP
	625	0,0128 \pm 0,0016	NP
	312,5	0,011 \pm 0,0007	NP
Micelio Saboraud	625	0,0064 \pm 0,0002	30,21 \pm 2,67 a
	312,5	0,0062 \pm 0,0001	32,09 \pm 0,790 a
	156,3	0,0062 \pm 0,0005	32,64 \pm 5,08 a
	78	0,0062 \pm 0,0002	32,69 \pm 2,54 a
Residuo agotado FES T5	2500	0,0171 \pm 0,0038	NP
	1250	0,0165 \pm 0,0036	NP
	625	0,0153 \pm 0,0017	NP
	312,5	0,0147 \pm 0,0027	NP
Residuo agotado FES T6	3593	0,0215 \pm 0,0009	NP
	1796	0,0161 \pm 0,0024	NP

	898	0,0102 ± 0,0015	NP
	449	0,0092 ± 0,0003	NP
Residuo agotado FES T7	2500	0,0139 ± 0,0014	NP
	1250	0,0138 ± 0,0007	NP
	625	0,0123 ± 0,0005	NP
	312,5	0,0120 ± 0,0008	NP
	ResiduoT5	4000	0,0173 ± 0,0025
ResiduoT6	4000	0,0165 ± 0,0041	NP
ResiduoT7	4000	0,0158 ± 0,0022	NP

Cada valor es expresado como media ± desviación estándar (n = 7) (ANOVA p<0.05). No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellas letras iguales, para cada muestra.

Prueba de Rangos Múltiples de Bonferroni. NP: No presenta inhibición.

Tabla 4-4: Velocidad de crecimiento y porcentaje de inhibición de *A. niger* por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con *L. crinitus*.

Muestra	Concentración (mg/L)	Tasa o velocidad de crecimiento	% inhibición
Control -		0,010 ± 0,004	
Control +	2500	0,0048 ± 0,0008	52,7 ± 1,25
Basidiomas	4250	0,0062 ± 0,0006	34,41 ± 0,43 a
	2125	0,0069 ± 0,0003	27,47 ± 3,01 b
	1062,5	0,0081 ± 0,0001	14,45 ± 1,08 c
	531,25	0,0132 ± 0,0029	NP
Micelio FEL T5	2500	0,006 ± 0,0005	37,01 ± 4,85 a
	1250	0,0073 ± 0,0007	22,66 ± 3,5 b
	625	0,0074 ± 0,0004	22,35 ± 3,83 b
	312,5	0,00194 ± 0,0047	NP
Micelio FEL T6	2500	0,0072 ± 0,0003	32,69 ± 3,83 a
	1250	0,0075 ± 0,002	29,74 ± 2,55 a
	625	0,0078 ± 0,0003	24,11 ± 3,89 bc
	312,5	0,0092 ± 0,0001	15,57 ± 2,42 c
Micelio FEL T7	2500	0,0072 ± 0,0017	32,59 ± 1,97 a
	1250	0,0075 ± 0,0011	29,52 ± 1,76 a

	625	0,0083 ± 0,0007	21,83 ± 6,41 a
	312,5	0,0096 ± 0,0007	9,69 ± 1,95 b
Micelio Sabouraud	625,0	0,0064 ± 0,0002	53,89 ± 4,12 a
	312,5	0,0062 ± 0,0001	50,39 ± 2,95 a
	156,3	0,0062 ± 0,0005	53,07 ± 2,47 a
	78	0,0062 ± 0,0002	50,43 ± 3,63 a
Residuo agotado FES T5	2500	0,0206 ± 0,0048	NP
	1250	0,0191 ± 0,0015	NP
	625	0,0127 ± 0,0030	NP
	312,5	0,0120 ± 0,0030	NP
Residuo agotado FES T6	3593	0,0036 ± 0,0002	43,46 ± 2,77 a
	1796	0,0161 ± 0,0024	39,57 ± 4,83 a
	898	0,0102 ± 0,0015	NP
	449	0,0092 ± 0,0003	NP
Residuo agotado FES T7	2500	0,0219 ± 0,0065	NP
	1250	0,0182 ± 0,0039	NP
	625	0,0170 ± 0,0065	NP
	312,5	0,0167 ± 0,0040	NP
ResiduoT5	4000	0,0169 ± 0,0049	NP
ResiduoT6	4000	0,0236 ± 0,0040	NP
ResiduoT7	4000	0,0078 ± 0,0046	NP

Cada valor es expresado como media ± desviación estándar (n = 7) (ANOVA p<0.05). No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellas letras iguales, para cada muestra.

Prueba de Rangos Múltiples de Bonferroni. NP: No presenta inhibición.

Tabla 4-5: Velocidad de crecimiento y porcentaje de inhibición de *S. aureus* por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con *L. crinitus*.

Muestra	Concentración (mg/L)	Tasa o velocidad de crecimiento	% inhibición
Control -		0,03 ± 0,01	
Control +	2500	0,0210 ± 0,0007	14,7 ± 1,77
Basidiomas	4250	0,0840 ± 0,0052	NP
	2125	0,0665 ± 0,0104	NP
	1062,5	0,0572 ± 0,0029	NP
	531,25	0,0578 ± 0,0049	NP

Micelio FEL T5	2500	0,0667 ± 0,0026	NP
	1250	0,06 ± 0,0043	NP
	625	0,0576 ± 0,0055	NP
	312,5	0,0501 ± 0,0021	NP
Micelio FEL T6	2500	0,0605 ± 0,0068	NP
	1250	0,0560 ± 0,0033	NP
	625	0,0532 ± 0,0041	NP
	312,5	0,0502 ± 0,0025	NP
Micelio FEL T7	2500	0,0337 ± 0,0004	NP
	1250	0,0327 ± 0,0025	NP
	625	0,0274 ± 0,0027	NP
	312,5	0,0229 ± 0,0025	NP
Micelio Caldo saboraud	625	0,0349 ± 0,0021	NP
	313	0,0323 ± 0,0011	NP
	156	0,0307 ± 0,0013	NP
	78	0,0307 ± 0,009	NP
Residuo agotado FES T5	2500	0,0476 ± 0,0075	NP
	1250	0,0426 ± 0,0069	NP
	625	0,0355 ± 0,0037	NP
	312,5	0,0266 ± 0,0023	NP
Residuo agotado FES T6	3593	0,0396 ± 0,0055	NP
	1796	0,0388 ± 0,0079	NP
	898	0,0375 ± 0,0041	NP
	449	0,03 ± 0,0078	NP
Residuo agotado FES T7	2500	0,0180 ± 0,0006	13,3 ± 1,09 a
	1250	0,0188 ± 0,0010	9,24 ± 1,67 a
	625	0,0411 ± 0,0127	NP
	312,5	0,0346 ± 0,0159	NP
Residuo T5	4000	0,0519 ± 0,0038	NP
Residuo T6	4000	0,0524 ± 0,0034	NP
Residuo T7	4000	0,0572 ± 0,0028	NP

Cada valor es expresado como media ± desviación estándar (n = 7) (ANOVA p<0.05). No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellas letras iguales, para cada muestra.

Prueba de Rangos Múltiples de Bonferroni. NP: No presenta inhibición.

Tabla 4-6: Velocidad de crecimiento y porcentaje de inhibición de *S. typhimurium* por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con *L. crinitus*

Muestra	Concentración (mg/L)	Tasa o velocidad de crecimiento	% inhibición
Control -		0,005 ± 0,001	
Control +	2500	0,0219 ± 0,0013	56,27 ± 2,62
Basidiomas	4250	0,0217 ± 0,0025	56,93 ± 4,86 a
	2125	0,0457 ± 0,0036	9,43 ± 2,19 b
	1062,5	0,0085 ± 0,0013	8,98 ± 2,70 b
	531,25	0,0057 ± 0,0047	NP
Micelio FEL T5	2500	0,0398 ± 0,0012	21,03 ± 2,39 a
	1250	0,0424 ± 0,0012	15,92 ± 2,36 b
	625	0,0451 ± 0,0015	10,66 ± 2,99 c
	312,5	0,0458 ± 0,0009	9,29 ± 1,74 c
Micelio FEL T6	2500	0,0360 ± 0,0013	28,6 ± 2,07 a
	1250	0,0368 ± 0,0007	27,01 ± 1,36 a
	625	0,0384 ± 0,0003	23,83 ± 0,50 b
	312,5	0,0403 ± 0,0011	20,06 ± 2,19 c
Micelio FEL T7	2500	0,0229 ± 0,0025	53,98 ± 1,09 a
	1250	0,0274 ± 0,0027	46,44 ± 5,36 b
	625	0,0327 ± 0,0025	34,42 ± 2,01 c
	312,5	0,0337 ± 0,0004	29,73 ± 2,67 c
Micelio Caldo Saboraud	625	0,0307 ± 0,0013	38,33 ± 2,65 a
	313	0,0307 ± 0,009	38,32 ± 1,85 a
	156	0,0323 ± 0,0011	35,19 ± 2,29 b
	78	0,0349 ± 0,0021	29,9 ± 4,19 c
Residuo agotado FES T5	2500	0,0266 ± 0,0023	46,94 ± 4,50 a
	1250	0,0355 ± 0,0037	29,14 ± 3,390 b
	625	0,0425 ± 0,0020	15,13 ± 4,08 c
	312,5	0,0441 ± 0,0030	11,84 ± 2,97 c
Residuo agotado FES T6	3593	0,0258 ± 0,0023	48,46 ± 4,66 a
	1796	0,0375 ± 0,0021	25,11 ± 4,140 b
	898	0,0387 ± 0,0030	22,74 ± 5,9 bc
	449	0,0415 ± 0,0022	17,15 ± 4,49 c
Residuo agotado FES T7	2500	0,020 ± 0,0029	59,96 ± 2,73 a
	1250	0,0210 ± 0,0025	57,78 ± 5,030 a

	625	0,0254 ± 0,0028	48,97 ± 5,59 b
	312,5	0,0341 ± 0,0024	31,62 ± 4,89 c
Residuo T5	4000	0,0524 ± 0,0030	NP
Residuo T6	4000	0,0572 ± 0,0028	NP
Residuo T7	4000	0,0524 ± 0,0034	NP

Cada valor es expresado como media ± desviación estándar (n = 7) (ANOVA p<0.05). No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellas letras iguales, para cada muestra.

Prueba de Rangos Múltiples de Bonferroni. NP: No presenta inhibición.

Tabla 4-7: Velocidad de crecimiento y porcentaje de inhibición de *E. coli* por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con *L. crinitus*

Muestra	Concentración (mg/L)	Tasa o velocidad de crecimiento	% inhibición
Control -		0,005 ± 0,001	
Control +	2500	0,0218 ± 0,0013	56,3 ± 2,63
Basidiomas	4250	0,0348 ± 0,0014	24,83 ± 3,10 a
	2125	0,0370 ± 0,0011	20,11 ± 2,45 b
	1062,5	0,0447 ± 0,0013	3,37 ± 2,81 c
	531,25	0,0453 ± 0,0005	2,19 ± 1,18 c
Micelio FEL T5	2500	0,0358 ± 0,0022	22,72 ± 4,66 a
	1250	0,0356 ± 0,0006	23,03 ± 1,310 a
	625	0,0363 ± 0,0016	21,54 ± 3,46 a
	312,5	0,0370 ± 0,0028	20,1 ± 6,11 a
Micelio FEL T6	2500	0,0324 ± 0,0036	29,98 ± 7,75 a
	1250	0,0353 ± 0,0029	23,82 ± 6,2 ab
	625	0,0349 ± 0,0013	24,62 ± 2,77 ab
	312,5	0,0350 ± 0,0009	24,51 ± 1,84 b
Micelio FEL T7	2500	0,0443 ± 0,0015	2,67 ± 2,62
	1250	0,0481 ± 0,0033	NP
	625	0,0473 ± 0,0010	NP
	312,5	0,0470 ± 0,0022	NP
Micelio Caldo saboraud	625	0,0410 ± 0,0010	8,55 ± 2,16 a
	313	0,0413 ± 0,0030	7,91 ± 2,68 ab
	156	0,0418 ± 0,0018	6,79 ± 3,92 ab
	78	0,0434 ± 0,0010	3,08 ± 2,27 b

Residuo agotado FES T5	2500	0,0553 ± 0,0009	NP
	1250	0,0524 ± 0,0018	NP
	625	0,0504 ± 0,0017	NP
	312,5	0,0479 ± 0,0042	NP
Residuo agotado FES T6	3593	0,0535 ± 0,0008	NP
	1796	0,0518 ± 0,0015	NP
	898	0,0495 ± 0,0014	NP
	449	0,0421 ± 0,0035	NP
Residuo agotado FES T7	2500	0,0491 ± 0,0019	NP
	1250	0,0485 ± 0,0016	NP
	625	0,0477 ± 0,0009	NP
	312,5	0,0465 ± 0,0009	NP
Residuo T5	4000	0,066 ± 0,0023	NP
Residuo T6	4000	0,0702 ± 0,004	NP
Residuo T7	4000	0,0673 ± 0,0025	NP

Cada valor es expresado como media ± desviación estándar (n = 7) (ANOVA p<0.05). No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellas letras iguales, para cada muestra.

Prueba de Rangos Múltiples de Bonferroni. NP: No presenta inhibición.

Tabla 4-8: Velocidad de crecimiento y porcentaje de inhibición de *B. cereus* por acción de extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con *L. crinitus*

Muestra	Concentración (mg/L)	Tasa o velocidad de crecimiento	% inhibición
Control -		0,03 ± 0,004	
Control +	2500	0,02 ± 0,0015	10,7 ± 6,86
Basidiomas	4250	0,0840 ± 0,0052	NP
	2125	0,0665 ± 0,0085	NP
	1062,5	0,0572 ± 0,0029	NP
	531,25	0,0578 ± 0,0049	NP
Micelio FEL T5	2500	0,0667 ± 0,0055	NP
	1250	0,0576 ± 0,0055	NP
	625	0,06 ± 0,0043	NP
	312,5	0,0501 ± 0,0022	NP
Micelio FEL T6	2500	0,0605 ± 0,0068	NP
	1250	0,0560 ± 0,0033	NP

	625	0,0532 ± 0,0041	NP
	312,5	0,0502 ± 0,0025	NP
Micelio FEL T7	2500	0,0697 ± 0,0036	NP
	1250	0,0565 ± 0,0043	NP
	625	0,0551 ± 0,0055	NP
	312,5	0,0549 ± 0,0071	NP
Micelio Caldo Saboraud	625	0,0530 ± 0,0055	NP
	313	0,0534 ± 0,0029	NP
	156	0,0428 ± 0,0057	NP
	78	0,0401 ± 0,0028	NP
Residuo agotado FES T5	2500	0,0602 ± 0,0022	NP
	1250	0,0504 ± 0,0187	NP
	625	0,0510 ± 0,0010	NP
	312,5	0,0530 ± 0,0014	NP
Residuo agotado FES T6	3593	0,0606 ± 0,0052	NP
	1796	0,0514 ± 0,0038	NP
	898	0,0532 ± 0,0010	NP
	449	0,0538 ± 0,0003	NP
Residuo agotado FES T7	2500	0,0673 ± 0,0027	NP
	1250	0,0630 ± 0,0069	NP
	625	0,0533 ± 0,0041	NP
	312,5	0,0579 ± 0,0047	NP
Residuo T5	4000	0,0680 ± 0,0065	NP
Residuo T6	4000	0,0751 ± 0,0099	NP
Residuo T7	4000	0,0656 ± 0,0095	NP

Cada valor es expresado como media ± desviación estándar (n = 7) (ANOVA p<0.05). No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellas letras iguales, para cada muestra.

Prueba de Rangos Múltiples de Bonferroni. NP: No presenta inhibición.

Tabla 4-9: Crecimiento de *L. paracaseii* en medio MRS suplementado con extractos acuosos obtenidos tanto de los basidiomas colectados como del micelio obtenido por FEL y de los residuos agotados con *L. crinitus*

Muestra	Concentración (mg/L)	% de crecimiento
Basidiomas	4250	68,56 ± 0,92 a
	2125	32,76 ± 2,55 b
	1062,5	32,24 ± 3,20 b

	531,25	29,70 ± 2,86 b
Micelio FEL T5	2500	38,15 ± 2,10 a
	1250	37,73 ± 2,20 a
	625	34,18 ± 1,20 a
	312,5	30,35 ± 1 a
Micelio FEL T6	2500	71,18 ± 1 a
	1250	35,88 ± 2,23 b
	625	27,10 ± 2,20 c
	312,5	24,50 ± 3,01 c
Micelio FEL T7	2500	29,77 ± 2,84 a
	1250	28,70 ± 1,68 b
	625	19,016 ± 1 c
	312,5	17,32 ± 0,57 c
Micelio Caldo saboraud	625	26,18 3,2 a
	313	17,84 ± 1,6 ab
	156	15,18 ± 1,4 b
	78	12,39 ± 1,230 b
Residuo agotado FES T5	2500	15,77 ± 1,3 a
	1250	12,729 ± 1,5 a
	625	11,096 ± 2,35 a
	312,5	3,198 ± 3,2 a
Residuo agotado FES T6	3593	47,416 ± 1,2 a
	1796	33,19 ± 2,27 b
	898	19,62 ± 2,1 c
	449	9,40 ± 3,2 d
Residuo agotado FES T7	2500	54,29 ± 2,5 a
	1250	20,56 ± 2,3 b
	625	10,65 ± 2,3 c
	312,5	7,60 ± 1 c
Residuo T5	4000	42,23 ± 2,02
Residuo T6	4000	42,706 ± 2,14
Residuo T7	4000	50,53 ± 1,06
Control Positivo (Glucosa)	1,50%	79,421 ± 4,47

Cada valor es expresado como media \pm desviación estándar (n = 7) (ANOVA $p < 0.05$). No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellas letras iguales, para cada muestra.

Prueba de Rangos Múltiples de Bonferroni.NP: No presenta inhibición.

Bibliografía

- Abate, D., & Abraham, W. R. (1994). Antimicrobial metabolites from *Lentinus crinitus*. *Journal of Antibiotics*, 47(11), 1348–1350.
- Abdullah, N., Ismail, R., Johari, N. M. K., & Annuar, M. S. M. (2013). Production of liquid spawn of an edible grey oyster mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél by submerged fermentation and sporophore yield on rubber wood sawdust. *Scientia Horticulturae*, 161, 65–69. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.06.026>
- Ainsworth, A. M. (1995). Technical Information Sheet No. 11: Isolation techniques for basidiomycetes. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11, 364–366.
- Andrade, E. F., Lobato, R. V., Araújo, T. V. De, Zangerônimo, M. G., Sousa, R. V. De, & Pereira, L. J. (2015). Effect of beta-glucans in the control of blood glucose levels of diabetic patients: a systematic review. *Nutrición Hospitalaria*, 31(1), 170–177. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.1.7597>
- Andrade Gallegos, R. H., & Mata, G. S. (2012). La producción iberoamericana de hongos comestibles en el contexto internacional. *Hongos Comestibles Y Medicinales En Iberoamérica: Investigación Y Desarrollo En Un Entorno Multiculturalp.* 9-16.
- Antony bacic, Fincher, G., & Stone, B. (2012). *Chemistry, biochemistry and Biology of (1-->3)-Beta-Glucans and Related Polusaccharides* (Vol. XXXIII). <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Arana gabriel, Y., Burrola aguilar, C., Garibay orijel, R., & Franco maass, S. (2014). Obtención de cepas y producción de inóculo de cinco especies de hongos silvestres comestibles de alta montaña en el centro de México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales Y Del Ambiente*, 20(3), 213–226. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2014.04.017>

- Arena, M. P., Russo, P., Fiocco, D., Capozzi, V., & Spano, G. (2016). β -Glucans and Synbiotic Foods. In *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics* (pp. 423–433).
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802189-7.00028-9>
- Arzave, J. A. R. (1987). *Manual de prácticas de bioquímica* (4th ed.). Monterrey, N. L.
- Bai, M. S., Wang, C., Zong, S. C., Lei, M., & Gao, J. M. (2013). Antioxidant polyketide phenolic metabolites from the edible mushroom *Cortinarius purpurascens*. *Food Chemistry*, *141*(4), 3424–3427. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.099>
- Bak, W. C., Park, J. H., Park, Y. A., & Ka, K. H. (2014). Determination of Glucan Contents in the Fruiting Bodies and Mycelia of *Lentinula edodes* Cultivars. *Mycobiology*, *42*(3), 301–304. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2014.42.3.301>
- Barba, M., Assumpc, F., Maieves, H., Lopes, G., Avila, S., Hornung, P., ... Hoffmann, R. (2016). Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *21*. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.005>
- Bergter, E. B., & Figueiredo, R. (2014). Fungal glycans and the innate immune recognition. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *4*(1), 145.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00145>
- Bermúdez, R. C., García, N., Serrano, M., Rodríguez, M. I., & Mustelier, I. (2014). Conversión de residuales agroindustriales en productos de valor agregado por fermentación en estado sólido. *Tecnología Química*, *34*(3), 263–274.
- Berne, S., Pohleven, F., Turk, T., & Sepc, K. (2008). Induction of fruiting in oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) by polymeric 3-alkylpyridinium salts. *Mycological Research*, *112*, 1085–1087. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.03.009>
- Bisaria, R., Madan, M., & Vasudevan, P. (1997). Utilisation of agroresidues as animal feed through bioconversion. *Bioresource Technology*, *59*(1), 5–8.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.005>
- Bishop, K. S., Kao, C. H. J., Xu, Y., Glucina, M. P., Paterson, R. R. M., & Ferguson, L. R. (2015). From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in

- nutraceuticals. *Phytochemistry*, 114, 56–65.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.02.015>
- Blackwell, M. (2011). The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species?. *American Journal of Botany*, 98(3), 426–438. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000298>
- Boa, E. (2005a). Los hongos silvestres comestibles: Perspectiva global de su uso e importancia para la población. *Productos Forestales No Madereros*, 163.
- Boa, E. (2005b). *Los hongos silvestres comestibles. Perspectiva global de su uso e importancia para la población.*
- Brauer, D., Kimmons, T. E., Phillips, M., & Brauer, D. E. (2010). Potential for manipulating the polysaccharide content of shiitake mushrooms. *Formatex*, 1136–1142.
- Brennan, M. A., Derbyshire, E., Tiwari, B. K., & Brennan, C. S. (2013). Integration of β -Glucan Fibre Rich Fractions from Barley and Mushrooms to Form Healthy Extruded Snacks. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68(1), 78–82.
<https://doi.org/10.1007/s11130-012-0330-0>
- Cardona, M. G., Sorza, J. D., Posada, S. L., Carmona, J. C., Ayala, S. A., & Alvarez, O. L. (2002). Establecimiento de una base de datos para la elaboración de tablas de contenido nutricional de alimentos para animales. *Rev Col Cien Pec*, 15, 240–246.
- Cardoso, R. V. C., Fernandes, Â., Oliveira, M. B. P. P., Calhelha, R. C., Barros, L., Martins, A., & Ferreira, I. (2017). Development of nutraceutical formulations based on the mycelium of *Pleurotus ostreatus*. *Food & Function*, 8(6), 2155–2164.
<https://doi.org/10.1039/c7fo00515f>
- Carrasco-González, J. A., Serna-Saldívar, S. O., & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2017). Nutritional composition and nutraceutical properties of the *Pleurotus* fruiting bodies: Potential use as food ingredient. *Journal of Food Composition and Analysis*, 58, 69–81. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.01.016>
- Castellani, A. (1963). Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 20, 1–6. <https://doi.org/10.1007/BF02054872>

- Caz, V., Gil-Ramírez, A., Largo, C., Taberero, M., Santamaría, M., Martín-Hernández, R., ... Soler-Rivas, C. (2015). Modulation of Cholesterol-Related Gene Expression by Dietary Fiber Fractions from Edible Mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(33), 7371–7380. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02942>
- Chang, C. W., & Chein, R. J. (2011). Absolute configuration of anti-HIV-1 agent (-)-concentricolide: Total synthesis of (+)-(R)-concentricolide. *Journal of Organic Chemistry*, 76, 4154–4157. <https://doi.org/10.1021/jo2004132>
- Chang, R. (1996). Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition Reviews*, 54, S91–S93. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(00\)00341-5](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(00)00341-5)
- Chang, S. (2009). *Training manual on mushroom cultivation technology*.
- Chaparro, D. F., Rosas, D. C., & Varela, A. (2009). Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera (Quindío, Colombia). *Revista Iberoamericana de Micología*, 26(4), 238–243. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2009.03.005>
- Chapingo, R., Martínez, B. A., Zárate, C. M., Comestibles, L. O. S. H., Santa, S. D. E., Del, C., ... Monte, D. E. L. (2006). Los hongos comestibles silvestres. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales Y Del Ambiente*, 12, 125–131.
- Chávez, A. A., & Metodología, I. V. (2010). Implementación de la tecnología de producción de hongos comestibles y medicinales en desechos agroindustriales, como apoyo socioeconómico familiar en dos comunidades rurales y urbanas del Departamento de Córdoba, Colombia. In *Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los hongos comestibles* (p. 407). Porfirio MORALES.
- Chegwin A., C., & Nieto R., I. J. (2013). 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. *Revista Mexicana de Micología*, 37, 01–09.
- Chen, S.-N., Chang, C.-S., Hung, M.-H., Chen, S., Wang, W., Tai, C.-J., & Lu, C.-L. (2014). The Effect of Mushroom Beta-Glucans from Solid Culture of *Ganoderma*

- lucidum on Inhibition of the Primary Tumor Metastasis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 7.
<https://doi.org/10.1155/2014/252171>
- Chen, S. N. (2009, April 16). Method of producing liquid and powered mushroom beta-glucan. Google Patents. Retrieved from
<https://www.google.com/patents/US20090098619>
- Cheung, P. C. K. (2008). Nutritional Value and Health Benefits of Mushrooms. In *Mushrooms as Functional Foods* (pp. 71–109). Retrieved from
<http://dx.doi.org/10.1002/9780470367285.ch3>
- Cheung, P. C. K. (2013). Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: Preparation and health benefits. *Food Science and Human Wellness*, 2(3–4), 162–166. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2013.08.001>
- Chiang, S.-S., Liang, Z.-C., Wang, Y.-C., & Liang, C.-H. (2017). Effect of light-emitting diodes on the production of cordycepin, mannitol and adenosine in solid-state fermented rice by *Cordyceps militaris*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 60, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.03.007>
- Chou, W.-T., Sheih, I. C., & Fang, T. J. (2013). The Applications of Polysaccharides from Various Mushroom Wastes as Prebiotics in Different Systems. *Journal of Food Science*, 78(7), M1041–M1048. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12160>
- Chou, W. T., Sheih, I. C., & Fang, T. J. (2013). The applications of polysaccharides from various mushroom wastes as prebiotics in different systems. *Journal of Food Science*, 78(7). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12160>
- CLSI. (2009). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi ; Approved Standard — Second Edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, 28, 1–35.
- CLSI. (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition* (Vol. 32).
- Cohen, R., Persky, L., & Hadar, Y. (2002). Biotechnological applications and potential of

wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0930-y>

Curtis, H., & Barnes, N. (2001). *Biología*.

Deng, G. (2013). A phase I/II trial of a polysaccharide extract from *Grifola frondosa* in breast cancer patients immunological effects. *J Cancer Res Clin Oncol*, 135(9), 1215–1221. <https://doi.org/10.1007/s00432-009-0562-z.A>

Dinis, M. J., Bezerra, R. M. F., Nunes, F., Dias, A. A., Guedes, C. V., Ferreira, L. M. M., ... Rodrigues, M. A. M. (2009). Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. *Bioresource Technology*, 100(20), 4829–4835. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.036>

DuBois, M., Gilles, K. a., Hamilton, J. K., Rebers, P. a., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

Dyker, G. (2002). Synthesis of Heterocycles. *Heterocycles*, (Scheme 1), 1255–1282. <https://doi.org/10.1002/9780470682531.w9781118438732pat0800>

Escalante, H., Orduz, J., Zapata, H. J., Cardona, M. C., & Duarte, M. (2011). Atlas del potencial energético de la biomasa residual en Colombia. *Bucaramanga, Colombia. Ediciones Universidad Industrial de Santander*.

Espinosa-Ortiz, E. J., Rene, E. R., Pakshirajan, K., van Hullebusch, E. D., & Lens, P. N. L. (2015). Fungal pelleted reactors in wastewater treatment: applications and perspectives. *Chemical Engineering Journal*, 283, 553–571. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.07.068>

Esteban Boza, M., Ileana Morales, H., & Marjorie Henderson, G. (2010). Development of Mature Cheese With the Addition of the Probiotic Culture. *Centro Nacional de Ciencia Y Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.*, 37(6), 215–223.

FAO. (2008). *Pago por Servicios Ambientales en Áreas Protegidas en América Latina*.

- Programa FAO/OAPN: Fortalecimiento del Manejo Sostenible de los Recursos Naturales en las Áreas Protegidas de América Latina*. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-i0822s.pdf>
- FAO. (2010). Control de plagas y enfermedades, 1–13.
- Fazaeli, H., & Masoodi, A. R. T. (2004). Spent Wheat Straw Compost of *Agaricus bisporus* Mushroom as Ruminant Feed. *Asian-Aust. J. Anim.*
- FDA. FDA, GRAS Notice (Mushroom Beta Glucan) 000413 (2011).
- Feeney, M. J., & Miller, A. M. (2014). Mushrooms - Biologically Distinct and Nutritionally Unique Exploring a “ Third Food Kingdom .” *Food and Nutrient Intake*, 49(6), 301–307. <https://doi.org/10.1097/NT.0000000000000063>
- Feng, Z. L., Fang, T. J., Qian, Y. X., & Rong, W. H. (2014). The clinical research for Ganoderan’s effect on preventing and treating cerebral arteriosclerosis through inhibiting NADPH oxidizing enzyme expression. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(4 Suppl), 1107–1111.
- Figueiredo, Á., & Silva, A. C. e. (2014). Atividade “in vitro” de extratos de *Pycnoporus sanguineus* e *Lentinus crinitus* sobre o fitopatógeno *Fusarium* sp. *Acta Amazonica*, 44(1), 1–8. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672014000100001>
- Flores, T. G., & Herrera, R. A. R. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de México*, 47(5), 388–390.
- Fontalvo, J., Córdoba, L., Gil, K., & Romero, I. (2013). Effect of Agroforestry Residues Partially Biodegraded by *Pleurotus Ostreatus* (Pleurotaceae) on Tomato Seedlings Development. *Acta Biologica Colombiana*, 18(2), 365–374.
- Franco-Molano, A. E., Aldana-Gómez, R., & Halling, R. E. (2000). *Setas de Colombia : agaricales, boletales et otros hongos : guía de campo*. Medellín: COLCENCIAS, Universidad de Antioquia.
- Franco-Molano, A. E., & Uribe, E. (2000). Hongos Agaricales y Boletales de Colombia. *Biota Colombiana*, 1(1), 25–43.

- Franco, A. esperanza, Corrales, A., & Palacios, Aida vascos. (2010). Macrohongos de colombia ii. Listado de especies de los órdenes agaricales, boletales, cantharellales y russulales (agaricomycetes, basidiomycota). *Actualidades Biologicas*, 32(92), 89–113.
- Furci, G. M. (2007). *Fungi Austral. Guía de campo de los hongos más vistosos de Chile*.
- Gaitan-Hernandez, R., Salmones, D., Perez Melo, R., & Mata, G. (2006). *Manual practico del cultivo de setas: aislamiento, siembra y produccion*.
- Gargano, M. L., Griensven, L. J. L. D. Van, Omoanghe, S., Lindequist, U., Venturella, G., Wasser, S. P., ... Zervakis, G. I. (2017). Medicinal mushrooms : Valuable biological resources of high exploitation potential. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, 151(3), 530–547.
<https://doi.org/10.1080/11263504.2017.1301590>
- Giannenas, I., Tontis, D., Tsalie, E., Chronis, E. F., Doukas, D., & Kyriazakis, I. (2010). Influence of dietary mushroom *Agaricus bisporus* on intestinal morphology and microflora composition in broiler chickens. *Research in Veterinary Science*, 89(1), 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.02.003>
- Gilchrist, L., Fuentes, G., Martínez, C., López, R., Duveiller, E., Singh, R. P., ... García, I. (2005). *Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada*. Retrieved from <http://ageconsearch.tind.io/bitstream/56185/2/guiaTrigoCebada.pdf>
- Goday, S. R., & Fr, L. (1975). Género *Lentinus* en españa. *Anal. Ints. Bot. Cavanilles*, 2(2), 75–84.
- Goodell, B., Qian, Y., & Jellison, J. (2008). Fungal Decay of Wood : Soft Rot-Brown Rot - White Rot.
- Gow, N., & Gadd, G. (1995). *The growing Fungus*.
- Grand, E. A., Hughes, K. W., & Petersen, R. H. (2011). Relationships within *Lentinus* subg . *Lentinus* (Polyporales , Agaricomycetes), with emphasis on sects . *Lentinus*

- and Tigrini, 399–413. <https://doi.org/10.1007/s11557-010-0711-4>
- Granda, D., Amanda Mejía, & Jiménez, G. (2005). Utilización de residuos de plátano para la producción de metabolitos secundarios por fermentación en estado sólido con el hongo *Lentinus crinitus*. *Vitae*, 12(2), 13–20.
- Gründemann, C., Garcia-käufer, M., & Sauer, B. (2015). Comparative chemical and biological investigations of β glucan containing products from shiitake mushrooms. *Journal of Functional Foods*, 18, 692–702.
<https://doi.org/dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.08.022>
- Guarro, J. (2012). Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infecc Microbiol*, 30, 33–39.
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.006>
- Guo, F. C., Williams, B. A., Kwakkel, R. P., & Verstegen, M. W. (2003). In vitro fermentation characteristics of two mushroom species, an herb, and their polysaccharide fractions, using chicken cecal contents as inoculum. *Poultry Science*, 82(10), 1608–1615. Retrieved from <http://ps.fass.org/content/82/10/1608.abstract>
- Hawksworth, D. L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, 95(6), 641–655.
[https://doi.org//doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80810-1](https://doi.org//doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80810-1)
- Heleno, S. A., Barros, L., Martins, A., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., Glamoclija, J., ... Ferreira, I. C. F. R. (2015). Nutritional value, bioactive compounds, antimicrobial activity and bioaccessibility studies with wild edible mushrooms. *LWT - Food Science and Technology*, 63(2), 799–806. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.028>
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., ... Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5), 509–547. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004>
- Holliday, J., Matt claver, & Wasser, S. P. (2005). Cordyceps. *Taylor and Francis*, 1–13.
<https://doi.org/10.1081/E-EDS-120024882>
- Hossain, S. M., Anantharaman, N., & Das, M. (2007). Studies on lignin biodegradation of

wheat straw using *Trametes versicolor* and *Lentinus crinitus*. *Journal of the Institution of Engineers (India)*, 87, 42–50.

Hu, D., Zhang, S., He, J., Dong, Z., Hui, Z., Feng, T., & Liu, J. (2015). Brasilane sesquiterpenoids and alkane derivatives from cultures of the basidiomycete *Coltricia sideroides*. *Fitoterapia*, 104, 50–54. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.05.009>

Hung, R., Lee, S., & Bennett, J. W. (2015). Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 3395–3405. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6494-4>

INS. *Bacillus cereus* en alimentos listos para consumo no industrializados (2011).

Ishibashi, K., Miura, N. N., Adachi, Y., Ohno, N., & Yadomae, T. (2001). Relationship between solubility of grifolan, a fungal 1,3-beta-D-glucan, and production of tumor necrosis factor by macrophages in vitro. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(9), 1993–2000. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.1993>

Jasinghe, V. J., & Perera, C. O. (2005). Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D₂ by UV irradiation. *Food Chemistry*, 92(3), 541–546. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.022>

Jesenak, M., Hrubisko, M., Majtan, J., Rennerova, Z., & Banovcin, P. (2014). Anti-allergic effect of Pleuran (beta-glucan from *Pleurotus ostreatus*) in children with recurrent respiratory tract infections. *Phytotherapy Research : PTR*, 28(3), 471–474. <https://doi.org/10.1002/ptr.5020>

Justo, A., Nagy, L. G., Grand, E. A., Redhead, S. A., & Hibbett, D. (2015). Phylogenetic relationships and morphological evolution in *Lentinus*, *Polyporellus* and *Neofavolus*, emphasizing southeastern Asian taxa. *Mycologia*. <https://doi.org/10.3852/14-084>

Kalač, P. (2013). A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(2), 209–218. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5960>

- Kalmıs, E. (2008). Feasibility of using olive mill effluent (OME) as a wetting agent during the cultivation of oyster mushroom , *Pleurotus ostreatus* , on wheat straw, 99, 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.042>
- Ko, Y. T., & Lin, Y. L. (2004). 1,3-B-Glucan Quantification By a Fluorescence Microassay and Analysis of Its Distribution in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3313–3318. <https://doi.org/10.1021/jf0354085>
- Kobori, H., Sekiya, A., Suzuki, T., Choi, J.-H., Hirai, H., & Kawagishi, H. (2015). Bioactive Sesquiterpene Aryl Esters from the Culture Broth of *Armillaria* sp. *Journal of Natural Products*, 78(1), 163–167. <https://doi.org/10.1021/np500322t>
- Kornerup, A., & Wanscher, J. H. (1963). *Methuen handbook of colour*. *Methuen*.
- Koutrotsios, G., Kalogeropoulos, N., Stathopoulos, P., Kaliora, A. C., & Zervakis, G. I. (2017). Bioactive compounds and antioxidant activity exhibit high intraspecific variability in *Pleurotus ostreatus* mushrooms and correlate well with cultivation performance parameters. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(5), 98. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2262-1>
- Koutrotsios, G., Mountzouris, K. C., Chatzipavlidis, I., & Zervakis, G. I. (2014). Bioconversion of lignocellulosic residues by *Agrocybe cylindracea* and *Pleurotus ostreatus* mushroom fungi – Assessment of their effect on the final product and spent substrate properties. *Food Chemistry*, 161, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.12>
- Koziol, M. J. (1992). Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Food Composition and Analysis*. [https://doi.org/10.1016/0889-1575\(92\)90006-6](https://doi.org/10.1016/0889-1575(92)90006-6)
- Laboratory, M. N. (2012). *Anthrone Reaction for Polysaccharide Detection*.
- Lackner, G., Bohnert, M., Wick, J., & Hoffmeister, D. (2015). Assembly of Melleolide Antibiotics Involves a Polyketide Synthase with Cross-Coupling Activity. *Chemistry & Biology*, 20(9), 1101–1106. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.07.009>
- Landa, R. T. (2013). *Estudio Químico de una Cepa Comercial del Hongo Pleurotus sp.*

- Largent, D. L. (1986). *How to identify mushrooms to genus I: Macroscopic features* (Eureka). Mad River Press.
- Lemieszek, M., & Rzeski, W. (2012). Anticancer properties of polysaccharides isolated from fungi of the Basidiomycetes class. *Wspolczesna Onkologia*, 16(4), 285–289. <https://doi.org/10.5114/wo.2012.30055>
- Leon. (2004). *Química y síntesis de los principios activos aislados de hongos superiores: Sus posibles aplicaciones farmacológicas*. Universidad de la Laguna.
- Li, B. W., Andrews, K. W., & Pehrsson, P. R. (2002). Individual Sugars, Soluble, and Insoluble Dietary Fiber Contents of 70 High Consumption Foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(6), 715–723. <https://doi.org/10.1006/jfca.2002.1096>
- Lin, Q., Long, L., Wu, L., Zhang, F., Wu, S., & Sun, X. (2016). Evaluation of different agricultural wastes for the production of fruiting bodies and bioactive compounds by medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Journal Sci Food Agric*, 97. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8097>
- Liu, J.-K. (2007). Secondary metabolites from higher fungi in China and their biological activity. *Drug Discov Ther*, 1(2), 94–103.
- López, A. M. T., Díaz, J. C. Q., & Garcés, L. A. (2011). Efecto de nutrientes sobre la producción de biomasa del hongo medicinal *Ganoderma lucidum*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1), 103–109.
- Machado, A. R. G., Teixeira, M. F. S., de Souza Kirsch, L., Campelo, M. da C. L., & de Aguiar Oliveira, I. M. (2015). Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. *Saudi Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.07.002>
- Machado, K. M. G., Matheus, D. R., Rodrigues, T. a., & Bononi, V. L. R. (2006). Enhancement of growth of *Lentinus crinitus* in soil using benomyl and vegetable oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(4), 425–427. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000400004>

- Magae, Y. M., & Hara, S. O. (2006). Structure-Activity Relationships of Triterpenoid Saponins on Fruiting Body Induction in *Pleurotus ostreatus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 70(8), 1979–1982. <https://doi.org/10.1271/bbb.60050>
- Magae, Y., Nishimura, T., & Ohara, S. (2005). 3- O -alkyl- D -glucose derivatives induce fruit bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Mycol. Res.* 109, 109(March), 374–376. <https://doi.org/10.1017/S0953756204002096>
- Maity, P., Sen, I. K., Maji, P. K., Paloi, S., Devi, K. S. P., Acharya, K., ... Islam, S. S. (2015). Structural, immunological, and antioxidant studies of beta-glucan from edible mushroom *Entoloma lividoalbum*. *Carbohydrate Polymers*, 123, 350–358. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.01.051>
- Manna, D. K., Nandi, A. K., Pattanayak, M., Maity, P., Tripathy, S., Mandal, A. K., ... Islam, S. S. (2015). A water soluble β -glucan of an edible mushroom *Termitomyces heimii*: Structural and biological investigation. *Carbohydrate Polymers*, 134, 375–384. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.099>
- Manzi, P., Aguzzi, A., & Pizzoferrato, L. (2001). Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry*, 73(3), 321–325. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00304-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00304-6)
- Manzi, P., Marconi, S., Aguzzi, A., & Pizzoferrato, L. (2004). Commercial mushrooms: Nutritional quality and effect of cooking. *Food Chemistry*, 84, 201–206. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00202-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00202-4)
- Marino, R. H., Dias de Abreu, L., Nascimento Pedra, W., & Mesquita, J. B. (2008). Crescimento e produção de isolados melhorados geneticamente de *Pleurotus ostreatus* em resíduo de coco. *Revista Ciência Agronômica*, 39(4).
- Markets, R. and. (1AD). Research and Markets: Global Mushroom Market Trends and Forecasts 2014-2019: Type (Button, Shiitake, and Oyster) & Application (Fresh Mushrooms and Processed Mushrooms (Dried, Frozen, and Canned)). *Business Wire (English)*. Retrieved from <http://ezproxy.unal.edu.co/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=bwh&AN=bizwire.c59694539&lang=es&site=eds-live>

- Martínez, D. A., Buglione, M. B., Filippi, M. V., Reynoso, L. del C., Rodríguez, G. E., & Agüero, M. S. (2015). Mycelial growth evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Agrocybe aegerita* on pear pomaces. *Anales de Biología*, (37), 1–10. <https://doi.org/10.6018/analesbio.37.1>
- Masé, G., & Ahg, R. H. (n.d.). Medicinal Mushrooms : a brief history and overview of principal species.
- Massah, J., & Azadegan, B. (2016). Effect of chemical fertilizers on soil compaction and degradation. *Agricultural Mechanization in Asia, Africa and Latin America*, 47(1), 44–50.
- Masuda, Y., Nawa, D., Nakayama, Y., Konishi, M., & Nanba, H. (2015). Soluble β -glucan from *Grifola frondosa* induces tumor regression in synergy with TLR9 agonist via dendritic cell-mediated immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, 98(December), 1–11. <https://doi.org/10.1189/jlb.1A0814-415RR>
- Mata, M., & Rivarden, L. (2010). Studies in neotropical polypores 27: More new and interesting species from Costa Rica. Estudios de poliporos neotropicales 27: Más nuevas e interesantes especies de Costa Rica. *Synopsis Fungorum.*, 27, 59–72.
- Mazzeo, M., León, L., Mejía, L. F., Guerrero, L. E., & Botero, J. D. (2010). Aprovechamiento Industrial De Residuos de cosecha y poscosecha del plátano. *Educación En Ingeniería*, 9, 128–139.
- McLaughlin, D. J., Hibbett, D. S., Lutzoni, F., Spatafora, J. W., & Vilgalys, R. (2009). The search for the fungal tree of life. *Trends in Microbiology*, 17(11), 488–497. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.08.001>
- Misaki, A., Kakuta, M., Sasaki, T., Tanaka, M., & Miyaji, H. (1981). Studies on interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharides: Antitumor action of periodate-modified, branched (1 \rightarrow 3)- β -d-glucan of *auricularia auricula-judae*, and other polysaccharides containing (1 \rightarrow 3)-glycosidic linkages. *Carbohydrate Research*, 92(1), 115–129. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)85986-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)85986-8)
- Mitchell, D. A., de Lima Luz, L. F., Krieger, N., & Berovic, M. (2011). Bioreactors for Solid-

- State Fermentation. *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*, 2, 347–360.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00107-0>
- Mizuno, T., Kato, N., Totsuka, A., Takenaka, K., Shinkai, K., & Shimizu, M. (1984). Fractionation, structural features and Antitumor activity of water soluble polysaccharide from Reishi the fruit body *Ganoder lucidum*. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 58, 871–880. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Moore, D., Robson, G. D., & Trinci, A. P. J. (2011). “Evolution and phylogeny of fungi.” *Encyclopaedia Britannica*, 1–21. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511977022>
- Motato R., K. E., Mejía G., A. I., & León P., Á. (2006). Evaluation of the agroindustrial wastes of banana (*Musa paradisiaca*) and sawdust of abarco (*Cariniana pyriformis*) as substrates for the culture of the fungus *Pleurotus djamor*. *Vitae*, 13(1), 24–29.
- Mueller, G. M., Bills, G. F., & Foster, M. S. (2004). *Biodiversity of fungi : inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780125095518>
- Mueller, G. M., Schmit, J. P., Leacock, P. R., Buyck, B., Cifuentes, J., Desjardin, D. E., ... Wu, Q. (2006). Global diversity and distribution of macrofungi. *Biodiversity and Conservation*, 16(1), 37–48. <https://doi.org/10.1007/s10531-006-9108-8>
- Murillo, E., & Méndez, J. (2003). Guía metodológica para la investigación fitoquímica preliminar en plantas medicinales. *Universidad Del Tolima, Ibagué*, 22.
- Nadhim, M., Ali, I., Salahuddin, S., & Al-saeedi, S. (2017). Applicable properties of the bio-fertilizer spent mushroom substrate in organic systems as a byproduct from the cultivation of *Pleurotus* spp. *Information Processing in Agriculture*, 4(1), 78–82. <https://doi.org/10.1016/j.inpa.2017.01.001>
- Nandi, A. K., Samanta, S., Maity, S., Sen, I. K., Khatua, S., Devi, K. S. P., ... Islam, S. S. (2014). Antioxidant and immunostimulant beta-glucan from edible mushroom *Russula albonigra* (Krombh.) Fr. *Carbohydrate Polymers*, 99, 774–782. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.016>
- Nasehi, M., Torbatinejad, N. M., Zerehdaran, S., & Safaie, A. R. (2017). Effect of solid-

- state fermentation by oyster mushroom (*Pleurotus florida*) on nutritive value of some agro by-products. *Journal of Applied Animal Research*, 45(1), 221–226.
<https://doi.org/10.1080/09712119.2016.1150850>
- Nitschke, J., Modick, H., Busch, E., Von Rekowski, R. W., Altenbach, H. J., & Mölleken, H. (2011). A new colorimetric method to quantify β -1,3-1,6-glucans in comparison with total β -1,3-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 127(2), 791–796.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.149>
- Nowak, R., Nowacka, N., Marek, J., & Anna, J. (2017). The preliminary study of prebiotic potential of Polish wild mushroom polysaccharides : the stimulation effect on Lactobacillus strains growth. *European Journal of Nutrition*, 0(0), 0.
<https://doi.org/10.1007/s00394-017-1436-9>
- Oh, Y. K., Lee, W. M., Choi, C. W., Kim, K. H., & Hong, S. K. (2010). Effects of Spent Mushroom Substrates Supplementation on Rumen Fermentation and Blood Metabolites in Hanwoo Steers, 23(12), 1608–1613.
- Ojico, J. O. R. A. U. L. M., Ernando, A. L. H., & Ombardia, M. A. L. (2005). Avena en la dieta sin-gluten: un riesgo para la salud del celíaco. contaminación masiva en productos de avena, 9–12.
- Oviedo, J. C., Casas, A. E., & Valencia, J. A. (2016). Evaluación de Tres Variables de Crecimiento del *Pleurotus pulmonarius* sobre Tusa de Maíz Empleando Procesamiento Digital de Imágenes Evaluation of Three Variables of Growth of *Pleurotus pulmonarius* on Corncob Using Digital Image Processing, *mi*, 27–36.
<https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000500004>
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2–3), 81–84. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3)
- Pandey, A., & Soccol, C. R. (2000). Bioconversion of Biomass : A Case Study of Ligno-cellulosics Bioconversions in Solid State Fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*.
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged

- mycelial processes. *Biotechnology Advances*, 22(3), 189–259.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.09.005>
- Papaspyridi, L.-M., Katapodis, P., Gonou-Zagou, Z., Kapsanaki-Gotsi, E., & Christakopoulos, P. (2011). Growth and biomass production with enhanced β -glucan and dietary fibre contents of *Ganoderma australe* ATHUM 4345 in a batch-stirred tank bioreactor. *Engineering in Life Sciences*, 11(1), 65–74.
<https://doi.org/10.1002/elsc.201000102>
- Pathmashini, L., Arulnandhy, V., Wijeratnam, R. S. W., Lanka, S., Lanka, S., Division, F. T., & Lanka, S. (2008). Cultivation of oyster mushroom (*pleurotus ostreatus*) on sawdust. *Bio. Sci.*, 37(2), 177–182.
- Pegler, D. N. (1983). *The Genus Lentinus*.
- Pillai, T. G., Maurya, D. K., Salvi, V. P., Janardhanan, K. K., & Nair, C. K. K. (2014). Fungal beta glucan protects radiation induced DNA damage in human lymphocytes. *Annals of Translational Medicine*, 2(2), 13. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.02.02>
- Pinzon, J. (2014). *Evaluación de la inclusión de los β -glucanos de *Ganoderma lucidum* en yogur*.
- Price, L. A., Wenner, C. A., Sloper, D. T., Slaton, J. W., & Novack, J. P. (2010). Role for toll-like receptor 4 in TNF-alpha secretion by murine macrophages in response to polysaccharide Krestin, a *Trametes versicolor* mushroom extract. *Fitoterapia*, 81(7), 914–919. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.06.002>
- Raimbault, M., Soccol, C. R., & Chuzel, G. (1998). International training course on solid state fermentation.
- Reig, A. D. L. C., & Anesto, J. (2002). Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. *Revista Cubana Aliment Nutr*, 16(1), 63–68. Retrieved from http://www.bvs.sld.cu/revistas/ali/vol16_1_02/ali10102.htm
- Reina, M. (2003). Caracterización del mercado de champiñones en Colombia.

- Reyes, J. I. A., & Campos, A. R. M. (2013). Aislamiento y purificación del hongo ectomicorrízico *Helvella lacunosa* en diferentes medios de cultivo. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 16, 51–59.
- Ridley, C. P., & Khosla, C. (2009). Polyketides. In *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)* (pp. 472–481). <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00158-9>
- Rios, M., Hoyos, J., & Mosquera, S. (2010). Evaluación de los parámetros productivos de la semilla de *Pleurotus ostreatus* propagada en diferentes medios de cultivo. *Bioteología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 8, 86–94. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1692-35612010000200012&script=sci_abstract
- Rios, R., & Ruiz, L. (1993). Aislamiento y cultivo del hongo comestible *pleurotus* afin *ostreatus* (jacq . Ex fr) kumm. *Folia Amazónica*, 5.
- Rios Hurtado, A., & Hicela Mosquera Mosquera, L. (n.d.). Ecología y bromatología de cuatro especies de setas nativas del departamento del Chocó (Colombia). *Alimentaria*, (357), 79–83. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=16193907>
- Rita, A., Machado, G., Francisca, M., Teixeira, S., Souza, L. De, & Conceic, M. (2015). Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.07.002>
- Rivarden, L. (1991). Genera of Polypores, nomenclatura and taxonomy, Fungiflora. Oslo Norway.
- Rivera, T., & Oesterling, J. (2010, March 4). Naturally sweetened juice beverage products with beta-glucan. Google Patents. Retrieved from <https://www.google.es/patents/WO2010025000A1?cl=en>
- Robledo, G. (2015). Taxonomía, Diversidad y Ecología de Poloporos.
- Roger Y. Stanier. (2005). *Microbiología*.

- Roncero-ramos, I., & Delgado-andrade, C. (2017). The beneficial role of edible mushrooms in human health. *Current Opinion in Food Science*, 14, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.04.002>
- Roncero-Ramos, I., Mendiola-Lanao, M., Pérez-Clavijo, M., & Delgado-Andrade, C. (2017). Effect of different cooking methods on nutritional value and antioxidant activity of cultivated mushrooms. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 68(3), 287–297. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1244662>
- Rop, O., Mlcek, J., & Jurikova, T. (2009). Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutrition Reviews*, 67(11), 624–631. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00230.x>
- Rosli, W., & Maihiza, N. (2015). The ability of oyster mushroom in improving nutritional composition , β -glucan and textural properties of chicken frankfurter, 22(1), 311–317.
- Roy, S., Barman, S., Chakraborty, U., & Chakraborty, B. (2015). Evaluation of Spent Mushroom Substrate as biofertilizer for growth improvement of *Capsicum annuum* L ., 3(3), 22–27. <https://doi.org/10.7324/JABB.2015.3305>
- Ruiz-herrera, J. (1991). Biosynthesis of Beta-glucans in fungi. *Antonie van Leeuwenhoek*, (60), 73–81.
- Run-hua, Z., Zeng-qiang, D., & Zhi-guo, L. I. (2012). Use of Spent Mushroom Substrate as Growing Media for Tomato and Cucumber Seedlings. *Pedosphere: An International Journal*, 22(3), 333–342. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(12\)60020-4](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(12)60020-4)
- Ruthes, A. C., Smiderle, F. R., & Iacomini, M. (2015). D-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. *Carbohydrate Polymers*, 117C, 753–761. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.051>
- Sánchez, J., & Royse, D. (2001). La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp., 293. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Sari, M., Prange, A., Lelley, J. I., & Hambitzer, R. (2017). Screening of beta-glucan

contents in commercially cultivated and wild growing mushrooms. *Food Chemistry*, 216, 45–51.

- Sartorato, A., Nechet, K. L., & Halfeld-Vieira, B. A. (2006). Diversidade genética de isolados de *Rhizoctonia solani* coletados em feijão-caupi no Estado de Roraima. *Fitopatologia Brasileira*. scielo.
- Schuffler, A., & Anke, T. (2009). Secondary Metabolites of Basidiomycetes. In *Physiology and Genetics, 1st edition* (pp. 209–231). https://doi.org/10.1007/978-3-642-00286-1_10
- Semedo, M. C., & Karmali, A. (2015). A Novel Colorimetric Assay of β -D-Glucans in Basidiomycete Strains by Alcian Blue Dye in a 96-Well Microtiter Plate. <https://doi.org/10.1002/btpr.2163>
- Semedo, M. C., Karmali, A., & Fonseca, L. (2014). A high throughput colorimetric assay of beta-1,3-d-glucans by Congo red dye. *J Microbiol Methods*, 109, 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.12.020>
- Shiono, Y., Hiramatsu, F., Murayama, T., Koseki, T., & Funakoshi, T. (2008). Two cyathane-type diterpenoids from the liquid culture of *Strobilurus tenacellus*. *Chemistry & Biodiversity*, 5(9), 1811–1816. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200890170>
- Silveira, M. L. L., Smiderle, F. R., Moraes, C. P., Borato, D. G., Baggio, C. H., Ruthes, A. C., ... Iacomini, M. (2014). Structural characterization and anti-inflammatory activity of a linear beta-D-glucan isolated from *Pleurotus sajor-caju*. *Carbohydrate Polymers*, 113, 588–596. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.057>
- Sinanoglou, V. J., Zoumpoulakis, P., Heropoulos, G., Proestos, C., Ciric, A., Petrovic, J., ... Sokovic, M. (2015). Lipid and fatty acid profile of the edible fungus *Laetiporus sulphureus*. Antifungal and antibacterial properties. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 3264–3272. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1377-8>
- Smiderle, F. R., Baggio, C. H., Borato, D. G., Santana-Filho, A. P., Sasaki, G. L., Iacomini, M., & Van Griensven, L. J. L. D. (2014). Anti-inflammatory properties of the medicinal mushroom *Cordyceps militaris* might be related to its linear (1 \rightarrow 3)-beta-

- D-glucan. *PLoS One*, 9(10), e110266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110266>
- Su, P., Henriksson, A., & Mitchell, H. (2007). Selected prebiotics support the growth of probiotic mono-cultures in vitro, 13, 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2007.04.007>
- Suárez, C., & Nieto, J. (2013). Revista Iberoamericana de Micología Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles : una alternativa en la obtención de nutracéuticos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2012.03.011>
- Suh, W., Nam, G., Yang, W. S., Sung, G., Shim, S. H., & Cho, J. Y. (2017). Chemical Constituents Identified from Fruit Body of *Cordyceps bassiana* and Their Anti-Inflammatory Activity. *Biomol Ther*, 25(2), 165–170.
- Synytsya, A., Míčková, K., Jablonský, I., Sluková, M., & Čopíková, J. (2008). Mushrooms of Genus *Pleurotus* as a source of dietary fibres and glucans for food supplements. *Czech Journal of Food Sciences*, 26(6), 441–446.
- Synytsya, A., Míčková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Spěváček, J., Erban, V., ... Čopíková, J. (2009). Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers*, 76(4), 548–556. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.021>
- Synytsya, A., & Novák, M. (2013). Structural diversity of fungal glucans. *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 792–809. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.077>
- Taylor, J. W., Jacobson, D. J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D. M., Hibbett, D. S., & Fisher, M. C. (2000). Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol*, 31(1), 21–32. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1228> rS1087-1845(00)91228-3 [pii]
- Thomas, L., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 81, 146–161. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.013>

- Thyagarajan, a, Zhu, J., & Sliva, D. (2007). Combined effect of green tea and *Ganoderma lucidum* on invasive behavior of breast cancer cells. *Int J Oncol*, 30(4), 963–969.
- Tibäck, E., & Tibäck, E. (2016). *Protein enriched foods and healthy ageing : Effects of almond flour , soy flour and whey protein fortification on muffin characteristics.*
- Torres López, A. M., Quintero Díaz, J. C., & Atehortua Garcés, L. (2011). Efecto de nutrientes sobre la producción de biomasa del hongo medicinal *Ganoderma lucidum* . *Revista Colombiana de Biotecnología* . scieloco .
- Trujillo, D. emmanuel serrano. Aislamiento vegetativo y multiesporico (2004).
- Uribe-meléndez, J. (1978). Catálogo de los Myxomicetes registrados para Colombia. *Caldasia*, 18(86), 23–36.
- Vasco-Palacios, A. M., & Franco-Molano, A. E. (2013). Diversity of Colombian macrofungi. *Mycotaxon*, 121(January), 1–58.
- Vasco-Palacios, A. M., Suaza, S. C., Castañó-Betancur, M., & Franco-Molano, A. E. (2008). Conocimiento etnoecológico de los hongos entre los indígenas Uitoto, Muinane y Andoke de la Amazonía Colombiana. *Acta Amazonica*, 38(10), 17–30. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672008000100004>
- Velásquez, luis fernando, Saldarriaga, Y., García, G., & Pineda, F. (1998). *Hongos de Antioquia Guía Ilustrada.*
- Velíšek, J., & Cejpek, K. (2011). Pigments of higher fungi: a review. *Czech J Food Sci*, 29(2), 87–102.
- Vieira, G. R. T., Liebl, M., Tavares, L. B. B., Paulert, R., & Smânia, A. (2008). Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and antimicrobial metabolites by *Polyporus tricholoma* Mont. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(3), 561–568. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000300029>
- Villares, A., Mateo-Vivaracho, L., & Guillamón, E. (2012). Structural Features and Healthy Properties of Polysaccharides Occurring in Mushrooms. *Agriculture*, 2(4), 452–471.

<https://doi.org/10.3390/agriculture2040452>

- Wang, J., Wang, H.-Y., Xia, X.-M., Li, P., & Wang, K.-Y. (2013). Inhibitory effect of sulfated lentinan and lentinan against tobacco mosaic virus (TMV) in tobacco seedlings. *International Journal of Biological Macromolecules*, *61*, 264–269. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.07.005>
- Wang, Q., Sheng, X., Shi, A., Hu, H., Yang, Y., Liu, L., ... Liu, H. (2017). beta-Glucans: Relationships between Modification, Conformation and Functional Activities. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *22*(2). <https://doi.org/10.3390/molecules22020257>
- Wang, S., Li, Y., Bao, L., Han, J., Yang, X., Li, H., ... Liu, H. (2012). Eryngiolide A, a Cytotoxic Macrocyclic Diterpenoid with an Unusual Cyclododecane Core Skeleton Produced by the Edible Mushroom *Pleurotus eryngii*. *Organic Letters*, *14*(14), 3672–3675. <https://doi.org/10.1021/ol301519m>
- Wang, W., Wu, Y., Chen, S., Liu, C., & Chen, S. (2015). Mushroom beta -Glucan May Immunomodulate the Tumor-Associated Macrophages in the Lewis Lung Carcinoma, *2015*, 27–34.
- Wasser, S. (2003). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *60*(3), 258–274. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1076-7>
- Wasser, S. P., Sokolov, D., Reshetnikov, S. V., & Timor-Tismenetsky, M. (2000). Dietary Supplements from Medicinal Mushrooms: Diversity of Types and Variety of Regulations. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v2.i1.10>
- Webster, J., & Weber, R. (2007). *Introduction to fungi* (Cambridge). New York.
- WHITE, T., BRUNS, T., LEE, S., & TAYLOR. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetics.
- Whittaker, R. H. (1969). New Concepts of Kingdoms of Organisms. *Science*, *163*(3863), 150–160. <https://doi.org/10.1126/science.163.3863.150>

- Willis, W. L., King, K., Iskhuehmen, O. S., & Ibrahim, S. a. (2009). Administration of mushroom extract to broiler chickens for bifidobacteria enhancement and Salmonella reduction. *Journal of Applied Poultry Research*, 18(4), 658–664. <https://doi.org/10.3382/japr.2008-00101>
- Wong, K.-H., & Cheung, P. C. K. (2005). Dietary Fibers from Mushroom Sclerotia: 1. Preparation and Physicochemical and Functional Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24), 9395–9400. <https://doi.org/10.1021/jf0510788>
- Wu, J., Cheung, P. C. K., Wong, K., & Huang, N. (2004). Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer. Part 2: effect of carbon-to-nitrogen ratio of the culture medium on the content and composition of the mycelial dietary fibre. *Food Chemistry*, 85, 101–105. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.06.009>
- Yang, Z. L. (2011). Molecular techniques revolutionize knowledge of basidiomycete evolution. *Fungal Diversity*, 50, 47–58. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0121-1>
- Yoon, L. W., Ang, T. N., Ngoh, G. C., & Chua, A. S. M. (2014). Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. *Biomass and Bioenergy*, 67(July 2015), 319–338. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.05.013>
- Yu, Z.-T., Liu, B., Mukherjee, P., & Newburg, D. S. (2013). *Trametes versicolor* Extract Modifies Human Fecal Microbiota Composition In vitro. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68(2), 107–112. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0342-4>
- Zapata-ocampo, P. A., & Rojas-vahos, D. F. (2010). Efecto de los campos eléctricos sobre la producción de biomasa micelial del hongo medicinal *ganoderma lucidum* [(W. CURT.: FR.) P. KARST. (GANODERMATACEAE)]. *Acta Biologica Colombiana*, 32(92), 5–17.
- Zapata, P., Rojas, D., Fernández, C., Ramírez, D., Restrepo, G., Orjuela, V., ... Atehortúa, L. (2007). PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y EXOPOLISACÁRIDOS DE *Grifola frondosa* BAJO CULTIVO SUMERGIDO

- UTILIZANDO FUENTES DE CARBONO NO CONVENCIONALES. *Revista EIA*, 137–144. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-12372007000100013&nrm=iso
- Zhang, Y., Li, S., Wang, X., Zhang, L., & Cheung, P. C. K. (2011). Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities. *Food Hydrocolloids*, 25(2), 196–206. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.02.001>
- Zhong, J., & Hui, J. (2009). Secondary metabolites from higher Fungi: Discovery, Bioactivity and Bioproduction. *Adv Biochem Engin*, 113, 79–150. <https://doi.org/10.1007/10>
- Zhong, K., Liu, L., Tong, L., Zhong, X., Wang, Q., & Zhou, S. (2013). Rheological properties and antitumor activity of schizophyllan produced with solid-state fermentation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.08.015>
- Zhou, X., Lin, J., Yin, Y., Zhao, J., Sun, X., & Tang, K. (2007). Ganodermataceae: natural products and their related pharmacological functions. *The American Journal of Chinese Medicine*, 35(4), 559–574. <https://doi.org/10.1142/S0192415X07005065>
- Zhu, F., Du, B., Bian, Z., & Xu, B. (2015). Beta-glucans from edible and medicinal mushrooms: Characteristics, physicochemical and biological activities. *Journal of Food Composition and Analysis*, 41, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.01.019>
- Zhu, F., Du, B., & Xu, B. (2016a). A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. *Food Hydrocolloids*, 52, 275–288. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.003>
- Zhu, F., Du, B., & Xu, B. (2016b). A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. *Food Hydrocolloids*, 52, 275–288. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.003>
- Zhuang, H., Chen, Z., Feng, T., Yang, Y., Zhang, J., Liu, G., ... Ye, R. (2017).

Characterization of *Lentinus edodes* β -glucan influencing the in vitro starch digestibility of wheat starch gel. *Food Chemistry*, 224, 294–301.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.087>