



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Comparación de la producción de metabolitos secundarios bioactivos con dos fuentes de carbono en la fermentación líquida de una especie de *Pleurotus* y su uso potencial en un alimento de tipo funcional

Carolina Vega Oliveros

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias, Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Bogotá D.C., Colombia

2016

Comparación de la producción de metabolitos secundarios bioactivos con dos fuentes de carbono en la fermentación líquida de una especie de *Pleurotus* y su uso potencial en un alimento de tipo funcional

Carolina Vega Oliveros

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Directora:

Dr. Sc. Ivonne Jeannette Nieto Ramírez

Línea de Investigación:

Diseño y desarrollo de productos – Alimentos Funcionales

Grupo de Investigación:

Química de Hongos Macromicetos de Colombia - QHM

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias, Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Bogotá D.C., Colombia

2016

Al amor de mi vida, compañero de viaje y amigo incondicional con quien tuve la suerte de casarme.

A mis cuatro padres y hermanos por sus palabras de aliento, sus consejos, confianza, fe y compañía aun en la distancia.

“Que tu alimento sea tu medicina, y que tu medicina sea tu alimento”.

Hipócrates.

Agradecimientos

A mi directora de tesis, Dr. Sci. Ivonne Jeannette Nieto Ramírez por su orientación, preocupación y tiempo dedicado durante el desarrollo de la investigación como el apoyo en mis tiempos de crisis personal, que como otra mamá me ayudó a no rendirme y culminar este trabajo.

A Dr. Ciencias Química Carolina Chegwin Angarita, mujer de fuerza e inteligencia, quien me ayudó a resolver de muchas formas las dificultades que se presentaron a lo largo de este trabajo.

A mi hermano Didier Augusto Vega-Oliveros, el modelo de científico más cercano y que más me ha motivado para lograr este sueño.

A los amigos incondicionales Carolina Gutiérrez y Fabián Rico, personajes que me llenaban de alegría, esperanza, ánimo e ideas para culminar esta investigación.

A Gregorio Medina, técnico profesional del Laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencia y Tecnología – ICTA por su colaboración, conocimiento y sus valiosos consejos.

A Leonardo Bravo y demás compañeros del grupo de Química de Hongos Macromicetos – QHM por toda su colaboración y ánimo.

Al profesor Mario Velásquez del grupo de Bioprocesos del Laboratorio de Ingeniería Química – LIQ y a la profesora Esperanza Torres del laboratorio de Agrobiotecnología en la Facultad de Ciencias Agrarias, por permitirme trabajar en las instalaciones de sus laboratorios y el uso de los equipos para lograr el desarrollo de mi trabajo

Resumen

El carácter nutracéutico de los macrohongos los hace “*per se*” alimentos funcionales para su consumo directo, pero también puede aprovecharse para la obtención de biomasa, cuya adición a una matriz alimentaria lleve a la producción de nutracéuticos con una bioacción específica. Es así, como su cultivo biotecnológico se convierte en la herramienta por excelencia para obtener la producción de una biomasa con el mejor contenido de aquellos bioactivos requeridos, lo que permitirá su empleo como ingrediente en la formulación de un alimento con el carácter funcional deseado. Para incursionar en este campo, poco explorado hasta el presente, se realizó esta investigación en la cual, mediante la aplicación de una fermentación en estado líquido (FEL), se cultivó una cepa colombiana de *Pleurotus ostreatus*, empleando salvado de trigo (ST) y harina de maíz amarillo (MA) como fuentes de carbono (FC) no tradicionales, en búsqueda de la que diese una biomasa más promisoría en términos de mayor cantidad y contenido de compuestos con acción hipocolesterolémica comprobada (esteroles y β -glucanos) y explorar la factibilidad de su introducción en un néctar de mango para obtener un nuevo alimento funcional, cuya ingesta reduzca los niveles de colesterol. Los resultados del proceso biotecnológico pusieron de manifiesto que el empleo de MA como FC proporciona la mejor biomasa, ya que la determinación estructural de los bioactivos arrojó como resultado la presencia de esteroles con buena acción hipocolesterolémica dado que sus características estructurales son las reportadas para que se presente dicha acción, así como un buen contenido de β -glucanos. La introducción en la matriz fue aceptable y proporcionó a ésta mayor carácter funcional potencial.

Palabras clave: *Pleurotus ostreatus*, fermentación, alimento funcional, hipocolesterolémico.

Abstract

The nutraceutical character of mushrooms defines them such as functional food for direct consumption "per se" but, they can also be used to obtain biomass that can be addition to a food matrix which leads the production of novel functional food with a specific bio-function. Thus the biotech crop becomes an excellent tool for the production of a biomass with the best content of those bio compounds by handling some of the process parameters, then allowing its use as an ingredient in the formulation of a food with the desired functional character. This research was made to introduce into this unexplored field so far, in which a native strain of *Pleurotus ostreatus* was growth by applying the liquid state fermentation (LSF) using wheat bran (WB) and yellow cornmeal (YC) as non-traditional carbon sources (CS) for seeking the most promising biomass in terms of highest amount of biomass and compounds variety with proven hypocholesterolemic effect (sterols and β -glucans) and to explore the feasibility of its introduction into a mango juice, in order to obtain a new functional food, which reduce cholesterol levels with the intake. The results of the bioprocess showed that the use of YC as CS provides the better biomass profile considering that the structural determination of bio compounds results in the presence of sterols with good hypocholesterolemic action based on researches which report this bio-activity linked to their structural conformation and good content of β -glucans. The introduction into the matrix was acceptable and gave it more potential functional profile.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*, fermentation, functional food, hypocholesterolemic.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XIV
Lista de tablas	XVI
Lista de abreviaturas	XVII
Introducción.....	1
1. Capítulo: La biotecnología, los macrohongos y los alimentos funcionales	5
1.1 Resumen.....	5
1.2 Abstract.....	6
1.3 Alimentos funcionales y Enfermedades Crónicas No Infecciosas.....	6
1.3.1 Enfermedades Crónicas No Infecciosas - ECNI	6
1.3.2 Historia y desarrollo de los Alimentos Funcionales y los Nutraceuticos	8
1.3.3 Alimentos funcionales y su Legislación en Colombia.....	12
1.4 Los Hongos	14
1.4.1 Generalidades.....	14
1.4.2 Las setas.....	15
1.5 Setas comestibles	16
1.5.1 Características nutricionales de las setas	17
1.5.2 Características funcionales de las setas	17
1.5.3 Compuestos bioactivos fúngicos.....	19
1.6 Género Pleurotus	24
1.6.1 Biología	25
1.6.2 Propiedades nutricionales	25
1.6.3 Propiedades medicinales.....	29
1.6.4 Producción Biotecnológica	30
1.6.5 Factores que inciden en la producción de biomasa fúngica por FEL.....	31
1.6.6 Hongos Macromicetos y Alimentos Funcionales.....	34

1.7	Conclusiones	38
2.	Capítulo: Selección de la fuente de carbono adecuada para la mejor producción de biomasa	39
2.1	Resumen	39
2.2	Abstract.....	40
2.3	Introducción	40
2.4	Materiales y Métodos	42
2.4.1	Cepas:.....	42
2.4.2	Fermentación Superficial - FeSup:	43
2.4.3	FEL:	43
2.5	Resultados y Discusión.....	44
2.5.1	FeSup y Crecimiento apical	44
2.5.2	FEL	50
2.6	Conclusiones	51
3.	Capítulo: Determinación del carácter funcional de la biomasa fúngica obtenida biotecnológicamente	53
3.1	Resumen	53
3.2	Abstract.....	54
3.3	Introducción	54
3.4	Materiales y Métodos	57
3.4.1	Cepas:.....	57
3.4.2	FEL:	58
3.4.3	Determinación estructural y de contenido de esteroides	58
3.4.4	Determinación del contenido de polisacáridos y β -glucanos	59
3.5	Resultados y Discusión.....	60
3.5.1	Confirmación, con base en la producción de bioactivos triterpenoidales, de la FC seleccionada	60
3.5.2	Determinación cuantitativa de esteroides.....	61
3.5.3	Determinación del contenido de polisacáridos y β -glucanos	62
3.5.4	Determinación estructural de esteroides y compuestos triterpenoidales	63
3.6	Conclusiones	70
4.	Capítulo: Potencial de la biomasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> nativo en la elaboración de un prototipo de alimento funcional mediante su inclusión en una matriz alimentaria	71
4.1	Resumen	71

4.2	Abstract	72
4.3	Introducción.....	72
4.4	Materiales y Métodos.....	74
4.4.1	Cepas:	74
4.4.2	FEL:.....	74
4.4.3	Cuantificación de compuestos bioactivos	74
4.4.4	Formulación del alimento	75
4.4.5	Análisis de control de calidad del alimento:	76
4.4.6	Evaluación Sensorial	76
4.5	Resultados y Discusión	77
4.5.1	Cuantificación de los compuestos bioactivos y su aporte al alimento funcional 77	
4.5.2	Control de Calidad del alimento.....	80
4.5.3	Análisis Sensorial:	81
4.6	Conclusiones	84
5.	Conclusiones Generales y Perspectivas.....	85
5.1	Conclusiones Generales	85
5.2	Perspectivas	86
A.	Anexo: Compuestos triterpenoidales de <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivado en harina de maíz amarillo	87
B.	Anexo: Formato de Evaluación del néctar de mango.....	91
	Bibliografía.....	93

Lista de figuras

Figura 1-1. Línea de tiempo con los antecedentes más importantes de los Alimentos Funcionales. Figura realizada por el autor.	9
Figura 1-2. Breve reseña legislativa relacionada con alimentos especiales en Colombia. Figura realizada por el autor	13
Figura 1-3. Árbol filogenético que muestra el origen polifilético de los hongos (recuadros sombreados) y sus relaciones con otros reinos (Cepero de García et al., 2012).	14
Figura 1-4. Morfología y partes de las setas.	16
Figura 1-5. A y B. Estructura base de los glucanos, tomado de.....	20
Figura 1-6. A – C: polisacáridos de origen fúngico más estudiados	21
Figura 1-7. A: ácido linoleico, B: ácido linolénico. Tomado de: http://iquimicas.com/chia-composicion-quimica-beneficios/	22
Figura 1-8. A – C: Flavonoides y esteroides de origen fúngico más estudiados	23
Figura 1-9. Imágenes representativas del género <i>Pleurotus</i>	26
Figura 2-1. Registro fotográfico del crecimiento apical en FeSup para <i>P. ostreatus</i> con ST y MA como fuente de carbono. (Las fotos con “X” corresponden a falta de crecimiento)	44
Figura 2-2. Representación del crecimiento apical diario de <i>P. ostreatus</i> con harina de ST y de MA como fuente de carbono.....	45
Figura 2-3. Representación de la TCA para <i>P. ostreatus</i> con harina de ST y de MA como fuente de carbono	45
Figura 2-4. Esquema del ritmo en el crecimiento.....	49
Figura 2-5. Cinética de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> obtenido por FEL con el empleo de ST y MA como Fuentes de Carbono.....	50
Figura 3-1. Rutas de la biosíntesis de los esteroides iniciando desde el escualeno, junto con los intermediarios y productos finales en hongos (amarillo), plantas (verde) y animales (rojo).	55
Figura 3-2. Extracto (mg) vs. Micelio (g) de <i>P. ostreatus</i> en los sustratos de ST y MA.....	60
Figura 3-3. Producción de biomasa y esteroides en <i>P. ostreatus</i> obtenido por FEL empleando MA como FC	61

Figura 3-4. Producción de biomasa y contenido de polisacáridos totales, β -glucanos y esteroles en <i>P. ostreatus</i> cultivado por FEL empleando MA como FC.	62
Figura 3-5. Cromatograma de los extractos en DCM de la biomasa de <i>P. ostreatus</i> obtenido con el empleo de MA a diferentes días de fermentación.	63
Figura 3-6. Cromatogramas de gases para los extractos en DCM del micelio de <i>P. ostreatus</i> cultivado por FEL con el empleo de MA como FC (A= día 9, B= día 11)	64
Figura 3-7. Espectro de masas del compuesto identificado como Ergost-5,7,22-trien-3 β -ol (ergosterol)	67
Figura 3-8: Descripción del paso final de la síntesis del colesterol a partir de demosterol en el hombre. Tomado de (Zerenturk et al., 2013).	68
Figura 4-1. A. Montaje de la FEL de <i>P. ostreatus</i> en MA en el shaker. B. Micelio filtrado.	77
Figura 4-2. Contenido en porcentaje (%) de polisacáridos totales, β -glucanos, esteroles y proteína en la biomasa obtenida de <i>P. ostreatus</i> por FEL en MA.	77
Figura 4-3. Frecuencia de calificación de los aspectos evaluados para todas las muestras.	82
Figura 4-4. Tratamientos de néctar de mango obtenidos para degustación. De Izquierda a derecha según el contenido de micelio se encuentran 0%, 2,5%, 3,5% y 4,5%.	82
Figura 4-5. Calificación media para parámetros de aceptación de néctares de mango con adición de micelio en diferentes concentraciones.	83

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1. Contenido nutricional de especies de <i>Pleurotus</i> . Tomado de (Khan & Tania, 2012). ...	28
Tabla 2-1. Relación del contenido de constituyentes y de la porción soluble de cada compuesto para las harinas de ST y MA.	47
Tabla 3-1. Cuantificación de biocompuestos y del micelio de <i>P. ostreatus</i> obtenido en FEL empleando como FC a MA.....	62
Tabla 3-2. Compuestos identificados en el micelio de <i>P. ostreatus</i> en FEL con MA con base en sus fragmentaciones características en Espectrometría de Masas.....	65
Tabla 3-3. Estructuras de los compuestos triterpenoidales identificados en el micelio de <i>P. ostreatus</i> obtenido biotecnológicamente (Estructuras tomadas de (Burns & Scroger, 1989).....	66
Tabla 4-1. Contenido de compuestos bioactivos y proteína en miligramos (mg) para 240 mL de néctar de mango ^a	78
Tabla 4-2. Resultados fisicoquímicos y microbiológicos de control de inocuidad para el producto biotecnológico y los cuatro tratamientos de néctar de mango.....	80
Tabla 4-3. Puntaje promedio de los cinco aspectos evaluados para cada tratamiento	81

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>C/N</i>	Relación carbón/nitrógeno
<i>DM2</i>	Diabetes Mellitus tipo II
<i>ECNI</i>	Enfermedades Crónicas No Infecciosas
<i>ECV</i>	Enfermedades Cardio-Vasculares
<i>FC</i>	Fuente de Carbono
<i>FEL</i>	Fermentación en Estado Líquido
<i>FES</i>	Fermentación en Estado Sólido
<i>FeSup</i>	Fermentación Superficial
<i>MA</i>	Harina de Maíz Amarillo
<i>Min.</i>	Ministerio de
<i>PDA</i>	Agar de Papa Dextrosa Agar
<i>rpm</i>	Revoluciones por minute
<i>ST</i>	Salvado de Trigo
<i>TCA</i>	Taza de Crecimiento Apical

Introducción

Uno de los problemas actuales al que se ve abocado el ser humano, debido al agitado ritmo de vida, es la mala nutrición resultante de la ingesta de alimentos no sanos. Siempre se han presentado conflictos entre los esfuerzos para erradicar la mala nutrición y las políticas aplicadas en la prevención de la obesidad. En muchos países en el mundo se ha detectado como resultado de esta problemática dos situaciones evidentes a nivel fisiológico: desnutrición y obesidad. Se estima que la desnutrición es la causa de muerte subyacente en el 45% de las defunciones de menores de 5 años (OMS, 2014). En cuanto a la obesidad se considera seriamente como la epidemia del siglo XXI en el mundo entero, con aproximadamente 1,5 billones de adultos con problemas de sobrepeso y una tercera parte de esta cifra corresponde a personas con obesidad, condición fuertemente asociada a enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo II (DM2) y cáncer, lo que conlleva a un uso considerablemente mayor de los servicios de salud (Conroy, Davidson, & Warnock, 2011).

Frente a la primera situación, los gobiernos lanzan programas de nutrición con la finalidad de introducir alimentos fortificados que permiten llenar los vacíos nutricionales derivados tanto de la falta de leche materna (ya sea porque no se suministra o por deficiencias nutricionales en la madre), como la falta de acceso a alimentos ricos en nutrientes (carnes, lácteos, verduras, etc.) (I.C.B.F., I.N.S., & Profamilia, 2011; OMS, 2014). En el segundo caso, por ejemplo en la obesidad mórbida, se recurre a la farmacoterapia, que implica el suministro de medicamentos como Orlistat, con efectos secundarios fuertes y consecuencias inciertas a largo plazo asociados a su uso, o la Sibutramina, de la cual se demostró presenta problemas de dependencia e induce a múltiples fallas cardiovasculares (James, 2005) por lo que fue retirada del mercado inicialmente por la Unión Europea (Allchurch & Benstetter, 2010) y después en Estados Unidos (Barth et al., 2010) y el mundo para el año 2010.

Los daños colaterales de este tipo de fármacos, han promovido la investigación de otras alternativas, entre ellas los nutracéuticos (Conroy et al., 2011) y nutraceuticos (S. T. Chang & Buswell, 1996; Nieto-Ramirez, Chegwin-Angarita, Atehortúa, & Sepulveda, 2013). Tanto esta enfermedad como el síndrome metabólico y la diabetes se asocian directamente con el aumento a nivel mundial de

aterosclerosis prematura y Enfermedades Cardiovasculares (ECV). Se estima que el presupuesto de la Unión Europea para las ECV es de €196 millones al año, donde aproximadamente la mitad de este dinero se destina a cubrir los costos del cuidado médico (Gylling et al., 2014) y para Colombia, este estimado alcanzó los US\$ 3 billones (COP\$ 569.6 billones) para el año 2010 (Gómez Grosso, 2016).

Una de las posibles maneras de reducir el riesgo de aparición de muchas dolencias o ayudar a su tratamiento es mediante la introducción de “nuevos alimentos” que podrían estar constituidos por productos naturales no utilizados habitualmente o derivados de los mismos y cuyo consumo habitual en la dieta o como suplemento dietario proporcionen al organismo compuestos con acción preventiva o curativa. Bajo esta premisa, las tendencias mundiales sobre el consumo y comercialización de estos productos, entre 2002 y 2008, presentaron un incremento del 173% aprox., impulsando las actividades de bioprospección moderna, mediante el uso de herramientas biotecnológicas (CONPES-, 2011). Es por esto que muchos productos utilizados tradicionalmente con enfoques médicos o alimenticios, hoy en día son objeto de estudio para comprobar y validar las creencias culturales para curar y/o prevenir varios de los padecimientos que aquejan al ser humano.

En los años 90's, se acuñó el término "nutracéutico", asimilado por muchos autores a “alimento funcional”, e incluye sustancias que no son tradicionalmente reconocidas como nutrientes (por ejemplo, vitaminas y minerales), pero que pueden presentar efectos fisiológicos positivos (Conroy et al., 2011). Se conoce que en USA, el mercado de ventas de alimentos funcionales crece a un ritmo del 15% anual y en algunos países europeos, como Holanda, una de cada cuatro personas consume estos productos habitualmente (Chalé, Ancona, & Campos, 2014). Sin embargo, la investigación sobre el posible uso de nutracéuticos en el tratamiento de enfermedades crónicas como la obesidad, es un tema reciente y como tal, todavía queda mucho por investigar (Conroy et al., 2011). Se debe aclarar que el concepto de “Alimentos funcionales” no tiene un status legal o aceptación general, pero es utilizado como definición en la profesión nutricionista, así como los términos “Nutracéuticos” y “Nutricéuticos” son aceptados y entendidos dentro de la comunidad de la ciencia y nutrición, pero no están incorporados en las regulaciones o leyes (P. C. Cheung, 2008).

Dentro de los productos naturales con gran potencial se encuentran los hongos macromicetos, dado que desde tiempos milenarios es bien conocido el protagonismo de ellos en diferentes culturas debido a sus propiedades nutricionales y medicinales, constituyéndose como el alimento funcional por excelencia. Existen cerca de 12000 especies de setas reconocidas y 200 son consideradas como comestibles. En particular, el género *Pleurotus* se cultiva en diferentes países gracias a su gran

adaptabilidad, destacándose algunas especies con propiedades farmacológicas reconocidas (Khan & Tania, 2012). Actualmente el incremento en su aprovechamiento a nivel global, se debe no solo a que son fuente de cantidades relativamente grandes de proteína de alta calidad y de productos bioactivos benéficos para la salud, sino también a que su producción mediante cultivo tradicional puede hacerse directamente desde materiales de desecho lignocelulósico, cuya clase y composición incide directamente en su valor como nutraceutico (Ivonne Jeannette Nieto & Chegwin A., 2010).

Pero, la obtención de los hongos no sólo se puede efectuar mediante cultivo tradicional sino también con el uso de procesos biotecnológicos como la fermentación en estado sólido (FES) y en estado líquido (FEL), siendo esta última la técnica que proporciona la producción de biomasa y/o bioactivos fúngicos en forma rápida y eficiente, ya que permite un mejor control de las variables del proceso y por ende una mayor eficiencia en el mismo (Cohen et al., 2014; Elisashvili, 2012), empleándose actualmente para la obtención de micelio en la industria nutra y nutriceutica.

Si bien la mayoría de los estudios en los que se obtiene mediante FEL micelio de macrohongos las fuentes de carbono empleadas son las convencionales o tradicionales (glucosa, fructosa, y otros mono y disacáridos), en investigaciones adelantadas sobre la producción biotecnológica dentro del grupo de investigación Química de Hongos Macromicetos del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia – sede Bogotá, específicamente sobre fermentación en estado líquido, de especies del género *Pleurotus* se ha determinado que al ser obtenidos empleando en la fermentación fuentes de carbono no tradicionales, no sólo se incrementa la cantidad de biomasa obtenida y por ende la producción de bioactivos sino que permite la biosíntesis de una mayor variedad estructural de los mismos, como es el caso de esteroides y compuestos triterpenoidales (Chegwin-Angarita & Nieto-Ramírez, 2014), metabolitos que exhiben actividad hipocolesterolemica (Bobek, Ozdín, & Galbavý, 1998), incrementando sus propiedades nutriceuticas.

Es por todo lo anterior que reviste gran importancia el efectuar estudios conducentes a lograr el aprovechamiento de los hongos comestibles a través de la biotecnología, con la finalidad de obtener una biomasa con excelente contenido de bioactivos, de manera que puedan ser adicionados a una matriz alimenticia y así obtener un alimento funcional que pueda, en alguna medida, ayudar a resolver el problema de sobrepeso y/o altos niveles de colesterol que aqueja a la población en la actualidad. Así mismo, para apreciar la validez de su aplicación valorar la influencia de la adición del producto biotecnológico en las características organolépticas de la matriz seleccionada.

1. Capítulo: La biotecnología, los macrohongos y los alimentos funcionales

1.1 Resumen

Frente al aumento de las enfermedades de tipo crónico no transmisible, las cuales afectan la calidad y costo de vida dada la premisa de sobrellevar las mismas mediante el uso de medicaciones especializadas, los alimentos funcionales representan una alternativa para minimizar el riesgo de padecer estas afecciones sin limitarse a ser un suplemento dietario considerando que optimizan o corrigen procesos metabólicos en pro de prevenir estas complicaciones. La búsqueda de “compuestos bioactivos” en alimentos con adjudicación popular y tradicional de propiedades medicinales, se ha extendido hasta abarcar los hongos macromicetos, en los que se han encontrado compuestos con acción fisiológica con incidencia en la reducción de las enfermedades crónicas. Ejemplo de estos compuestos son los esteroides, la fibra soluble, los β -glucanos, entre otros. Las propiedades nutraceuticas de los hongos comestibles los posicionan como una alternativa para hacer el debido aprovechamiento mediante su introducción en matrices alimentarias y ampliar el espectro de productos alimenticios con carácter funcional. El género *Pleurotus*, cultivado en diferentes países por su gran adaptabilidad, destaca algunas especies con propiedades farmacológicas reconocidas (*P. florida*, *P. tuber-regium*, *P. pulmonarius*, *P. ostreatus* y *P. eryngii*). Estos hongos constituyen una buena fuente de carbohidratos no-almidones, proteína de buena calidad, minerales y vitaminas, además de su contenido en compuestos bioactivos, posicionándolos como verdaderos alimentos funcionales, pero pobremente utilizados en nuestro país. Conocer su biología, sus métodos de producción y su potencial con miras a la bioprospección, permitirá explorar nuevas alternativas para lograr su adecuada explotación y aprovechamiento

Palabras Clave: alimentos funcionales, macromicetos, *Pleurotus*.

1.2 Abstract

Human longevity has resulted in the increase of non-transmissible chronic diseases type, which affect the quality and cost of living, considering the need of use specialized medications. Functional foods have shown to help this problematic, minimizing the risk of these conditions, not just acting like a dietary supplement only, but optimizing, correcting or supporting metabolic processes to prevent these diseases and other complications. The search for "bioactive compounds" in different raw foods, which have shown medicinal properties according popular or traditional adjudged, has been extended to the study of macromycetes fungi, organisms which have been found compounds with physiological action, with a direct impact in the reduce of the chronic diseases. Example of these compounds are sterols, soluble fiber, β -glucans, and others. The nutraceutical properties of edible mushrooms position them like first option for introducing them into food matrices, allowing expand the range of functional food products, so its biotechnological production become an important search area. The genus *Pleurotus* has a great capability of adaptation, so it grown in different countries, has also some species with recognized pharmacological properties such as *P. florida*, *P. tuber-regium*, *P. pulmonarius*, *P. ostreatus* and *P. eryngi*, they are a good source of non-starched carbohydrates, good quality protein, minerals and vitamins plus their compounds with physiological effects that is the reason to call them "true functional foods", but they have been poorly used in our country. To study and know their biology, looking for the bioprospecting utilization, it will allow to explore new alternatives to achieve its proper exploitation and utilization.

Key words: functional food, macromycetes, *Pleurotus*.

1.3 Alimentos funcionales y Enfermedades Crónicas No Infecciosas

1.3.1 Enfermedades Crónicas No Infecciosas - ECNI

Este concepto hace referencia a los padecimientos crónicos y/o degenerativos, que han surgido como consecuencia de la reducción de la mortalidad y el aumento de la longevidad, lo cual representa un aumento en el promedio de vida mayor a 80 años, con las alteraciones producidas por los hábitos alimenticios y de actividad física (poca o nula), la calidad de alimentos consumidos y factores ambientales y genéticos combinados, lo cual conlleva a la aparición de enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades respiratorias crónicas y la diabetes, sin dejar de lado

enfermedades neurológicas o reumáticas, que alteran significativamente la calidad de vida y son la causa de alrededor del 60% de las muertes y para las cuales aún no existen acciones efectivas de prevención y tratamiento (Uribe & Palacio, 2010). Dentro de este grupo se encuentra la obesidad que es reconocida como una enfermedad epidémica a nivel mundial, pero sin solución hasta el momento. Es considerada el factor de riesgo más importante para desarrollar otras enfermedades no transmisibles como DM2, hipertensión, enfermedad cardiovascular, accidente cerebrovascular, problemas respiratorios, enfermedad de la vesícula biliar, osteoartritis, apnea del sueño y ciertos tipos de cáncer (incluidos los de endometrio, colon, vesícula biliar, próstata, riñón y el cáncer de mama después de la menopausia), por lo cual se le considera un contribuyente importante de la carga mundial de enfermedades crónicas e incapacitantes además de las graves consecuencias sociales y psicológicas (baja autoestima, depresión clínica), en todas las edades y grupos socioeconómicos (Cooke & Bloom, 2006; Naser, Gruber, & Thomson, 2006).

Las principales causas de esta dolencia son el aumento del consumo de alimentos muy calóricos, pobres en nutrientes pero altos en grasas saturadas y azúcares, así como la reducción de la actividad física, lo que conlleva entre otras cosas al aumento de los niveles de colesterol. Salvo casos extremos, el tratamiento de esta enfermedad se basa en cambios de estilo de vida, de dieta y aumento de la actividad física. Sin embargo, estas exigencias y la negación patológica para cumplirlas por parte de la persona afectada, ha llevado al interés de desarrollar otras terapias como cirugía gastrointestinal y farmacoterapia (Cooke & Bloom, 2006).

A falta de soluciones farmacológicas, alternativas de tratamiento como el uso de estatinas han mostrado su eficacia en la disminución del colesterol en sangre, evidenciando disminuciones de 1 mmol/L de colesterol y esto puede reducir la incidencia de 5 años de eventos coronarios mayores, revascularización coronaria y accidente cerebrovascular, patologías que preceden al aumento del colesterol (CTT, 2005) Desgraciadamente, las estatinas sintéticas empleadas en la disminución del colesterol traen efectos secundarios por el uso prolongado como miotoxicidad, dolor muscular y hepatotoxicidad (Chegwin-Angarita, Nieto-Ramírez, Atehortúa, & Sepúlveda A., 2012; Finegold, Manisty, Goldacre, Barron, & Francis, 2014; Moosmann & Behl, 2004).

El tratamiento para estas dos enfermedades ha encaminado la búsqueda hacia los compuestos nutracéuticos, existentes en plantas y hongos. En el caso particular de estos últimos aunque se han encontrado muy buenos resultados con diferentes polisacáridos (glucanos) para el tratamiento de

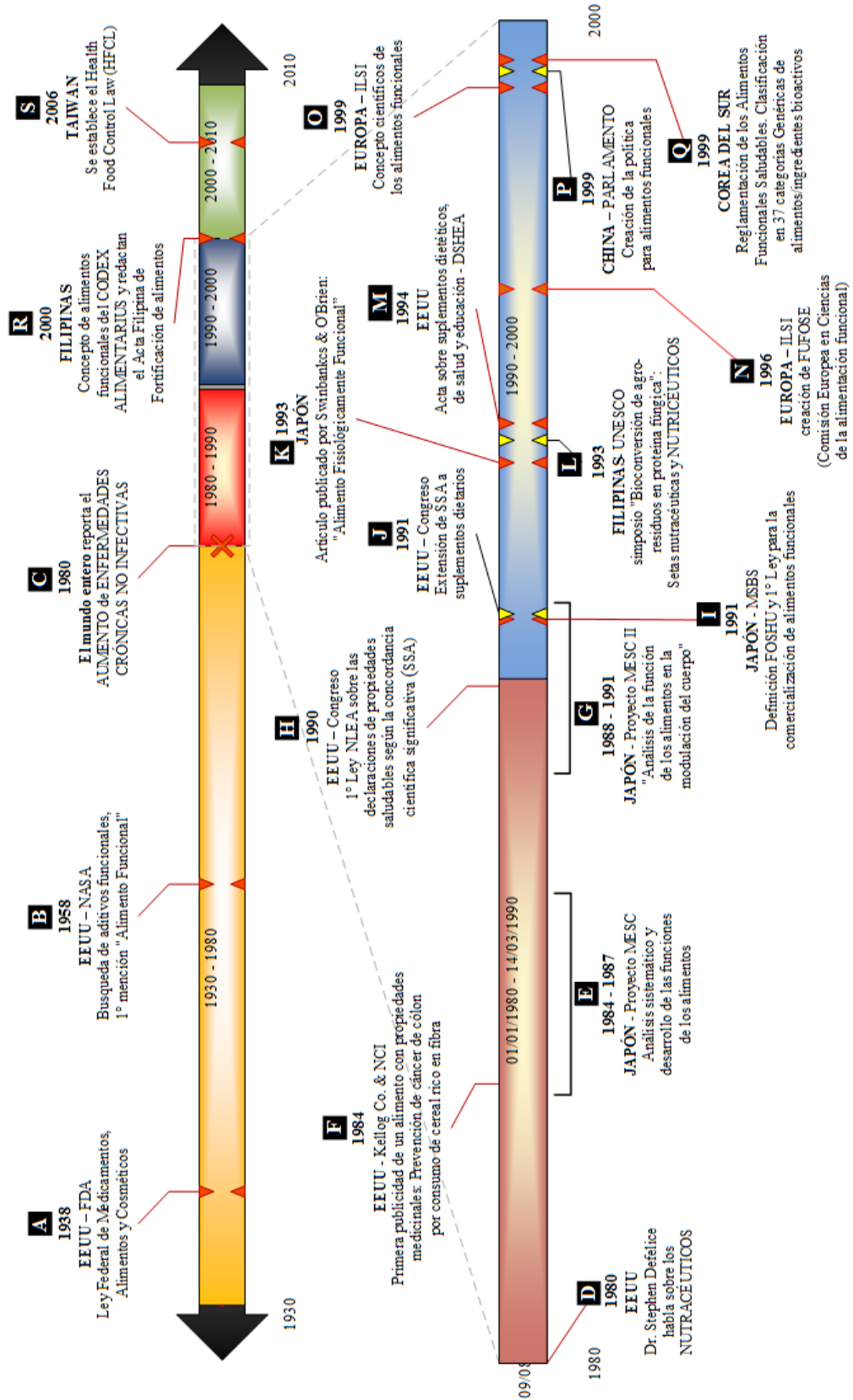
éstas y otras enfermedades (Akinyele, Fakoya, & Adetuyi, 2012; Bae et al., 2005; Bao, Liu, Fang, & Li, 2001; Boh & Berovic, 2007; Bohn & BeMiller, 1995; Carbonero et al., 2006; Chimilovski et al., 2011; do Rosário, Kangussu-Marcolino, do Amaral, Noletto, & Petkowicz, 2011; I Giavasis, 2014; Ioannis Giavasis, 2014; Khan & Tania, 2012; Lindequist, Niedermeyer, & Jülich, 2005; Lull, Wichers, & Savelkoul, 2005; Mantovani et al., 2008; Neelam & Singh, 2013; Pérez-Guisado, 2007; Roupas, Keogh, Noakes, Margetts, & Taylor, 2012), los compuestos tipo esteroides y triterpenos, se encuentran actualmente en la mira ya que han demostrado resultados importantes para reducir el impacto de las enfermedades crónicas no infecciosas (Calpe-Berdiel, Escolà-Gil, Rotllan, & Blanco-Vaca, 2008; P. C. K. Cheung, 1996; Gil-Ramírez, Ruiz-Rodríguez, Marín, Reglero, & Soler-Rivas, 2014; Joseph & Jini, 2013; Maki & Rains, 2011; Mannarino, Ministrini, & Pirro, 2014; Márquez-Fernández, Juárez Pacheco, & Trigoso, 2014; Perez G, Perez G, Perez G, & Zavala S, 1998; Schneider et al., 2011; Thompson & Grundy, 2005), motivo por el cual se ha incentivado las investigaciones para obtener su aislamiento y evaluar su potencial uso como suplementos o su inclusión en alimentos de tipo nutracéutico o funcional.

1.3.2 Historia y desarrollo de los Alimentos Funcionales y los Nutracéuticos

Los beneficios de los alimentos y de los productos naturales han sido reconocidos en el continente asiático por siglos. Plantas, nueces, sésamo, té y lirios ya se utilizaban en la antigua China para prevenir y tratar diferentes enfermedades como parte de la medicina tradicional. Se dice que Shen Nong (el granjero divino) descubrió las propiedades medicinales de la bebida de té hace 5000 años (Saarela, 2011).

Con estos antecedentes y ante el reto de los viajes espaciales de larga duración, en USA se desarrollaron inicialmente alimentos de alta densidad nutricional (aquellos que proveen cantidades significativamente altas de nutrientes por un número de calorías relativamente bajo), trabajando compuestos de tipo “aditivo funcional”: conservantes y fuente de calorías para el hombre. Se mencionan por primera vez los “alimentos funcionales” en 1938 (Figura 1-1, B) (Dymsza, 1975).

Figura 1-1. Línea de tiempo con los antecedentes más importantes de los Alimentos Funcionales. Figura realizada por el autor.



Hacia la década de los 80's, ante el aumento a nivel mundial de las ECNI, se adopta como un tema de salud pública y se da inicio a los planes de mejora alimentaria (Figura 1-1, C). En Japón se impulsó el proyecto MESC (Ministerio de educación, ciencia y cultura, por sus siglas en inglés), para mejorar el estatus de salud y reducir los costos por gastos médicos (Figura 1-1, E) (Saarela, 2011), y se propuso el concepto "alimento funcional" en un contexto moderno. Un segundo proyecto (Figura 1-1, G) llevó a cabo investigaciones científicas importantes involucrando profesionales médicos y de las ciencias de los alimentos (Arai, 2002).

El término "alimento fisiológicamente funcional", aparece formalmente en el journal "Nature" (Figura 1-1, K) con el título 'Japón explora la frontera entre alimentos y medicamentos'. Se obtuvieron resultados sobre nuevos fitoquímicos con efecto anticancerígenos, hipoglicemiantes, quimiopreventivos, antioxidantes y antivirales. Se encontraron factores para la defensa del cuerpo, modulación corporal, alérgenos en alimentos y contramedidas (Arai, 2002).

El primer alimento para uso en salud en Japón (food for health use – FOSHU) fue un arroz hipoalérgico llamado "Fine rice", tratado por hidrólisis enzimática de proteínas para retirar alérgenos propios que provocaban dermatitis atópica por su consumo. Posteriormente el Ministerio Japonés de Salud y Bienestar Social (MSBS), estableció la primera política de ley en el mundo que permitía la comercialización de alimentos funcionales, seleccionados en términos de FOSHU y las condiciones para lograr este sello (Figura 1-1, I), dando inicio a la producción de alimentos funcionales maximizando factores funcionales benéficos, mediante la aplicación de tratamientos enzimáticos y/o ingeniería genética para minimizar los no benéficos (Arai, 2002).

A la par con el estudio de fitoquímicos, el estudio de hongos y setas utilizados en los remedios orientales tradicionales para diversos trastornos fisiológicos, permitieron el reconocimiento de numerosos modificadores de la respuesta biológica y se acuñó el término de "setas nutraceuticas" en reconocimiento de los beneficios estudiados. Igualmente se establece la definición de "nutricéuticos" haciendo referencia a una nueva clase de compuestos extraíbles, ya sea del cuerpo fructífero (la seta), micelio o esporas, que encarnan características nutricionales y medicinales (Figura 1-1, L) (S. T. Chang & Buswell, 1996).

En China, de manera tardía se establecen los parámetros para la aprobación legal de estos alimentos (Figura 1-1, P), aun cuando en Hong Kong no hay una definición aceptada universalmente. En Corea

del Sur, se acuñó el término “Alimentos funcionales saludables”. (Figura 1-1, Q). En Taiwán se adoptó una posición similar a la de China y los alimentos con beneficios para la salud se denominan “Alimentos Saludables” (Figura 1-1, S). Las Filipinas tomaron el concepto del Codex Alimentarius e incluyen los alimentos fortificados (Figura 1-1, R). Otros países asiáticos aun no tienen clara la definición ni las regulaciones para los alimentos funcionales, reflejando la tradición oriental sobre que la medicina y los alimentos comparten un origen común (Arai, 2002; Saarela, 2011).

El movimiento asiático promovió en Europa la iniciativa FUFOSE (Figura 1-N). Expertos en nutrición y ciencias afines, coordinados por el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (ILSI), determinaron “Los conceptos científicos de los alimentos funcionales (Figura 1-1, O): Un alimento puede considerarse como funcional si se demuestra satisfactoriamente que afecta beneficiosamente una o más funciones diana en el cuerpo, más allá de los efectos nutricionales adecuados, de una manera que es relevante ya sea para mejorar la salud y el bienestar y/o reducir el riesgo de enfermedad. Un alimento funcional debe seguir siendo alimento y debe demostrar sus efectos en cantidades que normalmente se puede esperar que se consuma en la dieta. No es una píldora o una cápsula, sino que forma parte del patrón de comida normal” (Chalé et al., 2014; M B Roberfroid, 2002; Marcel B Roberfroid, 2002).

En USA, inicialmente los productos eran regulados por la FDA, clasificados por su uso previsto según lo dictado por la Ley Federal de 1938 de Medicamentos, Cosméticos y Alimentos [FFDCA 21 USC §321 (g) (1) (B), 1938] (Figura 1-1, A). Si un alimento especificaba una relación con una condición de salud, el uso previsto del producto cambiaba a fármaco y debía someterse a la revisión de la FDA (Berhaupt-Glickstein, Nucci, Hooker, & Hallman, 2014).

La influencia asiática impulsó la Fundación para la Innovación en Medicina (FIM) en Cranford – NJ, la cual acuñó el término “nutracéutico” a partir de las palabras “nutrición” y “Farmacéutico” (Figura 1-1, D), definido como un alimento (o parte de un alimento) que proporciona beneficios médicos o de salud, incluyendo la prevención y/o tratamiento de una enfermedad, término que en la actualidad se utiliza industrialmente sin definición reglamentada (Brower, 1998; Kalra, 2003).

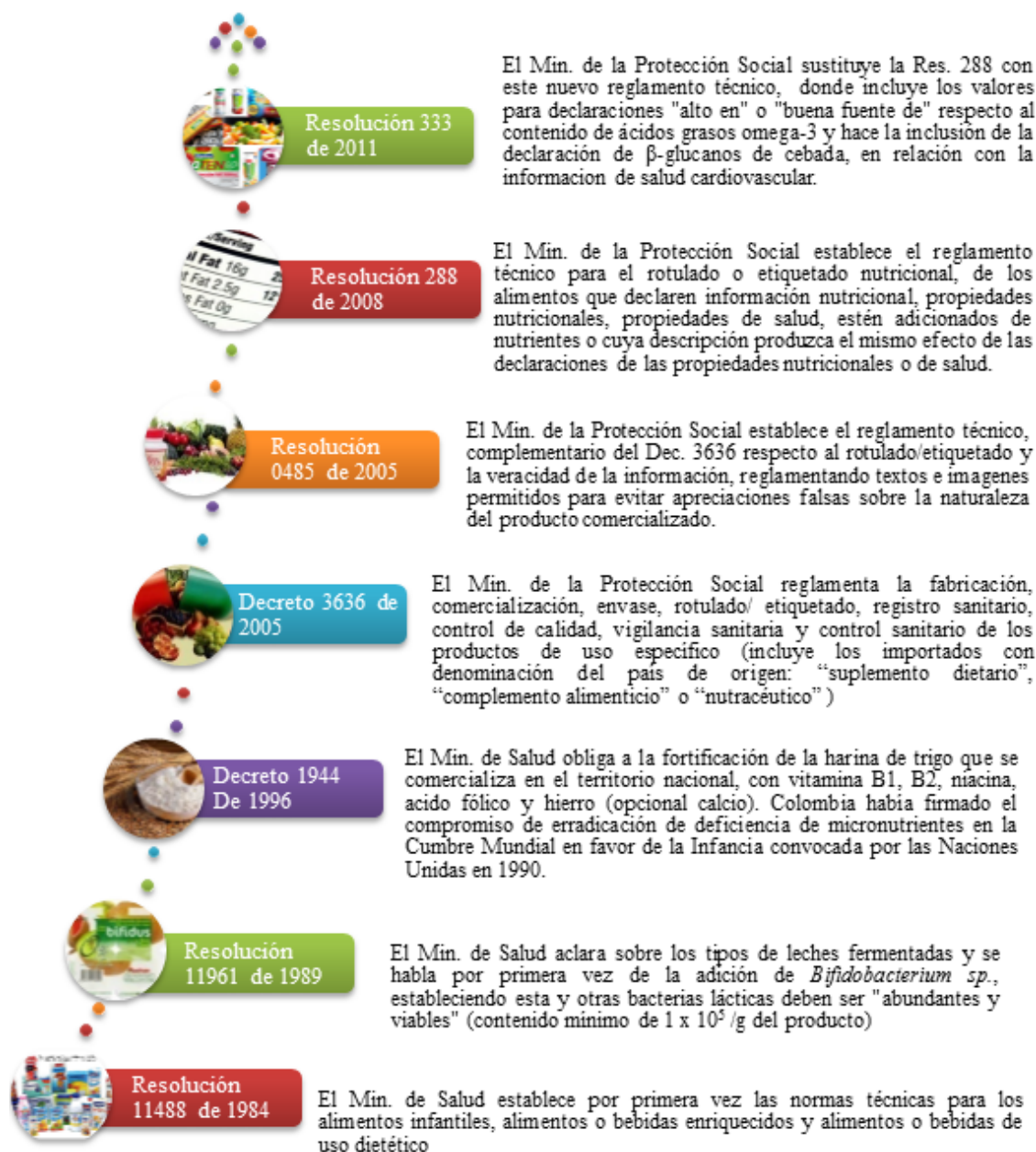
Posteriormente el marco regulatorio de la FDA fue desafiado por la compañía Kellogg y el Instituto Nacional del Cáncer (NCI, por sus siglas en inglés) con la campaña publicitaria que promovía tener una dieta baja en grasa y alta en fibra (consumiendo el cereal “All Bran®”) para prevenir el cáncer

de colon. Dado que la publicidad fue declarada oficialmente “No Engañosa” (Berhaupt-Glickstein et al., 2014) el Congreso modificó la FDCA 1938 con la Ley de Etiquetado Nutricional y Educación (NLEA) (Figura 1-1, H), para supervisar las declaraciones de propiedades saludables, bajo el criterio de “concordancia científica significativa” (Figura 1-1, J) (Berhaupt-Glickstein et al., 2014) y evitar que "suplementos dietéticos" promovieran en su etiqueta funcionar como tratamiento médicos (Giunta, Basile, & Tibuzzi, 2010). La tendencia de los nutraceuticos introdujo una nueva ley con un nuevo marco regulador para la seguridad y el etiquetado de los suplementos dietéticos (Figura 1-1, M) (Giunta et al., 2010) y estableció un protocolo de desarrollo de estos que incluyó identificar y caracterizar los compuestos activos, biodisponibilidad y efectos del procesamiento en ellos, la modulación de procesos biológicos, biomarcadores para evaluar los productos en ensayos clínicos, identificar los posibles beneficios por su consumo (Chalé et al., 2014; M B Roberfroid, 2002).

1.3.3 Alimentos funcionales y su Legislación en Colombia

El concepto de nutraceutico y alimento funcional ha llegado de manera tímida a nuestro país y las regulaciones no son tan claras como sucede en otros países. A continuación, se hace una breve revisión sobre el desarrollo de normatividad a medida que llegan los nuevos conceptos, con referencia al tema con el nombre de “alimentos especiales” (Figura 1-2).

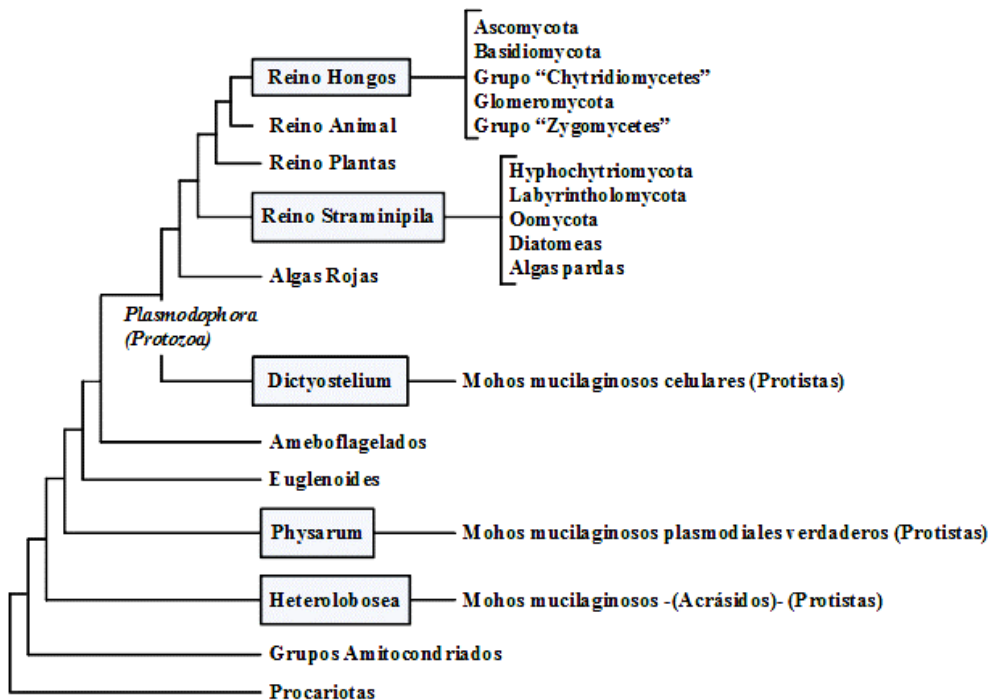
Figura 1-2. Breve reseña legislativa relacionada con alimentos especiales en Colombia. Figura realizada por el autor



1.4 Los Hongos

Los **hongos** (palabra escrita en minúscula, en referencia a los Hongos verdaderos y similares), son los organismos estudiados por los micólogos que fueron clasificados inicialmente en el reino vegetal. Posteriormente Whitaker en 1969 los separó formalmente en un quinto reino llamado Fungi y que en la actualidad se distribuyen en tres reinos: I) Hongos o Fungi (con mayúscula, Hongos verdaderos propiamente), II) Chromista o Straminipila, III) Protozoa, todos dentro del dominio Eukarya (Cepero de García et al., 2012).

Figura 1-3. Árbol filogenético que muestra el origen polifilético de los hongos (recuadros sombreados) y sus relaciones con otros reinos (Cepero de García et al., 2012).



1.4.1 Generalidades

Con las actuales técnicas moleculares, se ha podido hacer un ajuste respecto a las relaciones filogenéticas de este grupo, reconociendo que se dividen en tres reinos y su relación con los otros reinos (Figura 1-3). Las características del grupo de los hongos son (Cepero de García et al., 2012):

- Celularmente: comparte las características de los organismos eucariontes (membrana nuclear, organelos rodeados de membrana, uno o dos nucléolos dentro del núcleo, poseen cromosomas)

- Nutricionalmente: pueden ser heterótrofos (fuente de energía a partir de carbohidratos complejos) o quimiorganotrofos (compuestos orgánicos preformados), toman nutrientes por absorción, poseen digestión extracelular por degradación con exo-enzimas (Hongos) o por engolfamiento por fagocitosis de nutrientes (Protozoa), principalmente saprótrofos (materia orgánica muerta), también se observan simbiosis mutualistas, parasitismo biótrofo, necrótrofo o facultativo.
- Respiración aerobia principalmente (pocas especies son facultativas o anaerobias estrictas)
- No móviles. Sólo presentan flagelos las zoosporas y planogametos de los Hongos Chytridiomicota o de los Straminipila Oomycota
- Fase somática o vegetativa: Unicelular (levaduras), Filamentosa (mohos), Plasmodial (*slime molds*), Dimórficos unicelular-filamentoso (patógenos del hombre)
- La reproducción puede ser sexual, asexual o parasexual.

1.4.2 Las setas

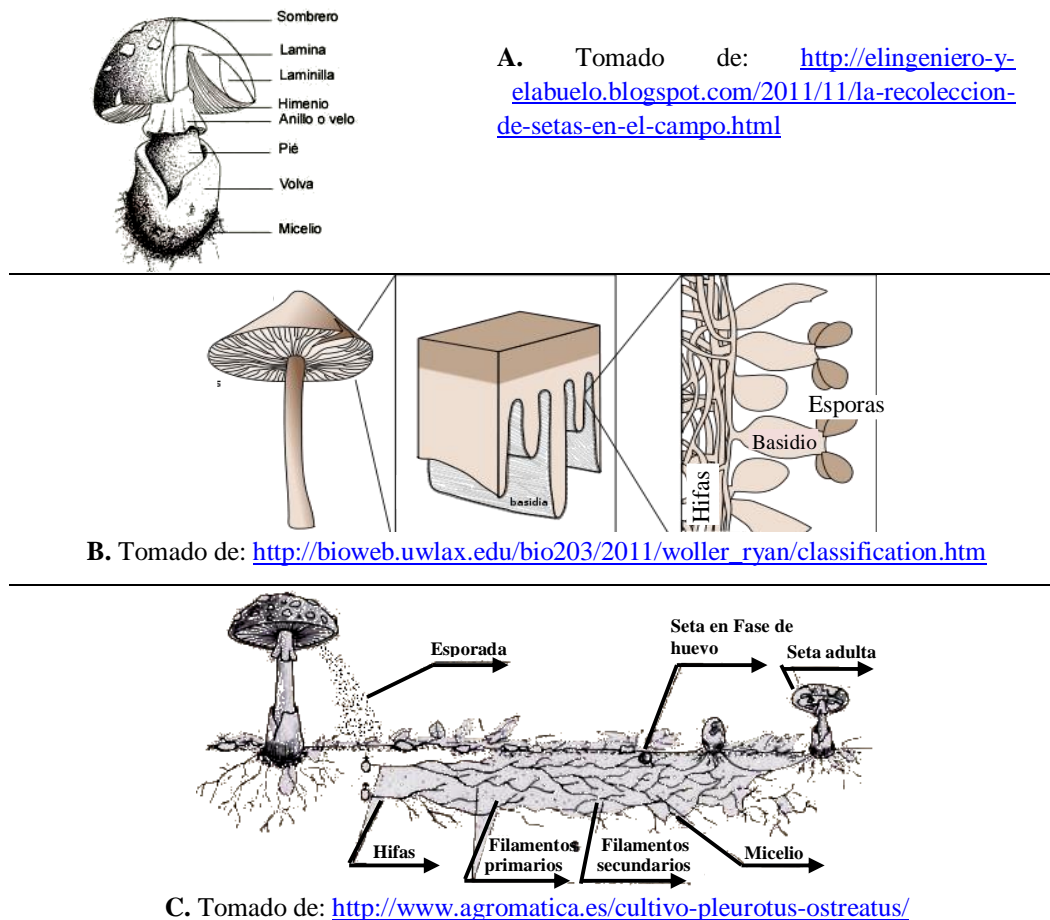
Una seta es un hongo macromiceto, con un cuerpo fructífero o esporocarpo distintivo que puede ser epigeo (estar encima del suelo) o hipogeo (estar bajo tierra) y lo suficientemente grande como para ser visto a simple vista y para ser recogida a mano (S.-T. Chang, Miles, & Press, 2004). Los esporocarpos pueden tener diversas formas, llegando a tomar morfologías similares por diferentes eventos de convergencia evolutiva (Hibbett, 2004), por lo cual encontramos setas similares que pertenecen tanto a los Basidiomicetes como a los Ascomicetes, pueden ser aéreas o crecer bajo la tierra, presentar textura o no carnosa, ser o no comestibles (S.-T. Chang et al., 2004).

Al hablar de setas, comúnmente se piensa en la típica forma de paraguas con píleo y estípite, algunas especies cuentan con un annulus (anillo) y una volva (copa), (Figura 1-4, A), El esporocarpo constituye la estructura que desarrolla el hongo para producir esporas y que se desarrolla por temporadas o estaciones (Figura 1-4, B), cuando las condiciones externas son adecuadas. El hongo verdadero se compone de hifas, que se ramifican a través del sustrato formando el micelio lo cual corresponde a la parte vegetativa del hongo (S.-T. Chang et al., 2004), (Figura 1-4, C).

Muchas setas son utilizadas para la alimentación (setas comestibles), otras se aplican en biorremediación y biotransformación. Como ejemplos de esto están *Hypsizygus tessulatus* o *Grifola frondosa* que pueden transformar residuos vegetales en biomasa comestible (Petre, Petre, & Dută, 2014; Sihanca Mendoza, 2011), *Hericiium erinaceus* y *Morchella esculenta* producen micelio con

harinas de cereal (F. Cui et al., 2010)(Taskin, Erdal, & Genisel, 2011) y esta última para producir hidrolasas (Martin, 1982). Especies de *Pleurotus* (*P. eryngii*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* y *P. sajor-caju*) secretan peroxidasas, lacasas y enzimas lignolíticas versátiles para la oxidación de compuestos aromáticos fenólicos y no fenólicos, aminas aromáticas y pueden prevalecer, biorremediar y deslignificar (Rodríguez, Nuero, Guillén, Martínez, & Martínez, 2004).

Figura 1-4. Morfología y partes de las setas.



A. Partes de una seta. B. Organización de los basidios y las basidiosporas en el himenio. C. Proceso de formación de micelio a partir de las basidiosporas.

1.5 Setas comestibles

La característica de comestibilidad de las setas es reconocida por los seres humanos desde tiempos inmemoriales, pero el cultivo intencional de las setas tuvo su comienzo, según registros, en China alrededor del año 600 D.C., con el hongo *Auricularia auricula*. Hoy en día se conocen cerca de 7000

especies que poseen diferentes grados de comestibilidad y más de 3.000 especies pueden ser consideradas especies principales comestibles, de las cuales sólo 100 son cultivadas con fines económicos (S.-T. Chang et al., 2004). En el caso de los hongos comestibles, se ha demostrado sus propiedades medicinales o funcionales en los géneros *Lentinus*, *Hericium*, *Grifola*, *Flammulina*, *Pleurotus* y *Tremella* (Carbonero et al., 2006) y se han obtenido productos a partir de ellos denominados suplementos dietéticos, nutraceuticos, y nutriceuticos (S.-T. Chang et al., 2004).

1.5.1 Características nutricionales de las setas

La materia seca del cuerpo fructífero de las setas es de alrededor el 5-15% del peso total del hongo. Tiene bajo contenido de grasa y alrededor de 19–35% de contenido de proteína de alta calidad dado que contiene los aminoácidos esenciales. Los cuerpos fructíferos de las setas son también ricos en vitaminas, principalmente B1, B2, C, y D2 y contiene elementos como K y P (A Synytsya, Míčková, Jablonský, Sluková, & Čopíková, 2008). El contenido de carbohidratos está en el rango de 50-90% del peso seco y contiene principalmente glicoproteínas y polisacáridos de tipo quitina, α y β -glucanos y otras hemicelulosas (mananos, xilanos, galactanos), con un 13 a 28% de carbohidratos disponibles. La mayoría de los polisacáridos presentes son glucanos lineales y ramificados con diferentes tipos de enlaces glicosídicos, tales como (1-3) y (1-6) β -glucanos y (1-3): α -glucanos, pero solo algunos son heteroglicanos verdaderos que contienen arabinosa, manosa, fucosa, galactosa, xilosa, glucosa y ácidos glucurónicos como principales componentes de la cadena lateral (A Synytsya et al., 2008; Wasser & Weis, 1999), lo cual puede llegar a representar del total de contenido de fibra dietaria (38 a 40%) un 5 a 7% de fibra soluble y del 93 y 95% de fibra insoluble (Heleno et al., 2015).

1.5.2 Características funcionales de las setas

Estudios realizados sobre el efecto de la incorporación a la dieta de setas evidencian un mejoramiento en la salud como consecuencia de la reducción de la grasa corporal, acción producida por la característica que poseen de ser bajas en calorías, sodio, grasa y colesterol, como también el que están compuestas principalmente de proteína, fibra (soluble e insoluble), carbohidratos asimilables, vitaminas y minerales (Aida, Shuhaimi, Yazid, & Maaruf, 2009).

Sin embargo, no son estos componentes los responsables del carácter nutriceutico sino aquellas sustancias biosintetizadas tanto en las setas, como en el micelio cultivado y en el medio de cultivo

agotado, las cuales presentan un total de 126 diferentes acciones biológicas y funciones medicinales, incluyendo la antitumoral, inmunoestimuladora, inmunomoduladora, antioxidante, captadora de radicales libres, cardiovascular, hipocolesterolémica, hipoglicemiante, antiviral, antibacterial, antiparasítica, antifúngica, detoxificante, hepatoprotectora, y muchísimos otros efectos (Cohen et al., 2014), lo cual ha marcado su empleo en suplementos dietarios o como medicamentos (Andriy Synytsya et al., 2009), permitiendo su clasificación como nutracéuticos (S. T. Chang & Buswell, 1996; S.-T. Chang et al., 2004).

Los macromicetos con más estudios al respecto y con alta demanda de consumo por sus propiedades son *Ganoderma lucidum* (Reishi), *Lentinula edodes* (Shiitake) y *Schizophyllum sp.*, hongos que se han consumido por siglos en Corea, China, Japón y el este de Rusia (Andriy Synytsya et al., 2009). Se ha reportado que la aplicación de los extractos crudos de Reishi, mostraron propiedades anticancerígena *in vitro* contra líneas celulares de cáncer tipo leucemia, linfoma, seno, vejiga humana, próstata, hígado y mieloma, con mecanismos de acción que incluyen inhibición de la proliferación celular, inducción de la apoptosis, detención del ciclo celular, inhibición del comportamiento invasivo y supresión de la angiogénesis tumoral (Aida et al., 2009). Otras investigaciones han demostrado que las setas comestibles, contienen compuestos de indol no alucinógenos y derivados que cumplen roles de neurotransmisores o de precursores, exhibiendo además actividad antioxidante, anticancerígena, antienvjecimiento, antiinflamatoria y analgésica. Además, contribuyen a la regulación del ciclo diario en humanos y participan en el proceso de coagulación de la sangre (Muszyńska & Sułkowska-Ziaja, 2012).

Con relación a *L. edodes*, éste 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. 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, D., Sobal, M., Morales, P., Martínez, W., Martínez, M., Mayett, 2004). Otros autores reportan que una dosis entre 150 y 300 mg de micelio diario mejoran el sistema inmune y combatir el cáncer (Donatini, 2010).

1.5.3 Compuestos bioactivos fúngicos

Desde 1980 el número total de metabolitos secundarios microbianos, reconocidos por su bioactividad, ha venido duplicándose cada 10 años y más del 38% son de origen fúngico. (Aida et al., 2009; Akinyele et al., 2012; Arora, Goyal, Balani, & Tandon, 2013; Asatiani, Elisashvili, Wasser, Reznick, & Nevo, 2007; S. T. Chang & Buswell, 1996; S.-T. Chang et al., 2004).

Como ya se ha evidenciado, nutricionalmente las setas comestibles poseen un sinnúmero de compuestos benéficos, pero son sus bioactivos los que despiertan el interés por el valor agregado que ofrecen unido a las diferentes opciones de producción de estos metabolitos (Ioannis Giavasis, 2014; Gregori, Švagelf, & Pohleven, 2007; Khan & Tania, 2012). A continuación, se describen los bioactivos de mayor distribución en los hongos.

- Polisacáridos:

A esta clase de compuestos pertenecen los polisacáridos y glicoproteínas, compuestos biosintetizados por la mayoría de los hongos. Los polisacáridos fúngicos más abundantes son la quitina, hemicelulosa, β y α -glucanos, mananos, xilanos y galactanos (Andriy Synytsya et al., 2009).

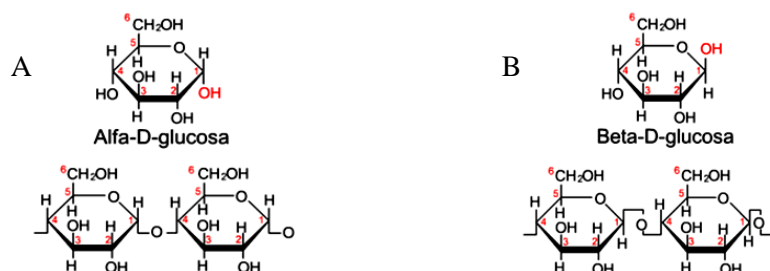
Estos compuestos son los principales responsables de las actividades anticancerígena e inmunomoduladora atribuidas a los hongos. Los polisacáridos fúngicos se describen con frecuencia como "modificadores de la respuesta biológica" (BRM's por sus siglas en inglés). Poseen la capacidad de desencadenar una reacción no específica, por lo general del sistema inmune, y estas reacciones pueden ir dirigidas contra células tumorales, infecciones virales o bacterianas e inflamaciones. Provocan también el aumento de la síntesis de las hormonas y de células del sistema inmune del huésped. Se ha descrito su capacidad para reducir los niveles de colesterol y azúcar en la sangre, actuando como fibras dietéticas no digeribles, y también actúan como antioxidantes y eliminadores de radicales libres, como moléculas hepatoprotectoras y desintoxicantes (Ioannis Giavasis, 2014).

Sus propiedades antitumorales difieren grandemente con su composición química y su configuración, así como en las propiedades físicas tales como solubilidad en agua, tamaño de las moléculas, grado de ramificación y la forma (Andriy Synytsya et al., 2009). El estudio de los mecanismos de su acción biológica han puesto de manifiesto el papel que cumplen en la terapia contra el cáncer, la estimulación del sistema inmune, actividad profiláctica contra la

quimioterapia/radioterapia, actividad antimicrobiana, y su potencial para regular y prevenir la hiperglucemia y la hipercolesterolemia (Ioannis Giavasis, 2014).

Dentro de los polisacáridos se diferencian dos grupos: los estructurales o Intrapolisacáridos (IPS) y los excretados por el microorganismo al medio exterior o Exopolisacáridos (EPS). Los EPS son polímeros de monosacáridos (>20) de alto peso molecular, sintetizados intracelularmente y posteriormente excretados. Generalmente se tratan de glucanos o polisacáridos no celulósicos fúngicos, presentes principalmente como unidades de glucosa lineales y ramificadas con diferentes tipos de enlaces glicosídicos, tales como (1–3) y (1–6) - β -glucanos (Figura 1-5A) y (1 – 3) - α -glucanos (Devi et al., 2013; Jeong et al., 2013; M. Patel, Patel, & Gupte, 2014; Silveira et al., 2015; Smiderle et al., 2012; A Synytsya et al., 2008) (Figura 1-5B).

Figura 1-5. A y B. Estructura base de los glucanos, tomado de <http://www.plantasyhongos.es/glosario/glucano.htm>

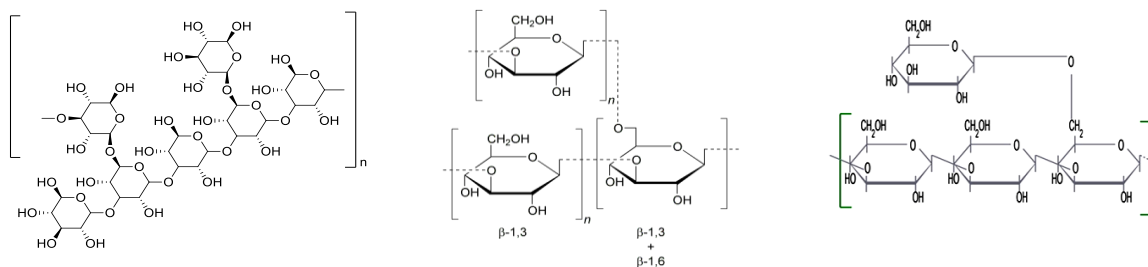


Algunos son heteroglicanos verdaderos que contienen ácido glucurónico, xilosa, galactosa, manosa, arabinosa o ribosa. La acción de estos heteroglicanos como fibra dietaria, soluble e insoluble, es similar a la presentada por polisacáridos encontrados en otros alimentos (Andriy Synytsya et al., 2009).

Los seis polisacáridos de origen fúngico más estudiados son Lentinan, Schizophyllano, Polisacárido-K, Polisacárido-P, Compuestos Activos Correlacionados con Hexosa (AHCC por sus siglas en inglés) y la fracción D de Maitake, debido a sus resultados significativos contra diferentes líneas de cáncer humano *in vitro* como HL-60 de leucemia y cáncer de colon, e *in vivo* se evidenció la reducción de tumores de tipo Sarcoma 180 intraperitoneal en roedores, no por efecto citotóxico directo sino por mediación inmunológica (S.-T. Chang et al., 2004; Devi et al., 2013; Silveira et al., 2015).

El Lentinan es un glucano biosintetizado por la seta Shiitake, conformado por una cadena principal de residuos de β -(1,3)-D-glucosa, a la cual se unen grupos laterales de β -(1,6)-D-glucosa -una ramificación cada tercera unidad principal- y un promedio de peso molecular 500,000 Da., (Figura 1-6, A). El sizofiran o schizophyllano es producido por la seta *Sch. commune*, de conformación química similar a la del Lentinan, posee conformación triple helicoidal, peso molecular entre 100,000–200,000 Da. (Figura 1-6, B). Estos dos polisacáridos han demostrado eficacia en el tratamiento de cáncer gástrico, de mama, de pulmón, de cuello uterino y de colon, en combinación con fármacos antineoplásicos convencionales, sin exhibir citotoxicidad directa contra las células cancerosas. Igualmente, contribuyen a la prevención de la metástasis, a la reducción de los efectos secundarios de la quimioterapia – radioterapia e inducen el incremento de la mitosis de las células de médula ósea, después de la supresión por medicamentos contra el cáncer (I Giavasis, 2014).

Figura 1-6. A – C: polisacáridos de origen fúngico más estudiados



A. Lentinan. Tomado de <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lentinan2D.png>

B. Sizofiran. Tomado de <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sizofiran.png?uselang=es>

C. Escleroglucano. Tomado de: <http://www.cargill.com/products/personal-care/ingredients/hydrocolloids/scleroglucan/>

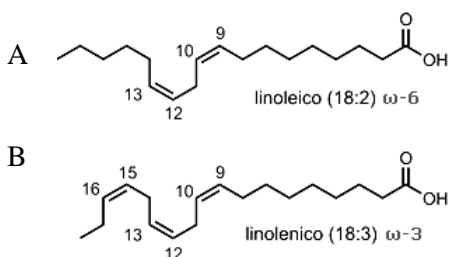
Otros polisacáridos estudiados son los escleroglucanos, glucanos extracelulares excretados por el micelio de *Sclerotium glaucanicum* o *S. Rolfsii*. Poseen una estructura central β -(1,3) a la que un solo grupo lateral glucosil-D se une a través de un β -(1,6) cada tercer o cuarta unidad glucosil de la cadena principal, formando un glucano de alto peso molecular de aproximadamente 1.000,000 Da, (Figura 1-6, C). Cabe anotar que tanto el Lentinan como el sizofirán, no han presentado toxicidad para los seres humanos incluso a dosis altas y son más eficaces cuando se administran en las primeras etapas del tratamiento del cáncer. Una característica común entre los glucanos mencionados, es que la actividad inmunoestimuladora más alta se correlaciona con un peso molecular alto y una conformación de triple hélice (I Giavasis, 2014).

También se ha observado en los glucanos de *L. edodes*, *G. lucidum*, *Sch. commune*, *S. rolfii*, *G. frondosa*, *Agaricus blazei*, *Cordiceps militaris*, *Cordiceps sinensis*, *P. ostreatus* y *Saccharomyces cerevisiae*, efectos hipolipidémicos e hipoglucémicos en suero sanguíneo en estudios con animales y humanos. Curiosamente, varios biopolímeros de hongos han demostrado actuar sinérgicamente en la reducción de la hiperlipidemia y la hiperglucemia. Los efectos hipolipidémicos están mediados por la interrupción de la circulación enterohepática de los ácidos biliares, que se traduce en un aumento de la excreción en las heces, mientras que la regulación de los niveles de glucosa en la sangre es por lo general debido a la unión de los biopolímeros no digeribles a la superficie intestinal retrasando la absorción de glucosa (I Giavasis, 2014).

- Ácidos Grasos:

Se encuentran los ésteres de glicerol y ácidos carboxílicos de masa molecular elevada, no ramificados, número de carbonos par, que se encuentran naturalmente como una mezcla, poseen una cadena de longitud y grado de insaturación variables y polaridad baja. Ejemplos de estos son los ácidos linoleico (figura 1-7, A), linolénico (figura 1-7, B) y oleico (Vollhardt & Schore, 2009).

Figura 1-7. A: ácido linoleico, **B:** ácido linolénico. Tomado de: <http://iquimicas.com/chia-composicion-quimica-beneficios/>



Cumplen un rol importante en el hombre, actuando de forma similar a las hormonas o como precursores de las mismas, ayudando al proceso digestivo y constituyendo una fuente de energía metabólica. Así mismo llegan a ser componentes estructurales y funcionales de las biomembranas y son los bloques básicos de la mayoría de los lípidos. Los ácidos grasos poliinsaturados de las familias ω -6 y ω -3 son precursores biosintéticos de los eicosanoides (prostaglandinas por ejemplo), que actúan como señalizadoras para muchos sistemas del cuerpo (Öztürk, Tel, Öztürk, & Duru, 2014). La presencia de este tipo de ácidos grasos insaturados constituye una característica nutracéutica favorable (S. T. Chang & Buswell, 1996), tienen efecto sobre enfermedades cardiovasculares,

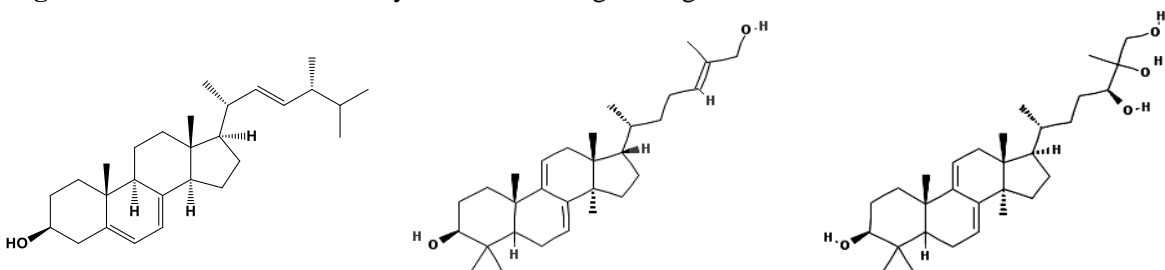
niveles de triglicéridos, hipertensión y artritis y pueden ser utilizados como quimiomarcadores (Barros et al., 2007; B. Ribeiro, de Pinho, Andrade, Baptista, & Valentão, 2009).

En estudios realizados con micelios de diferentes especies de *Pleurotus*, se encontró que el ácido graso predominante es el linoleico (68% de lípidos totales), salvo por las cepas de *P. eryngii*, cuyo principal ácido graso es el oleico (46%). Se encontró que en todas las cepas estudiadas, los ácidos oleico y palmítico estaban presentes en cantidades significativas (12%) y el ácido esteárico era el constituyente minoritario, evidenciándose que estos metabolitos puedan emplearse como quimiomarcadores en la diferenciación intragénica (Dimou, Georgala, Komaitis, & Aggelis, 2002).

▪ Terpenoides:

Corresponden a moléculas formadas por unidades de isopreno C5, unidas cabeza a cola, cuya estructura típica contiene un esqueleto carbonado de (C5)_n. Se clasifican como hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25), triterpenos (C30) y tetraterpenos (C40) (Dewick 2002). Dentro del grupo de los terpenos están los triterpenos y triterpenoides, compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal y en el reino Fungi (Lehninger, 2002). Por definición se consideran “productos naturales que tienen esqueleto de 30 átomos de carbono y que derivan del escualeno (6 unidades de isopreno) por ciclaciones y/o modificaciones de este” (Vollhardt & Schore, 2009; Wasser & Weis, 1999).

Figura 1-8. A – C: Flavonoides y esteroides de origen fúngico más estudiados



A. Ergosterol. Tomado de (NIETO and VALENCIA 2002)

B. Ganoderadiol. Tomado de <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ganoderadiol.png?uselang=es>

C. Ganoderiol A. Tomado de http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ganoderiol_A%26B.png?uselang=es

Los triterpenoides tetracíclicos tienen una gran relevancia en los macromicetos y dentro de ellos, los esteroides son los metabolitos más abundantes los cuales se encuentran formando parte de los componentes grasos y que son generalmente derivados del ergosterol (Figura 1-8, A) (Ko, Hung,

Wang, & Lin, 2008), principal componente triterpenoidal de los hongos (Siwulski, Sobieralski, Golak-Siwulska, Sokół, & Sękara, 2015).

Los compuestos de tipo triterpenoidal de origen fúngico presentan interesantes propiedades biológicas, como actividad inmunomoduladora (Xue et al., 2015), supresión tumoral por inducción de apoptosis (W. Wang et al., 2014) o citotoxicidad (S. Wang et al., 2013), actividad antimicrobiana tanto para bacterias Gram positivas como para Gram negativas (Joshi, Pathania, & Sagar, 2014; Neelam & Singh, 2013; Wasser & Weis, 1999), actividad antioxidante (Sasidhara & Thirunalasundari, 2014; Sathyaprabha, Kumaravel, & Panneerselvam, 2011), hipocolesterolémicos (Ondeyka et al., 2005; Wasser & Weis, 1999), hipoglicemiantes (Ravi, Renitta, Prabha, Issac, & Naidu, 2013) e hipotensivos, como se ha evidenciado con algunos compuestos triterpenoidales de *Ganoderma* (Paterson, 2006). Algunos se aplican en la farmacoterapia por sus excelentes resultados en ensayos clínicos (Ko et al., 2008; Lull et al., 2005; Ondeyka et al., 2005; Shai, McGaw, Aderogba, Mdee, & Eloff, 2008; Tan et al., 2008; Zhang, Zuo, Nakamura, Ma, & Hattori, 2009).

Ejemplo de estos son el ganodermadiol (Figura 1-8, B) y Ganoderiol A (Figura 1-8, B) de *G. lucidum*, los cuales inhiben efectos citopáticos producidos por el VIH-I y el Herpes simplex y presentan efectos hipocolesterolémicos e hipoglicemiantes (Dutta, 2013; Ioannis Giavasis, 2014; Paterson, 2006).

Respecto a la actividad hipoglicemiante, de manera preliminar se observó disminución significativa del nivel de glucosa en plasma en ratones con DM2 inducida, así como la liberación de insulina prolongada, a modo de fondo de reserva, por el compuesto γ -sitosterol de la planta *Lippia nodiflora* (Balamurugan, Durairandiyar, & Ignacimuthu, 2011). Con el Hongo *Inonotus obliquus*, el lanosterol y el peróxido de ergosterilo junto con otros compuestos de la fracción de acetato de etilo (Lu, Chen, Dong, Fu, & Zhang, 2010) también disminuyeron los niveles de glucosa en suero de ratones con DM2.

1.6 Género *Pleurotus*

Este género es conocido de manera popular como “Orellana” u “hongo ostra”, porque el píleo o carpóforo tiene forma de concha. Crece naturalmente en zonas templadas o en las estaciones más frías en las zonas subtropicales sobre los árboles, olmo, arce, bajo, álamo, acebo y laburnum (S.-T. Chang et al., 2004). Han sido reportados como parásitos de varios árboles y generadores de pudrición

blanca en la madera (por efectos lignolíticos), término que hace alusión al color que produce sobre ésta cuando degrada sus componentes lignocelulósicos (Bari et al., 2015).

Respecto a su consumo, las especies pertenecientes a este género son comestibles y gastronómicamente de primera calidad. Su color es blanco o castaño, aunque hay variedades azuladas y rosadas, con carne compacta en el carpóforo, fibrosa y blanca en el estípite, tienen un olor fragante y buen sabor. Son setas relativamente fáciles de cultivar y de amplia capacidad de adaptación, se encuentran en todo el mundo y su producción se ha incrementado rápidamente en los últimos años (S.-T. Chang et al., 2004). Han ganado popularidad sobre otras setas comestibles porque al momento de la colecta en espacios silvestres, no hay lugar a equivocaciones con especies y variedades venenosas (Vamanu, 2012).

1.6.1 Biología

El género *Pleurotus* pertenece a la familia Tricholomataceae, orden Agaricales, clase Basidiomycetes y cuenta con cincuenta especies reconocidas. Posee carpóforo redondeado, con la superficie lisa, abombada y convexa en su juventud, aplanándose luego poco a poco con un diámetro que oscila entre 5 y 15cm, dependiendo de la edad (Figura 1-9, A) y un himenóforo constituido por laminillas dispuestas radialmente, que van desde el pie que lo sostiene hasta el borde, las cuales son anchas, espaciadas unas de otras, blancas o crema, a veces bifurcadas (Figura 1-9, B) y en ellas se producen las esporas destinadas a la reproducción de la especie. Sus colores son diversos y la intensidad del mismo puede verse alterada por cambios en los factores ambientales, por ejemplo, la luz y la temperatura (S.-T. Chang et al., 2004).

Las esporas son pequeñas, oblongas, casi cilíndricas (Figura 1-9, E) y su esporada es de color blanco con cierto tono grisáceo (Figura 1-9, D). El pie suele ser corto, lateral oblicuo, ligeramente duro, blanco y con el principio de las laminillas en la parte de arriba (Figura 1-9, C) (López García & S.A, 2011; Rajarathnam, Bano, & Miles, 1987).

1.6.2 Propiedades nutricionales

La escasez de alimentos en tiempos de guerra volcó la mirada, desde 1940, a la búsqueda de alimentos ricos en proteína, con enfoque hacia los hongos y/o sus micelios. En general, las setas de *Pleurotus* frescas contienen 85-90% de humedad (Khan & Tania, 2012) con un contenido de proteína

en peso seco, de 10 a 30% y que puede alcanzar hasta 40%, según la especie (S.-T. Chang et al., 2004), la composición del sustrato y el tiempo de cosecha (Khan & Tania, 2012).

Figura 1-9. Imágenes representativas del género *Pleurotus*.



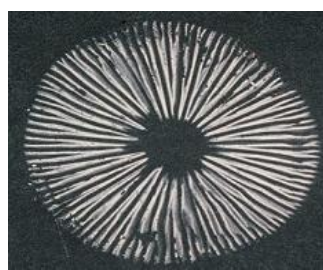
A. Tomado de: <http://magalangmushroomfarmville.weebly.com/profile.html>



B. Tomado de: [http://www.herbarium.iastate.edu/fungi/fungispecies.php?sp=Pleurotus+ostreatus+\(Jacq.%3A+Fr.\)+Kummer](http://www.herbarium.iastate.edu/fungi/fungispecies.php?sp=Pleurotus+ostreatus+(Jacq.%3A+Fr.)+Kummer)



C. Tomado de: http://www.mykoweb.com/CAF/species/Pleurotus_ostreatus.html



D. Tomado de: <http://www.agromatica.es/wp-content/uploads/2012/11/hongo.jpg>



E. Tomado de: <http://www.apsnet.org/publications/imageresources/Pages/sem088.aspx>

A. disposición de setas de *Pleurotus* de diferentes edades. **B.** Laminillas del himenio dispuestas separadamente desde el pie hasta el borde. **C.** *Pleurotus* que evidencia la disposición del pie. **D.** Esporada en papel de una seta. **E.** *Pleurotus ostreatus*, vista de una porción del himenio, muestra el basidio, estigma y las basidiosporas.

El contenido de lípidos frecuentemente oscila entre 0,2 a 8 g por 100 g de peso seco, aunque algunos estudios indican que comprende del 3 - 5% del peso seco y es generalmente más alto en el estípite que en el carpóforo. No es un género considerado buena fuente de ácidos grasos. Se ha observado que el ácido oleico es el ácido graso monoinsaturado más importante en las especies de *Pleurotus*, mientras que el linoleico es el poliinsaturado de mayor relevancia. La especie y los factores ambientales también afectan el contenido de lípidos, siendo influenciada su producción en gran medida por las condiciones de crecimiento (S.-T. Chang et al., 2004; Khan & Tania, 2012).

La seta fresca generalmente contienen de 3 a 28% de carbohidratos (S.-T. Chang et al., 2004), por lo que se les consideran buena fuente de estos. Los carbohidratos están presentes principalmente como polisacáridos o glicoproteínas. Los más abundantes son quitina, α - y β -glucanos, y otras hemicelulosas (por ejemplo, mananos, xilanos, y galactanos) (Khan & Tania, 2012). Este género contiene un glucano específico llamado Pleuran, el cual ha evidenciado propiedades antitumorales. El contenido de estos polisacáridos en los cuerpos fructíferos varía según especie y cepa, de 36 a 60 g / 100 g de peso seco. Los glucanos además son componentes de la fibra dietética soluble o insoluble (Khan & Tania, 2012), cuyo contenido varía entre el 3 y el 32% en peso seco, siendo el contenido de fibra dietética total (principalmente quitina) entre el 10 y 31% (S.-T. Chang et al., 2004).

Así mismo, las especies de *Pleurotus* son buena fuente de P, K, Fe, Zn, Ca, Mg Mn y Cu, por lo cual su inclusión en la dieta podría llegar a combatir las deficiencias de micronutrientes, aunque aún hacen falta estudios de biodisponibilidad. El contenido mineral varía de especie a especie, aunque también las fuentes nutricionales del cultivo en sí y los métodos para la determinación de minerales pueden ser responsables de esta variación. En lo referente a las vitaminas se ha reportado, específicamente para *P. ostreatus*, la presencia de vitaminas del complejo B y de vitamina C, sin embargo no se considera a todo el género buena fuente de vitaminas (Khan & Tania, 2012). Las características nutricionales se encuentran resumidas en la Tabla 1-1.

Tabla 1-1. Contenido nutricional de especies de *Pleurotus*. Tomado de (Khan & Tania, 2012).

Características	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. sajor-caju</i>	<i>P. florida</i>	<i>P. cystidiosus</i>	<i>P. highking 51</i>	<i>P. geestaranus</i>	<i>P. eryngii</i>	<i>P. tuber-regium</i>	<i>P. flabellatus</i>
Humedad ^a	85-87	85-87	87-88	86-87	85-86	85-86	85-90	88-89	91-94
Proteína ^b	17-42	16-38	15-21	17-18	20-21	19-20	11-12	13-17	21-22
Leucina ^c	16,4	14,6	NE	NE	NE	NE	10,8	28,4	NE
Valina ^c	10,5	10,1	NE	NE	NE	NE	7,4	33,4	NE
Lisina ^c	11,3	5,8	NE	NE	NE	NE	7,3	27,4	NE
Isoleucina ^c	9,9	11,2	NE	NE	NE	NE	7,2	21,1	NE
Treonina ^c	9,4	8,9	NE	NE	NE	NE	6,8	31,4	NE
Tirosina ^c	6,9	5,9	NE	NE	NE	NE	4,9	4,2	NE
Metionina ^c	2,7	2,7	NE	NE	NE	NE	1,7	4,8	NE
Fenilalanina ^c	11,1	9,2	NE	NE	NE	NE	2,1	21,9	NE
Lípidos ^b	0,5-5	1-5	1-5	5-6	5-6	3-4	7-8	0,2-2	1-2
Fibra ^b	24-31	22-31	23-27	25-26	30-31	26-27	28-29	15-16	10-12
Minerales ^b	4-10	5-9	8-12	7-8	5-6	5-6	4-5	4-10	4-10
Potasio ^c	1400	1600	1460	NE	NE	NE	NE	300	1537
Calcio ^c	2-36	3-23	0,5-34	NE	NE	NE	NE	3-200	120
Fósforo ^c	ND	ND	13,7	NE	NE	NE	NE	5-10	1616
Sodio ^c	3	2	0,3	NE	NE	NE	NE	2-8	686
Magnesio ^c	9-17	3-27	1-14	NE	NE	NE	NE	0,7-2	40
Zinc ^c	5-21	3-21	0,5-16	NE	NE	NE	NE	2-2,5	145
Hierro ^c	55-65	33-54	0,05-44	NE	NE	NE	NE	30	209
Manganeso ^c	0,5-3	0,5-3	0,5-3	NE	NE	NE	NE	2	10
Cobre ^c	0,65	0,8	0,05	NE	NE	NE	NE	0,3-2	22
Selenio ^c	0,011	0,025	0,013	NE	NE	NE	NE	ND	ND
Tiamina ^d	1,9-2,0	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Riboflavina ^d	1,8-5,1	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Niacina ^d	30-65	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Ác. Fólico ^d	0,3-0,7	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Ác. ascórbico ^d	28-35	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE

^a. % de peso en la seta fresca. ^b. g/100 g del peso seco. ^c. mg/g de peso seco. ^d. mg/100 g de peso seco.

NE= No especificado ND= No Detectado

1.6.3 Propiedades medicinales

Los estudios ponen de manifiesto que este género es una fuente promisoría para la producción de polisacáridos con potencial farmacológico ya sean obtenidos por FES o FEL, con actividades biológicas similares entre los compuestos de las fructificaciones y del micelio (S.-T. Chang et al., 2004; Andriy Synytsya et al., 2009). Se ha determinado actividad antitumoral en las fracciones de polisacáridos de los cuerpos fructíferos de casi todas las especies de *Pleurotus*, relacionada con la presencia de (1-3) β -D-glucanos cuyo mecanismo parece ser el incremento en la actividad de las células NK – asesinas naturales (en inglés Natural killer) y linfocitos B (S.-T. Chang et al., 2004; Y. Patel, Naraiian, & Singh, 2012).

Estos mecanismos producen efectos antitumorales, antineoplásicos y antimutagénicos, por lo cual previenen la formación de tumores y degeneraciones genéticas que originan otras patologías (Y. Patel et al., 2012). Además, exhibe modulación del sistema inmune, actividad hipoglicémica, efectos antitrombóticos, inhibición del crecimiento tumoral, reducción de la inflamación, hipotensivos, reductor de la concentración de lípidos en plasma y antioxidantes (S.-T. Chang et al., 2004).

La actividad antimicrobiana se ha estudiado utilizando extractos en metanol, éter y acetona, con diferentes especies de *Pleurotus*, demostrándose la inhibición del crecimiento de bacterias resistentes a antibióticos como *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*; la inhibición de las levaduras *Cándida albicans*, *C. glabrata* y de cepas de hongos de *Trichophyton* y *Epidermophyton* en dosis menores respecto a los antifúngicos comunes (Y. Patel et al., 2012).

La actividad inmunoestimuladora también es importante al momento de combatir infecciones virales. Se han identificado varias sustancias con efecto antiviral, por ejemplo, la ubiquitina y una proteína antiviral aisladas del cuerpo fructífero de algunas orellanas. Ciertos glucanos no hidrosolubles de *P. tuber-regium* y sus derivados sulfatados hidrosolubles actuaron contra el Herpes simple tipo I y II, por interacciones moleculares sobre la superficie del virus y extractos extracelulares de *P. ostreatus* actuaron por estímulo inmunológico. Así mismo las RNAsas aisladas de estas especies también han sido eficaces en la detención de la proliferación de cepas del virus del VIH (Y. Patel et al., 2012), una enzima lacasa de *P. citrinopileatus* puede inhibir una transcriptasa reversa del VIH y ciertas lacasas aisladas de *P. ostreatus* actúan impidiendo la proliferación del virus de la Hepatitis C (Khan & Tania, 2012).

1.6.4 Producción Biotecnológica

Existen diferentes formas de fungicultura que buscan una buena producción de biomasa. Generalmente se utiliza el cultivo tradicional (vigente en la actualidad), basado en medios de cultivos sólidos, con el objetivo de obtener cuerpos fructíferos para el mercadeo directo. La semilla se mezcla en un sustrato sólido (cascarilla de arroz, desechos de algodón, cáscaras de semilla de algodón, granos de sorgo, granos de centeno y otras harinas) (S.-T. Chang et al., 2004). Esta técnica no implica equipos sofisticados, pero a pesar de su simplicidad, requiere largos períodos de desarrollo, se dan bajos rendimientos y la producción depende del entorno, la especie y la composición del sustrato (Gregori et al., 2007).

Actualmente se aplican métodos de cultivo alternativos, a través de técnicas biotecnológicas, que permiten obtener biomasa micelial y compuestos bioactivos de manera más rápida y eficiente, dentro de las cuales se encuentran las fermentaciones ya sea en estado sólido (FES) o líquido (FEL) (P. A. Zapata, 2007). En la primera, el crecimiento de los hongos filamentosos se efectúa en un medio de cultivo sólido, cercano a la ausencia de agua pero con la suficiente presencia de esta para soportar el crecimiento y el metabolismo del organismo (Arango & Nieto, 2013). Este método es utilizado con preferencia para el aprovechamiento de desechos vegetales mediante la producción de setas y micelio a partir de estos sustratos o también para desarrollar sustratos que promuevan la producción de metabolitos específicos como las lacasas, enzimas de importancia industrial (Gregori et al., 2007).

La FEL es la fermentación producida en presencia de agua en exceso. Se conoce también como fermentación en estado sumergido (SmF). Los sustratos son líquidos, los componentes son preferiblemente solubles en agua o están en suspensión. Los microorganismos se desarrollan flotando en este medio de cultivo y en el caso de los hongos miceliares, se aplica agitación para formar pequeñas esferas de micelio denominadas «pellets». El cultivo sin agitación induce a que el micelio crezca en la superficie, pero ha perdido vigencia. Es un método muy utilizado en la industria por su sencillez y la facilidad de controlar mayor número de variables respecto a la FES así como mayor oportunidad de recuperación del producto final (Arango & Nieto, 2013; Elisashvili, 2012).

Como la FEL es más uniforme, reproducible y con menor incidencia de contaminación, es el proceso biotecnológico a elegir para la obtención de productos con propiedades medicinales y aplicaciones farmacéuticas, así como para la propagación de micelio, para diferentes aplicaciones como la de semilla en la producción de cuerpo fructífero en sustratos sólidos, biomasa para alimentos,

suplementos dietéticos, etc., obteniéndose alta producción de biomasa en un espacio compacto, en menor tiempo y con menos incidencia de contaminación (Elisashvili, 2012; Gregori et al., 2007).

Se observa también que, en la FES, la tasa de transferencia de O₂ y CO₂ es menor que en la FEL, se observan mayores incidencias de contaminación bacteriana y menor remoción del calor y menor actividad de agua, esto afecta la velocidad del crecimiento haciéndolo más lento y que sea efectivo en una menor proporción de microorganismos cultivables, es un proceso difícil de monitorizar, controlar y escalar. La FEL puede llegar a escalarse y se puede controlar la transferencia de O₂ y CO₂ (1998 Ramboult General and Microbiological Aspects of Solid Substrate Fermentation, n.d.).

1.6.5 Factores que inciden en la producción de biomasa fúngica por FEL

Factores Físicos:

- Temperatura

Se evidencia como factor determinante en la producción de biomasa y del compuesto de interés. En estudios con diferentes especies de setas donde se buscaba la mejor producción de EPS, se evidenció que el micelio acumulaba los polisacáridos (permanecían IPS) a bajas temperaturas (menor a 10°C), mientras que los EPS se incrementaban en sistemas de cultivo con temperaturas superiores a 10°C, con la mayor producción sobre los 25°C. Según la especie y el interés de la FEL, la temperatura ideal varía pero es muy importante para un desarrollo óptimo (Elisashvili, 2012).

- Agitación y aireación

La intensidad de la agitación y aireación son importantes en términos de lograr la mejor tasa de transferencia de masa, la oxigenación ideal y la producción de metabolitos. Una FEL exitosa mantiene una tasa de oxígeno disuelto que evite limitar o deteriorar las actividades normales de respiración. La aireación permite una mejor mezcla del medio de producción, ayudando a mantener un gradiente de concentración óptimo. Sin embargo, el exceso de agitación en las FEL con Hongos, puede dañar las hifas y afectar negativamente tanto el crecimiento como la formación de producto. La aplicación de una agitación débil permite la adherencia de partículas al micelio y reduce tanto la transferencia de masa como la transferencia de O₂. También se ha observado que la producción de un biocompuesto puede afectarse por la morfología y tamaño del pellet y esto es consecuencia de la fuerza de agitación. Se debe establecer un balance entre los efectos positivos y negativos de la agitación, representado en la velocidad de la misma (Y. Q. Cui, Van der Lans, & Luyben, 1997; Elisashvili, 2012; M Papagianni, Mattey, & Kristiansen, 1998).

Factores Biológicos

- Inóculo:

La cantidad y calidad del inóculo que se adiciona al medio influye tanto en el desarrollo del Hongo en el medio, como en la producción del biocompuesto objetivo. Se ha observado que en cantidades bajas de inóculo se producen mayores ramificaciones del micelio. Cuando se producen polisacáridos, la cantidad y el tamaño del pellet influyen en el aumento de la viscosidad del medio. Al contrario de las variables químicas, las cuales determinan la economía de la FEL, la cantidad y morfología del inóculo (esporas o micelio) deben establecerse según las condiciones que se construyan para la fermentación, porque se correlaciona con los rendimientos del proceso (Jamal, Idris, & Alam, 2011; Johansen, Coolen, & Hunik, 1998; Maria Papagianni, Nokes, & Filer, 2001).

Factores Químicos

- pH del medio

Uno de los principales factores que determinan el potencial biosintético de un método de producción es el pH del medio, ya que puede afectar a la función de la membrana celular, la absorción de varios nutrientes, la morfología celular y la estructura, la solubilidad de sales, estado iónico de sustratos, la actividad enzimática, y la biosíntesis del producto (Elisashvili, 2012).

- Fuente de carbono

Es un componente principal que garantiza el crecimiento del microorganismo y la producción de metabolitos bioactivos. Aunque la mayoría de los investigadores han usado la glucosa como fuente de carbono, hay algunos estudios que comparaban los efectos de diferentes azúcares sobre el crecimiento de hongos y la producción de compuesto objetivo, trabajando además con lactosa y sucrosa principalmente, aunque también se utiliza fructosa, maltosa, manitol etc. En varias investigaciones se ha encontrado que una buena producción de biomasa micelial no necesariamente es un factor determinante para la máxima producción de metabolitos como EPS en las diferentes especies (Elisashvili, 2012; Smiderle et al., 2012). Evidencia de esto se ha visto en setas de *L. edodes* y varias especies de *Pleurotus* (Elisashvili, 2012).

- Concentración inicial de azúcar en el medio

Como en el caso anterior se ha estudiado el efecto de variar las concentraciones de glucosa en el medio de cultivo sobre la actividad de biosíntesis de hongo y en general, el aumento de los niveles de biomasa y EPS se obtuvieron cuando los hongos se cultivaron en medios que contenían altas concentraciones de glucosa, pero con un máximo de saturación de la misma, mostrando además ser

especie dependiente, presentándose incluso inhibición del crecimiento o aumento de los IPS con exceso de azúcar (Elisashvili, 2012).

- Fuente de nitrógeno

Su naturaleza y concentración muestran en muchos casos ser de considerable importancia. El nitrógeno es un factor crítico en la síntesis de algunas enzimas de hongos, implicadas tanto en el metabolismo primario como secundario. Este elemento se puede suministrar al medio de cultivo en forma de iones de amonio o nitrato o en forma orgánica (por ejemplo, aminoácidos o proteínas) (Elisashvili, 2012).

- Vitaminas

Existe escasa información sobre los efectos de las vitaminas adicionadas de manera individual sobre el crecimiento micelial y la producción de EPS por hongos medicinales. Algunas vitaminas se pueden utilizar para mejorar la producción de EPS, mientras que el empleo de otras lleva al incremento de la biomasa micelial, siendo el efecto especie-dependiente, como lo demostró el estudio con *Antrodia cinnamomea* donde los autores sugirieron que el suministro de vitaminas no era un requisito absoluto para el crecimiento de esta especie (Elisashvili, 2012).

- Aditivos especiales

Muchos investigadores utilizan algunos agentes estimulantes, incluyendo ácidos grasos, agentes tensoactivos, aceites vegetales, y disolventes orgánicos en pro de aumentar la producción de bioactivos. Estos agentes son conocidos por mediar la permeabilización celular, mediante la desorganización de la membrana celular y/o directamente, afectando el nivel de síntesis de las enzimas que participan en la formación del producto, contribuyendo a una mayor producción de compuestos objetivo (Elisashvili, 2012).

- Medios complejos – Fuentes de carbono no tradicionales en fermentaciones.

Las proyecciones biotecnológicas que se derivan de la FEL incluyen el escrutinio de nuevas cepas con capacidad de producir más compuestos activos y que permitan desarrollar tecnologías competitivas, de bajo costo, para su producción. Uno de los enfoques adecuados para este propósito es utilizar el potencial de los residuos, que abarcan desechos animales (de mariscos) para la producción de enzimas (Matsumoto, Saucedo-Castañeda, Revah, & Shirai, 2004), hasta los residuos lignocelulósicos agroindustriales, aun cuando influyen en el rendimiento y los componentes químicos del micelio, la mayoría son ricos en compuestos orgánicos que aseguran un abundante crecimiento de los hongos (Elisashvili, 2012; Smiderle et al., 2012). La aplicación de sustratos con subproductos agrícolas (bagazo de caña, pulpa de café, harinas y pajas) se considera un enfoque

valioso para la producción de alimentos enriquecidos con proteína y de bajo costo (Soto-Cruz, Saucedo-Castañeda, Pablos-Hach, Gutiérrez-Rojas, & Favela-Torres, 1999).

Al respecto, el grupo Química de Hongos Macromicetos del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, ha realizado investigaciones en la producción de hongos tanto en FES como en FEL, direccionados al estudio de la influencia del sustrato en la producción de bioactivos, específicamente compuestos de carácter triterpenoidal. En el caso de la FES, empleando los residuos agroindustriales comunes, se determinó que la biosíntesis de los metabolitos secundarios está definida en gran medida por el residuo empleado y que el posterior uso de la biomasa obtenida determina la selección del sustrato (Ivonne J Nieto & A., Chegwin, 2008; Ivonne Jeannette Nieto & Chegwin A., 2010; Ivonne Jeannette Nieto & Chegwin-Angarita, 2013). Así mismo, estos estudios arrojaron resultados tan interesantes como el hecho de que siendo los macromicetos degradadores por excelencia pueden también incorporar y acumular compuestos en las fructificaciones sin transformación metabólica de los mismos (Nieto Ramirez, Chegwin-Angarita, & Osorio-Zuluaga, 2007).

En lo concerniente a la FEL dicho grupo evaluó la influencia del empleo de fuentes de carbono no tradicionales como son las harinas de cereales y concluyó que no hay un comportamiento generalizado entre la relación C/N del cereal y la producción de los compuestos bioactivos del producto biotecnológico y corroboró lo determinado en FES, es decir, que la selección del sustrato debe ser orientada hacia el tipo de metabolitos que se deseen obtener (Chegwin A. & Nieto R., 2013) y que definitivamente el empleo de este tipo de FC trae ventajas sobre las fermentaciones realizadas con las usuales, pero que la variación en cantidad y estructura de los metabolitos es además género y cepa dependiente (Chegwin-Angarita & Nieto-Ramírez, 2014). Estos trabajos resaltan el hecho de que, el uso de fuentes de carbono no tradicionales trae muchas ventajas cuando se desea obtener un producto biotecnológico con un alto potencial para su uso en farmacia o en alimentos.

1.6.6 Hongos Macromicetos y Alimentos Funcionales

Muchas sustancias extraídas y preparaciones derivadas de los macrohongos no utilizadas a nivel farmacéutico, se han empleado como una novedosa clase de productos, denominados de diferentes modos: suplementos dietarios (SDs), alimentos funcionales, nutracéuticos, nutricéuticos, fitoquímicos, micoquímicos, bioquimiopreventivos, o alimentos diseñadores. Estos términos varían en significado de país a país, así como la regulación de los mismos como ya se indicó (P. C. Cheung,

2008). En la actualidad, estos términos hacen referencia a un biocompuesto o extracto parcialmente refinado del cuerpo fructífero, o a la biomasa seca del mismo o del micelio de un Hongo, el cual es consumido en forma de cápsulas, tabletas, polvo, siropes o soluciones, como un suplemento dietario aportante de compuestos con propiedades terapéuticas (Ioannis Giavasis, 2014).

Estos suplementos están ampliamente extendidos en Asia pero, son poco conocidos y muy poco aprovechados en el mercado occidental así como su aplicación en matrices alimentarias no se ha estudiado a profundidad, como tampoco las interacciones entre el biocompuesto y el alimento donde es adicionado (I Giavasis, 2014). Evidencia del impacto de la matriz alimentaria sobre el biocompuesto, se señala en el estudio con los extractos hidro-alcohólicos de *Suillus luteus* y *Cropinopsis atramentaria*, los cuales presentan efecto sinérgico antioxidante. Los extractos, fueron adicionados a un queso cottage en dos tratamientos (extracto libre y microencapsulado con maltodextrina). Se evaluó la persistencia de la actividad antioxidante en el tiempo, encontrándose pérdida de dicha actividad en el queso con extracto libre y aumento en la misma para el producto encapsulado (A. Ribeiro et al., 2015).

Los compuestos de tipo polisacárido, pueden ser trabajados en alimentos cuyos procesos requieran altas temperaturas. Un estudio señala que la sustitución parcial de harina de trigo con hasta el 2% de glucanos de *L. edodes*, dio como resultado un producto horneado bajo en calorías y rico en fibra, mejorando incluso los parámetros de viscosidad de la pasta y la elasticidad, sin reducir su capacidad de retención de aire o la dureza final de los productos (J. Kim et al., 2011).

El empleo de derivados de los hongos en panadería no solo busca la obtención de un producto funcional, sino que además sirven como escenario de prueba de otras características de las setas para subsecuentes aplicaciones. Ejemplos de esto es la adición de un polisacárido producido por *Hypsizygos marmoreus* (en Oriente Bunashimeji) para mejorar el proceso de fermentación (Tokumitsu Okamura, Hamada, Okuda, & Ohsugi, 1999) y la adición de cuerpo fructífero pulverizado de *F. velutipes* y *L. edodes* para reemplazar la levadura en preparaciones de panadería (T Okamura, Nishikawa, Okuda, & Ohsugi, 1998; Takeno, Okamura, Fukuda, Okuda, & Ohsugi, 2001). Los dos estudios buscaban comparar y evaluar los procesos de fermentación, para posteriormente formular bebidas alcohólicas con mejores propiedades fermentativas y con características funcionales (Okamura-Matsui, Tomoda, Fukuda, & Ohsugi, 2003).

En alimentos líquidos, un primer caso investigó la elaboración de un alimento funcional líquido, elaborado con extracto de polisacáridos de la seta silvestre japonesa conocida como BaChu, jugo de baya de espino (*Crataegus monogyna*) y jugo de manzana. Esta investigación buscaba optimizar los parámetros de extracción de polisacáridos del hongo y encontrar la mejor formulación del extracto con los componentes mencionados (XuJie, Na, SuYing, ShuGang, & BaoQiu, 2008).

Un segundo ejemplo es la elaboración de una cerveza funcional, por adición de extracto etanólico de *G. lucidum*. El estudio indicó que la dosis adicionada influye en la aceptación por parte del público, pero la formulación óptima tuvo aceptación en personas consumidoras frecuentes de cerveza. El estudio se llevó a cabo para evaluar el uso potencial de esta especie, por sus amplios reportes de beneficios fisiológicos. Encontraron que los compuestos triterpenoidales (ácido Ganodérico y ácido Lucidénico) y ácidos grasos biológicamente activos que estaban en el extracto etanólico, prevalecían en el producto funcional después de la adición, demostrando su aplicación en bebidas alcohólicas con efectos benéficos para consumidores regulares con necesidades fisiológicas específicas (Leskosek-Cukalovic et al., 2010).

Otros estudios han considerado las inclusiones de micelio o partes del cuerpo fructífero como ingrediente del alimento funcional. Tal es el caso del estudio en el cual se aprovechaban los residuos de *Agrocybe aegerita* (estípites y aglomerados de hifas basales) para su incorporación a un cereal extruido listo para el consumo, con el fin de reemplazar una porción de harina de trigo y aumentar la característica de fibra en el mismo, observando reducciones del índice glicémico según estudios simulados de digestión *in vitro* (Brennan, Derbyshire, Tiwari, & Brennan, 2012).

Con un objetivo similar, se incorporó micelio de las setas *Antrodia camphorata*, *Agaricus blazei*, *Hericium erinaceus* y *Phellinus linteus* para sustituir el 5% de la harina de trigo en una formulación de pan. El estudio evaluó la calidad del pan con respecto al volumen específico, color, concentración equivalente de umami (EUC), análisis de perfil de textura, evaluación sensorial y la prevalencia de componentes funcionales. En general se encontró que las formulaciones con micelio conservaron cantidades sustanciales de los componentes funcionales como ácido γ -aminobutírico y ergotioneina, presentaron pérdida de la lovastatina pero se concluyó que el micelio podía ser incorporado en el pan y proporcionar efectos benéficos para la salud (Ulziijargal, Yang, Lin, Chen, & Mau, 2013).

El grupo de investigación en Química de Hongos Macromicetos dentro del contexto de los alimentos funcionales ha estudiado a *Lentinula edodes* (Shiitake) en dos trabajos diferentes para desarrollar productos con carácter nutracéutico. Dadas las múltiples referencias que corroboran los efectos fisiológicos de los extractos metanólicos y acuosos tanto del cuerpo fructífero como del micelio de Shiitake que contiene compuestos como la eritadenina (efectos hipocolesterolémicos), el lentinan (anticancerígeno principalmente) y el ácido oxálico (actividad antioxidante, inmunoterapéutica, antimicrobiana, y antiprotozoos) (Prasad, Rathore, Sharma, & Yadav, 2015; Valverde, Hernández-Pérez, & Paredes-López, 2015), se hizo una primera aproximación, enfocada en la formulación de un antipasto con adición de la estípita de *L. edodes*, para dar valor agregados a esta parte del hongo categorizada como subproducto pero que también contiene los bioactivos mencionados. Se encontró que los estípites de Shiitake pueden ser empleados de manera exitosa para la formulación de alimentos procesados de fácil elaboración, con una gran oportunidad de negocio para los Fungicultores por la aceptación de los consumidores, además de agregar al antipasto características nutritivas en cuanto a fibra y proteína e incluso ser ofrecido como alimento funcional y reduciendo las pérdidas postcosecha entre el 15 y el 20 % (Rivera Morales, 2010).

En el segundo estudio, se desarrolló una gelatina con adición de micelio de Shiitake obtenido por FEL, buscando producir un alimento funcional dirigido a la población infantil con proyección de coadyuvante en la farmacoterapia del cáncer. Se evaluó el carácter funcional de la biomasa mediante la determinación del contenido de polisacáridos, β -glucanos y esteroides y se observó la incidencia de la inclusión del micelio en la matriz alimentaria (propiedades organolépticas y características reológicas). Los resultados permitieron determinar que el micelio proporcionaba una cantidad tal de bioactivos que se podía considerar a la gelatina formulada como un real alimento funcional, con influencia de los polisacáridos en las características reológicas, pero sin afectación en la percepción de los consumidores (Suárez-Arango, 2012).

Aun siendo tan escasa la experimentación en la producción de alimentos funcionales con adición de macrohongos (cuerpo fructífero o micelio) a matrices alimentarias, se presenta un panorama tan promisorio que se incentiva el seguir investigando en este campo ya que las setas comestibles ofrecen bioactivos, que en algunas ocasiones no se encuentran en otras fuentes naturales.

1.7 Conclusiones

- La información aquí recopilada permite ver claramente que los macromicetos ofrecen un sinnúmero de metabolitos con actividades biológicas reconocidas y su producción biotecnológica, en especial mediante la fermentación en estado líquido, permite obtener una buena producción tanto de biomasa como de bioactivos. Estos bioactivos pueden emplearse en el desarrollo de alimentos de tipo funcional, cuya ingesta contribuirá al mejoramiento de la salud, mediante la prevención o el tratamiento de aquellas enfermedades provocadas por malos hábitos y/o alimentación poco balanceada.
- Las pocas investigaciones sobre el potencial de los macrohongos en la elaboración de esta clase de alimentos y el hecho de que en algunas culturas desde tiempos inmemoriales, se utilizan los extractos provenientes de las setas para el tratamiento o prevención de muchas enfermedades, plantea la necesidad de explorar el potencial de la inclusión de la biomasa fúngica en diferentes matrices alimentarias, lo que traería como consecuencia la obtención de mejores alimentos funcionales por su aporte conjunto de nutrientes y compuestos poseedores de actividad biológica.

2. Capítulo: Selección de la fuente de carbono adecuada para la mejor producción de biomasa

2.1 Resumen

Cuando se desea aprovechar al máximo el valor nutracéutico de los macromicetos con miras a la bioprospección es primordial encontrar las mejores condiciones para su producción biotecnológica. En el caso particular de la FEL, uno de los parámetros determinantes es la selección de la fuente de carbono. Por esta razón que en la actualidad investigadores del grupo de Hongos Macromicetos colombianos del departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia realizan trabajos tendientes a encontrar fuentes de carbono que conlleven a obtener biomasa fúngica en mayor cantidad y con mejor valor nutracéutico. Para ello se han centrado en la utilización de fuentes de carbono no tradicionales como componentes de los medios de cultivo, junto con el empleo de las mismas en la producción biotecnológica de especies nativas de macrohongos. En la presente investigación se buscó evaluar la influencia de la fuente de carbono sobre el crecimiento de una cepa autóctona de *Pleurotus ostreatus*, mediante la utilización de harina de maíz amarillo (MA) y salvado de trigo (ST) como fuente de carbono (FC), con la finalidad de obtener el mejor nutracéutico para su futura aplicación en la elaboración de un alimento de tipo funcional. La selección de la mejor fuente de carbono se basó en la evaluación del tiempo y la tasa de crecimiento apical (TCA), mediante el proceso de FeSup, utilizando como sustrato agares con las FC mencionadas y posteriormente realizando fermentación en estado líquido (FEL). La TCA fue mejor en el medio que contenía ST, con un tiempo total de crecimiento de 9 días frente al MA donde tardó 12 días. Sin embargo, la producción de biomasa en FEL fue mayor para el medio que contenía MA ($14,5 \pm 1,05$ g/L) respecto al ST ($4,6 \pm 0,17$ g/L.), poniendo de manifiesto que la FeSup no es por si sola el mejor método para la selección de la fuente de carbono adecuada. El comportamiento del hongo en la FEL posicionó a MA como la FC a elegir cuando se requiere alta producción de biomasa.

Palabras clave: *Pleurotus*, nutracéutico, biomasa, fuente de carbono, fermentación

2.2 Abstract

When the investigation of macromycetes is focused to bioprospecting by improving their nutraceutical value to the highest level, then it is essential to find the best conditions for their biotechnological production. For the particular case of liquid-state fermentation (LSF) methodology, the carbon source (CS) becomes to be a key parameter for a good mycelial development. The study of different CS, traditional and untraditional, is a challenge for the researchers of the group of the Colombian Fungi Macromycetes of Chemistry Department at the Universidad Nacional de Colombia, who have worked in this area with the goal of finding CS that lead to obtain larger quantities of fungal biomass with better nutraceutical value. For this reason, they have focused on the use of untraditional sources of carbon such as components of culture media, for the biotechnological production of native species of macro-fungi. The aimed of this research was to evaluate the influence of the CS on the growth of a native strain of *P. ostreatus*, using yellow cornmeal flour (YC) and wheat bran (WB), in order to get the best nutraceutical for future application in the development of a functional food type. The selection of the best CS was based on the assessment of the total time of growth and apical growth rate (AGR), through the process of surface fermentation (SF), by culture media that includes the CS mentioned and then performing a LSF. The TCA was higher in the medium containing WB, with a total time of growth of 9 days compared to the YC in which mycelia took 12 days to growth. However, the major biomass production was in LSF with YC ($14.5 + 1.05 \text{ g / L}$) compared to WB ($4.6 + 0.17 \text{ g / L}$), this demonstrates that the SF alone is not the best method for selecting the suitable CS. The behavior of the fungus in LSF system positioned YC as the preferred CS when biomass production is priority.

Keywords: Pleurotus, nutraceutical, biomass, carbon source, fermentation

2.3 Introducción

Uno de los factores que influyen en gran medida en el crecimiento miceliar es la fuente de carbono empleada. Al respecto, los trabajos previos realizados por el grupo de investigación en Química de Hongos Macromicetos, con base en lo reportado por (Paola A. Zapata, Rojas, & Atehortua, 2012), quienes determinaron que al igual que en el caso de biomasa, los polisacáridos y ácidos ganodéricos, el empleo de fuentes de carbono no tradicionales permite una buena producción de biomasa y bioactivos y que las mismas inciden tanto en su cantidad como en la variedad estructural de los mismos, repercutiendo en el valor nutricional de la biomasa obtenida y ligado a la especie cultivada

(Chegwin-Angarita, 2014; Chegwin-Angarita & Nieto-Ramírez, 2014; Ivonne Jeannette Nieto & Chegwin A., 2010; Nieto Ramírez, Chegwin Angarita, & Osorio Zuluaga, 2007).

En las investigaciones antes citadas, realizadas con tres diferentes especies de *Pleurotus* (*P. ostreatus*, *P. djamor*, *P. pulmonarius*) se encontró que el empleo de ST como fuente de carbono favorece la producción de triterpenoides, aun cuando presentó los valores más bajos de biomasa producida. Así mismo, MA dio muy buenos resultados respecto a la mayor producción de biomasa, pero la producción de compuestos triterpenoidales fue baja principalmente en lo referente a su variedad estructural. Los estudios evidenciaron que no existe una relación directa entre la producción de biomasa y la de los compuestos triterpenoidales y se observó que la especie que mejor se comportó en términos de mayor producción de biomasa fue *P. ostreatus* (Chegwin-Angarita, 2014; Chegwin-Angarita & Nieto-Ramírez, 2014; Ivonne Jeannette Nieto & Chegwin A., 2010).

La FeSup (Fermentación Superficial) implica el crecimiento de microorganismos sobre sustratos sólidos húmedos en ausencia de agua de flujo libre. La humedad necesaria en la FeSup existe en forma disuelta y ligada dentro de la matriz sólida, permitiendo que el proceso de transferencia de oxígeno sea eficiente, considerando que el microorganismo está casi en contacto con el oxígeno gaseoso del aire (Raghavarao, Ranganathan, & Karanth, 2003).

Esta clase de fermentación se ha empleado principalmente en el área ambiental, incluyendo la producción de compost (Mohammad, Alam, & Kabashi, 2013) y piensos a partir de residuos sólidos (Kumar, Shrivastava, Gomes, & Kuhad, 2013), biorremediación (Chandrasekhar, Amulya, & Mohan, 2015) como biodegradación de compuestos peligrosos (Ahmed, Zia, & Iqbal, 2016) y desintoxicación biológica de desechos industriales (Bautista, Pérez, García, Cuadros, & Marsal, 2015; Paul et al., 2014). Otras aplicaciones de esta clase de fermentación se llevan a cabo en diferentes campos como son: enriquecimiento nutricional de cultivos agroindustriales (Bhandari, Singh, Gupta, & Chand, 2014) y biotransformación de sus residuos (Demir & Tari, 2014), biopulping (producción de pasta de celulosa para papel) (Yoon, Ang, Ngoh, & Chua, 2014), alimentos fermentados (Li et al., 2013), enzimas (da Silva Delabona et al., 2013; Farinas, 2015), pigmentos (Kadam, Kamatkar, Khandare, Jadhav, & Govindwar, 2013; Srianta, Zubaidah, Estiasih, & Yamada, 2016), antibióticos (Slivinski, Mallmann, de Araújo, Mitchell, & Krieger, 2012), plaguicidas biológicos (El-Bendary, Moharam, Mohamed, & Hamed, 2016; Mnif, Elleuch, Chaabouni, &

Ghribi, 2013), ácidos orgánicos (Sharan, Charan, Bind, & Tiwari, 2015) y compuestos de sabor (Aggelopoulos et al., 2014; Leng & Xu, 2015).

Como ya se había mencionado en el Capítulo 1, la FEL es la fermentación producida en presencia de agua en exceso y los microorganismos se desarrollan flotando en este medio de cultivo (Arango & Nieto, 2013; Elisashvili, 2012) y su empleo puede aumentar el potencial de producción de micelio y exopolímeros en un espacio compacto en un periodo de tiempo, en algunos casos, menor comparado con la FeSup (S. W. Kim, Hwang, Park, et al., 2002; S. W. Kim, Hwang, Xu, et al., 2002). Esta fermentación es utilizada frecuentemente a la producción de biomasa y compuestos bioactivos (Elisashvili, 2012) como exo/endo polisacáridos (Ioannis Giavasis, 2014; Ren, He, Cheng, & Chang, 2014; Tai-Hao & Lin, 2013), compuestos antioxidantes (Smith, Doyle, & Murphy, 2015), lectinas (Awoyinka, Aina, Oloke, Majolagbe, & Akoni, 2014), ácidos grasos (Mokochinski et al., 2015), esteroides y triterpenoides (Chegwin A. & Nieto R., 2013; Chegwin-Angarita & Nieto-Ramírez, 2014) y estatinas (Chegwin-Angarita et al., 2012).

Con base en lo anterior se planteó esta parte de la investigación con el objetivo de evaluar el crecimiento de una cepa nativa de *P. ostreatus*, en dos fuentes de carbono no tradicionales mediante el empleo de FeSup y FEL, para determinar cuál de ellas favorece la producción de biomasa. Así mismo, mediante la comparación de los resultados obtenidos por aplicación de las técnicas antes mencionadas, evaluar la linealidad entre los dos métodos con la finalidad de determinar el potencial de la FeSup como método rápido de selección de fuentes de carbono.

2.4 Materiales y Métodos

2.4.1 Cepas:

Se trabajó con una cepa de *Pleurotus ostreatus* nativo, proporcionada por el Laboratorio de Ingeniería Química (LIQ) de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. La cepa fue cultivada en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en condiciones de aerobiosis y oscuridad. Se tuvo almacenada en refrigeración, $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y se conservó como cepa de trabajo.

2.4.2 Fermentación Superficial - FeSup:

Inóculo: De la cepa de trabajo se hizo un repique en medio sólido, en este caso un medio complejo, con fuentes de carbono no tradicionales y suplementado con un carbohidrato (sacarosa) para activar la cepa y darle oportunidad para su adecuación a las nuevas fuentes de carbono (FC). Las FC seleccionados fueron ST y MA. La composición de este primer medio (M1) en g/L es: harina de cereal 30; extracto de levadura 5, sacarosa 5, agar 8, se ajusta el pH a 5.6 ± 0.1 , se incubó en aerobiosis a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, en oscuridad (Nieto & Chegwin A, 2010).

Fermentación: El ensayo se realiza utilizando una segunda formulación de medio (M2) en caja de Petri y por triplicado para medir el crecimiento apical. Se adiciona ST y MA como fuentes de carbono no tradicionales con la siguiente composición (Ivonne Jeannette Nieto & Chegwin A., 2010) en g/L: NaNO_3 0.08, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, KH_2PO_4 0.03, KCl 0.01, harina de cereal 30, agar 8. Se ajustó el pH a 5.6 ± 0.1 , se autoclavó a 15 psi - 121°C por 30 minutos. Se colocó un disco de micelio de 5 mm de diámetro (de las cajas de M1) en el centro de la caja de Petri. Las cajas se incubaron a $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en aerobiosis (Chegwin-Angarita, 2014) con luz blanca permanente.

Crecimiento Apical: Se determinó diariamente el crecimiento radial midiendo y registrando el diámetro del micelio en las cajas de Petri con la siembra en superficie mencionada para las dos FC. Se registró la expansión total diaria y la Tasa de crecimiento apical (TCA), calculada tomando las diferencias de crecimiento diario vs la medición del día anterior en un plano simple, obteniéndose así la expansión neta en centímetros del micelio por día, en cada una de las FC empleadas (Fiddy & Trinci, 1976; Quintana-Obregón, Plascencia-Jatomea, Sánchez-Mariñez, Rosas-Burgos, & Cortez-Rocha, 2010).

2.4.3 FEL:

Inóculo: Se tomó micelio en relación de 4 g/L de medio líquido, a partir de cajas de Petri cultivadas en el medio M1.

Fermentación: El inóculo se adicionó a un medio líquido M3, de composición similar al M2, salvo que no se adicionó agar (Ivonne Jeannette Nieto & Chegwin A., 2010). Se ajustó el pH a $5.6 + 0.1$ y se esterilizó en autoclave una primera vez por 30 min. El medio se filtró y nuevamente se autoclavó

a 15 psi - 121 °C por 15 minutos. La fermentación con agitación se realizó durante once días (100 rpm), temperatura $27 \pm 1^\circ\text{C}$ con luz blanca permanente, equipo shaker Thermo–Scientific MaxQ.

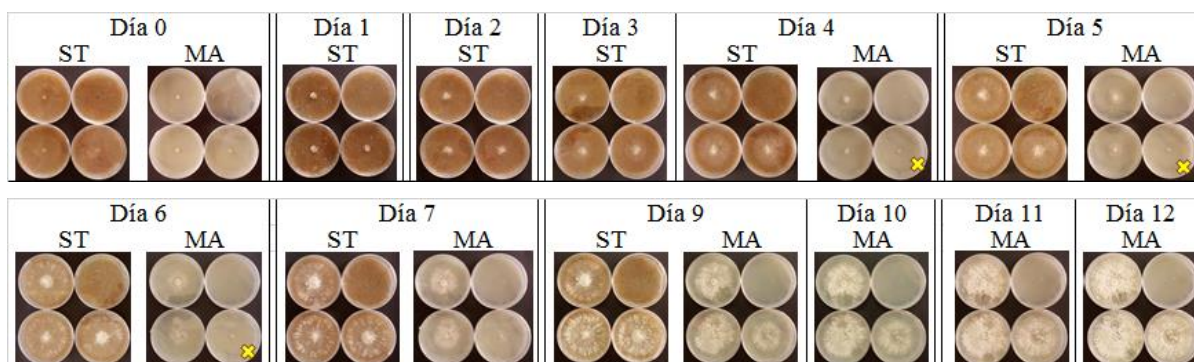
Cinética: Se tomaron diariamente y por triplicado muestras de la FEL para determinar la cinética de crecimiento. El micelio se filtró al vacío empleando papel whatman. La biomasa obtenida se secó hasta peso constante en estufa de calentamiento por conducción a 45°C para evitar descomposición de los compuestos bioactivos (Mora Correa, 2010). Se registró el peso del micelio seco para realizar la curva correspondiente a la cinética de crecimiento (Suárez-Arango, 2012).

2.5 Resultados y Discusión

2.5.1 FeSup y Crecimiento apical

La generación tubular de las hifas en los hongos, se produce de manera apical únicamente (S Bartnicki-Garcia & LIPPMAN, 1972), esta característica incide en la forma particular de las colonias de hongos, las cuales son circulares y presentan expansión radial (Riquelme, Reynaga-Peña, Gierz, & Bartnicki-García, 1998). Con base en esta premisa se efectuó la medición diaria del diámetro de crecimiento de *P. ostreatus* en los dos tipos de medios, Figura 2-1. Los datos de las mediciones tomadas se muestran en la Figura 2-2.

Figura 2-1. Registro fotográfico del crecimiento apical en FeSup para *P. ostreatus* con ST y MA como fuente de carbono. (Las fotos con “X” corresponden a falta de crecimiento)



A partir de los datos representados en la Fig. 2-3, se hace un segundo análisis del crecimiento con base en la TCA, calculada a partir de las diferencias de crecimiento de cada día respecto al día anterior y con estos datos se calcula una regresión lineal. La pendiente en este caso representa la

TCA para la cepa en este medio de cultivo (sin considerar el valor R^2). La Figura 2-4 muestra los resultados de este análisis. Según la regresión, la TCA de *P. ostreatus* en ST es de 0,508 cm/día y en MA es de 0,418 cm/día.

Figura 2-2. Representación del crecimiento apical diario de *P. ostreatus* con harina de ST y de MA como fuente de carbono

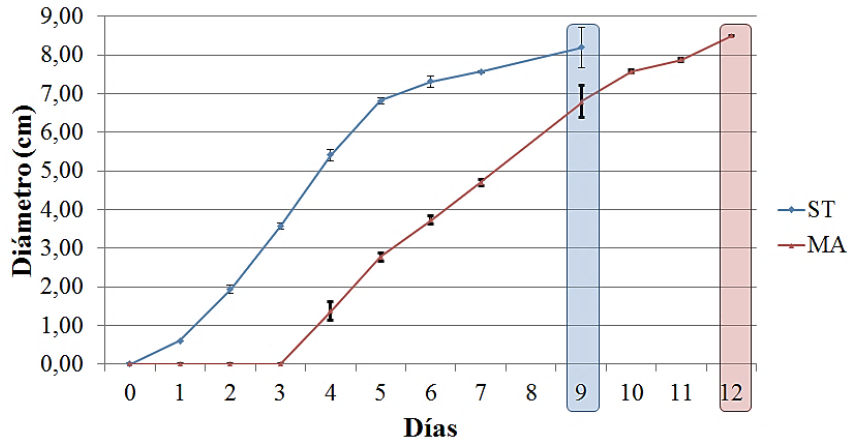
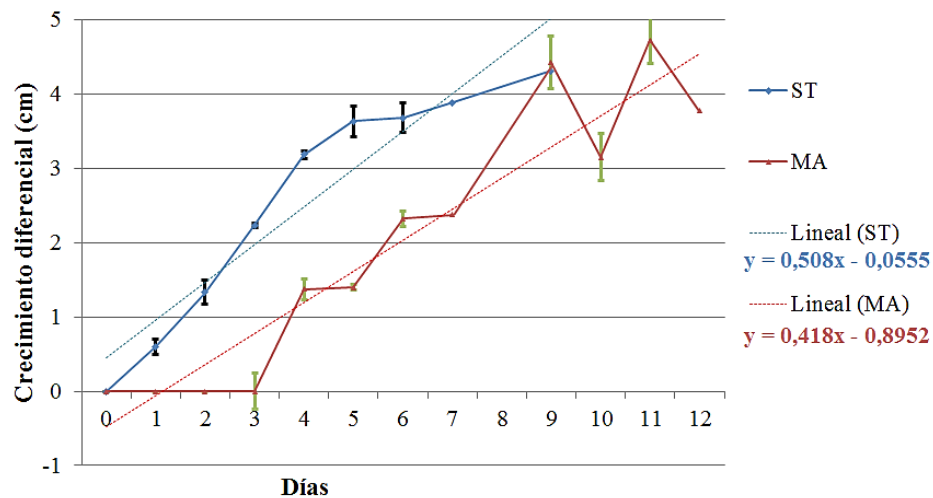


Figura 2-3. Representación de la TCA para *P. ostreatus* con harina de ST y de MA como fuente de carbono



De acuerdo a los datos de la pendiente para cada FC mostrados en la Figura 2-3 (velocidad en cm/día, para ST en color azul y para MA en color rojo), a pesar de que la velocidad de crecimiento en ST fue mayor según el cálculo de la pendiente (Trinci, 1971), se revisa si existen diferencias por punto entre las varianzas de los datos obtenidos. Tras verificar la homocedasticidad de los dos conjuntos

de datos, se aplicó una Prueba t ($\alpha = 0.05$) (Frank & Todeschini, 1994) y se corroboró que no existen diferencias estadísticas entre las dos medias de la TCA para los dos tratamientos ($P > 0,05$), es decir, la varianza de los errores respecto a la velocidad de crecimiento diario del micelio de *Pleurotus* en los dos sustratos es constante y presentan medias estadísticamente similares, por tanto a pesar de influir en el tiempo de inicio de crecimiento del micelio y en la TCA en general (Trinci, 1971), la cepa presenta un comportamiento de crecimiento similar sobre los dos sustratos, a pesar que la comparación cualitativa considerando los días totales de crecimiento apical fue mejor para ST.

Los resultados expuestos permiten deducir que el medio con harina de ST promovió el crecimiento y la expansión miceliar en un tiempo menor respecto al que contiene harina de MA. Sin embargo, la inspección visual evidenció que el grosor del micelio en el medio con harina de ST era menor comparado con el micelio en MA, el cual se observó robusto y grueso a pesar de tardar en iniciar su crecimiento. Por lo anterior la aplicación de la FeSup tradicional (solo medición de la expansión miceliar) para seleccionar la FC proporciona resultados aproximados y parciales, lo que hace necesario el complementarla con la determinación de la densidad miceliar, la cual es importante validar a futuro, con el uso de sustratos no convencionales, para hongos Macromicetos en FeSup (Knudsen & Li, 1990; Vásquez Vanegas, 2013).

Por otro lado, la relación carbono/nitrógeno (C/N) es un parámetro que se ha reportado de influencia significativa para la producción de biomasa y metabolitos (Bespalova, Makarov, Antonyuk, & Ignatov, 2002; S. S. Kim, Lee, Cho, Kim, & Hong, 2010; Lee, Park, Ahn, Ka, & Park, 2007), se tomaron los datos de contenido de C y N provenientes del análisis elemental realizado a todas las harinas empleadas por el grupo de investigación, en los cuales se reporta que para ST el contenido de C es de 41,54% y el de N de 2,73% y para MA es de 40,55% y 1,22% respectivamente. La relación C/N es entonces de 15,22 para ST y de 33,23 para MA, (Chegwin-Angarita & Nieto-Ramírez, 2014; Ivonne Jeannette Nieto & Chegwin A., 2010).

El análisis de los resultados de TCA y su correlación con el valor de C/N podría ayudar a inferir que a mayor relación C/N se produce más biomasa, a pesar que la invasión de micelio no fue la más rápida. Sin embargo, investigaciones previas del grupo (Nieto & Chegwin A, 2012) habían evidenciado que realmente este no es un factor determinante en la producción de biomasa, de manera que el resultado de la FeSup no sería concordante, lo cual corrobora la necesidad de determinar la densidad miceliar (Ivonne Jeannette Nieto & Chegwin A., 2010).

También se podría hipotetizar que valores de C/N altos, influyen negativamente tanto en la velocidad como en el tiempo de inicio de crecimiento para esta cepa de *P. ostreatus*. Para comprobar o desechar esta hipótesis se procede a analizar los constituyentes de las harinas empleadas (Tabla 2-1) (Maes & Delcour, 2002; Ratnayake & Jackson, 2006; Sun, Liu, Qu, & Li, 2008; W. M. Wang, Klopfenstein, & Ponte Jr, 1993)

Tabla 2-1. Relación del contenido de constituyentes y de la porción soluble de cada compuesto para las harinas de ST y MA.

Contenido	ST		MA	
	Total	Soluble (9,2 %) ^a	Total	Soluble (60%) ^b
Almidón	16,7 - 19%	1,46%	71%	71% ^b
Proteína	17 - 18%	3 - 3,1%	7 - 9,3%	2,8 - 3,72%
Carbohidratos no almidonados	46 - 58%	10 - 11%	17,70%	6,10%
-Arabinosilanos	22 - 70%	10%	N.C.	N.C.
-Celulosa	24%	-	N.R.	N.R.
-(1-3),(1-4)-β-glucanos	1,2 - 6%	0,28%	33,30%	20%
Lignina	3 - 10%	-	0,43%	-
Grasa	6%	-	1,30%	-
Azúcares no celulósicos	57 y 58%	4,58%	3,53 + 4,24%	2,12 - 2,54%
-Glucosa	28,60%	2,51%	1,38 - 1,65%	0,26 - 0,31%
-Xilosa	16,90%	1,40%	1,43 - 1,72%	0,24 - 0,29%
-Arabinosa	10,10%	0,83%	0,72 - 0,87%	0,42 - 0,5%
-Manosa	0,60%	0,10%	N.R.	N.R.
-Galactosa	1,90%	0,29%	N.R.	N.R.
Total nutrientes solubles disponibles	19,2 - 19,4%		11 - 12,36%	

N.C.= No contiene. N.R.= No reportan. (-) = Los estudios no señalan disolución de estos compuestos.

^a = Los porcentajes relacionados en la tabla sobre la porción soluble por nutriente, equivalen al total soluble respecto al contenido inicial de la fuente no tradicional trabajada. ^b = El almidón total en el MA se solubiliza, sin embargo, no se considera para el Total de nutrientes solubles en el agar (FeSup), debido a que la amilosa y amilopectina se gelatinizan dificultando su aprovechamiento por parte del hongo. En el medio líquido (FEL), quedan disueltas, con incremento del movimiento molecular y separación completa de los dos polímeros (Ratnayake & Jackson, 2006). Tabla calculada por el autor, a partir de (Camire & Flint, 1991; Dien et al., 2006; Jin, Hsieh, & Huff, 1994; Maes & Delcour, 2002; Ratnayake & Jackson, 2006; Sofi, Wani, Rather, & Wani, 2009; Sun et al., 2008; W. Wang, Klopfenstein, & J.G. Ponte, 1993; W. M. Wang et al., 1993).

Considerando los polisacáridos de fácil absorción por parte del hongo, los monosacáridos con los cuales *Pleurotus* puede transformar a Acetil CoA, que se encuentran disueltos en el medio por efecto del tratamiento térmico, se entiende que el hongo puede iniciar su crecimiento rápidamente, porque tiene al alcance nutrientes “starter” para su metabolismo como la glucosa, carbohidrato que ha sido reportado como la fuente de carbono más estimulante para la producción de micelio (Jonathan & Adeoyo, 2011). De acuerdo a lo analizado en la tabla, el ST contiene mayor cantidad de glucosa y otros monosacáridos disueltos en comparación con el MA, lo cual impulsó el crecimiento micelial del Hongo en el agar.

Existen diferentes estudios que han demostrado que el ST puede aumentar la producción de celulasas en los de Hongos filamentosos (Akpınar & Penner, 2004; Maeda et al., 2004; Sun et al., 2008); así como el hecho de que algunas especies de *Pleurotus*, como *P. ostreatus*, son excelentes descomponedores de lignina (Sławińska & Kalbarczyk, 2011) y dado que el ST presenta en su composición esta sustancia lo convierte en un sustrato de fácil colonización y crecimiento para estas setas (Locci et al., 2008).

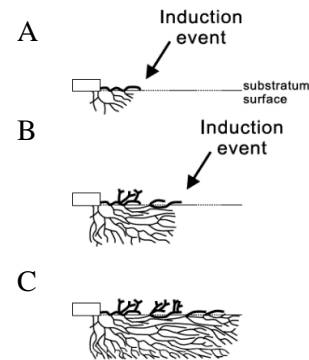
Cabe anotar aquí que, para los dos sustratos se observó, al momento de servir las cajas de Petri, separación y sedimentación de la parte insoluble siendo en el MA el efecto más pronunciado y esto probablemente redujo en mayor medida la biodisponibilidad de monosacáridos en la superficie, lo que sumado a la predominancia del almidón en el sustrato y la baja presencia de los monosacáridos, retrasó el inicio del crecimiento micelial por la reducida presencia de polímeros starter (Sun et al., 2008). La disponibilidad de nutrientes es un factor decisivo para el aumento de las ramificaciones de la hifa, así como la homogeneidad en su desarrollo (Figura 2-4). Esto explicaría las variaciones en las velocidades de crecimiento micelial evidenciadas en ambos sustratos (Figura 2-3), pero más marcado para el MA, ya que si la precipitación del sustrato arrastró consigo los nutrientes vitales para el inicio del catabolismo el hongo, como consecuencia lógica, daría relevancia a la expansión micelial sumergida y posteriormente a la aérea (Camire & Flint, 1991).

Los aumentos y disminuciones en las velocidades de crecimiento evidenciados en la Figura 2-4, también son consecuencia del comportamiento natural de su morfogénesis. El crecimiento se limita al ápice de la hifa, es decir que los hongos se desarrollan mediante crecimiento apical, un proceso muy complejo que requiere el tráfico polarizado de los organelos al ápice celular y la expulsión (exocitosis) de vesículas formadoras de pared hacia las áreas de crecimiento celular activo. En

hongos septados estas vesículas secretoras de enzimas hidrolíticas se acumulan en el ápice celular para formar el Spitzenkörper (Spk), estructura dinámica que determina el crecimiento y la morfología de la hifa y ayuda al suministro de las vesículas y con ellas, las enzimas hidrolíticas que facilitan la elongación de la hifa (Salomon Bartnicki-Garcia, Bartnicki, Gierz, López-Franco, & Bracker, 1995; Cepero de García et al., 2012; Moore, 2002).

Figura 2-4. Esquema del ritmo en el crecimiento.

A: hifas aéreas y sumergidas que crecen alejándose del inóculo (rectángulo), **B:** en respuesta a un evento inductivo, el crecimiento superficial se detiene, puede ser fisiológico o una señal (fluctuación de la luz o temperatura) y promueve la extensión sumergida del micelio que posteriormente es estimulada para ramificarse y extenderse nuevamente en la superficie, restableciendo el crecimiento superficial, **C:** eventos inductivos sucesivos promueven la repetición de este ciclo. Tomado de (Moore, 2002).



En estudios sobre este tópico con especies representativas de los grupos taxonómicos principales (Oomycetes, Zygomycetes, Deuteromycetes, Ascomycetes y Basidiomycetes) se encontró que la posición taxonómica, la presencia y el patrón de organización de los Spk variaba, haciendo que la tasa de elongación de la hifa nunca fuera estable fluctuando continuamente, con alternancia de períodos de crecimiento rápido y lento, a intervalos más o menos regulares. Así mismo, se notaron diferencias en la TCA (López-Franco, Bartnicki-Garcia, & Bracker, 1994; Moore, 2002), tal y como se observó en la presente investigación con el *P. ostreatus* nativo.

No se debe dejar de lado los reportes que ponen de manifiesto que con el empleo de MA se reduce la actividad de agua (Duodu et al., 2002), parámetro de vital importancia para el desarrollo de los hongos cuando se emplea FeSup, afectando la TCA (Biliaderis, 1991; Gervats, Molin, Grajek, & Bensoussan, 1988; Jeanne & Trinci, 1987). Adicionalmente, la reducción de la actividad de agua también puede estar afectando la biodisponibilidad del calcio en el medio y es conocido que la ausencia de este catión afecta la TCA (Schmid & Harold, 1988).

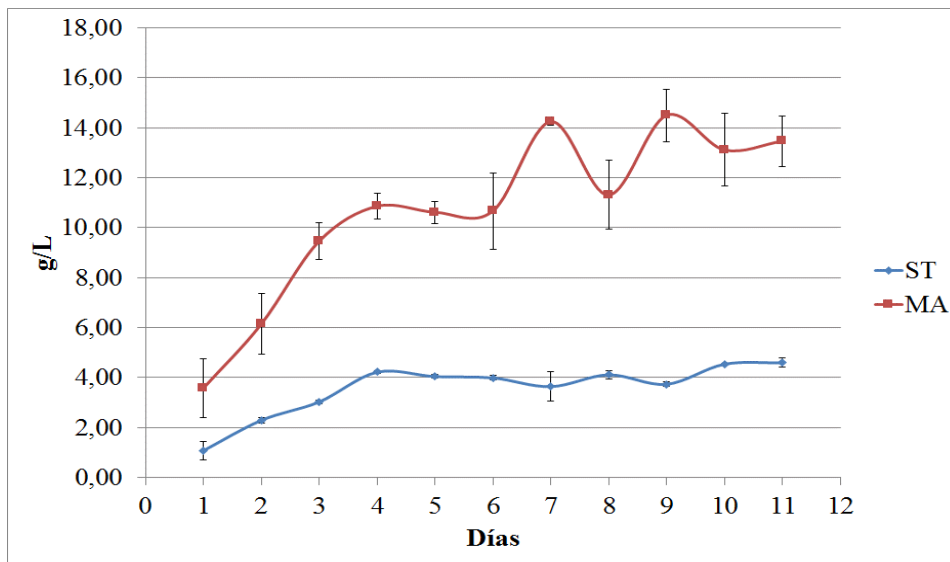
Sin embargo, es la relación íntima del hongo con el sustrato y la inducción de la producción de amilasas de manera tardía, lo que afecta en mayor medida el crecimiento, resultados concordantes con los estudios reportados de (Kunamneni, Permaul, & Singh, 2005; Nandakumar, Thakur,

Raghavarao, & Ghildyal, 1999), en los que se determina que un sustrato con ST presenta las mejores características de crecimiento comparado con otro que contiene MA. Este comportamiento enzimático explicaría, en el caso del MA, que *P. ostreatus* se queda en estado de “latencia” mientras logra obtener suficientes polímeros starter para poder inducir su producción de amilasas y aprovechar este medio de cultivo, fenómeno también observado en *A. niger*, en el cual los autores definieron a la glucosa como un compuesto represor del catabolismo (Nandakumar et al., 1999).

2.5.2 FEL

Luego de analizar los resultados obtenidos de la aplicación de la FeSup para la selección de la FC y encontrar que, si bien el crecimiento apical fue más rápido en ST, la inspección visual del micelio permitió inferir una mayor potencialidad como medio de cultivo al que contiene MA, se decidió realizar la FEL con las dos harinas para confirmar o descartar esta apreciación. Los resultados del micelio seco obtenido y la correspondiente cinética de crecimiento se expresan en la Figura 2-5.

Figura 2-5. Cinética de crecimiento de *P. ostreatus* obtenido por FEL con el empleo de ST y MA como Fuentes de Carbono



Las curvas de la cinética presentan diferencias lo cual era de esperarse ya que la FC es diferente. Es así como con ST se obtiene una curva normal para el desarrollo del organismo con una fase estacionaria relativamente grande, mientras que al emplear MA se alcanza a observar la posible presencia de un crecimiento diauxico con dos fases exponenciales separadas por una fase

estacionaria corta, comportamiento probablemente inducido tanto por la presencia de monosacáridos solubles como de los polímeros del almidón, señalado en la Tabla 2-1, los cuales requieren rutas anabólicas diferentes (Nandakumar et al., 1999). Igualmente, el decaimiento es mucho más pronunciado con MA lo cual puede ser debido a una mayor producción de enzimas hidrolíticas como quitanasas y β - glucosidasas que hidrolizan los carbohidratos de las paredes de las células fungales, comportamiento detectado ya en estudios realizados en *P. tuber-regium* (Wu, Cheung, Wong, & Huang, 2003).

El análisis de los resultados permitió determinar que la obtención de biomasa por FEL fue mayor con el empleo de MA (14,50 g/L) que de ST (4,60 g/L), corroborando lo observado en la FeSup, en donde se detectó visualmente una densidad micelar mayor al emplear MA. El rendimiento obtenido con el empleo de esta FC es muy superior a los reportados para *P. ostreatus* y *P. sajor-caju* en medios enriquecidos, en los que los títulos de biomasa están entre 1,16 y 7,35 g/L. (S. W. Kim, Hwang, Park, et al., 2002). Para el caso de *P. pulmonarius* cultivado con fuentes de carbono definidas como glucosa, xilosa, arabinosa y galactosa, el mejor rendimiento de biomasa (9,07 g/L) se presentó con glucosa (Smiderle et al., 2012). Lo anterior pone de manifiesto que la producción de biomasa se ve favorecida con el uso de la harina de MA, lo cual representa un bajo costo considerando que no tuvo adición de fuente de carbono o nitrógeno adicional.

La mayor producción de biomasa en FEL con MA probablemente se debe a que el acceso a la glucosa indujo rápidamente la producción de amilasas, por lo cual el hongo pudo aprovechar rápidamente el contenido de almidón en el medio y lograr una bioconversión eficiente (Nandakumar et al., 1999; Wu et al., 2003). El alejamiento con respecto al comportamiento normal de una cinética de crecimiento y que se observa especialmente en la correspondiente al empleo de MA (Figura 2-5), puede ser inducido por el mismo Hongo. Comportamientos similares ya se han reportado cuando se emplea FEL con agitación (Maria Papagianni et al., 2001).

2.6 Conclusiones

- Para la cepa nativa de *P. ostreatus*, se encontró que la fuente de carbono adecuada para la mayor producción de biomasa es la harina de MA.
- La FeSup tradicional no se constituye por sí sola como el mejor método para la selección del medio de cultivo con miras a su empleo en FEL. Adicionalmente la velocidad de

crecimiento del micelio en FeSup no está directamente relacionada con la cantidad de biomasa producida.

- En FeSup la más rápida expansión del micelio con harina de ST como FC se debe posiblemente a que éste posee, por su solubilidad en el medio acuoso empleado para la preparación del medio de cultivo, una mayor cantidad de monosacáridos y otros sustratos de fácil asimilación para la seta.
- El inicio tardío de la producción de micelio cuando se emplea harina de MA como FC puede obedecer a la afectación de la disponibilidad de la amilosa y amilopectina por efecto de su gelatinización en el agar.
- El volumen empleado en la FEL influye directamente en el tiempo de obtención máxima de biomasa, comprobando la influencia de las propiedades reológicas del medio de cultivo, que inciden directamente en la oxigenación y por ende en el desarrollo del hongo

3. Capítulo: Determinación del carácter funcional de la biomasa fúngica obtenida biotecnológicamente

3.1 Resumen

Cuando se desea la obtención de un alimento funcional, mediante la adición de biomasa fúngica a una matriz alimentaria, se hace prioritario determinar el carácter funcional de la misma. Dado que los bioactivos fúngicos de interés por sus efectos hipocolesterolémicos son los esteroides y los β -glucanos, se evaluó su contenido en el micelio obtenido por fermentación en estado líquido (FEL) de una cepa nativa colombiana de *P. ostreatus*, mediante el empleo de fuente de carbono no tradicional (FC). Así mismo, se definió la producción de los metabolitos esteroides a lo largo de la fermentación para definir la duración de la misma y para los días con mejor relación mg esteroides/g micelio la producción de β -glucanos por su cuantificación mediante técnicas espectrofotométricas, cuando se requiere la consecución de la biomasa con mayor potencial. Con base en los resultados obtenidos se determinó que el uso de la harina de maíz amarillo (MA) como FC estimuló la biosíntesis de los bioactivos, obteniéndose una mayor producción de ellos en el día 11 de la fermentación. En el caso particular de los esteroides, el llevar el proceso biotecnológico hasta ese día trae como resultado un micelio poseedor de esteroides con estructuras ergostánicas y estigmastánicas, reconocidas clínicamente como potentes agentes hipocolesterolémicos. La unión de las bioacciones de los metabolitos presentes en el producto biotecnológico lo posicionan como un excelente candidato para su empleo como ingrediente en alimentos funcionales.

Palabras clave: *Pleurotus ostreatus*, micelio, esteroides, fermentación líquida, carácter funcional.

3.2 Abstract

The research work focused to obtaining a functional food by addition of fungal biomass into a food matrix most to search and to determine the functional character of that mycelium. Sterols and β -glucan are the fungal bioactive of interest due their hypocholesterolemic effects, so they were quantified such as bio-compounds contents in the mycelium of a Colombian native strain of *P. ostreatus*, which was obtained by liquid-state fermentation (LSF) by employing untraditional carbon source (CS). Likewise, production of metabolites along fermentation was determined to define the length thereof, because of it is relevant to define the required biomass with the highest potential. Based on the results, it was determined that the media with yellow cornmeal flour (YC) stimulates the biosynthesis of bioactive compounds and increased production of them was on the eleventh (11th) day of LSF. In the particular case of sterols, the fact of carry the bioprocess until the 11th day results in a mycelium with some kind of sterols with ergosta and stigmasta nucleus clinically recognized as potent hypocholesterolemic agents. The union of the biological action of these metabolites into the biotechnological biomass product improves and position it as an excellent candidate for using such as an ingredient in functional foods.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*, mycelium, sterols, liquid-state fermentation, functional character

3.3 Introducción

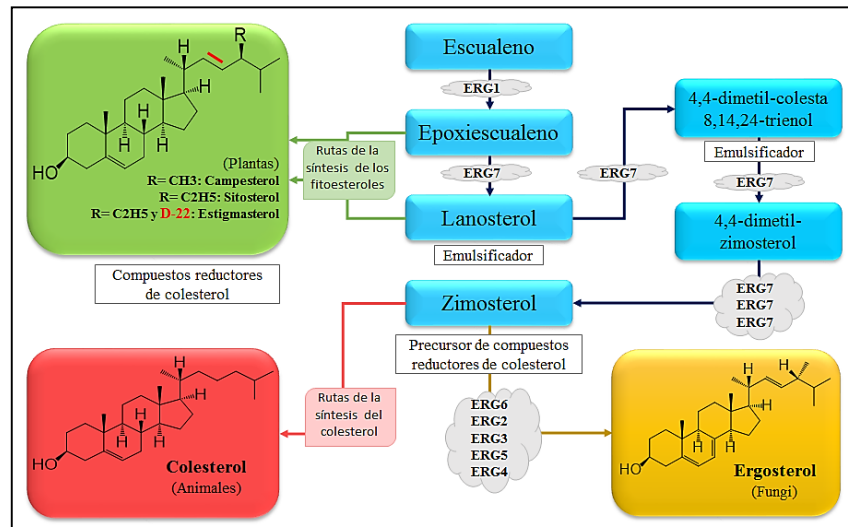
Según la definición de DeFelice, un "nutracéutico es un alimento (o parte de un alimento) que proporciona beneficios médicos o de salud, incluyendo la prevención y/o tratamiento de una enfermedad" (Scicchitano et al., 2014). El término se relaciona estrechamente con "alimentos funcionales", definidos como "cualquier alimento o ingrediente alimentario que puede proporcionar un beneficio para la salud más allá de los nutrientes tradicionales que contiene (Ross, 2000).

Estas definiciones generales, así como las presentadas en el Capítulo 1, se relacionan con una gran variedad de compuestos que pueden estar en una dieta normal. Una definición más exacta fue la dada por el Bureau of Nutritional Sciences of the Food Directorate of Health Canada, que define a un alimento funcional como aquel que "es similar en aspecto a un alimento convencional, se consume como parte de una dieta habitual, pero que tiene beneficios fisiológicos o que reduce el riesgo de enfermedades crónicas más allá de las funciones nutricionales básicas ". Dado que estas actividades

biológicas son proporcionadas por la presencia dentro del alimento de compuestos tales como esteroides, ácidos grasos, polisacáridos entre otros (Scicchitano et al., 2014), cuando se desea obtener un alimento funcional es indispensable determinar el denominado “carácter funcional” del o los ingredientes a adicionar al “alimento convencional”, mediante la determinación de la presencia y contenido de los compuestos responsables de las bioacciones.

Es bien conocido que los constituyentes bioactivos más representativos de los hongos son los compuestos de carácter triterpenoidal (triterpenos y esteroides) y los polisacáridos (Dutta, 2013; Ioannis Giavasis, 2014; Kalač, 2012; Márquez-Fernández et al., 2014). Los esteroides son constituyentes lipídicos esenciales de las membranas en las células eucariotas. Las características de los esteroides difieren entre especies, mientras que los mamíferos y las células fúngicas contienen principalmente colesterol y ergosterol (respectivamente) en mayor concentración, las plantas tienen perfiles de esteroides complejos, dominados por el sitosterol, estigmasterol y campesterol (Wriessnegger & Pichler, 2013) y definidos para todos por sus rutas biosintéticas (Figura 3-1).

Figura 3-1. Rutas de la biosíntesis de los esteroides iniciando desde el escualeno, junto con los intermediarios y productos finales en hongos (amarillo), plantas (verde) y animales (rojo).



ERG = enzimas; ERG1: escualeno epoxidasa, ERG2: C-8 esteroil isomerasa, ERG3: C-5 esteroil desaturasa, ERG4: C-24(28) esteroil reductasa, ERG5: C-22 esteroil desaturasa, ERG6: C-24 esteroil metil transferasa, ERG7: lanosterol sintasa, ERG11: C-24 esteroil demetilasa, ERG24: C-14 esteroil reductasa, ERG25: C-4 metil esteroil oxidasa, ERG26: C-3 esteroil dehidrogenasa, ERG27: 3-ceto esteroil reductasa. Tomado de (Wriessnegger & Pichler, 2013).

Los excesos en la dieta han llevado al aumento progresivo de los niveles de colesterol, debido a que en el hombre, además de la síntesis biológica en las células hepáticas por la ruta del Acetil CoA (Ganong & Barrett, 2005), también lo asimila a través de la dieta, en una relación 50/50 (Fuhrman, Elis, & Aviram, 1997; Wilson & Rudel, 1994). Esto conduce a la formación de ateromas, los cuales reducen el diámetro de paso del flujo sanguíneo e induce el desarrollo de enfermedades de tipo coronario, aterosclerosis, cálculos biliares, entre otros. Por otro lado, estos “quistes sebáceos” pueden soltarse del endotelio y desplazarse por el sistema circulatorio, generando riesgos de obstrucción de canales de menor diámetro cuyo evento se relaciona con enfermedades como la trombosis, los infartos, etc. (D. Q.-H. Wang, 2007; Wilson & Rudel, 1994).

Una manera de combatir el exceso de colesterol en etapas tempranas, es mediante el manejo de la dieta con reducción del consumo de alimentos de origen animal principalmente y el aumento del consumo de semillas y vegetales, los cuales aportan sus fitoesteroles y estos de manera natural, por un mecanismo de competencia física, reducen la absorción del colesterol en el lumen, ayudando a la reducción de sus niveles en suero (Genser et al., 2012; Katan et al., 2003). Otra alternativa no farmacológica la constituye la introducción a la dieta de esteroides fúngicos, ya que está comprobado que actúan como compuestos hipocolesterolémicos por mecanismos biológicos similares a los presentados por los fitoesteroides (AbuMweis, Barake, & Jones, 2008; Da Silva et al., 2015; Gylling et al., 2014; Katan et al., 2003; Maki & Rains, 2011; Patch, Tapsell, Williams, & Gordon, 2006). Se ha determinado que al alimentar hámster con cuerpos fructíferos de *Auricularia auricula*, *Tremella fuciformis* (Cheung 1996), *Volvariella volvacea* (P. C. K. Cheung, 1998) y *P. ostreatus* (Bobek et al., 1998) se reducían los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en sangre, efecto también presentado con la ingesta de micelio de *Pleurotus* obtenido por FEL (Dos Santos et al., 2013).

Adicionalmente, Gil-Ramírez *et al.*, evidenciaron el potencial hipocolesterolémico de tres matrices alimentarias (manteca de cerdo, mantequilla y chocolate blanco) enriquecidas con ergosterol extraído de *A. bisporus* con la misma potencia que ofrecen los fitoesteroides (Gil-Ramírez et al., 2014). Encontraron además que el extracto de *A. bisporus* enriquecido con ergosterol y otros esteroides fúngicos, reducía la producción de triglicéridos hepáticos y regulaba la expresión del mRNA de los genes relacionados con la síntesis del colesterol (Gil-Ramírez et al., 2015), es decir, mostraron efectos no solo a nivel de absorción sino también a nivel epigenético.

En relación a los polisacáridos, muchos biopolímeros fúngicos han mostrado tener efectos hipolipidémicos mediados por la interrupción de la circulación de los ácidos biliares, lo cual resulta en el incremento de la excreción de compuestos grasos (Ioannis Giavasis, 2013; Lakhanpal & Rana, 2005). Específicamente los β -glucanos fúngicos, como los extraídos de *L. edodes*, *G. lucidum*, *S. commune*, *Sclerotium rolfsii*, *G. frondosa*, *A. blazei*, *Cordiceps militaris*, *Cordiceps sinensis*, *P. ostreatus* y *S. cerevisiae*, han probado reducir los niveles de colesterol en sangre con efectos sinérgicos hipolipidémicos e hipoglicémicos, (Ioannis Giavasis, 2013, 2014; Lakhanpal & Rana, 2005). Estudios a nivel molecular han evidenciado que el efecto de los β -glucanos se relaciona con el atrapamiento de los ácidos biliares en el lumen intestinal para facilitar su exclusión y así disminuir los ácidos biliares que llegan al torrente sanguíneo a través de la circulación entero-hepática, lo que lleva a la reducción de la absorción del mismo a nivel de plasma como principal mecanismo hipocolesterolémico (Chen & Huang, 2009). Estudios *in vivo* con roedores también presentaron efectos de modificación de la expresión de genes con la síntesis del colesterol, presentando un resultado en la disminución similar al de estatinas aun cuando los mecanismos de acción no están claramente establecidos, llegando incluso a reducir los niveles de triglicéridos en el hígado. Esto fue observado con extractos acuosos de *L. edodes* que contenía principalmente α / β glucanos y fucomanogalactanos, suministrado a ratones normales y con problemas de colesterol (Gil-Ramirez et al., 2016).

Con base en las evidencias anteriores, así como en la alta incidencia en nuestro país de hipercolesterolemia y de las enfermedades relacionadas con esta patología (Capítulo 1), se planteó como objetivo de esta parte de la investigación la evaluación del carácter funcional presentado por el micelio de *P. ostreatus* obtenido por FEL, empleando como sustrato MA, mediante la determinación del contenido de esteroides, polisacáridos y β -glucanos. Así mismo, a través del seguimiento de la producción de bioactivos a lo largo de la fermentación, definir el día más propicio para la obtención de un producto biotecnológico con potencial hipocolesterolémico, aspecto este último no reportado hasta el presente.

3.4 Materiales y Métodos

3.4.1 Cepas:

Se trabajó con una cepa de *Pleurotus ostreatus* nativo, proporcionada por el Laboratorio de Ingeniería Química (LIQ) de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. La cepa fue

cultivada en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en condiciones de aerobiosis y oscuridad. Se tuvo almacenada en refrigeración, $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y se conservó como cepa de trabajo.

3.4.2 FEL:

Se realizó con las condiciones descritas en el Capítulo 2.

3.4.3 Determinación estructural y de contenido de esteroides

Obtención del extracto: Al micelio seco obtenido se le realizó extracción asistida por ultrasonido (Ultrasonido Elma E 30H, marca Elmasonic) empleando como disolvente extractante diclorometano (DCM) (Sigma – Aldrich) a 37°C por 30 min. con repetición del proceso hasta Liberman-Burchard negativo (Sabir, Hayat, & Gardezi, 2003). Posteriormente se concentró por rotaevaporación. Este mismo procedimiento se aplicó diariamente a la biomasa hasta finalizar el proceso biotecnológico. En cada una de las FC se hicieron triplicados sin micelio del medio líquido bajo las mismas condiciones de cultivo de FEL, y posteriormente se hicieron extracciones con DCM.

Control cromatográfico de la producción de esteroides a lo largo de la FEL: Con los extractos obtenidos diariamente se realizó cromatografía en capa delgada (CCD) utilizando cromatofolios DC-aluminium sheets, 20 x 20, Silica gel 60 F₂₅₄ de Merck®, para observar de manera preliminar la variedad de los metabolitos producidos durante la FEL y el aumento o reducción de los productos metabólicos durante la fermentación, para cada sustrato, así como la variación, si la hubiere, de los biometabolitos producidos por el hongo. Se empleó como solvente DCM-metanol (98:2), como revelador universal luz ultravioleta (254 nm y 366 nm) y como revelador específico para esteroides ZnCl_2 al 30% en metanol.

Cuantificación de esteroides totales: Se empleó el método colorimétrico de Liberman-Burchard (Sabir et al., 2003) a partir de una curva de calibración con estigmasterol (Sigma®) en un rango de concentraciones entre 0,0143 mg/ml y 0,31 mg/ml con 10 niveles, evaluación de linealidad de la curva $>99\%$ y $R^2 = 0,98$. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro marca VARIAN – Cory 50 Conc, a una longitud de onda de 640 nm. Los datos experimentales fueron sujetos a un análisis multivariante con el programa Excel 2016, con base en los resultados de los triplicados realizados para cada caso.

Caracterización de los esteroides: Se seleccionaron para la determinación estructural, los extractos provenientes de los dos días con la mejor relación de triterpenoides/micelio producido. Se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (CG-EM), en un equipo Trace GC ultra con detector de trampa de iones, modelo ITQ 900 S/N MS 1105627 y S/N Trace GC Ultra 620111123 (°T inyección =300°C, Rango m/z = 60 – 500, IE positivo, Solvente delay = 3 min., T inicio: 60°C por min., variación 7.4°C/min. Hasta 300°C por 15 min., tiempo 48,43 min., Split: 1/10, Flujo: 1,5 mL/min constante). La determinación estructural se realizó con base en la biblioteca del grupo y al análisis de sus espectros de masas.

3.4.4 Determinación del contenido de polisacáridos y β -glucanos

Se aplicó para los días con mejor relación mg esteroides/g micelio de acuerdo a lo mencionado en 3.4.3. La extracción de los polisacáridos del micelio se realizó por tratamiento con agua caliente (95°C) y posterior precipitación de los polisacáridos con etanol frío (Shcherba & Babitskaya, 2004). El precipitado se centrifugó en un equipo Hettich zentrifugen D-78532 Tuttlingen, Universal 32 R, condición de refrigeración (8°C) a 10000 rpm por 10 min. (Shcherba & Babitskaya, 2004).

El contenido de IPS totales se determinó empleando el método colorimétrico de Dubois modificado (Ávila Núñez, Rivas Pérez, Hernández Motzezak, & Chirinos, 2012). Los cálculos se efectuaron a partir de una curva de calibración con glucosa en un rango de concentraciones de 10 μ g/ml a 100 μ g/ml con 5 niveles, evaluación de linealidad de la curva >95% y $R^2= 0,98$. Igualmente se estableció el contenido de β -glucanos por el método colorimétrico de Nitschke modificado (Semedo, Karmali, & Fonseca, 2015). Se trabajó una curva de calibración con β -glucanos (70% de pureza) de *Ganoderma lucidum* suministrados por la empresa PROGAL BT, con un rango de concentraciones de 56 μ g/mL a 280 μ g/mL con 6 niveles, evaluación de linealidad de la curva >95% y $R^2= 0,99$. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro marca Varian modelo Cory 50 Con a 490 nm, con evaluación de la linealidad de la curva >95%. Los datos experimentales se sometieron a un análisis descriptivo de los datos obtenidos con el programa Excel 2016.

3.5 Resultados y Discusión

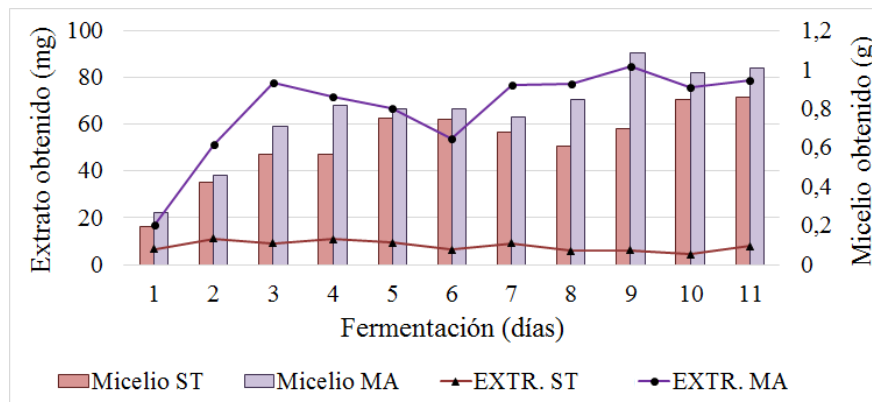
3.5.1 Confirmación, con base en la producción de bioactivos triterpenoidales, de la FC seleccionada

Si bien, por producción de biomasa, se escogió MA como la mejor FC, trabajos previos del grupo permitieron determinar que para *P. ostreatus* la mayor producción de esteroides se obtenía con el empleo de ST (Chegwin-Angarita & Nieto-Ramírez, 2014) y dado que se requiere una biomasa con gran valor nutracéutico (buena relación biomasa/bioactivos), se efectuó un análisis comparativo de la cantidad de extracto de compuestos triterpenoidales utilizando tanto la harina seleccionada como el ST, con la finalidad de tener una mayor seguridad de la elección de la FC y su utilización para la producción biotecnológica del hongo, con miras a la elaboración del alimento funcional.

Dado que la cantidad de micelio obtenido era tan pequeña se tomó el total de la biomasa obtenida en los triplicados, de manera que se obtuvo un único extracto por día. Como no siempre la mayor producción de biomasa coincide con la mayor producción de bioactivos, se realizó la extracción y cuantificación de los esteroides, producidos a lo largo de la fermentación, con la biomasa proveniente de la FEL con el empleo de ST y MA como FC.

La Figura 3-2 muestra la cantidad de extracto en DCM junto con la producción de biomasa con las 2 FC y permite ver claramente no sólo la diferencia entre la cantidad de extracto para cada día, sino que evidencia la diferencia tan grande en la producción de los bioactivos de interés, resultado que dio más razones para tomar MA como la FC a escoger para un proceso biotecnológico exitoso.

Figura 3-2. Extracto (mg) vs. Micelio (g) de *P. ostreatus* en los sustratos de ST y MA

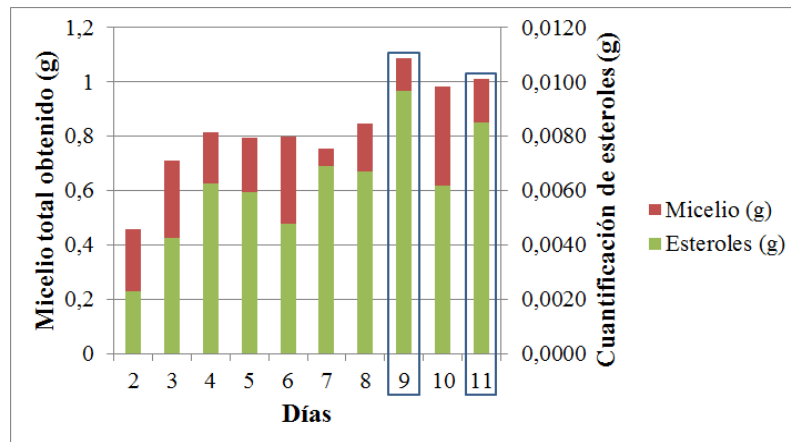


3.5.2 Determinación cuantitativa de esteroides

Con base en el resultado anterior se realizó la cuantificación de esteroides con el extracto proveniente del micelio en FEL con MA. Esta determinación se requiere ya que el disolvente empleado no sólo extrae esteroides sino otros compuestos triterpenoidales, junto con ácidos grasos. En la Figura 3-3, se presenta el comportamiento en la producción de esteroides entre los días 2 y 11 de la FEL.

Como se aprecia en la figura 3-2, los dos días con la mayor producción de esteroides y micelio corresponden al 9 y 11 (con 0,89% y 0,84% de concentración de esteroides en base seca respectivamente). Dado que lo buscado es buena producción de biomasa y de bioactivos, el día a seleccionar sólo con base en cantidad, sería el día 9. Sin embargo, la escogencia definitiva depende de la riqueza estructural de los bioactivos, lo que se analizará posteriormente. Se hizo cuantificación para las FC sin inóculo dando resultado negativo para la presencia de esteroides en el medio líquido. Cabe anotar en este punto que, aun cuando en la cinética de crecimiento (Cap. 1) se obtuvo la mayor producción de biomasa para los días 7 y 9 de la fermentación, al realizar el proceso en mayor escala se pueden presentar variaciones en la producción de biomasa debido a que se presentan cambios en las propiedades reológicas del medio de cultivo (mayor viscosidad), lo que trae como consecuencia una menor oxigenación y por ende cambios en el desarrollo del organismo, que en algunas ocasiones modifica el día de mayor producción de biomasa (Fazenda, Seviour, McNeil, & Harvey, 2008), lo cual se presentó en este estudio, en donde el día 7 no corresponde a la mayor producción de micelio.

Figura 3-3. Producción de biomasa y esteroides en *P. ostreatus* obtenido por FEL empleando MA como FC



3.5.3 Determinación del contenido de polisacáridos y β -glucanos

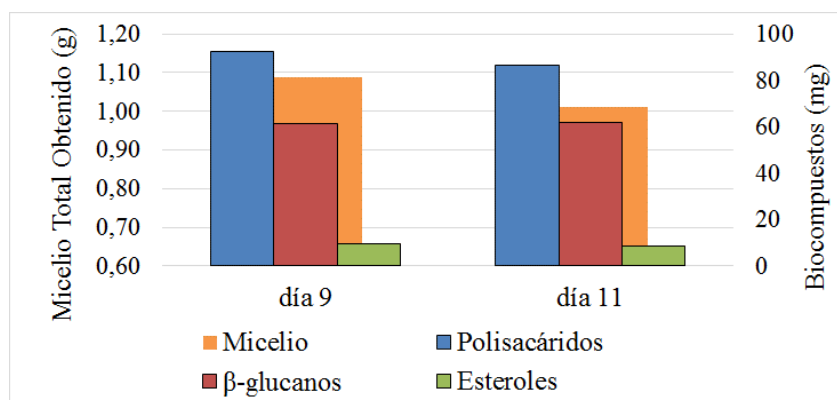
Como el carácter funcional que se busca está dado no sólo por los esteroides sino también por los polisacáridos fúngicos en general y los glucanos en particular, ya que son estos los responsables de la actividad hipocolesterolémica (P. C. K. Cheung, 1996), era necesario conocer el contenido de estos metabolitos para los días donde se encontró la mejor relación mg/esteroides/g micelio. La Tabla 3-1 muestra los resultados de esta cuantificación junto con la de los esteroides y la biomasa obtenida, los cuales se presentan de forma gráfica en la Figura 3-4.

El análisis de estos resultados permitió determinar que es efectivamente el día 9 de la fermentación el que lleva a la obtención de la biomasa con mayor contenido de bioactivos, lo que le proporciona un mejor carácter funcional y por lo tanto la posiciona como un buen candidato para, mediante su inclusión a una matriz alimentaria, obtener un nuevo alimento funcional.

Tabla 3-1. Cuantificación de biocompuestos y del micelio de *P. ostreatus* obtenido en FEL empleando como FC a MA

	día 9	día 11
Polisacáridos (mg)	92,3590	86,5789
β-glucanos (mg)	61,4450	61,7634
Esteroides (mg)	9,6700	8,5296
Micelio (g)	1,0872	1,0098

Figura 3-4. Producción de biomasa y contenido de polisacáridos totales, β -glucanos y esteroides en *P. ostreatus* cultivado por FEL empleando MA como FC.

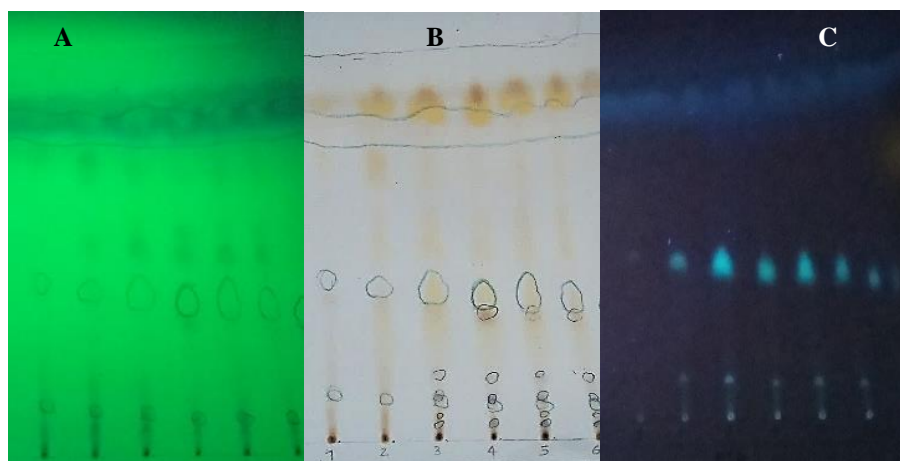


3.5.4 Determinación estructural de esteroides y compuestos triterpenoidales

Con la finalidad de tener una idea preliminar sobre el comportamiento en la producción de los bioactivos a lo largo de la fermentación se realizó una CCD de los extractos provenientes de la biomasa (Fig. 3-5).

El comportamiento cromatográfico indica que no hay variación en la clase de metabolitos presentes en el extracto, pero si en la concentración de los mismos, comportamiento concordante con la producción por parte del hongo de los metabolitos secundarios, ya que a mayor tiempo de fermentación hay menor concentración de nutrientes en el medio generando condiciones de estrés y por lo tanto haciendo que el hongo en respuesta biosintetice más cantidad de estos metabolitos. Como se indicó con anterioridad el extracto en DCM del micelio obtenido biotecnológicamente contiene esteroides junto con otros compuestos de carácter triterpenoidal y ácidos grasos. El revelado con $ZnCl_2$ en metanol indica la presencia de los bioactivos de interés (Popescu, Culmes, & Gird, 2015). Para determinar la identidad de los mismos se realizó el análisis mediante CG-EM.

Figura 3-5. Cromatograma de los extractos en DCM de la biomasa de *P. ostreatus* obtenido con el empleo de MA a diferentes días de fermentación.



(A) Revelado con UV 365 nm., (B) Revelado con $ZnCl_2$ en metanol y (C) Revelado con UV 254 nm.

Los cromatogramas de gases (Fig. 3-6) presentan el perfil típico para extractos orgánicos de biomasa fúngica, en los cuales se pueden delimitar dos zonas de interés: La comprendida entre 15 y 25 min. en la que aparecen los ácidos grasos y sus ésteres y aquella que se encuentra entre 30 y 40 min, en

donde se ven los picos correspondientes a los compuestos de carácter triterpenoidal (esteroles, triterpenos y cetotriterpenoides).

Si bien se había determinado que por cantidad de bioactivos era la biomasa obtenida en el noveno día de la fermentación la que presentaba mayor potencial, al realizar la comparación entre el cromatograma de los compuestos triterpenoidales biosintetizados al día 9 (Fig. 3-6, A) y los del día 11 (Fig. 3-6, B) se ve claramente una mayor variedad estructural en éste último día, lo que le podría dar un mayor carácter funcional.

La determinación estructural realizada con base en la comparación con la biblioteca del grupo (por presencia o ausencia de picos diagnósticos en sus espectros de masas) y lo reportado en literatura, permitió identificar como constituyentes del extracto a 7 compuestos de carácter triterpenoidal (Tabla 3-2 y Tabla 3-3).

Figura 3-6. Cromatogramas de gases para los extractos en DCM del micelio de *P. ostreatus* cultivado por FEL con el empleo de MA como FC (A= día 9, B= día 11)

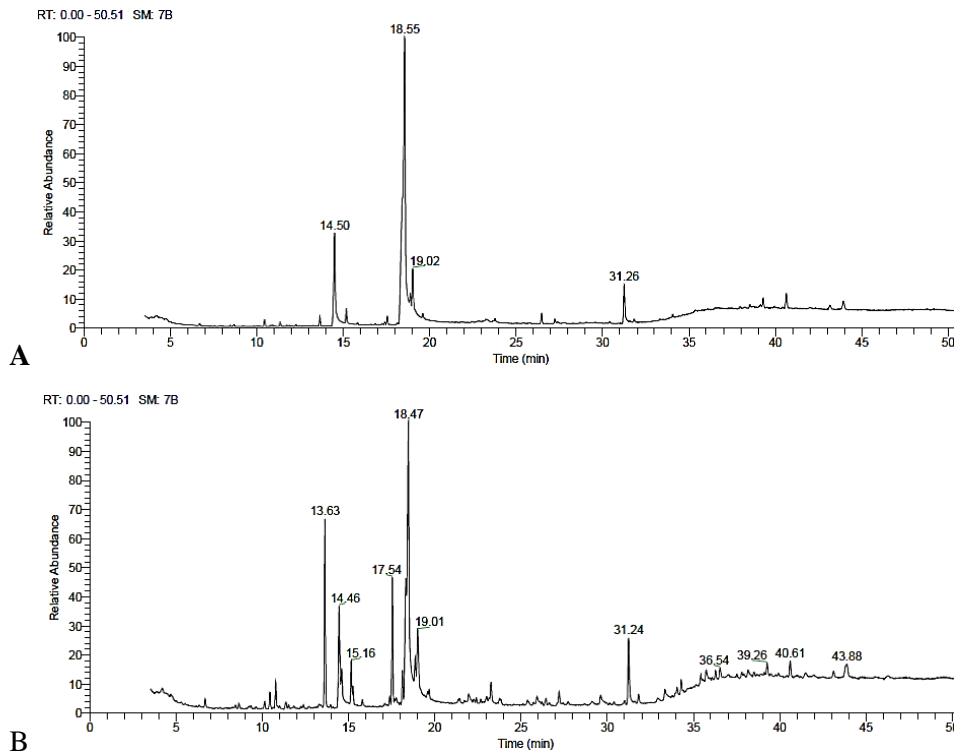
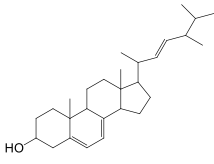
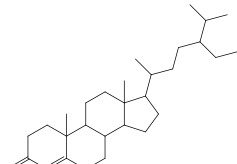
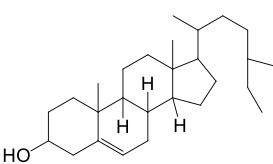
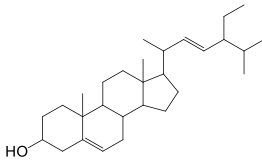
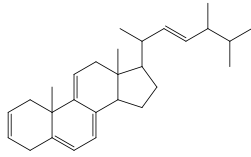
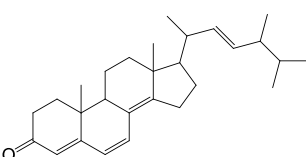
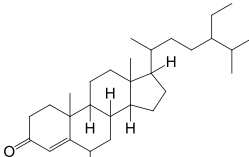


Tabla 3-2. Compuestos identificados en el micelio de *P. ostreatus* en FEL con MA con base en sus fragmentaciones características en Espectrometría de Masas

t_r	Compuesto	M⁺ (u.m.a)	Reportado anteriormente en	Referencia
34.04	Ergosta- 2,5,7,9(11),2 2-pentaeno	376	<i>P. ostreatus</i> , <i>P. pulmonarius</i> y <i>P. djamor</i> , <i>P. sajor-caju</i>	(Chegwin-Angarita & Nieto- Ramírez, 2014; Ivonne J Nieto & A., Chegwin, 2008)
39.27	Estigmast-5- en-3β-ol (estigmasterol)	414	<i>Laetiporus sulphureus</i> y en <i>Inonotus obliquus</i> nativo	(Y. J. Kim, Park, Min, & Shim, 2011; Ivonne J Nieto & Cucaita, 2007)
39.48	Ergosta- 4,6,8(14),22- tetraen-3-ona	392	<i>Penicillium herquei</i> , <i>P. sajor-caju</i> <i>Scleroderma polyrhizum</i> , <i>Polyporus umbellatus</i>	(Gonzalez, Barrera, & Tolfdo Marante, 1983; Lee, Park, Ahn, Park, & Lee, 2005; Marinho, Marinho, & Filho, 2009; Ivonne J Nieto & A., Chegwin, 2008)
37.00	Ergost- 5,7,22-trien- 3β-ol (ergosterol)	396	<i>Pleurotus sajor-caju</i> cultivado en FEL y <i>P. ostreatus</i> nativo; otras setas colombianas encontradas por el grupo: <i>G. austral</i> , <i>L. laccata</i> , <i>S. luteus</i> , <i>Panus Panoides</i> , <i>A. bisporus</i> , <i>Amanita rubescens</i> , <i>L. edodes</i> , <i>Macrolepiota colombiana</i>	(Kanagasabapathy, Malek, Kuppusamy, & Vikineswary, 2011; Ivonne J Nieto & A., Chegwin, 2008; Phillips et al., 2011; Rivera, Nieto, & Valencia, 2002; Zhajun, Ying, Shengping, & Jianmin, 2003)
35.57	6- Hidroxiestig mast-4-en-3- ona	428	<i>P. ostreatus</i> , <i>P. pulmonarius</i> y <i>P. djamor</i> , plantas y bagazo de caña.	(Chegwin-Angarita & Nieto- Ramírez, 2014; Georges, Sylvestre, Ruegger, & Bourgeois, 2006; Tewtrakul, Tansakul, Daengrot, Ponglimanont, & Karalai, 2010)

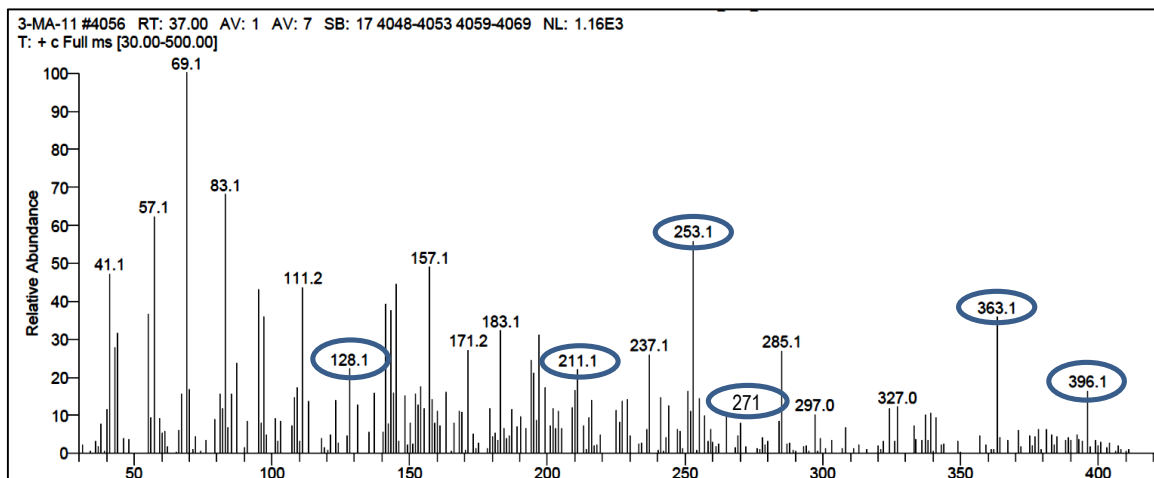
38.51	γ - sitosterol	414	<i>Schizophyllum commune</i> nativa en FEL, en plantas	(Aina et al., 2013; D. S. & N.S., 2015; Stephen & Suresh, 2015)
40.61	Estigmast-4-en-3-ona (sitostenona)	412	Corteza de plantas y como producto de biotransformación de <i>Rhodococcus sp.</i>	(Chaves, Roque, & Ayres, 2004; Macías-Villamizar & Suarez, 2014; Nogovitsina, Grishko, & G.A, 2014; Silvério, Barbosa, Silvestre, Piló-Veloso, & Gomide, 2007)

Tabla 3-3. Estructuras de los compuestos triterpenoidales identificados en el micelio de *P. ostreatus* obtenido biotecnológicamente (Estructuras tomadas de (Burns & Scroger, 1989))

Ergosterol	Sitostenona	γ - sitosterol	Estigmasterol
			
Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno	Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona	6-Hydroxystigmast-4-en-3-ona	
			

A modo de ejemplo se muestra el espectro de masas del ergosterol (Figura 3-7) en el cual se observan los mencionados “picos diagnósticos” correspondientes a las fragmentaciones características a saber:

Figura 3-7. Espectro de masas del compuesto identificado como Ergost-5,7,22-trien-3 β -ol (ergosterol)



396(M^+), 381 (M^+-CH_3), 363 ($M^+-CH_3-H_2O$), 271 (M^+-CL), 253 (M^+-CL-H_2O), 211 (M^+-CH_3 -Fisión anillo D) y 128 (M^+ -Fisión anillo C- H_2O-2CH_3).

De igual forma se analizaron los espectros de masas (Anexo A) de los demás compuestos (Nota: el espectro del Ergosterol no se vuelve a incluir en el Anexo A). La identificación de los esteroides biosintetizados por el hongo el día 11 de la fermentación y su comparación con los presentes en el día 9 evidencia el hecho de que a pesar de que en este día el contenido de esteroides es un poco mayor sólo hay uno, mientras que en el día 11 hay 3 y todos ellos con potencial acción hipocolesterémica.

Como es bien conocido el colesterol proveniente de la dieta y la bilis, forma parte de micelas que están constituidas por agregados de sales biliares y fosfolípidos, cuyo núcleo contiene colesterol, ácidos grasos y monoglicéridos. Es esta forma de micela la que permite la difusión del colesterol a través de la delgada capa acuosa que cubre la superficie del enterocito (fundamental para su difusión) mientras que los otros componentes lipídicos se disocian de modo que el colesterol y demás componentes micelares, son captados por el enterocito. El duodeno y el yeyuno proximal, son los segmentos de absorción más efectiva (Muñoz, Ureta, & Zelada, 2011).

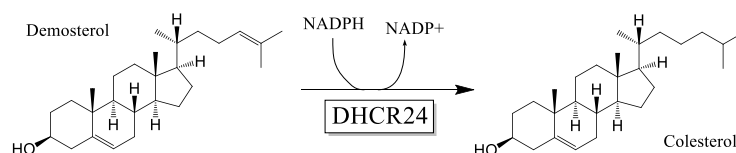
La interrupción de este proceso se produce mediante la administración, a través de la dieta, de esteroides exógenos reduciendo la absorción del colesterol, tanto del procedente de la ingesta de alimentos como el de origen biliar, ya que desplazan al esteroide de las micelas que lo solubilizan,

como paso previo a su absorción por un transportador activo. Esta inhibición se debe a que son más lipofílicos que el colesterol, propiedad que está relacionada a la mayor extensión y complejidad de su cadena lateral. Entre mayor sea la cadena presentan menor absorción debido a su mayor hidrofobicidad (Muñoz et al., 2011). Cabe aquí recordar que, en el colesterol, la cadena lateral se forma por ocho carbonos saturados mientras que los fitosteroles y fungiesterolés presentan 9 o 10 carbonos.

Adicional al efecto de disminuir la absorción del colesterol se presenta el hecho de que algunos de estos compuestos también pueden inhibir la síntesis del colesterol, efecto que se debe a la presencia del doble enlace en el C22 de la cadena lateral, como sucede con el estigmasterol y el brasicasterol, esterolés que son potentes inhibidores de la enzima esterol reductasa (3β -hidroxiesterol Δ^{24} -reductasa - DHCR24), la cual convierte el demosterol en colesterol (Figura 3-8) (Jáuregui et al., 2011; Zerenturk, Sharpe, Ikonen, & Brown, 2013).

La acumulación de demosterol puede reutilizarse en el organismo en la formación de la bicapa lipídica celular, formación sales biliares y para la esteroidogénesis (producción de hormonas esteroides), esta última alternativa es más eficiente a partir del demosterol que del colesterol (Zerenturk et al., 2013). Solamente se ha reportado un medicamento en la historia, el triparanol, anticolesterolémico que inducía la inhibición de la DHCR24, con efectos fisiológicos negativos importantes (resequedad de la piel, caída del pelo e inducción de formación de cataratas en la visión) debido a la acumulación del producto evitando la síntesis del colesterol constantemente, por lo cual fue retirado del mercado en 1962 (Kirby, 1967), pero tanto para los fitoesterolés como los esterolés fúngicos, no se ha observado acumulación que induzca a la supresión permanente del demosterol y nunca en cantidades que conduzcan a cambios fenotípicos como los descritos (Zerenturk et al., 2013). En lo concerniente a los aspectos fisiológicos y metabólicos en general la ingesta de estos esterolés es segura para el organismo humano, como lo han evidenciado los estudios realizados sobre su toxicidad, siempre y cuando se consuma menos de 8,6 g/día (Brufau, Canela, & Rafecas, 2008)

Figura 3-8: Descripción del paso final de la síntesis del colesterol a partir de demosterol en el hombre. Tomado de (Zerenturk et al., 2013)



Si se observan las estructuras de los esteroides identificados (Figura 6) se ve que los que corresponden al grupo estigmasta pueden incidir en la disminución de los niveles de colesterol desde los dos mecanismos antes mencionados. La actividad hipocolesterolémica de la biomasa obtenida se ve potenciada por la presencia del ergosterol y del γ -sitosterol, ya que al primero de ellos se le ha comprobado en estudios clínicos una actividad igual a la del β -sitosterol (Gil-Ramírez et al., 2014) y en cuanto al segundo mediante el empleo del Docking molecular se determinó que es un potente agente hipolipídico (Balamurugan, Stalin, Aravinthan, & Kim, 2015), ya que se une con la Acetoacetyl CoA tiolasa inhibiendo la formación Acetoacetyl CoA, que podría ser la razón para la disminución del nivel de colesterol, ya que no permitiría la biosíntesis del ácido mevalónico. Este resultado *in silico* corroboró lo determinado por los mismos investigadores en ensayos *in vitro*.

En lo referente a la presencia del γ -sitosterol, a pesar de que es un esteroide poco frecuente en la naturaleza, ya que es más común encontrar su isómero β , compuesto este ampliamente distribuido en el reino Plantae hasta el punto de considerarse como el esteroide típico de los vegetales, pero que también ha sido aislado de hongos, específicamente en 5 especies de *Cordyceps* (Yang, Feng, Zhao, & Li, 2009), *Inonotus obliquus* (L. X. Wang et al., 2014) y en varias especies del género *Tuber* (Tang, Li, & Tang, 2012). El isómero γ se ha reportado en muy pocas especies vegetales como es el caso de *Phyllanthus orbicularis* (Euphorbiaceae) (Gutiérrez Gaitén, Miranda Martínez, Bello Alarcón, Verona Hernández, & Montes de Oca Porto, 2011) y *Lippia nodiflora* L. (Verbenaceae) (Balamurugan et al., 2011) y en el micelio obtenido por FEL del basidiomiceto *Schizophyllum commune* (Aina et al., 2013). La identificación del γ -sitosterol en la biomasa del hongo en estudio se constituye en el segundo reporte en basidiomicetos y el primero para el género *Pleurotus*.

Es importante indicar que, si se piensa en procesos de incorporación por parte del hongo, característica ya reportada por investigadores del grupo Química de hongos Macromicetos (Nieto Ramírez et al., 2007) debido a que para la obtención de la biomasa se empleó como FC la MA, se esperaría encontrar β -sitosterol en MA. Sin embargo, en el estudio de producción mediante FEL de 3 especies de *Pleurotus*, realizado por los mismos investigadores y empleando esta misma harina, no se detectó presencia de este esteroide en MA (Chegwin-Angarita & Nieto-Ramírez, 2014; Ivonne J Nieto & A., Chegwin, 2008). Adicionalmente, el hecho de que se trate del isómero γ hace pensar que pueda ser biosintetizado por el hongo en estudio. De todo lo anteriormente expuesto se puede colegir que la biomasa con mayor carácter funcional es la obtenida a los 11 días de fermentación.

3.6 Conclusiones

- Para la cepa nativa *P. ostreatus* se corrobora que el sustrato que induce a la mayor formación de biomasa y de bioactivos de interés es MA, sin embargo, la exploración de otras FC podría mejorar el carácter nutracéutico de esta cepa.
- La cuantificación de biomasa y del contenido de bioactivos en el micelio obtenido por FEL con el empleo de MA, indicó que la mejor producción de micelio junto con la mayor biosíntesis por parte del hongo de esteroides, polisacáridos totales y β -glucanos se obtiene en el día 9 de la fermentación.
- La identificación de los esteroides evidenció que, si se desea obtener una biomasa con mayor carácter funcional, por mayor variedad estructural de ellos, el proceso biotecnológico debe llevarse a cabo durante once (11) días.
- Los esteroides de la biomasa al día 11 de fermentación se identificaron como ergosterol, estigmasterol y γ -sitosterol. Estos esteroides no se han reportado como presentes en MA, lo que permite inferir que son producto de la biosíntesis del hongo estudiado y no producto de incorporación a partir de la FC empleada.
- La presencia de los esteroides identificados contribuye en gran medida al carácter potencialmente hipocolesterolémico del producto biotecnológico obtenido, ya que por sus características estructurales realizan el efecto mediante dos mecanismos diferentes a saber: disminución de la absorción del colesterol e inhibición de la enzima esteroil reductasa, indispensable para la biosíntesis del colesterol, todos evidenciados en las diferentes investigaciones que los reportan. Sin embargo, para esta cepa se encontró que la concentración de esteroides producida en este sustrato es muy baja, lo que corrobora los hallazgos encontrados por el grupo de QHM, que evidencia que el proceso biotecnológico es especie/cepa dependiente y FC dependiente.
- El γ -sitosterol, es un esteroil poco común en hongos y su biosíntesis por parte de la cepa nativa de *Pleurotus ostreatus* se convierte en una particularidad de dicho hongo y su identificación en esta investigación se constituye en el primer reporte para el género *Pleurotus*.
- La presencia de β -glucanos, de los cuales también existen reportes sobre su actividad hipocolesterolémica por mecanismos de atrapamiento de los ácidos biliares en el lumen y excreción en las deposiciones, favorecen el perfil potencialmente funcional buscado con efecto reductor del colesterol en plasma, aumentando su capacidad de promoción de esta acción de forma sinérgica, observado en otros estudios.

4. Capítulo: Potencial de la biomasa de *Pleurotus ostreatus* nativo en la elaboración de un prototipo de alimento funcional mediante su inclusión en una matriz alimentaria

4.1 Resumen

P. ostreatus es una seta comestible ampliamente distribuida y estudiada, pero su introducción en matrices alimentarias para mejorar el perfil nutracéutico ha sido poco explorado. En este trabajo, se cultivó una cepa colombiana de *P. ostreatus* en condiciones de FEL con una FC de MA, teniendo en cuenta que esta FC mejoraba su perfil nutracéutico, relacionado con el contenido y variedad de esteroides intramiceliales (ergosterol, estigmasterol y γ -sitosterol) con proyección de acción hipocolesterolemica. Adicionalmente se cuantificó el contenido de polisacáridos totales (14,43%), β -glucanos (10,29%) y proteína (12,76%). Se trabajó con una matriz de néctar de mango (formulación estándar de néctar de mango, 30% de pulpa, pasteurizado, de acuerdo a los lineamientos de la Res. 3929 de 2013 del Min. De Salud y Protección Social) dadas sus cualidades antioxidantes ya reconocida y se adicionó el micelio (0%, 2,5%, 3,5%, 4,5%) para aumentar su perfil nutracéutico. La aceptación sensorial se evaluó a través de los parámetros de apariencia visual, sabor, aroma y consistencia, calificada en una escala hedónica de cinco puntos, relacionando la intensidad y aceptación con el incremento del valor numérico. Las muestras no mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$) para olor, aroma y consistencia. Sin embargo, los lotes con 3.5% y 4,5% contenido de micelio presentaron baja aceptación para color y sabor, relacionado con reacciones de Maillard entre las proteínas del micelio y azúcares reductores del mango, provocando pardeamiento. Respecto al sabor, los compuestos aromáticos y alcoholes encontrados en el micelio y probablemente por presencia de terpenoides del mismo, confirieron notas picantes y mentoladas al néctar. La revisión de la formulación utilizando antioxidantes o colorantes y saborizantes para mejorar la bebida resulta una alternativa promisorio para el desarrollo de este producto.

Palabras clave: *P. ostreatus*, alimento funcional, néctar, mango.

4.2 Abstract

P. ostreatus is a widely distributed edible mushroom studied, but their introduction into food matrices to enhance the nutraceutical profile has been little explored. In this paper, a Colombian strain of *P. ostreatus* was grown in conditions of LSF with CS made of YC, considering that this CS improved their nutraceutical profile, related to the content and variety of intra-mycelial sterols (ergosterol, stigmasterol and γ -sitosterol) with projection hypocholesterolemic action. Additionally, total polysaccharides content (14.43%), β -glucans (10.29%) and protein (12.76%) was quantified. We worked with an array of mango nectar (standard formulation of mango nectar, 30% pulp, pasteurized, according to Res. 3929 de 2013 – Min. De Salud y Protección Social - Colombia) because of its antioxidant qualities and recognized and mycelium was added (0%, 2.5%, 3.5%, 4, 5%) to increase their nutraceutical profile. Sensory acceptance was assessed using the parameters of visual appearance, taste, aroma and consistency, scored on a five-point hedonic scale, linking the intensity and acceptance with increasing numerical value. The samples showed no significant difference ($P > 0.05$) for odor, flavor and consistency. However, lots with 3.5% and 4.5% content showed low acceptance mycelium color and flavor, related to Maillard reactions between the proteins and reducing sugars mycelium handle, causing browning. Regarding the taste, aromatic compounds and alcohols found in the mycelium and probably by the presence of terpenoids thereof, spicy notes and mentholated conferred nectar. The review of the formulation using antioxidants or colorings and flavorings to improve drinking is a promising alternative for the development of this product, considering that adequate levels of sterols were taken into the drink.

Keywords: *P. ostreatus*, functional food, juice, mango.

4.3 Introducción

Uno de los factores más importantes al diseñar un alimento funcional, incorporando nutrientes y/o bioactivos exitosamente, lo constituye la elección de la matriz alimentaria (o también alimento portador) (Cortés R., Chiralt B., & Puente D., 2005).

En primera instancia hay que tener muy claro la finalidad buscada con la elaboración del alimento (mejoramiento en los mecanismos de defensa biológica, prevención o recuperación de algunas enfermedades específicas, control de las condiciones físicas y mentales, etc.), ya que se espera con su consumo mejorar el estado alimenticio y de salud de la población en su conjunto. Sin embargo, es fundamental conocer los gustos de la población a la que van destinados estos productos, por lo

que las características organolépticas del nuevo alimento deberán ser del agrado y aceptación del consumidor. Cabe recordar aquí que los alimentos funcionales más populares son aquellos que son más similares en apariencia a un alimento convencional, de manera que los alimentos funcionales en un formato que sea familiar para el consumidor presentan una mayor y fácil aceptación. Otro punto de anclaje importante es el sabor del producto. Una baja aceptabilidad trae como consecuencia un bajo consumo del producto funcional, como sucedió con las bebidas con un contenido alto de polifenoles y/o altos contenidos de fibra insoluble. Estos problemas sensoriales intrínsecamente se derivan de los componentes bioactivos adicionados al alimento y se deben abordar a través de los procesos de formulación (Sun-Waterhouse, 2011). Esto hace que no cualquier alimento pueda ser transformado en uno funcional, aunque desde el punto de vista técnico sea viable.

Así pues, la selección del alimento deberá garantizar el cumplimiento de las siguientes consideraciones: a) control de calidad, b) estabilidad y biodisponibilidad de los nutrientes bajo condiciones de uso y almacenamiento, c) las características organolépticas no deben sufrir cambios significativos, d) ser económicamente viable a través de un proceso industrial, e) no presentar toxicidad debido a un exceso de la dosis empleada o por interacciones con otros componentes originales del alimento (Cortés R. et al., 2005).

Una vez seleccionada la matriz y cuando el alimento está listo para su consumo, su análisis microbiológico da información acerca del resultado real de todo el proceso, debido a que la presencia de determinados microorganismos en los alimentos es una medida de su calidad sanitaria y además un indicador de prácticas de manipulación incorrectas, según estableció el Comité Internacional de Normas Microbiológicas para Alimentos (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, ICMSF) (Pérez-Silva García, Belmonte Cortés, & Martínez Corral, 1998). El aspecto microbiológico resulta fundamental porque influye en la conservación y la vida útil del producto, pero además porque los microorganismos pueden ser causantes de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's), cuyas siglas en inglés son FBI (Foodborne illness). En este orden de ideas, para garantizar inocuidad del alimento, se requiere la determinación de criterios para los microorganismos patógenos y/o toxinas, también conocidos como microorganismos indicadores, los cuales se pueden dividir en dos grupos: Indicadores de condiciones de manejo o de eficiencia de proceso que incluyen mesófilos aerobios, hongos y levaduras y coliformes totales; e indicadores de contaminación fecal como son coliformes fecales, *Escherichia coli*, enterococos y *Clostridium perfringens* (Rugama & Castillo, 2010).

Si bien la microbiología de los alimentos ha experimentado un considerable desarrollo en los últimos años su aplicación en zumos de fruta (matriz seleccionada para la presente investigación) con el objetivo de mejorar su seguridad y la calidad microbiológica es aún muy limitada. En el pasado se consideraba que en los zumos de frutas reconocidas como ácidas ($\text{pH} < 4.5$) el crecimiento de patógenos no era viable, pero la ocurrencia de brotes principalmente desde la década de 1980, dio lugar a que se prestara más atención a estos zumos ya que estaban implicados en brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (Lima Tribst, de Souza Sant'Ana, & de Massaguer, 2009).

Con base en lo anterior y en vista de que se presenta una tendencia mundial al empleo de fuentes naturales para mantener o mejorar la salud y con la finalidad de dar un mejor aprovechamiento a nuestros recursos naturales haciendo uso del valor nutracéutico de los macrohongos, se planteó estudiar el potencial del micelio obtenido biotecnológicamente en la preparación de un nuevo alimento funcional, mediante su inclusión a una matriz alimentaria. La selección de la matriz se realizó teniendo en cuenta que el alimento formase parte de la dieta normal de un gran porcentaje de la población y el carácter funcional se centró en su acción hipocolesterolémica.

4.4 Materiales y Métodos

4.4.1 Cepas:

Se trabajó con una cepa de *Pleurotus ostreatus* nativo, proporcionada por el Laboratorio de Ingeniería Química (LIQ) de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. La cepa fue cultivada en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en condiciones de aerobiosis y oscuridad. Posteriormente se mantuvo almacenada en condiciones de refrigeración a $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.4.2 FEL:

Se realizó con las condiciones descritas en los Capítulos 2 y 3.

4.4.3 Cuantificación de compuestos bioactivos

Se realizó con las condiciones descritas en los Capítulos 2 y 3.

Determinación del contenido de proteína: A la biomasa seca se le realizó el análisis elemental (Microanalizador Flash 2000) y posteriormente se calculó el contenido de proteína con el factor de corrección 4,38, calculado para hongos (Smiderle et al., 2012).

4.4.4 Formulación del alimento

Preparación del nutraceutico: La biomasa de *P. ostreatus* obtenida el día 11 se filtró al vacío para separar el micelio del medio agotado. Posteriormente se almacenó en condiciones de congelación hasta el momento de su inclusión en la matriz alimentaria.

Selección de la matriz alimentaria: para la selección de la matriz alimentaria, se tuvo en cuenta que el producto iba a ser dirigido a personas con índices de colesterol alto. La prevalencia de este índice en Colombia se presenta en hombres y mujeres adultos, pero que también puede incluir población joven (Merchán, Ruiz, & Ashner, 2005) por tanto, se buscó una matriz que fuera de fácil acceso y que pudiera ser ingerida varias veces en el día, por lo que se optó por una bebida de frutas. Se escogió como fruta base el mango (nutraceutico conocido por su actividad antioxidante (Asif et al., 2016)), teniendo en cuenta su abundancia en el país, se consideró su fragancia como elemento familiar para el público que además podía facilitar la aceptación por parte del consumidor regular y su sabor y dulce natural para hacer una adición baja de azúcar. Se consideró realizar la adición total del micelio y no de un extracto, considerando los beneficios del mismo, ya que no sólo es aportante de los bioactivos seleccionados (esteroles, polisacáridos totales y β -glucanos) sino de buena cantidad de fibra soluble e insoluble que igualmente incide potencialmente en la reducción del colesterol.

Formulación: Se elaboró el néctar de mango funcional trabajando con 4 tratamientos con las siguientes concentraciones de micelio adicionado: 0%, 2,5%, 3,5% y 4,5%. La formulación base contenía pulpa de mango lista para procesar (30%), ácido cítrico (0.05%), citrato de sodio (0,15%), sacarosa (7%), Benzoato de Sodio (0,1%). Para el lote de matriz sin micelio se adicionó 0,2% de carboximetilcelulosa (CMC), la mezcla se sometió a un proceso de pasteurización (76°C por 10 min.). Para los tres lotes que contenían micelio, después del tratamiento a 76°C, el néctar se enfrió hasta los 46°C \pm 1°C y se les adicionó la biomasa para posteriormente ser sellados y llevados inmediatamente a 4°C. Los cuatro lotes fueron almacenados en refrigeración por 18 días hasta la prueba de aceptación sensorial, previa liberación del lote por calidad microbiológica.

4.4.5 Análisis de control de calidad del alimento:

Control microbiológico: se realizaron pruebas microbiológicas de recuento en placa de mesófilos, hongos y levaduras y *E. coli*. Los ensayos se realizaron al micelio fresco refrigerado, al producto funcional inmediatamente elaborado y 8 días después de su preparación. Para el micelio se tomaron 11 g de muestra y para los néctares se tomaron 11 mL. Las muestras se mezclaron individualmente con 99 mL de agua peptona estéril y se agitaron (stomacher 400) durante 120s, obteniéndose así la dilución 10^{-1} . Posteriormente se realizaron diluciones de 10^{-2} y 10^{-3} utilizando agua peptonada estéril. El recuento de aerobios mesófilos se realizó sembrando en fondo en agar SPC (Merck®) incubado a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. El recuento de *E. coli* se efectuó sembrando en fondo en agar EMB (Merck®), incubado a $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas y se procedió a confirmar con caldo triptófano (Merck) y con el kit de pruebas bioquímicas RapidOne (Remel®) y coloración de Gram. El recuento de hongos y levaduras se realizó con siembra en fondo en agar PDA (Merk®), incubado a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 8 días. Los análisis fueron realizados según (Holguin et al., 1998). La verificación de los requisitos se efectúa de acuerdo a los lineamientos señalados por la Resolución 3929 de octubre de 2013 – Reglamento Técnico sobre los requisitos sanitarios que deben cumplir las bebidas con adición de pulpa, numeral 6.5.3. – Néctar de fruta pasteurizado.

Requisitos fisicoquímicos: Se hizo una verificación de lo estipulado en la Resolución antes mencionada, numeral 6.5.2., haciendo la medición de los sólidos solubles por lectura refractométrica (Pocket refractometer Pal-1 Atago, rango 0 – 53%) a 20°C (°Brix), tanto para la pulpa antes de su procesamiento, como para el producto final al cabo de 8 días de su preparación. Para el pH, aun cuando la norma indica que debe estar máximo en 4.6, se verificó que estuviera entre 4,8 y 5 (pHmetro Thermo Scientific Orion 4Star, electrodo 9157 BNMD) para preservar los biometabolitos y evitar su transformación por efecto de un entorno ácido.

4.4.6 Evaluación Sensorial

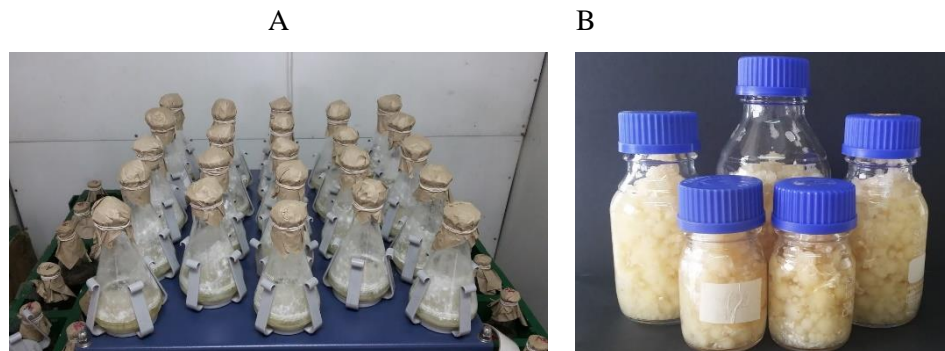
Una vez se verificó la inocuidad del producto preparado con las pruebas microbiológicas, los productos obtenidos de los cuatro tratamientos fueron sometidos a una prueba de satisfacción donde se valoraron los parámetros: apariencia general (color), olor, sabor, aroma y consistencia, calificados a través de una escala hedónica de cinco puntos (donde 5 equivale a “me gusta mucho”, 4 a “me gusta”, 3 “ni me gusta – ni me disgusta”, 2 “me disgusta” y 1 me disgusta mucho”) (Espinosa Manfugás, 2007; Hernandez, 2005). La prueba se realizó con un panel de consumidores, conformado

por 30 personas como panel piloto de pruebas orientadas al consumidor (Watts, Ylimaki, & Jeffery, 1992), entre 18 y 43 años con predominancia de edades entre 18 y 23 años y compuesto por 40% mujeres y 60% hombres, en uno de los laboratorios del departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia. El análisis estadístico fue realizado a través de un ANOVA no paramétrica de una sola vía ($P < 0,05$) con el software estadístico Stagraphics®.

4.5 Resultados y Discusión

Manteniendo los parámetros determinados en los capítulos anteriores se procedió entonces a realizar la FEL final (Figura 4-1), con la cual se obtendría el producto biotecnológico que sería adicionado a la matriz alimentaria. Al cabo de once (11) días, en condiciones asépticas, se hizo la filtración del micelio obtenido al cual se le realizó de nuevo la determinación cuantitativa de los bioactivos dado que, como se indicó en capítulos anteriores, la producción de biomasa y bioactivos puede presentar variaciones al cambiar el volumen de la fermentación

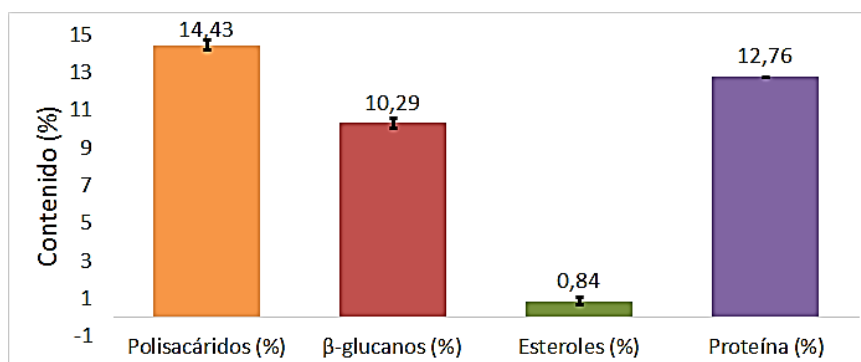
Figura 4-1. A. Montaje de la FEL de *P. ostreatus* en MA en el shaker. B. Micelio filtrado



4.5.1 Cuantificación de los compuestos bioactivos y su aporte al alimento funcional

Las concentraciones de los bioactivos calculadas para 100 g de micelio se ilustran en la Figura 4-2. Se encontró que el contenido de humedad promedio del micelio es del 95%, lo cual se tuvo en cuenta posteriormente para hacer el cálculo del contenido de metabolitos para la bebida final.

Figura 4-2. Contenido en porcentaje (%) de polisacáridos totales, β -glucanos, esteroides y proteína en la biomasa obtenida de *P. ostreatus* por FEL en MA.



De acuerdo a lo señalado en la Resolución 333 de febrero de 2011, se calculó la concentración de los compuestos bioactivos para una bebida con un contenido total de 240 mL, de acuerdo a las cantidades de referencia para jugos, néctares y bebidas de fruta. La adición de micelio se hace en material fresco, pero el cálculo de los compuestos bioactivos se realizó sobre la biomasa seca, con base al contenido de humedad señalado de 95%. (Tabla 4-1).

Tabla 4-1. Contenido de compuestos bioactivos y proteína en miligramos (mg) para 240 mL de néctar de mango ^a.

Descripción de contenidos	Tratamiento		
	2,50%	3,50%	4,50%
Micelio fresco adicionado (g)	25	35	45
Equivalente en peso seco (g)	1,25	1,75	2,25
Equivalente de Biomasa seca para 240 mL (g)	0,30	0,42	0,54
Bioactivos presentes calculados para 240 mL			
Polisacáridos (mg)	43,29	60,60	77,92
β-glucanos (mg)	30,87	43,22	55,56
Esteroles (mg)	2,52	3,53	4,54
Proteína (mg)	38,28	53,59	68,90

^a Los cálculos se hacen con base en la cantidad de micelio fresco adicionado a cada tratamiento, discriminando la humedad del 95% y la cantidad real en una bebida de 240 mL.

De los productos no lácteos con adición de esteroides o sus ésteres desarrollados en USA se tiene, a modo de ejemplo, el jugo de naranja Minute Maid, línea Heart Wise® de una empresa filial de Coca Cola® Co., cajas de 1745 mL aprox. (59 Oz.), con una concentración de 0,5 g de esteroides por porción de 237 mL aprox. (8 oz.) y un sello de ingesta máxima de cuatro porciones (2 g) al día (Maid, 2016) y otra bebida a base de frutas de la misma empresa con la marca Odwalla®, en su línea de

smoothies tipo superfood – Heart Health, botellas de 450 mL (15,2 O) de smoothies de diferentes sabores, con 0,4 g de esteroides por porción de 237 mL para un total de 0,76 g de esteroides por botella (Coca-Cola, 2016), lo cual lo convierte en una bebida con beneficios a la salud que no alcanza a afectar la misma y puede ser ingerida por personas que no sufren de colesterol alto (Becker, Staab, & Von Bergmann, 1993; Oliver et al., 2005; Peterson, 1951).

Respecto a los β -glucanos, son compuestos catalogados para mantener o disminuir el colesterol, la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) exige a los fabricantes que quieran adicionar este metabolito en sus alimentos una declaración de salud, así como que el producto contenga un mínimo de un gramo de β -glucanos. Además, se deberá indicar a los consumidores que el efecto se logra si se consume a diario un mínimo de 3 gramos de beta-glucanos, repartidos en distintos momentos del día (EFSA, 2009).

Con la bebida elaborada en este trabajo, la porción personal contendría cantidades de bioactivos por debajo de lo estipulado para personas que presentan niveles altos de colesterol (entre 1 y 3 g al día para esteroides (Genser et al., 2012; Oliver et al., 2005) para que se manifieste su actividad hipocolesterolemica, pero puede ser ingerida por aquellas sin padecimiento agudo de hipercolesterolemia, disminuyendo así el riesgo de sufrir esta patología, con el beneficio adicional de que su ingesta puede repetirse a discreción a lo largo del día sin causar efectos tóxicos ((Manfo, Nantia, & Kuete, 2014) ni vitaminosis (Genser et al., 2012) máxime cuando los componentes y extractos etanólicos de setas hasta el momento no han evidenciado efectos tóxicos para la salud (El Enshasy, Elsayed, Aziz, & Wadaan, 2013).

Cabe anotar aquí que el conjunto de esteroides adicionados, dada sus características estructurales (capítulo 3), realiza su efecto no sólo por desplazamiento del colesterol, como lo hacen los fitoesteroides generalmente empleados para este fin, si no que inciden directamente en su síntesis de manera similar a las estatinas; lo que permitiría pensar que el efecto podría presentarse a concentraciones más bajas. Aunado a lo anterior se encuentra el hecho de que no solamente se aumenta el carácter funcional del néctar si no que se incrementa su valor nutricional con la cantidad de proteína aportada por el micelio del hongo, convirtiendo un alimento que no se considera de tipo nutriente, a uno aportante de proteína con un perfil de aminoácidos muy rico (Xu, Yan, Chen, & Zhang, 2011).

Referente a los polisacáridos de manera general y los β -glucanos particularmente, también mejoran el perfil nutracéutico del producto (I Giavasis, 2014; Mantovani et al., 2008; J. P. Yang, Hsu, Lin, Hsu, & Chen, 2012), con dosis que pueden ser ingeridas varias veces en el día para completar una dosis de tipo terapéutico (Donatini, 2010).

4.5.2 Control de Calidad del alimento

La Tabla 4-2, recopila los resultados obtenidos para la pulpa y para del producto final de los cuatro tratamientos, en relación a lo estipulado por la resolución 3929:

Respecto al parámetro de pH, se buscó que la formulación permitiera valores en 4,7 y 5 para evitar la descomposición de algunos de los metabolitos de la biomasa, que podrían eventualmente causar alteraciones en las propiedades organolépticas del alimento, lo cual es totalmente indeseable. Sin embargo, estos valores presentan implicaciones sobre el proceso y la inocuidad del alimento a largo plazo, por lo cual se debe garantizar que el producto sea esterilizado y adicionalmente manejar de manera rigurosa las buenas prácticas de manufactura (BPM) para evitar la afectación del consumidor y consecuencias a nivel de salud pública. Por otro lado, se puede revisar la formulación o ajustarla según el pH de la pulpa para lograr mantener el pH a los niveles estipulados por la norma.

Tabla 4-2. Resultados fisicoquímicos y microbiológicos de control de inocuidad para el producto biotecnológico y los cuatro tratamientos de néctar de mango

Requisitos Res. 3929 - 2013	Requisitos Fisicoquímicos		Requisitos Microbiológicos		
	°Brix	pH	Aerobios mesófilos (UFC/g ó mL)	<i>E. coli</i> (UFC/g ó mL)	Hongos y levaduras (UFC/g ó mL) ^c
	mínimo 10	2,5 - 4,6	500 - 800	< 10	100 - 200
Micelio	N.A. ^a	N.A. ^a	10	<10	N.A. ^b
0% micelio	13,8	4,90	10	< 10	10
2,5% micelio	11,9	4,96	50	< 10	60
3,5% micelio	11,6	4,93	30	< 10	60
4,5% micelio	11,9	4,79	10	< 10	10

N.A. = No Aplica. ^a para el micelio no se aplican estos parámetros. ^b tratándose de micelio fresco, el hongo se encontraba vivo y este parámetro no se podía medir. ^c Para los tres tratamientos que contenían micelio, se verificó que las UFC que crecieron no se trataran de *P. ostreatus*.

4.5.3 Análisis Sensorial:



Con base a los resultados de la prueba hedónica (Tabla 4-3 y Figura 4-3), para la característica de **apariencia**, aspecto que el panelista evaluaba conjuntamente con el aspecto y el color, el análisis de varianza mostró diferencias estadísticas entre los tratamientos ($P < 0,05$) y la prueba de Tukey que se aplicó a esta variable indicó que la muestra que no contenía micelio, era significativamente diferente para este parámetro. Esta muestra en particular, tenía la tonalidad más clara (Figura 4-4) comparándola con los otros tres tratamientos que contenían micelio, los cuales presentaron una tonalidad oscura. Esto pudo ser producido por reacciones de Mayllard entre azúcares reductores del mango, péptidos y aminoácidos libres del micelio. Nuestra respuesta al color está fuertemente ligada al instinto, mucho más si se relacionan con la comida, desde el aspecto estético hasta el de seguridad, al punto de influir en como percibimos las características sensoriales y la aceptación de algo afectado por el color que observamos (Clydesdale, 1993). La afectación en el tono por el pardeamiento, influyó en el panel catador, con público principalmente joven, que se deja impresionar más por este factor (Clydesdale, 1993).

Tabla 4-3. Puntaje promedio de los cinco aspectos evaluados para cada tratamiento

Tratamientos	Apariencia	Olor	Sabor	Aroma	Consistencia
0% Micelio	4,2	3,6	3,7	3,4	3,7
2,5% Micelio	3,4	3,5	2,9	3,2	2,8
3,5% Micelio	3,2	3,1	2,6	2,8	2,6
4,5% Micelio	3,3	3,1	2,3	3,0	2,6
Total general	3,5	3,3	2,9	3,1	2,9

En cuanto al parámetro de **olor**, en el análisis de varianza se encontró que no existen diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los tratamientos en comparación con el control. Esto indica que un público regular no va a detectar a través del olfato la presencia de micelio hasta en concentraciones de 4,5%.

Este mismo análisis para la característica de **sabor**, mostró diferencias entre los tratamientos ($P < 0,05$). La prueba de Tukey indicó que se formaron dos grupos, el primer grupo corresponde a las muestras control (sin micelio), con 2,5% y 3,5% de micelio, el segundo grupo a las muestras con

3,5% y 4,5% de contenido de micelio. Esto indica que un público consumidor alcanza a percibir diferencias en el sabor respecto a la muestra control. Las diferencias pueden deberse posiblemente a la presencia de monoterpenos, compuestos aromáticos y alcoholes del micelio, que pueden conferir al néctar notas mentoladas y aromáticas, que los consumidores pueden asociar con menta, alcanfor, etc., y que afectan el sabor del mango.

Figura 4-3. Frecuencia de calificación de los aspectos evaluados para todas las muestras

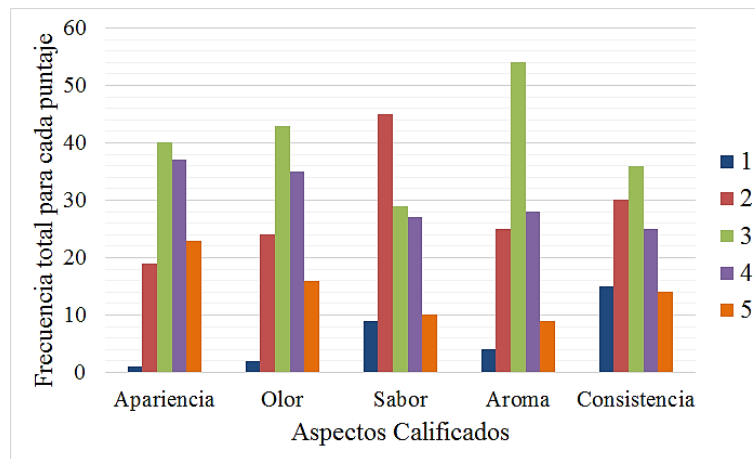


Figura 4-4. Tratamientos de néctar de mango obtenidos para degustación. De Izquierda a derecha según el contenido de micelio se encuentran 0%, 2,5%, 3,5% y 4,5%.



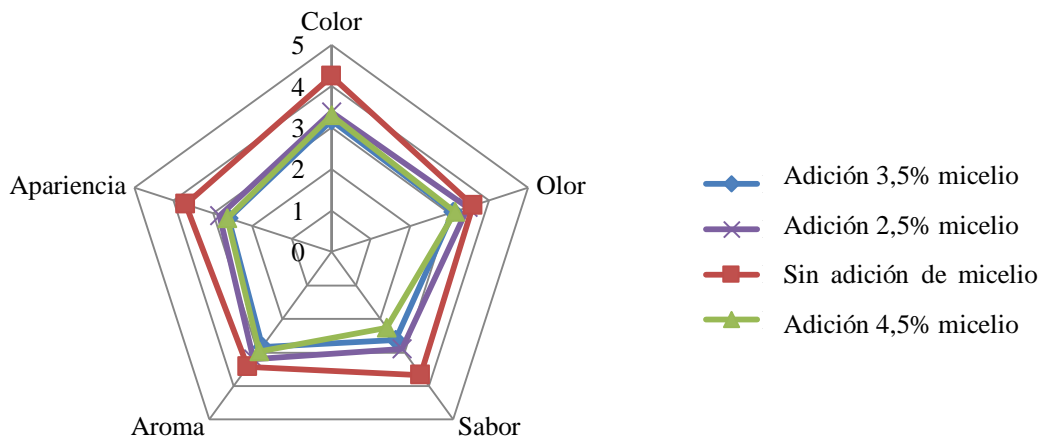
Respecto al análisis de varianza frente a la característica de **aroma**, no existen diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los tratamientos en comparación con el control. Esto indica que un público regular no va a detectar la presencia de micelio hasta en concentraciones de 4,5% a través de la percepción retronasal. Sin embargo, en las observaciones de la encuesta, algunos consumidores evaluaron como sabor una percepción percibida en la parte retronasal, debida a la presencia de volátiles en la muestra, y descrita por los panelistas en frases como: sabor a jarabe, sabor agrio, sabor

a vinagre, sabor fuerte y extraño, sabor a té, sabor artificial, no sabe a mango. Por lo anterior se sugiere evaluar este parámetro a través de un panel especializado.

El análisis de varianza mostró diferencias estadísticas entre los tratamientos ($P < 0,05$) para la característica de **consistencia**. La prueba de Tukey indicó que la muestra control, era significativamente diferente para este parámetro. Se resalta en este punto que la pulpa utilizada para la preparación del néctar fue comprada y presentaba tejido fibroso. Sin embargo, para la muestra sin micelio, hubo una percepción diferente entre los panelistas en comparación con los tratamientos que contenían micelio. Esto indica que el público consumidor, prefiere productos poco pastosos (con bajo contenido de fibra) y que el tejido fibroso incidió de manera importante en la respuesta de los panelistas hacia el néctar en general, aunque la presencia de micelio también afectó la palatabilidad del mismo. Esto se deduce de las observaciones escritas por algunos panelistas donde enfatizaban en el aspecto fibroso de la bebida (Ejemplos de observaciones: Muchas fibras, menos fibras, partículas que no son buenas para la consistencia).

El diagrama de araña (Figura 4-5) muestra el perfil sensorial de las muestras analizadas. Se observa que la muestra con mejor calificación general fue la muestra control. A pesar de que las muestras con micelio tuvieron una menor aceptación, se evidencia que en promedio tuvieron puntajes aceptables, con preferencia hacia el producto que contenía 25% de micelio en el néctar

Figura 4-5. Calificación media para parámetros de aceptación de néctares de mango con adición de micelio en diferentes concentraciones



Con referencia al color que es un parámetro de aceptación importante, al igual que en el sabor, la adición del micelio produjo cambios en el mismo (oscurecimiento), reflejado en las observaciones escritas por algunos panelistas como: color oscuro, color desagradable. Siendo que la vista es un sentido altamente relacionado con la aceptación de un producto, mejorar mediante aditivos la apariencia de este, puede generar un impacto importante para su aceptación (Clydesdale, 1993),

A pesar de la repercusión del color, textura y sabor por los factores anteriormente descritos, el olor y el aroma tuvieron calificaciones cercanas, especialmente entre las muestras control y con 25% de micelio, pero con valores que oscilan entre 3 y 4 en general, se sostuvo el aroma familiar del mango y no hubo calificativos negativos al respecto.

4.6 Conclusiones

- El micelio de *P. ostreatus* nativo presenta un buen potencial para ser adicionado a la matriz seleccionada (néctar de mango) proporcionándole un valor funcional adicional.
- La bebida potencialmente funcional elaborada en este trabajo, contiene cantidades de bioactivos (esteroles y β -glucanos) por debajo de lo estipulado para ser considerada como fuerte hipocolesterolémico.
- La adición al néctar de mango de la biomasa obtenida, si bien no da como resultado un nuevo alimento funcional 100% hipocolesterolémico, puede llegar a ser beneficioso para aquellas personas sin padecimiento agudo de hipercolesterolemia, disminuyendo así el riesgo de sufrir esta patología y las enfermedades relacionadas.
- Dada la baja concentración de compuestos hipocolesterolémicos del nuevo alimento funcional, su ingesta puede repetirse a discreción a lo largo del día sin causar efectos tóxicos.
- Al tener como ingrediente en la formulación del nuevo alimento la biomasa fúngica, se convierte a un alimento poco aportante de proteínas en uno de buen valor proteico que, junto con los esteroles y los β -glucanos, aumenta el carácter nutracéutico del mismo.
- El análisis sensorial permitió determinar que la formulación con adición de micelio de mayor aceptación fue la correspondiente a la adición de 2,5% de biomasa fúngica.
- Los aspectos negativos del néctar de mango funcional elaborado fueron el color y el sabor, parámetros que pueden ser corregidos adicionando sustancias antioxidantes y/o colorantes de origen natural.

5. Conclusiones Generales y Perspectivas

5.1 Conclusiones Generales

La FC que nos proporciona la biomasa fúngica con mayor valor nutracéutico es MA para la cepa utilizada en esta investigación.

El día de mayor producción, tanto de biomasa como de concentración de bioactivos y variedad de compuestos esterólicos en la FEL es el día 11 así como la mayor producción de β -glucanos.

Los esteroles biosintetizados por la cepa en estudio corresponden al ergosterol, estigmasterol y γ -sitosterol, compuestos reconocidos como hipocolesterolémicos. El último de estos esteroles, cuya aparición se había restringido a hasta el momento para el hongo *Schizophyllum commune*, se reporta por primera vez para el género *Pleurotus*.

Los esteroles identificados en la seta estudiada, dada su estructura, han sido reportados en su función hipocolesterolémica por medio de dos mecanismos a saber: por interrupción del proceso de absorción del colesterol exógeno demostrado ya en diferentes estudios clínicos. y por inhibición de la síntesis de colesterol endógeno, recientemente observado y en proceso de estudio *in vivo*.

Los fungiesteroles encontrados, dada la sinergia presentada por los dos mecanismos mencionados, permiten hipotetizar que su acción sea mayor como hipocolesterolémicos comparados con el β -sitosterol (fitoesterol), aplicado comúnmente en la formulación de alimentos funcionales.

Dada la baja concentración de los compuestos hipocolesterolémicos sintetizados por el Hongo (β -glucanos y esteroles), la biomasa obtenida si bien no se constituye como un potencialmente hipocolesterolémico por excelencia, puede ser empleada para la producción de un alimento funcional apto para normocolesterolémicos que busquen disminuir el riesgo de aparición de esta patología.

La biomasa de *P. ostreatus* obtenida biotecnológicamente, presenta un buen potencial para ser adicionada a una matriz alimentaria, proporcionándole un valor funcional agregado mejorando el perfil nutracéutico del néctar de mango.

Parece ser que la adición del micelio a la matriz alimentaria escogida en esta tesis, afecta el producto final en relación al color y al sabor, posiblemente como consecuencia de reacciones entre matriz y biomasa añadida.

5.2 Perspectivas

Explorar el empleo de otras FC en búsqueda de una hiperproducción de los compuestos bioactivos de interés.

Revisar y validar las metodologías de crecimiento miceliar en sustratos no convencionales, así como para hongos Macromicetos, para establecer una metodología completa y más acertada que determine el rendimiento de la biomasa frente a una nueva FC.

Estudiar mediante ensayos clínicos la efectividad de los esteroides biosintetizados por la cepa colombiana de *P. ostreatus*.

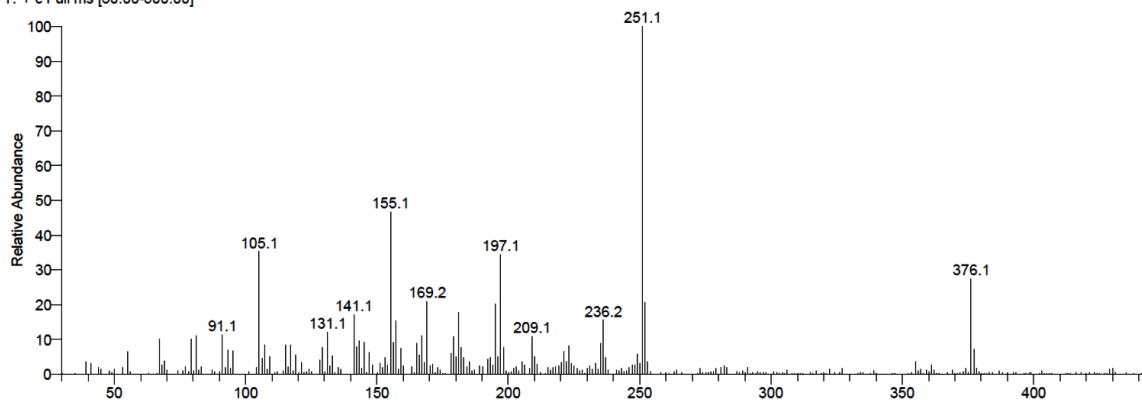
Con la finalidad de mejorar las características organolépticas del nuevo alimento funcional, explorar la adición de la biomasa fúngica a matrices alimentarias provenientes de otras frutas o combinación de ellas, que presenten notas ácidas y mentoladas que mejoren la aceptación del consumidor.

Estudiar la prevalencia de los compuestos activos adicionados y su interacción con los constituyentes propios de la matriz alimentaria.

A. Anexo: Compuestos triterpenoidales de *Pleurotus ostreatus* cultivado en harina de maíz amarillo

Ergost-2,5,7,9(11),22-pentaeno

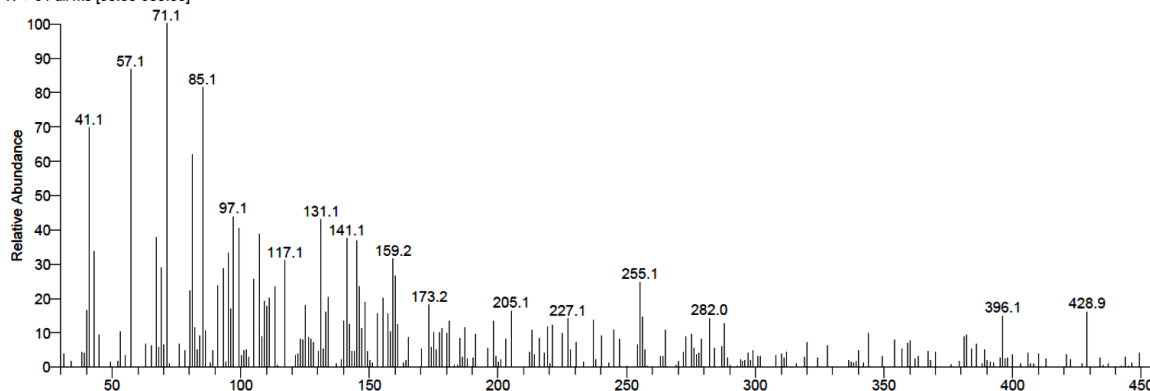
3-MA-11 #3700 RT: 34.04 AV: 1 AV: 7 SB: 17 3692-3697 3703-3713 NL: 6.73E3
T: + c Full ms [30.00-500.00]



376 (M^+), 361 ((M^+-CH_3)), 251 ((M^+-CL)), 235 ($(M^+-CL-CH_3-H)$), 225 ($(M^+-Fisión\ anillo\ D)$), 209 ($(M^+-Fisión\ anillo\ D-CH_3)$), 156 ($(M^+-Fisión\ anillo\ C-CH_3)$), 141 ($(M^+-Fisión\ anillo\ C-CH_3)$).

6-Hidroxiestigmast-4-en-3-ona

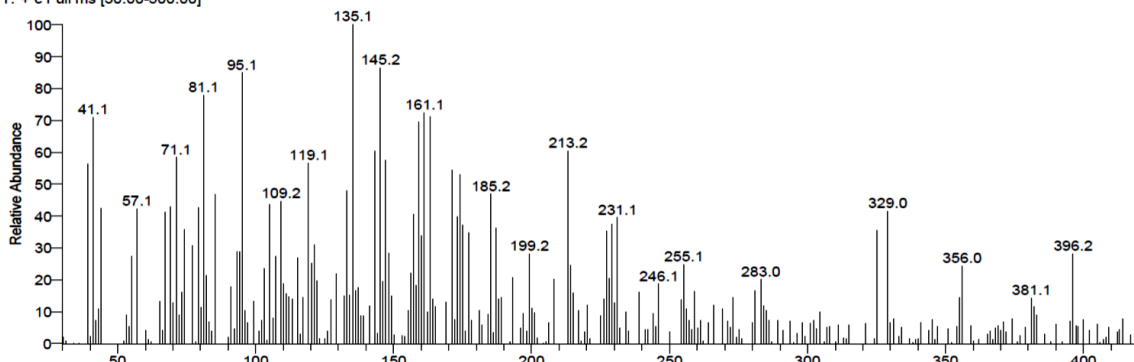
3-MA-11 #3884 RT: 35.57 AV: 1 AV: 7 SB: 17 3876-3881 3887-3897 NL: 9.77E2
T: + c Full ms [30.00-500.00]



428 (M^+), 413 (M^+-CH_3), 410 (M^+-H_2O), 287 (M^+-CL), 245 (M^+ -Fisión anillo D- C_3H_6), 227 (M^+ -Fisión anillo D- $C_3H_6-H_2O$).

γ - sitosterol

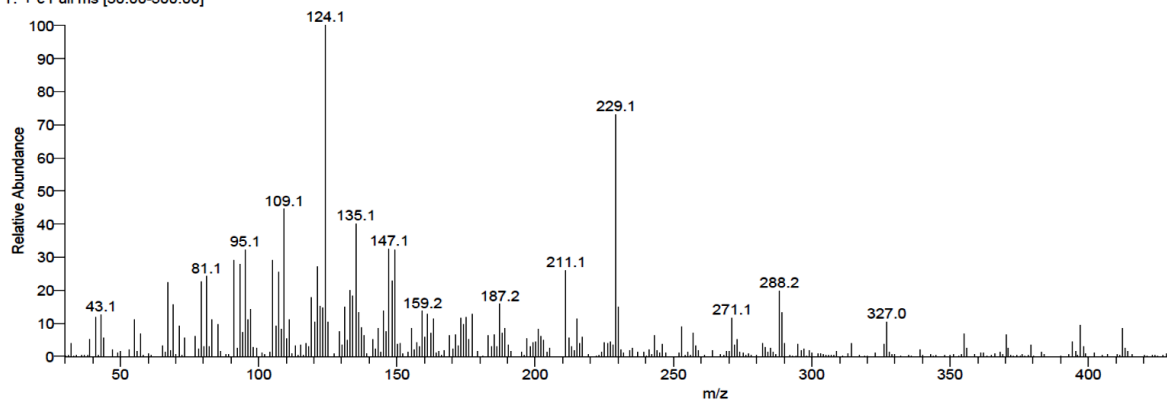
3-MA-11 #4238 RT: 38.51 AV: 1 AV: 7 SB: 17 4230-4235 4241-4251 NL: 1.03E3
T: + c Full ms [30.00-500.00]



414 (M^+), 396 (M^+-H_2O), 381 ($M^+-CH_3-H_2O$), 287 (M^+-CL), 269 (M^+-CL-H_2O), 229 (M^+ -Fisión anillo D- H_2O), 159 (M^+ -Fisión anillo C).

Estigmast-4-en-3-ona

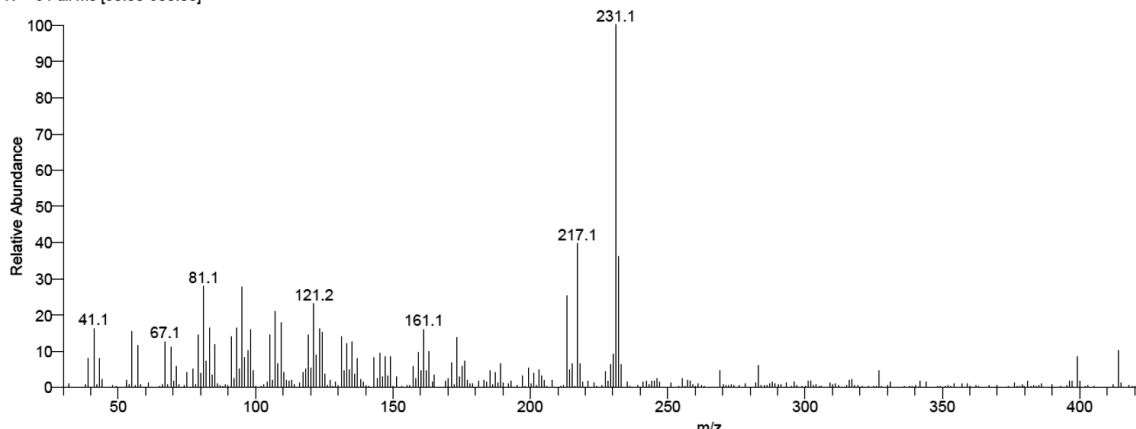
3-MA-11 #4491 RT: 40.61 AV: 1 AV: 7 SB: 17 4483-4488 4494-4504 NL: 8.85E3
T: + c Full ms [30.00-500.00]



412(M^+), 397 (M^+-CH_3), 370 ($M^+-C_3H_6$), 355 ($M^+-C_3H_6-CH_3$), 314 ($M^+-C_3H_6-CH_3-CO-CH$), 271 (M^+-CL), 229 (M^+ -Fisión anillo D),

Estigmast-5-en-3 β -ol (estigmasterol)

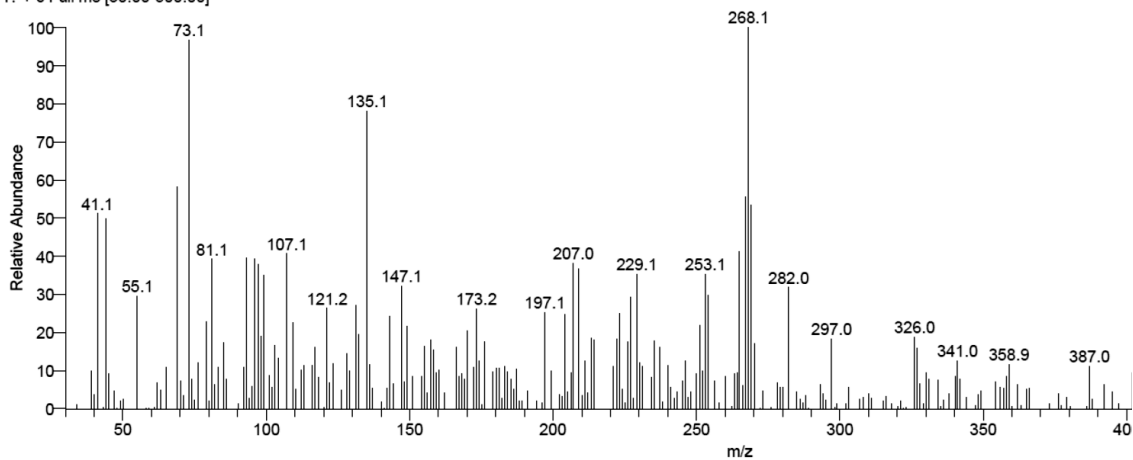
3-MA-11 #4330 RT: 39.27 AV: 1 AV: 7 SB: 17 4322-4327 4333-4343 NL: 1.04E4
T: + c Full ms [30.00-500.00]



414 (M⁺), 399 (M⁺-CH₃), 396 (M⁺-H₂O), 381 (M⁺-CH₃-H₂O), 269 (M⁺-CL-H₂O), 213 (M⁺-Fisión anillo D-H₂O-CH₃), 163 (M⁺-Fisión anillo C-CH₃), 145 (M⁺-Fisión anillo C-H₂O-CH₃).


Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one

3-MA-11 #4355 RT: 39.48 AV: 1 AV: 7 SB: 17 4347-4352 4358-4368 NL: 9.47E2
T: + c Full ms [30.00-500.00]



392 (M⁺), 377 (M⁺-CH₃), 267 (M⁺-CL), 265 (M⁺-CL-2H), 240 (M⁺-Fisión del anillo D), 225 (M⁺-CL-2H-Fisión del anillo D), 223 (M⁺-CL-2H-Fisión ring D-2H).

B. Anexo: Formato de Evaluación del néctar de mango

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE BOGOTÁ	PRUEBA HEDÓNICA DE ACEPTACIÓN PARA UNA MUESTRA DE NÉCTAR DE MANGO
---	---	--

Nombre: _____ Edad: _____ Sexo: M F Fecha: _____

Apreciado(a) panelista.
A continuación se presentan cuatro muestras de **néctar de mango** para ser probadas y evaluadas **INDIVIDUALMENTE** (sin compartir opiniones). Favor seguir estas instrucciones para el adecuado desarrollo del ejercicio

1. Apariencia general. Para cada una de las cuatro muestras de néctar, agitar el contenido e indicar si se comporta de acuerdo a como debe ser un néctar de mango. Favor colocar en la casilla un número de 1 a 5 según la escala de la columna de la derecha:

5= Me gusta mucho
4= Me gusta
3= No me gusta-No me disgusta
2= Me disgusta
1= Me disgusta mucho

MUESTRA	190	192	194	196
CALIFICACION				

2. Olor. Para cada una de las cuatro muestras de néctar, agitar el contenido y olerlo. Indicar si su fragancia corresponde a la de un néctar de mango. Favor colocar en la casilla un número de 1 a 5 según la escala del punto 1.

MUESTRA	190	192	194	196
CALIFICACION				

3. Sabor. Para cada una de las cuatro muestras de néctar, probar lentamente el contenido. Escribir en el cuadro de abajo según la escala del punto 1:

MUESTRA	190	192	194	196
Sabor				
Aroma				
Consistencia				
Coloque "X" a la mejor muestra				

Observaciones Generales para cada muestra

	190	192	194	196

Bibliografía

- AbuMweis, S. S., Barake, R., & Jones, P. J. H. (2008). Plant sterols/stanols as cholesterol lowering agents: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Food & Nutrition Research*, 52. Journal Article.
- Aggelopoulos, T., Katsieris, K., Bekatorou, A., Pandey, A., Banat, I. M., & Koutinas, A. A. (2014). Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. *Food Chemistry*, 145, 710–716. Journal Article.
- Ahmed, I., Zia, M. A., & Iqbal, H. M. N. (2016). Detergent-Compatible Purified Endoglucanase from the Agro-Industrial Residue by *Trichoderma harzianum* under Solid State Fermentation. *BioResources*, 11(3), 6393–6406. Journal Article.
- Aida, F. M. N. A., Shuhaimi, M., Yazid, M., & Maaruf, A. G. (2009). Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(11–12), 567–575. Journal Article. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.007>
- Aina, D. A., Oloke, J. K., Awoyinka, O. A., Adebayo, E. A., Akoni, O. I., Agbolade, J. O., & Odeniyi, K. (2013). Comparative cytotoxic effect of metabolites from wild and mutant strains of *Schizophyllum commune* grown in submerged liquid medium. *American Journal of Research Communication*, 1(7), 219–240.
- Akinyele, J. B., Fakoya, S., & Adetuyi, C. F. (2012). Anti-growth factors associated with *Pleurotus ostreatus* in a submerged liquid fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*, 8(3), 135–140. Journal Article. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84865567950&partnerID=40&md5=1495169dbdf667fde34239f5da4f4c01>
- Akpınar, Ö., & Penner, M. H. (2004). Preparation and separation of food grade cellooligosaccharides. *GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21(1), 27–32.
- Allchurch, M. H., & Benstetter, M. (2010). European Medicines Agency recommends suspension of marketing authorisations for sibutramine. (C. for M. P. for H. Use, Ed.). Government Document. Retrieved from http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Press_release/2010/01/WC500069995.pdf

- Arai, S. (2002). Global view on functional foods: Asian perspectives. *British Journal of Nutrition*, 88(SupplementS2), S139–S143. Journal Article. <http://doi.org/doi:10.1079/BJN2002678>
- Arango, C. S., & Nieto, I. J. (2013). Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(1), 1–8. Journal Article.
- Arora, S., Goyal, S., Balani, J., & Tandon, S. (2013). Enhanced antiproliferative effects of aqueous extracts of some medicinal mushrooms on colon cancer cells. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 15(3), 301–314. Journal Article. <http://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v15.i3.70>
- Asatiani, M., Elisashvili, V., Wasser, S. P., Reznick, A. Z., & Nevo, E. (2007). Antioxidant activity of submerged cultured mycelium extracts of higher basidiomycetes mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 9(2), 151–158. Journal Article. <http://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v9.i2.50>
- Asif, A., Farooq, U., Akram, K., Hayat, Z., Shafí, A., Sarfraz, F., ... Aftab, S. (2016). Therapeutic potentials of bioactive compounds from mango fruit wastes. *Trends in Food Science & Technology*, 53, 102–112. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.05.004>
- Ávila Núñez, R., Rivas Pérez, B., Hernández Motzezak, R., & Chirinos, M. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease. *Multiciencias*, 12(2), 129–135. Retrieved from www.redalyc.org
- Awoyinka, O. A., Aina, D. A., Oloke, J. K., Majolagbe, O. N., & Akoni, O. I. (2014). Comparative Study of the Haemagglutination Capabilities of Lectin Extracted from Submerged Cultures of Wild and Mutant Strains of *Schizophyllum commune*. *Open Access Library Journal*, 1(7), 1. Journal Article.
- Bae, J. T., Sim, G. S., Lee, D. H., Lee, B. C., Pyo, H. B., Choe, T. B., & Yun, J. W. (2005). Production of exopolysaccharide from mycelial culture of *Grifola frondosa* and its inhibitory effect on matrix metalloproteinase-1 expression in UV-irradiated human dermal fibroblasts. *FEMS Microbiology Letters*, 251(2), 347–354. Journal Article. <http://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.08.021>
- Balamurugan, R., Durairandiyan, V., & Ignacimuthu, S. (2011). Antidiabetic activity of γ -sitosterol isolated from *Lippia nodiflora* L. in streptozotocin induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, 667(1), 410–418. Journal Article.
- Balamurugan, R., Stalin, A., Aravinthan, A., & Kim, J.-H. (2015). γ -sitosterol a potent

- hypolipidemic agent: In silico docking analysis. *Medicinal Chemistry Research*, 24(1), 124–130. Journal Article.
- Bao, X., Liu, C., Fang, J., & Li, X. (2001). Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. *Carbohydrate Research*, 332(1), 67–74. Journal Article. [http://doi.org/10.1016/S0008-6215\(01\)00075-1](http://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00075-1)
- Bari, E., Nazarnezhad, N., Kazemi, S. M., Tajick Ghanbary, M. A., Mohebbi, B., Schmidt, O., & Clausen, C. A. (2015). Comparison between degradation capabilities of the white rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* in beech wood. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 104(JUNE), 231–237. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.03.033>
- Barros, L., Baptista, P., Correia, D. M., Casal, S., Oliveira, B., & Ferreira, I. C. F. R. (2007). Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. *Food Chemistry*, 105(1), 140–145. Journal Article. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.052>
- Barth, O. M., Freitas, A. S., Oliveira, E. S., Silva, R. A., Maester, F. M., Andrella, R. R. S., & Cardozo, G. M. B. Q. (2010). Evaluation of the botanical origin of commercial dry bee pollen load batches using pollen analysis: A proposal for technical standardization. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 82(4), 893–902. Journal Article. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-78650527874&partnerID=40&md5=bbc26c36e156bd58c40bccf9f3514940>
- Bartnicki-Garcia, S., Bartnicki, D. D., Gierz, G., López-Franco, R., & Bracker, C. E. (1995). Evidence that Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the hyphoid model. *Experimental Mycology*, 19(2), 153–159. Journal Article.
- Bartnicki-Garcia, S., & LIPPMAN, E. (1972). The bursting tendency of hyphal tips of fungi: presumptive evidence for a delicate balance between wall synthesis and wall lysis in apical growth. *Journal of General Microbiology*, 73(3), 487–500. Journal Article.
- Bautista, M. E., Pérez, L., García, M. T., Cuadros, S., & Marsal, A. (2015). Valorization of tannery wastes: Lipoamino acid surfactant mixtures from the protein fraction of process wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 262, 399–408. Journal Article.
- Becker, M., Staab, D., & Von Bergmann, K. (1993). Treatment of severe familial hypercholesterolemia in childhood with sitosterol and sitostanol. *J Pediatr*, 122(2), 292–296. [http://doi.org/10.1016/S0022-3476\(06\)80136-8](http://doi.org/10.1016/S0022-3476(06)80136-8)
- Berhaupt-Glickstein, A., Nucci, M. L., Hooker, N. H., & Hallman, W. K. (2014). The evolution of

- language complexity in qualified health claims. *Food Policy*, 47(0), 62–70. Journal Article. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodpol.2014.04.005>
- Bespalova, L. A., Makarov, O. E., Antonyuk, L. P., & Ignatov, V. V. (2002). Lipogenesis in the Basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* and *Flammulina velutipes* Cultivated on Different Media. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38(4), 349–354. Journal Article.
- Bhandari, V., Singh, A., Gupta, K., & Chand, K. (2014). Enriching nutritional value of underexploited crops using solid-state fermentation technology: an overview. *Environment and Ecology*, 32(3A), 1131–1136. Journal Article.
- Biliaderis, C. G. (1991). The structure and interactions of starch with food constituents. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 69(1), 60–78. <http://doi.org/10.1139/y91-011>
- Bobek, P., Ozdín, L., & Galbavý, Š. (1998). Dose- and time-dependent hypocholesterolemic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rats. *Nutrition*, 14(3), 282–286. Journal Article.
- Boh, B., & Berovic, M. (2007). *Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S.F. Gray (maitake mushroom): Medicinal properties, active compounds, and biotechnological cultivation. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 9(2), 89–108. Journal Article. <http://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v9.i2.10>
- Bohn, J. A., & BeMiller, J. N. (1995). (1→3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*, 28(1), 3–14. Journal Article. [http://doi.org/10.1016/0144-8617\(95\)00076-3](http://doi.org/10.1016/0144-8617(95)00076-3)
- Brennan, M. A., Derbyshire, E., Tiwari, B. K., & Brennan, C. S. (2012). Enrichment of extruded snack products with coproducts from chestnut mushroom (*Agrocybe aegerita*) production: Interactions between dietary fiber, physicochemical characteristics, and glycemic load. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(17), 4396–4401. Journal Article. <http://doi.org/10.1021/jf3008635>
- Brower, V. (1998). Nutraceuticals: Poised for a healthy slice of the healthcare market? *Nature Biotechnology*, 16(8), 728–730. Journal Article. <http://doi.org/10.1038/nbt0898-728>
- Brufau, G., Canela, M. A., & Rafecas, M. (2008). Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutrition Research*, 28(4), 217–225. <http://doi.org/10.1016/j.nutres.2008.02.003>
- Burns, G. W., & Scroger, M. G. (1989). NIST (National Institute of Standards and Technology) measurement services: The calibration of thermocouples and thermocouple materials. *Final Report National Inst. of Standards and Technology, Gaithersburg, MD. Temperature and*

- Pressure Div., 1*. Journal Article.
- Calpe-Berdiel, L., Escolà-Gil, J. C., Rotllan, N., & Blanco-Vaca, F. (2008). Phytosterols do not change susceptibility to obesity, insulin resistance, and diabetes induced by a high-fat diet in mice. *Metabolism*, 57(11), 1497–1501. Journal Article.
- Camire, M. E., & Flint, S. I. (1991). Thermal Processing Effects on Dietary Fiber Composition and Hydration Capacity in Corn Meal, Oat Meal, and Potato Peels. *Cereal Chemistry*.
- Carbonero, E. R., Gracher, A. H. P., Smiderle, F. R., Rosado, F. R., Sasaki, G. L., Gorin, P. A. J., & Iacomini, M. (2006). A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. *Carbohydrate Polymers*, 66(2), 252–257. Journal Article. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.03.009>
- Cepero de García, M. C., Restrepo Restrepo, S., Franco-Molano, A. E., Cárdenas Toquica, M., Vargas Estupiñán, N., & Uniandes, E. (2012). *Biología de Hongos* (1º). Book, Bogotá D.C.: Universidad de Los Andes Departamento de Ciencias Facultad de Ciencias Biológicas.
- Chalé, F. H., Ancona, D. B., & Campos, M. R. S. (2014). Dietary bioactive compounds with potential in preventing pathologies related with overweight and obesity; biologically active peptides. *Nutricion Hospitalaria*, 29(1), 10–20. Journal Article. <http://doi.org/10.3305/nh.2014.29.1.6990>
- Chandrasekhar, K., Amulya, K., & Mohan, S. V. (2015). Solid phase bio-electrofermentation of food waste to harvest value-added products associated with waste remediation. *Waste Management*, 45, 57–65. Journal Article.
- Chang, S. T., & Buswell, J. A. (1996). Mushroom nutraceuticals. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(5), 473–476. Journal Article. <http://doi.org/10.1007/bf00419460>
- Chang, S.-T., Miles, P. G., & Press, C. R. C. (2004). *MUSHROOMS: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact* (2º). Book.
- Chaves, M. H., Roque, N. F., & Ayres, M. C. C. (2004). Steroids and flavonoids of *Porcelia macrocarpa*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 15(4), 608–613. Journal Article.
- Chegwin A., C., & Nieto R., I. (2013). Influencia del medio de cultivo en la producción de metabolitos secundarios del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* cultivado por fermentación en estado líquido empleando harinas de cereales como fuente de carbono. *Revista Mexicana de Micología*, 37, 1–9. Journal Article.
- Chegwin-Angarita, C. (2014). *Incidencia del medio y de las condiciones de cultivo en el potencial como nutraceutico de tres especies del genero Pleurotus* (Thesis). Facultad de Ciencias

Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C.

- Chegwin-Angarita, C., & Nieto-Ramírez, I. J. (2014). Effect of non-conventional carbon sources on the production of triterpenoids in submerged cultures of *Pleurotus macrofungi*. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 59(1), 2287–2293. Journal Article.
- Chegwin-Angarita, C., Nieto-Ramírez, I. J., Atehortúa, L., & Sepúlveda A., L. J. (2012). Las estatinas: Actividad biológica y producción biotecnológica. 2012, 14(2). Journal Article. <http://doi.org/157-178>
- Chen, J., & Huang, X. (2009). The effects of diets enriched in beta-glucans on blood lipoprotein concentrations. *Journal of Clinical Lipidology*, 3(3), 154–158. <http://doi.org/10.1016/j.jacl.2009.04.054>
- Cheung, P. C. (2008). *Mushrooms as functional foods*. Book, John Wiley & Sons.
- Cheung, P. C. K. (1996). The hypocholesterolemic effect of two edible mushrooms: *Auricularia auricula* (tree-ear) and *Tremella fuciformis* (white jelly-leaf) in hypercholesterolemic rats I. *Nutrition Research*, 16(10), 1721–1725. Journal Article.
- Cheung, P. C. K. (1998). Plasma and hepatic cholesterol levels and fecal neutral sterol excretion are altered in hamsters fed straw mushroom diets. *The Journal of Nutrition*, 128(9), 1512–1516. Journal Article.
- Chimilovski, J. S., Habu, S., Teixeira, R. F. B., Thomaz-Soccol, V., Noseda, M. D., Medeiros, A. B. P., ... Soccol, C. R. (2011). Antitumour activity of *Grifola frondosa* exopolysaccharides produced by submerged fermentation using sugar cane and soy molasses as carbon sources. *Food Technology and Biotechnology*, 49(3), 359–363. Journal Article. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80053337072&partnerID=40&md5=f547d296588f9225127e2e64d9a5eee3>
- Clydesdale, F. M. (1993). Critical Reviews in Food Science and Nutrition Color as a factor in food choice Color as a Factor in Food Choice. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 33(1), 83–101.
- Coca-Cola. (2016). Odwalla Hearth Health. Retrieved from <http://www.coca-colacompany.com/press-center/image-library/odwalla-heart-health>
- Cohen, N., Cohen, J., Asatiani, M. D., Varshney, V. K., Yu, H. T., Yang, Y. C., ... Wasser, S. P. (2014). Chemical composition and nutritional and medicinal value of fruit bodies and submerged cultured mycelia of culinary-medicinal higher basidiomycetes mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 16(3), 273–291. Journal Article.

- <http://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v16.i3.80>
- CONPES-. (2011). Política para el desarrollo comercial de la biotecnología a partir del uso sostenible de la biodiversidad. (D. N. de Planeación, Ed.). Government Document, Bogotá D.C.
- Conroy, K. P., Davidson, I. M., & Warnock, M. (2011). Pathogenic obesity and nutraceuticals. *Proceedings of the Nutrition Society*, 70(4), 426–438. <http://doi.org/10.1017/S0029665111001662>
- Cooke, D., & Bloom, S. (2006). The obesity pipeline: current strategies in the development of anti-obesity drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(11), 919–931. Journal Article.
- Cortés R., M., Chiralt B., A., & Puente D., L. (2005). ALIMENTOS FUNCIONALES: UNA HISTORIA CON MUCHO PRESENTE Y FUTURO. *Vitae*, 12(1), 10. Journal Article.
- CTT, C. T. T. (2005). Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90 056 participants in 14 randomised trials of statins. *The Lancet*, 366(9493), 1267–1278. Journal Article.
- Cui, F., Liu, Z., Li, Y., Ping, L., Ping, L., Zhang, Z., ... Huang, D. (2010). Production of mycelial biomass and exo-polymer by *Herichium erinaceus* CZ-2: Optimization of nutrients levels using response surface methodology. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(2), 299–307. Journal Article. <http://doi.org/10.1007/s12257-009-0117-9>
- Cui, Y. Q., Van der Lans, R., & Luyben, K. (1997). Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 55(5), 715–726. Journal Article.
- D. S., P., & N.S., N. (2015). Comparison of Chemical Composition and Antioxidant Potential of Hydrodistilled Oil and Supercritical Fluid CO₂ Extract of *Valeriana wallichii* DC. *Journal of Natural Products and Resources*, 1(1), 6. Journal Article.
- Da Silva, R., Busch, P., Marques, A., Marques, C., Bicas, J., Pastore, G. M., ... O'Donovan., A. (2015). Chapter 23. *Phytosterols: Biological effects and mechanisms of hypocholesterolemic action*. *Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and Applications* (1°). Book, John Wiley & Sons, Ltd.
- da Silva Delabona, P., Pirota, R. D. P. B., Codima, C. A., Tremacoldi, C. R., Rodrigues, A., & Farinas, C. S. (2013). Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. *Industrial Crops and Products*, 42, 236–242. Journal Article.
- Demir, H., & Tari, C. (2014). Valorization of wheat bran for the production of polygalacturonase in

- SSF of *Aspergillus sojae*. *Industrial Crops and Products*, 54, 302–309. Journal Article.
- Devi, K. S. P., Roy, B., Patra, P., Sahoo, B., Islam, S. S., & Maiti, T. K. (2013). Characterization and lectin microarray of an immunomodulatory heteroglucan from *Pleurotus ostreatus* mycelia. *Carbohydrate Polymers*, 94(2), 857–865. Journal Article. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.017>
- Dien, B. S., Li, X.-L., Iten, L. B., Jordan, D. B., Nichols, N. N., O'Bryan, P. J., & Cotta, M. A. (2006). Enzymatic saccharification of hot-water pretreated corn fiber for production of monosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(5), 1137–1144. Journal Article.
- Dimou, D. M., Georgala, A., Komaitis, M., & Aggelis, G. (2002). Mycelial fatty acid composition of *Pleurotus* spp. and its application in the intrageneric differentiation. *Mycological Research*, 106(8), 925–929. Journal Article.
- do Rosário, M. M. T., Kangussu-Marcolino, M. M., do Amaral, A. E., Noletto, G. R., & Petkowicz, C. L. de O. (2011). Storage xyloglucans: Potent macrophages activators. *Chemico-Biological Interactions*, 189(1–2), 127–133. Journal Article. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2010.09.024>
- Donatini, B. (2010). Introduction à la mycothérapie: généralités sur l'intérêt des principaux mycelia. *Phytothérapie*, 8(3), 191–197. Journal Article.
- Dos Santos, L. F., Zanatta, A. L., Soccol, V. T., Torres, M. F., Bonatto, S. J. R., Rubel, R., & Soccol, C. R. (2013). Hypolipidemic and antiatherosclerotic potential of *Pleurotus ostreatus*, cultured by submerged fermentation in the high-fat diet fed rats. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18(1), 201–208. Journal Article. <http://doi.org/10.1007/s12257-012-0561-9>
- Duodu, K. G. G., Nunes, A., Delgadillo, I., Parker, M. L. L., Mills, E. N. C. N. C., Belton, P. S. S., & Taylor, J. R. N. R. N. (2002). Effect of grain structure and cooking on sorghum and maize in vitro protein digestibility. *Journal of Cereal Science*, 35(2), 161–174. Journal Article. <http://doi.org/10.1006/jcrs.2001.0411>
- Dutta, S. (2013). Role of mushrooms as nutraceutical an overview. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(4), B59–B66. Journal Article. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84889075197&partnerID=40&md5=f437549bb58ec39ab7dfc0270b6fc696>
- Dymysza, H. A. (1975). Nutritional application and implication of 1,3 butanediol. *Federation Proceedings*, 34(12), 2167–2170. Journal Article. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0->

- 0016716595&partnerID=40&md5=cfcba11359ea2e31921490a016d1664d
- EFSA. (2009). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to beta-glucans and maintenance of normal blood cholesterol concentrations (ID 754 , 755 , 757 , 801 , 1465 , 2934) and maintenance or achievement of a normal body weight (ID 820 , 823). *EFSA Journal*, 7(9), 1–18. <http://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1254>.
- El Enshasy, H., Elsayed, E. A., Aziz, R., & Wadaan, M. A. (2013). Mushrooms and truffles: Historical biofactories for complementary medicine in Africa and in the middle East. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. Journal Article. <http://doi.org/10.1155/2013/620451>
- El-Bendary, M. A., Moharam, M. E., Mohamed, S. S., & Hamed, S. R. (2016). Pilot-scale production of mosquitocidal toxins by *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus* under solid-state fermentation. *Biocontrol Science and Technology*, 26(7), 980–994. Journal Article.
- Elisashvili, V. (2012). Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products (review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 14(3). Journal Article.
- Espinosa Manfugás, J. E. (2007). *Evaluación Sensorial de los Alimentos*. La Habana: Ministerio de Educación Superior.
- Farinas, C. S. (2015). Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52, 179–188. Journal Article.
- Fazenda, M. L., Seviour, R., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2008). Submerged culture fermentation of “higher fungi”: the macrofungi. *Advances in Applied Microbiology*, 63, 33–103. Journal Article.
- Fiddy, C., & Trinci, A. P. J. (1976). Mitosis, septation, branching and the duplication cycle in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 97(2), 169–184. <http://doi.org/10.1099/00221287-97-2-169>
- Finegold, J. A., Manisty, C. H., Goldacre, B., Barron, A. J., & Francis, D. P. (2014). What proportion of symptomatic side effects in patients taking statins are genuinely caused by the drug? Systematic review of randomized placebo-controlled trials to aid individual patient choice. *European Journal of Preventive Cardiology*, 21(4), 464–474. <http://doi.org/10.1177/2047487314525531>
- Frank, I. E., & Todeschini, R. (1994). *The data analysis handbook* (14th ed.). Elsevier.
- Fuhrman, B., Elis, A., & Aviram, M. (1997). Hypocholesterolemic effect of lycopene and β -carotene

- is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 233(3), 658–662. Journal Article.
- Ganong, W. F., & Barrett, K. E. (2005). *Review of medical physiology* (Vol. 21). Book, McGraw-Hill Medical ^ eNew York New York.
- Genser, B., Silbernagel, G., De Backer, G., Bruckert, E., Carmena, R., Chapman, M. J., ... Dias, K. C. (2012). Plant sterols and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *European Heart Journal*, 33(4), 444–451. Journal Article.
- Georges, P., Sylvestre, M., Ruegger, H., & Bourgeois, P. (2006). Ketosteroids and hydroxyketosteroids, minor metabolites of sugarcane wax. *Steroids*, 71(8), 647–652. Journal Article.
- Gervats, P., Molin, P., Grajek, W., & Bensoussan, M. (1988). Influence of the water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. *Biotechnology and Bioengineering*, 31(5), 457–463. Journal Article.
- Giavasis, I. (2013). Production of microbial polysaccharides for use in food. *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals*, (June 2015), 413–468. <http://doi.org/10.13140/2.1.3493.3762>
- Giavasis, I. (2014). Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 162–173. Journal Article. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.010>
- Giavasis, I. (2014). Polysaccharides from Medicinal Mushrooms for Potential Use as Nutraceuticals. *Polysaccharides: Natural Fibers in Food and Nutrition*, 171. Journal Article.
- Gil-Ramírez, A., Caz, V., Martin-Hernandez, R., Marín, F. R., Largo, C., Rodríguez-Casado, A., ... Soler-Rivas, C. (2015). Modulation of cholesterol-related gene expression by ergosterol and ergosterol-enriched extracts obtained from *Agaricus bisporus*. *European Journal of Nutrition*, 1–17. Journal Article.
- Gil-Ramirez, A., Caz, V., Smiderle, F., Martin-Hernandez, R., Largo, C., Taberero, M., ... Soler Rivas, C. (2016). Water-soluble compounds from *Lentinula edodes* influencing the HMG-CoA reductase activity and the expression of genes involved in the cholesterol metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(9), 1910–1920. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05571>
- Gil-Ramírez, A., Ruiz-Rodríguez, A., Marín, F. R., Reglero, G., & Soler-Rivas, C. (2014). Effect of

- ergosterol-enriched extracts obtained from *Agaricus bisporus* on cholesterol absorption using an in vitro digestion model. *Journal of Functional Foods*, 11, 589–597. Journal Article.
- Giunta, R., Basile, G., & Tibuzzi, A. (2010). Legislation on nutraceuticals and food supplements: A comparison between regulations in USA and EU. (M. T. Giardi, G. Rea, & B. Berra, Eds.), *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Serial. http://doi.org/10.1007/978-1-4419-7347-4_24
- Gómez Grosso, L. A. (2016). Medicina de precisión y enfermedades cardiovasculares. *Revista Colombiana de Cardiología*, 23(2), 73–76. <http://doi.org/10.1016/j.rccar.2016.01.026>
- Gonzalez, A. G., Barrera, J. B., & Toldo Marante, F. J. (1983). The steroids and fatty acids of the basidiomycete *Scleroderma polyrhizum*. *Phytochemistry*, 22(4), 1049–1050. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(83\)85062-6](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(83)85062-6)
- Gregori, A., Švagelf, M., & Pohleven, J. (2007). Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. *Food Technology and Biotechnology*, 45(3), 238–249. Journal Article. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-35349026766&partnerID=40&md5=e07fbae35f03fbcf1143c9285e562304>
- Gutiérrez Gaitén, Y. I., Miranda Martínez, M., Bello Alarcón, A., Verona Hernández, S., & Montes de Oca Porto, R. (2011). Caracterización química por cromatografía de gases/espectrometría de masas de dos extractos obtenidos de *Phyllanthus orbicularis* HBK. *Revista Cubana de Farmacia*, 45(3), 405–413. Journal Article.
- Gylling, H., Plat, J., Turley, S., Ginsberg, H. N., Ellegård, L., Jessup, W., ... Chapman, M. J. (2014). Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 232(2), 346–360. Journal Article. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.11.043>
- Heleno, S. A., Barros, L., Martins, A., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., Glamoclija, J., ... Ferreira, I. C. F. R. (2015). Nutritional value, bioactive compounds, antimicrobial activity and bioaccessibility studies with wild edible mushrooms. *LWT - Food Science and Technology*, 63(2), 799–806. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.028>
- Hernandez, E. (2005). *Evaluación Sensorial* (1º). Bogotá D.C.: Universidad Nacional Abierta y a Distancia.
- Hibbett, D. S. (2004). Trends in morphological evolution in homobasidiomycetes inferred using maximum likelihood: A comparison of binary and multistate approaches. *Systematic Biology*, 53(6), 889–903. Journal Article. <http://doi.org/10.1080/10635150490522610>

- Holguin, M., Higuera, I., Rubio, B., Vargas, M., Muños, A., & Díaz, G. (1998). *Manual de técnicas de análisis para control de calidad microbiológico de alimentos para consumo humano*. Bogotá DC.: INVIMA - Ministerio de Salud.
- I.C.B.F., I.N.S., & Profamilia. (2011). Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia. (M. P. Social, Ed.). Government Document, Bogotá D.C.
- Jamal, P., Idris, Z. M., & Alam, M. Z. (2011). Effects of physicochemical parameters on the production of phenolic acids from palm oil mill effluent under liquid-state fermentation by *Aspergillus niger* IBS-103ZA. *Food Chemistry*, *124*(4), 1595–1602. Journal Article.
- James, W. P. T. (2005). The SCOUT study: risk-benefit profile of sibutramine in overweight high-risk cardiovascular patients. *European Heart Journal Supplements*, *7*(suppl L), L44–L48. Journal Article.
- Jeanne, M. M., & Trinci, A. P. J. (1987). Effects of water activity on growth and sporulation of *Paecilomyces farinosus* in liquid and solid media. *Microbiology*, *133*(2), 247–252. Journal Article.
- Jeong, S.-C., Koyyalamudi, S. R., Hughes, J. M., Khoo, C., Bailey, T., Marrisudi, K., ... Song, C.-H. (2013). Antioxidant and immunomodulating activities of exo-and endopolysaccharide fractions from submerged mycelia cultures of culinary-medicinal mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, *15*(3), 251–66. Journal Article. <http://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v15.i3.30>
- Jin, Z., Hsieh, F., & Huff, H. E. (1994). Extrusion cooking of corn meal with soy fiber, salt, and sugar. *Cereal Chemistry*, *71*(3), 227–233. Journal Article.
- Johansen, C. L., Coolen, L., & Hunik, J. H. (1998). Influence of Morphology on Product Formation in *Aspergillus awamori* during Submerged Fermentations. *Biotechnology Progress*, *14*(2), 233–240. Journal Article.
- Jonathan, S. G., & Adeoyo, O. R. (2011). Evaluation of ten wild Nigerian mushrooms for amylase and cellulase activities. *Mycobiology*, *39*(2), 103–108. Journal Article.
- Joseph, B., & Jini, D. (2013). Antidiabetic effects of *Momordica charantia* (bitter melon) and its medicinal potency. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, *3*(2), 93–102. Journal Article.
- Joshi, M., Pathania, P., & Sagar, A. (2014). Phytochemical analysis and in vitro antibacterial activity of *Russula lepida* and *Pleurotus ostreatus* from North West Himalayas, India. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, *6*(4), 1032–1034. Journal Article. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0->

- 84918834912&partnerID=40&md5=40a8a7202dffdacd70bf1764251597e6
- Kadam, A. A., Kamatkar, J. D., Khandare, R. V., Jadhav, J. P., & Govindwar, S. P. (2013). Solid-state fermentation: tool for bioremediation of adsorbed textile dyestuff on distillery industry waste-yeast biomass using isolated *Bacillus cereus* strain EBT1. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(2), 1009–1020. Journal Article.
- Kalač, P. (2012). A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(2), 209–218. Journal Article. <http://doi.org/10.1002/jsfa.5960>
- Kalra, E. K. (2003). Nutraceutical - Definition and introduction. *AAPS PharmSci*, 5(3), 2. Journal Article.
- Kanagasabapathy, G., Malek, S. N. A., Kuppusamy, U. R., & Vikineswary, S. (2011). Chemical composition and antioxidant properties of extracts of fresh fruiting bodies of *Pleurotus sajorajaju* (Fr.) Singer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2618–2626. Journal Article.
- Katan, M. B., Grundy, S. M., Jones, P., Law, M., Miettinen, T., Paoletti, R., & Participants, S. W. (2003). Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 78, pp. 965–978). Conference Proceedings, Elsevier.
- Khan, M. A., & Tania, M. (2012). Nutritional and medicinal importance of *Pleurotus* mushrooms: an overview. *Food Reviews International*, 28(3), 313–329. Journal Article.
- Kim, J., Lee, S. M., Bae, I. Y., Park, H., Gyu Lee, H., & Lee, S. (2011). (1–3)(1–6)- β -Glucan-enriched materials from *Lentinus edodes* mushroom as a high-fibre and low-calorie flour substitute for baked foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(10), 1915–1919. Journal Article.
- Kim, S. S., Lee, J. S., Cho, J. Y., Kim, Y. E., & Hong, E. K. (2010). Effects of C/N ratio and trace elements on mycelial growth and exo-polysaccharide production of *Tricholoma matsutake*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(2), 293–298. Journal Article.
- Kim, S. W., Hwang, H. J., Park, J. P., Cho, Y. J., Song, C. H., & Yun, J. W. (2002). Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. *Letters In Applied Microbiology*, 34(1), 56–61. Journal Article. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mnh&AN=11849494&lang=es&site=ehost-live>
- Kim, S. W., Hwang, H. J., Xu, C. P., Na, Y. S., Song, S. K., & Yun, J. W. (2002). Influence of

- nutritional conditions on the mycelial growth and exopolysaccharide production in *Paecilomyces sinclairii*. *Letters In Applied Microbiology*, 34(6), 389–393. Journal Article. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mnh&AN=12028416&lang=es&site=ehost-live>
- Kim, Y. J., Park, J., Min, B. S., & Shim, S. H. (2011). Chemical constituents from the sclerotia of *Inonotus obliquus*. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 54(2), 287–294. Journal Article.
- Kirby, T. J. (1967). Cataracts produced by triparanol.(MER-29). *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 65, 494. Journal Article.
- Knudsen, G. R., & Li, B. (1990). Effects of temperature, soil moisture, and wheat bran on growth of *Trichoderma harzianum* from alginate pellets. *Phytopathology*, 80(8), 724–727. Journal Article.
- Ko, H.-H., Hung, C.-F., Wang, J.-P., & Lin, C.-N. (2008). Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. *Phytochemistry*, 69(1), 234–239. Journal Article.
- Kumar, S., Shrivastava, B., Gomes, J., & Kuhad, R. C. (2013). Solid-State Bioconversion and Animal Feed Production: Present Status and Future Prospects. In *Biotechnology for Environmental Management and Resource Recovery* (pp. 45–53). Book Section, Springer.
- Kunamneni, A., Permaul, K., & Singh, S. (2005). Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(2), 168–171. Journal Article. <http://doi.org/10.1263/jbb.100.168>
- Lakhanpal, T. N., & Rana, M. (2005). Medicinal and nutraceutical genetic resources of mushrooms. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 3(2), 288–303. Journal Article.
- Lee, W. Y., Park, Y., Ahn, J. K., Ka, K. H., & Park, S. Y. (2007). Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(2), 249–254. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.04.009>
- Lee, W. Y., Park, Y., Ahn, J., Park, S., & Lee, H. (2005). Cytotoxic activity of ergosta-4, 6, 8 (14), 22-tetraen-3-one from the sclerotia of *Polyporus umbellatus*. *BULLETIN-KOREAN CHEMICAL SOCIETY*, 26(9), 1464. Journal Article.
- Lehninger, A. L. (2002). *Principios En Bioquímica*. Book, Editorial Omega.
- Leng, Y. W., & Xu, Y. (2015). Improvement of flavour compound synthesis in a mixed culture

- system at high temperature by solid-state fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 121(4), 609–613. Journal Article.
- Leskosek-Cukalovic, I., Despotovic, S., Lacic, N., Niksic, M., Nedovic, V., & Tesevic, V. (2010). Ganoderma lucidum—medical mushroom as a raw material for beer with enhanced functional properties. *Food Research International*, 43(9), 2262–2269. Journal Article.
- Li, S., Li, G., Zhang, L., Zhou, Z., Han, B., Hou, W., ... Li, T. (2013). A demonstration study of ethanol production from sweet sorghum stems with advanced solid state fermentation technology. *Applied Energy*, 102, 260–265. Journal Article.
- Lima Tribst, A. A., de Souza Sant'Ana, A., & de Massaguer, P. R. (2009). Review: microbiological quality and safety of fruit juices—past, present and future perspectives. *Critical Reviews in Microbiology*, 35(4), 310–339. Journal Article.
- Lindequist, U., Niedermeyer, T. H. J., & Jülich, W. D. (2005). The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(3), 285–299. Journal Article. <http://doi.org/10.1093/ecam/neh107>
- Locci, E., Laconi, S., Pompei, R., Scano, P., Lai, A., & Marincola, F. C. (2008). Wheat bran biodegradation by *Pleurotus ostreatus*: A solid-state Carbon-13 NMR study. *Bioresource Technology*, 99(10), 4279–4284. Journal Article. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.048>
- López García, M. T., & S.A, S. E. (2011). *1.001 Setas. Enciclopedia 1.001* (1^o). Book, Madrid.
- López-Franco, R., Bartnicki-Garcia, S., & Bracker, C. E. (1994). Pulsed growth of fungal hyphal tips. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(25), 12228–32. <http://doi.org/10.1073/pnas.91.25.12228>
- Lu, X., Chen, H., Dong, P., Fu, L., & Zhang, X. (2010). Phytochemical characteristics and hypoglycaemic activity of fraction from mushroom *Inonotus obliquus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(2), 276–280. Journal Article.
- Lull, C., Wichers, H. J., & Savelkoul, H. F. J. (2005). Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators of Inflammation*, 2005(2), 63–80. Journal Article. <http://doi.org/10.1155/mi.2005.63>
- Macías-Villamizar, V., & Suarez, L. E. C. (2014). Lignanos diarildimetilbutanos y otros constituyentes aislados de *Nectandra turbacensis* (kunth) nees (lauraceae). *Revista Colombiana de Química*, 43(1). Journal Article.
- Maeda, H., Sano, M., Maruyama, Y., Tanno, T., Akao, T., Totsuka, Y., ... Iguchi, Y. (2004). Transcriptional analysis of genes for energy catabolism and hydrolytic enzymes in the

- filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using cDNA microarrays and expressed sequence tags. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(1), 74–83. Journal Article. <http://doi.org/10.1007/s00253-004-1608-4>
- Maes, C., & Delcour, J. a. (2002). Structural Characterisation of Water-extractable and Water-unextractable Arabinoxylans in Wheat Bran. *Journal of Cereal Science*, 35(3), 315–326. <http://doi.org/10.1006/jcrs.2001.0439>
- Maid, M. (2016). Heart Wise® Orange Juice. Retrieved from <http://www.minutemaid.com/products/orange-juice/heart-wise/>
- Maki, K. C., & Rains, T. M. (2011). Hypocholesterolemic effects of plant sterols and stanols: Do the dose–response curves diverge? *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 85(1), 5–6. Journal Article.
- Manfo, F. P. T., Nantia, E. A., & Kuete, V. (2014). Hepatotoxicity and Hepatoprotective Effects of African Medicinal Plants. *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*, 323–355. Journal Article.
- Mannarino, M. R., Ministrini, S., & Pirro, M. (2014). Nutraceuticals for the treatment of hypercholesterolemia. *European Journal of Internal Medicine*, 25(7), 592–599. Journal Article.
- Mantovani, M. S., Bellini, M. F., Angeli, J. P. F., Oliveira, R. J., Silva, A. F., & Ribeiro, L. R. (2008). β -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 658(3), 154–161. Journal Article. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.07.002>
- Marinho, A. M. D. R., Marinho, P. S. B., & Filho, E. R. (2009). Esteroides produzidos por *penicillium herquei*, um fungo endofítico isolado dos frutos de melta azedarach (MELIACEAE). *Quimica Nova*, 32(7), 1710–1712.
- Márquez-Fernández, O., Juárez Pacheco, L. Á., & Trigos, Á. (2014). Isolation and identification of sterols in a commercial strain of *Pleurotus* sp. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales Y Del Ambiente*, 20(2), 227–235. Journal Article. <http://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2013.12.044>
- Martin, A. M. (1982). Submerged growth of *Morchella esculenta* in peat hydrolysates. *Biotechnology Letters*, 4(1), 13–18. Journal Article. <http://doi.org/10.1007/bf00139275>
- Martinez Carrera, D., Sobal, M., Morales, P., Martínez, W., Martínez, M., Mayett, Y. (2004). *Los hongos comestibles: propiedades nutricionales, medicinales y su contribción a la alimentación Mexicana. Colegio Posgraduados.*

- Matsumoto, Y., Saucedo-Castañeda, G., Revah, S., & Shirai, K. (2004). Production of β -N-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. *Process Biochemistry*, 39(6), 665–671. Journal Article.
- Merchán, V. A., Ruiz, M. A., & Ashner, M. P. (2005). Segundo consenso nacional sobre la detección, evaluación y tratamiento de las dislipoproteinemias en adultos. *Rev Colomb Cardiol*, 11(Supl. 2), 405–490. Journal Article.
- Mnif, I., Elleuch, M., Chaabouni, S. E., & Ghribi, D. (2013). *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant: production optimization and insecticidal activity against the carob moth *Ectomyelois ceratoniae*. *Crop Protection*, 50, 66–72. Journal Article.
- Mohammad, N., Alam, M. Z., & Kabashi, N. A. (2013). Development of composting process of oil palm industrial wastes by multi-enzymatic fungal system. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 15(3), 348–356. Journal Article.
- Mokochinski, J. B., López, B. G. C., Sovrani, V., Dalla Santa, H. S., González-Borrero, P. P., Sawaya, A. C. H. F., ... Torres, Y. R. (2015). Production of *Agaricus brasiliensis* mycelium from food industry residues as a source of antioxidants and essential fatty acids. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(9), 2052–2058. Journal Article.
- Moore, D. (2002). *Fungal morphogenesis* (Vol. 35). Book, Cambridge University Press.
- Moosmann, B., & Behl, C. (2004). Selenoprotein synthesis and side-effects of statins. *Lancet*, 363(9412), 892–894. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15739-5](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15739-5)
- Mora Correa, M. A. (2010). *Determinación estructural de los metabolitos Secundarios triterpenoidales en búsqueda de Antimicrobianos de un hongo silvestre Aphyllophoral colombiano* (Thesis). *Departamento de Química*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C.
- Muñoz, A. M., Ureta, C. A.-O., & Zelada, C. E. (2011). Fitoesteroles y fitoestanoles: Propiedades saludables. *Horizonte Médico*, 11(2). Journal Article.
- Muszyńska, B., & Sułkowska-Ziaja, K. (2012). Analysis of indole compounds in edible Basidiomycota species after thermal processing. *Food Chemistry*, 132(1), 455–459. Journal Article. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.021>
- Nandakumar, M. P., Thakur, M. S., Raghavarao, K. S. M. S., & Ghildyal, N. P. (1999). Studies on catabolite repression in solid state fermentation for biosynthesis of fungal amylases. *Letters in Applied Microbiology*, 29(6), 380–384. Journal article. <http://doi.org/10.1046/j.1472->

765X.1999.00652.x

- Naser, K. A., Gruber, A., & Thomson, G. A. (2006). The emerging pandemic of obesity and diabetes: are we doing enough to prevent a disaster? *International Journal of Clinical Practice*, 60(9), 1093–1097. Journal Article.
- Neelam, S., & Singh, S. (2013). Comparative in vitro studies on phytochemical and antibacterial properties of ethanolic extracts of pleurotus florida and pleurotus ostreatus. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(3), B396–B400. Journal Article. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84881299664&partnerID=40&md5=c174ff67318763fca85f56080337633e>
- Nieto, I. J., & A., Chegwin, C. (2008). Triterpenoids and fatty acids identified in the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 53(2), 1515–1517. Journal Article.
- Nieto, I. J., & Chegwin A., C. (2010). Influencia del sustrato utilizado para el crecimiento de hongos comestibles sobre sus características nutraceuticas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12, 169–178. Journal Article. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752010000100016&nrm=iso
- Nieto, I. J., & Chegwin-Angarita, C. (2013). The effect of different substrates on triterpenoids and fatty acids in fungi of the genus pleurotus. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 58(1), 1580–1583. Journal Article. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84878250694&partnerID=40&md5=6ee4cc3eee1d7ef01e76451737d63bf3>
- Nieto, I. J., & Cucaita, E. del P. (2007). ÁCIDOS GRASOS, ÉSTERES Y ESTEROLES DEL CUERPO FRUCTÍFERO DEL HONGO *Laccaria laccata* FATTY ACIDS, ESTERS AND STEROLS OF THE *Laccaria laccata* MUSHROOM ÁCIDOS GRAXOS, ÉSTERES E ESTERÓIS DO CORPO FRUTÍFERO DO. *Revista Colombiana de Química*, 36(3). Journal Article.
- Nieto Ramírez, I. J., Chegwin Angarita, C., & Osorio Zuluaga, H. J. (2007). Incorporation of caffeine into the macromicete fungus *Pleurotus sajor-caju* growing on coffee pulp. *Revista Iberoamericana de Micología: Organo de La Asociacion Espanola de Especialistas En Micologia*, 24(1), 72–74.
- Nieto Ramirez, I. J., Chegwin-Angarita, C., & Osorio-Zuluaga, H. J. (2007). Incorporación de cafeína en el hongo *Pleurotus sajor-caju* cultivado sobre pulpa de café. *Revista Iberoamericana*

- de Micología*, 24(1), 72–74. Journal Article.
- Nieto-Ramirez, I., Chegwin-Angarita, C., Atehortúa, L., & Sepulveda, L. (2013). Las estatinas: Química, técnicas analíticas, biosíntesis y farmacocinética. *Revista de La Facultad de Química Farmacéutica*, 20(1), 49–63.
- Nogovitsina, E. M., Grishko, V. V., & G.A. B. (2014). β -sitosterol-Transforming activity of native and mutant *Rhodococcus* strains. *Investigación Fundamental*, (9–10), 2218–2222. Journal Article.
- Okamura, T., Hamada, K., Okuda, N., & Ohsugi, M. (1999). Effects of Fermentable Sugar Derived from Bunashimeji Mushroom on Fermentation in Bread Processing. Journal Article.
- Okamura, T., Nishikawa, Y., Okuda, N., & Ohsugi, M. (1998). Effects of adding mushrooms to dough on gas production and loaf volume, *J. Cookery Sci. Jpn*, 31, 30–36. Journal Article.
- Okamura-Matsui, T., Tomoda, T., Fukuda, S., & Ohsugi, M. (2003). Discovery of alcohol dehydrogenase from mushrooms and application to alcoholic beverages. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 23(2–6), 133–144. Journal Article. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S1381-1177\(03\)00079-1](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S1381-1177(03)00079-1)
- Oliver, A. P., Segura, C. P., Bonet P., M. L., Oliver V., P., Serra V., F., Rodríguez G., A. M., & Riutort, J. R. (2005). *El Libro Blanco De Los Esteroles Vegetales*. Book, España: Unilever Foods S.A.
- OMS. (2014). Estadísticas Sanitarias Mundiales 2014. (O. M. de la Salud, Ed.). Electronic Book.
- Ondeyka, J. G., Jayasuriya, H., Herath, K. B., Guan, Z., Schulman, M., Collado, J., ... Singh, S. B. (2005). Steroidal and triterpenoidal fungal metabolites as ligands of liver X receptors. *Journal of Antibiotics*, 58(9), 559–565. Journal Article. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-27244453583&partnerID=40&md5=d02f0eecff72b234d96866c213964504>
- Öztürk, M., Tel, G., Öztürk, F. A., & Duru, M. E. (2014). The cooking effect on two edible mushrooms in Anatolia: Fatty acid composition, total bioactive compounds, antioxidant and anticholinesterase activities. *Rec. Nat. Prod*, 8, 189–194. Journal Article.
- Papagianni, M., Matthey, M., & Kristiansen, B. (1998). Citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* as functions of the mixing intensity in a stirred tank and a tubular loop bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 2(3), 197–205. Journal Article. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X\(98\)00032-1](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X(98)00032-1)
- Papagianni, M., Nokes, S. E., & Filer, K. (2001). Submerged and solid-state phytase fermentation

- by *Aspergillus niger*: effects of agitation and medium viscosity on phytase production, fungal morphology and inoculum performance. *Food Technology and Biotechnology*, 39(4), 319–326. Journal Article.
- Patch, C. S., Tapsell, L. C., Williams, P. G., & Gordon, M. (2006). Plant sterols as dietary adjuvants in the reduction of cardiovascular risk: theory and evidence. *Vascular Health and Risk Management*, 2(2), 157. Journal Article.
- Patel, M., Patel, U., & Gupte, S. (2014). Production of Exopolysaccharide (EPS) and its Application by New Fungal Isolates SGMP1 and SGMP2. *International Journal of Agriculture, Environment & Biotechnology Citation*., (July), 511–523. Journal Article.
- Patel, Y., Naraian, R., & Singh, V. K. (2012). Medicinal Properties of *Pleurotus* Species (Oyster Mushroom): A Review. *World Journal of Fungal and Plant Biology*, 3(1), 1–12. Journal Article. <http://doi.org/10.5829/idosi.wjfpb.2012.3.1.303>
- Paterson, R. R. M. (2006). Ganoderma—a therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*, 67(18), 1985–2001. Journal Article.
- Paul, T., Jana, A., Das, A., Mandal, A., Halder, S. K., Mohapatra, P. K. Das, & Mondal, K. C. (2014). Smart cleaning-in-place process through crude keratinase: an eco-friendly cleaning techniques towards dairy industries. *Journal of Cleaner Production*, 76, 140–153. Journal Article.
- Perez G, R. M., Perez G, C., Perez G, S., & Zavala S, M. A. (1998). Effect of triterpenoids of *Bouvardia terniflora* on blood sugar levels of normal and alloxan diabetic mice. *Phytomedicine*, 5(6), 475–478. Journal Article.
- Pérez-Guisado, J. (2007). Argumentos a favor de la incorporación de los β -D-glucanos a la alimentación. *Endocrinología Y Nutrición*, 54(6), 315–324. Journal Article.
- Pérez-Silva García, M., Belmonte Cortés, S., & Martínez Corral, J. (1998). Estudio microbiológico de los alimentos elaborados en comedores colectivos de alto riesgo. *Revista Española de Salud Pública*, 72(1), 67–75. Journal Article.
- Peterson, D. W. (1951). Effect of Soybean Sterols in the Diet on Plasma and Liver Cholesterol in Chicks. *Experimental Biology and Medicine*, 78(1), 143–147.
- Petre, M., Petre, V., & Dută, M. (2014). Mushroom biotechnology for bioconversion of fruit tree wastes into nutritive biomass. *Romanian Biotechnological Letters*, 19(6), 9952–9958. Journal Article. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84920472163&partnerID=40&md5=93699eb3d9168ad8b8163576e95d4a59>
- Phillips, K. M., Ruggio, D. M., Horst, R. L., Minor, B., Simon, R. R., Feeney, M. J., ... Haytowitz,

- D. B. (2011). Vitamin D and sterol composition of 10 types of mushrooms from retail suppliers in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14), 7841–7853. Journal Article. <http://doi.org/10.1021/jf104246z>
- Popescu, M. L., Culmes, M., & Gird, C. E. (2015). QUALITATIVE AND QUANTITATIVE CHEMICAL STUDY OF RUSSULA VIRESCENS MUSHROOM. *FARMACIA*, 63(3), 334–337. Journal Article.
- Prasad, S., Rathore, H., Sharma, S., & Yadav, A. S. (2015). Medicinal Mushrooms as a Source of Novel Functional Food. *Int J Food Sci Nutr Diet*, 4(5), 221–225. Journal Article.
- Quintana-Obregón, E. A., Plascencia-Jatomea, M., Sánchez-Mariñez, R. I., Rosas-Burgos, E. C., & Cortez-Rocha, M. O. (2010). Inhibición del crecimiento radial“ in vitro” de la Fusarium verticillioides en presencia de quitosano. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 11(6), 386–391. Journal Article.
- Raghavarao, K. S. M. S., Ranganathan, T. V., & Karanth, N. G. (2003). Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2–3), 127–135. Journal Article. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00125-0](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00125-0)
- Rajarithnam, S., Bano, Z., & Miles, P. G. (1987). Pleurotus mushrooms. Part I A. Morphology, life cycle, taxonomy, breeding, and cultivation. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 26(2), 157–223. Journal Article.
- Ramboult, M. (1998). 1998 Ramboult General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3). Retrieved from http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-34581998000300007&script=sci_arttext&tlng=pt
- Ratnayake, W. S., & Jackson, D. S. (2006). Gelatinization and solubility of corn starch during heating in excess water: new insights. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(10), 3712–3716. Journal Article. <http://doi.org/10.1021/jf0529114>
- Ravi, B., Renitta, R. E., Prabha, M. L., Issac, R., & Naidu, S. (2013). Evaluation of antidiabetic potential of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in alloxan-induced diabetic mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 35(1), 101–109. Journal Article. <http://doi.org/10.3109/08923973.2012.710635>
- Ren, X., He, L., Cheng, J., & Chang, J. (2014). Optimization of the solid-state fermentation and properties of a polysaccharide from *Paecilomyces cicadae* (Miquel) Samson and its antioxidant activities in vitro. *PLoS ONE*, 9(2), e87578. Journal Article.
- Ribeiro, A., Ruphuy, G., Lopes, J. C., Dias, M. M., Barros, L., Barreiro, F., & Ferreira, I. C. F. R.

- (2015). Spray-drying microencapsulation of synergistic antioxidant mushroom extracts and their use as functional food ingredients. *Food Chemistry*, 188, 612–618. Journal Article.
- Ribeiro, B., de Pinho, P. G., Andrade, P. B., Baptista, P., & Valentão, P. (2009). Fatty acid composition of wild edible mushrooms species: A comparative study. *Microchemical Journal*, 93(1), 29–35. Journal Article.
- Riquelme, M., Reynaga-Peña, C. G., Gierz, G., & Bartnicki-García, S. (1998). What Determines Growth Direction in Fungal Hyphae? *Fungal Genetics and Biology*, 24(1–2), 101–109. <http://doi.org/10.1006/fgbi.1998.1074>
- Rivera, A., Nieto, I. J., & Valencia, M. A. (2002). Composición y cuantificación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de la fracción esterólica de once hongos colombianos. *Revista Colombiana de Química*, 31(2), 95–102. Journal Article.
- Rivera Morales, O. A. (2010). *Estudio del efecto de la adición del estípite de Shiitake (Lentinula edodes Berk. Pegler) y de un extracto rico en sus polisacáridos sobre las cualidades nutricionales del antipasto/Study of effect of addition of Shiitake stipe (Lentinula edodes Berk. Peg) (Thesis)*. Universidad Nacional de Colombia.
- Roberfroid, M. B. (2002). Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87(SupplementS2), S139–S143. Journal Article. <http://doi.org/doi:10.1079/BJN/2002529>
- Roberfroid, M. B. (2002). Global view on functional foods: European perspectives. *British Journal of Nutrition*, 88(SupplementS2), S133–S138. Journal Article. <http://doi.org/doi:10.1079/BJN2002677>
- Rodríguez, E., Nuero, O., Guillén, F., Martínez, A. T., & Martínez, M. J. (2004). Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: The role of laccase and versatile peroxidase. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(6), 909–916. Journal Article. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.02.005>
- Ross, S. (2000). Functional foods: the Food and Drug Administration perspective. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(6), 1735s–1738s. Journal Article.
- Roupas, P., Keogh, J., Noakes, M., Margetts, C., & Taylor, P. (2012). The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 687–709. Journal Article. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2012.05.003>
- Rugama, M. S. F. A., & Castillo, I. Y. (2010). Un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria. *Universidad Nacional de Ingeniería UNI - Norte*, 63. Retrieved from

- <http://avdiaz.files.wordpress.com/2010/02/documento-microbiologia.pdf>
- Saarela, M. (2011). *Functional Foods: Concept to Product: Second Edition. Functional Foods: Concept to Product: Second Edition*. Book, Elsevier Ltd. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84902631618&partnerID=40&md5=23f071e6cb65f4d67076dc2b541363ac>
- Sabir, S. M., Hayat, I., & Gardezi, S. D. A. (2003). Estimation of sterols in edible fats and oils. *Pak J Nutr*, 2(3), 178–181. Journal Article.
- Sasidhara, R., & Thirunalasundari, T. (2014). Phytochemicals and antioxidant potentials of pleurotus djamor. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(4), 950–953. Journal Article. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84899851911&partnerID=40&md5=aa82febc4a5d832ee96575f98e4ec43d>
- Sathyaprabha, G., Kumaravel, S., & Panneerselvam, A. (2011). Studies on photochemical and vitamin analysis of Pleurotus platypus and Pleurotus oeus by GC/MS and HPLC technique. *Int J Pharm Sci Res*, 2, 2816–2821. Journal Article.
- Schmid, J., & Harold, F. M. (1988). Dual roles for calcium ions in apical growth of *Neurospora crassa*. *Microbiology*, 134(9), 2623–2631. Journal Article.
- Schneider, I., Kressel, G., Meyer, A., Krings, U., Berger, R. G., & Hahn, A. (2011). Lipid lowering effects of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in humans. *Journal of Functional Foods*, 3(1), 17–24. Journal Article.
- Scicchitano, P., Cameli, M., Maiello, M., Modesti, P. A., Muiesan, M. L., Novo, S., ... Ciccone, M. M. (2014). Nutraceuticals and dyslipidaemia: Beyond the common therapeutics. *Journal of Functional Foods*, 6(1), 11–32. Journal Article. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2013.12.006>
- Semedo, M. C., Karmali, A., & Fonseca, L. (2015). A high throughput colorimetric assay of β -1,3-d-glucans by Congo red dye. *Journal of Microbiological Methods*, 109, 140–148. Journal Article. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2014.12.020>
- Shai, L. J., McGaw, L. J., Aderogba, M. A., Mdee, L. K., & Eloff, J. N. (2008). Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(2), 238–244. Journal Article. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2008.06.036> [10.1016/j.sajb.2008.04.003](http://doi.org/10.1016/j.sajb.2008.04.003)
- Siddiqui, S., Hafeez, F., Begum, S., Siddiqui, B.S., Oleanderol, a new pentacyclic triterpene from the leaves of *Nerium oleander* (1988) *Journal of Natural Products*, 51, pp. 233-299
- Sharan, A., Charan, A. A., Bind, A., & Tiwari, S. B. (2015). Citric acid production from pre-treated

- sugarcane bagasse by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. *Asian Journal of Bio Science*, 10(2), 162–166. Journal Article.
- Shcherba, V. V., & Babitskaya, V. G. (2004). The Carbohydrates of Submerged Mycelium of Xylophilic Basidiomycetes. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40(6), 551–554. Journal Article. <http://doi.org/10.1023/b:abim.0000046988.73746.51>
- Sihuanca Mendoza, D. (2011). Desarrollo de un proceso biotecnológico para la producción de variedades especiales de hongos comestibles (*Pleurotus*, *Lentinula*, *Hypsizygus*), empleando bagazo de caña de azúcar y otros subproductos agrícolas y forestales como sustrato de cultivo. Journal Article.
- Silveira, M. L. L., Smiderle, F. R., Agostini, F., Pereira, E. M., Bonatti-Chaves, M., Wisbeck, E., ... Iacomini, M. (2015). Exopolysaccharide produced by *Pleurotus sajor-caju*: Its chemical structure and anti-inflammatory activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75(JANUARY), 90–96. Journal Article. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.023>
- Silvério, F. O., Barbosa, L. C. A., Silvestre, A. J. D., Piló-Veloso, D., & Gomide, J. L. (2007). Comparative study on the chemical composition of lipophilic fractions from three wood tissues of *Eucalyptus* species by gas chromatography-mass spectrometry analysis. *Journal of Wood Science*, 53(6), 533–540. Journal Article.
- Siwulski, M., Sobieralski, K., Golak-Siwulska, I., Sokół, S., & Sękara, A. (2015). *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) Karst.–health-promoting properties. A review. *Herba Polonica*, 61(3), 105–118. Journal Article.
- Sławińska, A., & Kalbarczyk, J. (2011). Evaluation of enzymatic activity of *Pleurotus ostreatus* regarding stages of mycelium development. *Acta Sci Pol*, 10(2), 195–202. Journal Article. Retrieved from [http://wydawnictwo.up.lublin.pl/acta/hortorum_cultus/2011/acta_hort_10\(2\)_art_16.pdf](http://wydawnictwo.up.lublin.pl/acta/hortorum_cultus/2011/acta_hort_10(2)_art_16.pdf)
- Slivinski, C. T., Mallmann, E., de Araújo, J. M., Mitchell, D. A., & Krieger, N. (2012). Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. *Process Biochemistry*, 47(12), 1848–1855. Journal Article.
- Smiderle, F. R., Olsen, L. M., Ruthes, A. C., Czelusniak, P. A., Santana-Filho, A. P., Sasaki, G. L., ... Iacomini, M. (2012). Exopolysaccharides, proteins and lipids in *Pleurotus pulmonarius* submerged culture using different carbon sources. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 368–376. Journal Article. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.063>

- Smith, H., Doyle, S., & Murphy, R. (2015). Filamentous fungi as a source of natural antioxidants. *Food Chemistry*, *185*, 389–397. Journal Article.
- Sofi, P. A., Wani, S. A., Rather, A. G., & Wani, S. H. (2009). Quality protein maize (QPM): Genetic manipulation for the nutritional fortification of maize. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, *1*(6), 244–253. Retrieved from <http://www.academicjournals.org/jpbcs>
- Soto-Cruz, O., Saucedo-Castañeda, G., Pablos-Hach, J. L., Gutiérrez-Rojas, M., & Favela-Torres, E. (1999). Effect of substrate composition on the mycelial growth of *Pleurotus ostreatus*. An analysis by mixture and response surface methodologies. *Process Biochemistry*, *35*(1), 127–133. Journal Article.
- Srianta, I., Zubaidah, E., Estiasih, T., & Yamada, M. (2016). Comparison of *Monascus purpureus* growth, pigment production and composition on different cereal substrates with solid state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Journal Article.
- Stephen, A., & Suresh, R. (2015). Nutritive and Therapeutic Values of Vegetables from the Markets of Chennai, Tamil Nadu, India. *Journal of Academia and Industrial Research (JAIR)*, *3*(11), 546. Journal Article.
- Suárez-Arango, C. (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* (Thesis). Programa Interfacultades en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C.
- Sun, X., Liu, Z., Qu, Y., & Li, X. (2008). The effects of wheat bran composition on the production of biomass-hydrolyzing enzymes by *Penicillium decumbens*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *146*(1–3), 119–128. Journal Article. <http://doi.org/10.1007/s12010-007-8049-3>
- Sun-Waterhouse, D. (2011). The development of fruit-based functional foods targeting the health and wellness market: A review. *International Journal of Food Science and Technology*, *46*(5), 899–920. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02499.x>
- Synytsya, A., Míčková, K., Jablonský, I., Sluková, M., & Čopíková, J. (2008). Mushrooms of Genus *Pleurotus* as a source of dietary fibres and glucans for food supplements. *Czech Journal of Food Sciences*, *26*(6), 441–446. Journal Article. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-58649117942&partnerID=40&md5=dd93d9674d79e4f69d44edafd6215a44>
- Synytsya, A., Míčková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Spěváček, J., Erban, V., ... Čopíková, J.

- (2009). Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers*, 76(4), 548–556. Journal Article. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.021>
- Tai-Hao, H. S. U., & Lin, F.-Y. (2013). Production method of extracellular polysaccharopeptides by *trametes versicolor* lh1 immobilization using liquid-surface complex carriers in submerged fermentation. Generic, Google Patents.
- Takeo, T., Okamura, T., Fukuda, S., Okuda, N., & Ohsugi, M. (2001). Utilization of Enokitake and Shiitake in fiber-bread processing and their characteristics. Journal Article.
- Tan, M.-J., Ye, J.-M., Turner, N., Hohnen-Behrens, C., Ke, C.-Q., Tang, C.-P., ... Rowland, A. (2008). Antidiabetic activities of triterpenoids isolated from bitter melon associated with activation of the AMPK pathway. *Chemistry & Biology*, 15(3), 263–273. Journal Article.
- Tang, Y., Li, H. M., & Tang, Y. J. (2012). Comparison of sterol composition between *Tuber* fermentation mycelia and natural fruiting bodies. *Food Chemistry*, 132(3), 1207–1213. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.077>
- Taskin, M., Erdal, S., & Genisel, M. (2011). Biomass and exopolysaccharide production by *Morchella esculenta* in submerged culture using the extract from waste loquat (*Eriobotrya japonica* L.) kernels. *Journal of Food Processing and Preservation*, 35(5), 623–630. Journal Article. <http://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2010.00510.x>
- Tewtrakul, S., Tansakul, P., Daengrot, C., Ponglimanont, C., & Karalai, C. (2010). Anti-inflammatory principles from *Heritiera littoralis* bark. *Phytomedicine*, 17(11), 851–855. Journal Article.
- Thompson, G. R., & Grundy, S. M. (2005). History and development of plant sterol and stanol esters for cholesterol-lowering purposes. *The American Journal of Cardiology*, 96(1), 3–9. Journal Article.
- Trinci, A. P. J. (1971). Influence of the Width of the Peripheral Growth Zone on the Radial Growth Rate of Fungal Colonies on Solid Media. *Journal of General Microbiology*, 67(3), 325–344. <http://doi.org/10.1099/00221287-67-3-325>
- Ulzizjargal, E., Yang, J.-H., Lin, L.-Y., Chen, C.-P., & Mau, J.-L. (2013). Quality of bread supplemented with mushroom mycelia. *Food Chemistry*, 138(1), 70–76. Journal Article.
- Uribe, C. V. C., & Palacio, L. M. A. (2010). Enfermedades crónicas no transmisibles. *Salud Uninorte*, 26(2). Journal Article.
- Valverde, M. E., Hernández-Pérez, T., & Paredes-López, O. (2015). Edible mushrooms: improving

- human health and promoting quality life. *International Journal of Microbiology*, 2015. Journal Article.
- Vamanu, E. (2012). Biological activities of the polysaccharides produced in submerged culture of two edible *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012. Journal Article. <http://doi.org/10.1155/2012/565974>
- Vásquez Vanegas, A. M. (2013). *Producción de xilanasas por Aspergillus sp. en fermentación sumergida y en fermentación en medio sólido* (Thesis). *Ingeniería Química*. Universidad Iberoamericana, México D.F. Retrieved from <http://www.bib.uia.mx/tesis/pdf/015774/015774.pdf>
- Vollhardt, P., & Schore, N. (2009). *Organic Chemistry* (6th ed.). Book, New York: W. H. Freeman and Company.
- Wang, D. Q.-H. (2007). Regulation of intestinal cholesterol absorption. *Annu. Rev. Physiol.*, 69, 221–248. Journal Article.
- Wang, L. X., Lu, Z. M., Geng, Y., Zhang, X. M., Xu, G. H., Shi, J. S., & Xu, Z. H. (2014). Stimulated production of steroids in *Inonotus obliquus* by host factors from birch. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(6), 728–731. <http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.05.022>
- Wang, S., Bao, L., Zhao, F., Wang, Q., Li, S., Ren, J., ... Liu, H. (2013). Isolation, Identification, and Bioactivity of Monoterpenoids and Sesquiterpenoids from the Mycelia of Edible Mushroom *Pleurotus cornucopiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(21), 5122–5129. Journal Article. <http://doi.org/10.1021/jf401612t>
- Wang, W. ., Klopfenstein, C. F., & J.G. Ponte, J. (1993). Effects of twin-screw extrusion on the physical properties of dietary fiber and other components of whole wheat and wheat bran and on the baking quality of the wheat bran. *American Association of Cereal Chemists*.
- Wang, W., Chen, K., Liu, Q., Johnston, N., Ma, Z., Zhang, F., & Zheng, X. (2014). Suppression of tumor growth by *Pleurotus ferulae* ethanol extract through induction of cell apoptosis, and inhibition of cell proliferation and migration. *PLoS ONE*, 9(7). Journal Article. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0102673>
- Wang, W. M., Klopfenstein, C. F., & Ponte Jr, J. G. (1993). Baking Quality of the Wheat Bran1. *Cereal Chem*, 70(6), 707–711. Journal Article.
- Wasser, S. P., & Weis, A. L. (1999). Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: Current perspectives. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 31–62. Journal Article.

- Watts, B. M., Ylimaki, G. L., & Jeffery, L. E. (1992). *Métodos sensoriales básicos para la evaluación de alimentos* (3°). Otawwa: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo.
- Wilson, M. D., & Rudel, L. L. (1994). Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol. 1994. *J. Lipid Res*, 35, 943–955. Journal Article.
- Wriessnegger, T., & Pichler, H. (2013). Yeast metabolic engineering - Targeting sterol metabolism and terpenoid formation. *Progress in Lipid Research*, 52(3), 277–293. <http://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.03.001>
- Wu, J.-Z., Cheung, P. C. K. K., Wong, K.-H., & Huang, N.-L. (2003). Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer—Part 1: physical and chemical factors affecting the rate of mycelial growth and bioconversion efficiency. *Food Chemistry*, 81(3), 389–393. Journal Article. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00457-0](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00457-0)
- Xu, X., Yan, H., Chen, J., & Zhang, X. (2011). Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnology Advances*, 29(6), 667–674. Journal Article.
- Xue, Z., Zhai, L., Yu, W., Wang, H., Kou, X., Peng, L., & Hu, D. (2015). Antitumor and Immunomodulatory Activity of *Pleurotus eryngii* Extract. *Journal of Food Biochemistry*, 39(1), 19–27. <http://doi.org/10.1111/jfbc.12096>
- XuJie, H., Na, Z., SuYing, X., ShuGang, L., & BaoQiu, Y. (2008). Extraction of BaChu mushroom polysaccharides and preparation of a compound beverage. *Carbohydrate Polymers*, 73(2), 289–294. Journal Article. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.11.033>
- Yang, F. Q., Feng, K., Zhao, J., & Li, S. P. (2009). Analysis of sterols and fatty acids in natural and cultured *Cordyceps* by one-step derivatization followed with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49(5), 1172–1178. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.02.025>
- Yoon, L. W., Ang, T. N., Ngoh, G. C., & Chua, A. S. M. (2014). Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. *Biomass and Bioenergy*, 67, 319–338. Journal Article.
- Zapata, P. A. (2007). Evaluación y desarrollo de un medio de cultivo para la producción de biomasa micelial del hongo medicinal *Ganoderma lucidum* bajo cultivo sumergido. *Medellín (Colombia): Facultad de Ciencias Exactas Y Naturales, Instituto de Biología. Universidad de Antioquia*. Journal Article.
- Zapata, P. A., Rojas, D. F., & Atehortua, L. (2012). Production of Biomass, Polysaccharides, and

- Ganoderic Acid using Non-conventional Carbon Sources under Submerged Culture of the Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.)P. Karst. (Higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 14(2), 197–203. <http://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v14.i2.80>
- Zerenturk, E. J., Sharpe, L. J., Ikonen, E., & Brown, A. J. (2013). Desmosterol and DHCR24: Unexpected new directions for a terminal step in cholesterol synthesis. *Progress in Lipid Research*, 52(4), 666–680. Journal Article. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2013.09.002>
- Zhajun, Z., Ying, W., Shengping, Y., & Jianmin, Y. (2003). Steroids from the fungus *Pleurotus ostreatus*. *Acta Botanica Sinica*, 45(6), 753–756. Journal Article.
- Zhang, Q., Zuo, F., Nakamura, N., Ma, C.-M., & Hattori, M. (2009). Metabolism and pharmacokinetics in rats of ganoderiol F, a highly cytotoxic and antitumor triterpene from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Natural Medicines*, 63(3), 304–310. Journal Article. <http://doi.org/10.1007/s11418-009-0337-5>