



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**UTILIZACIÓN DE LA FERMENTACIÓN LÍQUIDA DE
Lentinula edodes (SHIITAKE), PARA LA PRODUCCIÓN
DE METABOLITOS SECUNDARIOS BIOACTIVOS Y
EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL EMPLEO EN LA
PRODUCCIÓN DE UN ALIMENTO FUNCIONAL**

CAROLINA SUÁREZ ARANGO

**Universidad Nacional de Colombia
Programa Interfacultades en Ciencia y Tecnología de Alimentos
Bogotá, D.C, Colombia
2012**

**UTILIZACIÓN DE LA FERMENTACIÓN LÍQUIDA DE
Lentinula edodes (SHIITAKE), PARA LA PRODUCCIÓN
DE METABOLITOS SECUNDARIOS BIOACTIVOS Y
EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL EMPLEO EN LA
PRODUCCIÓN DE UN ALIMENTO FUNCIONAL**

CAROLINA SUÁREZ ARANGO

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Director (a):

Ivonne Jeannette Nieto Ramírez
Dr. Sci

Línea de Investigación:

Desarrollo de Alimentos Funcionales

Grupo de Investigación:

Química de Hongos Macromicetos

Universidad Nacional de Colombia

Programa Interfacultades en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Bogotá, D.C, Colombia

2012

*A Dios y sus especiales
mensajeros que llevan su mensaje
de amor por todo el universo.*

*A mis padres y hermano que
siempre han sido mi soporte y
alegría en todo momento.*

*A mis profesores, quienes además
de transmitirme sus conocimientos,
me han enseñado a ser un mejor
ser humano.*

*A mis amigos, por darme uno de
los mejores regalos, la amistad.*

A Danna, por su callada compañía.

*A esa estrella brillante y lejana que
espero pronto alcanzar para
estrecharla entre mis brazos y no
separarnos nunca más.*

Agradecimientos

La autora declara sus agradecimientos:

- Al director del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Dr. Anibal Herrera por permitir mi acceso y el uso de las instalaciones del Laboratorio de Microbiología para el desarrollo de parte del proyecto.
- A mi directora de tesis, Dr. Sci. Ivonne Jeannete Nieto Ramírez por su orientación, preocupación y tiempo dedicado durante el desarrollo de la investigación; pero sobre todo, por la amistad que surgió durante el tiempo que compartimos.
- A Gregorio Medina, técnico profesional del Laboratorio de Microbiología por su colaboración, sus consejos y su amistad.
- A mis compañeras y amigas de grupo de investigación, Dra. Carolina Chegwin y MSc. Rocío Rojas por brindarme su apoyo, su ánimo y su alegría en los momentos más difíciles.
- A mis compañeros de maestría, Raquel Oriana Díaz y Fabián Rico, por su inmensa colaboración en el desarrollo de parte del proyecto.
- Al equipo de mantenimiento del Instituto, al ingeniero Edwin Malagón y al técnico Miguel Angel Ramírez, por su colaboración, su prontitud y diligencia durante todo el desarrollo del proyecto, en momentos en los que se asomaba la desesperación.
- Al decano de la Facultad de Ciencias Dr. Jesús Sigifredo Valencia Ríos y al director del departamento de Química, Dr. Mauricio Maldonado, por facilitar los recursos requeridos para la publicación de artículos, fruto del trabajo de investigación.
- A todo el personal técnico, docente y administrativo del Instituto, a José Miguel, Alvaro, Héctor, Jairo, Elizabeth, Camilo, Ivon, Juanita, etc., por su apoyo y preocupación durante mi permanencia en el laboratorio.

"El científico no tiene por objeto un resultado inmediato. Él no espera que sus ideas avanzadas sean fácilmente aceptadas. Su deber es sentar las bases para aquellos que están por venir, y señalar el camino "

Nikola Tesla

Resumen

Lentinula edodes, hongo comestible conocido en el mundo como Shiitake, posee diferentes acciones biológicas; que lo convierten en el nutraceutico natural por excelencia. El objetivo de la presente investigación fue el de establecer la producción de biomasa fúngica y bioactivos (polisacáridos y triterpenoides) durante el cultivo sumergido del hongo, para posteriormente introducirlos en una gelatina de fruta y evaluar su comportamiento en la matriz a través del tiempo. Se obtuvo un rendimiento en biomasa fúngica cercano al 90%, mientras que la producción de polisacáridos bioactivos, los β -glucanos, tuvieron una alta producción por el micelio pero con baja excreción. En lo que respecta a los ácidos grasos se encontró una diferencia estructural entre los presentes en el micelio y los excretados al medio de cultivo. En cuanto a los compuestos triterpenoidales, éstos fueron identificados únicamente en el micelio, dentro de los cuales se encuentran tres posibles nuevos compuestos para el hongo. Con relación a la gelatina con fruta ésta presentó un importante contenido de los β -glucanos, lo que podría conllevar una reacción benéfica sobre el organismo que las consuma. La presencia de esos bioactivos, hace que algunas de las propiedades reológicas de la gelatina cambien significativamente, sin presentar influencia en la percepción por parte de los consumidores. Los resultados dan pie para adelantar posteriores investigaciones que lleven a mejorar la productividad de biomasa y metabolitos, para incluirlos en otros tipos de alimentos que sean consumidos por una proporción mayor de la población.

PALABRAS CLAVE: Basidiomicetos, fermentación sumergida, biometabolitos, polisacáridos, β -glucanos, ácidos grasos, triterpenoides.

Abstract

Lentinula edodes is an edible mushroom known worldwide as Shiitake; it has many different biological activities that make it as an excellent natural nutraceutic. The objectives of this research was establish the production of the biomass and bioactives, through the submerged culture of the fungus and posteriorly put into fruit gelatin, and make an evaluation of these bioactives behavior across the time. The yield of fungal biomass was closed to 90%, while bioactive polysaccharides production, β -glucans, had a high yield in the mycelium, but low excretion to the media. Regard fatty acids, they had structural differences between those related to the mycelia and exhausted culture medium. Related to triterpenoids compounds, they were identified only in the mycelium and among all of them, three were identified for the first time for the fungus. Regard to the fruit gelatin, it had an important quantity of β -glucans; this fact could lead to a benefic effect on any organism that consume the product. These bioactive compounds in the gelatin, especially functional polysaccharides, makes that some reological properties change significantly, but without any influence in consumers perception. All these results are the origin of forward investigations that lead to improve biomass and metabolites productivity, increase the bioactivities of the biotechnological product to the object to mix it with other foods consumed for the widest range of population.

KEY WORDS: Basidiomycetes, submerged fermentation, polysaccharides, β -glucans, fatty acids, triterpenoids.

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Lista de figuras	XI
Lista de tablas	XIII
Lista de abreviaturas	XIV
Introducción	1
1. Capítulo 1. Cultivo Biotecnológico de Macrohongos Comestibles: una Alternativa en la Obtención de Nutraceuticos	15
1.1 Resumen.....	15
1.2 Introducción	16
1.3 Fermentación en Estado Líquido (FEL)	17
1.4 Metabolitos Fúngicos con Potencial Terapéutico	19
1.4.1 β -glucanos	19
1.4.2 Policétidos	20
1.4.3 Terpenoides.....	21
1.4.4 Ácidos grasos	22
1.5 Cultivo de Macromicetos por FEL	23
1.5.1 Principales Setas Comestibles Cultivadas por FEL	24
1.5.2 <i>Lentinula edodes</i>	28
1.6 Conclusiones	31
1.7 Bibliografía.....	32
2. Capítulo 2. Producción de Triterpenoides y Ácidos Grasos para el Hongo Comestible <i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Singer, durante una Fermentación Sumergida	43
2.1 Resumen	43
2.2 Introducción	43
2.3 Materiales y Métodos	45
2.3.1 Cepa.....	45
2.3.2 Fermentación líquida de <i>Lentinula edodes</i>	46
2.3.3 Toma de muestras	46
2.3.4 Determinación de compuestos triterpenoidales en el micelio y el medio agotado	46
2.4 Resultados y Discusión.....	47
2.4.1 Cinética de crecimiento para <i>Lentinula edodes</i> en FEL	47
2.4.2 Ácidos grasos, esteres de ácidos grasos y compuestos triterpenoides	50
2.5 Conclusiones	57

2.6 Bibliografía.....	58
3. Capítulo 3. Utilización de la Fermentación Sumergida de <i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Singer para la Producción de Polisacáridos Bioactivos.....	65
3.1 Resumen	65
3.2 Introducción	65
3.3 Materiales y Métodos	67
3.3.1 Ceba.....	67
3.3.2 Fermentación líquida de <i>Lentinula edodes</i>	67
3.3.3 Toma de muestras	67
3.3.4 Determinación de intra, exo y β -glucanos bioactivos.....	68
3.4 Resultados.....	68
3.5 Discusión	71
3.6 Conclusiones.....	74
3.7 Bibliografía.....	74
4. Capítulo 4. Efecto de la Adición de un Producto Biotecnológico de Shiitake sobre una Gelatina de Fruta	79
4.1 Resumen	79
4.2 Introducción	79
4.3 Materiales y Métodos	80
4.3.1 Ceba.....	80
4.3.2 Fermentación líquida de Shiitake	81
4.3.3 Formulación de la gelatina.....	81
4.3.4 Evaluación de los compuestos bioactivos.....	81
4.3.5 Evaluación de la textura.....	82
4.3.6 Evaluación sensorial	82
4.3.7 Análisis estadístico.....	83
4.4 Resultados y Discusión	83
4.4.1 Determinación de compuestos bioactivos a través del tiempo.....	83
4.4.2 Análisis de textura.....	87
4.4.3 Evaluación sensorial	88
4.5 Conclusiones.....	89
4.6 Bibliografía.....	90
5. Conclusiones y recomendaciones	95
5.1 Conclusiones.....	95
5.2 Recomendaciones.....	98
6. Bibliografía.....	101

Lista de figuras

	Pág.
Figura I-1. Clasificación taxonómica del Shiitake	2
Figura 1-1. Estructura de la unidad básica del lentinan	20
Figura 1-2. Estructura de las estatinas de origen fúngico	21
Figura 1-3. Estructura de la pleuromutilina	21
Figura 1-4. Estructura del ergosterol	22
Figura 1-5. Estructuras de los ácidos oléico (a) y linoléico (b)	23
Figura 2-1. Cinética de crecimiento de la masa micelial y cambio del pH durante la fermentación del Shiitake en FEL	48
Figura 2-2. Cromatograma de gases de la fracción clorofórmica del micelio de <i>L. edodes</i> cultivado por FEL a los 3 días de fermentación	50
Figura 2-3. Cromatograma de gases de la fracción clorofórmica del micelio de <i>L. edodes</i> cultivado por FEL a los 15 días de fermentación	51
Figura 2-4. Variación en la composición de la fracción grasa no esterooidal del Shiitake durante la FEL	53
Figura 2-5. Cuantificación de los compuestos triterpenoidales en la FEL de Shiitake por patrón interno (stigmasterol)	57
Figura 3-1. Consumo y producción de polisacáridos y β -glucanos durante la fermentación de <i>L. edodes</i>	69
Figura 3-2. Producción de polisacáridos y β -glucanos por el micelio de <i>L. edodes</i>	70
Figura 3-3. Producción de exopolisacáridos y β -glucanos durante la fermentación líquida de <i>L. edodes</i>	70
Figura 3-4. Proporción de β -glucanos en el micelio de <i>L. edodes</i> , obtenido por fermentación líquida	73

Figura 4-1. Perfil cromatográfico de la gelatina control en el día inicial	86
Figura 4-2. Perfil cromatográfico de la gelatina con Shiitake en el día inicial	87

Lista de tablas

	Pág.
Tabla I-1. Propiedades medicinales para <i>Lentinula edodes</i>	4
Tabla I-2. Principales compuestos medicinales aislados del Shiitake (<i>Lentinula edodes</i>)	6
Tabla I-3. Algunas de las patentes obtenidas a partir de Shiitake y relacionadas con alimentos	10
Tabla 1-1. Condiciones empleadas en la FEL de macromicetos comestibles	30
Tabla 2-1. Acidos grasos y ésteres de ácidos grasos producidos por el micelio de <i>Lentinula edodes</i> cultivado por FEL	52
Tabla 2-2. Compuestos triterpenoidales producidos por <i>Lentinula edodes</i> cultivado por FEL	56
Tabla 4-1. Concentración de polisacáridos totales y β -glucanos en la gelatina de fruta control y con adición de Shiitake	85
Tabla 4-2. Atributos analizados por medio del perfil de textura y la prueba de punción de la gelatina de fruta con Shiitake y la gelatina control	88
Tabla 4-3. Medias de las pruebas hedónicas realizadas a la gelatina de fruta control y la gelatina de fruta con Shiitake	89

Lista de abreviaturas

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

FEL: fermentación en estado líquido

FES: fermentación en estado sólido

FS: fermentación sumergida

rpm: revoluciones por minuto

FOSHU: foods with specified health uses

OMS: Organización Mundial de la Salud

NCI: National Cancer Institute

ATP: adenosín trifosfato

PDA: papa dextrosa agar

GPEL: caldo glucosa peptona extracto de levadura

CG-EM: cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas

Introducción

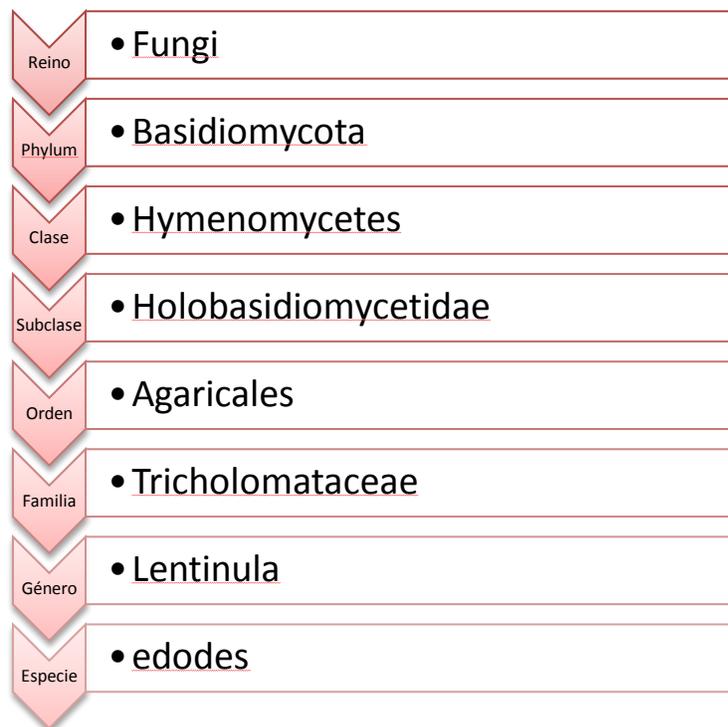
I. *Lentinula edodes* (Shiitake)

Las setas conocidas como Shiitake, Shiang-gu, hongo fragante u hongo del roble como son llamadas en Asia, su continente de origen, constituyen un alimento tradicional, exquisito y altamente valorado en la alimentación tradicional asiática. Pero no solamente son deliciosos, nutritivos, con gran sabor y un aroma seductor, sino que también contienen componentes que le proporcionan propiedades nutraceuticas, las cuales son debidas a las acciones biológicas presentadas por algunos de sus metabolitos. Entre éstas acciones se encuentran la antioxidante, hipocolesterolémica, hipoglicemiante, antibacteriana, inmunomoduladora, anticancerígena, reguladora del sistema cardiovascular y antiviral (se ha confirmado que inhibe la replicación del virus de la inmunodeficiencia adquirida –VIH) (Mattila, Suonpää et al. 2000) siendo las tres últimas las de mayor relevancia. Dichas propiedades se han atribuido a los polisacáridos y compuestos triterpenoidales (Smith, Rowan et al. 2002), metabolitos secundarios propios del hongo, los cuales han sido aislados del carpóforo, siendo esta la razón de que hace siglos los orientales han empleado este hongo en sus tratamientos médicos. En la actualidad muchos de estos compuestos están siendo utilizados en la producción de medicamentos comerciales (Smith, Rowan et al. 2002). Sin embargo, investigaciones preliminares sobre basidiomicetos y específicamente sobre Shiitake (Çağlarırmak 2007) han puesto de manifiesto que la proporción de estos compuestos varía tanto con el estadio del hongo como con el medio en que es cultivado (Cucaita 2007; Osman, Hassan et al. 2009). La historia taxonómica del Shiitake se remonta al año 1877, cuando Berkely propuso el nombre de *Agaricus edodes* para su clasificación. En adelante, la seta fue cambiando de género pasando por *Collybia*, *Armillaria*, *Lepiota*, *Pleurotus* y *Lentinus*, esta última clasificación dada por Singer aún es aceptada y empleada por muchos autores. Recientemente Pegler denominó al Shiitake como *Lentinula edodes* por las diferencias

microscópicas que existían con respecto a su clasificación anterior (Stamets 1993). La figura 1 muestra la clasificación taxonómica para el Shiitake.

L. edodes es uno de los hongos usados en etnomedicina mejor conocidos y caracterizados por sus acciones biológicas y en la medicina oriental se ha empleado para el tratamiento de un amplio rango de problemas de salud. Así mismo, es la materia prima de preparaciones ampliamente estudiadas y documentadas con propiedades farmacéuticas comprobadas (tabla I-1). Los estudios se basan especialmente en el polisacárido llamado lentinan y en las glicoproteínas tanto del micelio del hongo (LEM: micelio de *Leninula edodes*, por su sigla en inglés) como de los extractos de medios de cultivos líquidos (LAP y KS-2) (Wasser 2005), los cuales se han constituido en compuestos medicinales (tabla I-2) Pero, no sólo los compuestos aislados son benéficos para la salud sino que el consumo del hongo como tal proporciona los mismos beneficios. Se ha reportado que el consumo diario de 90g de shiitake fresco durante 7 días induce la reducción de hasta el 12% del colesterol en la sangre (Martinez-Carrera, Sobal et al. 2004). Otros autores reportan que una dosis entre 150 y 300 mg de micelio diario son suficientes para incrementar el sistema inmune y así combatir el cáncer (Donatini 2010).

Figura I-1. Clasificación taxonómica del Shiitake. (Kirk, Cannon et al. 2008)



I.1 Propiedades anti cancerígenas

Las investigaciones realizadas sobre los polisacáridos aislados de basidiomicetos ponen de manifiesto que estos compuestos modulan e incrementan la respuesta inmune del organismo, lo que les confiere propiedades antitumorales (Zhang, Cui et al. 2007) las cuales se han confirmado clínicamente con la demostración de su capacidad para prevenir (31-83%), inhibir (73-97%), o incluso revertir (22-77%) la formación de tumores. Su administración es normalmente por vía intraperitoneal en dosis de 0,2-25 mg/kg de peso corporal, observándose efectos positivos dentro de las primeras 24 horas y hasta por siete días. Así mismo, ha presentado enorme capacidad para prevenir cánceres inducidos viral o químicamente, así como metástasis cancerosa (Martinez-Carrera, Sobal et al. 2004).

Estos compuestos bioactivos también exhiben efectos regenerativos a nivel celular, aliviando efectos secundarios derivados de los tratamientos convencionales contra el cáncer, razón por la cual se consideran una excelente alternativa natural para la recuperación de pacientes tratados con quimioterapia. Los estudios han comprobado cinco efectos de regeneración a saber: 1. Incremento del número de leucocitos en sangre; 2. Recuperación de las funciones del sistema inmunológico del organismo; 3. Recuperación del apetito; 4. Reducción del dolor; 5. Efectos anti-eméticos y 6. Detención de la caída del pelo (Martinez-Carrera, Sobal et al. 2004).

Tabla I-1. Propiedades medicinales para *Lentinula edodes*. (Wasser y Weis 1999)

	Antifúngico	Antiinflamatorio	Antitumoral	Antiviral (anti-VIH)	Antibacterial y Antiparasítico	Regulador de la presión sanguínea	Desordenes cardiovasculares	Hipercolesterolemia, Hiperlipidemia	Antidiabético	Inmunomodulador	Tónico de riñones	Hepatoprotector	Tónico Nervioso	Potenciador Sexual
<i>Lentinula edodes</i>		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X		X

X: producto comercialmente desarrollado (medicamento o suplemento dietario)

I.2 Propiedades antibacteriales y antivirales

Es conocido que tanto el micelio de *Lentinula edodes* (LEM) como los medios agotados y diferentes extractos de éstos exhiben propiedades antibacteriales, con mayor efectividad contra gram positivos que contra gram negativos. Nora evaluó el medio agotado de *L. edodes* frente a varias bacterias (incluidas patógenas como *Bacillus megaterium*, *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*) y levaduras (*Candida albicans*); observando la inhibición del crecimiento de las bacterias (actividad bacteriostática) gram positivas, mientras que no inhibió ni las gram negativas ni la levadura (Nora 2001). Estos resultados son concordantes con el estudio realizado por Dantas-Vanetti en 2001; allí se evaluó la actividad antimicrobiana del micelio y extractos de éste, enfrentado a contaminantes de alimentos tanto gram positivos, como gram negativos (Dantas-Vanetti, Kazue et al. 2001); se ha argumentado que la acción antimicrobiana del Shiitake proviene de las lentamicinas y la lenticina (eritadenina), compuestos ajenos a los glucanos de la pared (Soboleva, Krasnopol'skaya et al. 2006). Así mismo, se ha explorado el posible uso del hongo como controlador biológico de fitopatógenos, mediante la evaluación de la actividad antimicrobiana contra *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae*, *Guignardia citricarpa*, *Colletotrichum sublineolum* y el virus del mosaico del tabaco (VMT), demostrándose la inhibición de las bacterias y del micromiceto por parte del Shiitake. Sin embargo, hubo una limitada inhibición de VMT con el extracto acuoso del micelio

(Pimentel 2008). Por otro lado, el LEM (micelio de *Lentinula edodes*, por su sigla en inglés) también ha demostrado su capacidad para inhibir *in vitro* la infección del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y la recuperación de pacientes infectados por otros virus; por ejemplo, estudios clínicos con 40 pacientes afectados por hepatitis B crónica, el LEM mejoró el funcionamiento del hígado y redujo la presencia del virus de la hepatitis B en sangre (Martinez-Carrera, Sobal et al. 2004).

Pero no sólo los compuestos del hongo sin modificación son los responsables de las acciones biológicas ya que algunos derivados como el sulfato de lentinan presentan una potente actividad para suprimir la expresión e infección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Otros compuestos antivirales también identificados del micelio son las lentinamicinas A y B; por otro lado, un extracto de Shiitake demostró una reducción del 46% de lesión pulmonar ocasionada por el virus de la influenza, lo cual fue incluso más eficiente que algunos medicamentos antivirales (clorhidrato de amantadina) empleados comúnmente (40%). También detuvo la multiplicación del virus de la poliomielitis (Mattila, Suonpää et al. 2000; Martinez-Carrera, Sobal et al. 2004). -

I.3 Propiedades hipocolesterolémicas y antihipertensivas

Los altos niveles de colesterol normalmente están asociados a la hipertensión y propensión a enfermedades cardiovasculares en el ser humano. La “lenticina” o “lentinacina” (eritadenina), aceleran la excreción y descomposición metabólica del colesterol ingerido por el organismo (Sugiyama, Akachi et al. 1995; Martinez-Carrera, Sobal et al. 2004). Un efecto similar lo produce también la fibra dietética contenida en el Shiitake. Pero, no sólo los intrametabolitos presentan estas acciones ya que un exopolímero, familiar a una glicoproteína, aislado del Shiitake, cuando se administra en una dosis de 200 mg/kg peso corporal, reduce el nivel plasmático de colesterol total en un 25,1%, mientras que el nivel de triglicéridos desciende en un 44,5% (Yang, Kim et al. 2002). Por otra parte, su bajo contenido de sodio y alta proporción de potasio hacen que sean ideales en la dieta para disminuir la hipertensión, sin embargo algunos estudios se han llevado a cabo al respecto, con muy buenos resultados (Kabir, Yamaguchi et al. 1987).

I.4 Propiedades antitrombóticas e hipoglicemiantes

La lentinacina, ha demostrado tener una notable actividad antitrombótica, mediante la inhibición de la aglutinación de plaquetas (Martinez-Carrera, Sobal et al. 2004). Así mismo se ha determinado los efectos hipoglicemiantes de un exo-polímero aislado del Shiitake. Al administrarse en una dosis de 200mg/kg peso corporal se registró una reducción de hasta el 21,5% en el nivel de glucosa plasmática, así como un incremento de 22,1% en el nivel de insulina plasmática (Yang, Kim et al. 2002).

Tabla I-2. Principales compuestos medicinales aislados del Shiitake (*Lentinula edodes*) (Rendon y De Villeros 2004)

Compuesto Activo	Tipo de Compuesto	Propiedad
Eritadenina	Derivado de adenosina	Hipolipidémico
C-1-2	Polisacárido	Inmunoactivo
Lectina	Proteína	Inmunoactivo
Lentinan	Polisacárido	Inmunoactivo, anticancerígeno, antiviral, antibacterial
Emitanina	Polisacárido	Inmunoactivo
EP3	Lignina	Antiviral, inmunoactivo
KS-2, KS-2-B	Péptido	Antiviral, inmunoactivo, antibacterial
-----	Poliribonucleótidos	Inmunoactivos
Ac2p	Polisacárido	Antiviral
FBP	Proteína	Antiviral
Tioprolina (TCA)	Aminoácidos	Eliminador de nitritos
Ergosterol	Esterol	Anticancerígeno

II. Fermentación en Estado Líquido de Shiitake

La fermentación en estado líquido (FEL) o fermentación sumergida (FS) hace referencia a aquella en donde hay por lo menos la misma concentración de agua y de sustrato sólido (nutrientes) en el proceso, es decir que hay una solución (Rodríguez-Couto, S. *et al.* 2006). Estos nutrientes deben ser preferiblemente líquidos o solubles en agua o en su defecto que se encuentren en suspensión. Es el tipo de fermentación más utilizado en la industria debido a que es sencillo, pueden controlarse muchas más variables que en la fermentación en estado sólido (FES) y el producto final es mucho más fácil de recuperar (Crueger & Crueger. 1993). En esta clase de fermentación los microorganismos se desarrollan flotando en el volumen del medio de cultivo, en el caso de los hongos miceliales (mohos), éstos pueden formar pequeñas esferas de micelio (pellets) cuando hay agitación, de otra forma, crecen en la superficie. El desarrollo del microorganismo se presenta de forma típica, dando origen a una fase de latencia o acoplamiento, una de crecimiento (fase logarítmica), una fase estacionaria y la última, la fase de muerte. La FEL también puede dividirse en varios tipos, por lote, continua y alimentada entre otras, según la entrada y salida de sustrato y producto, respectivamente (Crueger & Crueger. 1993).

El desarrollo de la biotecnología en especial de la fermentación en estado líquido (FEL) y la facilidad que proporciona en cuanto al manejo de sus variables, ha permitido realizar el cultivo del micelio de macrohongos con aumento en la producción de sus metabolitos, lo que ha impulsado aún más su obtención y el estudio de los compuestos con potencial como medicamentos tanto del medio agotado como del micelio (Smith, Rowan *et al.* 2002; Lindequist, Niedermeyer *et al.* 2005; Fazenda, Seviour *et al.* 2008).

En cuanto a la FEL en Shiitake, es utilizada para diferentes propósitos; es así como la literatura reporta la utilización del hongo en biorremediación de efluentes industriales con colorantes y residuos de destilerías, en producción de biodisel, (Nora y Imre 2001; Gaitán-Hernández, Esqueda *et al.* 2006; Vetchinkina, Pozdnyakova *et al.* 2008; Ahlawat y Singh 2009; Lopes, Sabaini *et al.* 2009; Vinokurov, Barkov *et al.* 2010; Saeki, Takeda *et al.* 2011) y de biometabolitos de interés tanto farmacéutico como alimenticio (Giovannozzi, D'annibale *et al.* 1994; Nora 2001; Turlo, Gutkowska *et al.* 2008; Osman, Hassan *et al.* 2009; Tepwong y Ohshima 2009; Feng, Li *et al.* 2010; Turlo, Gutkowska *et*

al. 2010). Sin embargo su utilización es poca comparada con otros basidiomicetos como *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma* y *Pleurotus* que son objeto de numerosos estudios en lo que respecta a la FEL, muchos de ellos ya a escala industrial (Lee, Lee *et al.* 1999; Tang y Zhong 2003; Prasad, Mohan *et al.* 2005; Benkortbi, Hanini *et al.* 2007; Papaspyridi, Katapodis *et al.* 2007; Tang, Zhu *et al.* 2007; El-Enshasy, Daba *et al.* 2010; Papaspyridi, Aligiannis *et al.* 2011; Zhou, Su *et al.* 2012). En cuanto a las condiciones generales de la FEL en Shiitake diferentes autores indican que la fuente de carbono más utilizada es la glucosa y que las fuentes de nitrógeno orgánico como el extracto de levadura y la peptona, son mejores que las inorgánicas, ya que estas últimas pueden inhibir el crecimiento o la producción de metabolitos (Fazenda, Seviour *et al.* 2008; Osman, Hassan *et al.* 2009; Feng, Li *et al.* 2010). De otra parte, y a pesar de que el pH puede influir en el metabolismo del hongo, ya que a pHs ácidos o básicos el hongo puede tomar diferentes rutas metabólicas y producir biomasa o biometabolitos secundarios como polisacáridos, el Shiitake tiene la capacidad de crecer en un amplio rango de pH (Stamets 1993; Furlan, Virmond *et al.* 1997; Fazenda, Seviour *et al.* 2008). De igual manera la temperatura y la aireación influyen en el crecimiento de los hongos, siendo un rango de 25 – 35°C el más adecuado ya que a temperaturas superiores a 35°C se puede inhibir el crecimiento (Osman, Hassan *et al.* 2009). De las pocas investigaciones realizadas se puede concluir que el promedio de temperatura empleado para FEL de *L. edodes* es de 26°C (Tsivileva, Pankratov *et al.* 2005; Turlo, Gutkowska *et al.* 2010). Así mismo al ser un organismo aerobio estricto y tener una alta susceptibilidad al CO₂ (Stamets 1993) la aireación debe ser constante, parámetro que en FEL con la técnica de frasco agitado, depende de la agitación ya que ella provee el oxígeno al interior del medio e impide que se produzcan zonas anaerobias durante la fermentación. En este orden de ideas una agitación de 100 a 150 rpm ha dado buenos resultados. Para la fermentación de *L. edodes* en fermentadores la aireación se lleva a cabo mediante inyección de oxígeno con agitación para la homogenización del medio con valores desde 1,5 l/litro de medio *min hasta 50l/litro de medio *min y agitaciones desde 100 rpm hasta 200 rpm (Kim, Hwang *et al.* 2002; Lobanok, Babitskaya *et al.* 2003; Feng, Li *et al.* 2010; Turlo, Gutkowska *et al.* 2010).

III. Alimentos Funcionales a partir de Shiitake

La Academia Nacional de Ciencia de los Estados Unidos, define los alimentos funcionales como “cualquier alimento o ingrediente alimenticio modificado, que pueda proporcionar un beneficio a la salud superior al de los nutrientes tradicionales que contiene” (Thomas y Eart 1994). El concepto de alimento funcional fue desarrollado por los japoneses durante la década de los 80's y los mismos introducidos en la dieta básica debido a la necesidad de disminuir los costos de los servicios de salud de una población que cada día aumentaba su edad y sus riesgos fisiológicos. El único país en el mundo que tiene un ente regulador para los alimentos funcionales es Japón, el cual desde 1991 controla esta clase de alimentos por medio de la aplicación del sistema FOSHU. Los alimentos con la aprobación de esta organización están soportados por informes de seguridad, evidencias científicas sobre el efecto en los humanos y la composición o análisis nutricional correspondiente. El FOSHU describe once categorías de ingredientes con actividad fisiológica (Cortés, Chiralt et al. 2005):

- Fibras alimentarias.
- Oligosacáridos.
- Alcoholes derivados de azúcares.
- Ácidos grasos poli insaturados.
- Péptidos y Proteínas.
- Glucósidos, Isoprenoides y Vitaminas.
- Alcoholes y Fenoles.
- Colinas (lecitina).
- Bacterias del ácido láctico.
- Minerales.
- Otros.

En el desarrollo de alimentos funcionales, son los japoneses quienes se posicionan en primer lugar, tanto así que en Japón hay patentes registradas relacionadas con alimentos y Shiitake desde 1986 (176 en total, INPIT). Los alimentos en su mayoría corresponden al resultado de tecnologías de fermentación en las que el micelio y el carpóforo son aprovechados para la producción de alimentos mediante la adición de éstos a un alimento, previa deshidratación del material fúngico. Cabe anotar aquí que son muy pocos los desarrollos alcanzados con el medio de cultivo agotado, lo que presupone la

pérdida de compuestos potencialmente utilizables. Los alimentos desarrollados abarcan desde yogures hasta bebidas alcohólicas, productos cárnicos, de panadería, así como salsas para sazonar alimentos; todos con el fin de adicionar un elemento funcional al alimento. La tabla I-3 muestra algunas de las patentes reportadas en Japón para la utilización de Shiitake en alimentos funcionales (JPO. 2012).

Tabla I-3. Algunas de las patentes obtenidas a partir de Shiitake y relacionadas con alimentos. Japan Patent Office (2012)

Producto de la patente	Parte del hongo utilizada	Número de patente y año de publicación
Alimento para la prevención de la caries	Carpóforo y micelio	2010-077028 2010
Pasta de pescado con hongos	Carpóforos crudos o deshidratados, extractos	2008-118978 2008
Agente terapéutico para inclusión en alimentos o bebidas	Carpóforos deshidratados	2006-273836 2006
Bebida alcohólica	Carpóforos secos	2006-204202 2006
Extracto para alimentos	Micelio	2005-132812 2005
Producción de yogurt	Micelio (extracto)	08-051927 1994
Hamburguesas	Pileos	01-317365 1989
Modificación del salvado del trigo para la elaboración de pan	Micelio	62-143658 1987
Espaguetis	Carpóforos secos	61-128851 1986
Torta de pescado	Carpóforo	61-015667 1986

Alrededor del mundo son pocos los estudios que se realizan de la inclusión de *L. edodes*, siendo los países orientales como China, Taiwan, Tailandia, Korea, los que más avances realizan. Japón ha desarrollado desde empanadas, pan, jamones, hasta jugos y bebidas alcohólicas, entre otros (Son, Kim et al. 2003; Chun, Chambers et al. 2005; Guo, Wang et al. 2008; Lin, Tseng et al. 2008; Guan, Xue et al. 2009; Yang 2009; Lin, Huang et al. 2010; Songdach, Riebroy et al. 2011). En lo que respecta a Estados Unidos, solamente se han encontrado 5 patentes relacionadas con esta clase especial de alimentos, empleados en su mayoría en la alimentación de personas enfermas y no como alimentos funcionales (tomado de google patents). En Europa, son muy pocos los alimentos funcionales que incluyen shiitake, solamente se reporta el uso del hongo para enriquecimiento de galletas dulces en Polonia (Regula y Gramza-Michalowska 2009). Lo general es el empleo del micelio o carpóforos deshidratados y empacados en tabletas como suplementos nutricionales. En Colombia, el desarrollo de este tipo de productos es casi nulo, solamente se ha reportado un trabajo de grado de la Universidad de la Salle, en el que utilizan el carpóforo seco, como sustituto de la harina en la producción de galletas dulces (Beltrán y Puerto 2006).

IV. Terapias Contra el Cancer

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el “cáncer” como un término que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de “tumores malignos” o “neoplasias malignas” y tienen como característica la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis (OMS. 2012). El Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (NCI por su sigla en inglés) lo define como un conjunto de enfermedades en las que las células anormales se dividen sin control y pueden invadir otros tejidos (NCI. 2012). Los tratamientos que se aplican a los pacientes pueden variar dependiendo de las edades y tipos de cáncer, pero la mayoría de éstos están enfocados a la eliminación de las células cancerosas. Entre estos tratamientos se encuentran la cirugía (en cánceres operables), la radioterapia y la más utilizada, la quimioterapia siendo este tipo de terapias extremadamente invasivas por lo que la calidad de vida del paciente se ve claramente afectada, disminuida y en algunos casos, es el tipo de tratamiento el que produce el descenso de los pacientes. No obstante, es

esta clase de tratamientos la que ha permitido que las expectativas de vida de pacientes enfermos hayan aumentado los últimos años y se pueda decir que un diagnóstico de cáncer no es sinónimo de muerte. Por otra parte, se conoce que cerca del 60% de los pacientes con cáncer solicitan en algún momento de la evolución de la enfermedad el uso de terapias alternativas (Martínez 1999); convirtiéndose en una tendencia a nivel mundial reforzada por el aumento del interés de la población por productos y terapias naturales (medicina alternativa). Sin embargo, estas terapias –contrario a lo que se podría pensar- no son solución para el cáncer, son más bien terapias adjuvantes que permiten una recuperación más rápida al paciente y disminuyen los efectos secundarios de las terapias tradicionales. Entre estas nuevas terapias se encuentran la génica (que si podría ser una terapia curativa definitiva) (Wysocki, Mackiewicz-Wysocka et al. 2002), la terapia con anticuerpos (Paganelli y de Santis 2004), la homeopatía, la medicina verde, la relajación, la vitaminoterapia, la medicina tradicional china, entre otras (Martínez 1999). Es en estas nuevas terapias alternativas donde entra la “micoterapia” donde, aprovechando el conocimiento que se tiene sobre las propiedades anticancerígenas e inmunoestimuladoras de los macromicetos, estos hongos son utilizados como complemento para el tratamiento del cáncer (Wasser y Weis 1999; Mattila, Suonpää *et al.* 2000; Smith, Rowan *et al.* 2002; Smith, Rowan *et al.* 2002; Martinez-Carrera, Sobal *et al.* 2004; Lindequist, Niedermeyer *et al.* 2005; Chan, Chan *et al.* 2009; Donatini 2010).

El panorama mundial de incidencia de esta enfermedad es por demás preocupante. Cerca de 12.700.000 de nuevos casos de cáncer se diagnosticaron y 7.600.000 muertes ocurrieron durante el 2008 (OMS. 2012). En Colombia, se dan aproximadamente más de 22.000 muertes por año a causa del cáncer, muchas más que las que produce el conflicto que aqueja nuestro país (INC 2008). De estas muertes, se producen casi 600 muertes anuales en niños menores de 15 años y aunque las expectativas de vida de los pacientes aumentan debido al avance científico que se lleva a cabo para combatir la enfermedad, también aumentan los costos para los pacientes y el sistema de salud no los subsidia. Como se mencionó anteriormente, las terapias alternativas son una buena manera de aumentar la efectividad de los tratamientos contra esta enfermedad y un buen recurso son los macromicetos. Dado que la producción de hongos por cultivo tradicional y la extracción de los metabolitos bioactivos son en algunos casos muy dispendiosas, la biotecnología es fundamental para el desarrollo de técnicas rentables y productivas para la obtención de estos bioactivos. Desafortunadamente el país tiene un bajo desarrollo de

este tipo de metodologías y es necesario que la academia, desde su perspectiva de proponente de nuevas tecnologías, profundice más en esta área con la finalidad de potenciar la producción de éstos metabolitos secundarios y así aprovecharlos para la producción de alimentos funcionales que puedan, en primera instancia, ayudar al tratamiento de enfermedades catastróficas, como el cáncer, lo que conllevaría a un menor costo en los tratamientos y un equilibrio en el sistema de salud; redundando así en la economía del país y en la salud de la población colombiana, con un especial énfasis en los niños.

V. OBJETIVOS

V. 1 Objetivo General

Estandarizar el proceso *in vitro* de la fermentación líquida de *Lentinula edodes* (Shiitake) para la obtención de bioactivos y evaluar su aplicabilidad en la producción de alimentos funcionales.

V. 2 Objetivos Específicos

Establecer la cinética de crecimiento del hongo, así como la de producción de exo e intra metabolitos secundarios bioactivos como compuestos triterpenoidales y polisacáridos en el proceso de fermentación líquida de *Lentinula edodes*.

Estimar las concentraciones totales de los bioactivos De interés a lo largo de la fermentación.

Determinar por métodos espectroscópicos la estructura de los bioactivos triterpenoidales mayoritarios producidos en la fermentación sumergida del hongo.

Desarrollar estudios preliminares que conlleven a determinar la estabilidad de los bioactivos, así como su incidencia en las características organolépticas de una matriz alimentaria (gelatina).

1. Capítulo 1. Cultivo Biotecnológico de Macrohongos Comestibles: una Alternativa en la Obtención de Nutraceuticos

1.1 Resumen

Los macromicetos han sido parte de la cultura humana desde hace miles de años y han sido reportados como alimento humano en las más importantes civilizaciones de la historia. Se han descrito muchísimas propiedades nutricéuticas de los macromicetos, como lo son sus propiedades anticancerígenas y antitumorales, hipocolesterolémicas, antivirales, antibacterianas, inmunomoduladoras, entre otras. Dado que la producción de hongos por cultivo tradicional y la extracción de los metabolitos bioactivos en algunos casos son muy dispendiosas, la biotecnología es fundamental para el desarrollo de técnicas rentables y productivas para la obtención de estos metabolitos. Es el desarrollo de esta tecnología y la facilidad que proporciona en cuanto al manejo de sus variables, lo que ha permitido realizar el cultivo en medio líquido del micelio de macrohongos con significativa reducción de tiempo y aumento en la producción de sus metabolitos, lo que ha impulsado aún más su obtención y el estudio de compuestos con potencial como medicamentos, nutraceuticos y cuasifarmaceuticos tanto del medio agotado como del micelio. El objetivo de esta revisión es el de ofrecer una visión general de la utilización de la fermentación en estado líquido (FEL) como herramienta tecnológica para la obtención de hongos comestibles, su estudio y el de sus bioactivos, mediante la descripción de las diferentes condiciones de cultivo que en los últimos años se han empleado, así como los resultados obtenidos. Se discutirá lo correspondiente a los géneros *Agaricus*, *Flammulina*, *Grifola*, *Pleurotus* y *Lentinula*, con énfasis en este último, dado que el Shiitake ha sido considerado desde siempre como el hongo medicinal por excelencia.

PALABRAS CLAVE: Fermentación sumergida, setas comestibles, nutraceuticos, alimentos funcionales, compuestos bioactivos.

1.2 Introducción

Las setas han sido empleadas por el hombre desde hace milenios tanto para la alimentación, como para el tratamiento de diferentes enfermedades; siendo los países del lejano oriente como Japón, China y Corea los principales utilitarios de ésta práctica (Smith, Rowan et al. 2002). En las últimas décadas y debido a la comprobación de las diversas actividades biológicas exhibidas por sus metabolitos secundarios, entre las que se encuentran antioxidante, hipocolesterolemica, hipoglicémica, antibacterial, antiviral, reguladora del sistema cardiovascular, la anticancerígena y la inmunomoduladora (Mattila, Suonpää et al. 2000), se ha intensificado a nivel mundial no sólo el cultivo y sino el consumo de este tipo de hongos sino el estudio de sus bioactivos.

Todos los metabolitos secundarios que producen los macromicetos y que les dan características nutraceuticas especiales han sido en su mayoría aislados del carpóforo y en la actualidad algunos de estos compuestos se extraen para ser empleados en la producción de medicamentos comerciales (Smith, Rowan et al. 2002). Investigaciones preliminares realizadas sobre basidiomicetos (Chang y Miles 2004) han puesto de manifiesto que la proporción de estos compuestos varía tanto con el estadio del hongo como con el medio en que es cultivado.

Si bien es cierto que la obtención de cuerpos fructíferos es sencilla debido a que se pueden usar diferentes sustratos baratos y accesibles, el cultivo tradicional no permite obtener los bioactivos en breves periodos de tiempo (días) y con procesos de purificación sencillos (Stamets 1993; MushWorld 2004). Es aquí donde el desarrollo de la biotecnología, por la facilidad en el manejo de sus variables, ha permitido realizar el cultivo en medio líquido del micelio de macrohongos con aumento en la producción de sus metabolitos, lo que ha impulsado considerablemente la obtención y determinación estructural de compuestos con potencial como medicamentos. Cabe anotar aquí que dichos compuestos se encuentran tanto en el micelio como en el medio agotado, lo que proporciona un mayor valor al empleo de la fermentación en estado líquido (FEL) o

fermentación sumergida como igualmente se le conoce para la producción de macromicetos.

El objetivo de esta revisión es el de ofrecer una visión actualizada de la utilización de la FEL como herramienta tecnológica en la obtención de los hongos comestibles más conocidos, con especial énfasis en *Lentinula edodes*, y una descripción de las investigaciones realizadas sobre condiciones de cultivo para la obtención de compuestos bioactivos de interés farmacológico y alimenticio.

1.3 Fermentación en Estado Líquido (FEL)

Desde el punto de vista biotecnológico, la fermentación se entiende como el proceso en que los microorganismos producen biomasa y metabolitos a partir de la utilización de sustancias orgánicas, en ausencia o presencia de oxígeno. La descomposición de los sustratos es llevada a cabo por enzimas producidas para tal fin por los microorganismos (Hernández 2003). Desde el enfoque bioquímico, la fermentación es definida como un conjunto de reacciones catabólicas que producen adenosín trifosfato (ATP), en las cuales los compuestos orgánicos sirven tanto de donadores primarios como de aceptores finales de electrones; produciendo el ATP por fosforilación a nivel sustrato (Madigan, Martinko *et al.* 1998). En palabras comunes, es un proceso intracelular, catabólico de oxidación incompleta, siendo el producto final un compuesto orgánico (Hesseltine 1972). Las fermentaciones pueden clasificarse como naturales o artificiales, cuando hay o no la intervención del hombre en ellas. Así mismo, según el tipo de producto que se desea obtener, según la presencia o ausencia de oxígeno, o según el estado del sustrato (Hesseltine 1972). Es este último aspecto el que permite clasificarlas en fermentaciones en estado líquido y fermentaciones en estado sólido.

La fermentación en estado líquido o fermentación sumergida (FEL) es aquella en la cual hay por lo menos la misma concentración de agua y de sustrato sólido (nutrientes) en el proceso, es decir que hay una solución de los nutrientes (Couto y Sanromán 2006; Fazenda, Seviour *et al.* 2008). Es el tipo de fermentación más utilizado en la industria debido a que es sencillo, pueden controlarse muchas más variables que en la fermentación en estado sólido (FES) y el producto final es mucho más fácil de recuperar (Crueger y Crueger 1993). En ella los microorganismos se desarrollan flotando en el

medio de cultivo y en el caso de los hongos miceliales, éstos pueden formar pequeñas esferas de micelio denominadas “pellets” cuando hay agitación, de otra forma, crecen en la superficie. En la FEL el desarrollo del microorganismo 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 (Crueger y Crueger 1993).

La principal diferencia con la FES radica en que el crecimiento de los hongos filamentosos en esta última se efectúa en un sustrato sólido cercano a la ausencia de agua, pero con la suficiente presencia de ésta para soportar el crecimiento y el metabolismo (Fazenda, Seviour *et al.* 2008). Sin embargo, a pesar de las muchas investigaciones que se han realizado desde que se conoce este tipo de fermentación, se siguen presentando algunos problemas como son la baja rata de transferencia de O₂, CO₂, remoción de calor y la contaminación bacteriana. Por otro lado; es un proceso lento para el cual muy pocos organismos se prestan debido precisamente a su baja actividad de agua, siendo además un proceso difícil de monitorear, controlar y escalar lo que lo convierte en un proceso de difícil implementación en la industria a pesar que la mayoría de ella, en especial la farmacéutica, la utiliza. Es por esto que la FEL se ha convertido en el método preferido de fermentación para aplicaciones industriales dado que es menos problemática debido a que se puede controlar la transferencia de oxígeno y la homogeneidad del cultivo es muy superior, haciéndola más repetitiva, reproducible y fácil de monitorear. En lo que respecta a las setas comestibles, sólo hasta hace unos años se ha empezado a desarrollar esta tecnología.

Las setas se han empleado en la alimentación y la medicina desde hace varias centurias, produciéndose en composta, tubulares, troncos, etc., que constituyen el cultivo tradicional (una fermentación en estado sólido). Sin embargo, el mayor inconveniente del empleo de setas como productor de bioactivos, es la variabilidad de los mismos debida a la composición del medio en el que se cultiva (por ejemplo, no todos el aserrines son iguales, así provengan de la misma especie). En contraste con la FES, la FEL ofrece un gran potencial gracias a que es una técnica mucho más rápida en donde las condiciones de cultivo son fácilmente reproducibles e independientes de las variaciones climáticas. Si bien es cierto que los macromicetos crecen mucho más lento que las bacterias y los

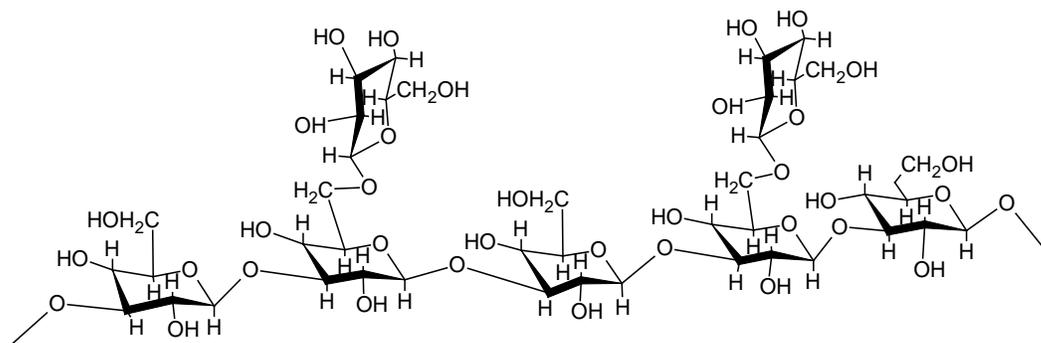
micromicetos, se puede aplicar esta tecnología mediante una optimización del proceso dependiendo la cepa y los metabolitos de interés.

1.4 Metabolitos Fúngicos con Potencial Terapéutico

Las setas comestibles son conocidas por su alto valor proteico, su considerable concentración de vitaminas, minerales, fibra dietaria, bajos niveles de sodio y grasas insaturadas (MushWorld 2004). Esto los convierte en un excelente nutraceutico ya que sus propiedades medicinales están directamente relacionadas con los compuestos que presentan acciones biológicas con potencial terapéutico. Dichos compuestos se pueden aislar tanto del micelio, como del carpóforo y del medio de cultivo agotado. Dentro de éstos se encuentran β -glucanos, enzimas, policétidos, ácidos grasos, polifenoles, flavonoides y terpenoides, entre otros. A continuación se describen los que se encuentran en mayor proporción en los macromicetos.

1.4.1 β -glucanos

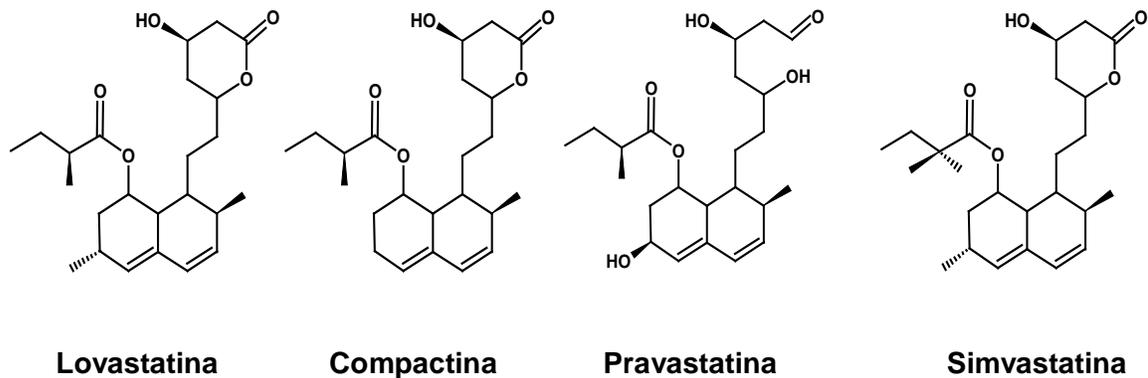
Los β -glucanos son polisacáridos no celulósicos constituidos por unidades de glucosa unidas por enlaces glicosídicos y con ramificaciones β -1-3 ó β -1-6. Son aislados principalmente de la pared celular de las células fúngicas (aproximadamente la mitad de la biomasa de la pared celular es constituida de β -glucanos); aunque también pueden ser excretados al medio. Poseen actividades inmunoestimuladoras, anticancerígenas, antiinfecciosas, hipocolesterolémicas, hipoglicémicas, antiinflamatorias y analgésicas (Chen y Seviour 2007; Smiderle, Olsen *et al.* 2008). El β -glucano más conocido a nivel mundial es el lentinan (figura 1-1), aislado de *Lentinula edodes* (Shiitake), polisacárido de 27,5 kDa que es utilizado en Japón como una medicina anticancerígena (Smith, Rowan *et al.* 2002; Chang y Miles 2004), debido a que estimula la secreción de citocinas por células T, lo que incrementa la generación de linfocitos T citotóxicos y células NK en presencia de interleucina 2 (Martinez-Carrera, Sobal *et al.* 2004; Zhang, Li *et al.* 2011).

Figura 1-1. Estructura de la unidad básica del lentinan

Aunque el lentinan es un agente anticancerígeno, es necesario realizarle modificaciones químicas para aumentar su actividad. Las investigaciones al respecto pusieron de manifiesto que la sulfatación puede aumentar su eficacia (Feng, Li *et al.* 2010; Feng, Li *et al.* 2010). Aunado a lo anterior se encuentra un reporte preliminar sobre el efecto protector de este glucano frente a infecciones de *Mycobacterium tuberculosis*, *in vitro* e *in vivo* en ratones. El modelo *in vivo* demostró que la administración de lentinan antes de la infección puede movilizar las defensas potenciales del huésped y reducir la infección micobacteriana (Markova, Kussovski *et al.* 2003).

1.4.2 Policétidos

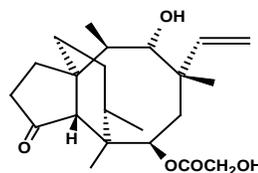
Los policétidos son estructuralmente una familia muy diversa de productos naturales con actividades y propiedades farmacológicas diversas, entre las que se cuentan la antibiótica, antifúngica, citostática, hipocolesterolémica, antiparasitaria, promoción del crecimiento animal e insecticida. Dentro de los policétidos las estatinas, policétidos no aromáticos, se constituyen en la actualidad como metabolitos muy importantes de los micetozoa dado que son inhibidores de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA), primera enzima involucrada en la biosíntesis de colesterol. La inhibición es debida a la similaridad estructural del sustrato natural de la enzima y las formas ácidas de las estatinas. Su uso es extendido en el tratamiento de pacientes con hipercolesterolemia, enfermedades cardiovasculares, así como también para aquellos propensos a la arterioesclerosis (Nirogi, Mudigonda *et al.* 2007). Las estatinas de origen fúngico incluyen la lovastatina, la simvastatina, la pravastatina y la compactina (Gunde-Cimerman, Friedrich *et al.* 1993) (figura 1-2).

Figura 1-2. Estructura de las estatinas de origen fúngico

Los macromicetos reportados como mayores productores de estos inhibidores pertenecen a los géneros *Pleurotus* y *Agaricus* y la FEL ya se está empleando por las casas comerciales farmacéuticas para la producción de este tipo de medicamentos (Çağlarırmak 2007; Pappaspyridi, Katapodis *et al.* 2007), ya que a diferencia de las sintetizadas químicamente no producen efectos secundarios indeseados en los pacientes.

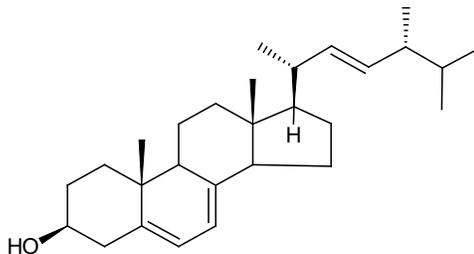
1.4.3 Terpenoides

Corresponden a moléculas formadas por unidades de isopreno, unidas cabeza a cola. Se clasifican como hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos, triterpenos y tetraterpenos. Algunos de estos compuestos han mostrado actividades antiandrogénicas, antivirales, antibacterianas, entre otras (Smith, Rowan *et al.* 2002; Liu, Shimizu *et al.* 2007; Popova, Trusheva *et al.* 2009; Lee, Ahn *et al.* 2011). Dentro de los diterpenos, el aislamiento de la pleuromutilina (figura 1-3) de *Pleurotus mutilis* y *Clitopilus passeckerianus* (antes llamado *Pl. passeckerianus*), metabolito con marcada acción antibiótica contra infecciones micoplasmáticas en animales, que ha permitido el desarrollado y la producción de este tipo de medicamento a nivel comercial (Benkortbi, Hanini *et al.* 2007).

Figura 1-3. Estructura de la pleuromutilina

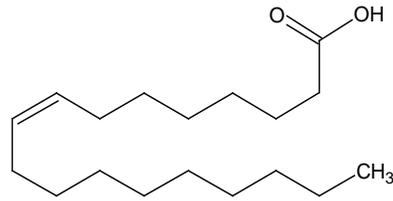
Los triterpenoides tetracíclicos tienen una gran relevancia en los macromicetos y dentro de ellos los esteroides son los metabolitos más abundantes. El ergosterol (figura 1-4) es el principal componente triterpenoidal de los hongos. Los metabolitos secundarios de esta clase presentan interesantes propiedades de tipo farmacológico; entre ellas la anticancerígena y la antimicrobiana (Smania, Delle Monache *et al.* 2003; Nieto 2010); algunos presentan también actividad hipocolesterolémica (Wasser y Weis 1999), antibiótica (Jikai 2001), antiinflamatoria (Yasukawa, Kaminaga *et al.* 1998; Lindequist, Niedermeyer *et al.* 2005), antifúngica, antitumoral (León, Valencia *et al.* 2003) e insecticida (Vokáč, Buděšínský *et al.* 1998), entre otras.

Figura 1-4. Estructura del ergosterol

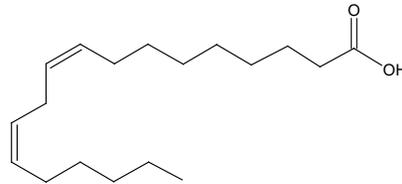


1.4.4 Ácidos grasos

La presencia de ácidos grasos insaturados como el ácido oléico y el linoléico (figura 1-5) constituye una característica nutracéutica favorable, puesto que los ácidos grasos no saturados son esenciales en una dieta sana ya que brindan protección frente a enfermedades cardiovasculares y arterioesclerosis producida por el colesterol (Miles y Chang 1999).

Figura 1-5. Estructuras de los ácidos oléico (a) y linoléico (b).

a. Estructura del ácido oléico



b. Estructura del ácido linoléico

1.5 Cultivo de Macromicetos por FEL

Debido a la gran capacidad que tienen los macromicetos de crecer en diferentes sustratos y condiciones medioambientales se ha explorado el empleo de la fermentación en estado líquido como una herramienta para obtener el mayor provecho de su cultivo. Dentro de las variables a considerar en cultivos sumergidos de macromicetos se encuentran la temperatura, el pH, la agitación y los medios de cultivo entre otras.

Diversas investigaciones ponen de manifiesto la capacidad de los macromicetos de crecer en un amplio rango de pH, sin embargo, recomiendan usar un pH de 5,0 o inferior para evitar la contaminación bacteriana. Así mismo, cuando el pH es bajo (pH 4) se incentiva la producción de biomasa y consumo de glucosa, mientras que un pH más básico (pH 6) puede estimular la producción de exopolisacáridos (Fazenda, Seviour *et al.* 2008).

La temperatura es clave para la fermentación de cualquier tipo de microorganismo. Los macromicetos también poseen la habilidad de crecer en un amplio rango de temperaturas en la naturaleza (Stamets 1993), sin embargo para las fermentaciones líquidas se ha empleado un rango entre 26°C y 36°C. Si bien se ha evidenciado que un aumento de la temperatura puede influir en el aumento del metabolismo del hongo, dicha variación

disminuye la solubilidad del oxígeno disuelto en el medio, lo que conllevaría a que la disponibilidad de éste sea menor en el interior del medio de cultivo y por consiguiente el crecimiento y el metabolismo disminuya en, ya que los macromicetos son organismos aerobios estrictos y son muy sensibles a las bajas concentraciones de oxígeno (Stamets 1993; Fazenda, Seviour *et al.* 2008).

La aireación es otro factor importante y fácil de controlar que influye directamente en la oxigenación y la homogenización del medio de cultivo durante la fermentación. La aireación puede darse por agitación de los caldos lo que permite que el oxígeno del ambiente se disuelva en el medio de cultivo, o bien por inyección donde el oxígeno es introducido al medio de cultivo a través de tubos conectados al fermentador, con o sin agitación. Algunos investigadores establecieron que una agitación muy fuerte puede llevar al rompimiento del micelio por las fuerza de agitación y por lo tanto la formación de pellets (en consecuencia, la producción de biomasa) se ve reducida, así como la producción de metabolitos como los exopolisacáridos (Fazenda, Seviour *et al.* 2008).

Otro parámetro determinante es la composición del medio de cultivo empleado para la fermentación líquida, ya que de éste depende el crecimiento micelial y por ende la biosíntesis de metabolitos. En la producción de macromicetos se han empleado medios sintéticos, medios complejos y sustratos constituidos por desechos. Es claro tener en cuenta que un medio puede ser bueno para una especie mientras que para otra no, afectando así mismo tanto la producción como la liberación de metabolitos. También es importante definir la relación carbono - nitrógeno ya que puede influenciar la eficiencia de producción de biomasa y de metabolitos (Fazenda, Seviour *et al.* 2008).

1.5.1 Principales Setas Comestibles Cultivadas por FEL

Dentro de las más conocidas se encuentran *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus spp*) y *Flammulina velutipes*. Prácticamente todas estas setas han sido introducidas a la cultura occidental desde países como China y Japón, debido a la gran inmigración de habitantes de esas zonas al hemisferio occidental y su aceptación se dio gracias a sus agradables sabores y excelente textura, lo que permitió la inclusión de las mismas en la dieta de casi todos los países del mundo. Los estudios realizados sobre los bioactivos producidos por los hongos comestibles, permiten ver su potencial empleo en la

farmacoterapia o en la elaboración de alimentos funcionales haciendo necesario realizar su cultivo por técnicas biotecnológicas, a fin de obtener mayor cantidad de compuestos en menor tiempo y con procesos de purificación más sencillos.

Género *Agaricus*

La primera fermentación en estado líquido de este género de macromicetos fue descrita por Humfeld en 1948 empleando *A. campestris*. A pesar de que la especie más conocida de este género es el *A. bisporus*, comúnmente llamado champiñón de París y siendo el macromiceto comestible más cultivado a nivel mundial mediante técnica tradicional en sustratos compostados que por lo general se componen de desechos agroindustriales; el empleo de la fermentación en estado sumergido se ha realizado en su mayoría para procesos de biorremediación (Ahlawat y Singh 2009; Akar y Divriklioglu 2010; Ertugay y Bayhan 2010); encontrándose un solo reporte del empleo de la fermentación para la bioproducción del micelio de esta especie con el propósito de obtener un análogo de la carne (Kim, Choi *et al.* 2011).

El *A. blazei*, también llamado *A. brasiliensis* o seta del sol, es la especie más utilizada en FEL para la producción de polisacáridos y otros compuestos con acciones biológicas conocidas y posible uso farmacológico (Lima, Habu *et al.* 2008; Li, Su *et al.* 2009). Es así como en 2008 se realizó la caracterización de exopolisacáridos producidos por la especie en fermentación sumergida (Lima, Habu *et al.* 2008); estudios que fueron complementados en 2009, con la determinación del efecto de los polisacáridos extracelulares en la hipolipidemia y la selección de un medio de cultivo de bajo costo, con alta producción de biomasa y polisacáridos intracelulares (Li, Su *et al.* 2009; Liu y Wang 2009). En 2010 se utilizó *A. brasiliensis* para la producción de exopolisacáridos y el estudio de la influencia de los diferentes métodos de secado en la actividad antitumoral presentada por estos metabolitos (Fernandes, Habu *et al.* 2011); cuya extracción también fue estandarizada en ese mismo año (Wang, Lui *et al.* 2010). Así mismo, se estudió el efecto de la aireación en la producción de ergosterol y blazeispirol (Shu y Lin 2011). El *A. novoi* se utilizó para hacer un estudio comparativo entre basidiomicetos en lo relacionado a la producción de exopolisacáridos por fermentación en estado sumergido empleando diferentes fuentes de carbono y nitrógeno (Elisashvili, Kachlishvili *et al.* 2009).

Género *Flammulina*

Enokitake es el nombre japonés con el que se conoce a este hongo, en Latinoamérica se conoce como “eñoki” y es una de las setas comestibles que presenta el carpóforo más pequeño pero con sabor muy agradable. La especie más conocida de este género es *Flammulina velutipes*. Los estudios desarrollados sobre ella son muy pocos a pesar de que es un hongo consumido a nivel mundial. El primer reporte hace referencia al estudio de las condiciones de cultivo del micelio para la producción de compuestos antimicrobianos (Rodrigues de Melo, Paccola-Meirelles *et al.* 2009). Posteriormente se realizó una evaluación completa de las condiciones de cultivo en FEL, composición y actividad biológica del micelio (Kozhemyakina, Ananyeva *et al.* 2010; Kim, Kong *et al.* 2011). En el 2011, se evaluaron las peptidasas extracelulares durante la fermentación koji (fermentación del trigo o de la soya por acción de micromicetos) y se desarrolló la identificación diferencial de genes con actividad antitirosina (Kozhemyakina, Ananyeva *et al.* 2010; Grimrath, Berends *et al.* 2011).

Género *Grifola*

La *Grifola frondosa* en Japón es llamada “maitake”. Su consumo también es muy difundido en los países asiáticos, sin embargo en el hemisferio occidental apenas si se la conoce. Este hongo exhibe actividades biológicas muy interesantes como son la inmunoestimuladora y la hipoglicemiantes. En cuanto a los estudios efectuados sobre este género que incluyen FEL se encuentra la extracción de polisacáridos del micelio de *Gr. frondosa* (Liu, Han *et al.* 2010), el estudio del efecto del trigo en el cultivo sumergido de *Gr. umbellata* (Chen, Chen *et al.* 2010); la determinación de la inhibición en células de cáncer de ovario producida por el extracto en acetato de etilo de *Gr. frondosa* (Rouhana-Toubi, Wasser *et al.* 2009); el efecto de la ingesta del micelio *G. frondosa* en la respuesta glicémica en ratas diabéticas (Lo, Hsu *et al.* 2008); la elucidación estructural de 1,3 β-D-glucano en *Gr. frondosa* (Tada, Adachi *et al.* 2009); el aumento en la producción de polisacáridos *Gr. umbellata* mediante la optimización de las condiciones de cultivo en frasco agitado (Huang y Liu 2008; Shih, Chou *et al.* 2008) y el estudio del crecimiento micelial y la producción de polisacáridos bioactivos en *Gr. frondosa* en cultivos por lote y lote alimentado (Shih, Chou *et al.* 2008).

Género *Pleurotus*

Es la segunda seta producida a nivel mundial. Es conocida en diferentes países como hongo ostra, gírgolas u orellanas. Aunque posee diferentes acciones biológicas, su mayor interés radica en la producción de polisacáridos inmunoestimuladores y estatinas naturales que son hipocolesterolémicas y que aventajan a las sintetizadas químicamente por sus pocos efectos secundarios. El género *Pleurotus*, debido a su gran producción de lacasas de baja especificidad y otras enzimas y a su eficiencia en la degradación de compuestos xenobióticos ha sido estudiado ampliamente para la biorremediación de diferentes efluentes (Giovannozzi, D'annibale *et al.* 1994; Rodríguez, Fernández *et al.* 2003; Anastasi, Prigione *et al.* 2010; Daba, Youssef *et al.* 2011; Goyal y Soni 2011). En lo referente a la producción de compuestos bioactivos se han realizado diversos trabajos donde se ha estudiado la producción de exopolisacáridos y xylooligosacáridos en *Pl. citrinopileatus*, *Pl. tuber-regium* (Wu, Mau *et al.* 2008; Zhang y Cheung 2011; Zhang y Cheung 2011), otros autores en *Pleurotus* spp. BCCB068 y *Pl. tailandia* (de Menezes, Silva *et al.* 2009), respectivamente. Así mismo, se ha reportado el efecto de la soya en la producción de pleuromutilina en *Pl. mutilis* (Hu, Zou *et al.* 2009) la formación y desarrollo de los pellets durante la fermentación así como el estudio de la temperatura en este proceso y su influencia en la apoptosis de las células (Petre, Teodorescu *et al.* 2010; Huang, Lin *et al.* 2011), la optimización de la producción de glucanos en *Pl. ostreatus* (El-Enshasy, Daba *et al.* 2010; Papaspyridi, Katapodis *et al.* 2010), la determinación de la actividad antioxidante del micelio de especies de *Pleurotus* (Liu, Zhou *et al.* 2010), de las actividades antitumorales e inmunoestimuladoras de los endopolímeros obtenidos del cultivo sumergido de *Pl. eryngii* (Jeong, Jeong *et al.* 2010) y de las propiedades antiproliferativas y antiadhesivas de los polisacáridos extraídos del micelio y carpóforos de *Pl. pulmonarius* y su aplicación en el tratamiento de caries (Lavi, Levinson *et al.* 2010). Algunos de los bioactivos obtenidos a partir de *Pleurotus* spp cultivados por FEL ya se producen a escala industrial (Wasser y Weis 1999; Smith, Rowan *et al.* 2002), sin embargo, también se hacen estudios para optimizar el proceso con nuevas tecnologías de fermentadores (Gueguim, Oloke *et al.* 2010).

1.5.2 *Lentinula edodes*

Lentinula edodes, conocido en Japón como Shiitake; es la especie mejor conocida del género y la tercera seta de mayor consumo a nivel mundial. Es considerada la seta comestible más importante a nivel medicinal debido a sus comprobadas actividades farmacológicas (Wasser 2002; Carbonero, Gracher *et al.* 2008; Hearst, Nelson *et al.* 2009; Bisen, Baghel *et al.* 2010; Chandra, Smith *et al.* 2011). Son pocos los estudios que se han realizado sobre la FEL de *L. edodes*, destacándose las investigaciones en donde se evalúan las diferentes variables para el cultivo sumergido de dos cepas diferentes del hongo, en donde se encontró que si bien su crecimiento se produce en un amplio rango de pH (desde 3 a 8), fue el pH de 7 el que proporcionó los mejores resultados (Furlan, Virmond *et al.* 1997). Sin embargo, el empleo de pH 5,5 en posteriores estudios evitó la contaminación bacteriana (Osman, Hassan *et al.* 2009). En cuanto a los medios de cultivo, se han desarrollado experimentos tanto con medios sintéticos comerciales, con propia fórmula, como con medios que incluyen materia prima o desechos industriales siendo el concepto general el de emplear una fuente de carbono sencilla y una fuente de nitrógeno orgánica ya que las sales de nitrógeno inorgánicas pueden producir cambios drásticos de pH que pueden inducir la apoptosis (Fazenda, Seviour *et al.* 2008; Osman, Hassan *et al.* 2009). Como fuentes de carbono se han usado desde caldos simples de glucosa y otros azúcares reductores, como medios más complejos (licores de maíz, melazas, almidones, caldo papa dextrosa, desechos agrícolas, líquido de estilados) (Giovannozzi, D'annibale *et al.* 1994; Rendon y De Villeros 2004; Turlo, Gutkowska *et al.* 2008; Osman, Hassan *et al.* 2009; Feng, Li *et al.* 2010; Turlo, Gutkowska *et al.* 2010). En cuanto a las fuentes de nitrógeno, las más empleadas en FEL han sido peptona y extracto de levadura (Rendon y De Villeros 2004; Turlo, Gutkowska *et al.* 2008; Osman, Hassan *et al.* 2009; Feng, Li *et al.* 2010). Por otro lado, se ha discutido mucho en cuanto a la temperatura apropiada para la FEL de *L. edodes*. Los estudios realizados a diferentes temperaturas, han arrojado como resultado que una temperatura superior a 35°C inhibe el crecimiento del hongo (Osman, Hassan *et al.* 2009). La mayoría de los estudios se han efectuado a una temperatura promedio de 26°C (Osman, Hassan *et al.* 2009; Tepwong y Ohshima 2009; Tsivileva, Pankratov *et al.* 2010). Otro punto controversial es el de la agitación. Si bien algunas evaluaciones sobre este parámetro indican como ideal una agitación entre 100 y 150 rpm, con la cual se obtiene prácticamente la misma producción de biomasa y polisacáridos (Feng, Li *et al.* 2010), estos resultados contrastan con lo encontrado por otros autores quienes realizaron

estudios con cultivos estáticos y con agitación, encontrando una gran producción de biomasa en los estáticos e inhibición del crecimiento a una velocidad de agitación de 150 rpm (Osman, Hassan *et al.* 2009). Lo anterior pone de manifiesto la conveniencia de realizar más estudios sobre este factor en *L. edodes*.

Las fermentaciones líquidas de *L. edodes* se han utilizado para fines diversos como son el estudio de la morfología del hongo en la fermentación, la formación de pellets, la producción de exoproteínas, la determinación de las bioacciones del producto biotecnológico, entre las que se destaca la actividad antioxidante (Tsivileva, Nikitina *et al.* 2008; Osman, Hassan *et al.* 2009; Petre, Teodorescu *et al.* 2010; Tsivileva, Pankratov *et al.* 2010; Turlo, Gutkowska *et al.* 2010); la antimicrobiana contra fitopatógenos, la optimización de vitamina B₁₂ (Nora 2001; Pimentel 2008; Tsivileva, Nikitina *et al.* 2008; Turlo, Gutkowska *et al.* 2008), el desarrollo de técnicas para la alta producción de bioactivos como polisacáridos, peroxidases, lectinas y lacasas (Feng, Li *et al.* 2010; Saeki, Takeda *et al.* 2011). Por otro lado, con miras a mejorar el proceso se ha explorado la utilización de compuestos que puedan aumentar la productividad como es el caso del selenio (Turlo, Gutkowska *et al.* 2008), así como la formulación de medios de cultivo apropiados para la producción de ergotioenina (Tepwong y Ohshima 2009).

De los diferentes estudios que sobre la producción de macromicetos empleando FEL se encuentran en la literatura, se puede concluir que las condiciones óptimas de cultivo son específicas, que dependen del hongo, la cepa y el metabolito de interés (tabla 1-1).

Tabla 1-1. Condiciones empleadas en la FEL de macromicetos comestibles

Género de Seta	Fuentes de carbono y nitrógeno empleadas	Temperaturas de Incubación^a	pH del medio de cultivo^a	Agitación (revoluciones por minuto)^a
<i>Agaricus</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Caldo papa dextrosa •Jugo de caña •Licor de maíz •Malta •Azúcares reductores, el más usado es la glucosa. •Proteína de soya •Extracto de levadura •Peptona 	25°C - 45°C, con un promedio de 27°C.	2 – 7, con un promedio de 6	120 - 200.
<i>Flammulina</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Caldo extracto de malta •Extracto de levadura •Asparginina •Azúcares reductores como la glucosa •Gluten de trigo •Peptona 	24°C - 28°C.	No se reporta	Estáticos, 150 y 750.
<i>Grifola</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Jugos de caña •Melazas •Aceites vegetales •Licor de maíz •Suero de leche •Azúcares reductores como la glucosa (la de mayor producción)y maltosa •Peptona •Extracto de levadura 	Se usa 25°C	pH bajos, el más usado 4,5.	100-160

<p><i>Pleurotus</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> •Caldo papa dextrosa •Aminoácidos •Licor de maíz •Extracto de malta •Azúcares reductores, las más utilizadas, glucosa y xilosa. •Hidrolizado de caseína •Torta de soya •Extracto de levadura •Peptona 	<p>25°C - 30°C</p>	<p>4 - 6</p>	<p>Estáticos, 100 - 160</p>
<p><i>Lentinula</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> •Caldo papa dextrosa •Melazas •Almidón •Licor de maíz •Lixiviados •Desechos industriales (sin especificar) •Sacarosa •Azúcares reductores, el más importante, la glucosa •Extracto de soya •Extracto de levadura •Polvo de levadura •Peptona 	<p>25°C - 40°C, con un promedio de 26°C.</p>	<p>3 - 10, con un promedio de 6</p>	<p>Estáticos, 100 – 150.</p>

1.6 Conclusiones

Los macromicetos y entre ellos, las setas comestibles, ofrecen un sinnúmero de metabolitos con actividades biológicas reconocidas. El empleo de la biotecnología y en especial la fermentación líquida por la mayor facilidad en el manejo de las variables del proceso, permitiría aprovechar al máximo la producción de bioactivos mediante la

obtención de altos rendimientos de los mismos lo que conllevaría una reducción de costos y al final, una disminución del precio al consumidor. Los estudios realizados hasta el presente con las principales setas comestibles ponen de manifiesto que las condiciones de crecimiento y producción de los metabolitos biológicamente activos difieren entre géneros y especies, así como también del bioactivo que se desea obtener. De igual manera, la implementación de esta tecnología para la producción a escala industrial se encuentra apenas en desarrollo siendo muy pocos los bioactivos producidos a escala industrial. Lo anterior evidencia el hecho de que se deben realizar más estudios de este tipo con la finalidad de lograr un desarrollo concienzudo de esta tecnología, lo que traerá como consecuencia natural el mejor aprovechamiento de los beneficios que los macrohongos aportan al ser humano.

1.7 Bibliografía

Ahlawat, O. P. y R. Singh (2009). Influence of pH, temperature and cultural media on decolorization of synthetic dyes through spent substrate of different mushrooms. *Journal of Scientific & Industrial Research* **68**: 1068-1074.

Akar, T. y M. Divriklioglu (2010). Biosorption applications of modified fungal biomass for decolorization of Reactive Red 2 contaminated solutions: Batch and dynamic flow mode studies. *Bioresource Technology* **101**(19): 7271-7277.

Anastasi, A., V. Prigione, *et al.* (2010). Industrial dye degradation and detoxification by basidiomicetes belonging to different eco-physiological groups. *Journal of Hazardous Materials* **177**: 260-267.

Benkortbi, O., S. Hanini, *et al.* (2007). Batch kinetics and modelling of Pleuromutilin production by *Pleurotus mutilis*. *Biochemical Engineering Journal* **36**(1): 14-18.

Bisen, P., R. K. Baghel, *et al.* (2010). *Lentinus edodes*: a macrofungus with pharmaceutical activities. *Current Medicinal Chemistry* **17**: 2419-2430.

Çağlarırnak, N. (2007). The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula edodes* and *Pleurotus* species) and an estimated approach to the volatile compounds. *Food Chemistry* **105**(3): 1188-1194.

Carbonero, E. R., A. H. P. Gracher, *et al.* (2008). *Lentinus edodes* heterogalactan: Antinociceptive and anti-inflammatory effects. *Food Chemistry* **111**(3): 531-537.

Couto, S. R. y M. Á. Sanromán (2006). Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *Journal of Food Engineering* **76**(3): 291-302.

Crueger, W. y A. Crueger (1993). *Biotecnología. Manual de Microbiología Industrial.*, Ed. Acribia.

Chandra, L. C., B. J. Smith, *et al.* (2011). Differential effects of shiitake- and white button mushroom-supplemented diets on hepatic steatosis in C57BL/6 mice. *Food and Chemical Toxicology* **49**(12): 3074-3080.

Chang, S. T. and P. G. Miles (2004). *Mushrooms cultivation, nutrition value, medicinal effect and environmental impact.* Boca Raton, Florida, CRC Press Inc.

Chen, H.-B., M.-J. Chen, *et al.* (2010). Effect of Using Whey in the Submerged Culture of *Grifola umbellata*. *Journal of Biotechnology* **150**, **Supplement**: 518.

Chen, J. y R. Seviour (2007). Medicinal importance of fungal β -(1→3), (1→6)-glucans. *Mycological Research* **111**(6): 635-652.

Daba, A. S., G. A. Youssef, *et al.* (2011). Production of recombinant cellulose enzyme from *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (type NRRL-0366). *African Journal of Microbiology Research* **5**: 1197-1202.

de Menezes, C. R., Í. S. Silva, *et al.* (2009). Production of xylooligosaccharides from enzymatic hydrolysis of xylan by the white-rot fungi *Pleurotus*. *International Biodeterioration & Biodegradation* **63**(6): 673-678.

El-Enshasy, H., A. Daba, *et al.* (2010). Bioprocess development for large scale production of anticancer exo-polysaccharide by *Pleurotus ostreatus* in submerged culture. *Journal of Applied Sciences* **10**(21): 2523-2529.

Elisashvili, V. I., E. T. Kachlishvili, *et al.* (2009). Carbon and Nitrogen Source Effects on Basidiomycetes Exopolysaccharide Production. *Applied Biochemistry and Microbiology* **45**(5): 531-535.

Ertugay, N. y Y. K. Bayhan (2010). The removal of copper (II) ion by using mushroom biomass (*Agaricus bisporus*) and kinetic modelling. *Desalination* **255**(1-3): 137-142.

Fazenda, M. L., R. Seviour, *et al.* (2008). Submerged Culture Fermentation of "Higher Fungi": The Macrofungi. *Advances in Applied Microbiology* **63**: 33-103.

Feng, Y.-L., W.-Q. Li, *et al.* (2010). Statistical optimization of media for mycelial growth and exo-polysaccharide production by *Lentinus edodes* and a kinetic model study of two growth morphologies. *Biochemical Engineering Journal* **49**(1): 104-112.

Feng, Y., W. Li, *et al.* (2010). Rapid and efficient microwave-assisted sulfate modification of lentinan and its antioxidant and antiproliferative activities in vitro. *Carbohydrate Polymers* **82**(3): 605-612.

Fernandes, M. B., S. Habu, *et al.* (2011). Influence by drying methods over in vitro antitumoral effects of exopolysaccharides produced by *Agaricus blazei* LPB03 on submerged fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **34**: 253-261.

Furlan, S., L. Virmond, *et al.* (1997). Mushrooms strains able to grow at high temperatures and low pH values. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **13**: 689-692.

Giovannozzi, G., A. D'annibale, *et al.* (1994). The production of exo-enzymes by *Lentinus edodes* and *Pleurotus ostreatus* and their use for upgrading corn straw. *Bioresource Technology* **48**: 173-178.

Goyal, M. y G. Soni (2011). Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Pleurotus florida*. African Journal of Microbiology Research **5**: 1131-1136.

Grimrath, A., P. Berends, *et al.* (2011). Koji fermentation based on extracellular peptidases of *Flammulina velutipes*. European Food Research and Technology **232**: 415-424.

Gueguim, E. B., J. K. Oloke, *et al.* (2010). Implementation details of computerized temporary immersion bioreactor (TIB): a fermentation case of *Pleurotus pulmonarius*. Biotechnology & Biotechnological Equipment **24**: 2149-2153.

Gunde-Cimerman, N., J. Friedrich, *et al.* (1993). Screening fungi for the production of an inhibitor of HMG CoA reductase: Production of mevinolin by the fungi of the genus *Pleurotus*. FEMS Microbiology Letters **111**(2-3): 203-206.

Hearst, R., D. Nelson, *et al.* (2009). An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. Complementary Therapies in Clinical Practice **15**(1): 5-7.

Hernández, A. (2003). Microbiología Industrial. Costa Rica, Ed. EUNED.

Hesseltine, C. W. (1972). Biotechnology report: solid state fermentations. Biotechnology and Bioengineering **14**: 517-532.

Hu, C., Y. Zou, *et al.* (2009). Effect of soybean oil on the production of mycelia biomass and pleuromutilin in the shake-flask culture of *Pleurotus mutilis*. World Journal of Microbiology and Biotechnology **25**: 1705-1711.

Huang, B., W. Lin, *et al.* (2011). Differential proteomic analysis of temperature-induced autolysis in mycelium of *Pleurotus tuber-regium*. Current Microbiology **62**: 1160-1167.

Huang, H.-C. y Y.-C. Liu (2008). Enhancement of polysaccharide production by optimization of culture conditions in shake flask submerged cultivation of *Grifola umbellata*. Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers **39**(4): 307-311.

Jeong, Y. T., S. C. Jeong, et al. (2010). Antitumor and immunomodulating activities of endo-biopolymers obtained from a submerged culture of *Pleurotus eryngii*. *Food Science and Biotechnology* **19**: 399-404.

Jikai, Y. T. (2001). Biologically active substances from mushrooms in Yunnan, China. *Heterocycles* **57**: 157-167.

Kim, K., B. Choi, et al. (2011). Bioproduction of mushroom mycelium of *Agaricus bisporus* by commercial submerged fermentation for the production of meat analogue. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **91**(9): 1561-1568.

Kim, S. Y., W. S. Kong, et al. (2011). Identification of differentially expressed genes in *Flammulina velutipes* with anti-tyrosinase activity. *Current Microbiology* **62**: 42-47.

Kozhemyakina, N. V., E. P. Ananyeva, et al. (2010). Conditions of cultivation, composition, and biological activity of mycelium of *Flammulina velutipes* (Fr) P Karst. *Applied Biochemistry and Microbiology* **46**: 536-539.

Lavi, I., D. Levinson, et al. (2010). Chemical characterization, antiproliferative and antiadhesive properties of polysaccharides extracted from *Pleurotus pulmonarius* mycelium and fruiting bodies. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**: 1977-1990.

Lee, I., B. Ahn, et al. (2011). Selective cholinesterase inhibition by lanostane triterpenes from fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **21**(21): 6603-6607.

León, F., M. Valencia, et al. (2003). Novel Cytostatic Lanostanoid Triterpenes from *Ganoderma australe*. *Helvetica Chimica Acta* **86**(9): 3088-3095.

Li, P., I. P. Su, et al. (2009). The effects of extracellular polysaccharide from the submerged fermentation of *Agaricus braziliensis* on hipolipidemic. 5th International Technnical Symposium on Food Processing, Monitoring Technology in Bioprocesses and Food Quality Management: 75-86.

Lima, L. F., S. Habu, *et al.* (2008). Production and characterization of the exopolysaccharides produced by *Agaricus brasiliensis* in submerged fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **151**(2-3): 283-294.

Lindequist, U., T. H. J. Niedermeyer, *et al.* (2005). The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM* **2**(3): 285-299285.

Liu, G. Q., W. J. Han, *et al.* (2010). Polysaccharides extraction from submerged-cultured mycelium of *Grifola frondosa*. 2010 International Conference on Bioinformatics and Biomedical Technology. ICBBT 2010: 111-114.

Liu, G. Q. y X. L. Wang (2009). Selection of a culture medium for reducing costs and enhancing biomass and intracellular polysaccharide production by *Agaricus blazei* AB2003. *Food Technology and Biotechnology* **47**(2): 210-214.

Liu, J., K. Shimizu, *et al.* (2007). Anti-androgenic activities of the triterpenoids fraction of *Ganoderma lucidum*. *Food Chemistry* **100**(4): 1691-1696.

Liu, X., B. Zhou, *et al.* (2010). Extraction and antioxidant activities of intracellular polysaccharide from *Pleurotus sp* mycelium. *International Journal of Biological Macromolecules* **47**(2): 116-119.

Lo, H. C., T. H. Hsu, *et al.* (2008). Submerged culture mycelium and broth of *Grifola frondosa* improve glycemic responses in diabetic rats. *American Journal of Chinese Medicine* **36**: 265-285.

Madigan, M., J. Martinko, *et al.*, Eds. (1998). Brock. *Biología de los Microorganismos*. España, Prentice Hall.

Markova, N., V. Kussovski, *et al.* (2003). Protective activity of Lentinan in experimental tuberculosis. *International Immunopharmacology* **3**(10-11): 1557-1562.

Martinez-Carrera, D., M. Sobal, *et al.* (2004). Los hongos comestibles: propiedades nutricionales, medicinales y su contribución a la alimentación mexicana. El shiitake. Puebla, Colegio de Posgraduados Campus Puebla.

Mattila, P., K. Suonpää, *et al.* (2000). Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition* **16**(7–8): 694-696.

Miles, P. G. y S. T. Chang (1999). *Biología de las setas: fundamentos básicos y acontecimientos actuales*. Hong Kong, World Scientific.

MushWorld, Ed. (2004). *Handbook 1: Oyster Mushroom Cultivation*. Mushrooms Grower's Cultivator. Seoul, Korea, MushWorld-Heineart Inc.

Nieto, I. J. (2010). *Química y biotecnología fúngica*. Bogotá, D.C., Universidad Nacional de Colombia.

Nirogi, R., K. Mudigonda, *et al.* (2007). Chromatography–mass spectrometry methods for the quantitation of statins in biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **44**(2): 379-387.

Nora, H. (2001). Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *International Journal of Antimicrobial Agents* **17**(1): 71-74.

Osman, M. E., F. R. H. Hassan, *et al.* (2009). Physiological studies on growth of two different strains of *Lentinus edodes*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* **3**(4): 4094-4103.

Papaspyridi, L.-M., P. Katapodis, *et al.* (2007). Studies on the production of statins by greek isolates of basidiomycetes. *Journal of Biotechnology* **131**(2, Supplement): S61-S62.

Papaspyridi, L.-M., P. Katapodis, *et al.* (2010). Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibres content by *Pleurotus ostreatus* ATHUM 4438 under submerged culture. *Biochemical Engineering Journal* **50**(3): 131-138.

Petre, M., A. Teodorescu, *et al.* (2010). Biotechnology of Mushroom Pellets Producing by Controlled Submerged Fermentation. *Romanian Biotechnological Letters* **15**(2 (Suppl)): 50-55.

Pimentel, M. (2008). Actividade antimicrobiana de extratos e fracos do cultivo *in vitro* de *Lentinula edodes* contra *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae*, *Guignardia citricarpa*, *Colletotrichum sublineolum* e *Tobacco mosaic virus*. *Agornomia*. Piracicaba, Universidade de Sao Paulo.

Popova, M., B. Trusheva, *et al.* (2009). Antibacterial triterpenes from the threatened wood-decay fungus *Fomitopsis rosea*. *Fitoterapia* **80**(5): 263-266.

Rendón, M. y P. De Villeros (2004). Evaluación del crecimiento y producción de exopolisacáridos del shiitake (*Lentinula edodes*) en cultivo sumergido. Departamento de Ingeniería. Medellín, Universidad EAFIT.

Rodrigues de Melo, M., L. D. Paccola-Meirelles, *et al.* (2009). Influence of *Flammulina velutipes* mycelia culture conditions on antimicrobial metabolite. *Mycoscience* **50**: 78-81.

Rodríguez, S., M. Fernández, *et al.* (2003). Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus* spp. *Revista Iberoamericana de Micología* **20**: 164-168.

Rouhana-Toubi, A., S. P. Wasser, *et al.* (2009). Ethyl acetate extracts of submerged cultured mycelium of higher basidiomycetes mushrooms inhibit human ovarian cancer cell growth. *International Journal of Medicinal Mushrooms* **11**: 29-37.

Saeki, N., H. Takeda, *et al.* (2011). Induction of manganese peroxidase and laccase by *Lentinula edodes* under liquid culture conditions and their isozyme detection by enzymatic staining on native-PAGE. *Mycoscience* **52**: 132-136.

Shih, I.-L., B.-W. Chou, *et al.* (2008). Study of mycelial growth and bioactive polysaccharide production in batch and fed-batch culture of *Grifola frondosa*. *Bioresource Technology* **99**(4): 785-793.

Shu, C.-H. y K.-J. Lin (2011). Effects of aeration rate on the production of ergosterol and blazeispirol A by *Agaricus blazei* in batch cultures. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* **42**(2): 212-216.

Smania, E. F. A., F. Delle Monache, *et al.* (2003). Antifungal activity of sterols and triterpenes isolated from *Ganoderma annulare*. *Fitoterapia* **74**(4): 375-377.

Smiderle, F. R., L. M. Olsen, *et al.* (2008). Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1→3),(1→6)-linked β -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. *European Journal of Pharmacology* **597**(1-3): 86-91.

Smith, J., N. Rowan, *et al.* (2002). Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments, University of Strathclyde.

Stamets, P. (1993). *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*.

Tada, R., Y. Adachi, *et al.* (2009). An unambiguous structural elucidation of a 1,3- β -d-glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa* by solution NMR experiments. *Carbohydrate Research* **344**(3): 400-404.

Tepwong, P. y T. Ohshima (2009). Biosynthesis of ergothioneine during different stages of submerged fermentation of "shiitake (*Lentinus edodes*) mushrooms and their bioactive properties." *Journal of Bioscience and Biotechnology* **108**: S4-S5.

Tsivileva, O. M., V. E. Nikitina, *et al.* (2008). Isolation and characterization of *Lentinus edodes* (Berk) singer extracellular lectins. *Biochemistry (Moscow)* **73**: 1154-1161.

Tsivileva, O. M., A. N. Pankratov, *et al.* (2010). Extracellular protein production and morphogenesis of *Lentinula edodes* in submerged culture. *Mycological Progress* **9**: 157-167.

Turlo, J., B. Gutkowska, *et al.* (2010). Effect of selenium enrichment on antioxidant activities and chemical composition of *Lentinula edodes* (Berk) Pegl. mycelia extracts. *Food and Chemical Toxicology* **48**: 1085-1091.

Turlo, J., B. Gutkowska, *et al.* (2008). Optimizing vitamin B12 biosynthesis by micelia cultures of *Lentinula edodes* (Berk) Pegl. . *Enzyme and Microbial Technology* **43**: 369-374.

Vokáč, K., M. Buděšínský, *et al.* (1998). New ergostane type ecdysteroids from fungi. Ecdysteroid constituents of mushroom *Paxillus atrotomentosus*. *Tetrahedron* **54**(8): 1657-1666.

Wang, X. L., G. Q. Lui, *et al.* (2010). Extraction of mycelia polysaccharides from submerged-cultured *Agaricus blazei*. 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, iCBBE 2010.

Wasser, S. P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**(3): 258-274.

Wasser, S. P. y A. L. Weis (1999). Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms* **1** 1: 31-62.

Wu, C. Y., J. L. Mau, *et al.* (2008). The influence of cultivation conditions on mycelial growth and exopolysaccharide production of culinary-medicinal mushroom *Pleurotus citrinopileatus* singer (Agaricomycetideae). *International Journal of Medicinal Mushrooms* **10**(279-292): 279.

Yasukawa, K., T. Kaminaga, *et al.* (1998). 3 β -p-Hydroxybenzoyldehydrotumulosic acid from *Poria cocos*, and its anti-inflammatory effect. *Phytochemistry* **48**(8): 1357-1360.

Zhang, B.-B. y P. C. K. Cheung (2011). A mechanistic study of the enhancing effect of Tween 80 on the mycelial growth and exopolysaccharide production by *Pleurotus tuber-regium*. *Bioresource Technology* **102**(17): 8323-8326.

Zhang, B.-B. y P. C. K. Cheung (2011). Use of Stimulatory agents to enhance the production of bioactive exopolysaccharide from *Pleurotus tuber-regium* by submerged fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**(4): 1210-1216.

Zhang, Y., S. Li, *et al.* (2011). Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities. *Food Hydrocolloids* **25**(2): 196-206.

2. Capítulo 2. Producción de Triterpenoides y Ácidos Grasos para el Hongo Comestible *Lentinula edodes* (Berk.) Singer, durante una Fermentación Sumergida

2.1 Resumen

La fermentación en estado líquido es mundialmente utilizada a escala industrial debido a que el control de sus variables y la recuperación de biometabolitos de interés son labores fáciles de hacer. El shiitake es un hongo medicinal por excelencia, ya que posee diversos metabolitos que presentan acciones farmacológicas entre ellos, los compuestos triterpenoidales; sin embargo, los estudios de la utilización de este hongo en la fermentación líquida son reducidos. Se determinó la cinética de crecimiento del hongo en un medio mínimo, así como la de la producción de compuestos triterpenoidales y ácidos grasos. Se identificaron dos nuevos compuestos triterpenoidales para la especie y se encontró que, la fuente de carbono así como la temperatura son determinantes para la producción de metabolitos secundarios en el hongo.

PALABRAS CLAVE: Shiitake, fermentación sumergida, metabolitos secundarios, ácidos grasos.

2.2 Introducción

El hongo comestible *Lentinula edodes*, llamado popularmente shiitake, hongo fragante u hongo del roble es reconocido mundialmente por sus propiedades medicinales entre las que se encuentran entre otras la antioxidante, hipocolesterolémica, hipoglicémica, antibacteriana, inmunomoduladora, anticancerígena, reguladora del sistema cardiovascular

y antiviral (se ha confirmado que inhibe la replicación del virus de la inmunodeficiencia adquirida –VIH) (Mattila, Suonpää *et al.* 2000), siendo las tres últimas las de mayor relevancia. Dichas propiedades se han atribuido a los polisacáridos y compuestos triterpenoidales (Smith, Rowan *et al.* 2002), metabolitos secundarios propios del hongo, los cuales han sido aislados del carpóforo, siendo esta la razón de su empleo durante siglos en los países orientales en el tratamiento de un sinnúmero de dolencias. Hoy en día muchos de estos compuestos están siendo empleados en la producción de medicamentos comerciales (Smith, Rowan *et al.* 2002); sin embargo, investigaciones preliminares sobre basidiomicetos y específicamente sobre shiitake han puesto de manifiesto que la proporción de estos compuestos varían tanto con el estadio del hongo como con el medio en que es cultivado (Çağlarımak 2007; Cucaita 2007).

Los terpenoides son un grupo de compuestos aislados de los macromicetos que exhiben actividades biológicas importantes. Corresponden a moléculas formadas por unidades de isopreno, unidas cabeza a cola y el número de estas permite clasificarlos como hemiterpenos (5), monoterpenos (10), sesquiterpenos (15), diterpenos (20), sesterpenos(25), triterpenos (30) y tetraterpenos (40). Dentro de las bioacciones de estos compuestos se reportan actividades antiandrogénicas, antivirales y antibacterianas, entre otras (Smith, Rowan *et al.* 2002; Liu, Shimizu *et al.* 2007; Ko, Hung *et al.* 2008; Popova, Trusheva *et al.* 2009; Lee, Ahn *et al.* 2011). De estos compuestos son los triterpenoides, y específicamente los tetracíclicos, y dentro de ellos los esteroides, los que revisten mayor relevancia ya que se constituyen en los metabolitos más abundantes en macromicetos. El ergosterol es el principal componente triterpenoidal de los hongos, está presente en la membrana fúngica y es utilizado como marcador biológico y cuantificador de la biomasa fúngica (Mille-Lindblom, von Wachenfeldt *et al.* 2004).

Dado que estos compuestos también están presentes en el micelio, el cual puede ser obtenido tanto por fermentación en estado sólido (FES) como por fermentación sumergida (SmF) (Sakai y Kajiwara 2004; Cucaita 2007), con miras al mejor aprovechamiento de las propiedades del Shiitake y dada la poca literatura científica sobre el empleo de la fermentación para la obtención del micelio se hace necesario un estudio más a fondo de su producción biotecnológica.

La fermentación en estado líquido (FEL) o fermentación sumergida (FS) es producida cuando hay por lo menos la misma concentración de agua y de sustrato sólido (nutrientes) en el proceso, es decir que se presenta una solución (Couto y Sanromán 2006). Estos nutrientes deben ser preferiblemente líquidos, solubles en agua o en su defecto que se encuentren en suspensión. Es el tipo de fermentación más utilizado en la industria debido a que es sencillo, pueden controlarse muchas más variables que en la fermentación en estado sólido (FES) y el producto final es mucho más fácil de recuperar. Los microorganismos se desarrollan flotando en el volumen del medio de cultivo, en el caso de los hongos miceliales (mohos), formando pequeñas esferas de micelio (pellets) cuando hay agitación, de otra forma, crecen en la superficie. El desarrollo del microorganismo 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. Son recientes y pocas las investigaciones de la producción de *L. edodes* en FEL, por lo que se tienen escasos datos sobre el crecimiento y producción de metabolitos secundarios triterpenoidales en esta especie. En el presente trabajo se buscó determinar la cinética de crecimiento de *L. edodes* en un medio de cultivo mínimo y la producción de compuestos triterpenoidales en el tiempo.

2.3 Materiales y Métodos

2.3.1 Cepa

La cepa utilizada es la Sh1 del cepario del Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA), de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, la cual se mantuvo en medio PDA (papa dextrosa agar, OXOID®) incubándose a 22 +/- 2°C por 5-8 días. Los inóculos empleados fueron un repique 1 (R1) de un cultivo madre. La composición del medio (caldo GPEL) empleado en la fermentación líquida fue (g/L): glucosa (20), extracto de levadura (2,5); peptona (2,5); con un pH de 4,5 ajustado con HCL 0,1 N y NaOH 0,1N.

2.3.2 Fermentación líquida de *Lentinula edodes*

Preparación del pre inoculo

Se tomaron 200 ml del caldo GPEL en matraces de 500 mL y se inocularon con discos de 4 mm de diámetro de las cajas de PDA previamente invadidas por el micelio y se llevaron a incubación a agitación orbital (100 rpm) a una temperatura de 28°C por 12-13 días.

Producción de biomasa

De los cultivos puros que no evidenciaron la presencia de otro tipo de microorganismos como bacterias y levaduras, se tomó un número determinado de pellet (se tomó el peso de ellos) formados en el caldo de inóculo y se llevaron 200 ml de caldo fresco GPEL. Las condiciones de incubación fueron las mismas que para el inóculo, con un tiempo de fermentación de 15 días.

2.3.3 Toma de muestras

Las muestras se tomaron cada 3 días, hasta el tiempo de finalización de la fermentación. Se realizaron tres réplicas por cada muestra. Las muestras fueron filtradas al vacío para separar el medio agotado del micelio, el cual posteriormente se pesó. Se midió el pH al medio agotado y se congeló a -18°C para su posterior liofilización. Los análisis para el micelio se hicieron en fresco. Las muestras se almacenaron en refrigeración en bolsas estériles hasta su posterior análisis químico.

2.3.4 Determinación de compuestos triterpenoidales en el micelio y el medio agotado

La cuantificación y determinación estructural de los compuestos triterpenoidales mayoritarios en el micelio y en el medio agotado, se efectuaron por cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (CG-EM). La metodología seguida fue modificada de la descrita por Cucaita (2007) para la determinación de compuestos triterpenoidales a partir del micelio de *Lentinula edodes*. El micelio se sometió a extracción con metanol y posterior partición con cloroformo. El medio agotado se extrajo con cloroformo. Los extractos clorofórmicos se concentraron en rotaevaporador y se caracterizaron por CG-MS. Para la cuantificación, se empleó el método de estándar

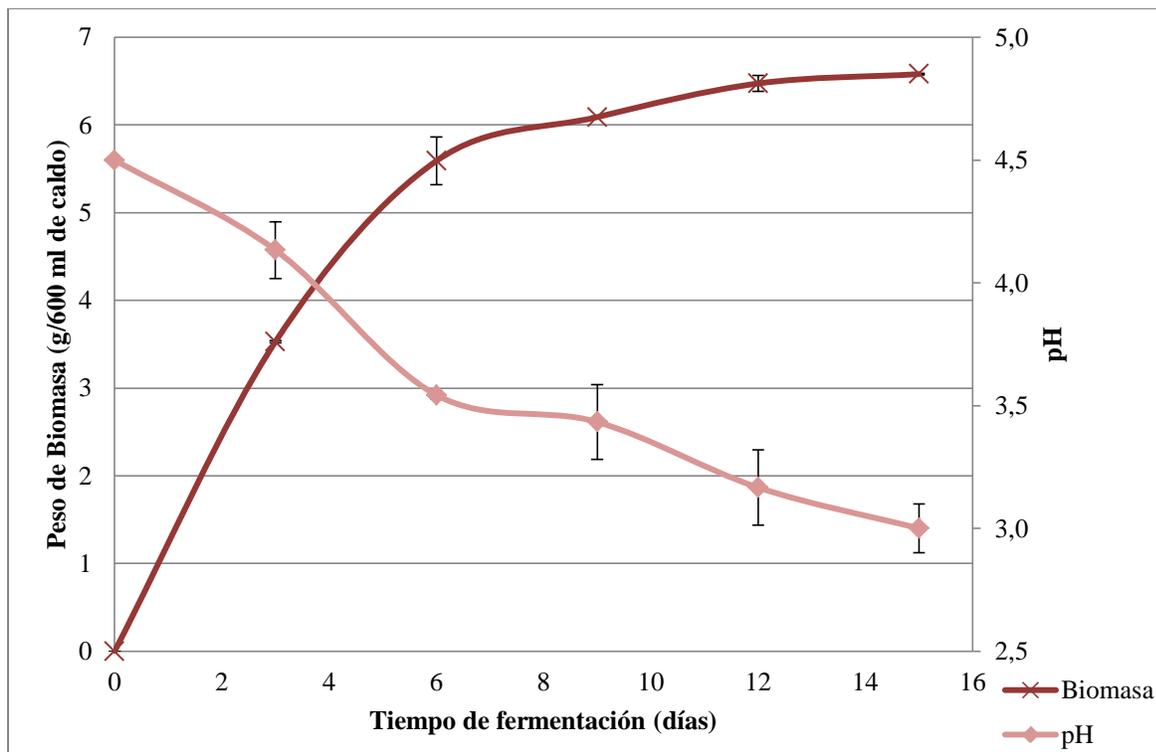
interno con estigmasterol al 95% (Sigma®). Los análisis por CG-EM se realizaron en un cromatógrafo marca Hewlett Packard 6890 con las siguientes características: columna capilar HP% 30m, 0,33mm de diámetro interno y 25µm de espesor; gas de arrastre helio 4,5 a 1mL/min; modo Split 1:10: temperatura desde 70°C hasta 300°C a 7,4°C/min. Este cromatógrafo está acoplado a un espectrómetro de masas 5973 con una fuente de ionización de 70eV.

2.4 Resultados y Discusión

2.4.1 Cinética de crecimiento para *Lentinula edodes* en FEL

El rendimiento de biomasa obtenido fue aproximadamente de 10,1g/L (90,6%), valor concordante con lo reportado en la literatura (Rendon y De Villeros 2004; Pimentel 2008; Feng, Li *et al.* 2010). La representación gráfica de la cinética de crecimiento (figura 2-1) permite ver que el comportamiento del hongo corresponde al descrito comúnmente, un crecimiento exponencial y que la fase estacionaria es incipiente. El empleo de preinóculo evitó la fase lag (de acoplamiento); resultado semejante al presentado por Rendón (2004), lo que permite confirmar que el desarrollo de preinóculo mejora la producción de biomasa incidiendo en la disminución de costos de producción, ya que los tiempos de incubación disminuirían apreciablemente. En la mayoría de las investigaciones con macrohongos se obvia este paso (Fazenda, Seviour *et al.* 2008), restándole importancia a la fase de adaptación la cual reviste importancia cuando el hongo proviene de una fase sólida, como es el agar (Sakai y Kajiwara 2004; Osman, Hassan *et al.* 2009), como bien lo determinan investigaciones sobre basidiomicetos en las que se establecen las ventajas que trae la producción de preinóculo como fase previa cuando se trabaja con fermentadores de grandes volúmenes (Kim, Hwang *et al.* 2002; Yang, Kim *et al.* 2002; Hwang, Kim *et al.* 2003; Lavi, Levinson *et al.* 2010; Turło, Gutkowska *et al.* 2010; Smiderle, Olsen *et al.* 2012).

Figura 2-1. Cinética de crecimiento de la masa micelial y cambio del pH durante la fermentación del Shiitake en FEL



En relación con el tiempo empleado en FEL para la producción de biomasa y bioactivos éste fue de 10 a 15 días, que coincide con el reportado (Rendon y De Villeros 2004; Pimentel 2008; Feng, Li *et al.* 2010). En cuanto al crecimiento micelial, el máximo de la fase exponencial se logró a los 9 días de fermentación. Así mismo, la velocidad específica de crecimiento (μ) fue de $0,9317 \text{ g día}^{-1}$, lo que indica que cada día de fermentación en fase exponencial se generó casi un gramo de biomasa. La velocidad disminuye a partir del día 12, permitiendo inferir que éste es el momento en el cual los nutrientes o el pH presente en el caldo de cultivo podrían influir negativamente en el desarrollo del hongo, siendo esto lo esperado cuando se presenta la fase estacionaria.

El empleo de un medio de cultivo simple se realizó buscando un balance entre concentración de glucosa, peptona y extracto de levadura, tomando como base las investigaciones de diferentes investigadores quienes determinaron la influencia de la concentración de glucosa en la producción de biomasa, exopolisacáridos e intrapolisacáridos, así como el efecto elicitor en la producción de biomasa del extracto de levadura (Fang y Zhong 2002; Fazenda, Seviour *et al.* 2008) (Rendon y De Villeros 2004;

Fazenda, Seviour *et al.* 2008; Smiderle, Olsen *et al.* 2012). Los resultados obtenidos permiten concluir que la selección del medio de cultivo parece ser la adecuada. Sin embargo, se requieren trabajos posteriores con modificaciones de la composición del medio para determinar a ciencia cierta esta apreciación.

En la figura 2-1 se puede ver que se presenta un descenso en el pH del medio de cultivo a lo largo del tiempo de fermentación, lo que puede deberse a la producción de diferentes ácidos orgánicos por parte del hongo y su excreción al medio. A este particular, algunos autores han identificado al ácido oxálico como el responsable de la reducción del pH en la FEL de *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* (Seo, Kim *et al.* 2010). Fang y Zhong (2002) atribuyen este comportamiento, en el caso particular de *Ganoderma lucidum*, a la producción de los ácidos ganodéricos (Fang y Zhong 2002); sin embargo, dichos metabolitos son ácidos muy débiles y por lo tanto no podrían ser responsables de un cambio de pH tan significativo. Por otro lado, si se parte del hecho de que Chegwin (2011) reportó la presencia de ácidos de cadenas cortas y medianas como los ácidos 2-metilbutanóico, 3-metilbutanóico, pentanóico, hexanóico, octanóico y el nonanóico en la FEL de especies de *Pleurotus* (Chegwin 2011) y que el resultado del análisis del medio de cultivo agotado en la presente investigación evidencia la presencia de ácidos como el hexanóico, heptanóico, octanóico y dodecanóico; los cuales presentan un grado de acidez mayor, se podría hipotetizar que son estos compuestos los que contribuyen en mayor grado a la disminución del pH.

En lo referente a la relación entre el pH y la producción de biomasa, los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por varios autores entre ellos Fang y Zhong (2002) quienes obtuvieron una buena producción de biomasa y de biometabolitos en el tiempo sin controlar el pH (Tsivileva, Pankratov *et al.* 2005; Seo, Kim *et al.* 2010; Smiderle, Olsen *et al.* 2012). Del comportamiento del micelio durante la fermentación se puede deducir que el pH no fue en ningún momento extremo ya que no afectó la fisiología del micelio, el cual se mantuvo en forma de pellet y no filamentoso, cambio que se produce a pH muy ácidos.

2.4.2 Ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos y compuestos triterpenoides

El cromatograma de gases de la fracción clorofórmica del micelio del hongo a diferentes tiempos de fermentación (figuras 2-1 y 2-2) evidencia la presencia de compuestos en las dos zonas de interés: la correspondiente a los tiempos de retención de los ácidos grasos y sus ésteres (20 – 30min.) y la respectiva a los compuestos de carácter triterpenoidal (30-40min.).

Figura 2-2. Cromatograma de gases de la fracción clorofórmica del micelio de *L. edodes* cultivado por FEL a los 3 días de fermentación

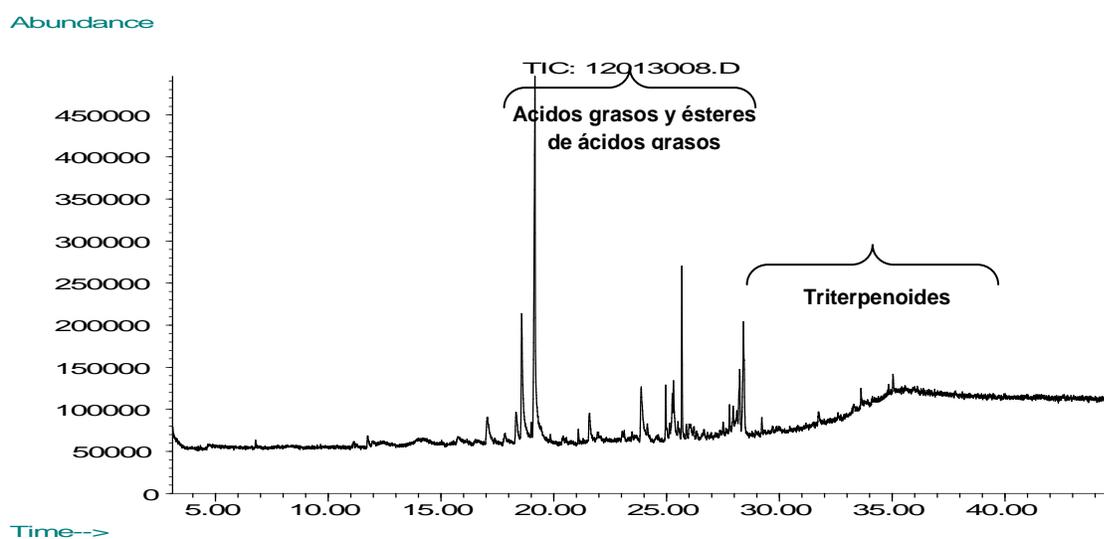
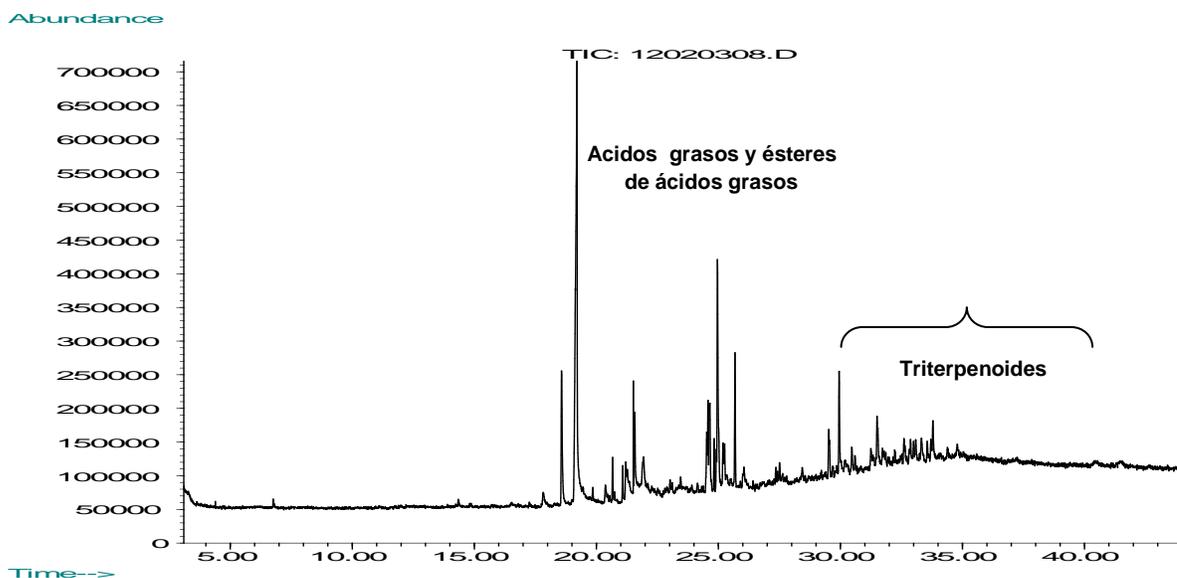


Figura 2-3. Cromatograma de gases de la fracción clorofórmica del micelio de *L. edodes* cultivado por FEL a los 15 días de fermentación



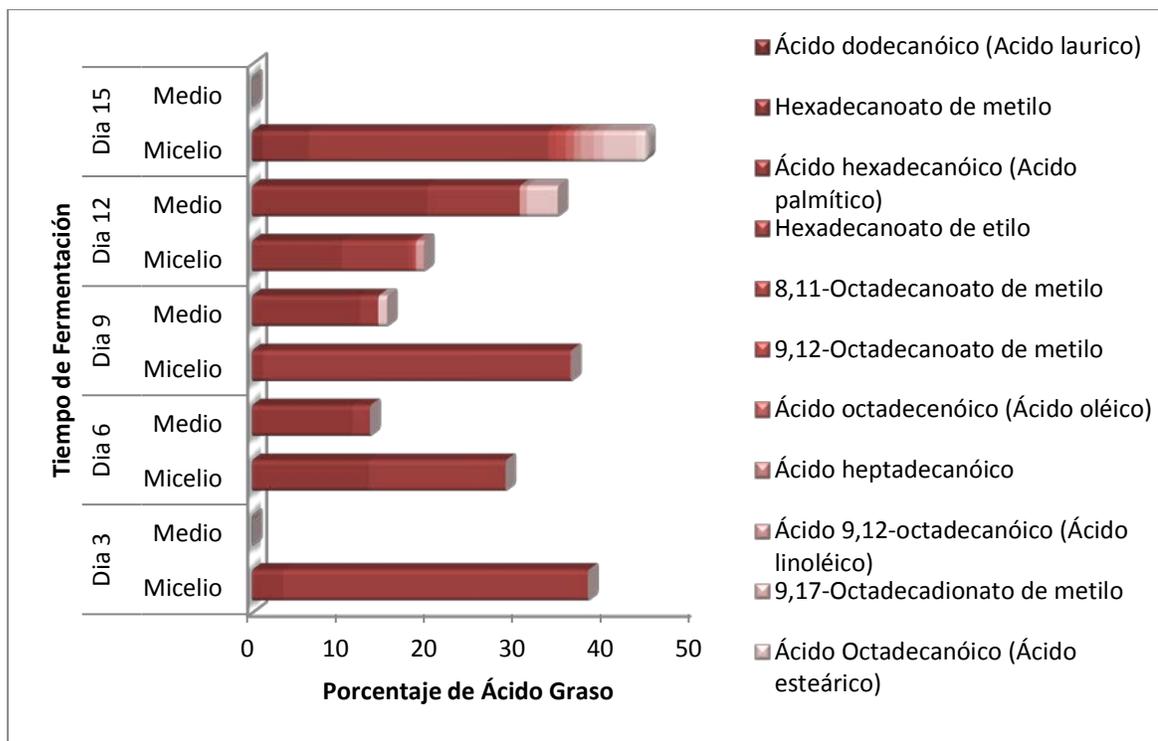
Los ácidos grasos y sus ésteres se identificaron con base en el análisis de las fragmentaciones en sus espectros de masas y la comparación con literatura. De estos compuestos los mayoritarios corresponden a los ácidos oléico, linoléico y palmítico, reportados anteriormente tanto para los cuerpos fructíferos de este género en particular como para el reino *Fungi* en general (Karliński, Ravnskov *et al.* 2007; Kavishree, Hemavathy *et al.* 2008), así como para el micelio obtenido por FEL y FES (Sakai y Kajiwara 2004; Nieto y Cucaita 2007). Cabe anotar aquí que los ácidos grasos del medio agotado y del micelio varían tanto en cantidad como en diversidad estructural a lo largo del tiempo. A partir del día 6 se detecta en el medio de cultivo el ácido palmítico, el cual hasta el día 11 es el único excretado por el hongo. A partir del día 12 aparecen, junto con el palmítico, los ácidos linoléico, oléico y esteárico. Al llegar al día 15 ninguno de los ácidos fue detectado. Este resultado puede deberse a que en la primera etapa de la fermentación el hongo biosintetiza y excreta los ácidos grasos los cuales, al presentarse el agotamiento de las fuentes de carbono, estos pueden ser tomados por el micelio para continuar su desarrollo, puesto que se conoce que los hongos pueden usar lípidos y ácidos grasos como fuente de carbono para la producción de micelio (Hattori, Ohta *et al.*

2003). La figura 2-4 muestra la composición y la variación en el contenido de ácidos grasos y de ésteres de ácidos grasos durante la fermentación.

Tabla 2-1. Acidos grasos y ésteres de ácidos grasos producidos por el micelio de *Lentinula edodes* cultivado por FEL

Compuesto	Tiempo de retención	Formula condensada	Referencia
Ácido dodecanóico (Ácido laurico)	17,836	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	(Reis, Barros <i>et al.</i> 2012)
Hexadecanoato de metilo	18,573	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	(Jaramillo 2009)
Ácido hexadecanóico (Ácido palmítico)	19,200	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	(Benavides 2004; Çağlarımak 2007; Nieto y Chegwin 2008; Jaramillo 2009; Reis, Barros <i>et al.</i> 2012)
Hexadecanoato de etilo	19,457	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	(Nieto y Chegwin 2008)
8,11-Octadecanoato de metilo	20,662	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	(Cucaita 2007)
9,12-Octadecanoato de metilo	20,668	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	(Cucaita 2007; Jaramillo 2009),
Ácido octadecenóico (Ácido oléico)	20,754	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	(Sakai y Kajiwara 2004; Çağlarımak 2007; Nieto y Chegwin 2008; Reis, Barros <i>et al.</i> 2012)
Ácido heptadecanóico	21,079	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	(Reis, Barros <i>et al.</i> 2012)
Ácido 9,12-octadecanóico (Ácido linoléico)	21,208	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	(Benavides 2004; Kitzberger, Lomonaco <i>et al.</i> 2009; Reis, Barros <i>et al.</i> 2012)
9,17-Octadecadionato de metilo	21,264	C ₁₈ H ₃₂ O	(Nieto y Chegwin 2008)
Ácido Octadecanóico (Ácido esteárico)	21,571	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	(Nieto y Chegwin 2008; Jaramillo 2009; Kitzberger, Lomonaco <i>et al.</i> 2009; Reis, Barros <i>et al.</i> 2012)
Linoleato de etilo	24,826	C ₁₉ H ₃ O ₂	(Jaramillo 2009; Abd Malek, Kanagasabapathy <i>et al.</i> 2011)

Figura 2-4. Variación en la composición de la fracción grasa no esteroideal del Shiitake durante la FEL



En cuanto al contenido graso del micelio se identificaron tanto ácidos grasos como sus ésteres (tabla 2-1). Es evidente que existe una relación directa tiempo- producción de ácidos grasos y ésteres. Se identificaron dos ácidos grasos saturados (el palmítico y el esteárico) siendo el palmítico el mayoritario en todos los tiempos de fermentación. Igualmente se identificó un ácido graso monoinsaturado (ácido oléico) y un poliinsaturado (ácido linoléico), concordando con lo reportado por Reis (2012), quien realizó el perfil lipídico de diferentes setas comestibles comerciales incluido el Shiitake. Sin embargo, la proporción de ácidos grasos reportados en la literatura (Kitzberger, Lomonaco et al. 2009, Reis, Barros et al. 2012) es diferente a la obtenida en el presente trabajo siendo los ácidos saturados los que están en mayor proporción.

Dado que para *Pleurotus pulmonarius*, se encontró que la fuente de carbono influía directamente en el tipo de ácido graso producido por el hongo obtenido por FEL y siendo la glucosa la que propicia la producción de ácidos monoinsaturados (Smiderle, Olsen et al. 2012), se podría hipotetizar que igualmente es este carbohidrato el que influencia la

producción de este tipo de ácidos grasos en el Shiitake. Así mismo, la mayor producción de ácidos monoinsaturados puede deberse a la temperatura en que se efectuó la fermentación ya que Sakai y Kajiwara (2004) en su estudio sobre *L. edodes* concluyen que la temperatura influye determinadamente en la proporción y tipo de ácidos, encontrando que a temperaturas altas (25°C o mayores) se producen mayor proporción de ácidos grasos saturados mientras que a temperaturas bajas (18°C) predominan los insaturados. Con base en que la investigación se realizó a una temperatura de incubación de 28°C, la relación obtenida de ácidos grasos saturados e insaturados confirma esta hipótesis. (Sakai y Kajiwara 2004). Los ácidos grasos identificados ya se habían aislado de algunos basidiomicetos (tabla 2-1), pero en lo concerniente a *L. edodes* obtenida por fermentación ya sea en estado líquido, sólido o cultivo tradicional, es la primera vez que se reportan. El resultado anterior indica que un medio de cultivo mínimo como el usado puede producir una gran variedad de ácidos grasos y de sus ésteres, lo que hace necesario la realización de estudios posteriores más detallados, que permitan relacionar fuentes de carbono y producción ácidos grasos con el objetivo de confirmar esta hipótesis y por ende mejorar la producción de estos compuestos de importancia medicinal en el Shiitake.

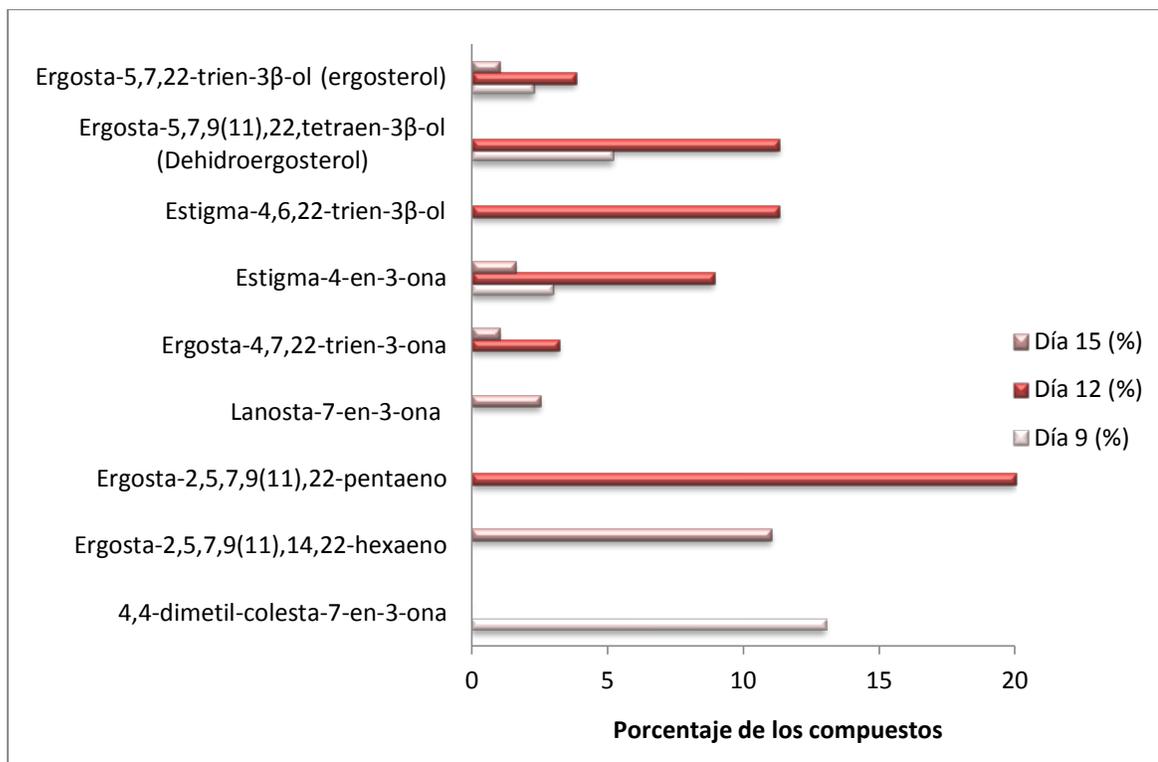
En lo referente a los compuestos triterpenoidales los cuales, al igual que los ácidos grasos y sus ésteres, se identificaron con base a los reportes bibliográficos y el análisis de sus espectros de masas, se encontraron tanto triterpenos como esteroides (tabla 2-2 y figura 2-5). La presencia de los mismos se detecta en el micelio a partir del noveno día de fermentación, cuando éste está maduro y la velocidad de crecimiento disminuye (figuras 2-1, 2-2 y 2-3), ya que la mayoría de los metabolitos secundarios se producen en mayor proporción cuando el hongo empieza a sentir stress por alimento (Waites, Morgan *et al.* 2001). La mayoría de ellos ya están reportados para basidiomicetos (tabla 2-2), con excepción de la 4,4-dimetil-colesta-7-en-3-ona y la estigma-4-en-3-ona, que hasta el presente se han reportado sólo en plantas de la familia Liliaceae (Nazif, Delazar *et al.* 2008), constituyéndose éste en el primer reporte para un basidiomiceto. En cuanto a la lanosta-7-en-3-ona, no se ha reportado ni en el reino *Plantae* ni en el *Fungi*, por lo que esta estructura aquí propuesta sería novedosa. Formando parte de los esteroides se encuentra el ergosterol, compuesto reportado como biomarcador para los hongos y utilizado algunas veces para la cuantificación de biomasa fúngica (Ruzicka, Edgerton *et al.* 2000; Mille-Lindblom, von Wachenfeldt *et al.* 2004; Lau, Lee *et al.* 2006). Al hacer la

cuantificación de los compuestos se evidencia que el porcentaje de éstos varía y no se presenta una tendencia en su producción. De los resultados se ve claramente que en el día 12 se tiene la mayor producción y variedad de los compuestos de carácter triterpenoidal, con proporciones comprendidas entre el 3 y el 20%, siendo los mayoritarios los de núcleo ergostánico. Los triterpenos sólo se biosintetizan entre el día 9 y el día 12, mientras que los esteroides sólo aparecen a partir del día 12. El ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol) tuvo un porcentaje muy bajo comparado con otros tipos de esteroides, lo que concuerda con lo expuesto por Mille-Lindblom *et al.* (2004), Zhao *et al.* (2005) y Moeskops *et al.* (2012) quienes expresan su preocupación por la relación directa entre el ergosterol y la biomasa presente en una muestra, máxime cuando éste puede estar presente aún en una muestra con biomasa fúngica muerta (Mille-Lindblom, von Wachenfeldt *et al.* 2004; Zhao, Lin *et al.* 2005; Moeskops, Buchan *et al.* 2012). Estos resultados han hecho que actualmente se esté reevaluando esta metodología para la medición de biomasa fúngica. Por otro lado, el porcentaje de ergosterol obtenido es mucho menor que el reportado para carpóforos y productos de FEL del Shiitake (Mattila, Lampi *et al.* 2002; Cucaita 2007), lo que permite hipotetizar que el medio de cultivo es muy pobre y no proporciona los suficientes nutrientes para la producción de ergosterol, en contraste con los empleados por otros autores quienes reportan mayores concentraciones en FEL que en fermentaciones en fase sólida tanto en agar como en tubulares de aserrín (Niemenmaa, Galkin *et al.* 2008; Tang, Li *et al.* 2012). Otra posible explicación es la aireación, puesto que al realizar la FEL se busca introducir una buena cantidad de oxígeno para inducir una buena producción de biomasa, lo que puede incidir negativamente en la biosíntesis del ergosterol ya que estudios han determinado que una baja aireación activa la producción de éste compuesto (Jasinghe, Perera *et al.* 2007; Shu y Lin 2011).

Tabla 2-2. Compuestos triterpenoidales producidos por *Lentínula edodes* cultivado por FEL

Compuesto	T _r (min.)	Formula condensada	Referencia
4,4-dimetil-colesta-7-en-3-ona	31,781	C ₂₉ H ₄₈ O	(Nazif, Delazar <i>et al.</i> 2008)
Ergosta-2,5,7,9(11),14,22-hexaeno	32,057	C ₂₈ H ₄₀	(Jaramillo 2009; Mora 2010)
Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno	32,167	C ₂₈ H ₃₈	(Cucaita 2007; Nieto y Chegwin 2008; Jaramillo 2009; Mora 2010)
Lanosta-7-en-3-ona	32,603	C ₃₀ H ₅₀ O	No reportado en literatura
Ergosta-4,7,22-trien-3-ona	32,829	C ₂₈ H ₄₂ O	(Zhang, Draeger <i>et al.</i> 2009)
Estigma-4-en-3-ona	33,560	C ₂₉ H ₄₈ O	(Nazif, Delazar <i>et al.</i> 2008)
Estigma-4,6,22-trien-3β-ol	33,737	C ₂₉ H ₄₂ O	(Cucaita 2007)
Ergosta-5,7,9(11),22,tetraen-3β-ol (Dehidroergosterol)	34,083	C ₂₈ H ₄₂ O	(Atherton, Duncan <i>et al.</i> 1972; Nieto y Valencia 2002; Benavides 2004; Rivera, Osorio <i>et al.</i> 2005; Cucaita 2007; Nieto y Chegwin 2008; Jaramillo 2009)
Ergosta-5,7,22-trien-3β-ol (ergosterol)	34,501	C ₂₈ H ₄₄ O	(Nieto y Valencia 2002; Cucaita 2007; Nieto y Chegwin 2008; Jaramillo 2009; Kitzberger, Lomonaco <i>et al.</i> 2009)

Figura 2-5. Cuantificación de los compuestos triterpenoidales en la FEL de Shiitake por patrón interno (estigmasterol)



2.5 Conclusiones

El porcentaje de rendimiento para la fermentación líquida de *L. edodes* estuvo acorde a lo reportado en la literatura. Durante la obtención de micelio mediante FEL éste produce ácidos grasos tanto insaturados como saturados, siendo estos últimos los más abundantes durante toda la fermentación. Igualmente, el hongo biosintetiza compuestos de carácter triterpenoidal, dentro de los cuales se encuentran triterpenos, esteroides y cetoesteroides. La producción de estos compuestos es diferencial, ya que la mayor proporción y variedad de ácidos grasos y sus ésteres se presenta en el día 15 mientras que la de compuestos triterpenoides se produce en el día 12, resultados que permiten concluir que tanto las condiciones de fermentación como el medio de cultivo influyen de manera significativa en la producción de cada tipo de metabolito. Con base en el hecho de las acciones biológicas de los compuestos triterpenoidales se hace necesario realizar nuevos estudios de cinética de crecimiento y de producción de bioactivos con diferentes fuentes de carbono y condiciones de fermentación, para determinar la incidencia real de

éstos en la síntesis de biometabolitos con la finalidad de explotar su uso industrial y/o medicinal.

2.6 Bibliografía

Abd Malek, S. N., G. Kanagasabapathy, *et al.* (2011). Lipid Components of a Malaysian Edible Mushroom, *Termitomyces heimii* Natarajan. International Journal of Food Properties. DOI:10.1080/10942912.2010.506017

Atherton, L., J. M. Duncan, *et al.* (1972). Isolation and biosynthesis of ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3[small beta]-ol from *Mucor rouxii*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications(15).

Benavides, O. L. (2004). Estudio químico de la fracción insaponificable del hongo macromiceto *Lentinula edodes* (Shiitake). Departamento de Química. Bogotá D.C, Universidad Nacional de Colombia.

Çağlarırnak, N. (2007). The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula edodes* and *Pleurotus* species) and an estimated approach to the volatile compounds. Food Chemistry **105**(3): 1188-1194.

Couto, S. R. y M. Á. Sanromán (2006). Application of solid-state fermentation to food industry—A review. Journal of Food Engineering **76**(3): 291-302.

Cucaita, E. d. P. (2007). Estudio químico comparativo de metabolitos secundarios de los hongos comestibles *Laccaria laccata* y *Lentinula edodes* y determinación de su variación respecto al estadio del hongo. Departamento de Química. Bogotá, D.C, Universidad Nacional de Colombia.

Chegwin, C. (2011). Incidencia del medio de cultivo y las condiciones de cultivo en el potencial como nutraceutico de tres especies del género *Pleurotus*. Departamento de Química. Bogota, Universidad Nacional de Colombia.

Fang, Q.-H. y J.-J. Zhong (2002). Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic acid and polysaccharide. *Biochemical Engineering Journal* **10**(1): 61-65.

Fazenda, M. L., R. Seviour, *et al.* (2008). Submerged Culture Fermentation of "Higher Fungi": The Macrofungi. *Advances in Applied Microbiology* **63**: 33-103.

Feng, Y.-L., W.-Q. Li, *et al.* (2010). Statistical optimization of media for mycelial growth and exo-polysaccharide production by *Lentinus edodes* and a kinetic model study of two growth morphologies. *Biochemical Engineering Journal* **49**(1): 104-112.

Hattori, T., A. Ohta, *et al.* (2003). The ability of ectomycorrhizal fungi to utilize fatty acids and a lipid as a carbon source for mycelial growth. *Canadian Journal of Botany* **81**(12): 1285-1292.

Hwang, H.-J., S.-W. Kim, *et al.* (2003). Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190. *Enzyme and Microbial Technology* **33**(2–3): 309-319.

Jaramillo, M. (2009). Determinación estructural y de actividad antimicrobiana de los intra y exo metabolitos secundarios triterpenoidales en *Ganoderma lucidum* obtenido en cultivo sumergido. Departamento de Química. Bogotá, D.C., Universidad Nacional de Colombia.

Jasinghe, V. J., C. O. Perera, *et al.* (2007). Kinetics of the conversion of ergosterol in edible mushrooms. *Journal of Food Engineering* **79**(3): 864-869.

Karliński, L., S. Ravnskov, *et al.* (2007). Fatty acid composition of various ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas of Norway spruce. *Soil Biology and Biochemistry* **39**(4): 854-866.

Kavishree, S., J. Hemavathy, *et al.* (2008). Fat and fatty acids of Indian edible mushrooms. *Food Chemistry* **106**(2): 597-602.

Kim, S. W., H. J. Hwang, *et al.* (2002). Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. *Letters in Applied Microbiology* **34**: 56-61.

Kitzberger, C. S. G., R. H. Lomonaco, *et al.* (2009). Supercritical fluid extraction of shiitake oil: Curve modeling and extract composition. *Journal of Food Engineering* **90**(1): 35-43.

Ko, H.-H., C.-F. Hung, *et al.* (2008). Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. *Phytochemistry* **69**(1): 234-239.

Lau, A. P. S., A. K. Y. Lee, k (2006). Ergosterol as a biomarker for the quantification of the fungal biomass in atmospheric aerosols. *Atmospheric Environment* **40**(2): 249-259.

Lavi, I., D. Levinson, *et al.* (2010). Chemical characterization, antiproliferative and antiadhesive properties of polysaccharides extracted from *Pleurotus pulmonarius* mycelium and fruiting bodies. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**: 1977-1990.

Lee, I., B. Ahn, *et al.* (2011). Selective cholinesterase inhibition by lanostane triterpenes from fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **21**(21): 6603-6607.

Liu, J., K. Shimizu, *et al.* (2007). Anti-androgenic activities of the triterpenoids fraction of *Ganoderma lucidum*. *Food Chemistry* **100**(4): 1691-1696.

Mattila, P., A.-M. Lampi, *et al.* (2002). Sterol and vitamin D2 contents in some wild and cultivated mushrooms. *Food Chemistry* **76**(3): 293-298.

Mattila, P., K. Suonpää, *et al.* (2000). Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition* **16**(7-8): 694-696.

Mille-Lindblom, C., E. von Wachenfeldt, *et al.* (2004). Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after death. *Journal of Microbiological Methods* **59**: 253-262.

Moeskops, B., D. Buchan, *et al.* (2012). Soil quality indicators for intensive vegetable production systems in Java, Indonesia. *Ecological Indicators* **18**(0): 218-226.

Mora, M. A. (2010). Determinación estructural de los metabolitos secundarios triterpenoidales en búsqueda de antimicrobianos de un hongo silvestre *Aphylllophoral* colombiano. Departamento de Química. Bogotá, D.C., Universidad Nacional de Colombia.

Nazif, E., A. Delazar, *et al.* (2008). CG-MS Analysis of the Dichloromethane Extract of the Bulbs of *Ornithogalum cuspidatum* Bert.(Family: Liliaceae) from Iran. *Records of Natural Products* **2**(3): 94-99.

Niemenmaa, O., S. Galkin, *et al.* (2008). Ergosterol contents of some wood-rotting basidiomycete fungi grown in liquid and solid culture conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation* **62**(2): 125-134.

Nieto, I. J. y E. Cucaita (2007). Acidos grasos, ésteres y esteroides del cuerpo fructífero del hongo *Laccaria laccata*. *Revista Colombiana de Química* **36**(3): 277-284.

Nieto, I. J. y C. Chegwin (2008). Triterpenoids and fatty acids identified in the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Journal of the Chilean Chemical Society* **53**(2): 1515-1517.

Nieto, I. J. y M. A. Valencia (2002). Esteroides, Ácidos Grasos e Hidrocarburos de los Cuerpos Fructíferos de *Ganoderma australe*. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* **47**: 511-516.

Osman, M. E., F. R. H. Hassan, *et al.* (2009). Physiological studies on growth of two different strains of *Lentinus edodes*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* **3**(4): 4094-4103.

Pimentel, M. (2008). Actividade antimicrobiana de extratos e fracos do cultivo *in vitro* de *Lentinula edodes* contra *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae*, *Guignardia citricarpa*,

Colletotrichum sublineolum e *Tobacco mosaic virus*. Agornomia. Piracicaba, Universidade de Sao Paulo.

Popova, M., B. Trusheva, *et al.* (2009). Antibacterial triterpenes from the threatened wood-decay fungus *Fomitopsis rosea*. *Fitoterapia* **80**(5): 263-266.

Reis, F. S., L. Barros, *et al.* (2012). Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study. *Food and Chemical Toxicology* **50**(2): 191-197.

Rendon, M. y P. De Villeros (2004). Evaluación del crecimiento y producción de exopolisacáridos del shiitake (*Lentinula edodes*) en cultivo sumergido. Departamento de Ingeniería. Medellín, Universidad EAFIT.

Rivera, A., H. J. Osorio, *et al.* (2005). Dehidroergosterol: un artefacto generado durante el proceso de extracción de esteroides en el hongo *Pleurotus sajor-caju*. *Revista Colombiana de Química* **34**(2): 117-125.

Ruzicka, S., D. Edgerton, *et al.* (2000). The utility of ergosterol as a bioindicator of fungi in temperate soils. *Soil Biology and Biochemistry* **32**(7): 989-1005.

Sakai, H. y S. Kajiwara (2004). Membrane lipid profile of an edible basidiomycete *Lentinula edodes* during growth and cell differentiation. *Lipids* **39**(1): 67-73.

Seo, M. J., M. J. Kim, *et al.* (2010). Initial acidic pH is critical for mycelial cultures and functional exopolysaccharide production of an edible mushrooms, *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* JM27. *The Journal of Microbiology* **48**(6): 881-884.

Shu, C.-H. y K.-J. Lin (2011). Effects of aeration rate on the production of ergosterol and blazeispirol A by *Agaricus blazei* in batch cultures. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* **42**(2): 212-216.

Smiderle, F. R., L. M. Olsen, *et al.* (2012). Exopolysaccharides, proteins and lipids in *Pleurotus pulmonarius* submerged culture using different carbon sources. *Carbohydrate Polymers* **87**(1): 368-376.

Smith, J., N. Rowan, *et al.* (2002). *Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments*, University of Strathclyde.

Tang, Y., H.-M. Li, *et al.* (2012). Comparison of sterol composition between Tuber fermentation mycelia and natural fruiting bodies. *Food Chemistry* **132**(3): 1207-1213.

Tsvileva, O. M., A. N. Pankratov, *et al.* (2005). Effect of media components on the mycelial film formation in submerged culture of *Lentinus edodes* (Shiitake). *Food Technology and Biotechnology* **43**(3): 227-234.

Turło, J., B. Gutkowska, *et al.* (2010). Effect of selenium enrichment on antioxidant activities and chemical composition of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. mycelial extracts. *Food and Chemical Toxicology* **48**(4): 1085-1091.

Waites, M. J., N. L. Morgan, *et al.* (2001). *Industrial Microbiology, An Introduction*. Oxford, Blackwell Publishing.

Yang, B. K., D. H. Kim, *et al.* (2002). Hypoglycemic effect of a *Lentinus edodes* exopolymer produced from a submerged mycelial culture. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **66**(5): 937-942.

Zhang, W., S. Draeger, *et al.* (2009). Ring B aromatic steroids from an endophytic fungus, *Colletotrichum* sp. *Natural Product Communications* **4**(11): 1449-1454.

Zhao, X. R., Q. Lin, *et al.* (2005). Does soil ergosterol concentration provide a reliable estimate of soil fungal biomass?. *Soil Biology and Biochemistry* **37**(2): 311-317.

3. Capítulo 3. Utilización de la Fermentación Sumergida de *Lentinula edodes* (Berk.) Singer para la Producción de Polisacáridos Bioactivos

3.1 Resumen

Los β -glucanos han sido descritos como los polisacáridos bioactivos por excelencia, tienen capacidad inmunoestimadora, anticancerígena, antimicrobiana, hipoglicémica, entre otras. Con el fin de determinar el potencial nutracéutico de un cultivo líquido de *Lentinula edodes* se determinó, por medio de técnicas colorimétricas, la concentración de polisacáridos y β -glucanos tanto intra como exo. Los resultados indican que la concentración de intra- β -glucanos aumenta durante la fermentación y la producción de exo- β -glucanos es poca, mientras que por otra parte, la concentración de éstos en la biomasa es cercana al 22%, resultado mayor a los reportados anteriormente.

PALABRAS CLAVE: β -glucanos, anticancerígenos, Shiitake, , fermentación líquida, colorimetría.

3.2 Introducción

Los hongos comestibles han sido considerados como excelentes nutracéuticos debido a sus comprobadas propiedades medicinales aunadas a su valor nutricional. El segundo hongo más consumido alrededor del mundo, el Shiitake (*Lentinula edodes*) (Jiang, Wang *et al.* 2010), es considerado la seta medicinal por excelencia debido sus múltiples acciones biológicas como la inmunoestimuladora, anticancerígena, antiviral, antibacteriana, entre otras (Wasser 2002; Carbonero, Gracher *et al.* 2008; Hearst, Nelson

et al. 2009; Bisen, Baghel *et al.* 2010; Chandra, Smith *et al.* 2011). Debido a esto, desde la década de los 70's se ha incrementado la investigación relacionada a los compuestos que le confieren a este hongo las propiedades antes descritas, dentro de los que se encuentran ácidos grasos, triterpenos y polisacáridos. Estos últimos componen un gran porcentaje de la biomasa fúngica (50 – 90%) dependiendo de la cepa y el ambiente en el que se desarrolla el hongo, constituyentes en su mayoría de la pared, aunque también pueden ser excretados al medio (Zhang, Cui *et al.* 2007). Dentro de ellos, los β -glucanos, ocupan un lugar especial debido a su comprobada capacidad inmunoestimuladora y anticancerígena (Wasser 2002; Chen y Seviour 2007; Mantovani, Bellini *et al.* 2008; Chan, Chan *et al.* 2009; Rop, Mlcek *et al.* 2009; Ramberg, Nelson *et al.* 2010). Estos compuestos son cadenas largas de monosacáridos (en su mayoría, glucosa), unidos por enlaces glicosídicos (β 1-3; β 1-4 ó β 1-6) que pueden tener ramificaciones; su estructura terciaria varía con el grado de ramificaciones y el tipo de enlace. Su contenido en los hongos varía entre 0,21 a 0,53 g/100g de materia seca y su peso molecular puede exceder los 400kDa (Nitschke, Modick *et al.* 2011; Stachowiak y Regula 2012). Son compuestos aislados tanto de los carpóforos como del micelio y del medio agotado en los que son cultivados. El β -glucano más importante de *L. edodes* es el lentinan, cuya acción inmunoestimuladora y anticancerígena ha sido ampliamente documentada y que en la actualidad, es utilizado como tratamiento complementario en pacientes de oncología y considerado por la Unión Europea como un ingrediente alimenticio seguro (European Food Safety Authority 2010; Zhang, Li *et al.* 2011).

La fermentación sumergida (FS) es una técnica biotecnológica ampliamente usada en la producción de biometabolitos microbianos y cuyo empleo para el cultivo de macrohongos se ha intensificado en los últimos años, por sus múltiples ventajas, entre las que se destaca la obtención de cantidad grande de metabolitos en tiempos cortos, además de su rentabilidad (Crueger y Crueger 1993). El objetivo del presente estudio fue evaluar la producción de polisacáridos bioactivos y por ende su potencial nutraceutico de *L. edodes* cultivado por fermentación sumergida.

3.3 Materiales y Métodos

3.3.1 Cepa

La cepa utilizada es la Sh1 del cepario del Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA), de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, la cual se mantuvo en medio PDA (papa dextrosa agar, OXOID®) incubándose a 22 +/- 2°C por 5-8 días. Los inóculos empleados fueron un repique 1 (R1) de un cultivo madre. La composición del medio (caldo GPEL) empleado en la fermentación líquida fue (g/L): glucosa (20), extracto de levadura (2,5); peptona (2,5); con un pH de 4,5 ajustado con HCL 0,1 N y NaOH 0,1N.

3.3.2 Fermentación líquida de *Lentinula edodes*

Preparación del pre inóculo

Se tomaron 200 ml del caldo GPEL en matraces de 500 mL y se inocularon con discos de 4 mm de diámetro de las cajas de PDA previamente invadidas por el micelio y se llevaron a incubación a agitación orbital (100 rpm) a una temperatura de 28°C por 12-13 días.

Producción de biomasa

De los cultivos puros que no evidenciaron la presencia de otro tipo de microorganismos como bacterias y levaduras, se tomó un número determinado de pellet (se tomó el peso de ellos) formados en el caldo de inóculo y se llevaron 200 ml de caldo fresco GPEL. Las condiciones de incubación fueron las mismas que para el inóculo, con un tiempo de fermentación de 15 días.

3.3.3 Toma de muestras

Las muestras se tomaron cada 3 días, hasta el tiempo de finalización de la fermentación. Se realizaron tres réplicas por cada muestra. Las muestras fueron filtradas al vacío para separar el micelio del medio agotado; este último fue liofilizado. Las muestras fueron guardadas en refrigeración para la posterior determinación de polisacáridos.

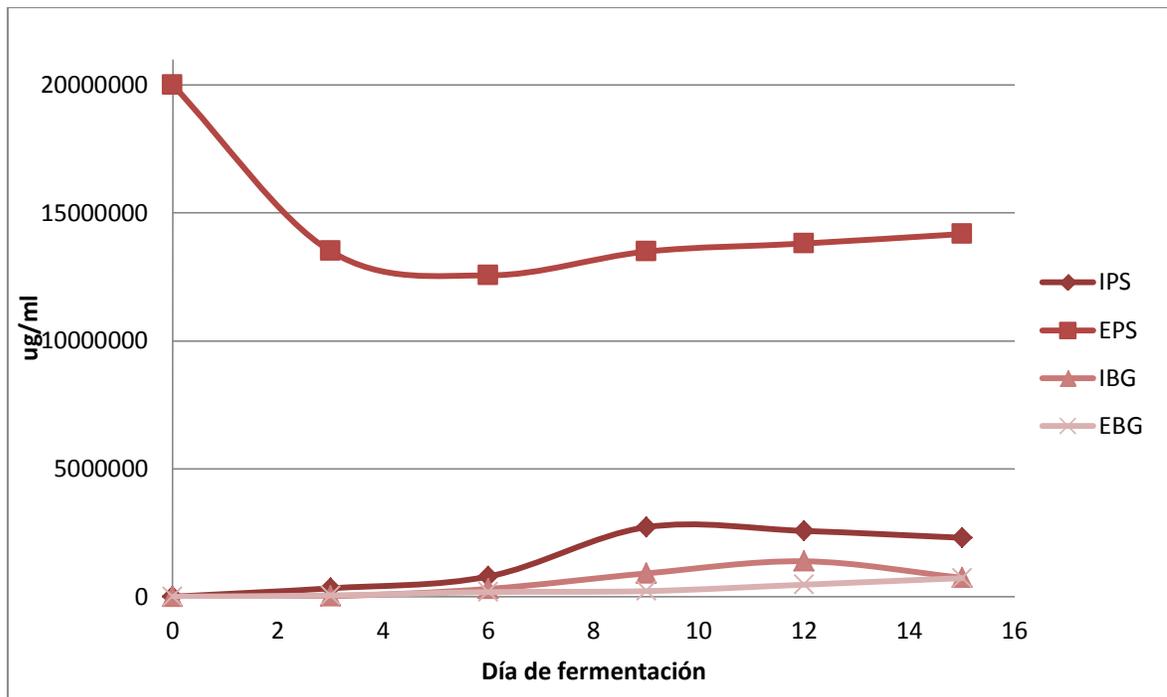
3.3.4 Determinación de intra, exo y β -glucanos bioactivos

El micelio obtenido se extrajo por tres veces con agua caliente (95°C) y se realizó la precipitación de los polisacáridos con etanol. El precipitado obtenido fue filtrado con membrana de 0,22 μ m y posteriormente secado en estufa a una temperatura de 50°C hasta peso constante. Para la determinación de intrapolisacáridos, se hidrató con agua destilada el precipitado seco y se llevó a un volumen de 5ml; para los exopolisacáridos, el medio agotado liofilizado fue hidratado a 30 ml y se tomó una alícuota de 10 μ l que se llevó a un volumen final de 5 ml. La determinación de polisacáridos totales se llevó a cabo por el método de Dubois (1956) con una curva de calibración entre 10 y 280 μ g/ml. La determinación de β -glucanos se realizó por la modificación del método de rojo congo de Nitschke (2011) duplicando el volumen de celda y modificando el pH del buffer para la preparación del colorante a 5,6. Como patrón de β -glucanos (1-3), (1-6), se usó un producto comercial (Now Foods), con una curva de calibración que se hizo entre 50 y 250 μ g/ml (Dubois, Gilles *et al.* 1956; Nitschke, Modick *et al.* 2011), las muestras se disolvieron en NaOH 0,01M; el equipo empleado para la determinación fue un espectrofotómetro marca Varian modelo Cory 50 Con. Para los polisacáridos se empleó una longitud de onda de 492nm y para la de los β -glucanos una de 523nm.

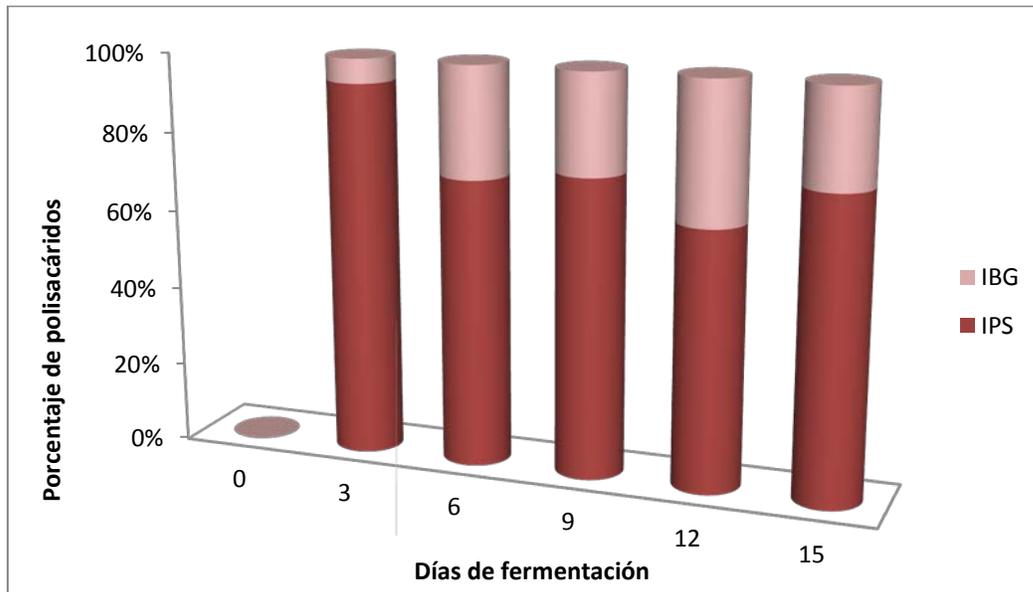
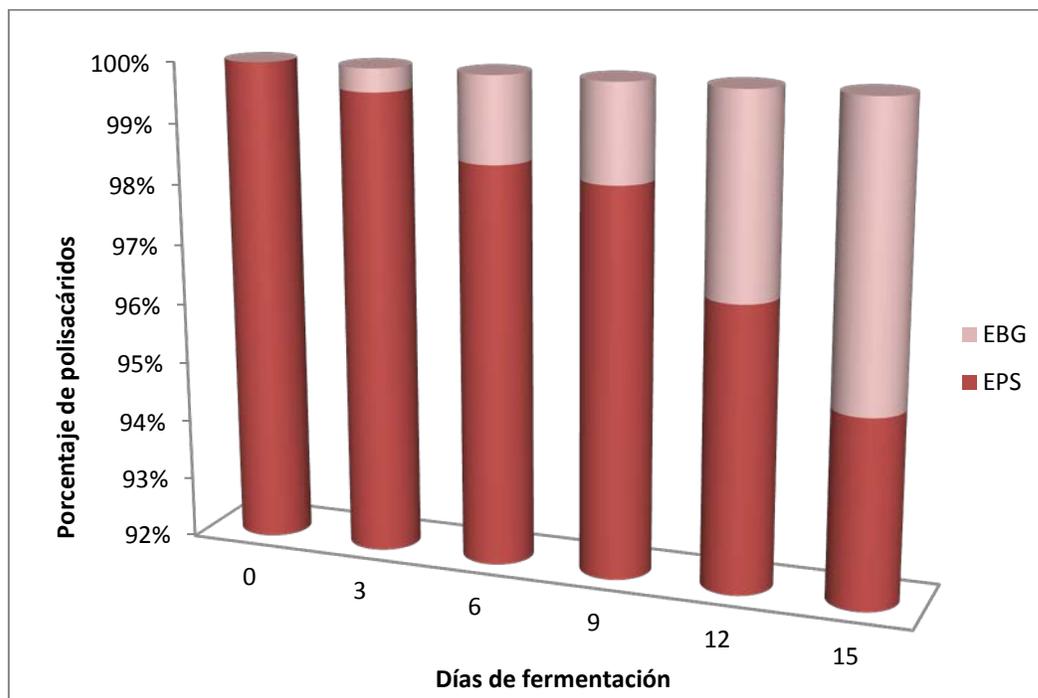
3.4 Resultados

La producción de polisacáridos y β -glucanos a lo largo de la fermentación de *L. edodes* se muestra en la figura 3-1. El decrecimiento observado en el contenido de exopolisacáridos (polisacáridos totales determinados por Dubois) en los primeros días de fermentación es atribuible al consumo de la glucosa del medio (única fuente de carbono) por parte del hongo para iniciar su crecimiento micelial. A partir del día 6, cuando éste empieza a alcanzar la fase estacionaria se evidencia un aumento de los exopolisacáridos debido a la presencia de polisacáridos de cadena larga excretados por el hongo. Por otro lado, los intrapolisacáridos tuvieron una tendencia ascendente dada por el crecimiento del hongo, con disminución de la concentración a partir de 9 días de fermentación, lo que confirma que el hongo se encuentra en fase estacionaria y empieza a secretar metabolitos al medio.

Figura 3-1. Consumo y producción de polisacáridos y β -glucanos durante la fermentación de *L. edodes*



Las figuras 3-2 y 3-3 muestran la proporción de intra y exopolisacáridos a lo largo de la fermentación. Los polisacáridos relacionados a la pared celular de los hongos son la quitina, la hemicelulosa, mananos y β -glucanos (Manzi y Pizzoferrato 2000; Smiderle, Olsen *et al.* 2012). Aunque la prueba de rojo congo no es absolutamente específica para los glucanos, ya que en algunas ocasiones reacciona con polisacáridos de cadena larga, la implementación del método (Nitschke, Modick *et al.* 2011) y su modificación aseguran una unión más selectiva con los β -glucanos presentes en las muestras. La concentración de polisacáridos totales, tanto los relacionados al micelio como los presentes en el medio de cultivo, es mucho mayor que la de β -glucanos ya que el método de Dubois además de cuantificar los polisacáridos producidos por el hongo también está cuantificando la glucosa presente en el medio, proporcionando valores elevados (figuras 3-1 y 3-3).

Figura 3-2. Producción de polisacáridos y β -glucanos por el micelio de *L. edodes***Figura 3-3.** Producción de exopolisacáridos y β -glucanos durante la fermentación líquida de *L. edodes*

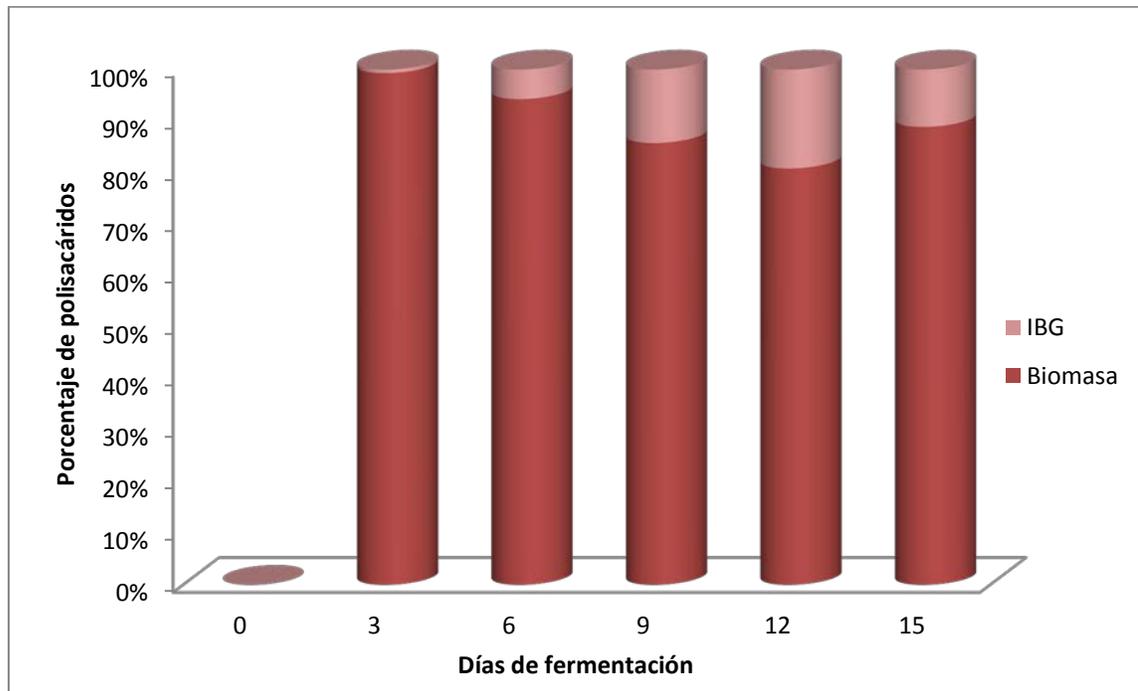
3.5 Discusión

La formulación del medio se realizó con base en que una proporción elevada de la fuente de carbono (casi hasta 30%) en el medio es beneficiosa para la producción de biomasa y polisacáridos (Rendon y De Villeros 2004; Fazenda, Seviour *et al.* 2008), además conociendo que una de las mejores fuentes de carbono para el crecimiento de hongos en una fermentación líquida y en especial del Shiitake, es la glucosa (Osman, Hassan *et al.* 2009) así como el hecho de que las fuentes de nitrógeno orgánicas son las mejores para este tipo de hongos (Fazenda, Seviour *et al.* 2008; Huang y Liu 2008; Elisashvili, Kachlishvili *et al.* 2009). La relación de carbono-nitrógeno empleada fue 4:1; esta permite una gran producción de biomasa y de polisacáridos, según lo reportado anteriormente (Rendon y De Villeros 2004; Feng, Li *et al.* 2010). Cabe aquí anotar que algunos autores hablan de que un bajo pH tiene un efecto elicitor sobre la producción de biomasa, mientras que un pH más básico, tiene un mejor efecto en la producción de polisacáridos activos, y también que la temperatura tiene un papel preponderante en la fermentación, ya que a temperaturas de 25°C o menores se favorece la producción de biomasa, mientras que superiores tienen un efecto en la producción de exopolisacáridos debido a su mayor solubilidad en la solución (Babitskaya, Shcherba *et al.* 2005; Fazenda, Seviour *et al.* 2008). Para el presente estudio se utilizó un pH ácido y una temperatura de 28°C ya que se buscaba obtener alta producción de biomasa y una alta proporción de exopolisacáridos. Todos estos factores son definitivos cuando se requiere una gran producción de biomasa para obtener una alta proporción de polisacáridos activos ya que estos hacen parte de las paredes celulares del hongo (Manzi y Pizzoferrato 2000; Smiderle, Olsen *et al.* 2012).

En la mayoría de estudios llaman exopolisacáridos a aquellos que están anclados a la pared y por lo tanto no son considerados parte de la célula fúngica, estos son obtenidos al filtrar y lavar el micelio y no es tenido en cuenta el medio de cultivo agotado (Kim, Hwang *et al.* 2002; Babitskaya, Bisko *et al.* 2004; Lee, Park *et al.* 2007; Chen, Zhao *et al.* 2008; Scherba y Babitskaya 2008; Feng, Li *et al.* 2010; Xiao, Xiao *et al.* 2010; Diamantopoulou, Papanikolaou *et al.* 2012). Sin embargo, en los últimos años se ha establecido que los hongos pueden excretar metabolitos al medio de cultivo (como por ejemplo lacasas, polisacáridos, ácidos grasos y otros) y es por esto que la denominación “exopolisacáridos” involucra además a esta clase de metabolitos (Hatakka 1994; Kim,

Yang *et al.* 2001). Los resultados obtenidos arrojan, como era de esperarse, que la proporción de β -glucanos dentro de los intrapolisacáridos del hongo es importante (más del 40% para el día 12 de fermentación), ya que son constituyentes de su pared, con un ascenso progresivo de la concentración de éstos durante la fermentación, y posterior declive al iniciarse la fase estacionaria (figura 3-2). Estos resultados son concordantes con lo reportado para basidiomicetos de otros géneros en donde la mayor producción de endopolisacáridos se da cuando se ha alcanzado la mayor producción de biomasa. Así mismo, dicho contenido se alcanza, después del día 12 al igual que en nuestro caso, (Lee, Park *et al.* 2007; Diamantopoulou, Papanikolaou *et al.* 2012). Por otra parte, al comparar el resultado de intra β -glucanos con estudios anteriores sobre *L. edodes* y otros basidiomicetos y sabiendo que la fracción de estos polisacáridos extraídos pertenece a la soluble en agua, se puede establecer que el porcentaje está en el rango reportado (Manzi y Pizzoferrato 2000; Nitschke, Modick *et al.* 2011); aun cuando se ha reportado que estos se producen más en el micelio que en el carpóforo (Lee, Park *et al.* 2007; Nitschke, Modick *et al.* 2011). Sin embargo, si los resultados son comparados con el peso de biomasa obtenida, se evidencia que el porcentaje es un poco más del 20% de la biomasa para el día 12 (figura 3-4), por lo que ese lapso de tiempo podría ser elegido como el de mayor producción de β -glucanos si se piensa en obtención a gran escala de estos compuestos.

Figura 3-4. Proporción de β -glucanos en el micelio de *L. edodes*, obtenido por fermentación líquida



En cuanto a los polisacáridos encontrados en el medio de cultivo agotado, se observa una tendencia a disminuir durante los primeros 6 días de fermentación, evidenciando la fuerte actividad metabólica que el hongo presentó al crecer la cual produjo un gran consumo de la glucosa presente en el medio de cultivo. Con relación a los β -glucanos excretados por el hongo al medio de cultivo, se evidencia una tendencia creciente que se acentúa más al alcanzar la máxima producción de biomasa (12 días), tiempo de fermentación para la producción de exopolisacáridos igual al reportado para varios basidiomicetos incluyendo *L. edodes* (Kim, Hwang *et al.* 2002; Lee, Park *et al.* 2007; Diamantopoulou, Papanikolaou *et al.* 2012). Es sabido que en la fase estacionaria muchos de los metabolitos secundarios de los hongos son excretados al medio y que además de disminuir la rata de crecimiento del hongo también hay una incipiente muerte de micelio, por lo que los polisacáridos se desprenden del hongo y se disuelven en el medio de cultivo, lo que se evidencia por el aumento de la viscosidad de los medios de cultivo (Fazenda, Seviour *et al.* 2008; Scherba y Babitskaya 2008) o por el aumento en la concentración de éstos en el caldo de cultivo, como ocurrió en esta investigación. Otro

punto a destacar es que la elección de un medio de cultivo simple, sin ningún tipo de enriquecimiento o sales minerales permitió obtener una mejor producción de biometabolitos que en estudios donde se ha suplementado este mismo medio con sales inorgánicas (Diamantopoulou, Papanikolaou *et al.* 2012), lo que indica que para la producción de polisacáridos no es indispensable realizar suplementación. Estos resultados permitirán estudios posteriores en búsqueda de medios de cultivo más económicos, mediante el aprovechamiento de desechos de industrias que contengan proporciones de carbono y nitrógeno y contenido de glucosa similares al medio de cultivo aquí empleado, con el objetivo de optimizar un proceso eficiente y económico para la producción de polisacáridos bioactivos, ya que últimamente la industria farmacéutica y alimenticia se ha enfocado en este tipo de compuestos que ofrecen propiedades tanto farmacológicas, como reológicas (Wasser 2002; Zhang, Cui *et al.* 2007; Zhang, Xu *et al.* 2007; Zhang, Xu *et al.* 2008; Stachowiak y Regula 2012).

3.6 Conclusiones

Los resultados obtenidos en la producción de exopolisacáridos e intrapolisacáridos, así como de β -glucanos a lo largo de la fermentación de *L. edodes* concuerdan con lo reportado hasta el presente en lo referente a la concentración de polisacáridos bioactivos en la biomasa obtenida. Sin embargo, la proporción de β -glucanos alcanzada mediante la metodología aplicada es diferente, se obtuvo un porcentaje de intra- β -glucanos cercano al 20% para el día 12, mucho mayor a lo reportado (Nitschke, Modick *et al.* 2011) y cerca de un 6% para los exo- β -glucanos, porcentaje acorde a lo recientemente reportado (Diamantopoulou, Papanikolaou *et al.* 2012). Este resultado que permitió comprobar que el micelio del Shiitake en fermentación líquida tiene una menor proporción en el contenido de β -glucanos que los carpóforos obtenidos por cultivo tradicional lo que confirma con lo encontrado en diferentes géneros de basidiomicetos, incluyendo *L. edodes* (Lee, Park *et al.* 2007; Nitschke, Modick *et al.* 2011).

3.7 Bibliografía

Babitskaya, V. G., N. A. Bisko, *et al.* (2004). Some Physiological Aspects of the Submerged Cultivation of Culinary–Medicinal Shiitake Mushroom *Lentinus edodes* (Berk.) Singer (Agaricomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms* **6**: 369-374.

Babitskaya, V. G., V. V. Shcherba, *et al.* (2005). Polysaccharides of *Ganoderma lucidum*: Factors Affecting Their Production. *Applied Biochemistry and Microbiology* **41**(2): 169-173.

Bisen, P., R. K. Baghel, *et al.* (2010). *Lentinus edodes*: a macrofungus with pharmaceutical activities. *Current Medicinal Chemistry* **17**: 2419-2430.

Carbonero, E. R., A. H. P. Gracher, *et al.* (2008). *Lentinus edodes* heterogalactan: Antinociceptive and anti-inflammatory effects. *Food Chemistry* **111**(3): 531-537.

Crueger, W. y A. Crueger (1993). *Biología. Manual de Microbiología Industrial.*, Ed. Acribia.

Chan, G. C., W. K. Chan, *et al.* (2009). The effects of B-glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology & Oncology* **2**: 25-35.

Chandra, L. C., B. J. Smith, *et al.* (2011). Differential effects of shiitake- and white button mushroom-supplemented diets on hepatic steatosis in C57BL/6 mice. *Food and Chemical Toxicology* **49**(12): 3074-3080.

Chen, J. y R. Seviour (2007). Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-glucans. *Mycological Research* **111**(6): 635-652.

Chen, W., Z. Zhao, *et al.* (2008). Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect in vitro. *Bioresource Technology* **99**(8): 3187-3194.

Diamantopoulou, P., S. Papanikolaou, *et al.* (2012). Mushroom Polysaccharides and Lipids Synthesized in Liquid Agitated and Static Cultures. Part I: Screening Various Mushroom Species. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.

Dubois, M., K. A. Gilles, *et al.* (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **28**: 350-356.

Elisashvili, V. I., E. T. Kachlishvili, *et al.* (2009). Carbon and Nitrogen Source Effects on Basidiomycetes Exopolysaccharide Production. *Applied Biochemistry and Microbiology* **45**(5): 531-535.

European Food Safety Authority, E. (2010). Scientific opinion on the safety of "*Lentinus edodes* extract" (Lentinex(R)) as a novel food ingredient. *EFSA Journal* **8**(7): 1685-1700.

Fazenda, M. L., R. Seviour, *et al.* (2008). Submerged Culture Fermentation of "Higher Fungi": The Macrofungi. *Advances in Applied Microbiology* **63**: 33-103.

Feng, Y.-L., W.-Q. Li, *et al.* (2010). Statistical optimization of media for mycelial growth and exo-polysaccharide production by *Lentinus edodes* and a kinetic model study of two growth morphologies. *Biochemical Engineering Journal* **49**(1): 104-112.

Hatakka, A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews* **13**(2-3): 125-135.

Hearst, R., D. Nelson, *et al.* (2009). An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice* **15**(1): 5-7.

Huang, H.-C. y Y.-C. Liu (2008). Enhancement of polysaccharide production by optimization of culture conditions in shake flask submerged cultivation of *Grifola umbellata*. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers* **39**(4): 307-311.

Jiang, T., Q. Wang, *et al.* (2010). Structure and composition changes in the cell wall in relation to texture of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) stored in modified atmosphere packaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90**: 742-749.

Kim, D. H., B. K. Yang, *et al.* (2001). Production of a hypoglycemic, extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom, *Phellinus linteus*. *Biotechnology Letters* **23**(7): 513-517.

Kim, S. W., H. J. Hwang, *et al.* (2002). Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. *Letters in Applied Microbiology* **34**: 56-61.

Lee, W. Y., Y. Park, *et al.* (2007). Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*. *Enzyme and Microbial Technology* **40**(2): 249-254.

Mantovani, M. S., M. F. Bellini, *et al.* (2008). β -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **658**(3): 154-161.

Manzi, P. y L. Pizzoferrato (2000). Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry* **68**(3): 315-318.

Nitschke, J., H. Modick, *et al.* (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.

Osman, M. E., F. R. H. Hassan, *et al.* (2009). Physiological studies on growth of two different strains of *Lentinus edodes*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* **3**(4): 4094-4103.

Ramberg, J. E., E. D. Nelson, *et al.* (2010). Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature. *Nutrition Journal* **9**(54): 1-22.

Rendon, M. y P. De Villeros (2004). Evaluación del crecimiento y producción de exopolisacáridos del shiitake (*Lentinula edodes*) en cultivo sumergido. Departamento de Ingeniería. Medellín, Universidad EAFIT.

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

Scherba, V. V. y V. G. Babitskaya (2008). Polysaccharides of xylotrophic Basidiomycetes. *Applied Biochemistry and Microbiology* **44**(1): 78-83.

Smiderle, F. R., L. M. Olsen, *et al.* (2012). Exopolysaccharides, proteins and lipids in *Pleurotus pulmonarius* submerged culture using different carbon sources. *Carbohydrate Polymers* **87**(1): 368-376.

Stachowiak, B. y J. Regula (2012). Health-promoting potential of edible macromycetes under special consideration of polysaccharides: a review. *European Food Research and Technology* **234**(3): 369-380.

Wasser, S. P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**(3): 258-274.

Xiao, J.-H., D.-M. Xiao, *et al.* (2010). Nutritional requirements for the hyperproduction of bioactive exopolysaccharides by submerged fermentation of the edible medicinal fungus *Cordyceps taii*. *Biochemical Engineering Journal* **49**(2): 241-249.

Zhang, M., S. W. Cui, *et al.* (2007). Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology* **18**(1): 4-19.

Zhang, Y., S. Li, *et al.* (2011). Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities. *Food Hydrocolloids* **25**(2): 196-206.

Zhang, Y., X. Xu, *et al.* (2007). Dynamic viscoelastic behavior of triple helical Lentinan in water: Effects of concentration and molecular weight. *Polymer* **48**: 6681-6690.

Zhang, Y., X. Xu, *et al.* (2008). Dynamic viscoelastic behavior of triple helical Lentinan in water: Effect of temperature. *Carbohydrate Polymers* **73**: 26-34.

4. Capítulo 4. Efecto de la Adición de un Producto Biotecnológico de Shiitake sobre una Gelatina de Fruta

4.1 Resumen

El empleo que se le ha dado al *Lentinula edodes* (Shiitake) como componente medicinal y alimenticio en la cultura asiática ha sido el punto de partida para implementar la utilización de este hongo en la producción de alimentos funcionales. Con la finalidad de aprovechar los metabolitos con acción biológica que este produce, se realizó la incorporación del micelio del hongo a una formulación de gelatina con fruta, a la cual se determinó el contenido y presencia de algunos compuestos bioactivos, su comportamiento reológico y la aceptación por parte del consumidor. Se obtuvo una gelatina con una concentración aproximada de 80mg de β -glucanos en las muestras analizadas, además de la presencia de ácidos grasos insaturados y esteroides que le confieren propiedades inmunoestimuladoras, anticancerígenas, hipocolesterolémicas y antidiabéticas. Las propiedades reológicas de la gelatina no presentaron diferencias frente a la muestra control (a excepción de la dureza y la gomosidad). En cuanto a la aceptación por parte de los consumidores fue buena ya que, salvo por un bajo valor de dulzura, no encontraron diferencia con la gelatina sin adición de Shiitake.

PALABRAS CLAVE: Alimento funcional, β -glucanos, gelificantes, reología, sitoesterol.

4.2 Introducción

El Shiitake es el segundo hongo comestible con mayor consumo a nivel mundial (Kitzberger, Lomonaco et al. 2009); además de su exquisito sabor y agradable textura,

posee propiedades medicinales comprobadas (Mattila, Suonpää et al. 2000; Çağlarırnak 2007; Cassileth 2011), razón por la cual ha sido ampliamente utilizado por la medicina tradicional oriental y ha sido objeto de estudio desde el último tercio del siglo pasado. Los compuestos a los que se les atribuye la mayoría de esas propiedades, entre las cuales las más importantes son la anticancerígena, inmunoestimuladora y antimicrobiana, son los β -glucanos, ácidos grasos insaturados y triterpenoides (Smith, Rowan et al. 2002). Es debido a esto que, además de buscar su aplicación farmacológica en el tratamiento de diversos tipos de enfermedades mediante el aislamiento de este tipo de compuestos se busca su inclusión en alimentos que proporcionen un efecto en la prevención de enfermedades. Es en Asia donde se ha desarrollado más este campo ya que su historia y conocimiento sobre el hongo lo han permitido. Sin embargo, en occidente también se han llevado a cabo varios estudios que han traído como resultado el desarrollo de alimentos funcionales que van desde bebidas fermentadas, hasta productos de panadería y bocadillos (snacks); en los que en su mayoría se han empleado carpóforos, estípites o micelio producidos mediante cultivo tradicional y fermentación en estado sólido y muy poco empleando la fermentación en estado líquido para la obtención del hongo a emplear en la elaboración del alimento funcional (Son, Kim et al. 2003; Chun, Chambers et al. 2005; Lin, Tseng et al. 2008; Guan, Xue et al. 2009; Regula y Gramza-Michalowska 2009; Lin, Huang et al. 2010; Songdach, Riebroy et al. 2011). El objetivo de este estudio es el de evaluar el efecto de la adición a una gelatina con fruta del producto biotecnológico de la obtención de Shiitake, por fermentación líquida, así como la determinación de los compuestos con actividad biológica, su prevalencia en el tiempo y el efecto de los mismos en la percepción por parte de consumidores jóvenes.

4.3 Materiales y Métodos

4.3.1 Cepa

La cepa utilizada es la Sh1 (*Lentinula edodes*) del cepario del Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA), de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, la cual se mantuvo en medio PDA (papa dextrosa agar, OXOID®) incubándose a 22 +/- 2°C por 5-8 días. La composición del medio (caldo GPEL) empleado en la fermentación líquida fue (g/L): glucosa (20),

extracto de levadura (2,5); peptona (2,5); con un pH de 4,5 ajustado con HCL 0,1 N y NaOH 0,1N.

4.3.2 Fermentación líquida de Shiitake

Se desarrolló un preinóculo en el que matraces de 500ml con 200 ml de caldo GPEL se inocularon con varios discos de agar PDA cubiertos por el micelio; los matraces fueron incubados en agitación (100 rpm) por 12 días a 28°C; los pellets desarrollados durante esta fase de preinóculo se llevaron nuevamente a matraces con caldo GPEL y se llevaron a incubación bajo las condiciones anteriormente descritas por otros 15 días. El producto biotecnológico fue congelado, liofilizado, pesado y almacenado en bolsas estériles para su utilización.

4.3.3 Formulación de la gelatina

Se utilizó fresa fresca, colágeno comercial y sacarosa para la formulación de la gelatina. Se preparó una gelatina control sin producto biotecnológico y la gelatina evaluada. A la fruta se le realizó un proceso de desinfección por inmersión en hipoclorito de sodio (100 ppm) durante 10 min y enjuague, posteriormente se sumergió en solución de ácido cítrico (0,5 %) como antioxidante durante 20 min. Se formuló el producto para obtener una gelatina con un contenido de 150 – 200 mg de producto biotecnológico por cada 100 g, lo que otorga posibles propiedades funcionales inmunoestimuladoras, anticancerígenas, hipocolesterolémicas, entre otras, según lo recomendado generalmente en la micoterapia (Donatini 2010). Las proporciones del producto fueron de 25% de fruta, 3,0% de colágeno, 10% de azúcar y 62% de agua. Al volumen final de la gelatina se le agregó la cantidad requerida del producto biotecnológico. Las muestras se sirvieron en vasos cilíndricos (20ml y 100ml), se taparon y se refrigeraron a 4°C para su posterior análisis químico, textural y sensorial.

4.3.4 Evaluación de los compuestos bioactivos

La extracción de los polisacáridos se hizo por tratamiento con agua caliente (95°) y posterior precipitación con etanol. La extracción de los compuestos triterpenoidales y ácidos grasos se realizó por maceración con diclorometano (HoneyWell ®) hasta que la prueba de Lieberman-Buchard fuera negativa. La determinación cuantitativa de los

polisacáridos bioactivos se hizo por el método colorimétrico de Nitschke (2011), el cual se modificó usando el doble de volumen de reactivos y muestra para obtener un volumen de 2,8 ml para la celda y un estándar de β -glucanos comercial (Now Foods), realizando las lecturas en un espectrofotómetro marca VARIAN – Cory 50 Conc, a una longitud de onda de 523nm. La determinación estructural de los compuestos triterpenoidales y ácidos grasos se hizo por CG-EM, en un cromatógrafo marca Hewlett Packard 6890 con las siguientes características: columna capilar HP5 30m, 0,33mm de diámetro interno y 25 μ m de espesor; gas de arrastre helio 4,5 a 1mL/min; modo Split 1:10: temperatura desde 70°C hasta 300°C a 7,4°C/min. Este cromatógrafo está acoplado a un espectrómetro de masas 5973 con una fuente de ionización de 70eV. Las muestras se analizaron el mismo día de la producción de la gelatina y 20 días después.

4.3.5 Evaluación de la textura

Se realizó un análisis instrumental de textura empleando el texturómetro TA.XT Plus (Stable Microsystems), El perfil de textura (TPA) se obtuvo tomando cilindros de la gelatina de 3 cm de diámetro y 3 cm de altura, los cuales se sometieron a una compresión uniaxial en dos ciclos con 5s de intervalo usando la sonda cilíndrica de 75 mm de diámetro P/75, a una velocidad de 5 mm/s hasta un 30% de deformación de la muestra. La resistencia a la ruptura y la adhesividad se determinaron por una prueba de penetración sometiendo a cilindros de gelatina de 3cm de diámetro por 3 cm de altura a una compresión simple, utilizando la sonda cilíndrica P/10 de 10 mm de diámetro a una velocidad de 1mm/s hasta una penetración de 1,5 cm en la muestra.

4.3.6 Evaluación sensorial

El panel de consumidores fue reclutado en la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, con una muestra de 31 personas entre los 19 y 25 años (una proporción aproximada de 50/50 para hombres y mujeres). Las muestras fueron codificadas con números al azar de 3 dígitos y presentadas aleatoriamente a los panelistas. Se evaluaron los atributos de apariencia, textura (descrita como sensación al comer la gelatina), aroma y sabor, en ese orden. Se usó una escala hedónica de 5 puntos en la que 1 significa “me disgusta mucho” y 5 “me gusta mucho”.

4.3.7 Análisis estadístico

Para el contenido de polisacáridos y el perfil de textura se determinó la normalidad de los datos con una prueba de Shapiro Wilks (W cercano a 1), posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y análisis de comparación múltiple con la prueba de Tuckey ($\alpha=0,05$) para determinar variaciones significativas entre los tratamientos. Los datos del análisis sensorial se analizaron por medio de la prueba no paramétrica de Wilcoxon en el que se evaluó si hubo diferencias significativas entre las medias de cada muestra, en cada atributo con un $P \leq 0,05$, con el programa SPSS 10.5® para Windows®.

4.4 Resultados y Discusión

4.4.1 Determinación de compuestos bioactivos a través del tiempo

Dentro de los polisacáridos que hacen parte de las estructuras celulares de las plantas y de los hongos se encuentran los β -glucanos, la celulosa, la hemicelulosa, la quitina, entre otros y algunos de ellos exhiben diferentes propiedades benéficas a la salud como son inmunoestimulante, anticancerígena, antibacterial, antiviral y prebiótica (Wasser y Weis 1999; Mattila, Suonpää *et al.* 2000; Wasser 2002; Laroche y Michaud 2007; Aida, Shuhaimi *et al.* 2009; Synytsya, Míčková *et al.* 2009). Dentro de ellas reviste especial interés para el presente trabajo las acciones anticancerígena e inmunoestimuladora la cual es debida a los β -glucanos.

Al realizar la cuantificación de los polisacáridos se evidenció una diferencia significativa ($\alpha \leq 0,05$) en la cantidad de estos compuestos contenidos en las dos muestras, la gelatina con el producto biotecnológico presenta una mayor concentración de estos bioactivos que la gelatina control (tabla 4-1). Dado que la prueba de rojo congo se usa para la cuantificación de polisacáridos de cadenas alto peso molecular con estructuras complejas (β -glucanos) (Yuguchi, Hirotsu *et al.* 2005), se aplicó para la determinación cuantitativa de ellos encontrándose que en la gelatina que contiene el producto biotecnológico, la concentración es un 18% mayor. Es sabido que cerca del 90% de los polisacáridos de cadena larga en el Shiitake son β -glucanos (Manzi y Pizzoferrato 2000), lo que explica su alto contenido en la gelatina que contiene el producto biotecnológico,

que fue de 78 mg y 74 mg por cada 100 g de gelatina, en los días 0 y 20, respectivamente.

Cabe aquí anotar, que los polisacáridos presentes en la fresa corresponden a celulosa, polisacáridos no celulósicos tanto solubles como insolubles (<http://alimentos.org.es/carbohidratos-fresa>), que forman parte de la fibra dietaria los cuales, que si bien son benéficos, no ejercen por si mismos una bioacción. Por otro lado, se evidencia que hay una disminución del contenido de polisacáridos bioactivos al transcurrir el tiempo; al hacer el análisis estadístico entre los días, se encuentra que no hay una diferencia significativa ($\alpha \leq 0,05$) entre las medias de la concentración de polisacáridos bioactivos en las muestras en el día inicial y a los 20 días de almacenamiento. La proporción de pérdida entre la gelatina control y la gelatina con Shiitake fue muy diferente. En la primera la pérdida de polisacáridos fue de casi un 13% a los 20 días de conservación, mientras que en la gelatina con producto biotecnológico la pérdida es casi 10 veces menos. La disminución de los polisacáridos, aunque era esperada, puede explicarse en el caso de la gelatina con Shiitake por degradación microbiana y enzimática ya que la carga microbiana en la fresa es alta y aun cuando se hizo una desinfección de la fruta antes de la preparación, pudieron quedar células viables de bacterias, como son diferentes tipos de bacilos que pueden degradar polisacáridos de cadena larga (Planas 2000), bacterias que se verían disminuidas en la gelatina funcional, ya que el Shiitake es conocido por su acción antibacteriana (Mattila, Suonpää et al. 2000; Nora 2001). En cuanto a la degradación enzimática, puede ser debida al hecho de que el Shiitake produce glucanasas *de novo* que pueden degradar sus propios glucanos (Minato, Kawakami et al. 2004) y aunque la gelatina se mantuvo a 4°C, pudieron actuar a una baja velocidad por lo que hubo una baja degradación de estos compuestos. Los resultados obtenidos en cuanto al contenido de polisacáridos activos (β -glucanos) y su persistencia a lo largo del tiempo son por demás promisorios para el posterior desarrollo de otros alimentos funcionales que incluyan micelio de *L. edodes* producido en masa por fermentación líquida. Lo anterior se ve reforzado por los estudios clínicos que se han desarrollado sobre β -glucanos que han demostrado que el uso tanto de éstos compuestos aislados como del micelio de los hongos tienen un importante efecto benéfico y/o preventivo (Kogan 2000; Chen y Seviour 2007; Mantovani, Bellini et al. 2008; Rop y Mlcek 2009; Lazaridou, Papoutsi et al. 2011).

Tabla 4-1. Concentración de polisacáridos totales y β -glucanos en la gelatina de fruta control y con adición de Shiitake

Muestra	Polisacáridos totales		β -glucanos ^c	
	Día inicial	20 Días	Día inicial	20 Días
Gelatina Control	74,920±0,01a*	40,654±0,02a*	0.000	0.000
Gelatina con Shiitake	88,400±0,03b**	84,088±0,02b**	78.000	74.000

Valores expresados como medias \pm SD (n=3). Medias con diferentes letras al lado indican diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$).

*No hay diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$) durante el tiempo de almacenamiento.

**No hay diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$) durante el tiempo de almacenamiento.

^c Cálculo teórico

En cuanto a otros tipos de compuestos bioactivos, como los ácidos grasos y los compuestos triterpenoidales, hubo una diferencia apreciable entre las dos muestras, como se puede observar en los respectivos cromatogramas; mientras que en las muestras de la gelatina que no tenía el producto biotecnológico no se observó presencia de estos compuestos en la región comprendida entre 20 y 25 minutos en el cromatograma (fig 4-1) típica de ácidos grasos y sus ésteres, en contraste con la gelatina con Shiitake en la que se observa la presencia de estos compuestos (fig 4-2), cuya presencia y concentración varía en el tiempo. Para el día 0, en la gelatina con adición de producto biotecnológico se encontraron ácido oleico, linoleato de etilo, ácido linoléico mientras que para el día 20, sólo se encontró linoleato de etilo pero ya en menor proporción. Con respecto a los esteroides si bien, tanto la gelatina control como la adicionada con el producto biotecnológico, presentan el pico correspondiente al estigma-5-en-3 β -ol (β -sitosterol) esteroide propio de la fresa, éste se encuentra con mayor concentración en la gelatina funcional. Los compuestos encontrados tanto para la gelatina control como para la gelatina con Shiitake, han sido reportados previamente tanto para la fruta como para el hongo (Debieu, Corio-Costet et al. 1995; Yang, Karlsson et al. 2001; Moreau, Whitaker et al. 2002; Joseph, Janardhanan et al. 2011). La presencia de ácidos grasos insaturados como el linoléico aporta un valor agregado a la gelatina ya que forma parte de los denominados ácidos grasos esenciales (Smit, Muskiet et al. 2004). La ingesta de ésteres de ácidos grasos constituye una fuente adicional de ácidos grasos insaturados, necesarios para las funciones vitales y que además son excelentes

en la prevención de enfermedades cardiovasculares y la disminución de colesterol (Miles y Chang 1999). Por otro lado, el β -sitosterol ha sido ampliamente estudiado como hipolipidémico, antioxidante y últimamente se ha determinado su actividad como regulador de glucosa o “antidiabético” (Moreau, Whitaker et al. 2002; Quílez, García-Lorda et al. 2003; Sujatha, Anand et al. 2010). La mayor cantidad de β -sitosterol, así como de ácidos grasos insaturados hacen que la inclusión del producto biotecnológico en la gelatina de fruta proporcione a ésta un mayor valor funcional, ya que adicional al componente inmunomodulador (β -glucanos) y de fibra dietaria (polisacáridos benéficos), tendría compuestos con acción hipolipidémica, antioxidante y antidiabética proporcionada, por los ácidos grasos y esteroides, lo que la convertiría en un muy buen nutraceutico.

Figura 4-1. Perfil cromatográfico de la gelatina control en el día inicial

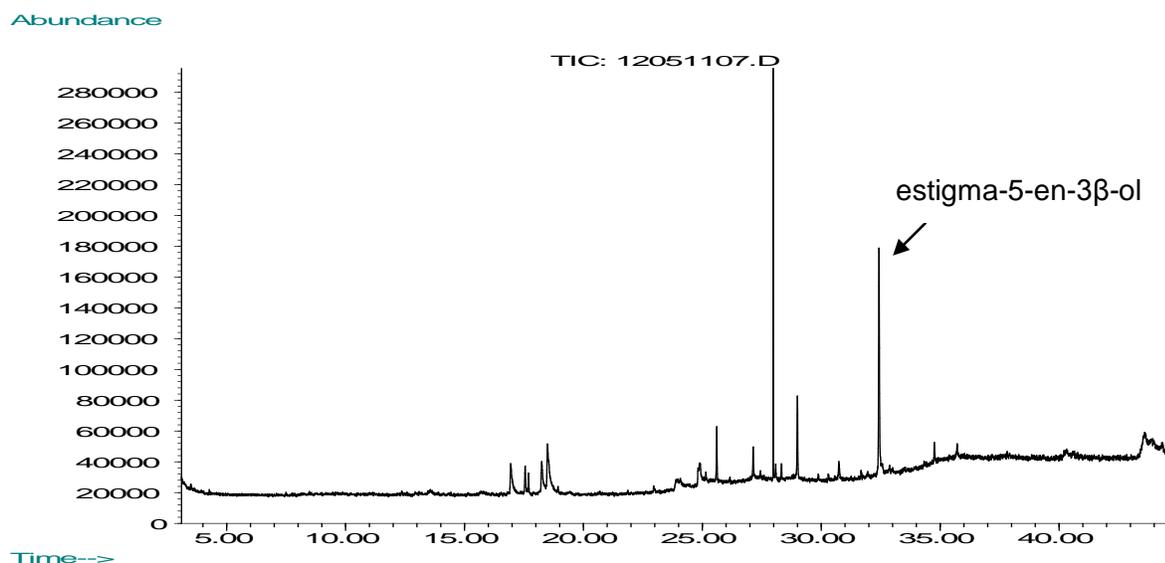
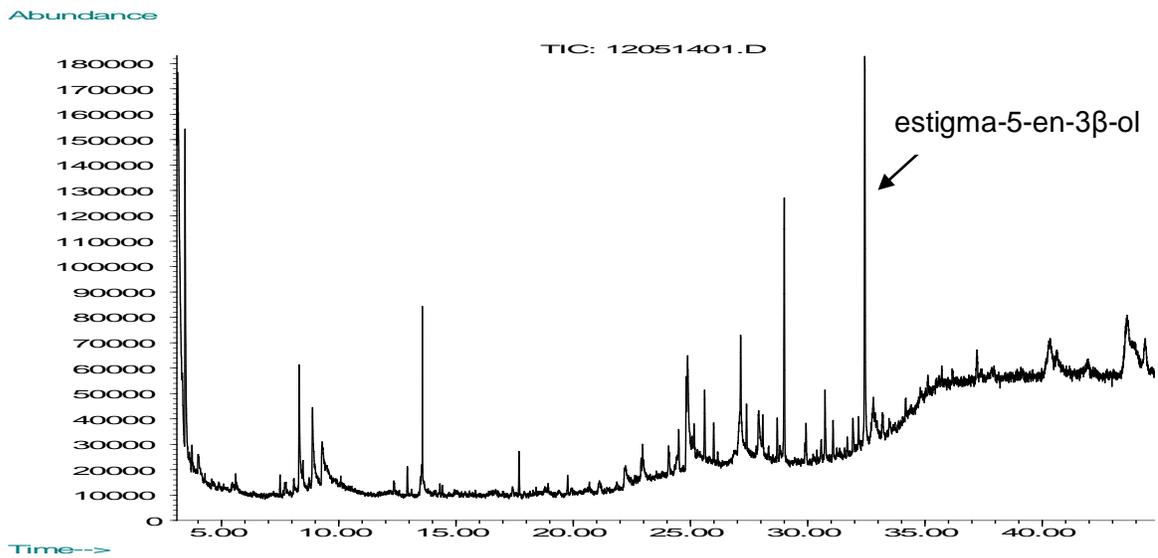


Figura 4-2. Perfil cromatográfico de la gelatina con Shiitake en el día inicial

4.4.2 Análisis de textura

El análisis del perfil de textura y la prueba de punción realizados a la gelatina definieron que las dos muestras tuvieron un comportamiento similar en la mayoría de variables, excepto por la firmeza y la gomosidad (tabla 4-2). No hubo diferencias estadísticamente significativas para los atributos adhesividad, elasticidad, cohesividad y resiliencia. La gelatina con Shiitake es menos sensible a la fractura (más firme) que la gelatina control, lo que también le confiere mayor gomosidad y hace que la fuerza de masticación deba ser mayor.

Es sabido que los β -glucanos tienen propiedades de hidrocoloides (Bruce A 2009; Gidley y Nishinari 2009) y específicamente para el Shiitake, su principal polisacárido, el lentinan tiene poderosas capacidades gelificantes y viscoelásticas en soluciones acuosas y bajo ciertas temperaturas (Zhang, Xu et al. 2007; Zhang, Xu et al. 2008; Zhang, Li et al. 2011), es así que a temperaturas de refrigeración obtiene su gel más fuerte (Zhang, Li et al. 2011) por lo que podría esperarse este comportamiento en la gelatina. Los β -glucanos al tener una estructura compleja y muchos grupos hidroxilo, tienen la capacidad de ligar más agua y por ende conseguir estructuras de gel más compactas y firmes que otro tipo de polisacáridos (Gidley y Nishinari 2009) además de una mayor dureza y gomosidad (casi el doble). La gelatina con Shiitake no presentó sinéresis, fenómeno que se da

cuando los polisacáridos no son capaces de ligar más el agua y empiezan a perderla, efecto que se comenzó a observar en la gelatina control, a los 20 días de almacenamiento. En cuanto a la adhesividad, atributo que hace referencia a lo pegajosa que podría ser la muestra al momento de masticar, aunque se pensaba que podría ser mayor en la gelatina con Shiitake, los análisis estadísticos demostraron que su comportamiento fue similar al control. La elasticidad (capacidad de recuperación después de un esfuerzo) presentó valores muy similares al control, al igual que la resiliencia y la cohesividad que son propiedades íntimamente relacionadas con la elasticidad. El resultado anterior permite inferir que no son los polisacáridos del Shiitake los que le confieren esta característica (la elasticidad) al producto sino que es conferida por el colágeno y que mayores concentraciones de polisacáridos bioactivos podrían influir en estas características, esto debido a que la pequeña cantidad utilizada para la formulación afectó dos variables como son la firmeza y la gomosidad, se podría esperar que si se aumenta la concentración de estos compuestos, la dureza y la gomosidad aumentarían más y afectaría otras características como la elasticidad y la resiliencia ya que el producto podría perder sus cualidades como un sólido elástico, sino que pasaría a ser un sólido firme o fracturable.

Tabla 4-2. Atributos analizados por medio del perfil de textura y la prueba de punción de la gelatina de fruta con Shiitake y la gelatina control

Atributo	Gelatina control	Gelatina con Shiitake
Firmeza	57,673 ± 5,563a	108,994 ± 11,993b
Adhesividad	-25,827 ± 1,630a	-24,739 ± 3,518a
Elasticidad	0,860 ± 0,031a	0,840 ± 0,095a
Cohesividad	0,885 ± 0,029a	0,901 ± 0,040a
Gomosidad	282,824 ± 30,475a	498,808 ± 73,857b
Resiliencia	0,621 ± 0,033a	0,634 ± 0,032a

*Cada valor está expresado como la media ± SD (n=10). Medias con diferentes letras al lado indican diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$)

4.4.3 Evaluación sensorial

El análisis sensorial se desarrolló en población joven entre 19 y 25 años, consumidores frecuentes de este tipo de productos. Se hizo una prueba hedónica de 5 puntos con 4 preguntas que describían las características principales de un alimento (apariciencia,

textura, aroma y sabor). El análisis estadístico demostró que no hubo diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las dos muestras para los tres primeros atributos (apariencia, textura y aroma), en contraste con el atributo de sabor el cual arrojó diferencias estadísticamente significativas (tabla 4-3). En cuanto a la similitud entre las dos gelatinas a pesar de que instrumentalmente hubo diferencias significativas en la textura (firmeza y gomosidad), la mayoría de atributos tuvieron un comportamiento similar y por ello los panelistas (consumidores) no encontraron diferencia apreciable. Las opiniones expresadas por los panelistas se enfocaron en la dulzura de la gelatina, nunca a sabores diferentes conferidos por el producto biotecnológico. La disminución en el dulzor parece ser debida a que el producto biotecnológico interfiere en el sabor dulce de la gelatina, por lo que se podría pensar en aumentar la cantidad de azúcar y/ o de fruta o adicionar un saborizante en la formulación para mejorar este atributo. Es muy poca la información pertinente acerca de la aceptación por parte de los consumidores de alimentos que contienen Shiitake, sin embargo, los estudios reportados evidencian que al momento de incluir el hongo, un bajo porcentaje de inclusión no evidencia diferencias estadísticamente significativas con las muestras control y que la aceptación es buena (Chun, Chambers et al. 2005; Lin, Tseng et al. 2008; Lin, Huang et al. 2010).

Tabla 4-3. Medias de las pruebas hedónicas realizadas a la gelatina de fruta control y la gelatina de fruta con Shiitake

Muestra	Apariencia	Textura	Aroma	Sabor
Gelatina control*	32,355a	34,484a	35,081 ^a	37,774a
Gelatina con Shiitake	30,645a	28,516a	27,919 ^a	25,226b

*Se usó una prueba hedónica de cinco puntos donde 1, significa me disgusta mucho, 3, me es indiferente y 5, me agrada mucho. Medias con diferentes letras al lado tienen diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

4.5 Conclusiones

La adición del producto biotecnológico obtenido por FEL del hongo comestible *Lentinula edodes* (Shiitake) proporciona a la gelatina de fruta β -glucanos, ácidos grasos insaturados y esteroides que proporcionan valor nutraceútico al alimento. Por otro lado, la presencia de estos β -glucanos parece interferir en las propiedades reológicas de la gelatina; sin embargo no parece influir en la percepción de los consumidores ya que la

tendencia en las propiedades sensoriales es la misma a excepción de la dulzura que parece ser afectada por el producto biotecnológico.

4.6 Bibliografía

Aida, F. M. N. A., M. Shuhaimi, *et al.* (2009). Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Trends in Food Science & Technology* **20**(11–12): 567-575.

Bruce A, S. (2009). Chapter 2.1 - Chemistry of β -Glucans. *Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides*. B. Antony, B. F. Geoffrey, B. A. y S. A. San Diego, Academic Press: 5-46.

Çağlarımak, N. (2007). The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula edodes* and *Pleurotus* species) and an estimated approach to the volatile compounds. *Food Chemistry* **105**(3): 1188-1194.

Cassileth, B. (2011). Shiitake mushroom (*Lentinula edodes*). *Oncology-New York* **25**(6): 548-551.

Chen, J. y R. Seviour (2007). Medicinal importance of fungal β -(1→3), (1→6)-glucans. *Mycological Research* **111**(6): 635-652.

Chun, S., E. Chambers, *et al.* (2005). Perception of pork patties with shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom powder and sodium tripolyphosphate as measured by Korean and United States consumers. *Journal of Sensory Studies* **20**: 156-166.

Debieu, D., M.-F. Corio-Costet, *et al.* (1995). Sterol composition of the vine powdery mildew fungus, *Uncinula necator*: Comparison of triadimenol-sensitive and resistant strains. *Phytochemistry* **39**(2): 293-300.

Donatini, B. (2010). Introduction a la mycothérapie: généralités sur l'intérêt des principaux mycelia. *Phytothérapie* **8**: 191-197.

Gidley, M. J. y K. Nishinari (2009). Chapter 2.2 - Physico-chemistry of (1,3)- β -Glucans. Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides. B. Antony, B. F. Geoffrey, G. B. F. Bruce A. StoneA - Antony Bacic y A. S. Bruce. San Diego, Academic Press: 47-118.

Guan, J., S. J. Xue, *et al.* (2009). Development of drink mixed by shiitake mushroom mill culls and papaya juice. Science and Technology of Food Industry **5**.

Joseph, S., K. K. Janardhanan, *et al.* (2011). A new epoxidic ganoderic acid and other phytoconstituents from *Ganoderma lucidum*. Phytochemistry Letters **4**(3): 386-388.

Kitzberger, C. S. G., R. H. Lomonaco, *et al.* (2009). Supercritical fluid extraction of shiitake oil: Curve modeling and extract composition. Journal of Food Engineering **90**(1): 35-43.

Kogan, G. (2000). (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)- β -D-glucans of yeasts and fungi and their biological activity. Studies in Natural Products Chemistry. R. Atta ur, Elsevier **23**: 107-152.

Laroche, C. y P. Michaud (2007). New Developments and Prospective Applications for B(1,3) Glucans. Recent Patents on Biotechnology **1**: 59-73.

Lazaridou, A., Z. Papoutsi, *et al.* (2011). Effect of oat and barley β -glucans on inhibition of cytokine-induced adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells: Molecular structure–function relations. Carbohydrate Polymers **84**(1): 153-161.

Lin, L.-Y., Y.-H. Tseng, *et al.* (2008). Quality of shiitake stipe bread. Journal of Food Processing and Preservation **32**(6): 1002-1015.

Lin, P. H., S. Y. Huang, *et al.* (2010). A novel alcoholic beverage developed from shiitake stipe extract and cane sugar with various *Saccharomyces* strains. LWT - Food Science and Technology **43**: 971-976.

Mantovani, M. S., M. F. Bellini, *et al.* (2008). β -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **658**(3): 154-161.

Manzi, P. y L. Pizzoferrato (2000). Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry* **68**(3): 315-318.

Mattila, P., K. Suonpää, *et al.* (2000). Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition* **16**(7-8): 694-696.

Miles, P. G. y S. T. Chang (1999). *Biología de las setas: fundamentos básicos y acontecimientos actuales*. Hong Kong, World Scientific.

Minato, K.-i., S. Kawakami, *et al.* (2004). An exo β -1,3-glucanase synthesized de novo degrades lentinan during storage of *Lentinula edodes* and diminishes immunomodulating activity of the mushroom. *Carbohydrate Polymers* **56**(3): 279-286.

Moreau, R. A., B. D. Whitaker, *et al.* (2002). Phytosterols, phytosteranols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research* **41**(6): 457-500.

Nora, H. (2001). Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *International Journal of Antimicrobial Agents* **17**(1): 71-74.

Planas, A. (2000). Bacterial 1,3-1,4- β -glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1543**(2): 361-382.

Quílez, J., P. García-Lorda, *et al.* (2003). Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions. *Clinical Nutrition* **22**(4): 343-351.

Regula, J. y A. Gramza-Michalowska (2009). Effect of the addition of dried shiitake (*Lentinula edodes*) to corn crackers on their chemical composition and ability to bind

Fe(III) and Zn(II) - A short report. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences **59**(3): 275-278.

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

Smit, E. N., F. A. J. Muskiet, *et al.* (2004). The possible role of essential fatty acids in the pathophysiology of malnutrition: a review. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids **71**(4): 241-250.

Smith, J., N. Rowan, *et al.* (2002). Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. Biotechnology Letters **24**: 1839-1845.

Son, M. H., S. Y. Kim, *et al.* (2003). Texture properties of surimi gel containing shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*). Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition **32**(6): 859-863.

Songdach, C., S. Riebroy, *et al.* (2011). Texture and color characteristics of crispy healthy snack produced from shiitake, straw and Indian oyster mushrooms. The 12th Asean Food Conference 2011. Bangkok, Thailand: PF-179.

Sujatha, S., S. Anand, *et al.* (2010). Biological evaluation of (3 β)-stigmast-5-en-3-ol as potent anti-diabetic agent in regulating glucose transport using in vitro model. International Journal of Diabetes Mellitus **2**(2): 101-109.

Synytsya, A., K. Míčková, *et al.* (2009). Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. Carbohydrate Polymers **76**(4): 548-556.

Wasser, S. P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Applied Microbiology and Biotechnology **60**(3): 258-274.

Wasser, S. P. y A. L. Weis (1999). Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms* **1**: 31-62.

Yang, B., R. M. Karlsson, *et al.* (2001). Phytosterols in Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) Berries: Identification and Effects of Different Origins and Harvesting Times. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**(11): 5620-5629.

Yuguchi, Y., T. Hirotsu, *et al.* (2005). Structural characteristics of xyloglucan – Congo red aggregates as observed by small angle X-ray scattering. *Cellulose* **12**: 469-477.

Zhang, Y., S. Li, *et al.* (2011). Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities. *Food Hydrocolloids* **25**(2): 196-206.

Zhang, Y., X. Xu, *et al.* (2007). Dynamic viscoelastic behavior of triple helical Lentinan in water: Effects of concentration and molecular weight. *Polymer* **48**: 6681-6690.

Zhang, Y., X. Xu, *et al.* (2008). Dynamic viscoelastic behavior of triple helical Lentinan in water: Effect of temperature. *Carbohydrate Polymers* **73**: 26-34.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

La producción de biomasa obtenida en la fermentación líquida de *Lentinula edodes* en un medio simple (10,1 g/L) es similar a la reportada anteriormente, aún para medios enriquecidos.

La velocidad específica de crecimiento (μ), presentó un valor de $0,9317 \text{ g día}^{-1}$ que indica que el hongo llegó a crecer casi un gramo por día. Este parámetro es importante ya que permitirá comparar medios de cultivos que se puedan evaluar posteriormente y medir el crecimiento del hongo.

La obtención de preinóculo es una parte muy importante en el proceso de fermentación líquida de macrohongos, puesto que la realización de este paso acelera la producción de biomasa y de metabolitos. Aun cuando se pueda pensar que el proceso de fermentación se alarga con este paso, el rendimiento es mayor, tanto de biomasa como de metabolitos, ya que el consumo de nutrientes por parte del hongo es únicamente para producción de biomasa y biometabolitos y no para el proceso de adaptación (fase lag).

El pH elegido para realizar la fermentación permitió una buena producción de biomasa y de intra y exo metabolitos, permitiendo además que la contaminación bacteriana fuera prácticamente nula.

A pesar de que el medio de cultivo no era enriquecido, la fermentación líquida de *Lentinula edodes* alcanzó una incipiente fase estacionaria a 12 días de fermentación, tiempo en que algunos de los metabolitos sintetizados y excretados por el hongo, como los ácidos grasos, fueron nuevamente utilizados por el hongo para su subsistencia a pesar de la clara presencia de glucosa. Este resultado es totalmente concordante con

estudios recientemente publicados, que indican que los macromicetos comestibles, a pesar de tener disponibilidad de la fuente de carbono, desvían sus rutas metabólicas y disminuyen el consumo de glucosa.

El tiempo que podría ser elegido para terminar la fermentación del Shiitake es de 12 días, ya que en éste se evidenció la máxima producción de biomasa y de biometabolitos como polisacáridos, ácidos grasos y triterpenoides.

La reducción del pH durante la fermentación puede ser debido a la producción de los ácidos de cadenas cortas y medianas encontrados en el ensayo.

Se evidenció un aumento en la concentración y variedad de compuestos de tipo triterpenoidal, así como de ácidos grasos y de sus ésteres durante la fermentación líquida de *L. edodes*. Los ácidos grasos mayoritarios fueron los insaturados (oleico y linoléico) para el medio de cultivo agotado y los ácidos grasos saturados como el palmítico para el micelio. Todos estos compuestos han sido reportados anteriormente para basidiomicetos y sobre todo para *L. edodes*.

La presencia de compuestos triterpenoidales se da únicamente en el micelio del hongo, más no en el medio de cultivo agotado y en su producción no existe una clara tendencia, como tampoco en la biosíntesis de un compuesto en particular a lo largo del proceso fermentativo. La mayor producción y variedad de los compuestos de carácter triterpenoidal se da en el día 12, con proporciones comprendidas entre el 3 y el 20%, siendo los mayoritarios los de núcleo ergostánico. Los triterpenos sólo se biosintetizan entre el día 9 y el día 12, mientras que los esteroides sólo aparecen a partir del día 12. El ergosterol tuvo una concentración muy baja, lo que indica que se debe revisar el empleo de este compuesto como biomarcador para la determinación de la presencia y concentración de hongos en muestras.

Dos compuestos triterpenoidales se reportan como posibles nuevas estructuras para la especie, el 4,4-dimetil-colesta-7-en-3-ona y la estigma-4-en-3-ona, evidenciando que los hongos macromicetos son fuente de metabolitos de diferentes características estructurales.

Se reporta el compuesto lanosta-7-en-3-ona, del cual no hay reportes ni para el reino *Fungi*, ni para el reino *Plantae*; por lo que esta estructura propuesta sería una novedad.

Hubo una tendencia creciente de la concentración de los intrapolisacáridos en el hongo, del micelio, los β -glucanos alcanzaron una concentración casi del 22%, porcentaje mayor a reportes anteriores. Los resultados obtenidos sugieren que un medio simple como el utilizado puede tener los mismos rendimientos (o mayores) que un medio enriquecido, como se evidencia con publicaciones recientes.

Aunque hubo producción de exopolisacáridos y los resultados son similares a reportes previos, se evidencia que la proporción de estos en el medio de cultivo es muy baja (cerca del 6%).

La incorporación del producto biotecnológico a una gelatina con fruta, que contenía los bioactivos propios de la fresa reportados en literatura, incrementó significativamente el contenido de bioactivos con la presencia de β -glucanos, ácidos grasos y esteroides confiriéndole acciones inmunoestimuladoras, anticancerígenas, hipocolesterolémicas y antioxidantes que la hacen un producto alimenticio con propiedades nutraceuticas.

El hecho de que los polisacáridos presentes en el producto biotecnológico, como los β -glucanos, exhiban propiedades gelificantes y viscoelásticas hace que la presencia de ellos en la gelatina con fruta produzca cambios significativos en algunos atributos reológicos como la firmeza y la gomosidad.

La presencia del producto biotecnológico en la gelatina de fruta no tuvo impacto en los atributos sensoriales evaluados salvo en el sabor el cual se vio afectado, no por sabores ajenos a la gelatina, sino por la sensación de dulzura presente en ella. Pareciera que el micelio, junto con sus bioactivos secuestran el sabor dulce en ella, por lo que se debe realizar posteriores formulaciones con edulcorantes o saborizantes que ayuden a realzar este atributo.

5.2 Recomendaciones

En futuras obtenciones de *Lentinula edodes* por fermentación en estado líquido es muy importante mantener la relación carbono/nitrógeno, ya que como se determinó en la investigación, es imprescindible para obtener una buena proporción de biomasa y de biometabolitos bioactivos.

Cuando el objetivo sea la producción de ácidos grasos y exopolisacáridos es importante la temperatura y el pH de la fermentación ya que, como se evidenció, estos determinan el tipo de ácidos grasos y la concentración de exopolisacáridos.

Investigaciones posteriores con medios de cultivo más económicos como desechos industriales y otros, deben tener en cuenta que la glucosa es la mejor fuente de carbono tanto para la producción de biomasa, como de β -glucanos y ácidos grasos; por eso, debe estar presente en la formulación en proporción adecuada.

El uso de la fermentación líquida es una muy buena herramienta para la biorremediación, los hongos basidiomicetos son excelentes en esa función debido al pool enzimático que poseen; *Lentinula edodes* al pertenecer a este Phylum, puede ser utilizado en la biorremediación de efluentes industriales no tóxicos como melazas o desechos de destilerías e industria cervecera para producir biomasa y biometabolitos, pero siempre teniendo en cuenta la composición del medio de cultivo, así se puede utilizar esta técnica con dos fines diferentes.

Debe ser motivo de investigación la utilización de otros métodos de secado más económicos pero que no incidan en la actividad del producto biotecnológico, aunque la liofilización es un método ideal, puede ser costoso a escala industrial.

Deben realizarse estudios que permitan establecer la relación del producto biotecnológico con los edulcorantes, ya que se definió que tiene un efecto negativo en este atributo sensorial.

Al evidenciarse que el Shiitake tiene un efecto en la dulzura del producto, podría ser incluido en productos salados. Son varios los productos de esta clase que se han hecho en oriente.

Debido a su conocido contenido proteico también podrían establecerse estudios de reemplazos cárnicos con el micelio del hongo, como ya se ha reportado utilizando otro tipo de setas (*Agaricus bisporus*) como sustitutos cárnicos con excelentes resultados.

Al conocerse que los polisacáridos del Shiitake tienen propiedades de hidrocoloides, se puede utilizar la fermentación líquida para optimizar su producción y su posterior utilización en la industria alimenticia, un ejemplo evidente de esto es la utilización del Schizophyllan del hongo *Schizophyllum commune*.

6. Bibliografía

Ahlawat, O. P. y R. Singh (2009). Influence of pH, temperature and cultural media on decolorization of synthetic dyes through spent substrate of different mushrooms. *Journal of Scientific & Industrial Research* **68**: 1068-1074.

Beltrán, S. J. y Puerto, P. A. (2006). Transformación de la seta comestible shiitake (*Lentinula edodes*) en harina como sustituto para elaborar galleta dulce de regado. Facultad de Ingeniería de Alimentos. Bogotá, D.C, Universidad de la Salle: 84.

Benkortbi, O., S. Hanini, *et al.* (2007). Batch kinetics and modelling of Pleuromutilin production by *Pleurotus mutilis*. *Biochemical Engineering Journal* **36**(1): 14-18.

Çağlarırnak, N. (2007). The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula edodes* and *Pleurotus* species) and an estimated approach to the volatile compounds. *Food Chemistry* **105**(3): 1188-1194.

Cortés, M., A. Chiralt, *et al.* (2005). Alimentos funcionales: una historia con mucho presente y futuro. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* **12**(1): 5-14.

Cucaita, E. d. P. (2007). Estudio químico comparativo de metabolitos secundarios de los hongos comestibles *Laccaria laccata* y *Lentinula edodes* y determinación de su variación respecto al estadio del hongo. Departamento de Química. Bogotá, D.C, Universidad Nacional de Colombia.

Chan, G. C., W. K. Chan, *et al.* (2009). The effects of B-glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology & Oncology* **2**: 25-35.

Chun, S., E. Chambers, *et al.* (2005). Perception of pork patties with shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom powder and sodium tripolyphosphate as measured by Korean and United States consumers. *Journal of Sensory Studies* **20**: 156-166.

Dantas-Vanetti, M., N. Kazue, *et al.* (2001). Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. *Brazilian Journal of Microbiology* **32**: 206-210.

Donatini, B. (2010). Introduction a la mycothérapie: généralités sur l'intérêt des principaux mycelia. *Phytothérapie* **8**: 191-197.

El-Enshasy, H., A. Daba, *et al.* (2010). Bioprocess development for large scale production of anticancer exo-polysaccharide by *Pleurotus ostreatus* in submerged culture. *Journal of Applied Sciences* **10**(21): 2523-2529.

Fazenda, M. L., R. Seviour, *et al.* (2008). "Submerged Culture Fermentation of Higher Fungi": The Macrofungi. *Advances in Applied Microbiology* **63**: 33-103.

Feng, Y.-L., W.-Q. Li, *et al.* (2010). Statistical optimization of media for mycelial growth and exo-polysaccharide production by *Lentinus edodes* and a kinetic model study of two growth morphologies. *Biochemical Engineering Journal* **49**(1): 104-112.

Furlan, S., L. Virmond, *et al.* (1997). Mushrooms strains able to grow at high temperatures and low pH values. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **13**: 689-692.

Gaitán-Hernández, R., M. Esqueda, *et al.* (2006). Bioconversion of agrowastes by *Lentinula edodes*: the high potential of viticulture residues. *Applied Microbiology and Biotechnology* **71**: 432-439.

Giovannozzi, G., A. D'annibale, *et al.* (1994). The production of exo-enzymes by *Lentinus edodes* and *Pleurotus ostreatus* and their use for upgrading corn straw. *Bioresource Technology* **48**: 173-178.

Guan, J., S. J. Xue, *et al.* (2009). Development of drink mixed by shiitake mushroom mill culls and papaya juice. *Science and Technology of Food Industry* **5**.

Guo, G. J., Q. H. Wang, *et al.* (2008). Development of soft canned food of ham with shiitake. *Meat Industry* **4**.

INC. (2008). Mortalidad por cáncer según primeras causas y sexo, tasas específicas por grupos de edad, Colombia 2000-2006. 2011, from <http://www.cancer.gov.co/documentos/Mortalidad/Mortalidad%20nacional%20por%20tipo%20de%20c%C3%A1ncer%20y%20grupo%20de%20edad%202000-2006%20.pdf>.

JPO. (2012). Industrial Property Digital Library. Monthly, Japan Patent Office.

Kabir, Y., M. Yamaguchi, *et al.* (1987). Effect of Shiitake (*Lentinus edodes*) and Maitake (*Grifola frondosa*) mushrooms on blood pressure and plasma lipids of spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **33**(5): 341-346.

Kim, S. W., H. J. Hwang, *et al.* (2002). Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. *Letters in Applied Microbiology* **34**: 56-61.

Kirk, P. M., P. F. Cannon, *et al.*, Eds. (2008). *Dictionary of the Fungi*. Ainsworth & Bisbi's. *Dictionary of the Fungi*. United Kingdom, CABI Europe.

Lee, K. M., S. Y. Lee, *et al.* (1999). Bistage control of pH for improving exopolysaccharide production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermentor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **88**(6): 646-650.

Lin, L.-Y., Y.-H. Tseng, *et al.* (2008). Quality of shiitake stipe bread. *Journal of Food Processing and Preservation* **32**(6): 1002-1015.

Lin, P. H., S. Y. Huang, *et al.* (2010). A novel alcoholic beverage developed from shiitake stipe extract and cane sugar with various *Saccharomyces* strains. *LWT - Food Science and Technology* **43**: 971-976.

Lindequist, U., T. H. J. Niedermeyer, *et al.* (2005). The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM* **2**(3): 285-299285.

Lobanok, A. G., V. G. Babitskaya, *et al.* (2003). Composition and biological activity of submerged mycelium of the xylotrophic basidiomycete *Lentinus edodes*. *Applied Biochemistry and Microbiology* **39**(1): 60-64.

Lopes, A., N. M. Sabaini, *et al.* (2009). Biomass production of sun-mushroom and shiitake in liquid culture media with agro-industrial residues. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos* **27**(2): 183-190.

Martinez-Carrera, D., M. Sobal, *et al.* (2004). Los hongos comestibles: propiedades nutricionales, medicinales y su contribución a la alimentación mexicana. El shiitake. Puebla, Colegio de Posgraduados Campus Puebla.

Martínez, I. (1999). Cáncer y medicina alternativa. *Revista Cubana de Oncología* **2**: 77-80.

Mattila, P., K. Suonpää, *et al.* (2000). Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition* **16**(7-8): 694-696.

NCI. (2012). What is cancer? *Cancer Topics*, 2012, from <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>.

Nora, H. (2001). Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *International Journal of Antimicrobial Agents* **17**(1): 71-74.

Nora, H. y M. Imre (2001). Production of laccase and manganese peroxidase by *Lentinus edodes* on malt-containing by-product of the brewing process. *Process Biochemistry* **37**: 491-496.

OMS. (2012). Cáncer. Nota descriptiva No 297, 2012, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>.

Osman, M. E., F. R. H. Hassan, *et al.* (2009). Physiological studies on growth of two different strains of *Lentinus edodes*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* **3**(4): 4094-4103.

Paganelli, G. y R. de Santis (2004). Antibody-based cancer therapies: back to "polyclonals"? *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **31**(11): 1453-1455.

Papaspyridi, L.-M., N. Aligiannis, *et al.* (2011). Production of bioactive metabolites with pharmaceutical and nutraceutical interest by submerged fermentation of *Pleurotus ostreatus* in a batch stirred tank bioreactor. *Procedia Food Science* **1**(0): 1746-1752.

Papaspyridi, L.-M., P. Katapodis, *et al.* (2007). Studies on the production of statins by greek isolates of basidiomycetes. *Journal of Biotechnology* **131**(2, Supplement): S61-S62.

Pimentel, M. (2008). Actividade antimicrobiana de extratos e fracos do cultivo *in vitro* de *Lentinula edodes* contra *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae*, *Guignardia citricarpa*, *Colletotrichum sublineolum* e *Tobacco mosaic virus*. Agornomia. Piracicaba, Universidade de Sao Paulo.

Prasad, K. K., S. V. Mohan, *et al.* (2005). Laccase production by *Pleurotus ostreatus* 1804: Optimization of submerged culture conditions by Taguchi DOE methodology. *Biochemical Engineering Journal* **24**(1): 17-26.

Regula, J. y A. Gramza-Michalowska (2009). Effect of the addition of dried shiitake (*Lentinula edodes*) to corn crackers on their chemical composition and ability to bind

Fe(III) and Zn(II) - A short report. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences **59**(3): 275-278.

Rendon, M. y P. De Villeros (2004). Evaluación del crecimiento y producción de exopolisacáridos del shiitake (*Lentinula edodes*) en cultivo sumergido. Departamento de Ingeniería. Medellín, Universidad EAFIT.

Saeki, N., H. Takeda, *et al.* (2011). Induction of manganese peroxidase and laccase by *Lentinula edodes* under liquid culture conditions and their isozyme detection by enzymatic staining on native-PAGE. Mycoscience **52**: 132-136.

Smith, J., N. Rowan, *et al.* (2002). Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. Biotechnology Letters **24**: 1839-1845.

Smith, J., N. Rowan, *et al.* (2002). Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments, University of Strathclyde.

Soboleva, A., L. M. Krasnopol'skaya, *et al.* (2006). Antibiotic properties of the strains of the basidiomycete *Lentinus edodes* (Berk.) sing. Antibiot Khimioter **51**(7): 3-8.

Son, M. H., S. Y. Kim, *et al.* (2003). Texture properties of surimi gel containing shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*). Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition **32**(6): 859-863.

Songdach, C., S. Riebroy, *et al.* (2011). Texture and color characteristics of crispy healthy snack produced from shiitake, straw and Indian oyster mushrooms. The 12th Asean Food Conference 2011. Bangkok, Thailand: PF-179.

Stamets, P. (1993). Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms.

Sugiyama, K., T. Akachi, *et al.* (1995). Eritadenine-induced alteration of hepatic phospholipid metabolism in relation to its hypocholesterolemic action in rats. *Nutritional Biochemistry* **6**: 80-87.

Tang, Y.-J. y J.-J. Zhong (2003). Scale-up of a liquid static culture process for hyperproduction of ganoderic acid by the medicinal mushrooms *Ganoderma lucidum*. *Biotechnology Progress* **19**: 1842-1846.

Tang, Y.-J., L.-W. Zhu, *et al.* (2007). Submerged culture of mushrooms in bioreactors - challenges, current state-of-the-art, and future prospects. *Food Technology and Biotechnology* **45**(3): 221-229.

Tepwong, P. y T. Ohshima (2009). Biosynthesis of ergothioneine during different stages of submerged fermentation of "shiitake" (*Lentinus edodes*) mushrooms and their bioactive properties. *Journal of Bioscience and Biotechnology* **108**: S4-S5.

Thomas, P. R. y R. Eart (1994). Enhancing the food supply. Opportunities in the nutrition and food sciences. Washington, D.C., National Academic Press: 98-142.

Tsvileva, O. M., A. N. Pankratov, *et al.* (2005). Effect of media components on the mycelial film formation in submerged culture of *Lentinus edodes* (Shiitake). *Food Technology and Biotechnology* **43**(3): 227-234.

Turlo, J., B. Gutkowska, *et al.* (2010). Effect of selenium enrichment on antioxidant activities and chemical composition of *Lentinula edodes* (Berk) Pegl. mycelia extracts. *Food and Chemical Toxicology* **48**: 1085-1091.

Turlo, J., B. Gutkowska, *et al.* (2008). Optimizing vitamin B12 biosynthesis by micelia cultures of *Lentinula edodes* (Berk) Pegl. . *Enzyme and Microbial Technology* **43**: 369-374.

Vetchinkina, E. P., N. N. Pozdnyakova, *et al.* (2008). Laccase and lectin activities of intracellular proteins produced in a submerged culture of the xylotrophic basidiomycete *Lentinus edodes*. *Current Microbiology* **57**: 381-385.

Vinokurov, V. A., A. V. Barkov, *et al.* (2010). New methods of manufacturing alternative fuels from renewable feedstock sources. *Chemistry and Technology of Fuels and Oils* **46**(2): 75-78.

Wasser, S. P. (2005). Shiitake (*Lentinus edodes*). *Encyclopedia of Dietary Supplements*. P. M. Coates, M. R. Blackman, G. M. Cragget al. New York, Marcel Dekker: 653-664.

Wasser, S. P. y A. L. Weis (1999). Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms* **1** 1: 31-62.

Wysocki, P. J., M. Mackiewicz-Wysocka, *et al.* (2002). Cancer gene therapy – state-of-the-art. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy* **7**(4): 149-155.

Yang, B. K., D. H. Kim, *et al.* (2002). Hypoglycemic effect of a *Lentinus edodes* exopolymer produced from a submerged mycelial culture. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **66**(5): 937-942.

Yang, G. T. (2009). Research on the processing technique of mushroom steamed bread. *Journal of Anhui Agricultural Sciences* **8**.

Zhang, M., S. W. Cui, *et al.* (2007). Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology* **18**(1): 4-19.

Zhou, X. W., K. Q. Su, *et al.* (2012). Applied modern biotechnology for cultivation of *Ganoderma* and development of their products. *Applied Microbiology and Biotechnology* **93**: 941-963.