



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Determinación de la correlación tiempo de fermentación-características estructurales y cantidad de bioactivos, de *Pleurotus* cultivados por FEL y su incidencia en el potencial antibiótico del producto biotecnológico**

**Alvaro Leonardo Bravo Espejo**

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

2017



# **Determinación de la correlación tiempo de fermentación- características estructurales y cantidad de bioactivos, de *Pleurotus* cultivados por FEL y su incidencia en el potencial antibiótico del producto biotecnológico**

**Alvaro Leonardo Bravo Espejo**

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

Directora:

Dra. Ivonne J. Nieto Ramírez

Codirectora:

Dra. Carolina Chegwin Angarita

Productos Naturales

Grupo de Investigación en Química de Hongos Macromicetos Colombianos

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

2017



*Este trabajo está dedicado a mi Madre Mireya Espejo, a mi padre Alvaro Bravo, a mi hermano Juan Sebastián Bravo y a mi tío Salomón Bravo. Ellos me forjaron como persona y gracias a ellos, tengo la oportunidad de presentar este escrito. Los amo con el alma.*

## Agradecimientos

Le agradezco a Dios por permitirme compartir con las personas que conocí a lo largo de mi pregrado y posgrado. A mi familia por ser un apoyo incondicional, fundamental para mi trabajo. Además, los valores inculcados, me han permitido generar, en mi ámbito científico y social, lazos fraternos con las personas que he ido conociendo. Mil gracias a mi mamá y papá. A mi hermano Juan Sebastián, que estuvo conmigo siempre y me ayudó con sus conocimientos y su tiempo. A mi directora y profesora Ivonne J. Nieto, por su paciencia y amistad, por todas las enseñanzas que me brindó, por abrirme las puertas de su grupo de investigación durante 4 años y medio y soportar a este joven hiperactivo. A mi Co-Directora, profesora y amiga Carolina Chegwin, le agradezco de corazón su participación en el trabajo, su capacidad motivadora, el tiempo brindado y particularmente su esfuerzo en mi preparación como estudiante y profesional. A mi grupo de investigación, Carito Vega, Diego, Daniel, Manuel Gastelbondo, Jeimmy y Manuel Patiño. No pude tener mejor grupo, lleno de amor, cariño, fraternidad y una sed insaciable de investigación. Les guardo mucho cariño por su apoyo y amabilidad. Los quiero mucho. A Setas exóticas de Colombia y particularmente a Alejandro Rivera por su apoyo y amistad tanto de forma personal como científica. Al grupo de investigación en Microbiología Ambiental del Departamento de Química, a sus estudiantes y particularmente al profesor Pedro Filipe de Brito Brandão, que me confió su laboratorio y me brindó herramientas para culminar de manera satisfactoria mi trabajo. Mil gracias profe Pedro. Al grupo de investigación de Biopolímeros perteneciente a los laboratorios de ingeniería química (LIQ). De manera especial darle las gracias a Juan Pablo Ortiz, que sacó de su tiempo y paciencia para colaborar. Al grupo de investigación de Agrobiotecnología de la Facultad de Ciencias Agrarias, a sus estudiantes y a su docente, la profesora Esperanza Torres, por permitirme hacer uso de sus instalaciones y equipos. Al grupo de Investigación en Microbiología del Departamento de Biología, mil gracias por su apoyo y colaboración. Quisiera darle las gracias a los docentes que me formaron en el pregrado, dado que gracias a ellos adquirí conocimientos fundamentales para el presente trabajo. De manera especial a la Profesora Liliam Palomeque, es la docente ejemplar y a quien le debo el apoyo para poderme graduar de Químico. A la profesora Diana Farías, por su esfuerzo por mejorar el departamento durante su instancia en la dirección, acciones que estarán siempre en los estudiantes que pasen por el Departamento. Al profe Marco Fidel, que me brindó la motivación en una clase de mi pregrado y sus palabras aún hacen eco. A la profesora Diana Sinuco, a los profesores Freddy Ramos y Leonardo Castellanos, que fueron docentes con los que aprendí montones. Quisiera agradecer al profesor de mi vida, a mi tío Salomón, sin él no hubiera podido ser quien soy y es el docente que todos llegamos a necesitar a lo largo de nuestra vida. Finalmente, a mis amigos de carrera con los que compartí, lloré, reí y pasamos momentos inolvidables, Diego Insuasty, Carlos Ipiales, Diana Silva, Farja Ayala, Tatiana Albarracin, Alejandro Cubides y Stefanie Ramos.

## Resumen

El cultivo biotecnológico ha permitido el mejor aprovechamiento de las propiedades nutraceuticas de los macrohongos, ya que gracias al manejo de las variables de estos procesos se puede obtener biomasa más rápidamente y con mayor contenido de bioactivos. Es este hecho lo que ha incentivado la utilización de las fermentaciones y el aumento de las investigaciones con la finalidad de obtener el mayor beneficio de ellas. Tal es el caso de la presente investigación, en la cual se evaluó la incidencia del empleo de diferentes FC tienen sobre el carácter nutraceutico de la biomasa de *P. eryngii* cultivado por FEL. Así mismo, se realizó la determinación de los metabolitos secundarios a lo largo del tiempo de fermentación, no sólo para llenar el vacío investigativo en este aspecto, sino para establecer el día de su mayor producción y evaluar si durante la fermentación se presenta variación estructural de los mismos. Como resultado se encontró que son el empleo de la harina de garbanzo como FC y un tiempo de fermentación de 9 días, las condiciones que permiten la consecución de la biomasa con mayor valor nutraceutico. En cuanto a los bioactivos, que para este caso son los compuestos triterpenoidales y específicamente los esteroides, escogidos por su actividad antimicrobiana, no presentaron cambios estructurales, pero si en su contenido en la biomasa. Sin embargo, al ser evaluada dicha actividad, se encontró que si bien el extracto la posee no es debida a los triterpenoides, lo que lleva a concluir que la misma debe ser proporcionada por los ácidos grasos, componentes mayoritarios del extracto. La baja actividad antimicrobiana presentada no permite considerar a la biomasa obtenida como la materia prima para la consecución de un buen nutraceutico, resultado que no disminuye su carácter nutraceutico puesto que contiene otros metabolitos también poseedores de bioacciones.

**Palabras clave:** (Hongos Macromicetos, *Pleurotus eryngii*, Biotecnología, Fermentación en estado líquido, actividad antimicrobiana, bioactivos, esteroides).

## Abstract

Biotechnology cultures has allowed best use of nutraceutical properties of macro-fungus. Thanks to handling of processes variables, biomass can be obtained faster and higher bioactive content. This fact has encouraged use of fermentations and increased research to obtain greatest benefit from them. In case of present research, the incidence use of different carbon sources on the nutraceutical character of *Pleurotus eryngii* biomass cultivated by LSF was evaluated. Also, determination of secondary metabolites during fermentation time was carried out, not only to fill investigative absence in this aspect, as well establish the day of greater production and evaluate if during fermentation there is a structural variation. As result was found that use chickpea flour as FC and fermentation time of 9 days are the conditions that allow achievement of biomass with higher nutraceutical value. For the bioactive, which in this case are triterpenoid compounds, specifically sterols, chosen due their antimicrobial activity, did not present structural changes but if in their content in biomass. However, when antimicrobial activity was evaluated, was found in extract, but is not due triterpenoids, which leads infer that it must be provided by the fatty acids, major components of the extract. Low antimicrobial activity presented does not allow consider obtained biomass as raw material for achievement of a good nutraceutical, result does not diminish nutraceutical character since contains other metabolites also possessing bioactions.

**Keywords: (Mushrooms Macromycetes, *Pleurotus eryngii*, Biotechnology, Liquid State Fermentation, antimicrobial activity, bioactive, sterols)**

# Contenido

	Pág.
<b>1. Selección de la Fuente de carbono que permita la mejor eficiencia en el cultivo biotecnológico de <i>Pleurotus eryngii</i></b> .....	<b>3</b>
1.1 Antecedentes.....	3
1.2 Macromicetos .....	4
1.3 Basidiomicetos.....	6
1.3.1 El género <i>Pleurotus</i> .....	7
1.3.2 El hongo <i>Pleurotus eryngii</i> .....	8
1.4 Cultivo tradicional .....	9
1.5 Biotecnología .....	10
1.5.1 Fermentaciones .....	11
1.5.2 Fermentación en estado sólido .....	11
1.5.3 Fermentación superficial .....	12
1.5.4 FEL.....	14
1.6 Efecto de la Fuente de Carbono sobre la producción de biomasa en la FEL.....	16
1.7 Metodología .....	19
1.7.1 Obtención del material fúngico.....	19
1.7.2 Materiales y reactivos .....	19
1.7.3 Fermentación superficial .....	20
1.7.4 Fermentación en estado líquido.....	20
1.7.5 Tratamiento estadístico.....	20
1.7.6 Análisis elemental .....	20
1.8 Análisis de resultados .....	21
1.8.1 Fermentación superficial (Fesup).....	21
1.8.2 Fermentación en estado líquido (FEL).....	27
1.9 Conclusiones .....	30
<b>2. Selección de la FC que proporcione el producto biotecnológico de mayor valor nutracéutico y determinación de su potencial en la obtención de un buen nutracéutico</b> .....	<b>33</b>
2.1 Antecedentes.....	33
2.2 Aspectos nutracéuticos, nutracéuticos, farmacéuticos y cosmeceúticos de macrohongos.....	34
2.3 Bioactivos en macromicetos .....	35
2.3.1 Compuestos triterpenoidales en macromicetos .....	39
2.3.2 Triterpenos del género <i>Pleurotus</i> .....	43
2.4 Incidencia de la composición del medio de cultivo en la producción de bioactivos	45
2.5 Influencia del tiempo de fermentación en el carácter nutracéutico de la biomasa fúngica.....	46

X Determinación de la correlación tiempo de fermentación-características estructurales y cantidad de bioactivos, de *Pleurotus* cultivados por FEL y su incidencia en el potencial antibiótico del producto biotecnológico

---

2.6	Metodología .....	50
2.6.1	Materiales y reactivos .....	50
2.6.2	Obtención de biomasa a mayor escala.....	50
2.6.3	Extracción de los metabolitos secundarios de la biomasa de <i>P. eryngii</i> .....	50
2.6.4	Purificación del extracto por cromatografía en columna clásica .....	50
2.6.5	Elucidación estructural.....	51
2.6.6	Cuantificación de esteroides por método espectrofotométrico .....	51
2.6.7	Cinética de crecimiento.....	51
2.6.8	Saponificación.....	51
2.6.9	Análisis estadístico .....	52
2.7	Resultados y análisis.....	52
2.7.1	Incidencia de la FC en la cantidad de esteroides de la biomasa del <i>P. eryngii</i> .....	52
2.7.2	Efecto de la FC sobre la composición de la fracción grasa de la biomasa del <i>P. eryngii</i> .....	55
2.7.3	Influencia del tiempo de fermentación en el carácter nutracéutico de la biomasa del <i>P. eryngii</i> .....	59
2.7.4	Determinación estructural de los metabolitos triterpenoidales del <i>P. eryngii</i> presentes en el extracto saponificado y en las fracciones obtenidas por CCC.....	61
2.8	Conclusiones .....	73
<b>3.</b>	<b>Potencial antibiótico de los bioactivos del <i>P. eryngii</i> cultivado por FEL.....</b>	<b>75</b>
3.1	Antecedentes.....	75
3.2	Actividad antimicrobiana de basidiomicetos .....	76
3.3	Actividad antimicrobiana de ácidos grasos y triterpenos en basidiomicetos .....	81
3.4	Metodología.....	86
3.4.1	Actividad antimicrobiana por el método de discos por difusión en agar .....	86
3.4.2	Actividad antimicrobiana por el método de pozos por difusión en agar.....	86
3.5	Resultados y análisis.....	87
3.6	Conclusiones .....	89
<b>4.</b>	<b>Conclusiones generales y recomendaciones .....</b>	<b>90</b>
	Conclusiones.....	90
	Recomendaciones.....	91

## Lista de Figuras

	<b>Pág.</b>
<i>Figura 1-1: Partes que conforman el cuerpo fructífero de un hongo basidiomiceto</i> .....	6
<i>Figura 1-2: Diferentes especies del género Pleurotus (Superior izquierda y centro: P. pulmonarius, superior derecha: P. citrinopileatus, Inferior izquierda: P. ostreatus e inferior derecha: P. djamor) (imagen compilada por el autor)</i> .....	7
<i>Figura 1-3: Cuerpo fructífero del Pleurotus eryngii. (Tomado de: <a href="http://www.edulis.com/Eryngii.php">http://www.edulis.com/Eryngii.php</a>)</i> .....	9
<i>Figura 1-4: Producción de hongos comestibles a través de cultivo tradicional A) cultivo tradicional de Pleurotus ostreatus (Imagen tomada de: <a href="http://tips-ukm.com/teknik-penanaman-pemeliharaan-serta-pemanenan-pada-budidaya-jamur-tiram/">http://tips-ukm.com/teknik-penanaman-pemeliharaan-serta-pemanenan-pada-budidaya-jamur-tiram/</a>) B) Shiitake (Lentinula edodes) en Colombia (Imagen brindada por Setas exóticas de Colombia SA)</i> .....	10
<i>Figura 1-5: Biorreactor tipo bandeja (Yoon et al., 2014).</i> .....	12
<i>Figura 1-6: Crecimiento en FeSup de un Pleurotus eryngii en caja de Petri (Imagen tomada por el autor)</i> ....	13
<i>Figura 1-7: Fermentaciones en estado líquido A) A escala laboratorio en erlenmeyers (Imagen tomada por el autor). B) Bioreactor convencional con control de aireación, pH, viscosidad, entre otros (tomado de: <a href="http://medellin.unal.edu.co/~biofab/concurso.html">http://medellin.unal.edu.co/~biofab/concurso.html</a>).</i> .....	15
<i>Figura 1-8: Formación de pellets en una FEL del hongo Pleurotus eryngii (imagen tomada por el autor)</i> .....	15
<i>Figura 1-9: Producción de biomasa de tres hongos del género Pleurotus cultivados por FEL haciendo uso de harinas de cereal como medio de cultivo (Chegwin Angarita, 2014).</i> .....	19
<i>Figura 1-10: Análisis proximal de las diferentes fuentes de carbono empleadas como componentes del medio de cultivo para Pleurotus eryngii A) Contenido proteico B) Carbohidratos C) Lípidos. Datos tomados de: <a href="http://alimentoscolombianos.icbf.gov.co/alimentos_colombianos/consulta_alimento.asp">http://alimentoscolombianos.icbf.gov.co/alimentos_colombianos/consulta_alimento.asp</a></i> .....	23
<i>Figura 1-11: Crecimiento radial del Pleurotus eryngii en diferentes FC por FeSup</i> .....	25
<i>Figura 1-12: Relación C/N de las FC usadas y cantidad de biomasa de Pleurotus eryngii obtenida con cada una de ellas mediante FEL.</i> .....	27
<i>Figura 2-1: Estructuras de algunos metabolitos aislados de hongos macromicetos</i> .....	36
<i>Figura 2-2: Núcleos triterpenoidales más comunes en hongos basidiomicetos</i> .....	39
<i>Figura 2-3: Esteroles ampliamente distribuidos en el reino fungi</i> .....	40
<i>Figura 2-4: Novedosos compuestos de carácter triterpenoidal con núcleo ergosta aislados de los cuerpos fructíferos de P. eryngii</i> .....	43
<i>Figura 2-5: Triterpenoies pentacíclicos aislados de P. eryngii</i> .....	44
<i>Figura 2-6: Contenido de esteroles presentes en extractos de acetato de etilo del micelio de tres especies de Pleurotus obtenidos mediante FEL con el empleo de diferentes FC</i> .....	46
<i>Figura 2-7: Curva de crecimiento micelial para Pleurotus tuber-regium con diferentes fuentes de carbono (J.-Z. Wu et al., 2003b)</i> .....	47
<i>Figura 2-8: Cinética de crecimiento del P. ostreatus obtenido por FEL en un medio suplementado con monosacáridos como fuente de carbono (referencia)</i> .....	48

XII Determinación de la correlación tiempo de fermentación-características estructurales y cantidad de bioactivos, de *Pleurotus* cultivados por FEL y su incidencia en el potencial antibiótico del producto biotecnológico

---

Figura 2-9: Porcentaje de esteroides en la biomasa de <i>Pleurotus eryngii</i> obtenida por FEL con el empleo de diferentes FC no tradicionales. ....	53
Figura 2-10: Correlación entre el contenido de esteroides (%) en la biomasa de <i>Pleurotus eryngii</i> obtenido por FEL y C/N de las diferentes FC no tradicionales empleadas.....	54
Figura 2-11: Cromatogramas de los extractos sin y con saponificación de la harina de garbanzo, soya y linaza .....	58
Figura 2-12: Producción de biomasa y esteroides del <i>P. eryngii</i> a lo largo de una fermentación en estado líquido.....	60
Figura 2-13: CCD del seguimiento en columna de las diferentes fracciones obtenidas.....	62
Figura 2-14: TIC de la fracción Fc2 del extracto de <i>P. eryngii</i> cultivado por FEL con el empleo de harina de garbanzo como FC .....	63
Figura 2-15: TIC del extracto saponificado del <i>P. eryngii</i> cultivado por FEL con el empleo de harina de garbanzo como FC. ....	63
Figura 2-16: A) Espectro de masas del compuesto 1, B) patrón de fragmentación propuesto.....	64
Figura 2-17: A) Espectro de masas del compuesto 2 y B) patrón su fragmentación propuesto. ....	65
Figura 2-18: A) Espectro de masas del compuesto 3 y B) patrón su fragmentación propuesto. ....	66
Figura 2-19: A) Espectro de masas del compuesto 4 y B) patrón su fragmentación propuesto. ....	67
Figura 2-20: A) Espectro de masas del compuesto 5 y B) patrón su fragmentación propuesto. ....	68
Figura 2-21: A) Espectro de masas del compuesto 6 y B) patrón su fragmentación propuesto. ....	69
Figura 2-22: Ruta biosintética de triterpenos pentacíclicos.....	71
Figura 2-23: Biosíntesis de la $\alpha$ -amirina .....	71
Figura 2-24: A) Espectro de masas del compuesto 7 y B) patrón su fragmentación propuesto .....	72

# Lista de tablas

Pág.

<i>Tabla 1-1: Comparación de algunas características entre los métodos de fermentación en estado líquido y sólido (Fazenda et al., 2008)</i> .....	15
<i>Tabla 1-2: Efecto de la Fuente de carbono sobre la producción de biomasa en FEL de diferente hongos basidiomicetos</i> .....	16
<i>Tabla 1-3: Uso de FC no tradicionales para incrementar la eficiencia en la producción de biomasa de P. ostreatus, P. pulmonarius y P. djamor</i> .....	18
<i>Tabla 1-4: Crecimiento radial en FeSup de Pleurotus eryngii haciendo uso de diferentes FC tradicionales y no tradicionales como medio de cultivo.</i> ....	22
<i>Tabla 1-5: Criterios de preselección de la fuente de carbono a emplear</i> .....	28
<i>Tabla 1-6: Producción de biomasa de otras especies de Pleurotus en comparación con las obtenidas en este trabajo</i> .....	30
<i>Tabla 2-1: Bioacciones determinadas por algunos metabolitos secundarios de macromicetos</i> .....	37
<i>Tabla 2-2: Productos comerciales que contienen metabolitos extraídos de hongos basidiomicetos (Brizuela, García, Pérez, &amp; Mansur, 1998)</i> .....	38
<i>Tabla 2-3: Esteroles distribuidos en basidiomicetos.</i> .....	40
<i>Tabla 2-4: Investigaciones realizadas sobre el seguimiento de bioactivos y biomasa a lo largo de una FEL con diferentes basidiomicetos</i> .....	48
<i>Tabla 2-5: Composición de la fracción grasa del del P. eryngii cultivado en las diferentes FC.</i> .....	55
<i>Tabla 2-6: Metabolitos secundarios determinados a lo largo de la fermentación.</i> .....	61
<i>Tabla 2-8: Triterpenos identificados en el extracto saponificado y en la Fracción Fc2 del P. eryngii cultivado en FEL</i> .....	73
<i>Tabla 3-1: Actividad antimicrobiana de extractos fúngicos en MeOH y DCM (Diámetro de la zona inhibida en mm)</i> .....	79
<i>Tabla 3-2: Actividad antimicrobiana de compuestos aislados del estípite de Shiitake</i> .....	85
<i>Tabla 3-3: Actividad antimicrobiana determinada por difusión en agar por el método de discos y pozos (mm)</i> .....	87

# Lista de abreviaturas

## Abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
<i>FC</i>	Fuente de Carbono
<i>FN</i>	Fuente de Nitrógeno
<i>FES</i>	Fermentación en estado sólido
<i>FEL</i>	Fermentación en estado líquido
<i>FeSup</i>	Fermentación superficial
<i>LSY</i>	Leche de soya
<i>HSY</i>	Harina de soya
<i>BN</i>	Bienestarina
<i>GB</i>	Harina de Garbanzo
<i>ST</i>	Salvado de trigo
<i>TR</i>	Harina de trigo
<i>TI</i>	Harina de trigo integral
<i>LI</i>	Linaza
<i>CB</i>	Harina de cebada
<i>CN</i>	Harina de Centeno
<i>AZ</i>	Harina de Arroz
<i>MAB</i>	Harina de maíz Amarillo burdo
<i>MAP</i>	Harina de maíz Amarillo precocido
<i>MB</i>	Harina de maíz blanco
<i>HP</i>	Harina de plátano
<i>SU</i>	Harina de sagú
<i>PDB</i>	Caldo de papa dextrose
<i>GLU</i>	Glucosa
<i>MH</i>	Muller-Hinton
<i>c/u</i>	Cada uno
<i>RMN</i>	Resonancia magnética nuclear
<i>DCM</i>	Diclorometano
<i>MeOH</i>	Metanol
<i>CCD</i>	Cromatografía en capa delgada
<i>CCC</i>	Cromatografía en columna clásica
<i>CG-EM</i>	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
<i>CL</i>	Cadena lateral

# Introducción

El ser humano vive constantemente envuelto en un entorno que ya sea por factores económicos, culturales, sociales o geográficos, descuida su alimentación y por ende su salud tanto inmediata como a largo plazo. Esto hace que se presenten problemas de tipo inmunológico, intestinal, cardiovascular, entre otras ((IFPR), 2016). Adicionalmente el uso de antibióticos para tratar enfermedades originadas por diferentes tipos de bacterias ha provocado que éstas generen resistencia haciendo necesario encontrar nuevos antimicrobianos constantemente. Por ello, se ha convertido en una necesidad mundial obtener alimentos y/o derivados de productos naturales que proporcionen no solo componentes con valor nutritivo, sino que también aporten compuestos con valor fisiológico, permitiendo mejorar o mantener un buen estado integral del individuo, disminuyendo la aparición de enfermedades y encontrando compuestos novedosos que permitan el control sobre bacterias u hongos perjudiciales para el hombre. Estos “*alimentos funcionales*” son llamados nutraceuticos, los cuales se pueden consumir en la dieta y son usados ya sea para la prevención o el tratamiento de enfermedades de diferente índole; cuando estos nutraceuticos son sometidos a un proceso (secado o extracción de un componente en particular), el producto derivado de ellos se denomina nutraceutico el cual actúa como suplemento dietario que posee características funcionales (P. Miles & Chang, 1999).

Entre los alimentos nutraceuticos tenemos a los hongos comestibles, considerados alimentos funcionales por excelencia. Tienen alto valor nutricional, dado por su contenido de fibra, la presencia de todos los aminoácidos esenciales y el contenido de proteína necesario para una dieta normal. Además de nutrir también tienen compuestos con actividad biológica comprobada, como lo son los ácidos grasos, saturados e insaturados, esteroides, polifenoles,  $\beta$ -glucanos, entre otros (De Silva et al., 2013). En general, todos los hongos comestibles presentan en mayor o menor cantidad estos bioactivos, y algunos en particular biosintetizan compuestos que no se encuentran en todas las especies o géneros, como es el caso de los ácidos ganodéricos (Roupas, Keogh, Noakes, Margetts, & Taylor, 2012).

Una de las ventajas que presentan los hongos frente a otros productos naturales, que pueden también ser usados como nutracéuticos o como fuente primaria de compuestos bioactivos, es el medio y el método de cultivo. A diferencia de productos como los cereales, frutas, leguminosas y productos marinos, los hongos crecen sobre diferentes tipos de sustratos, dado que poseen enzimas especializadas en degradar una gran variedad de materia orgánica. Adicionalmente, los procesos biotecnológicos son la herramienta ideal para la producción de hongos comestibles, cuando se piensa en emplearlos como ingrediente de nuevos alimentos funcionales y/o novedosos fármacos, ya que permite que su crecimiento sea rápido y económico, teniendo la posibilidad de optimizar los procesos de forma tal que el producto biotecnológico se obtenga de forma más eficiente y rentable (Fazenda, Seviour, McNeil, & Harvey, 2008a).

Así pues, es de vital importancia continuar con la investigación alrededor de los hongos, con la finalidad de aprovechar realmente todo el potencial que ellos poseen, el cual en la actualidad está prácticamente desaprovechado.

La presente tesis hace uso de la Fermentación en estado líquido (FEL) para la producción de biomasa fúngica de *Pleurotus eryngii*, que a su vez presente buen contenido de bioactivos, utilizando como componente del medio de cultivo diferentes fuentes de carbono (FC) no tradicionales, con miras a determinar el potencial uso del producto biotecnológico; bien sea en la elaboración de un alimento funcional con actividad antimicrobiana o como nutriceúutico o novedoso antibiótico. Así mismo, por medio del estudio de la producción de esteroides a lo largo de la fermentación, llegar a establecer el día de cultivo que proporcione la biomasa más promisoriosa.

# 1. Selección de la Fuente de carbono que permita la mejor eficiencia en el cultivo biotecnológico de *Pleurotus eryngii*

## 1.1 Antecedentes

Los hongos comestibles y medicinales se han posicionado como los alimentos funcionales por excelencia, los cuales se pueden obtener por procesos biotecnológicos, dependiendo del objetivo que se le quiere dar. Es así como se puede hacer uso de la Fermentación en estado sólido (FES) para la producción posterior de cuerpos fructíferos, que pueden ser usados como nutracéuticos (consumidos en la dieta diaria) o la FEL para la obtención de micelio y su posterior empleo, bien sea como nutracéutico con uso como suplemento dietario, para el empleo del micelio en la elaboración de alimentos funcionales o en la producción de inóculo líquido para su posterior utilización en FES. Igualmente el proceso se puede utilizar para la obtención de enzimas de uso industrial e investigativo (P. G. Miles. & Chang., 2004).

Cuando se emplea cualquiera de las dos fermentaciones anteriormente mencionadas, un parámetro fundamental para determinar la eficiencia del proceso biotecnológico es la composición del medio de cultivo (Suárez Arango & Nieto, 2013). En el caso particular de la FEL, las FC más comúnmente usadas son carbohidratos como la glucosa y la fructosa. Sin embargo, el medio en general requiere ser suplementado tanto con fuentes de nitrógeno (FN), como lo son la peptona, el extracto de levadura o el tartrato de amonio; como con sales minerales (sulfato de magnesio y manganeso, cloruro de potasio, sales de fosfato entre otras). Esto hace que se incrementen los costos del proceso aumentando así mismo el valor comercial del producto biotecnológico obtenido. Por ello se ve en la necesidad de recurrir a otras FC que sean más eficientes en la producción de biomasa y

con las cuales se pueda generar una disminución en el valor comercial del producto (P. Zapata. et al., 2007).

Entre las FC que pueden presentar mejores resultados se destacan las harinas de cereales, leguminosas y sub-productos de estos. Estas FC no tradicionales, como se han denominado, han sido objeto de estudio en los últimos años mostrando resultados satisfactorios en la producción de biomasa. Esto se debe a que presentan un contenido mayoritariamente de carbono en forma de polisacáridos, un buen contenido de nitrógeno dado por las proteínas y aminoácidos que poseen, con el valor agregado del aporte de sales minerales de zinc, cobre, magnesio, potasio y sodio, proporcionando así un medio tal que no necesitaría suplementación alguna. Adicionalmente, presentan otros tipos de compuestos que pueden llegar a activar algunas rutas metabólicas en el hongo, lo cual puede contribuir a la obtención de mejores resultados en la producción de biomasa (C. H. Wu, Popova, Hahn, & Paek, 2009; P. A. Zapata, Rojas, & Atehortua, 2012).

Por lo anotado anteriormente, esta primera parte de la investigación se basó en el análisis de la producción de biomasa del *Pleurotus eryngii* cultivado por FEL, haciendo uso de diferentes FC no tradicionales, determinando cuál (cuales) de ellas puede(n) llegar a tener una mejor eficiencia en la producción de biomasa. Este resultado permitirá seleccionar la(s) FC no tradicionales que puedan ser usadas como componentes del medio de cultivo y que conlleven a la obtención de un producto biotecnológico con buenas propiedades nutraceuticas, de forma económica, ahorrando tiempo y energía de producción.

## 1.2 Macromicetos

Los hongos pertenecientes a los macromicetos (carpóforos visibles a simple vista y que se pueden tomar con la mano) también denominados setas (cuando son comestibles), son organismos filamentosos y heterótrofos, que presentan, al igual que los micromicetos, una producción micelial primaria formada a partir de hifas (estructura fundamental del reino fungi), pero a diferencia de éstos, presentan un micelio secundario que produce al final el cuerpo fructífero. Los macromicetos constituyen un gran grupo conformado por los ascomicetos y los basidiomicetos. Lo que diferencia a los primeros es que solo algunos de ellos pueden formar una fructificación como es el caso de la *Morchella esculenta*, en contraste con los basidiomicetos que generalmente siempre lo presentan, siendo estos de gran variedad de formas, colores y tamaños (P. G. Miles. & Chang., 2004).

El ser humano a lo largo de su historia ha estado ligado a los macrohongos, en el ámbito cultural, espiritual y nutricional. En el oriente, países asiáticos como China, Japón, Corea y Taiwán entre otros, han empleado los hongos desde siempre, tanto así, que en la antigua China el consumo de éstos, era lo mejor para sanar dolencias, tanto espirituales como físicas. Por otro lado, en países del viejo continente como lo es el Reino Unido, los mitos de los hongos llegaron hasta los cuentos de hadas incluyendo a los elfos, que los usaban como base ritual y a los gnomos que eran tan pequeños que los utilizaban como refugio. En Latinoamérica las tribus indígenas hacían uso de los hongos con propiedades psicoactivas ayudando a los Chamanes a contactarse con sus deidades, prácticas que todavía se mantienen vigentes (Stamets, 2000).

Si bien el uso ceremonial se centraba en los hongos nativos y sólo para el aprovechamiento de sus propiedades psicotrópicas, el hombre recurrió a su cultivo para tener una mayor disponibilidad de los mismos y aprovecharlos como alimento o medicamento. Uno de los primeros hongos que se cultivó sobre troncos de madera, alrededor de 600 años a.C. fue el *Auricularia auricula* en China, seguido por la *Flammulina velutipes* 200 años después y *Lentinula edodes* 1000 años d.C. No es hasta el año 1600, en Francia donde se realizó el primer cultivo sobre un sustrato sólido de *Agaricus bisporus* convirtiéndose en el hongo comestible por excelencia y siendo uno de los más producidos en el mundo (P. G. Miles. & Chang., 2004).

Dados los beneficios que han presentado los hongos sobre la salud y la nutrición de las personas, los cuales se han documentado a lo largo de la historia (Stamets, 2000), el incremento en su consumo para el año 2002 según Miles and Chang 2004 llegó a ser de 6 millones de toneladas métricas, las cuales estaban valoradas entre los 25 y los 30 millones de dólares. En datos más reciente, la FAO muestra como el mayor productor a China, que para el 2014 tuvo una producción de 7,6 millones de toneladas, superando a todos los países asiáticos. Entre los países europeos esta posición la ocupó Italia con 0,6 millones de toneladas. Estados Unidos se posicionó como primero en el continente Americano con 0,43 millones de toneladas (FAO (Food and Agriculture Organization of the United States), 2007). En lo que respecta a Latinoamérica no se tiene registro en bases de datos internacionales de producción de hongos comestibles. Sin embargo, según el libro publicado en el 2010, gracias a La Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales: Producción, Desarrollo y Consumo (RLHCM), son México y Chile los dos

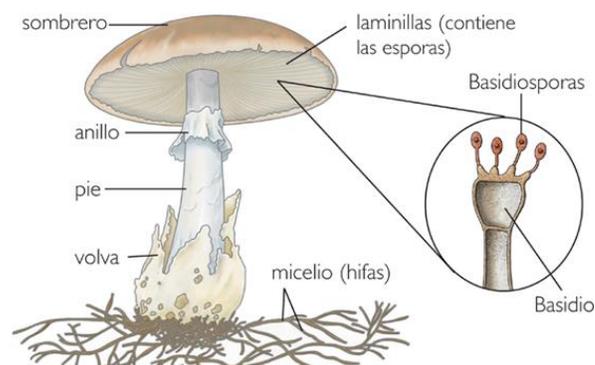
países con destacada participación en el área de producción. Ellos destacan, que existen diferentes especies y géneros de hongos, tanto comestibles como medicinales, en el territorio americano y por ello es que debemos estimular a su cultivo y su consumo dado que esto tiene un impacto tanto social, económico e investigativo (Carrera-Martinez, N, M, & P, 2010).

Este hecho ha incentivado las investigaciones ya sea con miras a la producción de biomasa y de bioactivos o al aislamiento de dichos metabolitos secundarios para hacer uso de los hongos como nutra, nutricéuticos y posibles cuasifarmaceúticos. Así mismo, implementar el uso de nuevas tecnologías, nuevos sustratos, novedosos medios de cultivo y optimización de procesos biotecnológicos para mejorar la eficiencia de estos procesos que lleven a la obtención, en el caso de compuestos con actividad antimicrobiana, de antibióticos con acciones similares a las presentadas por los medicamentos actualmente empleados y que, en el mejor de los casos, podrían solucionar problemas de resistencia de bacterias patógenas (Brizuela, García, Pérez, & Mansur, 1998).

### 1.3 Basidiomicetos

Esta clase de hongos se caracterizan, como se anotó anteriormente, por presentar un cuerpo fructífero visible y característico con estructuras definidas (Figura 1-1). Son denominados basidiomicetos por la forma de la estructura que contiene las esporas, las cuales, en esta clase de hongos se denominan basidiosporas. Entre las setas comúnmente cultivadas de este grupo, las de mayor producción son: *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea*, diferentes especies de *Ganoderma* y *Pleurotus*, *Grifola frondosa* y *Auricularia auricula* (P. G. Miles. & Chang., 2004).

**Figura 1-1:** Partes que conforman el cuerpo fructífero de un hongo basidiomiceto



No todos los basidiomicetos presentan volva y anillo, generalmente estas estructuras son típicas de los macrohongos venenosos o nocivos para la salud. La ausencia de ellas es indicio de comestibilidad (Guzman, 1990).

### 1.3.1 El género *Pleurotus*

Dentro de los basidiomicetos comestibles están los hongos pertenecientes al género *Pleurotus*, también llamados orellanas. Son catalogados como hongos de pudrición blanca, debido a que biosintetizan enzimas que permiten la degradación de lignina y celulosa. El tamaño de su carpóforo maduro varía dependiendo de la especie, con diámetros desde 5 cm hasta 15 cm y presenta diferentes tonalidades de color blanco, amarillo, rosado y grisáceo (Figura 1-2). Su himenóforo es radial, en laminillas y varía según la especie. Se encuentran de forma silvestre alrededor del mundo y crecen comúnmente en zonas templadas y subtropicales. Tiene un aroma y sabor agradable y se conocen hasta el momento 50 especies (P. G. Miles. & Chang., 2004).

La producción de hongos de este género en China llegó a ser de 2 millones de toneladas métricas para el 2002, siendo las especies más cultivadas *P. ostreatus*, *P. sajor-caju*, *P. djamor*, *P. pulmonarius* y *P. ferulae*. Una de las ventajas de este género es que crece en diferentes condiciones climáticas, con requerimientos nutricionales mínimos, además de tener costos bajos en su producción industrial y son catalogados como hongos medicinales, dado que presentan diferentes tipos de compuestos bioactivos (P. G. Miles. & Chang., 2004).

**Figura 1-2:** Diferentes especies del género *Pleurotus* (Superior izquierda y centro: *P. pulmonarius*, superior derecha: *P. citrinopileatus*, Inferior izquierda: *P. ostreatus* e inferior derecha: *P. djamor*) (imagen compilada por el autor)



Desde el punto de vista nutritivo y biológico, este género se destaca por su contenido de vitaminas, minerales, proteína y una variedad de polisacáridos; estos últimos poseedores de diversas actividades biológicas (Meng et al., 2011). Igualmente también presentan otro tipo de compuestos como esteroides y ácidos grasos insaturados, los cuales tienen actividad hipocolesterolémica y antimicrobiana entre otras (Alves et al., 2012).

En lo que respecta a su crecimiento, se ha cultivado sobre diversos sustratos mostrando que es un género con un pull enzimático que le permite degradar una gran cantidad de compuestos (Chang & Chang, 2016; Masaphy, Levanon, & Henis, 1996; Mehrdad Jafarpour, 2011; Moonmoon, Uddin, Ahmed, Shelly, & Khan, 2010; Purnomo, Mori, Putra, & Kondo, 2013) y es por ello que su uso se ha direccionado a la degradación de compuestos nocivos para el medio ambiente y para el ser humano. Esta cualidad del género también ha permitido que se promueva su crecimiento en FC no tradicionales ya sea para su fructificación, para el crecimiento en FEL y posterior uso como inóculo líquido o para la obtención de nutracéuticos (Chegwin-Angarita & Nieto-Ramírez, 2014a; Nieto & Carolina Chegwin, 2008; P. Zapata et al., 2012).

Comúnmente se emplean FC de composición definida como es el caso de monosacáridos y disacáridos (Glucosa, Fructosa, Sacarosa, xilosa, entre otras) (J.-Z. Wu, Cheung, Wong, & Huang, 2003b), con las restricciones antes mencionadas, de que se requieren FN y sales minerales, lo que hace de las FEL procesos más costosos y con un mayor tiempo de producción. Así pues, las FC no tradicionales son una opción viable que redundará en beneficios mejorando la calidad del producto biotecnológico, disminuyendo el tiempo y los costos.

### **1.3.2 El hongo *Pleurotus eryngii*.**

Entre los hongos del género *Pleurotus*, la especie *eryngii* ha empezado a adquirir una gran importancia en el mercado por sus excelentes propiedades organolépticas y medicinales (Figura 1-3). Su empleo, más allá de la gastronomía, desde el punto de vista etnofarmacológico, ha estado relacionado con el tratamiento de diferentes enfermedades y dolencias (Mariga et al., 2014). En varios reportes se ha determinado que posee actividad inmunopotenciadora, antioxidante, hepatoprotectora, hipolipidémica y anticancerígena (Jingjing et al., 2012; Li & Shah, 2014; Xue, Li, et al., 2015). Por lo anteriormente

mencionado su venta se incrementó exponencialmente en Norte América y su producción se centra en Europa y Asia oriental especialmente China, Taiwán y Corea (Corra, Brugnari, Bracht, Peralta, & Ferreira, 2016).

**Figura 1-3:** Cuerpo fructífero del *Pleurotus eryngii*. (Tomado de: <http://www.edulis.com/Eryngii.php>)



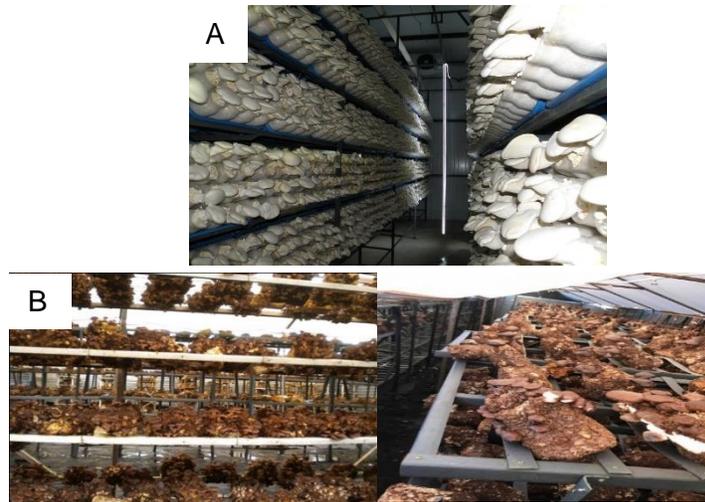
El aumento de las demandas de este tipo de productos, ha incentivado las investigaciones relacionadas con la implementación de técnicas de cultivo que permitan favorecer la producción de biomasa. Entre ellas se encuentra el cultivo tradicional y los procesos biotecnológicos, siendo estos últimos una de las opciones con mayor potencial en la fungicultura.

## 1.4 Cultivo tradicional

Para la producción de cuerpos fructíferos se utilizan sustratos sólidos por cultivo tradicional. La cantidad de agua requerida en el proceso es baja pero suficiente para el crecimiento fúngico.

Muchas culturas ancestrales han usado esta metodología de una forma más artesanal, donde el hongo es inoculado sobre troncos de madera muerta (Stamets, 2000). A través de las décadas el proceso se desarrolló a tal punto que actualmente la obtención de cuerpos fructíferos es muy común en la industria y se producen en grandes cantidades como se puede observar en la Figura 1-4.

**Figura 1-4:** Producción de hongos comestibles a través de cultivo tradicional **A)** cultivo tradicional de *Pleurotus ostreatus* (Imagen tomada de: <http://tips-ukm.com/teknik-penanaman-pemeliharaan-serta-pemanenan-pada-budidaya-jamur-tiram/>) **B)** Shiitake (*Lentinula edodes*) en Colombia (Imagen brindada por la empresa Setas exóticas de Colombia SA)



Dentro de las desventajas que presenta este proceso se encuentran los largos tiempos que tarda, la limitación de su aplicabilidad a organismos que soporten una baja actividad de agua, la dificultad de monitorear o controlar las diferentes variables como la temperatura, la transferencia de oxígeno y de dióxido de carbono, el control de contaminantes y la humedad, entre otros. Es por ello que la FEL se ha convertido en una metodología preferente para algunas aplicaciones comerciales (Fazenda et al., 2008a). En lo que respecta a Latinoamérica, en las bases de datos de la FAO, FAOSTAT y la FDA, no se encuentran reportes de producción de hongos comestibles o de su uso como drogas o suplementos alimenticios. Esto evidencia que la fungicultura en Latinoamérica aún no es lo suficientemente fuerte y aunque existen fungicultores latinoamericanos, su producción no se ve reflejada en organismos internacionales (Martínez-Carrera, 2000).

## 1.5 Biotecnología

La biotecnología no es, en sí misma, una ciencia. Es la aplicación de un enfoque multidisciplinario, tanto científico como tecnológico, a los sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados, para la creación o modificación de productos o procesos de valor

para el hombre. Es entonces, una herramienta con la que se busca, a través de un determinado organismo vivo, bien sea la producción de biomasa o de un grupo de determinados metabolitos, en tiempos menores comparado con los métodos tradicionales. Conforman estos procesos biotecnológicos las fermentaciones, las cuales pueden ser en estado líquido (también llamada fermentación sumergida) o en estado sólido, dependiendo de la manera como se encuentren los nutrientes. Estas técnicas han tenido un fuerte impacto sobre la producción industrial de setas y sobre el uso de desechos agroindustriales como sustrato para el cultivo (Fazenda et al., 2008a; Papaspyridi, Aligiannis, Christakopoulos, Skaltsounis, & Fokialakis, 2011; Rodríguez, Nuero, Guillén, Martínez, & Martínez, 2004; Yildiz, Yildiz, Gezer, & Temiz, 2002)

### **1.5.1 Fermentaciones**

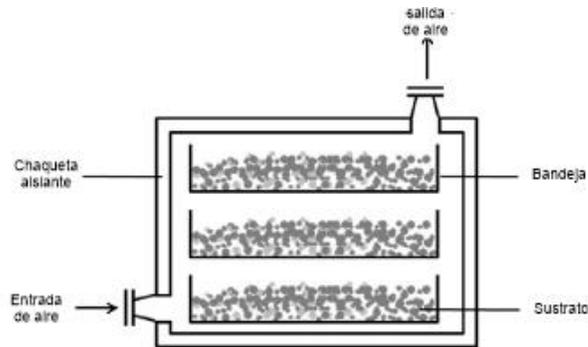
Desde el punto de vista biotecnológico, la fermentación se entiende como aquel proceso en que los microorganismos producen metabolitos y/o biomasa, a partir de la utilización de sustancias orgánicas, en ausencia o presencia de oxígeno. La descomposición de los sustratos es llevada a cabo por enzimas producidas por los microorganismos para tal fin. Las fermentaciones, en el caso particular de los hongos, permiten un mayor rendimiento en la producción de biomasa y metabolitos, de forma rápida y eficiente, satisfaciendo objetivos como la obtención de metabolitos específicos de interés farmacológico, así como biomasa micelial, que posteriormente puede ser usada para la formación de cuerpos fructíferos. De otra manera, el medio de cultivo permite el aprovechamiento de las enzimas excretadas por el hongo, las cuales tienen adicionalmente excelente aplicación industrial (Brizuela et al., 1998; Lv et al., 2009; Papaspyridi et al., 2011; Sarangi, Ghosh, Bhutia, Mallick, & Maiti, n.d.)

### **1.5.2 Fermentación en estado sólido**

Como se dijo anteriormente la FES utiliza un sustrato sólido, pero a diferencia del cultivo tradicional este hace uso de un Bioreactor para la producción de micelio. Esta fermentación es ampliamente usada para la producción de enzimas y de semilla para cultivo tradicional. La ventaja que tiene es que la producción de micelio y de enzimas se hace controlando la temperatura y la humedad, asemejando las condiciones del hábitat natural lo que mejora la eficiencia biológica (Yoon, Ang, Ngoh, & Chua, 2014). En la Figura 1-5 se puede

observar el diseño del bioreactor más usado para obtener micelio para semilla a través de FES. Se denomina biorreactor en bandejas y tiene la ventaja de ser de bajo costo y gastar poca energía. Sin embargo, el control de la aireación, del transporte de calor y de masa es bajo.

**Figura 1-5:** Biorreactor tipo bandeja (Yoon et al., 2014).



Tanto la FES como el cultivo tradicional tienen la desventaja del tiempo, dado que puede tardar entre 1 y 3 meses en la producción de biomasa o de cuerpos fructíferos. Es por ello que se buscan otras técnicas que permitan la evaluación y la aplicabilidad de diferentes variables de cultivo para una mejor producción de biomasa.

### 1.5.3 Fermentación superficial

La fermentación superficial (FeSup) es un tipo de fermentación especial, en la que los componentes del medio de cultivo pueden estar disueltos o en suspensión, y a diferencia de una FES, tiene un alto contenido de agua, condiciones que permiten una buena biodisponibilidad (intermedia entre la FEL y FES) de los nutrientes al organismo. En la FeSup el hongo va desarrollándose sobre la superficie del medio de cultivo y las hifas crecen de forma radial alrededor del disco de inoculación, pudiéndose presentar micelio aéreo o micelio profundo, los cuales tienen el objetivo de captar oxígeno, dado que son organismos aerobios y al mismo tiempo captar los nutrientes del sustrato (Donini, Bernardi, & Do Nascimento, 2006; Gaitán-Hernández, 2005). Como se puede observar para el caso de la Figura 1-6 el micelio aéreo es abundante y presenta un crecimiento radial mientras el profundo no se observa dado que penetra el medio de cultivo. En este tipo de fermentaciones se pueden usar varias metodologías de medición, una de ellas es el crecimiento radial diario, evaluando el tiempo total de invasión o haciendo uso de curvas

de crecimiento donde se relaciona el crecimiento diario y el día de cultivo (Donini et al., 2006)

**Figura 1-6:** Crecimiento en FeSup de un *Pleurotus eryngii* en caja de Petri (Imagen tomada por el autor)



Esta metodología permite la evaluación, de forma preliminar, de diferentes sustratos o condiciones de cultivo para el crecimiento de una gran cantidad de organismos. En el caso de los macromicetos, ha sido usada como ensayos *in vitro*, mostrando buenos resultados en lo que respecta a la evaluación de la capacidad degradadora de los hongos sobre residuos agroindustriales, los cuales son adicionados como componentes del medio (Masaphy et al., 1996; Rodríguez, Nuero, Guillén, Martínez, & Martínez, 2004). Para el caso del crecimiento de hongos del género *Pleurotus* (*pulmonarius*, *ostreatus* y *eryngii*) estos han mostrado ser promisorios para la degradación de residuos ligninocelulíticos (Zervakis, Philippoussis, Ioannidou, & Diamantopoulou, 2001). En el caso del Shiitake (*Lentinula edodes*) por medio de ensayos por FeSup, Lakhtar et al 2010 evaluó diferentes cepas y su efectividad para la degradación de polifenoles de la industria de residuos del aceite de oliva evidenciando que es un hongo promisorio para el tratamiento de este tipo de residuos (Lakhtar, Ismaili-Alaoui, Philippoussis, Perraud-Gaime, & Roussos, 2010) Respecto a FC tradicionales, Zagrean et al 2016 evaluó como medio de cultivo, el extracto de malta, de trigo y de papa con agar (MEA, WEA y PDA respectivamente). El autor reportó, que para el caso del *Pleurotus eryngii* mostró mejores resultados el Extracto de malta agar con velocidades de crecimiento mayores a los otros dos medios usados (Zagrean, Sbirciog, Zabut, & Mandru, 2016). Desde otro punto de vista, Donini et al 2006 reportó el empleo de la FeSup para evaluar el efecto de diferentes FC no tradicionales, como el salvado de trigo, maíz, arroz y soja, para

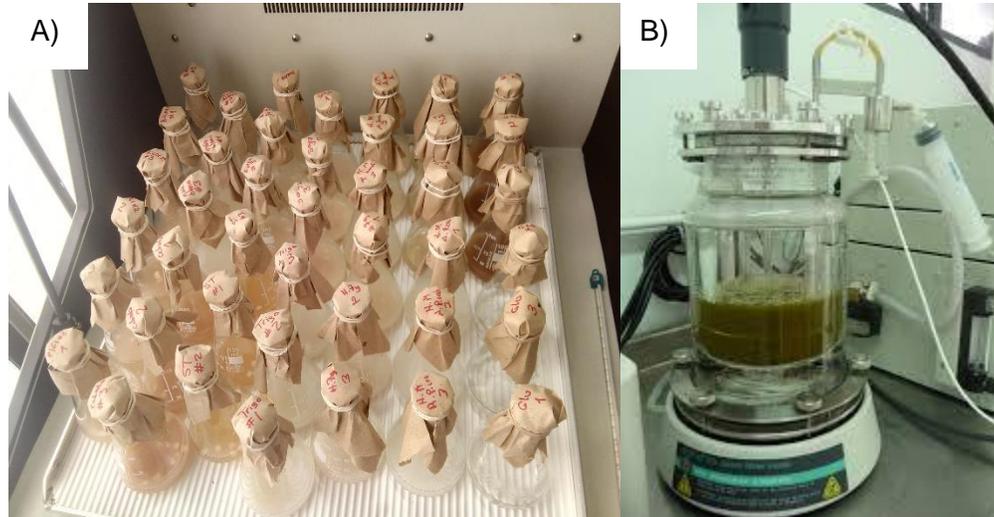
el cultivo de *Agaricus brasiliensis*. Los autores compararon el crecimiento micelial diario empleando CDA (Compost-dextrosa-agar) suplementado con 0, 10 y 20% de las FC, encontrando que un medio suplementado con 20% de los salvados, lleva a velocidades de crecimiento y biomasa micelial mayores a los que se presentan sin éstas (Donini et al., 2006). Posteriormente, Vargas-Isla et. al en el 2008 desarrollaron un estudio similar, en el que el objetivo era evaluar cómo varía la cantidad de biomasa y el crecimiento radial del micelio del *Lentinus strigosus* en función de diferentes temperaturas de cultivo (25, 30, 35, 40°C) haciendo uso de la FeSup (Vargas-Isla, Ishikawa, Vargas-Isla, Noemia, & Ishikawa, 2008). Finalmente, sin importar el objetivo de la FeSup, la evaluación matemática (curvas de crecimiento) como los valores de crecimiento radial diario pueden ser usadas para realizar el análisis de resultados en esta metodología (Donini et al., 2006; Schémaeza, Somda, Sereme, Adam, & Ouedraogo, 2013).

De este modo, podemos observar como la FeSup ha sido usada para evaluar la influencia de una FC sobre el crecimiento micelial o para determinar el potencial degradador de los hongos sobre residuos o compuestos contaminantes. Sin embargo, es importante recalcar que en la actualidad no se encuentran reportes donde se evidencie la relación que hay entre la FeSup y la FEL y si estas dos metodologías pueden llegar a ser extrapolables.

#### **1.5.4 FEL**

La FEL es un proceso biotecnológico muy usado tanto en la industria como en el ámbito investigativo en el que el hongo crece en un medio líquido (Fazenda, Seviour, McNeil, & Harvey, 2008b; Papaspyridi et al., 2011). El primer reporte del empleo de FEL para la obtención de hongos se remonta a 1948 cuando Humfeld realizó el cultivo de *Agaricus campestris* (Humfeld, 1948). Esta fermentación se caracteriza por hacer uso de un medio de cultivo acuoso, compuesto por una FC, una FN y sales minerales, que por supuesto deben suplir las necesidades nutricionales del hongo. Como se observa en la Figura 1-7 A la FEL se puede realizar a escala de laboratorio en erlenmeyers permitiendo controlar algunas variables del proceso como son la temperatura, la composición del medio de cultivo, el pH inicial y la agitación (Fazenda et al., 2008a). Para tener un control más estricto de estas variables e incluir otras como la aireación, el contenido de gases, el pH a lo largo del proceso, se deben emplear un bioreactor como el que se observa en la Figura 1-7 B. Este hecho permite una optimización del proceso y por ende maximizar el potencial nutri y nutraceutico del producto biotecnológico obtenido.

**Figura 1-7:** Fermentaciones en estado líquido **A)** A escala laboratorio en erlenmeyers (Imagen tomada por el autor). **B)** Bioreactor convencional con control de aireación, pH, viscosidad, entre otros (tomado de: <http://medellin.unal.edu.co/~biofab/concurso.html>).



A diferencia de la FES, ésta tiene un alto contenido de agua, la biomasa se obtiene suspendida y la biodisponibilidad de los nutrientes es mayor. Cuando en una FEL hay agitación, se puede observar un crecimiento en “pellets” los cuales son pequeñas esferas de micelio (Figura 1-8) (B. C. Lee et al., 2004).

**Figura 1-8:** Formación de pellets en una FEL del hongo *Pleurotus eryngii* (imagen tomada por el autor)



En la tabla 1-1 diseñada con base en lo reportado por Fazenda en el 2008, se muestran las diferencias entre algunas de las características de la FEL y la FES. Hay que dejar en claro que ninguna es mejor que la otra, depende del objetivo al que se quiera llegar.

**Tabla 1-1:** Comparación de algunas características entre los métodos de fermentación en estado líquido y sólido (Fazenda et al., 2008)

CARACTERÍSTICA	FEL	FES
Velocidad	Rápido	Lento
Control de variables	Fácil	Difícil
Cantidad de agua	Alta	Baja
Posibilidad de contaminación	Probable	Probable
Factibilidad de industrialización	Factible	Complejo

Indistintamente del tipo de fermentación empleado, el cambio en la composición del medio de cultivo que dará los nutrientes, en este caso en particular, al hongo, es uno de los factores más ampliamente estudiados y como se verá a continuación, su optimización puede llevar a un mejoramiento en la producción de biomasa y/o de metabolitos secundarios (F R Smiderle et al., 2012).

## 1.6 Efecto de la Fuente de Carbono sobre la producción de biomasa en la FEL

La producción de biomasa por FEL ha sido estudiada en gran medida para las FC tradicionales o usuales. La búsqueda de incrementar los rendimientos de producción, generando un mayor porcentaje de conversión de nutrientes en biomasa con el menor costo, ha impulsado el uso de FC no tradicionales (*P. Zapata et al., 2012*). Como se puede apreciar en la tabla 1-2 los estudios realizados muestran como varía de forma significativa la biomasa producida con cambios en la FC.

**Tabla 1-2:** Efecto de la Fuente de carbono sobre la producción de biomasa en FEL de diferente hongos basidiomicetos

HONGO	TIPO DE FC	FC	BIOMASA (g/L)	REFERENCIA
<i>Pleurotus tuber-regium</i>	Simple	-Glucosa	11,8	(Jin-zhong Wu, Cheung, Wong, & Huang, 2003)
		-Fructosa	13,3	
		-Almidón de maíz	14,6	
	Compleja	(30g/L c/u)		

<b><i>Pleurotus ostreatus</i></b>	Simple	-Xilosa -Glucosa -Trealosa -Fructosa -Manosa (60g/L c/u)	23,7 21,1 20,5 12,3 17,2	(Papaspyridi, Katapodis, Gonou-Zagou, Kapsanaki-Gotsi, & Christakopoulos, 2010a)
<b><i>Pleurotus sajor-caju</i></b>	Complejo	Extracto de malta	14,40	(El-Kattan & El-Sayed, 1988)
<b><i>Pleurotus pulmonarius</i></b>	Complejo	Glucosa (10g/L) y licor de maíz fermentado (8mL/L)	6,2	(Belinky, Masaphy, Levanon, Hadar, & Dosoretz, 1994)
<b><i>Pleurotus eryngii</i></b>	Simples	-glucosa -Sacarosa -Lactosa 2% v/v	9,56 5,27 4,22	(H. B. Chen et al., 2013)
<b><i>Agaricus brasiliensis</i></b>	Complejo	Glucosa, harina de maíz, salvado de trigo y harina de soya (10g/L c/u)	10,99	(Gao & Gu, 2007a)
<b><i>Grifola Frondosa</i></b>	Simple	-Glucosa -Sacarosa -Maltosa -Galactosa	3,5 2,6 3,0	(B. C. Lee et al., 2004)
	Compleja	-Almidón 30g/L c/u	1,9 1,6	
<b><i>Ganoderma lucidum</i></b>	Simple	-Glucosa (35g/L)	3,20	(Yang, Min, Bi, Zhou, & Huang, 2013a) CLO: aceite de <i>Coix lacryma</i>
		-Glucosa (35g/L) con 2% de CLO	10,71	
<b><i>Antrodia cinnamomea</i></b>	simple	-Glucosa -Fructosa -Xilosa -Sorbitol -Manitol (5%P/V c/u)	2,39 2,16 9,17 2,95 1,90	(Lin, Wang, & Sung, 2006)

Como es apreciable en la tabla 1-2, la gran mayoría de FC que se usan son las tradicionales como los monosacáridos y en algunos casos se hace uso de FC no tradicionales. Sin embargo, estas FC tradicionales, necesariamente hacen uso de fuentes de nitrógeno y sales minerales incrementando los costos y en algunos casos el tiempo de cultivo. Es por ello que las FC no tradicionales adquieren gran importancia, dado que su

implementación no solo genera biomasa iguales o mayores que las producidas con las tradicionales, sino que además disminuye notablemente los costos, el tiempo de cultivo y sus propiedades nutraceuticas (Chegwin-Angarita & Nieto-Ramírez, 2014a; Jin-zhong Wu et al., 2003; P. Zapata. et al., 2007).

La investigación más reciente, enfocado al género *Pleurotus*, es la realizada por Chegwin et al 2014, en el que se reporta el estudio de tres especies de *Pleurotus* cultivados en FEL haciendo uso de FC no tradicionales. Como se observa en la tabla 1-3 a pesar de que las autoras hicieron uso de varios tipos de FC no tradicionales la producción varío en un amplio rango y la Harina de maíz pinto fue la que estimuló a los hongos a producir la mayor cantidad de biomasa.

**Tabla 1-3:** Uso de FC no tradicionales para incrementar la eficiencia en la producción de biomasa de *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* y *P. djamor*

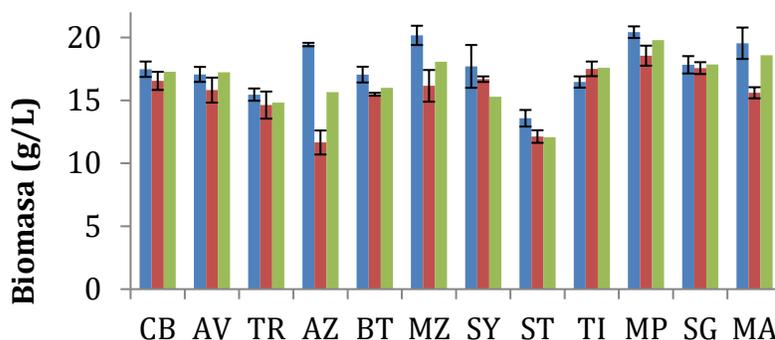
HONGO	FC > BIOMASA	FC < BIOMASA
<i>P. ostreatus</i>	Harina de maíz pinto	Salvado de trigo
<i>P. pulmonarius</i>	Harina de maíz pinto	Harina de arroz
<i>P. djamor</i>	Harina de maíz pinto	Salvado de trigo

FC>biomasa: FC no tradicional que proporciona la mayor producción de biomasa

FC<Biomasa: FC no tradicional que proporciona la menor producción de biomasa

De estos resultados, las autoras concluyen que la cantidad de biomasa obtenida con FC no tradicionales es similar en algunos casos a los obtenidos con FC tradicionales (Figura 1-9). Sin embargo, la ventaja de las no tradicionales es que son más económicas, no se necesita una fuente de nitrógeno, dado que estas ya tienen incorporado proteínas que cumplen esta función y en comparación con lo reportado por Papaspyridi et al 2010, la cantidad necesaria para producir biomasa similares, es la mitad comparada con monosacáridos. Esto podría llevar a que sean estas harinas de cereal y leguminosas un medio óptimo en la producción biotecnológica de los hongos objeto de estudio (Chegwin Angarita, 2014).

**Figura 1-9:** Producción de biomasa de tres hongos del género *Pleurotus* cultivados por FEL haciendo uso de harinas de cereal como medio de cultivo (Chegwin Angarita, 2014).



**Azul:** *P. ostreatus* **Rojo:** *P. pulmonaris* **Verde:** *P. djamor*. CB: harina de cebada, AV: harina de avena, TR: harina de trigo, AZ: harina de arroz, BT: bienestarina, MZ: harina de maíz, SY: harina de soya, ST: salvado de trigo, TI: Harina de trigo integral, MP: Harina de maíz pinto, SG: harina de siete granos y MA: harina de maíz amarillo

Es por ello, que es fundamental determinar la FC no tradicional que provee al *Pleurotus eryngii* de una buena producción de biomasa y compararla con FC tradicionales, de manera tal que podamos seleccionar una(s) FC(s) que hagan del producto biotecnológico un buen nutraceutico iniciando desde el punto de vista de la biomasa.

## 1.7 Metodología

### 1.7.1 Obtención del material fúngico

El material fúngico fue cultivado en las instalaciones del laboratorio de Agrobiotecnología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, empleando una cepa de *Pleurotus eryngii* proporcionada por la empresa *Setas Exóticas de Colombia SAS*, de la cual se realizaron repiques en cajas de Petri con medio PDA y se almacenaron a 4°C.

### 1.7.2 Materiales y reactivos

Todas las FC no tradicionales utilizadas fueron adquiridas en un comercio popular colombiano (Paloquemado). El PDA (Acumedia NeoGen Corporation). La glucosa utilizada es marca Carlo Ebra Reagents, El extracto de levadura es Becton, Dickinson and Company. Las sales minerales usadas fueron adquiridas en Applichem Panreac ITW companies.

### **1.7.3 Fermentación superficial**

Se usaron inóculos en PDA de 0,5 cm de diámetro que fueron llevados a cajas de Petri con un medio de composición (g/L): FC 30, sacarosa 5, extracto de levadura 5 y agar 8. Se incubaron a 27 °C con seguimiento diario del crecimiento mediante medición del diámetro micelial empleando una regla convencional, hasta observar invasión total del micelio. Como FC se emplearon Glucosa (GLU), Agar papa dextrosa (PDA), Bienestarina (BN), leche de soya (LSY), linaza (LI), harina de maíz amarillo precocido (MAp) y burdo (MAb), de trigo (TR), de cebada (CB), de maíz blanco (MB), de soya (HSY), de trigo integral (TI), de garbanzo (GB), de arroz (AZ), de sagú (SU), de siete granos (SG), de centeno (CN), de plátano (HP), de avena (AV) y salvado de trigo (ST). Las cajas se incubaron a 27°C y todos los procesos fueron realizados por triplicado.

### **1.7.4 Fermentación en estado líquido**

Matraces de 100 ml con 25 ml de medio de cultivo compuestos por (mg/L): NaNO<sub>3</sub> 80, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 20, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30, KCl 10 y 30g/L de FC, fueron esterilizados en autoclave a 15 psi y a 121°C por 15 minutos. Posteriormente fueron filtrados y nuevamente esterilizados bajo las mismas condiciones, pero por un periodo de 45 minutos. La inoculación se realizó con discos de micelio más agar de 0,5 cm de diámetro, hasta obtener una cantidad de 0,4 g. Los matraces se llevaron a un agitador orbital a 150 rpm a una temperatura de 28 °C ± 2 °C en luz blanca por 10 días de cultivo. El producto biotecnológico se filtró al vacío y la biomasa obtenida se secó por 48 horas a 40 °C (todos los procesos fermentativos se realizaron por triplicado).

### **1.7.5 Tratamiento estadístico**

Se realizó un análisis de varianza ANOVA por el método de Duncan, permitiendo observar si existían o no, diferencias estadísticamente significativas entre las biomásas obtenidas con las diferentes FC empleadas.

### **1.7.6 Análisis elemental**

El contenido de C y N de las FC fue determinado por un equipo Thermo FLASH 2000 Organic Elemental Analyzer.

## **1.8 Análisis de resultados**

### **1.8.1 Fermentación superficial (Fesup)**

El estudio por FeSup haciendo uso de FC no tradicionales como componente de los medios de cultivo y como FC tradicionales glucosa y PDA, arrojó como resultado que la velocidad de crecimiento es mayor cuando se hace uso de harinas de cereal o leguminosas, como se evidencia en la tabla 1-4. Este resultado permite inferir que es la composición de estas FC (Figura 1-10 A, B y C) la que proporciona las condiciones para un mejor desarrollo del hongo. Esto podría ser debido a que los carbohidratos presentes en ellas son metabolizados mejor por el hongo, hipótesis que estaría soportada por la investigación de Papaspyridi et al. 2010, quienes determinaron que los hongos no metabolizan de igual manera todos los carbohidratos, ya que los procesos metabólicos que los involucran son diferentes. Otra posible explicación de este comportamiento sería que algunos de los otros componentes de las harinas permiten al hongo metabolizar mejor los carbohidratos, como es el caso de algunos compuestos orgánicos (ácidos grasos) o sales minerales, actuando como elicitores en el primero de los casos y como cofactores enzimáticos en el segundo (Mesa C. Urdaneta, Octoban; Rodríguez de Valero, Sofía; Fernandez, Viluzca; León de Pinto, Gladyz; Villalobos, Rafael, 2011).

**Tabla 1-4:** Crecimiento radial en FeSup de *Pleurotus eryngii* haciendo uso de diferentes FC tradicionales y no tradicionales como medio de cultivo.

FC	Crecimiento radial (cm)*																		
	Día de cultivo																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
<u>MB</u>	0,8	1,4	1,9	3	4,4	5,8	7,3	8,5											
<u>AV</u>				2,3	2,9	5,5	6,4	7,6	8,5										
<u>GB</u>	0,8	1,5	1,9	2,8	4,4	5,7	7,1	8	8,5										
<u>BN</u>	0,8	1,5	2,1	3	4,2	5,4	7,1	8	8,5										
<u>TI</u>	0,8	1,5	1,8	2,7	4,2	5,3	6,8	7,9	8,5										
<u>ST</u>	0,9	1,3	2,1	3,2	4,3	5,4	6,6	7,8	8,5										
<u>CN</u>	0,8	1,4	1,9	2,5	3,3	4,7	6,8	7,6	8,5										
<u>AZ</u>	0,8	1,1	1,7	2,7	3,7	5,1	6,6	7,8	8,5										
<u>MAB</u>				2,5	2,8	4,5	5,6	6,5	7,7	8,5									
<u>SG</u>				1,7	3	3,5	5,2	6,1	7,9	8,5									
<u>CB</u>	0,8	1,4	1,9	2,6	3,8	4,9	6,4	7,4	8,4	8,5									
<u>SU</u>	0,8	1,3	1,8	2,9	4,2	5	6,3	7,3	8	8,5									
<u>MAP</u>				2,4	2,8	5,5	5,9	7,2	8,1	8,1	8,5								
<u>LI</u>	0,7	1,2	1,4	1,9	2,5	3,6	4,8	6,1	7,2	8,2	8,5								
<u>TR</u>				1,7	2,7	3,7	4,6	5,9	6,6	7,3	7,9	8,5							
<u>LSY</u>	0,8	1,3	1,8	2,3	3,1	3,9	4,8	5,8	6,7	7,5	8,3	8,5							
<u>HSY</u>	0,7	1,3	1,6	1,9	2,4	2,7	4,3	5,1	5,9	6,9	7,9	8,5							
<u>GLU</u>				1,1	1,8	2,5	3,2	3,6	4,2	5,1	6	6,4	6,8	7,6	7,6	7,6	7,9	8,5	
<u>PDA</u>				1,4	2,3	3,1	3,9	4,7	5,2	5,6	5,6	5,6	5,6	5,8	5,8	6,1	6,1	8,5	
<u>HP</u>				1,3	2,3	2,9	3,6	4	4,5	5,8	6,3	6,9	7,4	7,8	7,8	7,8	8,2	8,4	8,5

\*las desviaciones estándar de las mediciones no superaron el valor de  $\pm 0,1$  cm. Glucosa (GLU), agar papa dextrosa (PDA), Bienestarina (BN), leche de soya (LSY), linaza (LI), harina de: maíz amarillo precocido (MAP) y burdo (MAB), avena (AV), trigo (TR), cebada (CB), maíz blanco (MB), soya (HSY),trigo integral (TI), garbanzo (GB), arroz (AZ), sagú (SU), siete granos (SG), centeno (CN), plátano (HP) y salvado de trigo (ST).

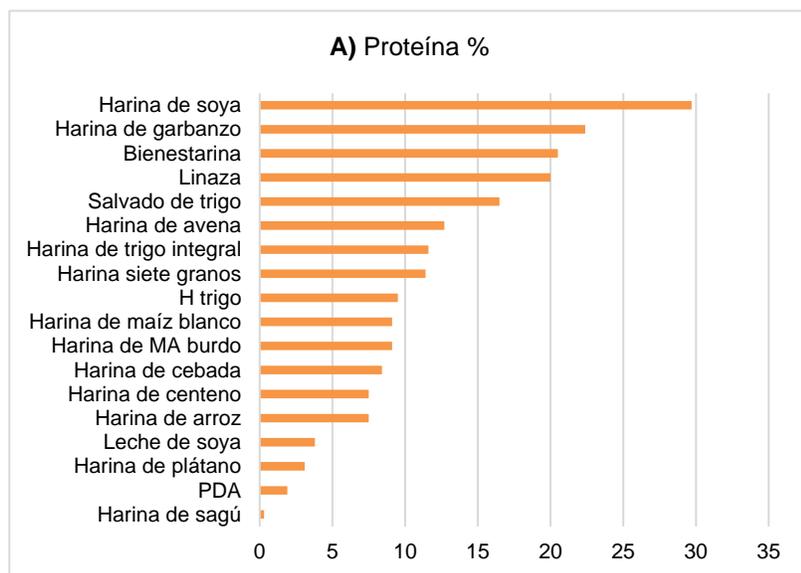
Es así como la harina que menos favoreció el crecimiento micelial fue la de plátano, que está constituida mayoritariamente por carbohidratos y no presenta un alto contenido de proteínas ni de lípidos, razón por la cual probablemente tomo más tiempo que las otras. Sin embargo, en este orden de ideas al examinar concienzudamente la tabla 1-4, la harina de trigo tiene un contenido menor de lípidos (0.50%) que la de plátano (0.70%), lo que permitiría hipotetizar que el crecimiento sería menor en la de trigo, situación que no se da ya que el tiempo para llenado de caja fue de 12 días en contraste con la de plátano cuyo crecimiento tomó 19 días. Esto permitiría inferir que no es el contenido de lípidos un factor determinante en la velocidad de crecimiento del hongo en estudio.

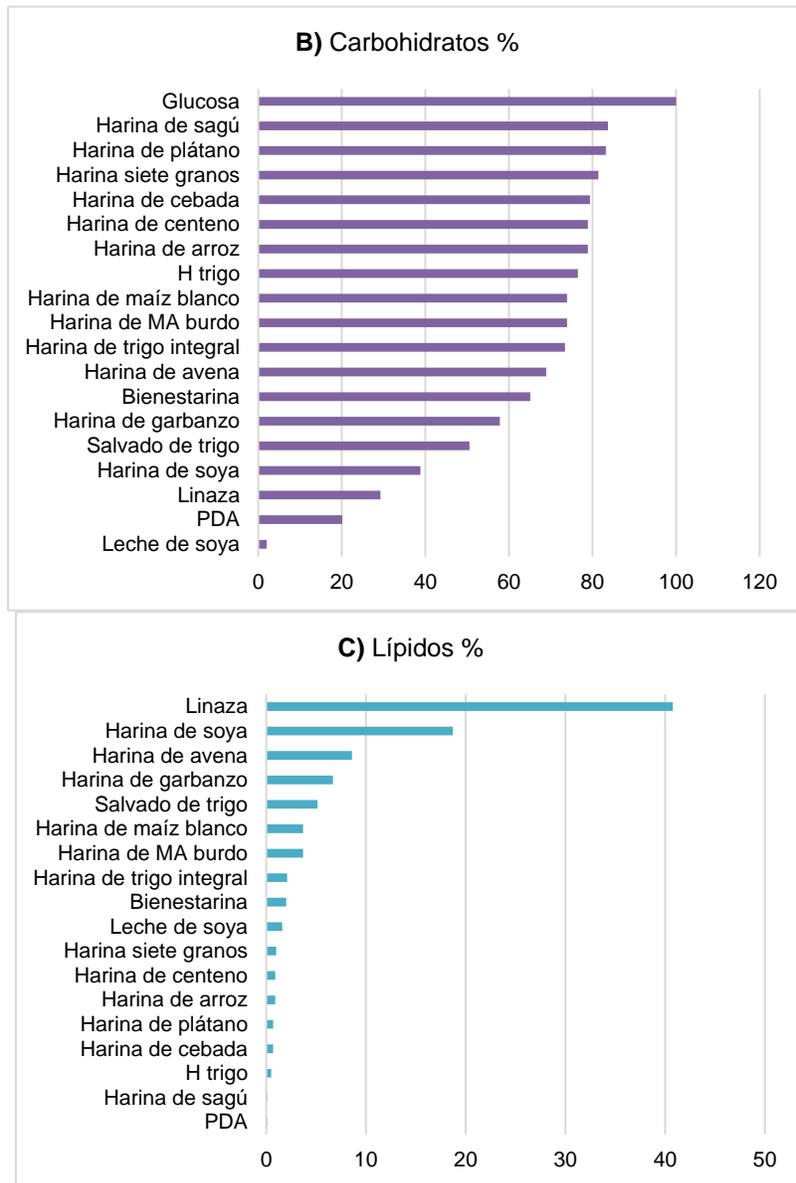
De igual manera, si se piensa en la cantidad de nitrógeno (proporcionado por el contenido protéico) al comparar la harina de plátano (3.10%) con la de maíz amarillo burdo (9,10%)

era de esperarse que la velocidad de crecimiento fuese aproximadamente 3 veces mayor. Sin embargo, el hongo con esta última FC sólo tardó 10 días en llenar la caja frente a los 19 con la harina de plátano, lo que permite deducir que, si el contenido de nitrógeno incide en el crecimiento del hongo, no lo hace en una relación lineal directa. La hipótesis de que el contenido de nitrógeno incide en el desarrollo del hongo pierde validez al comparar el tiempo de crecimiento cuando se emplea harina de centeno (7.5% de proteína) con la de bienestarina (20.50 % de proteína), ya que en las dos FC el tiempo empleado por el hongo para llenado total fue de 9 días. De todo lo anteriormente contemplado, se puede pensar que no es sólo un componente de las harinas el responsable de la mejor eficiencia biológica en la producción del hongo, sino el resultado de interrelaciones entre ellos. Aunado a lo anterior, no se debe dejar de lado que los elementos como el P, K y Mg; así como los considerados de rastro entre los cuales está el Fe, Zn y Mn, tienen un papel importante ya que actúan como cofactores y activadores enzimáticos (P. G. Miles. & Chang., 2004). Estudios efectuados sobre *Paecilomyces japonica* obtenido por FEL demostraron que los iones de hierro son coenzimas importantes que realizan una reacción de transferencia de electrones. Así mismo, los iones de manganeso actúan como coenzima de la superóxido dismutasa y son esenciales para la acción catalítica de las enzimas, especialmente las que utilizan ATP y sintetizan ADN y ARN (J. S. Lee et al., 2013)

**Figura 1-10:** Análisis proximal de las diferentes fuentes de carbono empleadas como componentes del medio de cultivo para *Pleurotus eryngii* **A)** Contenido proteico **B)** Carbohidratos **C)** Lípidos. Datos tomados de:

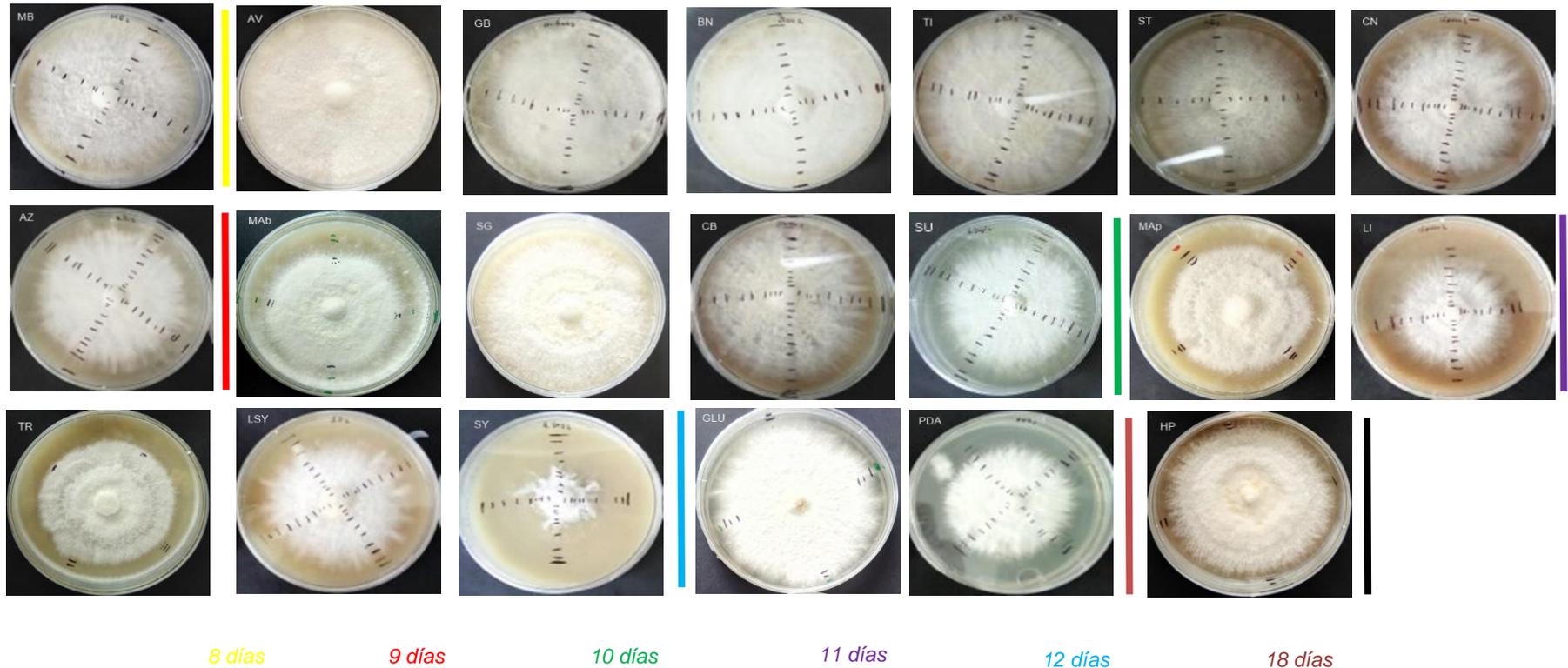
[http://alimentoscolombianos.icbf.gov.co/alimentos\\_colombianos/consulta\\_alimento.asp](http://alimentoscolombianos.icbf.gov.co/alimentos_colombianos/consulta_alimento.asp)





Cabe aquí anotar que el análisis anterior se basa sólo en el crecimiento radial, sin tener en cuenta un factor muy importante que es la densidad micelial, es decir la cantidad de micelio en mg por cm<sup>2</sup> de colonia (Donini et al., 2006; H. Zhang, Tang, & Chen, 2010). Sin embargo, por apreciación a simple vista de la Figura 1-11, es evidente que el micelio aéreo de la harina de avena es mayor al obtenido con la harina de maíz blanco, en prácticamente el mismo lapso de tiempo, permitiendo deducir sin lugar a dudas que la harina de avena proporciona más biomasa. Igualmente, la bioconversión del hongo es menor con la harina

**Figura 1-11:** Crecimiento radial del *Pleurotus eryngii* en diferentes FC por FeSup



Glucosa (GLU), agar papa dextrosa (PDA), Bienestarina (BN), leche de soya (LSY), linaza (LI), harina de: maíz amarillo precocido (MAp) y burdo (MAb), avena (AV), trigo (TR), cebada (CB), maíz blanco (MB), soya (HSY),trigo integral (TI), garbanzo (GB), arroz (AZ), sagú (SU), siete granos (SG), centeno (CN), plátano (HP) y salvado de trigo (ST).



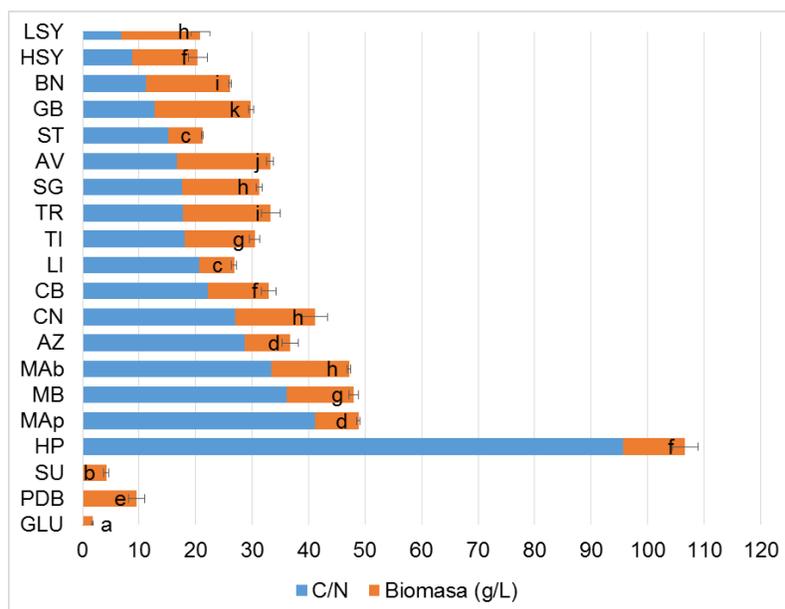
de maíz amarillo precocido. La confirmación de la eficiencia biológica se puede realizar mediante la separación y pesada del micelio obtenido, pero dado que se busca una metodología que de forma rápida permita una aproximación a la selección de medios de cultivo, sólo se tomará el aprovechamiento de la FC por el hongo a cultivar.

Como resultado final se tiene que la FeSup permite determinar cuál FC es más apta para el desarrollo del hongo, dada por su velocidad de crecimiento, así como la apreciación a simple vista de la densidad micelial. Con base en lo anterior se podrían tener como posibles FC las harinas de AV, GB y BN. Sin embargo, es necesario realizar las FEL para determinar cuál de ellas es la que efectivamente daría una mayor producción de biomasa.

### 1.8.2 Fermentación en estado líquido (FEL)

La FEL se efectuó durante 10 días, tiempo promedio determinado por la FeSup para invasión total de las cajas en todas las FC no tradicionales, con excepción de la harina de plátano. Los resultados obtenidos (Figura 1-12) mostraron que la mayor cantidad de biomasa de *P. eryngii* cultivada por FEL se obtuvo con el empleo de la harina de GB como componente del medio de cultivo (17,0533 g/L), seguida de la AV (16,5520 g/L). Comparando todos los resultados de FEL frente a los previamente obtenidos mediante la FeSup, se corrobora que con esta última técnica solamente se puede determinar la facilidad de aprovechamiento de la FC y sólo lograr una preselección de la mejor FC.

**Figura 1-12:** Relación C/N de las FC usadas y cantidad de biomasa de *Pleurotus eryngii* obtenida con cada una de ellas mediante FEL.



Glucosa (GLU), Caldo papa dextrosa (PDB), Bienestarina (BN), leche de soya (LSY), linaza (LI), harina de: maíz amarillo precocido (MAp) y burdo (MAb), avena (AV), trigo (TR), cebada (CB), maíz blanco (MB), soya (HSY) trigo integral (TI), garbanzo (GB), arroz (AZ), sagú (SU), siete granos (SG), centeno (CN), plátano (HP) y salvado de trigo (ST). (ANOVA)  $\alpha=0,05$  Método de Duncan. Cada biomasa está seguida por una letra de la "a" la "k" si dos promedios están con letra diferente, estas presentan diferencias estadísticamente significativas.

Para realizar la preselección de la FC con mayor potencial, con este trabajo en particular y teniendo presente buscar aplicación de los resultados en bioprospección, se tomaron como criterios el mejor aprovechamiento de la FC (días de llenado de caja) y la eficiencia del proceso (g de biomasa/L). La aplicación de los mismos permitió la preselección de 2 FC no tradicionales: harina de garbanzo (GB) y harina de avena (AV) (Tabla 1-5), ya que ellas proporcionan una buena producción de biomasa en el menor tiempo de cultivo.

**Tabla 1-5:** Criterios de preselección de la fuente de carbono a emplear

FC	TIEMPO (DÍAS) FESUP	EFICIENCIA EN FEL (g/L)	FC PRESELECCIONADA
MB	8	11,9100	No
BN	9	14,8813	No
GB	9	17,0533	Si
ST	9	5,9780	No
AV	9	16,5520	Si
CN	9	14,0187	No
AZ	9	8,0133	No
TI	9	12,4560	No
SG	10	13,7320	No
MAb	10	13,8120	No
CB	10	10,8160	No
SU	10	4,2000	No
MAp	11	7,6813	No
LI	11	6,1653	No
TR	12	15,5860	No
LSY	12	13,9453	No
HSY	12	11,5613	No
PDB	18	9,6000	No
GLU	18	1,7427	No
HP	19	10,9853	No

En lo referente al análisis de la posible incidencia de los constituyentes de las diferentes FC utilizadas (Figura 1-10 A, B y C) y su comparación con los obtenidos por FeSup, tomando a modo de ejemplo las harinas con un buen % de proteínas para determinar la influencia del contenido de nitrógeno sobre la producción de biomasa por FEL, se ve como para HSY (29,70), GB (22,39) y BN (20.50) la producción de biomasa (g/L) es de 11,56,

17,05 y 14,88 respectivamente, alcanzando valores que se encuentran entre los títulos más altos; resultados que dan pie para pensar que a mayor contenido de proteínas mayor obtención de biomasa. No obstante, si se toma la leche de soya que presenta un contenido de proteínas del 3,8% que a su vez exhibe una producción de biomasa de 13,94 g/L valor mayor que el obtenida por HSY, FC que octuplica los contenidos de proteína, lo que permite deducir que no es este factor el responsable directo de la buena o mala producción de biomasa.

Si se realiza el mismo ejercicio con relación al % de carbohidratos, específicamente con harinas de contenido entre el 73 % y el 79 % como son CB, CN, TR, MB, MAb y TI, con todas se obtiene una eficiencia que está entre 10,8160 y 15,5860 g/L respectivamente, indicando una posible relación entre las dos variables; resultado de fácil explicación ya que la proporción de C influye en el contenido de proteína y lípidos en el micelio, constituyentes estructurales del hongo, lo que se ve reflejado en una mayor cantidad de biomasa (Fazenda et al., 2008a). Sin embargo, el comportamiento no es el mismo cuando se emplea AZ o SU que tienen una concentración de carbohidratos de 78,90% y 83.7% y la biomasa generada fue tan sólo de 8,1 g/L y 4.2 g/L respectivamente, resultado que desvirtúa totalmente la suposición anterior.

En líneas generales se puede deducir que no es individualmente cada constituyente de las harinas empleadas el que determina la eficiencia, sino que es la interrelación entre todos y que esto sería aplicable tanto a la FeSup como a la FEL.

Otro aspecto a tener en cuenta es establecer si efectivamente existe incidencia de la relación C/N sobre la producción de biomasa, como lo aseveran algunos autores (Gern, Wisbeck, Rampinelli, Ninow, & Furlan, 2008; J.(Diamantopoulou, Papanikolaou, Aggelis, & Philippoussis, 2016)-Z. Wu et al., 2003). Para dar claridad sobre ello se determinó dicha relación para todas las harinas empleadas como FC y se correlacionaron con la producción de biomasa (Figura 1-12). Como se puede apreciar fácilmente no existe una incidencia directa de este factor, concordante con los resultados reportados por Chegwin et. al en el 2014 y aplicable solo a FC no tradicionales.

En lo que respecta a las FC tradicionales, según el reporte de Wu et al 2004 donde la relación C/N óptima para una buena producción de biomasa de *P. tuber-regium* es 24, usando como FC glucosa y extracto de levadura como FN, mientras que para otros hongos la relación C/N es variable y tiene una dependencia del género, especie y cepa. Adicionalmente es importante recalcar que el monosacárido usado como FC y el tipo de

FN dependiendo de si es orgánica o inorgánica, también presentarán un efecto sobre la producción de biomasa (Bespalova, Makarov, Antonyuk, & Ignatov, 2002; Diamantopoulou et al., 2016; NAIR et al., 1989).

Por otro lado, comparando las producciones de biomasa con otras especies de *Pleurotus* que fueron cultivados por FEL haciendo uso de FC no tradicionales, el comportamiento del *P. eryngii* es en general menor (Tabla 1-6).

**Tabla 1-6:** Producción de biomasa de otras especies de *Pleurotus* en comparación con las obtenidas en este trabajo

FC	<i>P. djamor</i>	<i>P. pulmonarius</i>	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. eryngii</i>
CB	17,2804	16,5535	17,4791	10,8160
AV	17,2342	15,8181	17,0663	16,5520
TR	14,8251	14,6273	15,4602	15,5860
AZ	15,6531	11,6555	19,4413	8,0133
BN	15,9972	15,4860	17,0504	14,8813
MB	18,0754	16,1572	20,1672	11,9100
HSY	15,2870	16,6884	17,7026	11,5613
ST	12,0634	12,1273	13,5815	5,9780
TI	17,5882	17,5067	16,4610	12,4560
SG	17,8625	17,5667	17,8292	13,7320
MA	18,6896	15,6061	19,5428	13,8120

Harina de Cebada (CB), Avena (AV), Trigo (TR), Arroz (AZ), Bienestarina (BN), Maíz blanco (MB), de soya (HSY), de trigo integral (TI), siete granos (SG), maíz amarillo (MA) y salvado de trigo (ST)

Del análisis de esta misma tabla se deduce que cada una de las especies de *Pleurotus*, dada su especificidad enzimática, aprovecha mejor determinada FC. En el caso particular del *P. eryngii*, con base en los resultados obtenidos a lo largo de esta parte de la investigación, son la harina de garbanzo y de avena, las fuentes de carbono que generan una mejor producción de biomasa, presentando diferencias estadísticamente significativas con el resto de las harinas empleadas.

## 1.9 Conclusiones

Se corrobora que las FC no tradicionales son más eficientes que las tradicionales en lo que respecta a la producción de biomasa.

La FeSup es una metodología que permite seleccionar, de manera preliminar, FC promisorias. Sin embargo, es necesario complementar el método con la determinación de la cantidad de biomasa producida.

---

Son la harina de garbanzo y de avena las FC que se presentan como las más aptas para una mayor producción de biomasa del *P. eryngii*.

Se ratifica que, para las FC no tradicionales, el efecto de la relación C/N sobre la producción de biomasa, es género, especie y cepa dependiente.

Se confirmó para el caso particular del *P. eryngii*, que el contenido de carbohidratos, lípidos, proteína y minerales de las FC, no afectan de forma independiente la producción de biomasa, sino que por el contrario es una interrelación ideal la que permite la mayor eficiencia.



## **2. Selección de la FC que proporcione el producto biotecnológico de mayor valor nutracéutico y determinación de su potencial en la obtención de un buen nutracéutico**

### **2.1 Antecedentes**

Si bien una buena producción de biomasa es un parámetro de la eficiencia de cualquier proceso biotecnológico, cuando se trata de la aplicación de la misma como nutra o nutracéutico, es de vital importancia que la misma contenga metabolitos secundarios que exhiban actividad biológica (bioactivos).

Dentro de los bioactivos de los macromicetos se ha prestado mayor atención a los polisacáridos, generalmente  $\beta$ -glucanos, ya que estos presentan actividades biológicas que los hacen más atractivos para su empleo en farmacoterapia como son la actividad anticancerígena y la acción inmunoestimuladora (Brizuela et al., 1998; De Silva et al., 2013; Pattar, 2010; Won et al., 2011). Aunado a lo anterior está el hecho de que su abundancia dentro de los metabolitos fúngicos es mayor, lo que ha traído como consecuencia el haber dejado de lado metabolitos de igual importancia como son los compuestos triterpenoidales, que al igual que los polisacáridos le proporcionan a los hongos propiedades medicinales entre las que se destacan la antimicrobiana, la hipocolesterolémica, la antitumoral, la antifúngica, la inmunoestimulante, etc (Y. W. Liu et al., 2014; Yaoita, Kikuchi, & Machida, 2015)(Öztürk, Tel-çayan, et al., 2015).

La producción de estos compuestos depende, al igual que la de la biomasa, de las diferentes variables del proceso biotecnológico las cuales tienen marcada incidencia tanto en la cantidad como en la variedad estructural de los mismos (Chegwin-Angarita & Nieto-

Ramírez, 2014b; Hatvani et al., 2005; Nieto & Chegwin-Angarita, 2013). Con base en los resultados del capítulo anterior se hace necesario investigar la incidencia del empleo de FC no tradicionales sobre el carácter nutracéutico de la biomasa obtenida biotecnológicamente, lo que permitirá explorar la efectividad de ser empleada en la obtención de nutracéuticos; necesidad que se ve reforzada debido a que las investigaciones sobre este aspecto son muy reducidas, siendo el grupo de Investigación en Química de Hongos Macromicetos de la Universidad Nacional, quien ha incursionado más profundamente (Chegwin-Angarita & Nieto-Ramírez, 2014b; Nieto & Carolina Chegwin, 2008; Nieto & Chegwin-Angarita, 2013; Suárez & Nieto, 2013).

El estudio planteado junto con la determinación de los posibles cambios producidos a lo largo de la fermentación bien sea en la cantidad o en las estructuras de los bioactivos, investigación no realizada hasta el día de hoy, no sólo complementará la información que se tiene del proceso biotecnológico en sí, sino que se constituiría en un estudio pionero en esta área.

## **2.2 Aspectos nutracéuticos, nutricéuticos, farmacéuticos y cosmeceúticos de macrohongos**

Los hongos macromicetos presentan un gran valor funcional derivado, como ya se había indicado, de la presencia en ellos no solo de componentes con valor nutricional sino de otros que son beneficiosos para la salud. Es bien conocido que estos organismos son fuente de compuestos bioactivos útiles en el desarrollo de medicinas naturales por su valor nutracéutico y por posibilitar la preparación de nutracéuticos, productos farmacéuticos y en algunos casos hasta de fungir como cosmeceútico. Aproximadamente 300 especies de hongos se conocen por presentar propiedades medicinales o nutracéuticas y otras 1800 se han identificado como potenciales fuentes de nutricéuticos. *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Hericiium erinaceus*, *Pleurotus ostreatus* y *Grifola frondosa* son las especies más cultivadas. De igual modo, han sido las más estudiadas con la finalidad de analizar su valor medicinal y su potencial como nutracéuticos (Lakhanpal & Rana, 2005) El término nutracéutico fue introducido por Stephen DeFelice en 1979 quien lo definió como “un alimento (o parte de este) que provee de beneficios médicos a la salud, incluyendo prevención y/o tratamiento de enfermedades”. Este término está íntimamente relacionado con “alimento funcional”. En vista de que no hay un límite real entre estos dos conceptos

el Bureau of Nutritional Sciences of the Food Directorate of Health Canada (Health Canada, 1998), determinó que un nutraceutico es un producto proveniente de un alimento que generalmente se comercializa en formas no asociadas con la original (Scicchitano et al., 2014).

En este orden de ideas, cuando se habla del micelio del hongo (forma no normal de consumir el alimento), se habla de un nutraceutico. En cambio, los extractos parcialmente purificados de los hongos que poseen solamente los componentes bioactivos se denominan nutraceutico. En el caso de que se haga referencia en particular a su capacidad para el cuidado de la piel, entonces recibe el nombre de cosmeceutico. Este término fue usado por primera vez hace más de 30 años por el científico Albert Kligman, en una reunión de la Sociedad de Química Cosmética, para identificar un producto que pudiera tener un efecto terapéutico sobre la piel (Carrera-Martinez et al., 2010). Cuando se tiene un producto obtenido y purificado de los hongos con una composición química definida, se puede referir a él como un farmaceutico, el cual tiene un uso médico determinado siendo utilizados terapéuticamente para el tratamiento de condiciones médicas específicas (P. Miles & Chang, 1999).

Dichas propiedades funcionales de los productos naturales en general son atribuibles a la presencia de metabolitos tanto primarios como secundarios. A continuación, se hará una breve descripción de los bioactivos más destacados aislados de macromicetos.

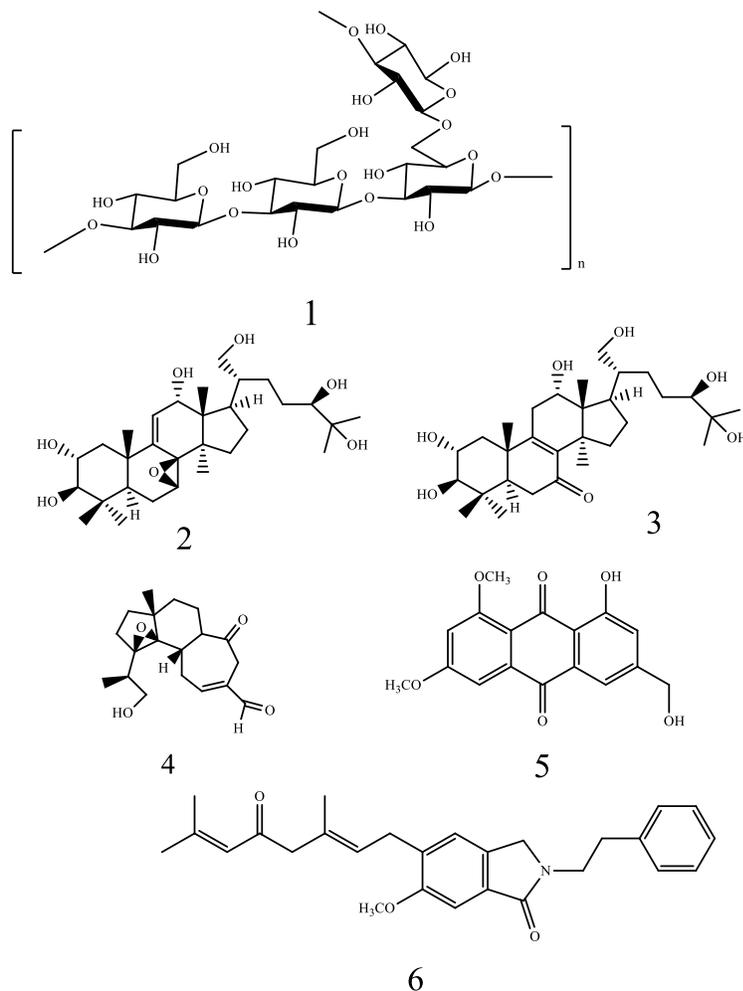
## 2.3 Bioactivos en *macromicetos*

Los metabolitos secundarios se pueden definir como compuestos biosintetizados a partir de rutas metabólicas específicas, siendo incluso característicos de ciertos géneros y/o especies, de forma tal que, en determinados casos como es el de los ácidos grasos, pueden ser empleados como quimiomarcadores taxonómicos (Malheiro, Guedes de Pinho, Soares, César da Silva Ferreira, & Baptista, 2013). Dentro de ellos se encuentran polisacáridos, compuestos terpenoidales, fenoles, flavonoides y alcaloides.

Östürk et. al en el 2015 hacen un recuento de los metabolitos aislados en la última década desde diferentes macromicetos. Los autores mencionan que a partir de 13 especies se han reportado 24 tipos de polisacáridos entre  $\beta$ -glucanos y otros complejos, 259 terpenos (7 monoterpenos, 19 sesquiterpenos, 54 diterpenos, 179 triterpenos) a partir de 29 especies de hongos; 55 esteroides de 11 especies; 41 compuestos fenólicos de 13 especies y 42

alcaloides de 13 especies (Öztürk, Tel-Çayan, Muhammad, Terzioğlu, & Duru, 2015). En la Figura 2-1 se encuentran algunas de las estructuras de estos metabolitos.

**Figura 2-1:** Estructuras de algunos metabolitos aislados de hongos macromicetos



**1)** Polisacárido aislado de *Auricularia pilytricha* **2-3)** Triterpenoides lanostánicos aislados de *Naematoloma fasciculare* **4)** Scabromina diterpeno ciatano aislado de *Sarcodon scabrosus* **5)** Citreoroseina 6,8-dimetil éter, polifenol tipo antraquinona aislado del *Cortinarius purpurascens* **6)** Isohericenona alcaloide aislado del *Hericiium erinaceum*.

Los metabolitos secundarios en general, presentan diferentes bioacciones, de allí la importancia de profundizar en su estudio (De Silva et al., 2013; Gyawali & Ibrahim, 2014a; Öztürk, Tel-Çayan, et al., 2015). En la tabla 2-1 se presenta a modo de ejemplo, algunos grupos de metabolitos de origen fúngico, así como su acción biológica, que incluso han llevado a su comercialización, tal como se muestra en la tabla 2-2.

**Tabla 2-1:** Bioacciones determinadas por algunos metabolitos secundarios de macromicetos

HONGO	TIPO DE METABOLITO	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIA
<i>Lentinus sp</i>	Polisacáridos	Antitumoral Antimicrobiana Antiviral Antioxidante	<i>(Bisen, Baghel, Sanodiya, Thakur, &amp; Prasad, 2010; Çağlarirmak, 2007; Okamoto, Kodoi, Nonaka, Fukuda, &amp; Hashimoto, 2004; Rahman &amp; Choudhury, 2012; Sudirman, Lef6bvre, Kiffer, &amp; Botton, 1994; Surenjav, Zhang, Xu, Zhang, &amp; Zeng, 2006; Taketlara &amp; Uida, 1979)</i>
	Esteroles	Hipocolesterolémica Antimicrobiana	
<i>Ganoderma sp</i>	Polisacáridos	Antitumoral Antimicrobiana Antiviral Antioxidante	<i>(Baby, Johnson, &amp; Govindan, 2015; Y. K. Chen, Kuo, Chiang, Lo, &amp; Sheen, 2009; C. R. Cheng et al., 2010; Ferreira et al., 2015; Gan, Kuo, &amp; Lin, 1998; Hearst et al., 2010; P. A. Zapata et al., 2012)</i>
	Esteroles, Terpenos y triterpenos	Inmunomodularora Inmunoestimulante Hipoglicémico Antiinflamatoria Hepatoprotectivo	
	Proteínas	Antitumoral Antimicrobiana Antiviral Antioxidante Antimicrobiana	
<i>Agaricus sp</i>	Polisacáridos	Inmunomoduladora Antioxidante Antimicrobiana	<i>(Barros et al., 2008; De Silva et al., 2013; Kimatu et al., 2017; Fhernanda R Smiderle et al., 2013; Takaku, Kimura, &amp; Okuda, 2001; Wang,</i>
	Esteroles	Antitumoral Antimicrobiana Antioxidante Hipocolesterolémica	
	Proteínas hidrolizadas	Antioxidante  Antioxidante	

	Compuestos fenólicos		Wang, & Han, 2013)
<i>Pleurotus sp</i>	Polisacáridos	Antioxidante Hepatoprotectiva Antitumoral	(Jeong, Jeong, Gu, Islam, & Song, 2010; Y.-L. Lee, Huang, Liang, & Mau, 2007; Ren, Wang, Guo, Yuan, & Yang, 2016; Sun, Hu, & Li, 2017; Xu et al., 2017)
	Esteroles y triterpenos polipéptidos	Antimicrobiana  Antioxidante Antitumoral Inmunoestimulante	

**Tabla 2-2:** Productos comerciales que contienen metabolitos extraídos de hongos basidiomicetos (Brizuela, García, Pérez, & Mansur, 1998).

NATURALEZA QUÍMICA	ORGANISMO	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	PRODUCTO
Sesquiterpenos y compuestos relacionados	<i>Merulius, Marasmius, Naematoloma, Pleurotus, Lentinula, Panaelus</i>	antimicrobiana antifúngica, antiviral, citotóxica, mutagénica	Merudial, Naemotolin, Naematolon, Hynophilin, Leianafulveno, Pleutellol, Ácido pleurotólico, Omphalone, Fulvoferruginin
Diterpenoides	<i>Cyathus, Crinipellis</i>	Citotóxica, antifúngica, antibacteriana.	Estriatin, Pleuromutilin, Cavipetin
Acetilenos	<i>Marasmius, Clitocybe, Coprinus, Pleurotus, Merulius.</i>	Antibacterial, antifúngica, citotóxica	Escorodonin
Glicolípidos	<i>Ustilago, Schizonella</i>	Antimicrobiana, citotóxica	Schizonellina
Policetonas	<i>Merulius, Phlebia</i>	Antimicrobiana, hemolítica	Ácido merulínico
Nucleósidos	<i>Cylitocybe, Lentinula</i>	Antibacteriana, antiviral	Nebularin
Sales de diazonio	<i>Agaricus xanthodermus</i>	Antibacteriana, citotóxica	Agaridin

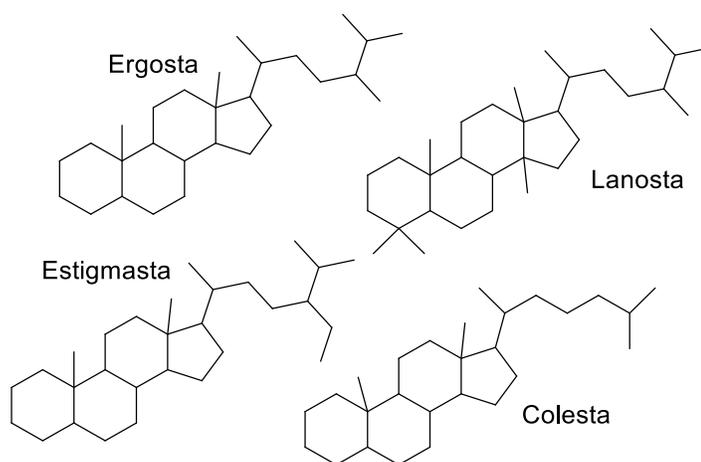
El estudio de los polisacáridos y los triterpenoides, se ha visto regido por la bioacción de los mismos, prestando especial atención a los primeros dada la acción anticancerígena e inmunomoduladora que presentan. Muchos de estos polisacáridos exhiben eficacia sobre tipos específicos de cáncer, lo que los ha posicionado como agentes quimioterapéuticos. Tal es el caso del Lentinan,  $\beta$ -glucano aislado de *Lentínula edodes*, que al ser empleado

como coadyuvante en el tratamiento de carcinoma gástrico y colorrectal, ha presentado excelentes resultados (Bisen et al., 2010; Ng & Yap, 2002; Okamoto et al., 2004). Siendo este tipo de bioactivos tan atractivos para la farmacoterapia, han relegado las investigaciones sobre metabolitos como los compuestos triterpenoidales, haciendo que no se aprovechen al máximo sus acciones biológicas.

### 2.3.1 Compuestos triterpenoidales en macromicetos

Los compuestos triterpenoidales tetracíclicos constituyen un grupo de amplia distribución en basidiomicetos (Cheung, 2010; De Silva et al., 2013; Hammann, Lehnert, & Vetter, 2016; Yaoita et al., 2015). Su estructura básica corresponde al núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno. Forman parte de los componentes grasos del hongo y pueden ser divididos en cuatro grupos mayoritarios en los macrohongos, dependiendo de los sustituyentes presentes en el núcleo básico: los lanosta, colestá, estigmasta y los ergosta (Figura 2-2). Estos metabolitos exhiben actividades biológicas comprobadas, entre las que se destaca la antimicrobiana (Gyawali & Ibrahim, 2014a; Jain, Singh, & Jain, 2001; Keller, Maillard, & Hostettmann, 1996; Popova, Trusheva, Gyosheva, Tsvetkova, & Bankova, 2009)

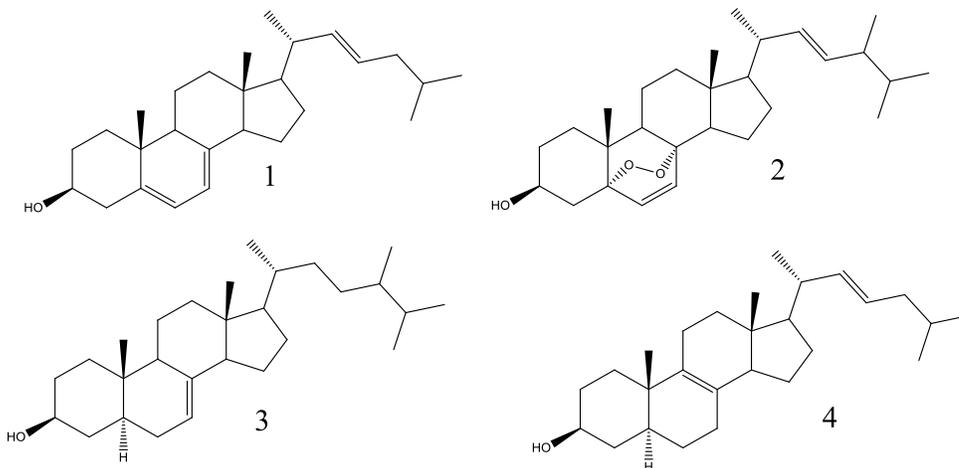
**Figura 2-2:** Núcleos triterpenoidales más comunes en hongos basidiomicetos



Muchos metabolitos de tipo triterpenoidal han sido extraídos tanto del micelio como del cuerpo fructífero de los macromicetos, en especial esteroides. A modo de ejemplo se pueden citar el ergosterol (1) precursor de la vitamina D<sub>2</sub>, peróxido de ergosterilo (2), zimosterol (3) y fungisterol (4), entre otros (Figura 2-3). Cabe aquí anotar que el hecho de

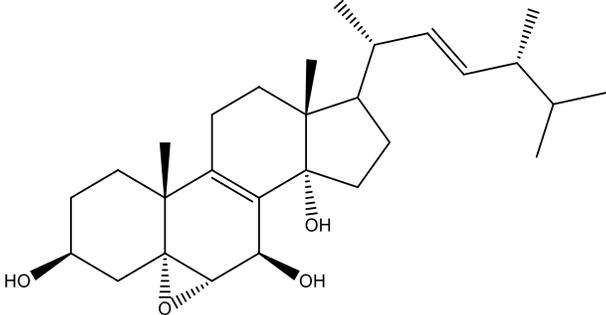
que dependiendo del sustrato o medio empleado para el desarrollo del hongo, así como del género y la especie del mismo, hace que estos metabolitos presenten una gran variedad estructural. Esta particularidad les confiere un mayor espectro de actividades biológicas (Nieto & Chegwin-Angarita, 2013; Yaoita et al., 2015), incentivando por tanto su estudio.

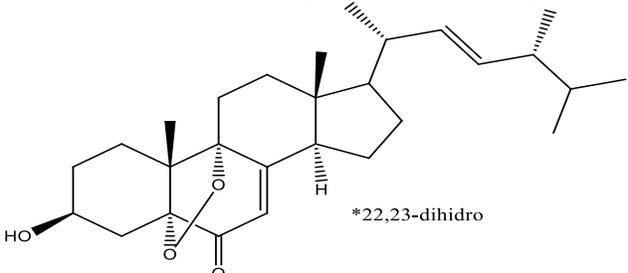
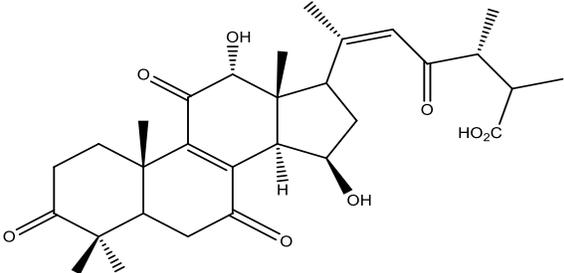
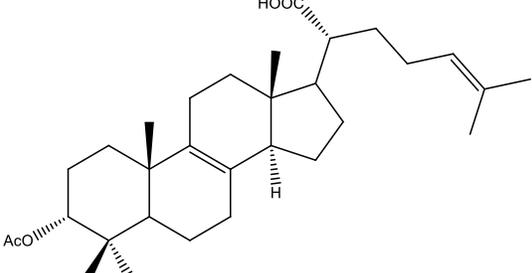
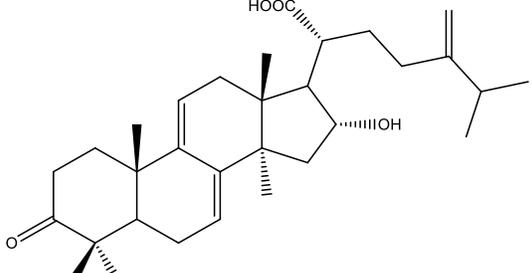
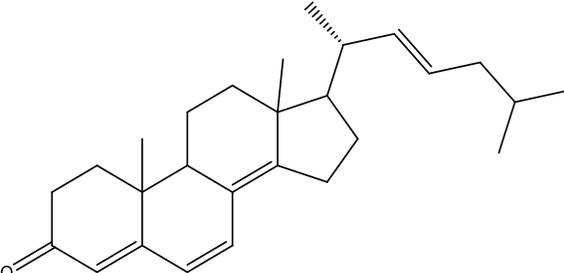
**Figura 2-3:** Esteroles ampliamente distribuidos en el reino fungi

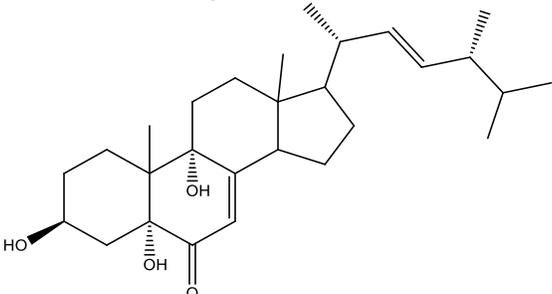
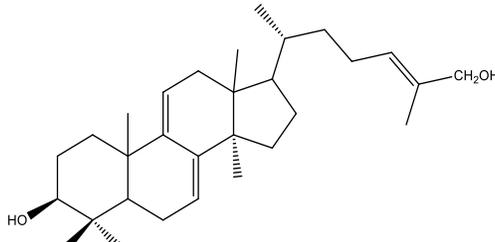
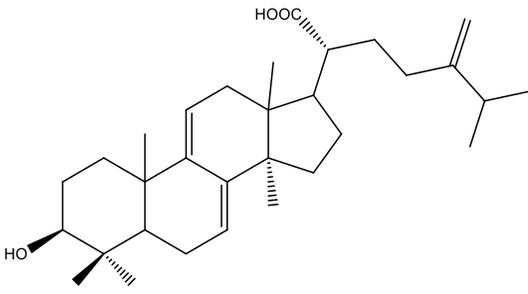
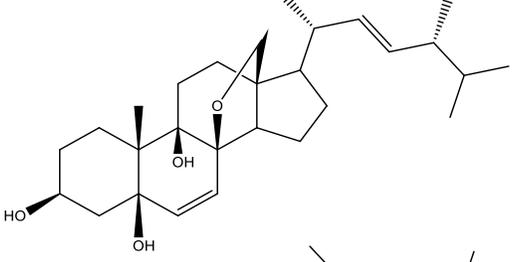
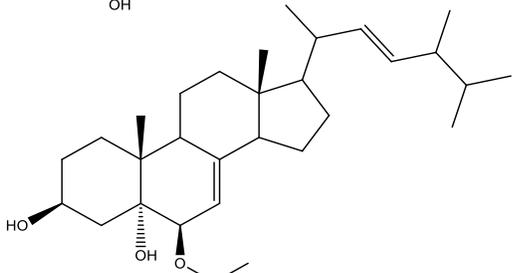


En la tabla 2-3 se encuentran las estructuras de otros esteroides identificados en basidiomicetos, algunos de ellos con actividad biológica comprobada.

**Tabla 2-3:** Esteroides distribuidos en basidiomicetos.

HONGO	COMPUESTO	ACTIVIDAD
<i>Lentinula edodes</i>	5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxi-7 $\beta$ ,14 $\alpha$ -dihidroxi-(22E,24R)-ergosta-22,8(9)-dien-3 $\beta$ -ol 	No determinada (Yaoita et al., 1998)

<p><i>Hypsizigus marmoreus</i></p>	<p>5<math>\alpha</math>,9<math>\alpha</math>-epidioxy-(22E)-ergosta-7,22-dien-3<math>\beta</math>,6<math>\alpha</math>-diol</p>  <p>*22,23-dihidro</p>	<p>No determinada (Yaoita et al., 1998)</p>
<p><i>Elfvigia applanata</i></p>	<p>Ácido elfvingico A</p> 	<p>Anticancerígena (Yoshikawa et al., 2002)</p>
<p><i>Fomiptosis pinicola</i></p>	<p>Ácido 3<math>\alpha</math>-acetiloxilanosta-8,24-dien-21-oico</p> 	<p>Antimicrobiana (Keller et al., 1996)</p>
<p><i>Fomiptosis pinicola</i></p>	<p>Ácido poliporénico</p> 	<p>Antimicrobiana (Keller et al., 1996)</p>
<p><i>Ganoderma neojaponicum</i></p>	<p>Ergosta-4,6,8,(14),22-tetraen-3-ona</p> 	<p>No determinada (Gan et al., 1998)</p>

<p><i>Trametes versicolor</i></p>	<p>3<math>\beta</math>,5<math>\alpha</math>,9<math>\alpha</math>-trihidroiergosta-7,22-dien-6-ona</p> 	<p>Citotóxica (Zjawiony, 2004)</p>
<p><i>Ganoderma pfeifferi</i></p>	<p>Ganodermediol</p> 	<p>Antiviral contra influenza tipo A (Zjawiony, 2004)</p>
<p><i>Leatiloporus sulphureus</i></p>	<p>Ácido dehidrotrametenólico</p> 	<p>Hipoglicemi ante (Zjawiony, 2004)</p>
<p><i>Stropharia rugosoannulata</i></p>	<p>8<math>\beta</math>,18<math>\beta</math>-epoxiergosta-6,22-dien-3<math>\beta</math>,5<math>\beta</math>,9<math>\beta</math>-triol</p>  <p>6<math>\beta</math>-etoxiergosta-7,22-dien-5<math>\alpha</math>,3<math>\beta</math>-diol</p> 	<p>No determinada (Jing Wu et al., 2013)</p>

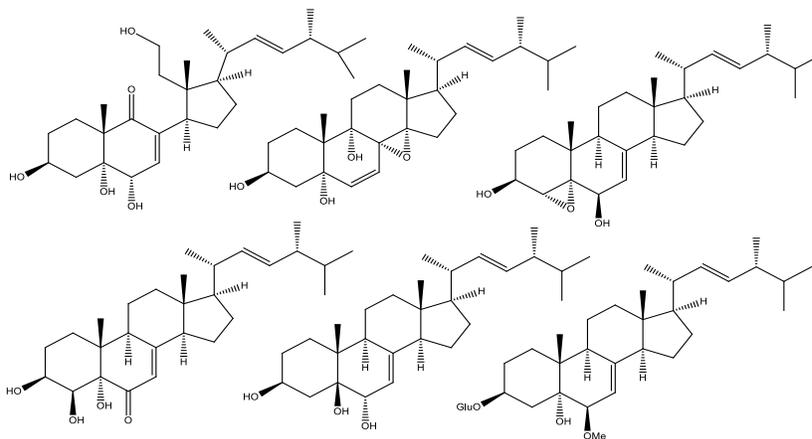
Como se puede deducir del análisis de la tabla anterior, hay una amplia variabilidad de estructuras triterpenoidales que han sido identificadas en este grupo de productos naturales. A continuación, se presentarán los estudios más relevantes que sobre este tipo de metabolitos se tienen para el género *Pleurotus*.

### 2.3.2 Triterpenos del género *Pleurotus*

En el caso del *Pleurotus sajor-caju*, haciendo uso de los cuerpos fructíferos cultivados se elucidaron estructuralmente: Ergosta-5(10),6,8(9),22-tetraen-3 $\beta$ -ol, Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 $\beta$ -ol (Nieto & Carolina Chegwin, 2008). Haciendo uso de cuerpos fructíferos adquiridos comercialmente de *Pleurotus ostreatus* Yaoita et al 1998 elucidó: 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -dihidroxi-Ergosta-7-en-6-ona y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -trihidroxi-ergosta-7-en-6-ona (Yaoita et al., 1998). Desde el *Pleurotus pulmonarius*, se elucidaron los siguientes triterpenos a partir del micelio cultivado por FEL: 6 $\alpha$ -hidroxiestigmast-4-en-3-ona, Ergosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol, Ergosta-2,5,7,9,14,22-hexaeno y finalmente, los siguientes esteroides fueron elucidados en el *Pleurotus djamor* cultivado por FEL: Ergosta-4,22-dien-3-ona y Estigmast-5-en-3 $\beta$ -ol (Chegwin-Angarita & Nieto-Ramírez, 2014).

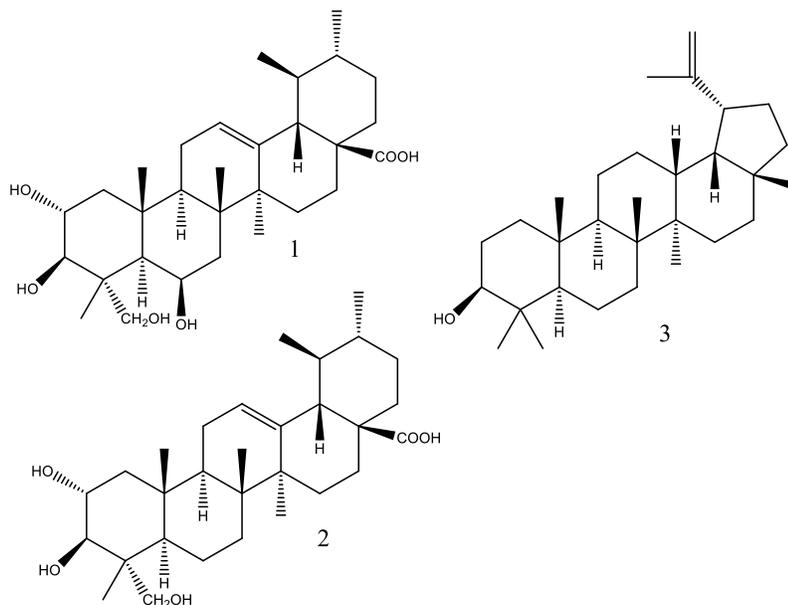
Particularmente para el *Pleurotus eryngii* las investigaciones enfocadas al estudio de su composición son reducidas y en el caso de los triterpenos, solo se encuentran dos reportes. Kikuchi et al en el 2016, quienes aislaron a partir de sus cuerpos fructíferos (adquiridos comercialmente en la empresa Hokuto Corp) seis compuestos de tipo ergostano y variaciones en los sustituyentes presentes en el núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno (Figura 2-4) (Kikuchi et al., 2016)

**Figura 2-4:** Novedosos compuestos de carácter triterpenoidal con núcleo ergosta aislados de los cuerpos fructíferos de *P. eryngii* (Kikuchi et al 2016)



Por otro lado se ha reportado la presencia de compuestos triterpenoidales pentacíclicos con actividad antitumoral, particularmente el compuesto 1 y 2 tuvieron una inhibición antitumoral un poco más fuerte contra el cáncer de seno (Figura 2-5) (Kundu, 1994; Xue, Li, et al., 2015; Xue, Zhai, et al., 2015).

**Figura 2-5:** Triterpenoides pentacíclicos aislados de *P. eryngii* (Xue et al 2015)



1) Ácido 2,3,6,23-tetrahidroxi-urs-12-en-28-oico 2) Ácido 2,3,23-trihidroxi-urs-12-en-28-oico 3) Lupeol

Las características anteriormente descritas relacionadas con la actividad biológica y la variedad de estructuras identificadas en los macromicetos han incentivado el estudio de herramientas que permitan favorecer la maquinaria biosintética de los organismos, en busca de estimular la producción de metabolitos con novedosas actividades biológicas o con potenciamiento de las ya existentes. Dentro de estas estrategias se encuentra los procesos biotecnológicos, como se describió en el capítulo 1. La variación en las condiciones de la fermentación, no solo altera la producción de biomasa, sino por supuesto la composición de la misma. En la siguiente sección se ahondará en el efecto de la composición del medio de cultivo sobre la producción de bioactivos.

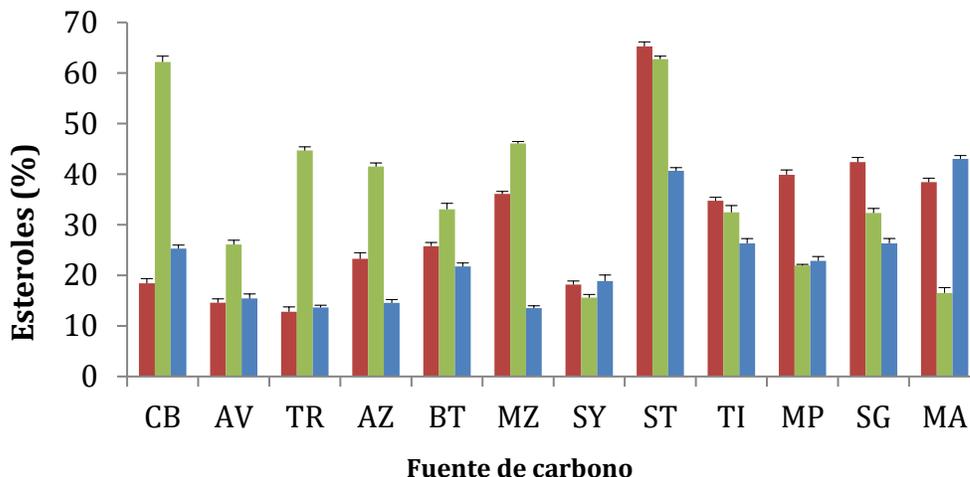
## 2.4 Incidencia de la composición del medio de cultivo en la producción de bioactivos

Desde el punto de vista de bioactivos, autores han determinado que existe un cambio en la concentración de éstos que es dependiente de los parámetros del proceso fermentativo. Sin embargo, estos estudios se enfocan mayoritariamente en la producción de polisacáridos haciendo uso de FC tradicionales (Diamantopoulou et al., 2016) (Fasidi, 1996; Fasola, Gbolagade, & Fasidi, 2007; Jonathan & Fasidi, 2001).

Particularmente, para el caso de los triterpenoides, Zou en el 2006, publicó un artículo en el que evaluó la producción de biomasa, exopolisacáridos y **ergosterol** de *Agaricus bisporus*, utilizando glucosa y sacarosa como FC. Cabe aquí anotar que esta especie pertenece al orden agaricales al igual que el *P. eryngii*, objeto de la presente investigación. En los resultados obtenidos, se evidenció que con el empleo de glucosa se favorece la producción de ergosterol y de biomasa (Zou, 2006).

En el caso del género *Pleurotus*, Chegwin et al en 2014 reportan los resultados de un trabajo sobre la influencia que conlleva el empleo de FC no tradicionales, en la variación estructural y la producción de compuestos triterpenoidales (Chegwin-Angarita & Nieto-Ramírez, 2014b; Nieto & Chegwin-Angarita, 2013). En primera instancia, determinaron que la composición de las FC, no tiene ningún efecto sobre la obtención de estos compuestos para las 3 especies estudiadas (*P. ostreatus*, *P. pumonarius* y *P. djamor*), al igual que la relación C/N. En segunda instancia los autores concluyeron que la variación en la cantidad de los bioactivos no sólo depende de la FC sino también de la especie cultivada (Figura 2-6). En cuanto a la variabilidad estructural de los triterpenoides ésta fue mayor con el empleo de salvado de trigo como FC en las 3 especies (Nieto & Chegwin-Angarita, 2013).

**Figura 2-6:** Contenido de esteroides presentes en extractos de acetato de etilo del micelio de tres especies de *Pleurotus* obtenidos mediante FEL con el empleo de diferentes FC.



Azul: *P. ostreatus* Rojo: *P. pulmonaris* Verde: *P. djamora*. CB: harina de cebada, AV: harina de avena, TR: harina de trigo, AZ: harina de arroz, BT: bienestarina, MZ: harina de maíz, SY: harina de soya, ST: salvado de trigo, TI: Harina de trigo integral, MP: Harina de maíz pinto, SG: harina de siete granos y MA: harina de maíz amarillo

Adicionalmente en el mismo estudio se determinó que las FC no tradicionales influyen sobre la producción de ácidos grasos insaturados y sus ésteres, mostrando que al igual que en el caso de los triterpenoides, no existe una tendencia entre la relación C/N de las harinas y la biosíntesis de éstos. En general se observó que la producción de ácidos para las tres especies fue menor que la de sus ésteres y encontrándose en mayor proporción en el micelio, brindando así, valor nutracéutico al producto biotecnológico.

Es así, como se ha determinado que las diferentes FC no tradicionales pueden ser usadas como medio de cultivo en FEL para una buena producción de bioactivos. Sin embargo, se debe establecer el tiempo ideal de cultivo que permita la obtención del producto biotecnológico con las mejores propiedades nutracéuticas.

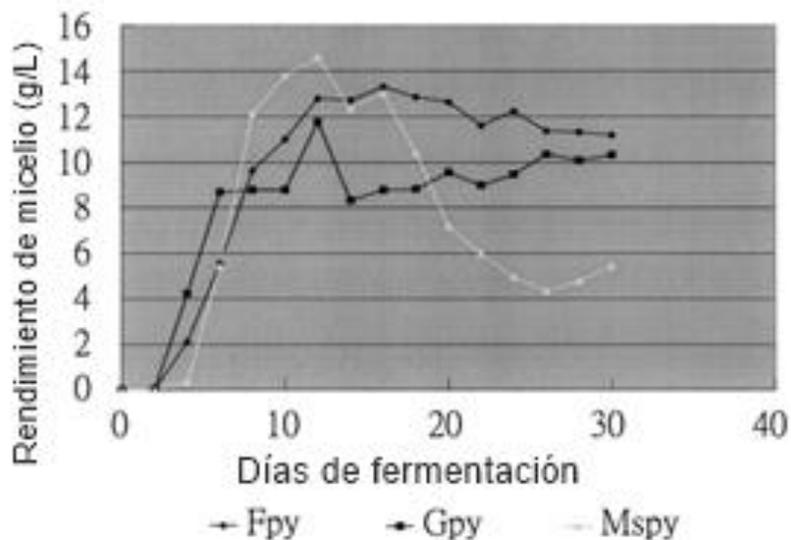
## 2.5 Influencia del tiempo de fermentación en el carácter nutracéutico de la biomasa fúngica

Una determinación de gran importancia para evaluar la eficiencia de proceso biotecnológico con miras a la producción de un buen nutracéutico, es la correspondiente a estimar el lapso de tiempo en el cual se obtiene la mayor producción de los bioactivos de

interés y de biomasa, lo cual se lograría haciendo el estudio de los metabolitos a lo largo del tiempo de la fermentación. El resultado de este ejercicio permitiría conocer el intervalo del proceso en el cual se tiene la mayor concentración de ellos lo que conllevaría a la obtención de un producto biotecnológico con buenas características nutraceuticas.

Teniendo en cuenta que el carácter nutraceutico está relacionado tanto con la biomasa como con los bioactivos, los primeros estudios se enfocaron a la producción de biomasa como lo reporta Wu et al 2003 (Figura 2-7). Los autores concluyen que la incorporación de la fructosa a las rutas metabólicas del hongo es más eficiente que la de glucosa, lo que afecta directamente la producción de biomasa. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la FC no tradicional aunque presenta la mayor producción de biomasa, ésta decae a lo largo de la FEL a diferencia de las FC tradicionales que tienden a producir una cantidad estable con el tiempo (J.-Z. Wu, Cheung, Wong, & Huang, 2003). Es así que desde el punto de vista de la biomasa existe un cambio y por ende una variación en el potencial nutraceutico.

**Figura 2-7:** Curva de crecimiento micelial para *Pleurotus tuber-regium* con diferentes fuentes de carbono (J.-Z. Wu et al., 2003b).

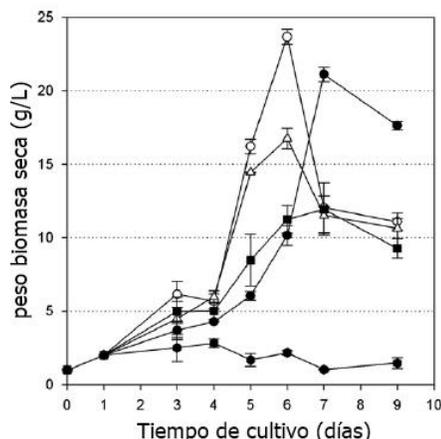


**Fpy:** fructosa, peptona y extracto de levadura **Gpy:** Glucosa, peptona y extracto de levadura **Mspy:** almidón de maíz, peptona y extracto de levadura

En otro reporte, Papispyridi et al. 2010 determinaron la producción de biomasa de *P. ostreatus* usando como FC varios monosacáridos entre los que se encontraba la xilosa, glucosa y trealosa en proporciones de 60 g/L. Los valores máximos de biomasa se obtuvieron al día 6 (23,7, 21,1 y 20,5 g/L respectivamente) (Figura 2-8), a excepción de la

glucosa que presentó el máximo en el día 7. Posteriormente hay un decaimiento de la biomasa como se reportó por otros autores (Shih, Chou, Chen, Wu, & Hsieh, 2008a; Jinzhong Wu et al., 2003; B.-B. Zhang & Cheung, 2011), el cual puede atribuirse a una autólisis de la hifa debido a las enzimas secretadas (Papaspýridi, Katapodis, Gonou-Zagou, Kapsanaki-Gotsi, & Christakopoulos, 2010b).

**Figura 2-8:** Cinética de crecimiento del *P. ostreatus* obtenido por FEL en un medio suplementado con monosacáridos como fuente de carbono (referencia)



(■) fructosa (▼) rafinosa (□) sacarosa (○) xilosa (●) glucosa (◇) maltosa (△) manosa (▽) trealosa. Las fermentaciones fueron llevadas a cabo en replicas a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ , a 220 rpm

Así como se ha reportado cambios en la biomasa se ha determinado variaciones en la concentración de metabolitos secundarios a lo largo de una FEL incidiendo directamente en su potencial nutra y nutricéutico (Gao & Gu, 2007b; Xiao et al., 2004; Yang et al., 2013a; J. Zhang, Zhong, & Geng, 2014a). Un resumen de los trabajos sobre estos tópicos se presenta en la tabla 2-4.

**Tabla 2-4:** Investigaciones realizadas sobre el seguimiento de bioactivos y biomasa a lo largo de una FEL con diferentes basidiomicetos

HONGO	OBJETIVO DE ESTUDIO	TIPO DE FC	OBSERVACIONES	REFERENCIA
<i>Grifola frondosa</i>	Biomasa y exopolisacáridos	Simple (glucosa 30g/L)	La máxima concentración de polisacáridos se obtiene en el día 12 (5,2g/L), mientras que la biomasa no varía desde el día 9 (9g/L)	(B. C. Lee et al., 2004)
<i>Agaricus brasilensis</i>	Biomasa, exo e intrapolisacáridos y ergosterol	Compleja (10g/L de glucosa, harina de maíz y harina de	A los 4 días de cultivo el hongo alcanza la mayor producción de biomasa (10g/L) al igual que del ergosterol, intra y exo	(Gao & Gu, 2007a)

			soya. 5g/L de salvado de trigo)	polisacáridos con un leve decaimiento al 5 día	
<b><i>Pleurotus ostreatus</i></b>	Biomasa y exopolisacáridos	y	Compleja (licor de maíz fermentado (20g/L), glucosa (40g/L) y extracto de levadura (5g/L)	En el día 8 de cultivo se obtiene la mayor producción de biomasa (25g/L) mientras que no se observan cambios en la concentración de polisacáridos desde el día 3 (50g/L)	(Maria et al., 2007)
<b><i>Ganoderma Lucidum</i></b>	Biomasa y ácidos ganodéricos		Cultivo en dos etapas: 1°: Lactosa 35 g/L 2°: adición de 5mg/L de celulosa en el día 3 de cultivo	La producción de biomasa llegó a su máximo en el día 11 (10g/L), al igual que los ácidos ganodéricos (12mg/L), concentración que permanece constante hasta el día 25 de cultivo.	(J. Zhang, Zhong, & Geng, 2014b)
<b><i>Ganoderma lucidum</i></b>	Biomasa, triterpenos, exopolisacáridos e intrapolisacáridos	e	Complejo: Glucosa 35g/L y CLO 2%	La biomasa máxima se obtiene en el día 7 (10,27g/L) al igual que los triterpenos (88,15mg/L, exopolisacáridos e intrapolisacáridos (0,317 y 0,406 g/L respectivamente)	(Yang, Min, Bi, Zhou, & Huang, 2013b)
<b><i>Ganoderma applanatum</i></b>	Biomasa endo y exopolisacáridos	y	Simple (25 g/L de glucosa)	La biomasa permanece constante en 6,5g/L desde el día 4 de cultivo, mientras que los exopolisacáridos llegan a su concentración máxima en el día 12 (1,25 g/L) con un decaimiento gradual hasta el día 16. Caso contrario sucede con los endopolisacáridos incrementando su concentración gradualmente llegando a un máximo en el día 24 (5%)	(W. Y. Lee, Park, Ahn, Ka, & Park, 2007)
<b><i>Pleurotus eryngii</i></b>	Biomasa y exopolisacáridos	y	Simples (glucosa 2%v/v)	Para el día 7 de cultivo se obtiene una mayor cantidad de biomasa 9,45 g/L junto con los exopolisacáridos (72 mg/L)	(H. B. Chen et al., 2013)

CLO: aceite de *C lacryma-jobi*

De la tabla anteriormente presentada se recalca que la gran mayoría de investigaciones hacen uso de FC tradicionales (generalmente simples) y las que usan las no tradicionales (complejas) las usan en muy bajas concentraciones. Es importante también resaltar, que las producciones de biomasa son bajas o iguales con lo ya reportado por Chegwin et al 2014. Por otro lado, las investigaciones se han enfocado en los polisacáridos, y los que hacen un estudio de compuestos de carácter triterpenoidal pierden de vista la variación estructural que pueda darse. En consecuencia, es de gran importancia determinar, si para la especie *P. eryngii* cultivada por FEL, se generan o no cambios en la producción de estos

metabolitos en términos de cantidad como de variabilidad estructural a lo largo de la fermentación.

## **2.6 Metodología**

### **2.6.1 Materiales y reactivos**

DCM (J.TBaker), ácido sulfúrico 96% (J.TBaker), anhídrido acético (Carlo Ebra reagents), hidróxido de sodio (Pancrea) y metanol (Merck-Germany), acetato de etilo (Merck-Germany), tolueno (Honeywell), Sulfato de sodio anhidro (Fisher Scientific), Silica Gel 60 (Mecharey-Nagel).

### **2.6.2 Obtención de biomasa a mayor escala**

Con el objetivo de obtener una mayor cantidad de biomasa para poder realizar el procedimiento de purificación de compuestos y/o enriquecimiento de fracciones, se realizó un cultivo a mayor escala utilizando como FC la harina de GB y el periodo de tiempo de fermentación determinado por la cinética de crecimiento, siguiendo la metodología descrita en el numeral 1.7.4.

### **2.6.3 Extracción de los metabolitos secundarios de la biomasa de *P. eryngii***

Las biomásas obtenidas con las diferentes FC fueron sometidas a extracción exhaustiva (reacción negativa de Liebermann-Burchard) asistida por ultrasonido con DCM. El solvente se eliminó por rotaevaporación.

### **2.6.4 Purificación del extracto por cromatografía en columna clásica**

1 gramo del extracto obtenido como esta descrito en el numeral 2.6.3 fue sometido a CCD con el objetivo de determinar la fase móvil óptima para una buena separación de los metabolitos, revelando con el reactivo específico para núcleos esteroidales (cloruro de zinc en metanol al 30%) y empleando como fase móvil con mejor resolución fue tolueno:acetato de etilo (8:2). Posteriormente el extracto fue cromatografiado en columna clásica con empleo de un gradiente de elusión desde solo tolueno, con incremento de polaridad desde

0,5% hasta 100% acetato de etilo. Las fracciones de la columna se reagruparon según su comportamiento cromatográfico en CCD.

### **2.6.5 Elucidación estructural**

Tanto los extractos como las fracciones de columna fueron analizados mediante CG-EM, empleando un cromatógrafo Hewlett Packard serie 6890, acoplado a un espectrómetro de masas Hewlett Packard serie 5973, con una columna ZB-5 aplicando los siguientes parámetros: modo splitless, flujo de 1,1 ml/min, temperatura del inyector 300°C, fuente de ionización 250°C y cuadrupolo 200°C. La rampa de calentamiento inicio en 60°C (1 min), con incrementos de 7,4°C/min hasta alcanzar 310°C donde se mantuvo por 10 min. Todos los espectros de masas fueron comparados con la librería del equipo y sometidos a análisis de su patrón de fragmentación

### **2.6.6 Cuantificación de esteroides por método espectrofotométrico**

La cuantificación se llevó a cabo en un equipo Varian Cary 50 spectrophotometric. Se realizaron dos curvas de calibración, una a bajas y otra a altas concentraciones de estigmasterol con intervalos entre 0,014 mg/ml a 0,31 mg/ml y 0,071 mg/ml a 0,71 mg/ml respectivamente. Se tomaron entre 1 a 3 mg de cada extracto y se realizó la determinación colorimétrica siguiendo la metodología estandarizada (Chegwin-Angarita & Nieto-Ramírez, 2014a). Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

### **2.6.7 Cinética de crecimiento**

La FEL para realizar los estudios de la cinética de crecimiento, se realizó como está descrito en el numeral 1.7.4, tomando por cada día tres matraces. Los productos biotecnológicos se filtraron al vacío y la biomasa obtenida se secó por 48 horas a 40 °C.

### **2.6.8 Saponificación**

La saponificación de los extractos seleccionados se realizó mediante el tratamiento con NaOH 1M en Metanol y posterior reflujo durante 3 horas. Al producto de la reacción se le realizó una extracción de la fracción insaponificable con éter etílico, al cual se le hicieron

lavados con agua destilada hasta neutralidad. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró mediante rotavaporación.

### **2.6.9 Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza ANOVA por el método de Tukey, permitiendo observar si existían o no, diferencias estadísticamente significativas entre las biomásas y la cantidad de esteroides obtenidas del *P. eryngii* haciendo uso de diferentes FC.

## **2.7 Resultados y análisis**

Es bien conocido que el potencial como nutraceutico de la biomasa de los hongos comestibles está determinado no sólo por la cantidad obtenida de la misma, sino por el contenido de bioactivos y/o la variabilidad estructural de ellos. Si bien en el capítulo anterior se establecieron cuales FC no tradicionales proporcionarían la mayor cantidad de biomasa, la determinación de si esa biomasa es apta para la obtención de nutraceuticos, depende de establecer la influencia, si la hubiese, de la FC y del transcurso de la fermentación, en la biosíntesis por parte del hongo de estos compuestos.

### **2.7.1 Incidencia de la FC en la cantidad de esteroides de la biomasa del *P. eryngii***

Del análisis de la Figura 2-9, en la cual aparece la producción de esteroides en las diferentes FC empleadas, salta a primera vista que el comportamiento es diferente al presentado para la biomasa. Es así como, si se considera la eficiencia del proceso con relación a la producción de biomasa en las diferentes FC, se encuentra que en términos generales:

GB>AV>TR>BN>CN>LSY>MB>SG>TI>HSY>HP

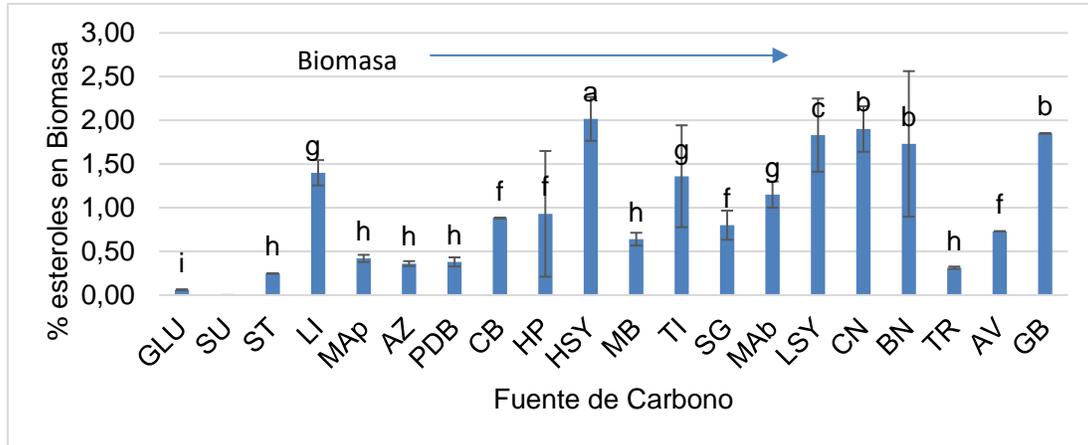
En contraste con lo hallado en la biosíntesis por parte del hongo de los esteroides en donde:

HSY>CN>GB>LSY>BN>LI>TI>MAb>SG>AV>TR

Lo anterior permite ver que la harina de GB, que se seleccionó en el capítulo anterior como una de las que proporciona la mayor eficiencia en el proceso, se encuentra dentro de las

mejores en producción de los bioactivos de interés, lo que le proporciona el valor nutracéutico buscado. Así mismo, AV que corresponde a la segunda opción para su empleo en FEL para producción de micelio, se posiciona dentro de las más bajas en contenido esterólico, lo que lleva a descartarla como FC a emplear cuando se persigue la producción de una buena biomasa nutracéutica.

**Figura 2-9:** Porcentaje de esteroles en la biomasa de *Pleurotus eryngii* obtenida por FEL con el empleo de diferentes FC no tradicionales.

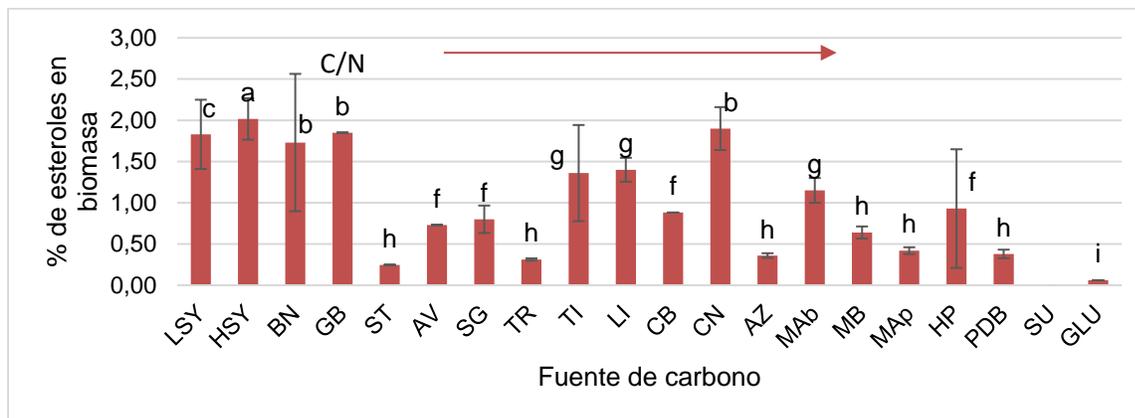


El análisis estadístico se realizó por el método de Tukey. Promedios seguidos de letras iguales no presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ )

Con el resultado anterior (Fig. 2-9) se puede evidenciar que no existe una relación directa entre la producción de biomasa y la de esteroles, ya que un buen crecimiento micelial no siempre garantiza una alta producción de metabolitos, lo que se ha comprobado en estudios realizados en macromicetos por varios autores (C. R. Cheng et al., 2010; Fazenda et al., 2008a; Gao & Gu, 2007a; Zou, 2006), aunado al hecho de que juegan también un importante papel el género y la especie de hongo estudiado (Chegwin-Angarita, 2014).

Al igual que en el caso de la producción de biomasa y en vista del comportamiento tan diferente en cuanto a esteroles se refiere, se hace necesario analizar la posible influencia de los constituyentes y la relación C/N de las FC utilizadas (Fig. 2-10).

**Figura 2-10:** Correlación entre el contenido de esteroides (%) en la biomasa de *Pleurotus eryngii* obtenido por FEL y C/N de las diferentes FC no tradicionales empleadas.



El análisis estadístico se realizó por el método de Tukey. Promedios seguidos de letras iguales no presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ )

Como se puede apreciar en la Figura 2-10, no parece haber una correlación directa entre la producción de esteroides y la relación C/N. Sin embargo, se puede inferir que una relación baja permite estimular la producción de esteroides, dado que de las 5 FC que presentan el mayor contenido de los mismos, solo la Harina de centeno tiene una relación C/N particularmente diferente de las primeras 4, que incluso duplica el valor de la de GB. Este hecho podría explicarse con base en que el nitrógeno es esencial para la biosíntesis de metabolitos secundarios, lo cual es soportado por otras investigaciones (Diamantopoulou et al., 2016; Rizki & Tamai, 2011; Shih, Chou, Chen, Wu, & Hsieh, 2008b; Jin-zhong Wu, Cheung, Wong, & Huang, 2004)

Por otro lado, cuando se comparan los resultados obtenidos en la Figura 2-10 con la composición de las FC usadas (Figura 1-10 A, B y C), se puede observar que aquellas con un contenido de proteína alto, proporcionan la mayor cantidad de esteroides. Tal es el caso de las harinas de GB, BN y SY que presentan % de proteínas de 22,39, 20,50 y 29.70 respectivamente, proporcionando a la biomasa contenidos de esteroides de 1.84. 1.73 y 2.01%. Este resultado permite concluir que sí se presenta una correlación entre el contenido de proteína de la FC y la biosíntesis de esteroides, con la excepción de la harina CN.

Así mismo, se observó que hay un comportamiento dependiente de la especie, teniendo en cuenta que para otras del mismo género, se estableció que es el salvado de trigo, la FC

que favorece la producción de esteroides (Nieto & Carolina Chegwin, 2008; Nieto & Chegwin-Angarita, 2013), resultado que es contrastante con lo obtenido en este estudio.

Finalmente es evidente que ni los carbohidratos ni el porcentaje de lípidos, están presentando una influencia sobre la producción de esteroides. A modo ejemplo, MB, TI y MAb, tienen un contenido de carbohidratos similar (73,4 a 73,9%). No obstante, el porcentaje de esteroides varía significativamente, incluso duplicando los valores, para el caso particular de MB y TI entre 0,64 y 1,36% respectivamente. Por otro lado, el uso de SG, CN, AZ, HP y CB con contenidos de lípidos similares (0,7 a 1,0%), estimulan la producción de esteroides en un rango amplio desde 0,8 hasta 1,9%.

### 2.7.2 Efecto de la FC sobre la composición de la fracción grasa de la biomasa del *P. eryngii*

Como se había indicado con anterioridad, esta fracción está constituida por ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos y compuestos triterpenoidales en general y esteroides en particular. Para estudiar el efecto que el empleo de las diferentes FC, pudiese presentar sobre la variabilidad estructural de los metabolitos, se realizó la determinación estructural de los componentes de los extractos por CG-EM (ver anexo A). En la tabla 2-5 se encuentran consignados los resultados.

**Tabla 2-5:** Composición de la fracción grasa del *P. eryngii* cultivado en las diferentes FC.

FC	METABOLITOS*											
	ÁCIDOS GRASOS Y SUS ESTERES								TRITERPENOIDES			
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
<b>Avena</b>	-	13,55	<1	-	-	-	-	25,4	3,21	-	-	-
<b>Garbanzo</b>	<1	15,14	<1	<1	1,38	-	34,78	39,57	9,15	<1	<1	<1
<b>Harina de trigo</b>	-	13,33	1,79	-	-	-	24,28	29,89	3,5	-	-	-
<b>Bienestarina</b>	22,05	20,52	-	-	10,15	6,35	4,95	28,04	7,88	-	-	-
<b>Maíz blanco</b>	-	37,52	<1	-	-	-	-	30,55	8,74	-	-	-
<b>Harina de soya</b>	-	28,23	-	-	-	-	-	51,03	18,46	-	-	-
<b>Arroz</b>	14,55	8,89	-	-	17,38	2,1	-	10,32	2,4	-	-	-
<b>Leche de soya</b>	10,8	22,44	-	-	4,82	3,53	-	40,88	12,43	-	-	-
<b>Linaza</b>	17,27	9,47	-	-	7,40	6,8	-	46,56	8,98	-	-	-
<b>Harina de trigo integral</b>	1,72	9,15	-	-	2,14	-	3,25	17,34	2,33	33,28	-	-
<b>PDB</b>	10,75	13,39	<1	-	23,48	<1	-	17,82	5,18	-	-	-
<b>Siete granos</b>	38,39	10,41	-	2,64	25,62	11,72	-	11,2	<1	-	-	-

<b>Maíz amarillo burdo</b>	4,08	12,57	-	-	4,23	-	-	18,27	3,34	-	-	-
<b>Glucosa</b>	-	36,35	-	-	-	-	-	21,91	5,85	-	-	-
<b>Sagú</b>	11,17	12,42	-	-	35,95	<1	-	20,45	4,89	-	-	-
<b>Harina plátano</b>	13,98	11,44	-	6,5	44,15	14,14	-	-	<1	-	-	-
<b>Centeno</b>	11,17	18,79	-	-	7,35	-	2,59	2,37	16,71	-	-	-

I: Palmitato de metilo, II: Ácido palmítico, III: Palmitato de etilo, IV: Linoleato de metilo, V: Oleato de metilo, VI: Estearato de metilo, VII: Ácido linoleico, VIII: Ácido Oleico, IX: Ácido esteárico, X: Ergost-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol, XI: Estigmast-5-en-3 $\beta$ -ol, XII: Estigmast-5-en-3-ona.

\* La concentración de los diferentes metabolitos está dado en % de áreas relativas

Como se observa en esta Tabla 2-5, existe un cambio en la composición de la biomasa como consecuencia de la FC utilizada para su crecimiento, resultado concordante con lo reportado por Chegwin et al 2014. La harina de GB es la que presenta el mayor número de estructuras triterpenoidales, aunque en mu baja proporción, lo que reafirma que es esta la FC óptima para la producción de un buen nutraceutico de *P. eryngii*. Una visión más general la da, la observación de los TICs (Anexo A).

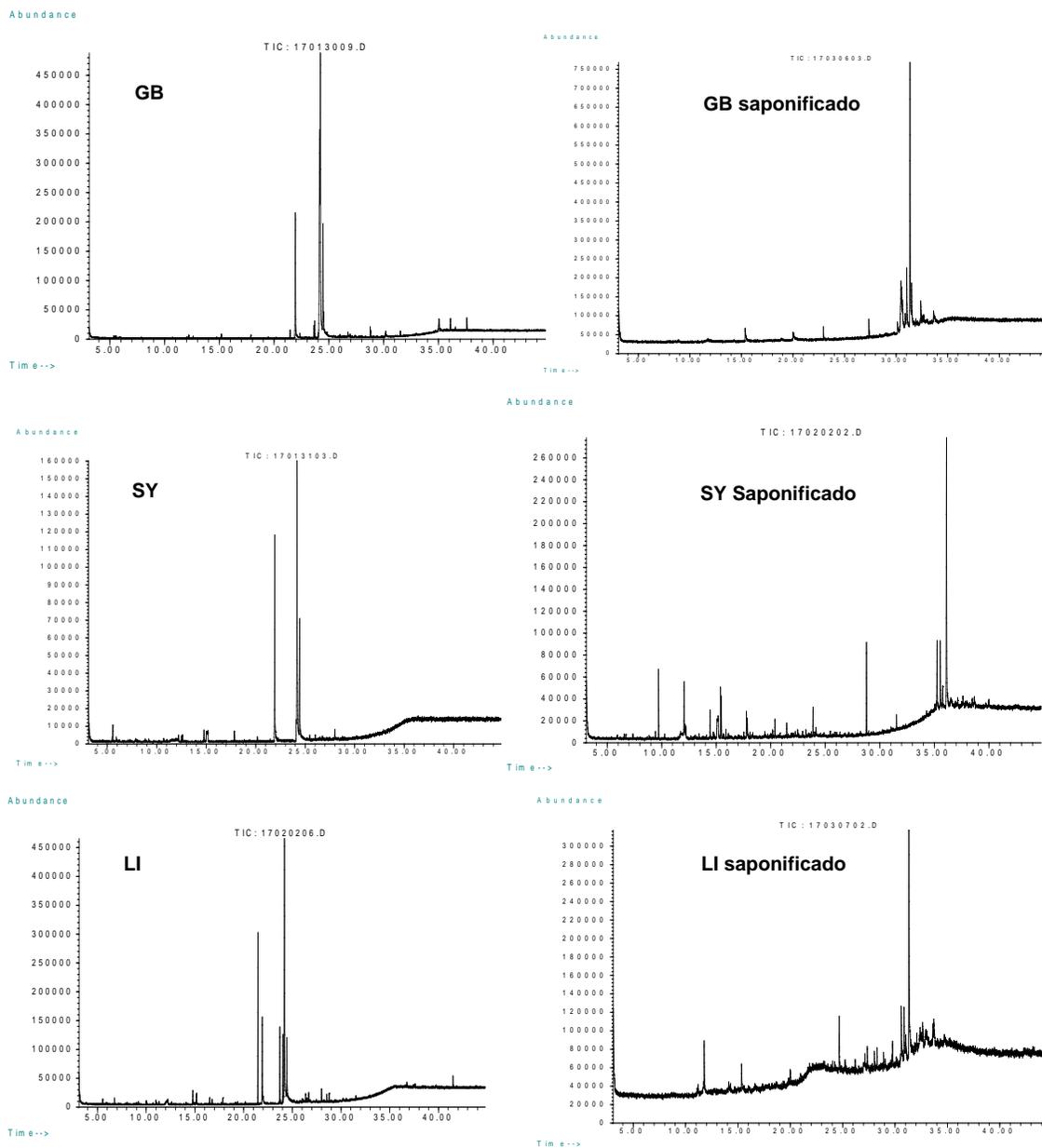
Por otra parte, los ácidos grasos, así como sus esterios, han sido catalogados como constituyentes bioactivos de diferentes productos naturales, con base en la amplia variedad de actividades biológicas que ellos exhiben (Desbois & Smith, 2010; Hamza et al., 2016). En esta investigación, se determinó que el ácido palmítico y el ácido esteárico son los constituyentes comunes, indistintamente de si la FC es tradicional o no, observándose variaciones en la cantidad de los mismos (Anexo A). Estos ácidos grasos ya han sido identificados en otras especies de hongos del género *Pleurotus* haciendo uso de FEL (Nieto & Chegwin-Angarita, 2013), pero este es el primer reporte de la identificación de los mismos en micelio de *Pleurotus eryngii*. Jing et. al en el 2012 mencionan la presencia de este grupo de metabolitos en cuerpos fructíferos del *P. eryngii*, mayoritariamente de ácido linoleico, seguido del palmítico, el ácido oleico y en muy baja cantidad del ácido esteárico (Jing, Shi, Li, Sun, & You, 2012). Estos resultados son contrastantes con los del presente estudio, ya que el ácido linoleico no es un componente constante en los extractos y adicional a esto, no es el mayoritario en ningún caso. Estos resultados son concordantes con la hipótesis planteada por Yang et al 2012, quienes mencionan que la variación en la producción de los metabolitos entre los fructificaciones y el micelio, podría ser debida tanto a los diferentes estadios de maduración del organismo como a las similitud de las condiciones de crecimiento entre un cultivo tradicional y las nativas (Tang, Li, & Tang, 2012).

---

Adicionalmente la Tabla 2-5 permite ver que, con excepción de la harina de GB y TI, se presenta ausencia de compuestos triterpenoidales. Al examinar los cromatogramas (anexo A) y la tabla 2-5, se puede observar que el contenido de ácidos grasos y de sus ésteres es muy alto. En estudios previos dentro del grupo de investigación ya se había detectado esta particularidad y se determinó que la alta concentración de estos metabolitos impide la visualización en los cromatogramas de los compuestos triterpenoidales (Cucaita Velandia, 2007). Lo anterior hace imprescindible la saponificación de los extractos. Es así como se tomaron de manera aleatoria los extractos provenientes de las biomásas obtenidas mediante el empleo de las harinas de GB, LI, y SY, como FC y se saponificaron.

En las Figuras 2-11 se encuentran los cromatogramas de los extractos sin y con saponificación, de donde se puede concluir que efectivamente el proceso facilita el análisis de la composición triterpenoidal de los mismos.

**Figura 2-11:** Cromatogramas de los extractos sin y con saponificación de la harina de garbanzo, soja y linaza



En este punto de la investigación, se debe dar inicio a determinar el tiempo más favorable en el que el producto biotecnológico adquiere el contenido de bioactivos ideal para un buen nutracéutico.

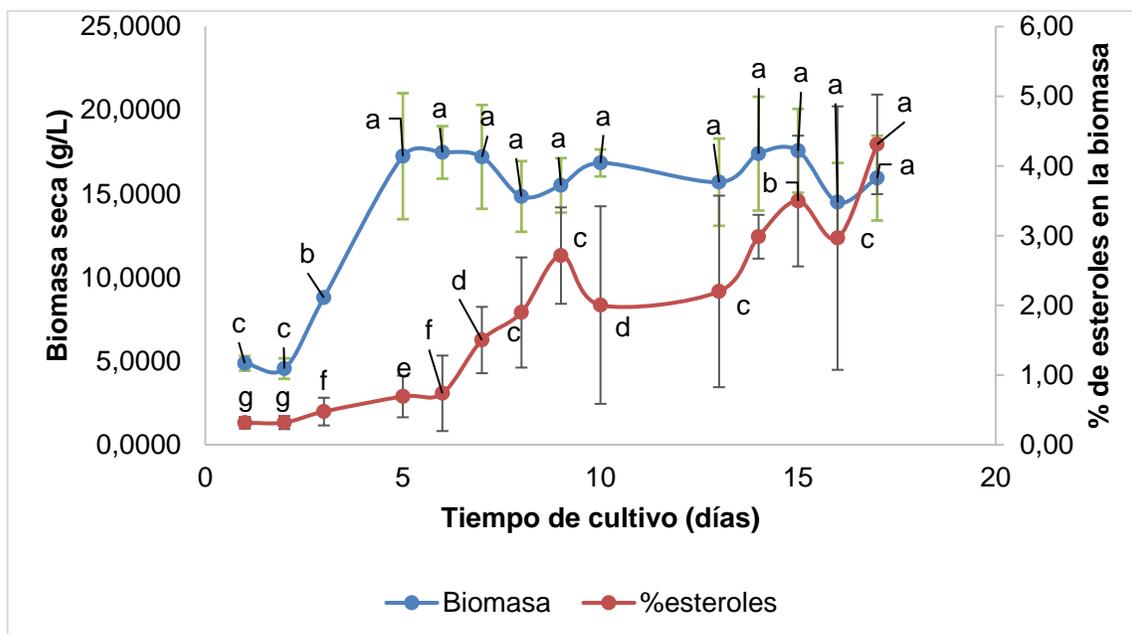
### **2.7.3 Influencia del tiempo de fermentación en el carácter nutracéutico de la biomasa del *P. eryngii*.**

En la Figura 2-12 se encuentran tanto la producción de biomasa como de esteroides con el transcurso de la fermentación, parámetros que determinan el carácter nutracéutico de la biomasa.

Referente a la producción de biomasa, el análisis estadístico permitió determinar que no hay diferencias significativas a tiempos bajos de fermentación (día 5 y día 10), lo que permite definir que cualquiera de estos días puede ser usado como tiempo de fermentación para la producción de una mayor cantidad de biomasa. En vista de obtener un proceso biotecnológico que permita ahorro de tiempo y de costos, se puede llevar la fermentación hasta un día intermedio en el rango anterior.

Del mismo modo, la producción de esteroides, determinada por el método espectrofotométrico, mostró un comportamiento similar al de la producción de la biomasa, con un lapso de tiempo entre los días 9 y 15 en lo que no hay diferencias estadísticamente significativas en el contenido de los metabolitos reportado en otros géneros del mismo orden (agaricales). Esto puede deberse a que el estado de estrés del hongo se incrementa considerablemente haciendo que su mecanismo biosintético se exprese en mayor medida a tiempos altos de fermentación, donde el sustrato ya no se encuentra en el medio para alimentar al hongo. Estas condiciones de cultivo adversas hacen que el metabolismo, particularmente de los esteroides y triterpenos se vean incrementadas como lo se ha reportado (Dewick, 2002; Zheng, Xu, Ma, Zhan, & Chen, 2014).

**Figura 2-12:** Producción de biomasa y esteroides del *P. eryngii* a lo largo de una fermentación en estado líquido.



Los datos obtenidos para la biomasa, fueron sometido a un análisis estadístico por el método de Tukey, letras iguales significa que no presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Para el caso los porcentajes de esteroides en la biomasa, al no ser normales ni homogéneos, se hizo uso de un análisis estadístico de varianzas no paramétrico Kruskal Wallis, promedios con letras seguidas iguales, no presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Comparando la producción de esteroides y de biomasa a lo largo de la FEL podemos observar que el día 9 es el más favorable desde el punto de vista de contenido esteróico, dado que su concentración es mayor a el día 8 y 7 y aunque se observa un incremento en días posteriores, son tiempos de fermentación altos lo que se reflejaría en mayor tiempo y gasto energético y por ende mayores costos.

En lo que se refiere a la variabilidad estructural, como se observa en el anexo B y en la tabla 2-6, es claro que esta no se presenta, pero si hay un cambio en la concentración de los compuestos triterpenoidales del extracto. Así mismo, se evidencia que es hasta el día 7 en el que el hongo inicia la biosíntesis de triterpenoides. Dado que, como se observa en la Figura 2-12 hay un decrecimiento de la concentración de esteroides a partir del día 9 de cultivo y como no se observa diferencias estadísticamente significativas en la biomasa del día 5 al día 10 se decidió estudiar la variabilidad estructural hasta el día 9.

**Tabla 2-6:** Metabolitos secundarios determinados a lo largo de la fermentación.

COMPUESTO	DÍA DE FERMENTACIÓN*								
	1	2	3	5	6	7	8	9	
<i>Palmitato de metilo</i>	-	-	12,04	45,45	54,33	1,62	2,88	3,97	
<i>Oleato de metilo</i>	-	-	43,30	19,86	16,98	1,00	1,94	2,48	
<i>Estearato de metilo</i>	-	-	-	16,30	20,93	-	-	-	
<i>Linoleato de metilo</i>	-	-	10,93	-	-	-	-	-	
<i>Ácido estearico</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Estigmast-5-en-3<math>\beta</math>-ol</i>	-	-	-	-	-	7,04	4,49	7,08	
<i>B-amirina</i>	-	-	-	-	-	3,10	1,16	5,03	
<i>Estigmast-4-en-3-ona</i>	-	-	-	-	-	7,74	8,17	9,97	
<i>Ergosta-5,22-dien-3<math>\beta</math>-ol</i>	-	-	-	-	-	1,37	1,52	1,57	
<i>Ergosta-5-en-3<math>\beta</math>-ol</i>	-	-	-	-	-	2,56	1,81	3,40	
<i>Ergosterol</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	

\*La concentración de los diferentes metabolitos, para cada día de fermentación, está dada en % de áreas relativas.

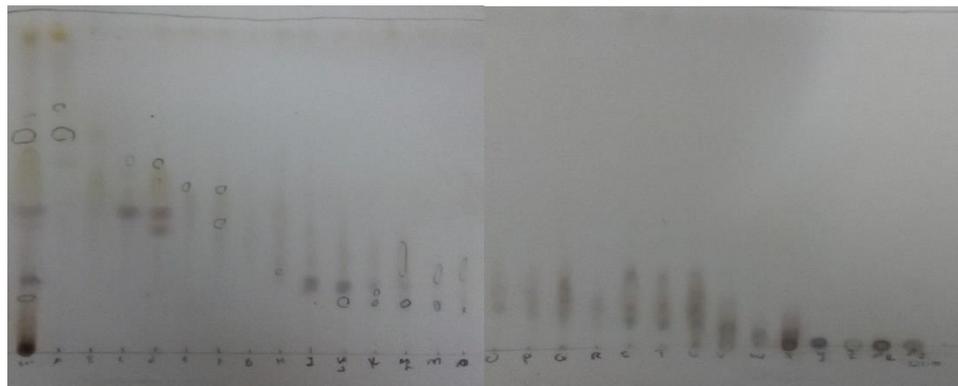
Este cambio en la cantidad está estrechamente relacionada con el grado de estrés a que está sometido el hongo (Jennings, 1995; P. G. Miles. & Chang., 2004; Moore & Frazer, 2002).

A partir de los resultados obtenidos en este capítulo es la harina de garbanzo la que proporciona una biomasa con el mayor contenido de esteroides, confiriéndole al hongo la mejor composición para un buen nutraceutico.

#### **2.7.4 Determinación estructural de los metabolitos triterpenoidales del *P. eryngii* presentes en el extracto saponificado y en las fracciones obtenidas por CCC.**

De la CCC realizada se obtuvieron cerca de 225 fracciones las cuales, de acuerdo a su comportamiento en CCD, fueron reunidas en sub-fracciones de la Fc1 a la Fc12 (Figura 2-13)

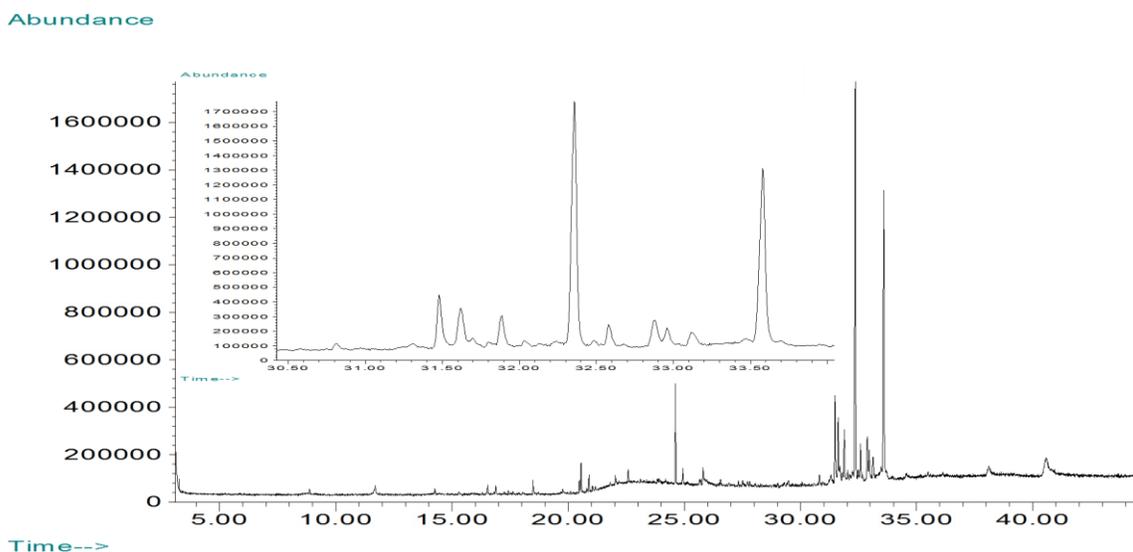
**Figura 2-13:** CCD del seguimiento en columna de las diferentes fracciones obtenidas



El revelador utilizado fue cloruro de zinc en metanol 30%

La Fracción Fc2 fue la única que mostró un perfil cromatográfico que permitía un análisis de su composición dado que tanto la Fc1 y la Fc3 hasta la Fc12 al visualizarse con un revelador universal (UV a 365 y 254 nm) se observaba una concentración considerable de impurezas. Esto se puede deber a que en el caso de la Fc1 y la Fc3, a que la cantidad de los compuestos obtenida de los compuestos de interés fue muy baja impidiendo su análisis. En el resto de las fracciones se observa que poseen un Rf bajo, lo que da a suponer que presentan una polaridad alta respecto a las otras fracciones y por ende su volatilidad es baja, imposibilitando su análisis por CG. Estos compuestos que presentan núcleos esteroidales y son de alta polaridad probablemente estén relacionados con los triterpenos pentacíclicos ácidos o los tetracíclicos polihidroxiados que se determinaron en el *P. eryngii* (Kikuchi et al., 2016; Xue, Li, et al., 2015). Por ello, la fracción que se analizó por CG-EM fue la Fc2. El cromatograma mostró 8 compuestos con tr entre 31 y 34 min de tiempo de retención, el TIC y ampliación muestran en la Figura 2-14.

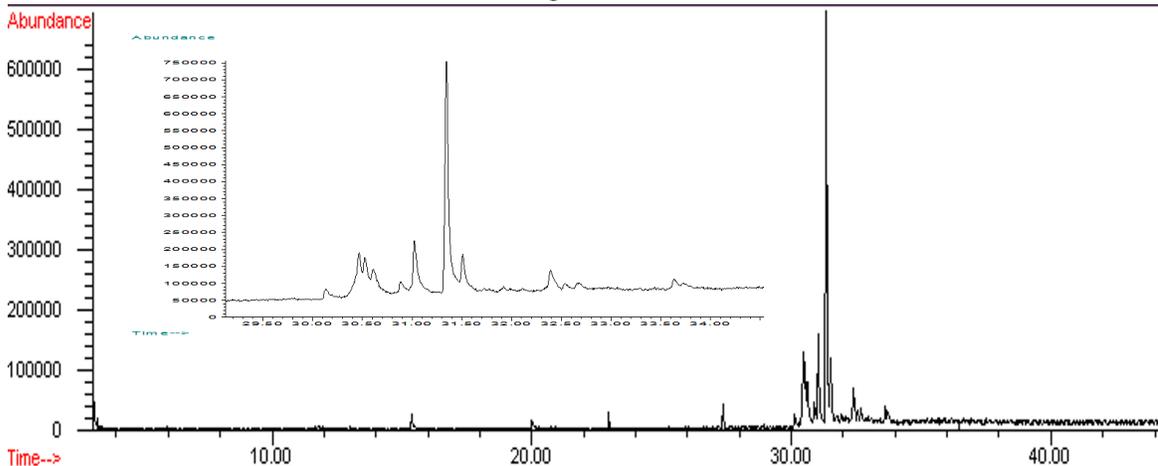
**Figura 2-14:** TIC de la fracción Fc2 del extracto de *P. eryngii* cultivado por FEL con el empleo de harina de garbanzo como FC



El TIC anterior comparte con el saponificado, dos picos con tiempos de retención de 31,49 y 32,35 los cuales corresponden a los compuestos 6 y 7, analizados posteriormente. Los otros picos corresponden a compuestos con un EM que no presentan los picos diagnósticos de triterpenoides y por ende no se estudiarán en este trabajo.

El cromatograma del extracto saponificado (fig 2-15) muestra la presencia de un total de 7 picos en la zona correspondiente a tiempos de retención entre 30 y 34 minutos.

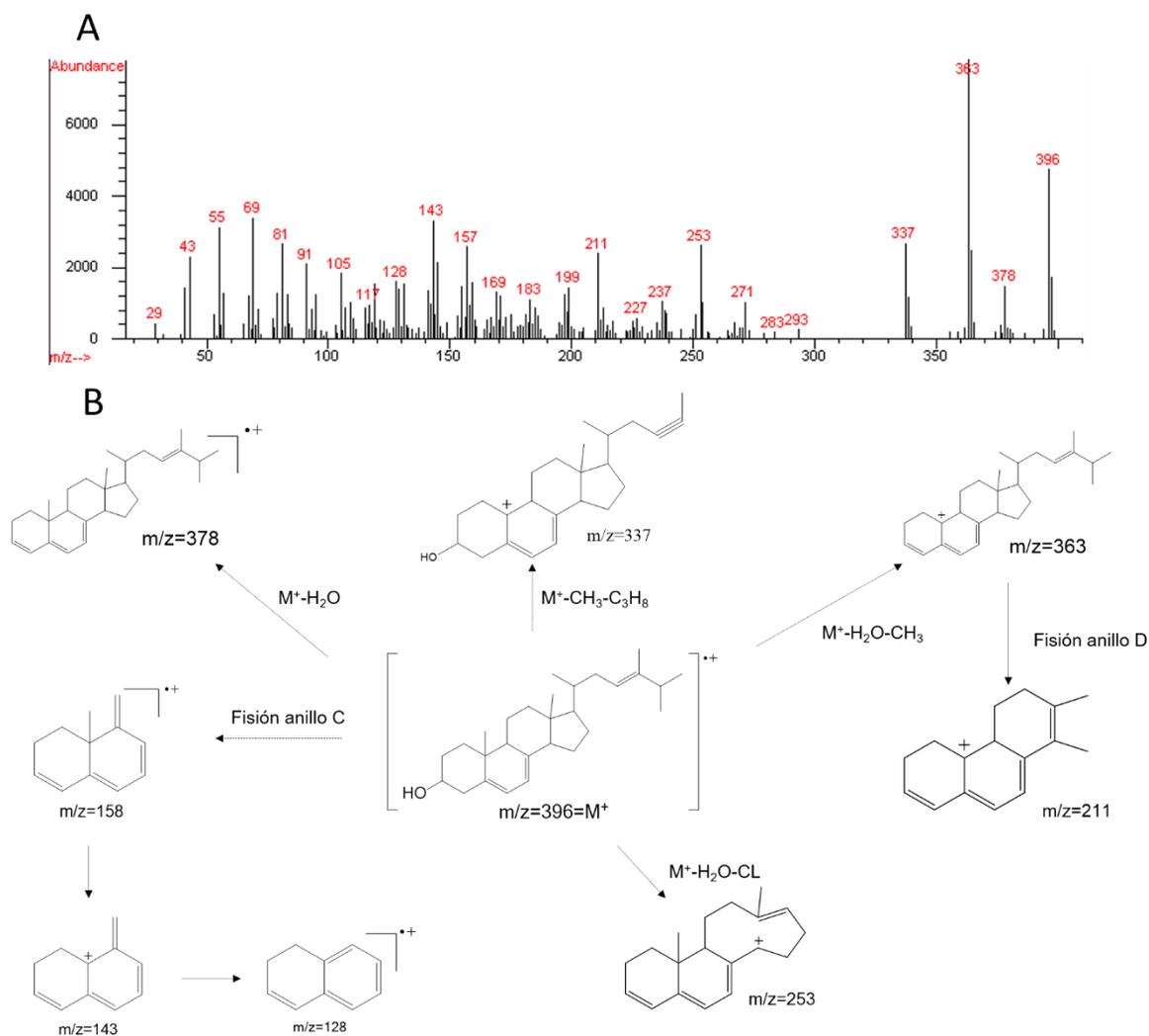
**Figura 2-15:** TIC del extracto saponificado del *P. eryngii* cultivado por FEL con el empleo de harina de garbanzo como FC.



▪ Compuesto 1 (tr: 30,47)

El espectro de masas del compuesto 1 (fig-2-16A) presenta un pico de ion molecular  $M^+=396$ . Como se puede ver en el patrón de fragmentación propuesto (fig 2-16B), se observa los picos de  $[M^+-CH_3-H_2O]$ ,  $[M^+-CL]$  y la fisión del anillo D y C para núcleos que presentan un  $\Delta^{5,7}$  con insaturación en el C-22 de la CL. Así se puede llegar a concluir que el compuesto a tr 39,47 es el ergosta-5,7,22-trien -3 $\beta$ -ol o ergosterol. Ya ha sido reportado por algunos autores, dado que es el triterpeno más abundante de la membrana celular de los hongos (Chegwin-Angarita & Nieto-Ramírez, 2014b; Zou, 2006)

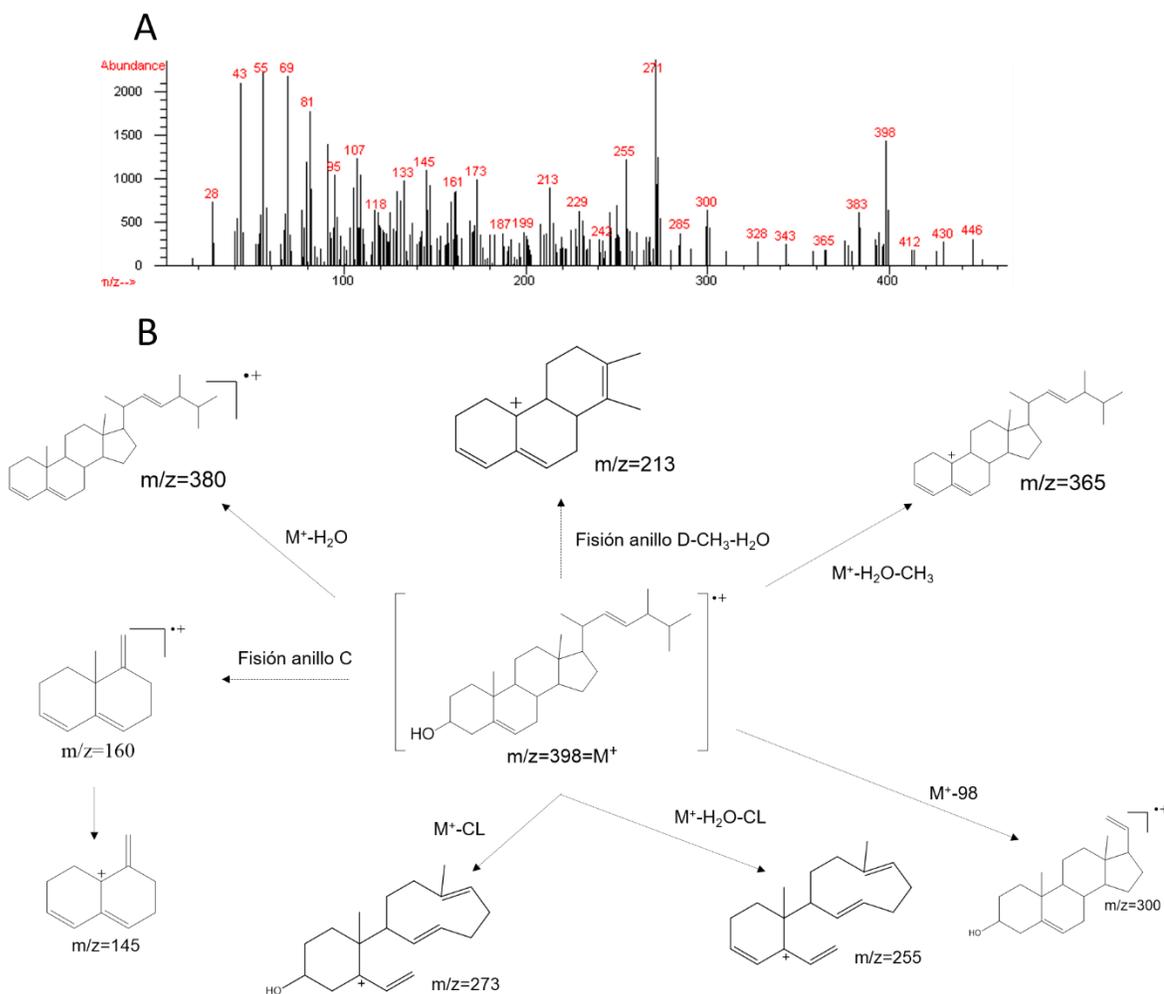
**Figura 2-16:** A) Espectro de masas del compuesto 1, B) patrón de fragmentación propuesto.



▪ Compuesto 2 (tr: 30,53)

El espectro de masas del compuesto 2 (fig 2-17A) presenta un pico de ion molecular  $M^+=398$  m/z. Como se observa en su patrón de fragmentación (fig 2-17B) exhibe los fragmentos diagnósticos de  $[M^+-CH_3-H_2O]$ ,  $[M^+-CL]$  y fisiones del anillo D y C, característico de núcleos  $\Delta^5$ , con insaturación en el C-22 de la cadena lateral. Dado lo anterior se infiere que el compuesto 2 es el ergosta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol. Este compuesto ya ha sido identificados en otros hongos del género *Pleurotus* (Chegwin-Angarita & Nieto-Ramírez, 2014b)

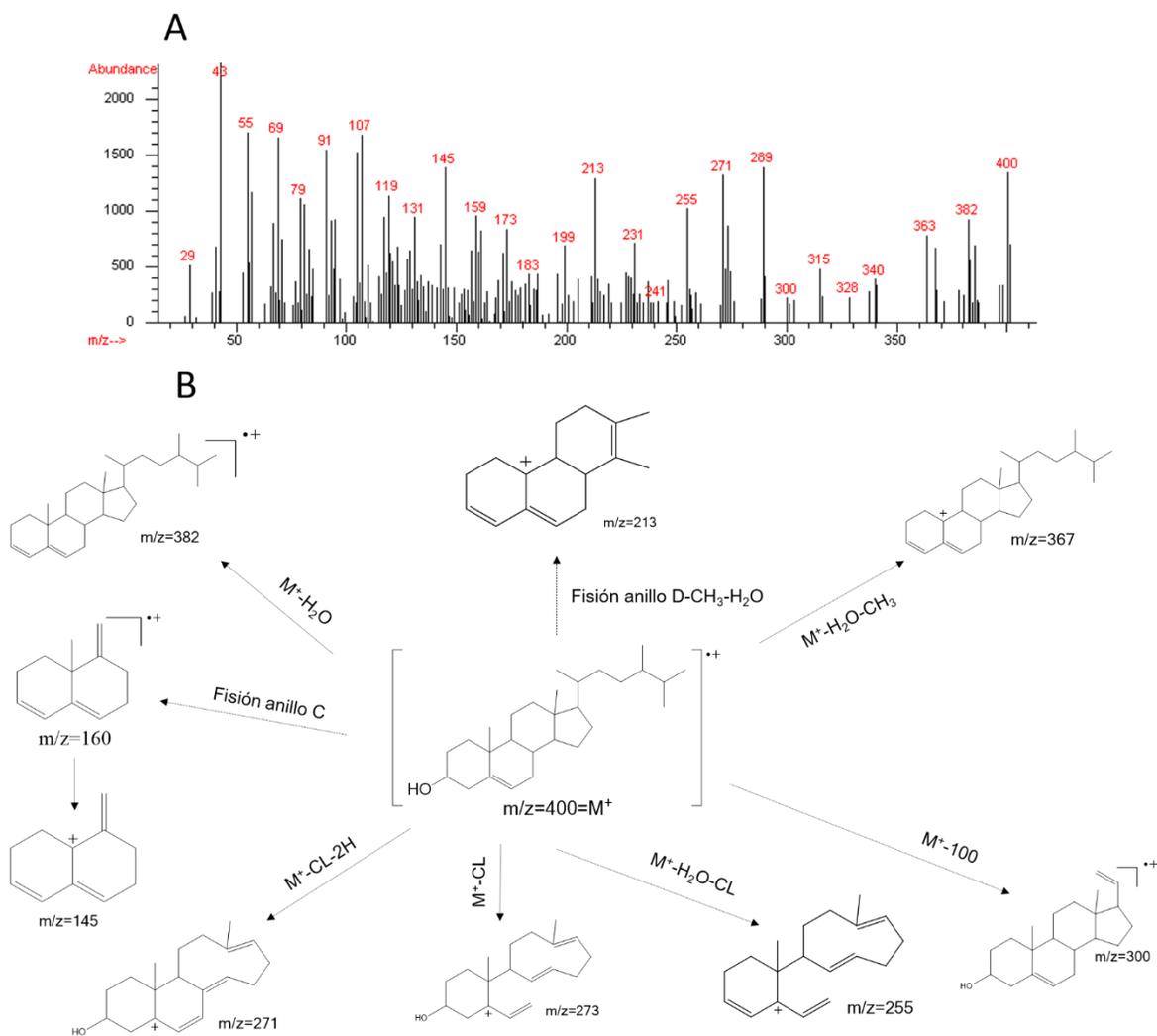
**Figura 2-17:** A) Espectro de masas del compuesto 2 y B) patrón su fragmentación propuesto.



▪ Compuesto 3 (tr: 30,61)

El compuesto 3 mostró un espectro de masas que tiene como pico de ion molecular  $M^+=400$  m/z (Fig 2-18A). Por su patrón de fragmentación (fig 2-18B), al igual que los compuestos anteriores tiene los picos de  $[M^+-H_2O-CH_3]$ , junto con la fisión del anillo D y C típicos para núcleos con  $\Delta^5$ . También se puede observar en  $[M^+-CL]$  en 273 m/z. Así se puede inferir que el compuesto 3 es el ergosta-5-en-3 $\beta$ -ol, el cual ha sido identificado en basidiomicetos y particularmente en otras especies de *Pleurotus* y (Chegwin-Angarita & Nieto-Ramírez, 2014b; Nieto & Carolina Chegwin, 2008).

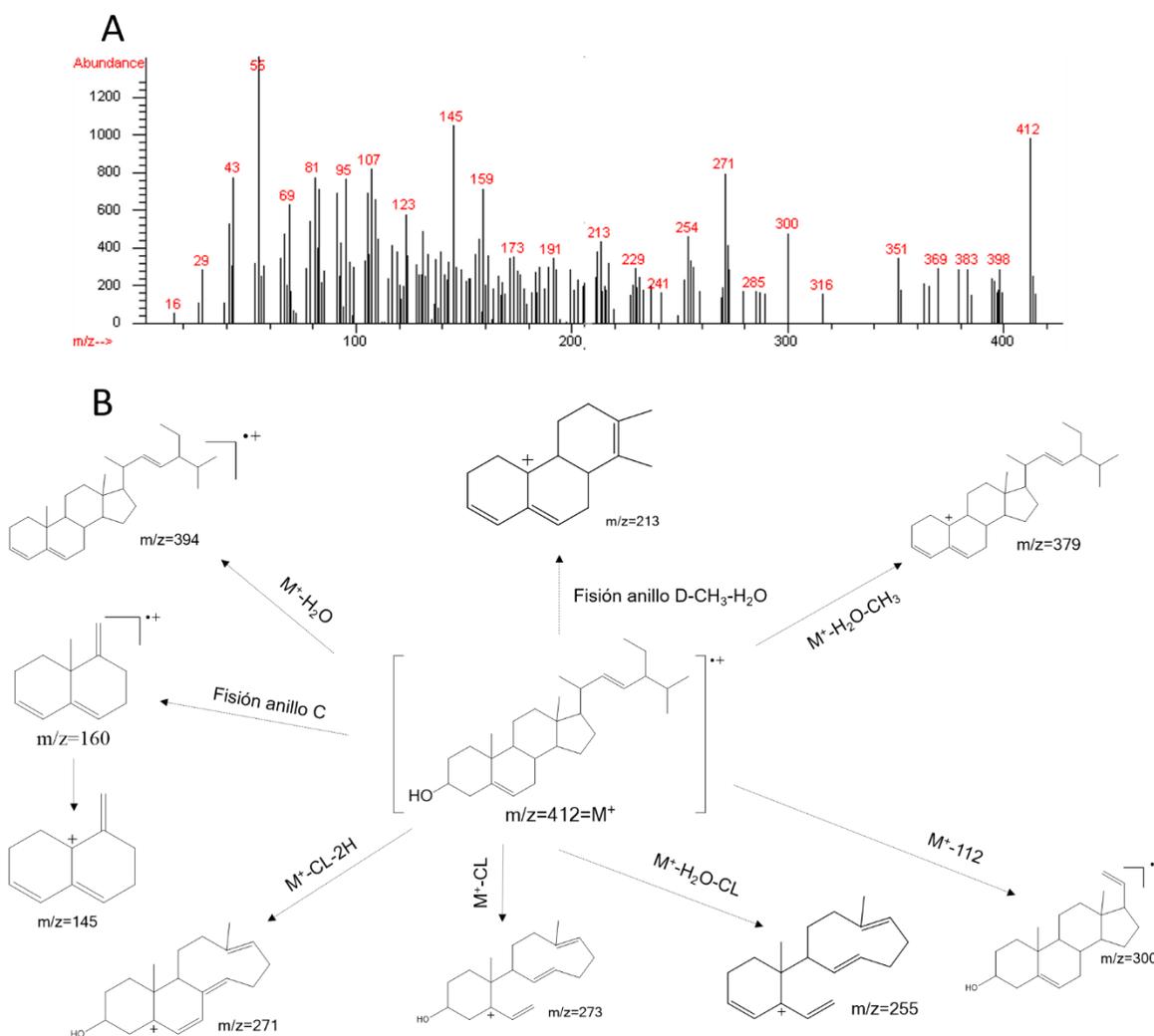
**Figura 2-18:** A) Espectro de masas del compuesto 3 y B) patrón su fragmentación propuesto.



▪ Compuesto 4 (tr: 31,04)

El compuesto 4 tiene un espectro de masas (fig 2-19A) con un pico de ion molecular en 412 m/z. Como se aprecia en el patrón de fragmentación (fig-2-19B) el pico  $[M^+-CH_3-H_2O]$  infiere OH en el C-3. Al igual que los otros compuestos, se observa las fisiones del anillo D y C típicos de un núcleo  $\Delta^5$ . El pico  $[M^+-CL]$  en 300 m/z es de un núcleo estigmasta con insaturación en el C-22. Así se puede colegir que el compuesto 4 es el estigmast-5,22-dien-3 $\beta$ -ol. Este metabolito también ha sido aislado e identificado en otros hongos del género *Pleurotus* (Chegwin-Angarita & Nieto-Ramírez, 2014b).

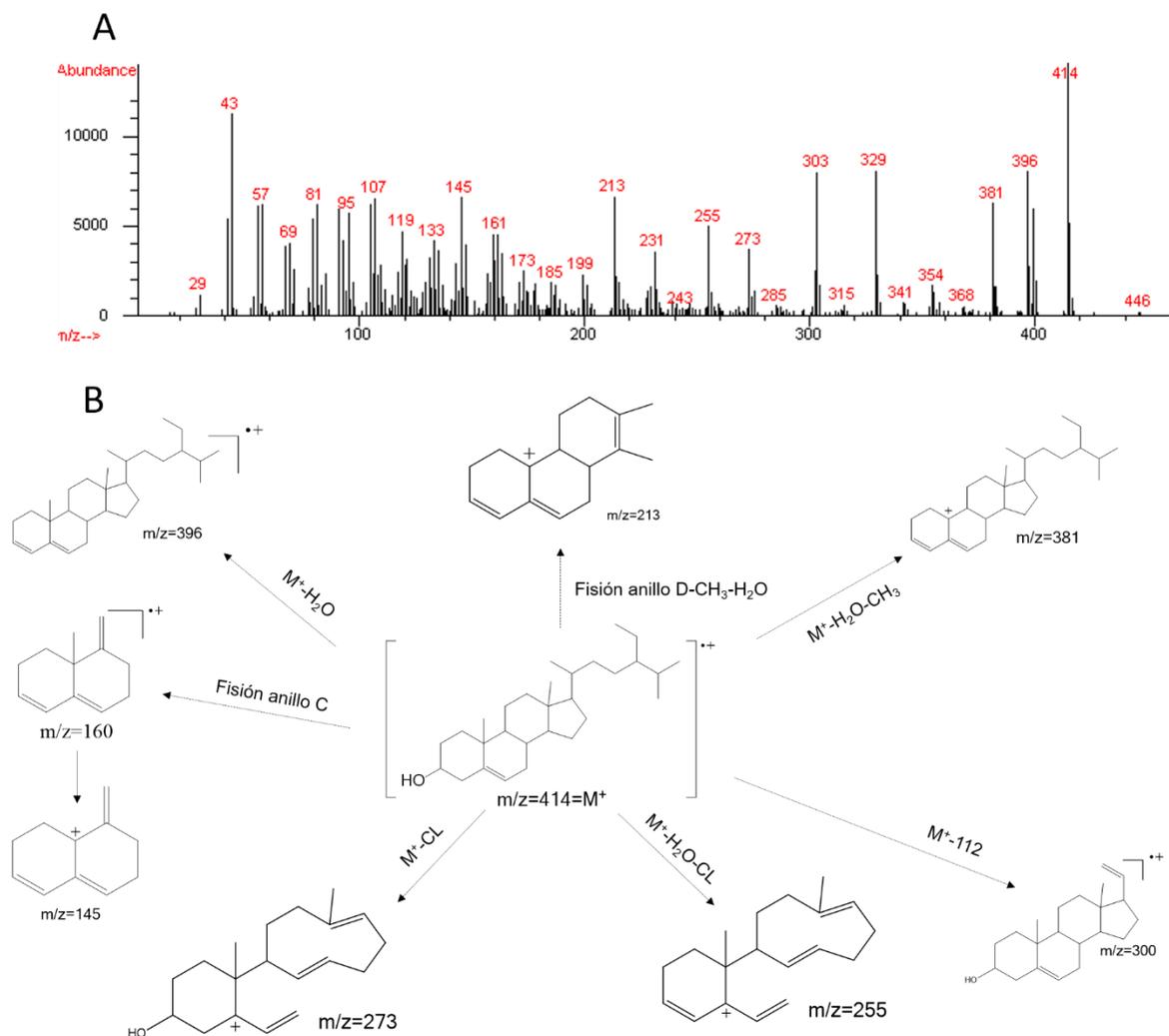
**Figura 2-19:** A) Espectro de masas del compuesto 4 y B) patrón su fragmentación propuesto.



▪ Compuesto 5 (tr: 31,35)

El Compuesto 5 tiene un espectro de masas (fig-2-20A) con un pico de ion molecular en 414 m/z. Como se puede ver en su patrón de fragmentación (fig 2-20B) se presenta el  $[M^+ - H_2O - CH_3]$  que las fisiones del anillo C y D típicas de núcleos  $\Delta^5$ . Adicionalmente el pico en 303 m/z es diagnóstico de cadena lateral perteneciente a un núcleo estigmasta llevando a elucidar el compuesto como un estigmast-5-en-3 $\beta$ -ol. Este metabolito ya ha sido determinado en otras especies de *Pleurotus* y basidiomicetos (Chegwin-Angarita & Nieto-Ramírez, 2014a; Nieto & Carolina Chegwin, 2008)

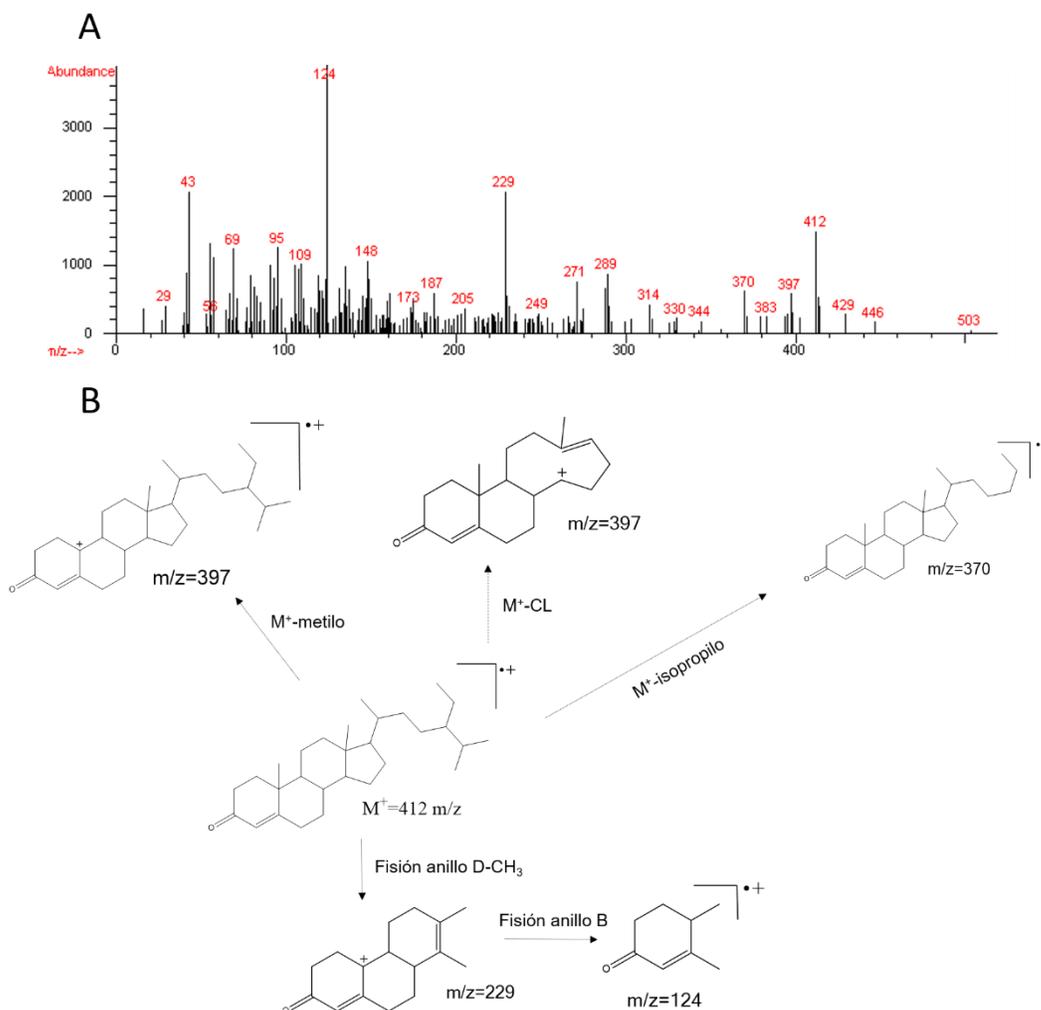
**Figura 2-20:** A) Espectro de masas del compuesto 5 y B) patrón su fragmentación propuesto.



▪ Compuesto 6 (tr: 32,39)

El compuesto 6, presente también en la Fc2, tiene un espectro de masas (fig 2-21A) con pico de ion molecular 412 m/z. Como se puede ver en su patrón de fragmentación (fig 2-21B) se tiene un  $[M^+-CH_3]$  con ausencia de  $[M^+-H_2O]$ , por lo que puede suponerse que no tiene un grupo OH en el C-3. Se observa la pérdida de 28 unidades típica de un enlace C=O por lo que se puede suponer que se trata de un cetosteroide. El  $[M^+-CL]$  puede inferir una cadena del núcleo estigmasta y es el pico en 124 m/z que confirma la fisión del anillo B de un núcleo estigmasta  $\Delta^4$ . Por lo anterior se podría inferir que el compuesto es el Estigmast-4-en-3-ona, ya identificado en otras especies de *Pleurotus* (Chegwin-Angarita & Nieto-Ramírez, 2014a)

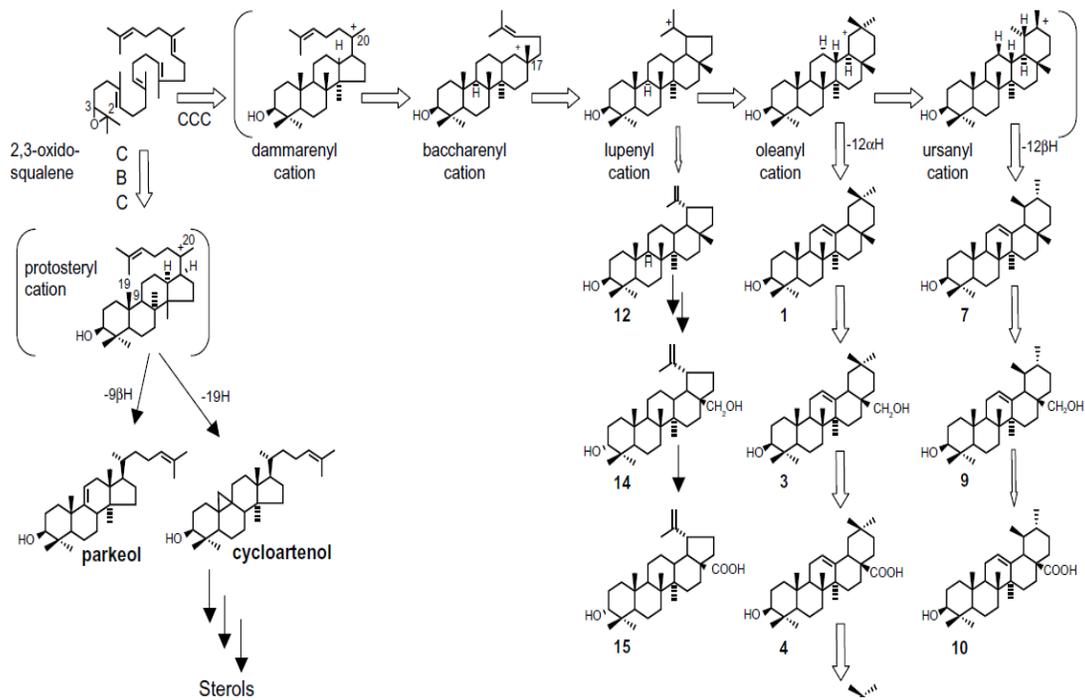
**Figura 2-21:** A) Espectro de masas del compuesto 6 y B) patrón su fragmentación propuesto.



- Compuesto 7 (tr: 31,51)

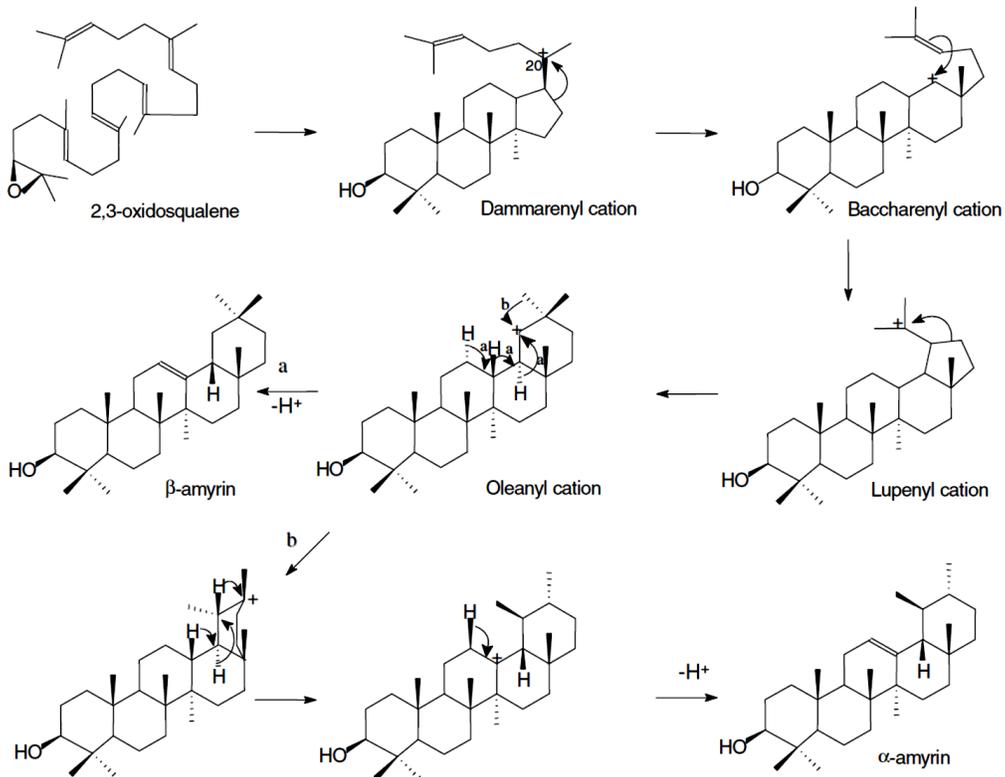
El compuesto 7, identificado también en la Fc2, tiene un espectro de masas (fig 2-24A) con pico de ion molecular en 426 m/z de muy baja intensidad. No es un espectro típico de triterpenos tetracíclicos sino que es muy parecido a lo publicado para los triterpenos pentacíclicos, con picos en 218 y 203 m/z como lo muestra el patrón de fragmentación propuesto (Fig 2-24B) (Seki et al., 2011; Vázquez et al., 2011; Zheng et al., 2014). Los compuestos triterpenoidales pentacíclicos constituyen la clase más numerosa de productos OSC (provenientes de las reacciones de oxidación del Escualeno) con una amplia distribución en reino plantae, pero su presencia en hongos en general y en basidiomicetos en particular no es común. Sin embargo, investigadores ya han reportado la presencia de estos metabolitos, específicamente de la  $\alpha$ -amirina, en 16 especies de hongos micorríclicos arbusculares (AMF), concretamente en el orden Glomales (Grandmougin-Ferjani, Dalpé, Hartmann, Laruelle, & Sancholle, 1999) organismos que probablemente evolucionaron como un grupo ancestral antes de los Ascomicetes y Basidomicetos (Volkman, 2005). Desde el punto de vista de la biosíntesis de triterpenoides en hongos, es bien conocido que a partir del acetil CoA dichos organismos biosintetizan el óxido de escualeno, el que da origen al catión protosterilo. Sin embargo, dentro de esta ruta biosintética se puede producir también el catión damarenilo (fig 2-22). Si el hongo posee las enzimas requeridas, a partir del primer catión puede producir, pasando por el cicloartenol, los compuestos triterpenoidales tetracíclicos como son los esteroides. En caso de que la acción enzimática se dirija por el catión damarenilo el hongo puede sintetizar los triterpenos pentacíclicos con esqueletos base de oleano o ursano (fig 2-23) (Jo, Han, Hwang, & Choi, 2016; Vázquez et al., 2011; Volkman, 2005; Zheng et al., 2014).

**Figura 2-22:** Ruta biosintética de triterpenos pentacíclicos (.



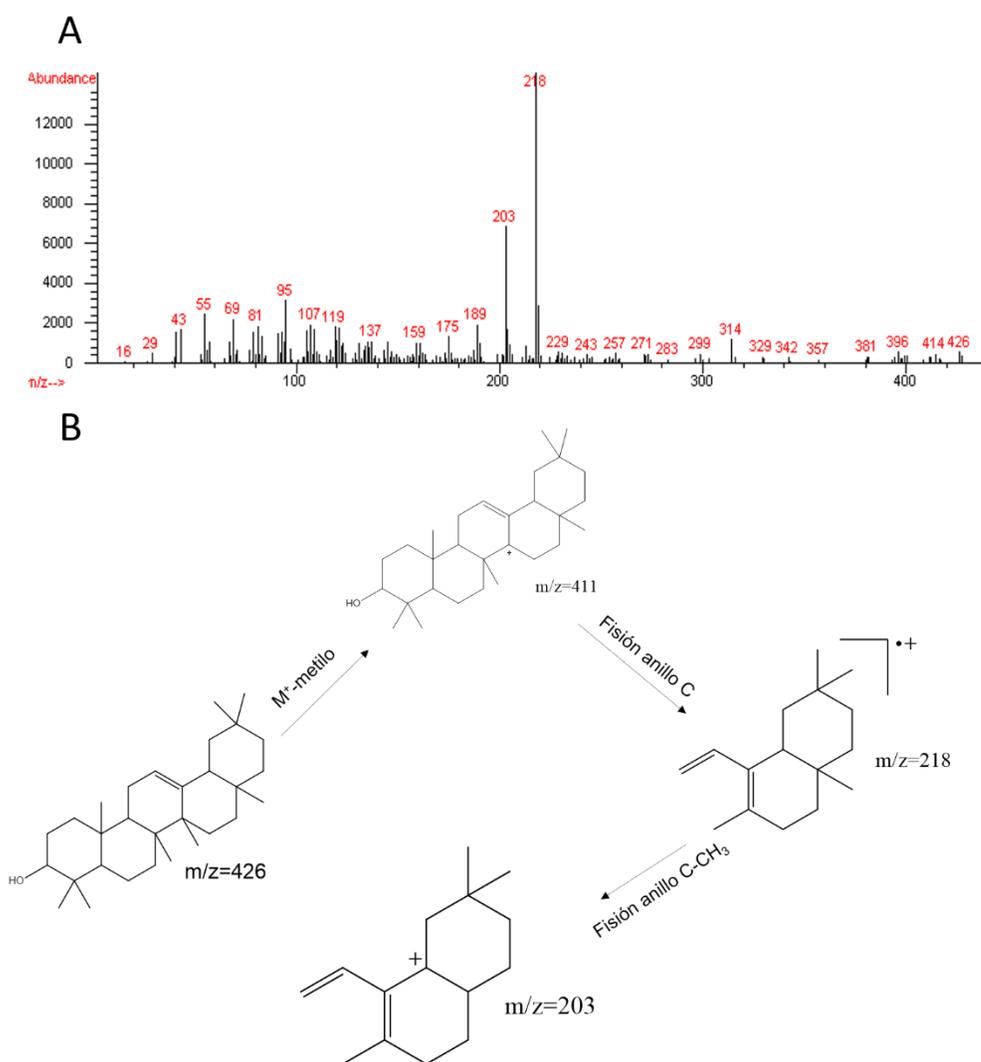
En el caso de la  $\alpha$ - amirina la biosíntesis se representa en la Figura 2-23.

**Figura 2-23:** Biosíntesis de la  $\alpha$ -amirina



Si bien, en el género *Pleurotus* no es usual la biosíntesis de triterpenoides pentacíclicos, parece ser que el *Pleurotus eryngii* posee las enzimas requeridas para su producción, como lo soporta el hecho de que en él se han reportado compuestos con esqueleto ursano (Xue, Li, et al., 2015)

**Figura 2-24:** A) Espectro de masas del compuesto 7 y B) patrón su fragmentación propuesto



En la tabla 2-8 están resumidos los diferentes triterpenoides que fueron identificados en el extracto saponificado de la biomasa obtenida empleando GB como FC.

**Tabla 2-7:** Triterpenos identificados en el extracto saponificado y en la Fracción Fc2 del *P. eryngii* cultivado en FEL

Pico	Compuesto	tr (min)			
		Fc2	%	GBs	%
1	Ergosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol	-	-	30,47	11,72
2	Ergosta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol	-	-	30,53	8,59
3	Ergosta-5-en-3 $\beta$ -ol	-	-	30,61	8,37
4	Estigmast-5,22-dien-3 $\beta$ -ol	-	-	31,04	4,55
5	Estigmast-5-en-3 $\beta$ -ol	-	-	31,35	41,77
6	Estigmast-4-en-3-ona	32,35	31,74	32,39	5,68
7	Amirina	31,49	7,06	31,51	5,68

GBs: Extracto saponificado del *P. eryngii*, Fc2: Fracción de columna.

Como se puede evidenciar existe una gran diferencia en la composición del extracto saponificado y la fracción analizada de la columna. Esto se puede deber a que los otros metabolitos eluyeron en otra fracción, pero su concentración fue muy baja y presentaban impurezas lo cual impidieron su identificación. Estos resultados infieren que el componente mayoritario fue estigmas-5-en-3 $\beta$ -ol, lo cual sugiere que es el componente principal dentro de los esteroides del *P. eryngii*, dado que la concentración del estigmast-4-en-3-ona, componente principal de la Fc2, está en baja concentración en el extracto saponificado. Por lo tanto, los resultados obtenidos en columna y por saponificación son concordantes, evidenciando que saponificar permite una mejor obtención e identificación de los componentes bioactivos de carácter triterpenoidal.

## 2.8 Conclusiones

- Se corroboró que las FC no tradicionales son más eficientes en la producción de esteroides que las tradicionales y que adicionalmente la biosíntesis es cepa y especie dependiente.
- Se ratificó que la FC empleada incide en la composición de la biomasa.
- Se determinó que la harina de garbanzo es la fuente de carbono no tradicional idónea para el cultivo de *P. eryngii* por FEL, que presenta la mayor cantidad de bioactivos.
- Se estableció que un tiempo de cultivo de 9 días es el ideal en fermentación en estado líquido, para obtener un buen nutraceutico.
- Se evidenció un cambio en la cantidad más no en la variabilidad estructural de triterpenoides a lo largo de la fermentación.

74 Determinación de la correlación tiempo de fermentación-características estructurales y cantidad de bioactivos, de *Pleurotus* cultivados por FEL y su incidencia en el potencial antibiótico del producto biotecnológico

---

- Se encontró la posibilidad de que el hongo sintetice la amirina, un triterpeno pentacíclico no reportado antes en el género *Pleurotus*.

## **3. Potencial antibiótico de los bioactivos del *P. eryngii* cultivado por FEL**

### **3.1 Antecedentes**

Desde el descubrimiento y exploración de agentes antibióticos en el siglo XX, la toxicidad selectiva contra los blancos de dichos agentes ha asegurado la gran efectividad en su uso para combatir infecciones. Sin embargo, el empleo durante tanto tiempo de los antibióticos paradójicamente ha resultado en una diseminación de patógenos multiresistentes a estas drogas y que es ya considerada por la OMS y algunos autores como la mayor emergencia y el problema de salud pública más importante en la actualidad.

Es así como en “Las Recomendaciones de Copenhaguen: reporte de la conferencia EU para la amenaza microbial” se resalta la necesidad en el desarrollo de nuevos principios para el tratamiento o prevención de infecciones en humanos y animales (Hearst, et al. 2008). En este orden de ideas una excelente alternativa puede ser por lo tanto, examinar las propiedades antimicrobiales de macrohongos como nuevas fuentes de tales agentes, así como también la determinación estructural de los compuestos responsables de la acción los cuales podrían constituirse en agentes microbianos promisorios, lo que conllevaría a su posterior empleo y así, disminuir el uso de antibióticos convencionales en el tratamiento de enfermedades; contribuyendo de esta forma, a minimizar el desarrollo de resistencia a los agentes microbiales.

En este contexto, una de las opciones es el explorar la posibilidad de que la biomasa obtenida biotecnológicamente con el empleo de FC no tradicionales, como es el caso de la presente investigación, conlleve a la obtención de un micelio con potencial actividad antimicrobiana.

### 3.2 Actividad antimicrobiana de basidiomicetos

Una de las actividades más importante exhibida por los basidiomicetos es la antibiótica o antimicrobiana y es en el año 1949 donde Florey reporta el uso de extractos de cuerpos fructíferos y de cultivos miceliales de más de 2000 especies de hongos con esta actividad. Tal es el caso de la Pleuromutilina, antibiótico de origen fúngico utilizado para tratar enfermedades del ganado (Brizuela et al., 1998).

Cabe anotar aquí que la mayoría de reportes de antimicrobianos fúngicos se han enfocado a los hongos medicinales *Ganoderma lucidum* y *Lentinula edodes*. Avci et al en el 2014 evaluaron este tipo de actividad en los extractos etanólicos, clorofórmicos y acuosos para los dos géneros, encontrando que para el primero de ellos son los extractos etanólicos los que presentan mejor actividad en contraste con el *Lentinula* en donde son los extractos clorofórmicos (Avci, Avci, & Kose, 2014).

En los estudios reportados por Karaman et al 2010, se evaluó la actividad antibacteriana, determinada por el método de difusión en agar, para diferentes extractos tanto metanólicos como diclorometánicos de diferentes hongos basidiomicetos mostrados en la tabla 3-1. Los autores indican que la mayoría de los extractos tienen actividad antibacteriana sobre bacterias Gram negativas (excepto *Salmonella enteritidis*) pero que la actividad más fuerte se presenta sobre bacterias Gram-positivas, particularmente sobre *S. aureus*, *B. subtilis* y *M. luteus*. Respecto al origen de la cepas se puede evidenciar que las bacterias animales fueron más susceptibles que las ATCC y las humanas, llevando a sugerir el posible uso de estos extractos para el tratamiento de infecciones animales especialmente sobre cepas bacterianas multirresistentes a los antibióticos convencionales.

Haciendo énfasis en el tipo de extracto, los autores aseveran que su diferencia de actividad confirma la existencia de diferentes mecanismos de acción establecido por la polaridad de los componentes de los extractos y por ende una influencia directa de su relación estructura actividad (Karaman, Jovin, Malbaša, Matavuly, & Popović, 2010).

De la tabla 3-1 es importante también destacar los extractos obtenidos del *P. ostreatus*, del cual los obtenidos con DCM fueron los que presentaron actividad sobre un mayor número de bacterias que el obtenido en MeOH. Esto hace suponer que los componentes, que como se vio en el capítulo 2 son mayoritariamente ácidos grasos y triterpenoides, son activos y de gran interés de estudio. Vale destacar que, aunque estos extractos

---

presentaron actividad sobre algunas bacterias, esta es de una respuesta promedio respecto a los de otros hongos y como se vio en el capítulo 1, este género es de crecimiento fácil, rápido y económico.

Lo anterior hacer pensar que probablemente las especies de *Pleurotus* tienen un potencial para producción de compuestos antibióticos con rápida adquisición, siendo un género destacable para la producción de nutri y nutracéuticos.



**Tabla 3-1:** Actividad antimicrobiana de extractos fúngicos en MeOH y DCM (Diámetro de la zona inhibida en mm)

Organismo	<i>M. giganteus</i>	<i>L. sulphureus</i>	<i>C. versicolor</i>	<i>F. velutipes</i>	<i>G. lucidum</i>	<i>G. applanatum</i>	<i>P. triginus</i>	<i>P. ostreatus</i>	Amp	Gen
MeOH <sup>2</sup> CHCl <sub>3</sub> <sup>2</sup>										
<i>M. luteus</i> <sup>an</sup>	12,63±0,75 9,75±1,92	- 8,5±0,57	10,25±0,35 11,33±1,5	- 10,3±1,15	13,88±0,35 17,0±0,82	14,75±0,35 6,5±0,23	- 11,7±2,0	- 11,67±0,75	38	26
<i>S. aureus</i> <sup>an</sup>	14,75±0,5 9,0±0,83	9,50±0,58 7,25±0,82	18,5±1,48 12,25±0,5	7,25±0,35 19,75±0,5	7,5±0,44 8,0±0,0	13,0±1,83 21,50±1,71	13,12±0,5 8,5±0,5	7,50±0,58 7,25±1,29	47	20
<i>Bacillus sp</i> <sup>an</sup>	9,75±0,5 9,25±0,83	8,25±0,58 9,25±0,5	10,75±0,96 11,5±0,5	15,75±2,31 11,0±0,8	14,00±1,83 10,5±0,58	16,00±0,25 -	7,50±0,58 9,5±1,7	7,00±0,76 -	0	22
<i>S. aureus</i> <sup>b</sup>	10,25±0,5 -	12,75±1,02 -	15,75±0,94 11,75±0,5	10,50±0,4 9,5±0,7	10,25±0,85 7,0±0,0	- 10,25±0,9	- 9,5±0,6	- 11,5±1,0	34	20
<i>S. lutea</i> <sup>c</sup>	11,00±0,75 -	- -	10,00±0,84 9,5±0,6	- -	- 13,0±0,82	- 10,0±0,0	- 9,0±0,0	- -	29	38
<i>E. coli</i> <sup>d</sup>	- 10,0±1,0	- 7,25±0,0	- 7,25±0,5	- 7,0±0,25	- 8,0±1,25	- 7,0±0,71	- 8,0±1,5	- 8,5±1,0	16	20
<i>S. flexneri</i> <sup>h</sup>	11,50±0,58 8,5±0,5	9,50±0,58 8,5±0,7	- 12,0±0,58	9,00±1,00 11,0±0,82	- -	- 7,0±0,71	- 13,5±0,7	- 9,5±0,6	28	30
<i>P. mirabilis</i> <sup>h</sup>	11,59±0,71 -	- -	- -	8,00±1,00 -	- -	- -	9,75±0,96 -	9,17±0,29 -	0	21
<i>S. enteritidis</i> <sup>h</sup>	17,50±0,71 -	13,00±1,41 -	18,50±2,12	- -	- 14,0±0,81	9,5±0,71 10,75±0,96	14,0±1,41 12,00±0,81	- -	25	20

an: cepa de origen animal, h: cepa patógena humana, b: cepa ATCC25923, c: ATCC 9341, d: ATCC 25922, 2: La concentración de los extractos fue de 5% (w/v); todos los extractos fueron solubilizados en el mismo solvente orgánico, Amp: ampicilina (10µg/disco), Gen: Gentamicina (10µg/disco)



Por otro lado, Skariyachan et. al en el 2016 estudiaron los extractos metanólicos y acuosos de los cuerpos fructíferos de la especie *P. ostreatus*, mostrando excelentes resultados frente a bacterias multiresistentes a 48 diferentes agentes antibióticos en concentraciones de 50 a 100 µg/disco y 50 a 100 µg/pozo (Skariyachan, Prasanna, Manjunath, Karanth, & Nazre, 2016), resultado concordante por lo reportado por Alves et al en el 2012, en donde el extracto metanólico de la misma especie presenta actividad frente a bacterias Gram-positivas mientras extractos de *Pleurotus sajor-caju*, *eryngii* y *ostreatus* presentan actividad sobre bacterias Gram-negativas. Vale rescatar del trabajo publicado la gran importancia de la investigación sobre los basidiomicetos lo que muestra el gran potencial que tienen para novedosos compuestos con actividad biológica (Alves et al., 2012).

Respecto a extractos obtenidos de hongos basidiomicetos cultivados por FEL, Dyakov et al 2011 reportan como la actividad antimicrobiana de extractos en acetato de etilo de todo el producto biotecnológico, cambia en función del medio y el tiempo de cultivo. Los autores hacen uso de varios tipos de hongos basidiomicetos donde se destaca la *Flammulina velutipes*, *Coprinus comatus*, *Lycoperdon pyriforme*, *Macrolepiota procera*, *Pholiota lenta* y *Armillaria sp* los cuales hacen parte del orden agaricales al igual que el hongo del presente estudio. Como conclusión, los autores mencionan que la actividad depende del medio de cultivo y del género, siendo la *Flammulina velutipes* la que presenta la mayor actividad (Dyakov et al., 2011).

Así, por los reportes mencionados anteriormente, se evidencia la importancia de hacer un estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos de baja polaridad del hongo en estudio, dado que esto da un indicio de su capacidad antibiótica y su uso como nutracéutico.

### **3.3 Actividad antimicrobiana de ácidos grasos y triterpenos en basidiomicetos**

Entre los componentes mayoritarios en extractos de baja polaridad se encuentran la fracción grasa de los hongos. Generalmente esta está compuesta por ácidos grasos y triterpenos. Los ácidos grasos mayoritarios en basidiomicetos son el ácido linoleico, oleico y palmítico junto con sus esterios como lo muestran diferentes reportes (Manu-Tawiah & Martin, 1987; Reis, Barros, Martins, & Ferreira, 2012; Ribeiro, Guedes De Pinho, Andrade, Baptista, & Valentão, 2009) mientras que los triterpenos varían ampliamente dependiendo

de la cepa, el medio de cultivo y el estadio del hongo (Chegwin-Angarita & Nieto-Ramírez, 2014b; Hammann et al., 2016; P. A. Zapata et al., 2012).

Respecto a bacterias como *S. aureus*, *B. subtilis* y *Cereus*, *Salmonella sp* y *K pneumoniae*, ácidos grasos como el linoleico y el esteárico han presentado actividad antimicrobiana, como lo reporta Gutiérrez et al 2005 quienes evalúan la actividad de extractos del *Tubifex tubifex*, obteniendo una fracción enriquecida en ácido linoleico, esteárico, láurico y margárico, determinando que el ácido de mayor actividad es el linoleico, seguido por el margárico (Gutiérrez, Martha, Martha, & Gutiérrez, 2005). Así mismo, el ácido oleico extraído y aislado de *Helichrysum pedunculatum* mostró actividad solo frente a *B. subtilis*, *S. aureus* y *M. kristinae* con una CMI de 1 mg/ml (Dilika, Bremner, & Meyer, 2000). Estos trabajos mencionados, muestran la capacidad de los ácidos grasos como agentes antimicrobianos, siendo los basidiomicetos productos naturales que poseen una gran concentración de estos componentes y por ende organismos con potencial antibiótico (Desbois & Smith, 2010).

Por otro lado, los triterpenos también han mostrado actividad antimicrobiana. Así lo reportó Popova et al 2009, quienes aislaron diferentes estructuras triterpenoidales de núcleo lanosta. El extracto clorofórmico presentó actividad sobre *S. aureus* y *C. albicans*, llegando a potencias similares a la del patrón positivo (Estreptomycin). Los componentes del extracto fueron aislados y evaluados evidenciando buena actividad frente a *S. aureus* pero no frente a *C. albicans* (Popova et al., 2009). Resultados similares fueron obtenidos por Liu et al 2010 en el que un triterpeno lanostánico, obtenido a partir de los hongos *Jahnporus hirtus* y *Albatrellus flettii* presentó una CMI de 40 y 32 µg/ml para *B. cereus* y *E. fecalis* respectivamente (X.-T. Liu et al., 2010). Del mismo modo, se ha determinado por varios autores que triterpenoides de núcleo lanosta y ergosta han presentado actividad antimicrobiana obtenidos de diferentes hongos basidiomicetos (Z. Bin Cheng et al., 2013; Hu et al., 2014; Keller et al., 1996; Kim, Choi, Choi, & Lee, 2010).

En lo concerniente con trabajos realizados en el grupo de investigación de Química de Hongos Macromicetos, en el publicado por Rojas 2012, se determinó que extractos crudos del estípite de Shiitake presentan actividad a partir de 8 mg/ml sobre *Ps. aeruginosa*, *S. enteritidis* y *S. aureus*, sin embargo, estos fueron inactivos contra *E. coli*. La bacteria más susceptible a los extractos fue la *S. aureus* (Gram-positiva), esto se relaciona con la

diferencia en la pared celular de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Gyawali & Ibrahim, 2014b; Rojas, 2012).

Como se puede apreciar en la tabla 3-2, el autor reporta la evaluación de la actividad antimicrobiana de los componentes puros del Shiitake. Es de destacar, que el ergosterol es el componente que mayor actividad presenta, aun así, no es activo contra la *S. enteritidis* al igual que el resto de compuestos. En líneas generales, los esteroides poseen una capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano con la misma fortaleza que el ácido linoleico a concentraciones de 0,5 a 1 mg/ml colocando en evidencia el potencial de los compuestos con núcleo ergosta. Es de destacar la actividad antimicrobiana que presentan el ergosterol, el ergosta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol y el ergosta-5-en-3 $\beta$ -ol, que da un indicio a la relación estructura-actividad que se puede presentar. A 1 mg/ml se ve como la actividad se ve incrementada a más insaturaciones, infiriendo que las estas son fundamentales para que se presente actividad antimicrobiana. Por otro, respecto a la cantidad de grupos -OH parece ser que no es fundamental para que se presente la actividad, hecho que se puede hipotetizar dado que el ergosta-6,22-dien-3 $\beta$ ,5,8-triol no presenta la misma actividad que si tiene el ergosterol y por ello, otras estructuras no necesariamente esteroideas pueden presentar la actividad en cuestión.



**Tabla 3-2:** Actividad antimicrobiana de compuestos aislados del estípite de Shiitake.

Compuesto	Microorganismos ensayados	Concentraciones						control positivo	
		0,1 mg/ml	0,25 mg/ml	0,5mg/ml	1 mg/ml	2mg/ml	4 mg/ml	Ciprofloxacina	Cefalotina
Ácido linoleico	<i>S aureus</i>	NI	NI	15 mm	16 mm	16mm	20mm		38mm
	<i>S enteritidis</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC		40mm
	<i>Ps aeruginosa</i>	7mm	8mm	10mm	12mm	16mm	18mm	45mm	
	<i>E coli</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC		35mm
Ergosta-5,7,22-trien-3β-ol	<i>S aureus</i>	10mm	10mm	12mm	18mm	20mm	20mm		38mm
	<i>S enteritidis</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC		40mm
	<i>Ps aeruginosa</i>	16mm	18mm	18mm	20mm	25mm	25mm	45mm	
	<i>E coli</i>	6mm	10mm	14mm	15mm	18mm	22mm		35mm
Ergosta-7-en-3β-ol	<i>S aureus</i>	-----	-----	10mm	16mm	-----	-----		38mm
	<i>S enteritidis</i>	-----	-----	12mm	20mm	-----	-----		40mm
	<i>Ps aeruginosa</i>	-----	-----	18mm	20mm	-----	-----	45mm	
	<i>E coli</i>	-----	-----	15mm	18mm	-----	-----		35mm
Ergosta-5,22-dien-3β-ol	<i>S aureus</i>	-----	-----	10mm	12mm	-----	-----		38mm
	<i>S enteritidis</i>	-----	-----	15mm	20mm	-----	-----		40mm
	<i>Ps aeruginosa</i>	-----	-----	12mm	18mm	-----	-----	45mm	
	<i>E coli</i>	-----	-----	6mm	8mm	-----	-----		35mm
Ergosta-7,22-dien-3,5-diol-6-ona	<i>S aureus</i>	8mm	10mm	11mm	12mm	14mm	15mm		38mm
5,6-epoxi ergosta-8,22-dien-3β,7-diol	<i>S enteritidis</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC		40mm
Ergosta-6,22-dien-3β,5,8-triol	<i>Ps aeruginosa</i>	6mm	6mm	8mm	8mm	10mm	10mm	45mm	
5,6-epoxi ergosta-8(14),22-dien-3β,7-diol	<i>E coli</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC		35mm

(----- no evaluado, NI: No inhibió, NC: no creció)

Es así como diferentes extractos crudos y componentes aislados de los basidiomicetos han presentado actividad antimicrobiana moderada frente a bacterias patógenas, lo que hace que los hongos basidiomicetos sean una fuente importante de antibióticos.

### 3.4 Metodología

Todos los ensayos de actividad se realizaron a partir del extracto crudo, saponificado y la fracción Fc2 obtenido del *P. eryngii*, cultivado en harina de garbanzo por FEL.

#### 3.4.1 Actividad antimicrobiana por el método de discos por difusión en agar

El extracto saponificado y el extracto crudo fueron solubilizados DCM hasta una concentración de 25 mg/ml. Se adicionó 100  $\mu$ L en un disco de papel Whatman #4 previamente esterilizado y se dejó secar. El cultivo bacteriano y la determinación de la actividad, siguió las normas de la CLSI (CLSI, 2009). Cepas bacterianas de *S. aureus*, *Ps. aeruginosa*, *E. coli* y *Salmonella spp* fueron previamente activadas en un caldo de Muller Hinton (MHB) por 18 horas a 37°C. Posteriormente se inoculó por extensión en MH agar (MHA) en caja de Petri y se cultivaron por 24 horas a 37°C. Se tomaron entre 2 a 3 loops de colonias aisladas de cada bacteria y se llevó a un caldo MH hasta una absorbancia de 0,5 en la escala de McFarland. Posteriormente 600  $\mu$ L de suspensión bacteriana fue llevada a 120 ml de MH agar a 40°C y agitada hasta una buena homogenización. Se sirvieron 20 ml de MH agar previamente inoculados sobre cajas de Petri estériles, se dejaron secar y posteriormente colocaron equidistantes 5 discos (patrón positivo: tetraciclina 10 mg/ml, Patrón negativo: DCM, GBs: Extracto saponificado y GBss: Extracto sin saponificar) se dejó incubar a 37°C haciendo lecturas a las 24 y 48 horas de cultivo (Balouiri, Sadiki, & Ibsouda, 2016; Valgas, Machado de Souza, A Smânia, & Smânia Jr, 2007).

#### 3.4.2 Actividad antimicrobiana por el método de pozos por difusión en agar

El extracto crudo, saponificado y la Fc2, fueron solubilizados en metanol/tween 20 (1:1) hasta una concentración de 25 mg/ml. El cultivo bacteriano y la actividad antimicrobiana, se realizaron siguiendo las normas de la CLSI (Wikler et al., 2009), empleando el mismo

proceso de inoculación bacteriana que en el método de discos. Posterior a la solidificación del medio, con un sacabocados estéril de 0,5 cm de diámetro se abrieron 4 pozos equidistantes. En cada pozo se adicionaron 60  $\mu$ L de cada extracto utilizando como patrón positivo tetraciclina (10 mg/ml) y como patrón negativo Metanol/tween 20 (1:1). Se dejaron incubar a 37°C y se realizaron lecturas a 24 y 48 horas (Balouiri et al., 2016; Valgas et al., 2007).

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y los halos medidos con calibrador.

### 3.5 Resultados y análisis

Los resultados obtenidos para la actividad antimicrobiana se pueden observar en la tabla 3-3.

En términos generales indistintamente de la metodología empleada para la determinación de la actividad, tanto los extractos como la fracción, presentan una actividad muy baja comparada con el patrón de referencia. La fracción al igual que el extracto saponificado, son más activos frente a los microorganismos Gram negativos, mientras que el extracto sin saponificar es más activo para Gram positivos, comportamiento que puede atribuirse a la presencia de ácidos grasos C18:2 que ya han sido reportados.

**Tabla 3-3:** Actividad antimicrobiana determinada por difusión en agar por el método de discos y pozos (mm)

Cepas Bacterias	Actividad por difusión en agar (discos)			
	Tetraciclina (1 mg/disco)	Fc2 (2,50 mg/disco)	GBss (2,50 mg/disco)	GBs (2,50 mg/disco)
<i>S aureus</i>	16,5	2,0	3,0	0
<i>Ps aeruginosa</i>	13,0	3,0	1,3	1,4
<i>E coli</i>	15,5	0	1,5	1,5
<i>Salmonella spp</i>	12,1	2,0	0	0
Bacterias	Actividad por difusión en agar (pозos)			
	Tetraciclina 0,6mg/pozo	Fc2 (1,50mg/pozo)	GBss (1,50mg/pozo)	GBs (1,50mg/pozo)
<i>S aureus</i>	23,8	0	8,2	0
<i>Ps aeruginosa</i>	23,5	0	6,3	0

<i>E coli</i>	23,4	0	5,2	2,1
<i>Salmonella spp</i>	25,5	0	0	0
GBs= Extracto saponificado, GBss= Extracto sin saponificar, Fc2 fracción de columna				

Con base en los resultados obtenidos, la biomasa cultivada empleando harina de garbanzo como fuente de carbono, si bien presenta actividad, esta es muy baja, lo que la descarta como un potencial antimicrobiano.

Respecto al extracto sin saponificar GBss, se puede inferir que su actividad es debida a los ácidos grasos y no a los triterpenoides, resultados concordantes con la literatura dado que los ácidos grasos, hablando particularmente del oleico, palmítico y linoleico, siempre han presentado esta bioactividad tanto puros como en mezcla y desde el punto de vista estructura-actividad, puede deberse a que existe una similitud entre los ácidos grasos y los componentes de la membrana celular bacteriana lo que permite que estos metabolitos, penetren la membrana y haya un cambio en su funcionamiento normal y su permeabilidad haciendo que la célula muera (Desbois & Smith, 2010; Huang, George, & Ebersole, 2010). Desde el punto de vista de las bacterias, por el método de pozos no se presentó actividad sobre la *Salmonella sp* esto puede deberse a que las bacterias Gram-negativa presentan una pared celular compuesta por una membrana que presenta una capa simple lo que impide la incorporación de los metabolitos a la célula y por ello no se presenta la actividad. Estos resultados están soportados por otros autores en los cuales extractos o fracciones grasas no tiene actividad frente a esta bacteria (Karaman et al., 2010; Pereira et al., 2013). Aunque los resultados, desde el punto de vista de la actividad antibiótica no son satisfactorios, es de vital importancia recalcar que los componentes triterpenoidales determinados en el *Pleurotus eryngii*, han reportado otras actividades biológicas. Tal es el caso tanto del compuestos con núcleo ergostano, que han presentado una actividad muy fuerte frente al virus de la influenza tipo A (Öztürk, Tel-Çayan, et al., 2015); entre tanto, el estigmas-4-en-3-ona ha sido determinado como un hipoglucémico teniendo buenas propiedades para controlar los niveles de azúcar en la sangre (Alexander-Lindo, Morrison, & Nair, 2004) también, el estigmast-5-en-3 $\beta$ -ol se ha posicionado como un compuesto con buena actividad antitumoral, antihiperlipidémico y antidiabético (Sujatha et al., 2010). Por otro lado, es importante destacar que los compuestos de carácter triterpenoidal han mostrado una actividad hipocolesterolémica alta, lo cual le da un valor adicional a los triterpenos del *P. eryngii*. Finalmente, es de destacar que la presencia de la amirina en el

*P. eryngii* es un valor agregado muy importante dado que este tipo de metabolitos presentan actividad anticancerígena o antitumoral comprobada (Vázquez et al., 2011).

### 3.6 Conclusiones

- La biomasa fúngica obtenida empleando la harina de garbanzo, no se posiciona como fuente de un potencial antibiótico.
- Los componentes más activos de la fracción grasa del *P. eryngii*, frente a los microorganismos evaluados, corresponden a los ácidos grasos, aunque su potencia es baja.

## 4. Conclusiones generales y recomendaciones

### Conclusiones

- Se corroboró que el uso de FC no tradicionales como medio de cultivo en FEL para el crecimiento del *Pleurotus eryngii* favorece la producción de diferentes bioactivos a diferencia de las tradicionales como la glucosa. Adicionalmente, se reafirmó que estas FC incrementan los rendimientos del proceso biotecnológico, llevando a inferir que son estas las ideales para la obtención de nutracéuticos y en algunos casos para nutricéuticos.
- El presente estudio estableció que la harina de garbanzo favorece la producción de biomasa y triterpenos en el *P. eryngii* cultivado por FEL, llevando al producto biotecnológico obtenido a tener las mejores propiedades nutracéuticas.
- Es importante recalcar que hubo una gran variación del potencial nutracéutico con las diferentes FC evaluadas, encontrando que a diferencia de otras especies del género, el salvado de trigo no proporciona el valor nutracéutico esperado, reafirmando la hipótesis de que el comportamiento es cepa y fuente de carbono dependiente.
- La determinación de bioactivos a lo largo de una FEL mostró que no hay cambios en la variabilidad estructural pero que sí en la cantidad de los mismos.
- El seguimiento de la producción de bioactivos con el tiempo de fermentación permitió aprovechar mejor el proceso biotecnológico ya que proporcionó el tiempo mínimo de cultivo, hecho que puede ser utilizado para futuras investigaciones.

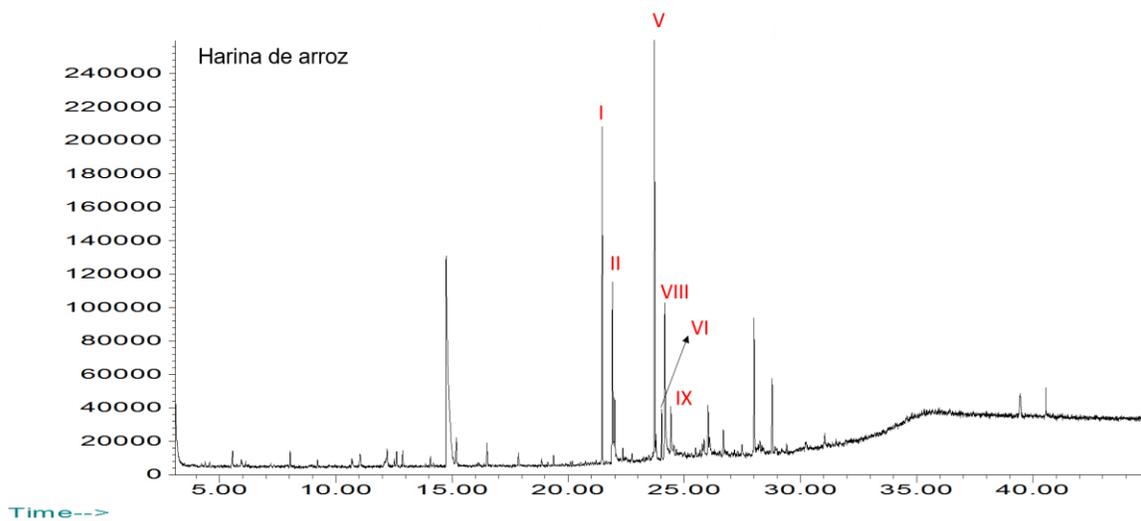
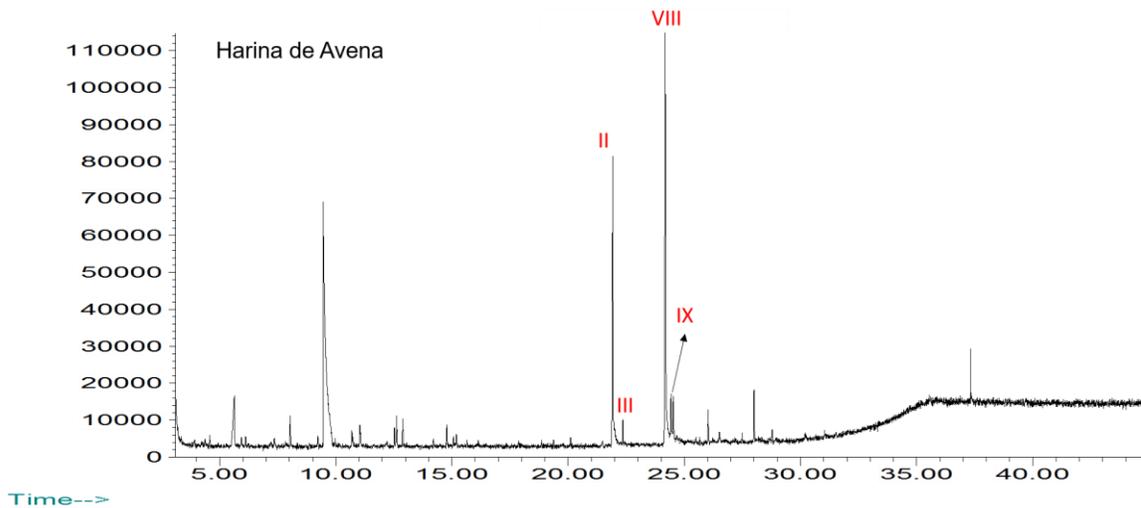
- Los resultados obtenidos permitieron determinar que el día 9 de cultivo es el momento apropiado para detener el proceso logrando la obtención del producto biotecnológico con el mayor contenido de bioactivos.
- La biomasa obtenida con harina de garbanzo presenta una baja actividad antimicrobiana.

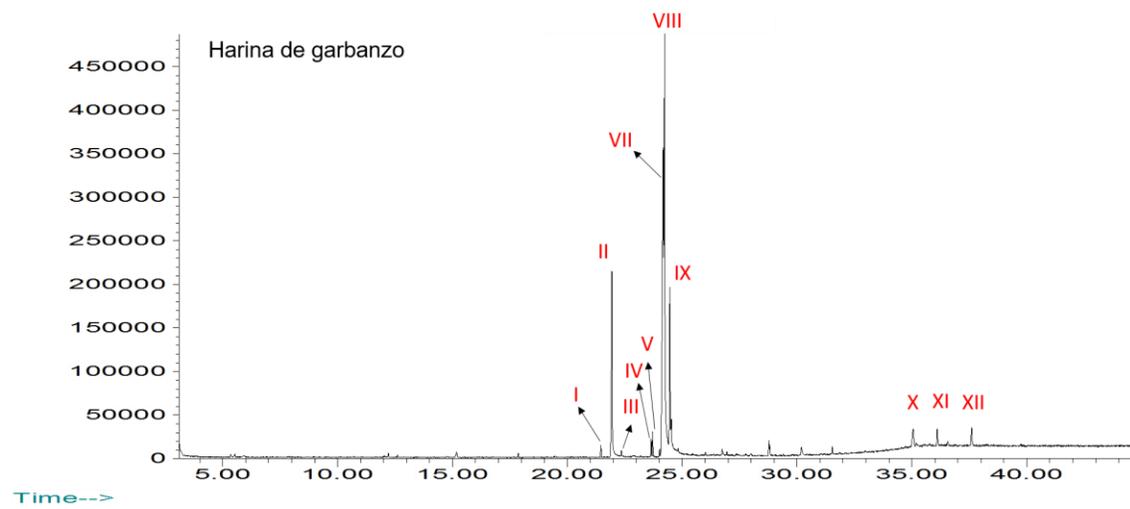
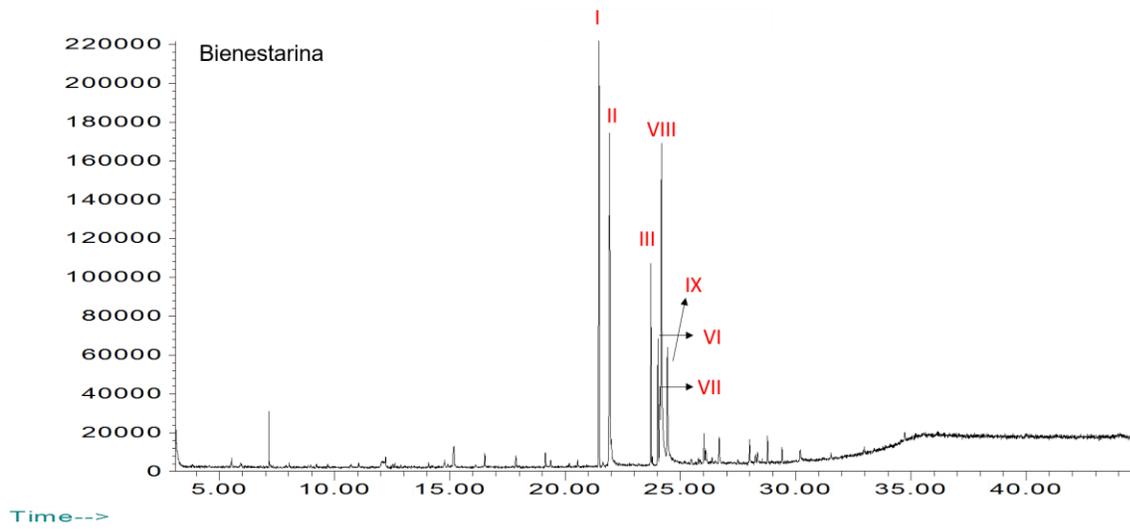
## Recomendaciones

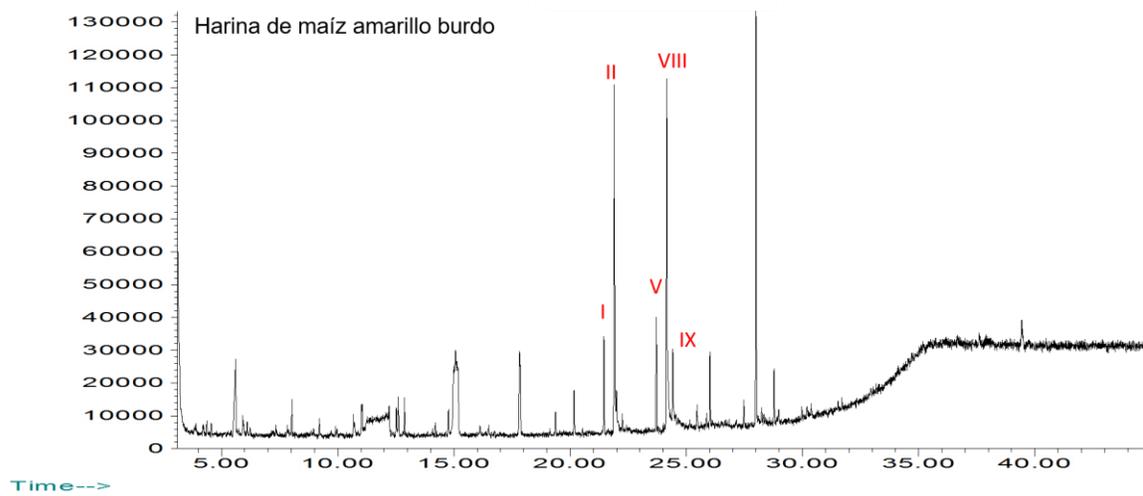
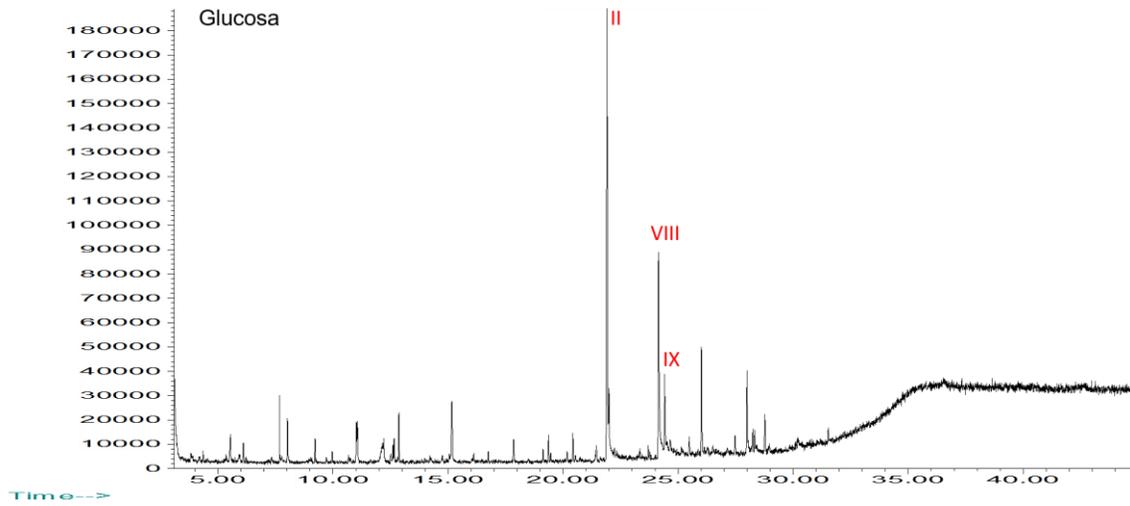
- Incursionar en la determinación de otras actividades biológicas para los metabolitos encontrados en la biomasa estudiada, puesto que el hecho de que ellos no mostraron poseer actividad antimicrobiana no les quita su calidad de bioactivos, máxime, cuando se determinó que el *P. eryngii* biosintetiza triterpenos pentacíclicos como la amirina, los cuales han presentado buena actividad anticancerígena.
- Es recomendable mejorar la metodología de FeSup para la evaluación de la FC de manera que la convierta en un método más eficiente para la preselección.
- Debido a que este es el primer reporte sobre la posibilidad de la presencia de la amirina el *P. eryngii*, es necesario aislarla y purificarla para poderla identificar inequívocamente.

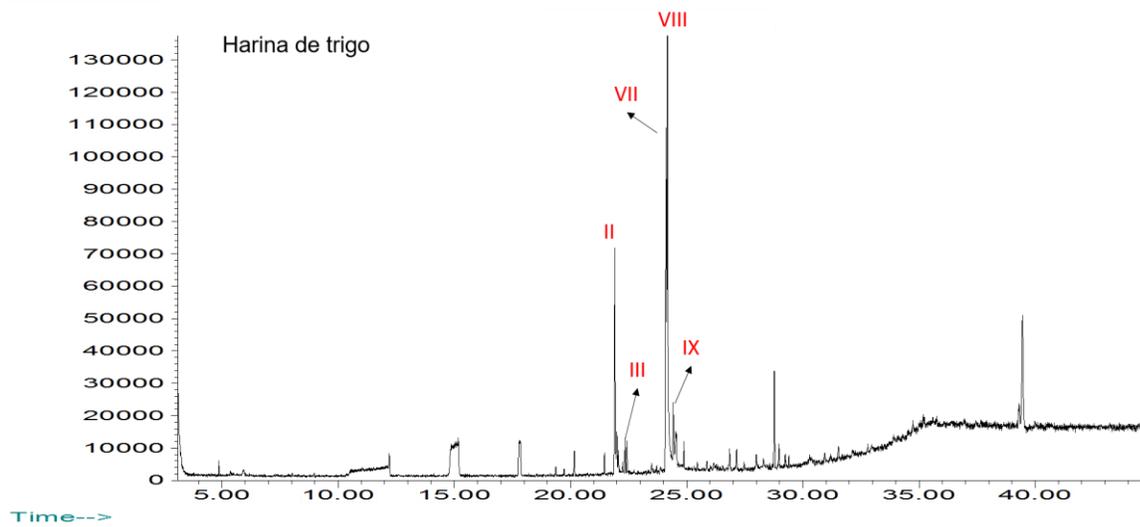
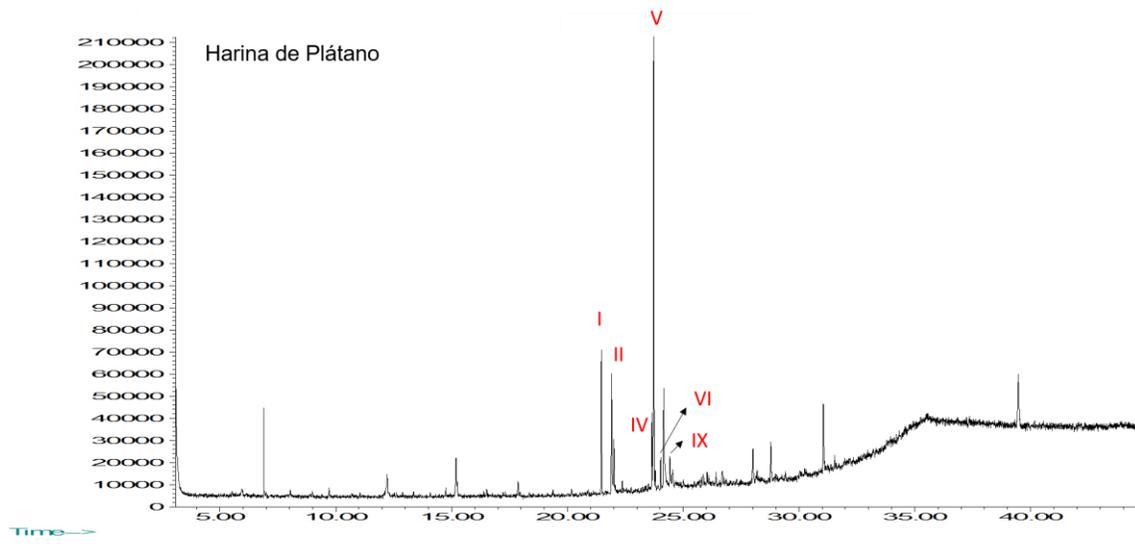


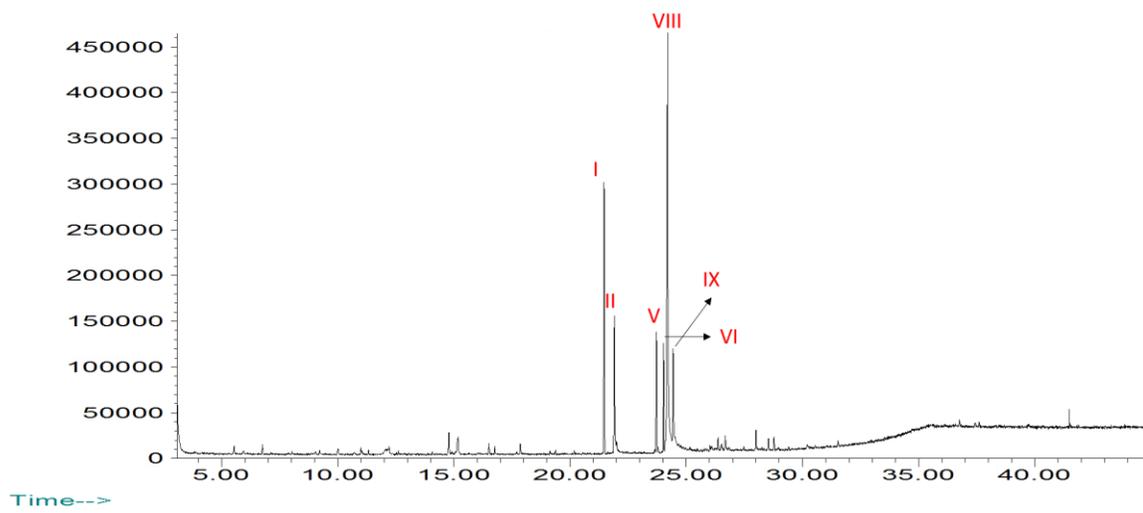
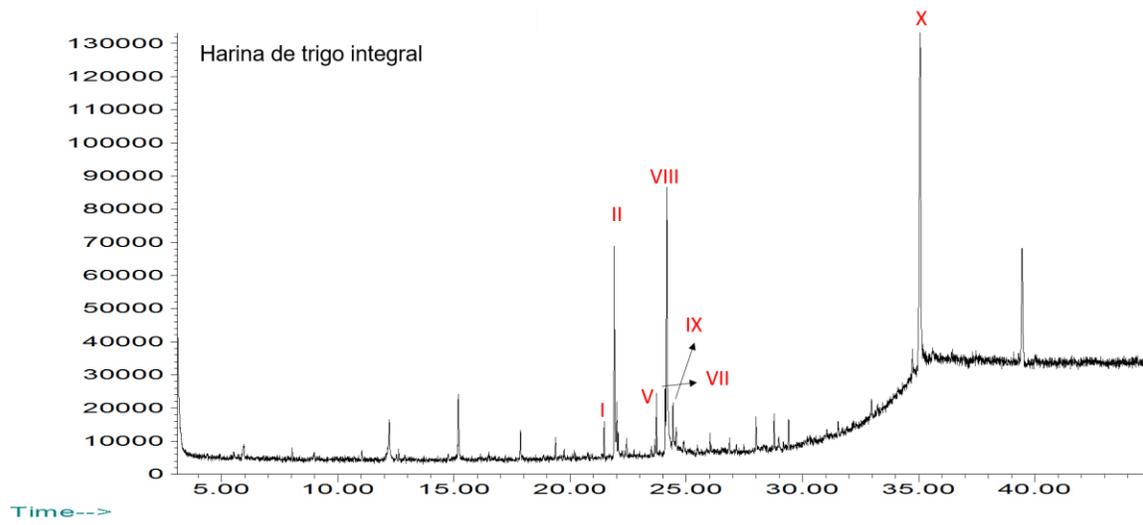
## A. Anexo A: TIC de la composición del *P. eryngii* cultivado por FEL con diferentes FC

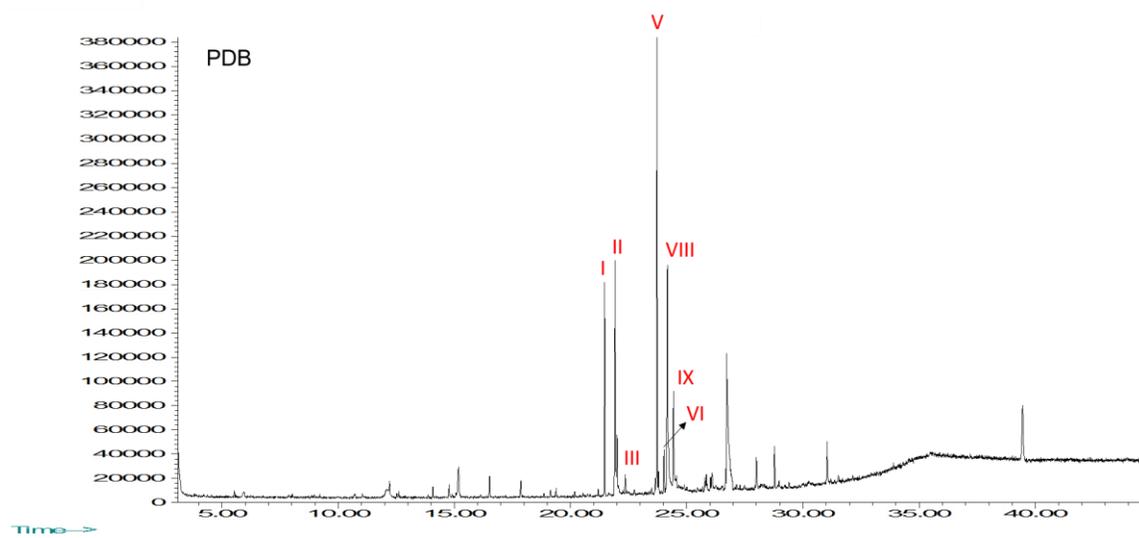
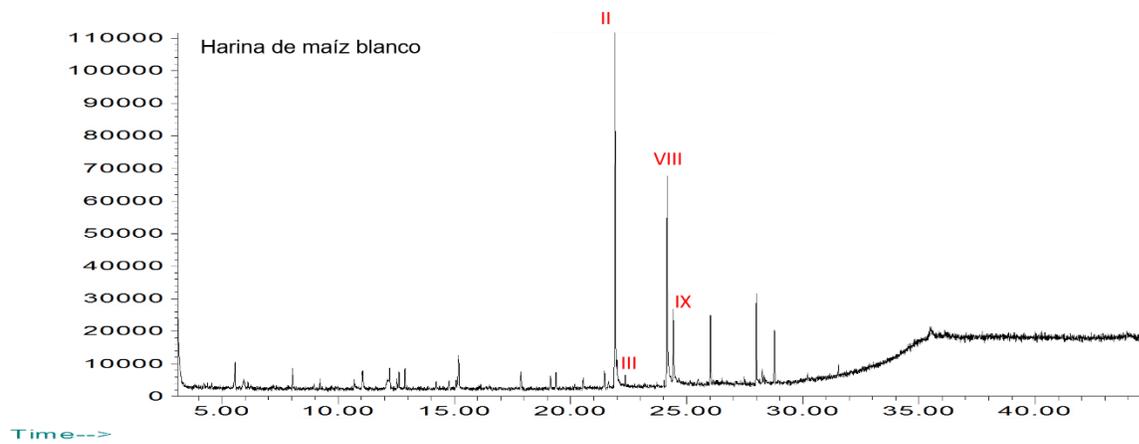
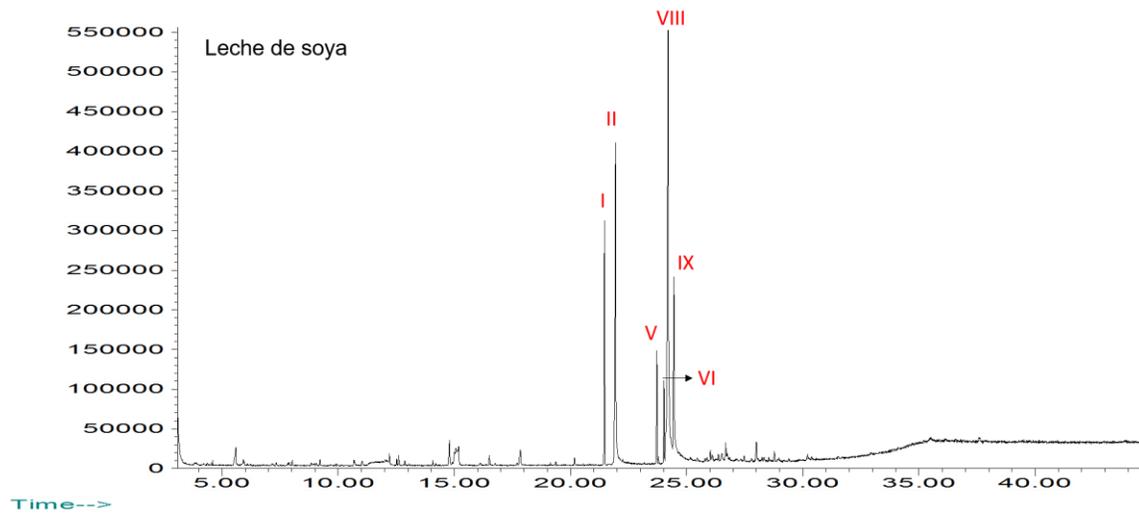


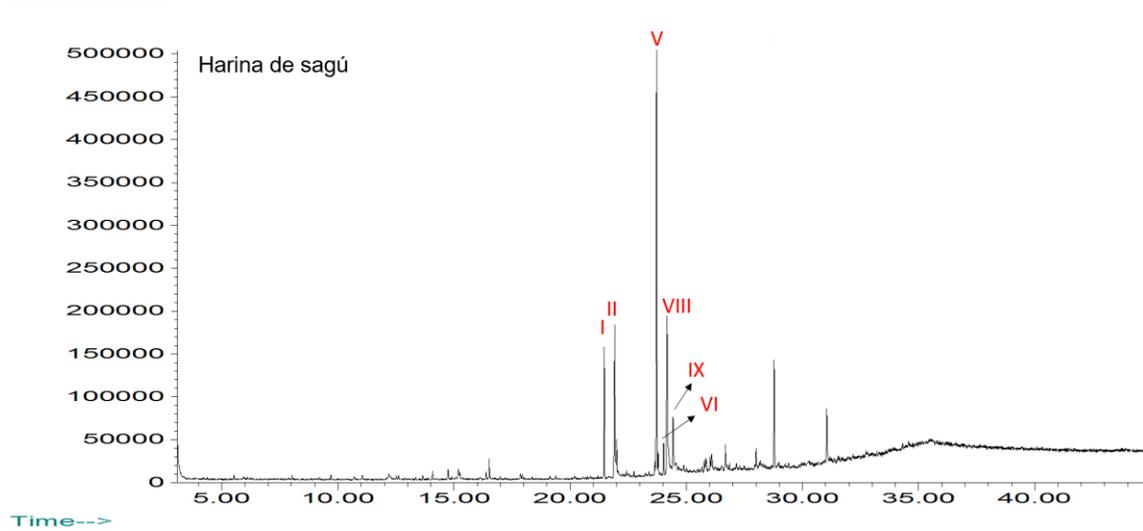
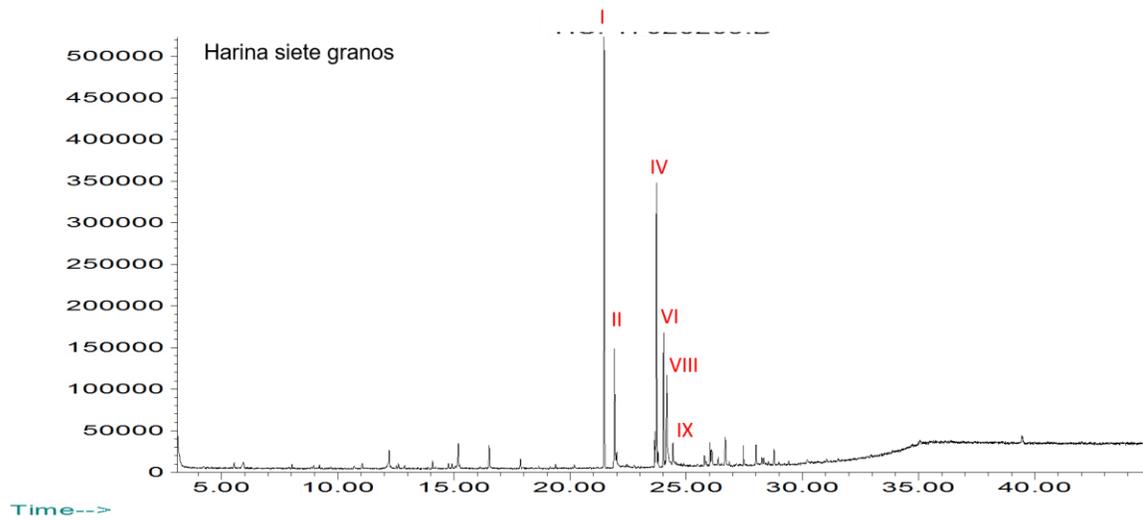


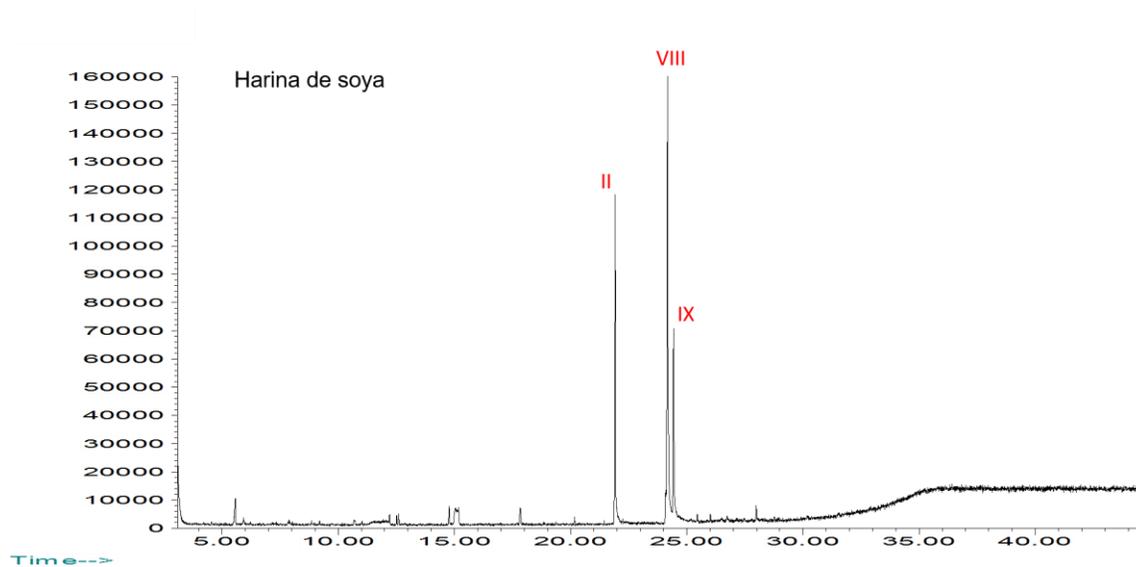








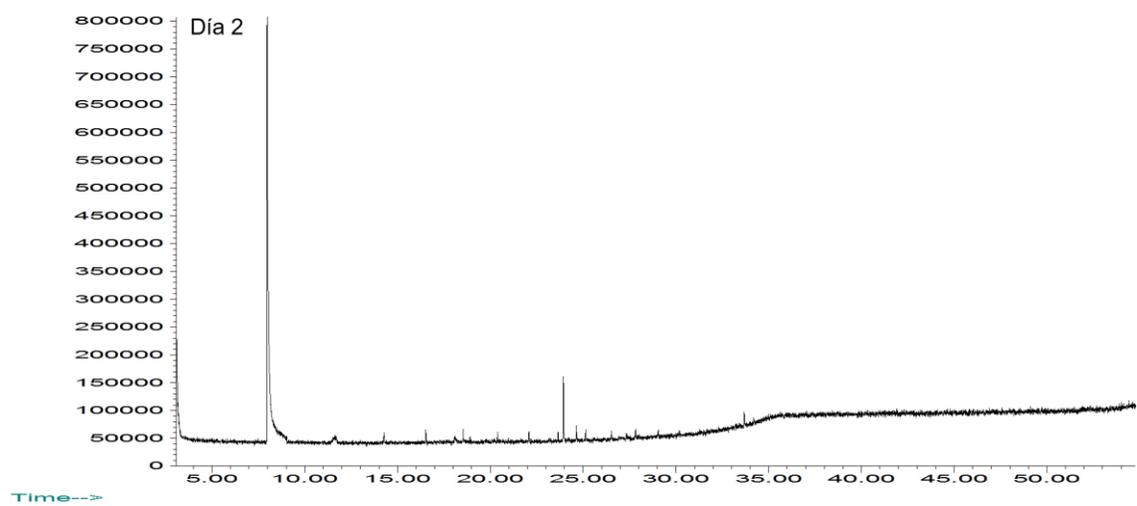
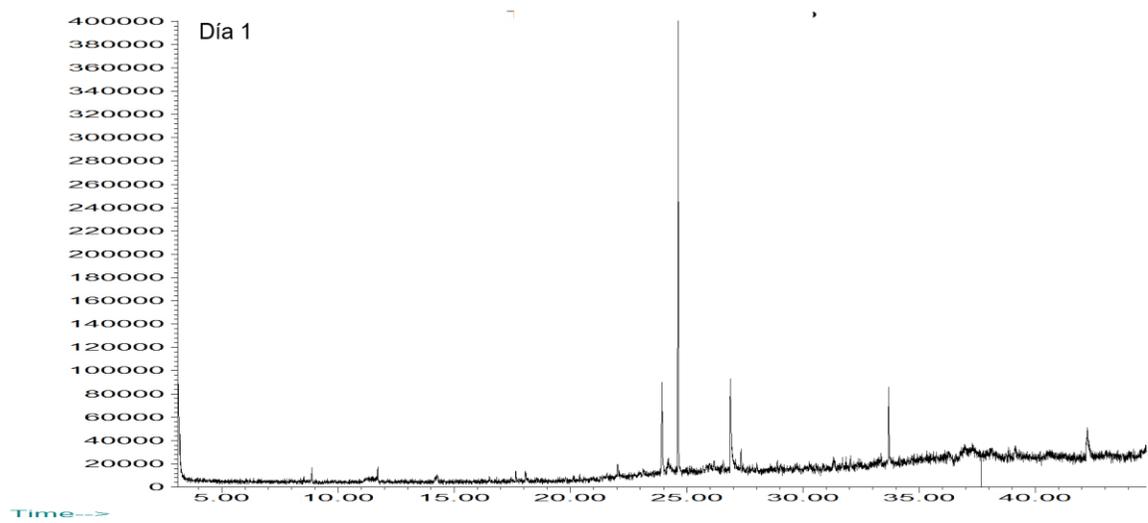


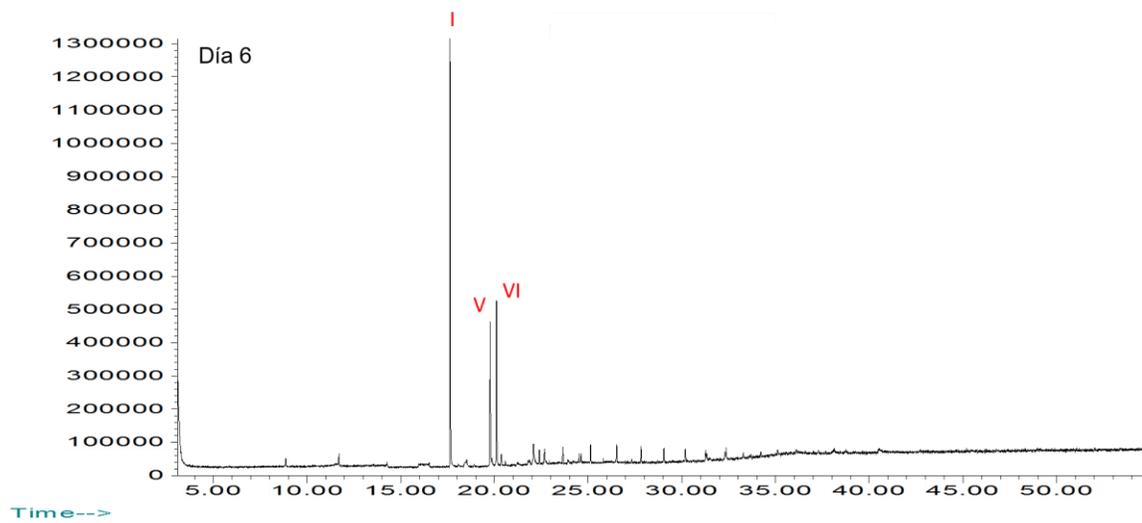
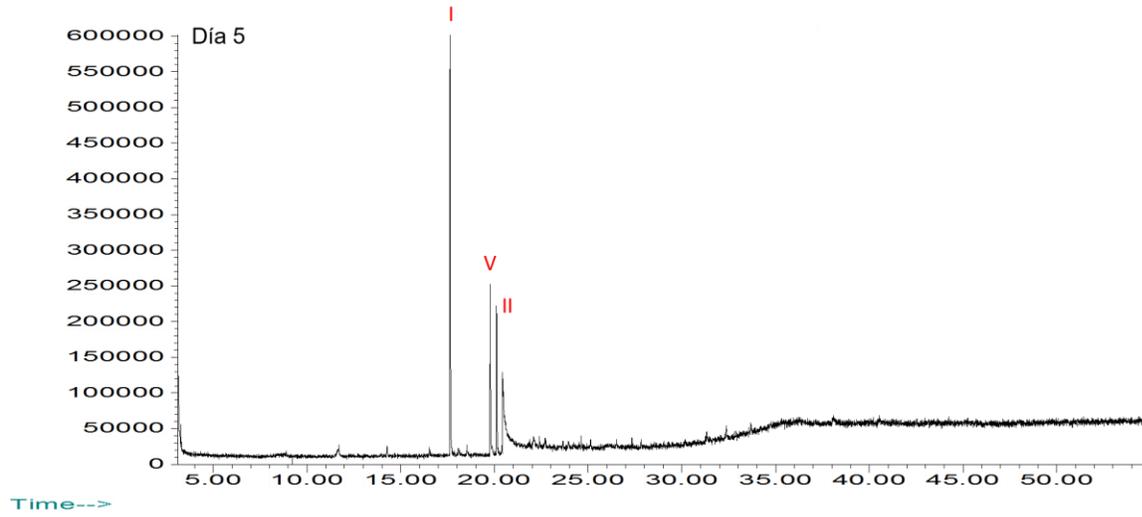
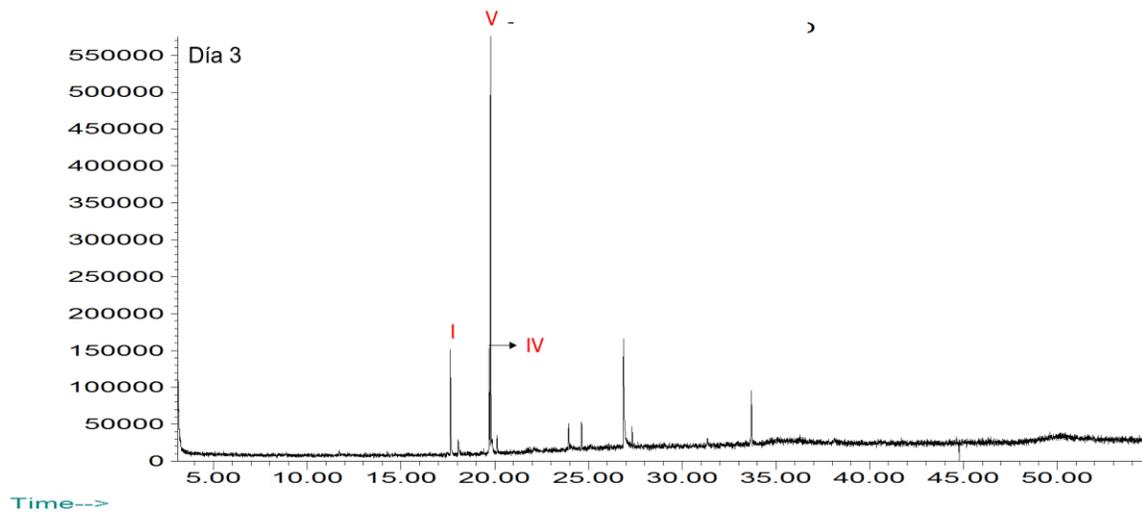


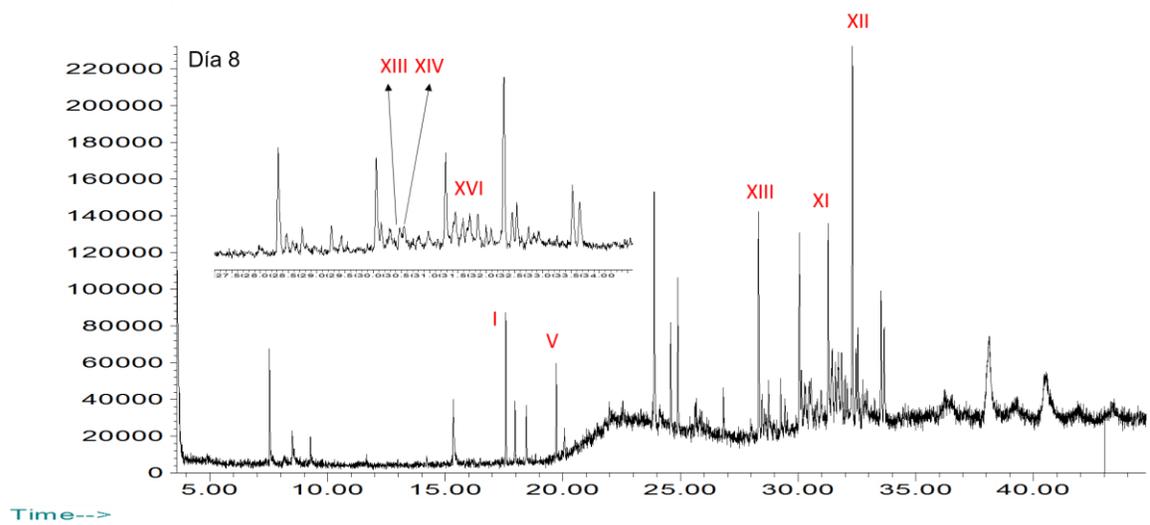
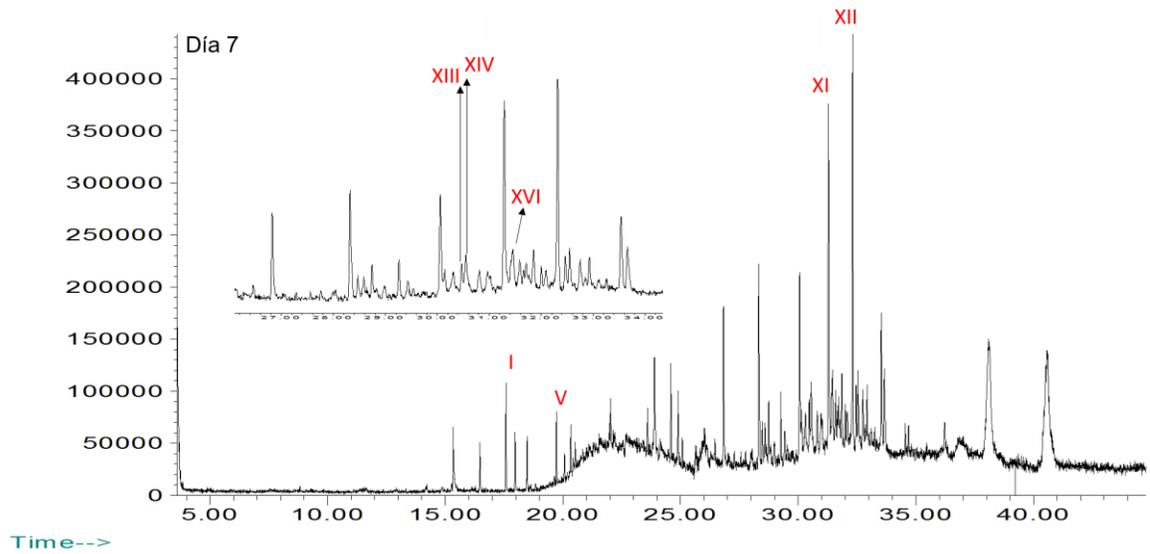
Número	Compuesto
I	Palmitato de etilo
II	Ácido palmítico
III	Palmitato de etilo
IV	Linoleato de metilo
V	Oleato de metilo
VI	Estearato de metilo
VII	Ácido linoleico
VIII	Ácido oleico
IX	Ácido esteárico
X	Ergosterol
XI	Estigmast-5-en-3 $\beta$ -ol
XII	Estigmast-5-en-3-ona

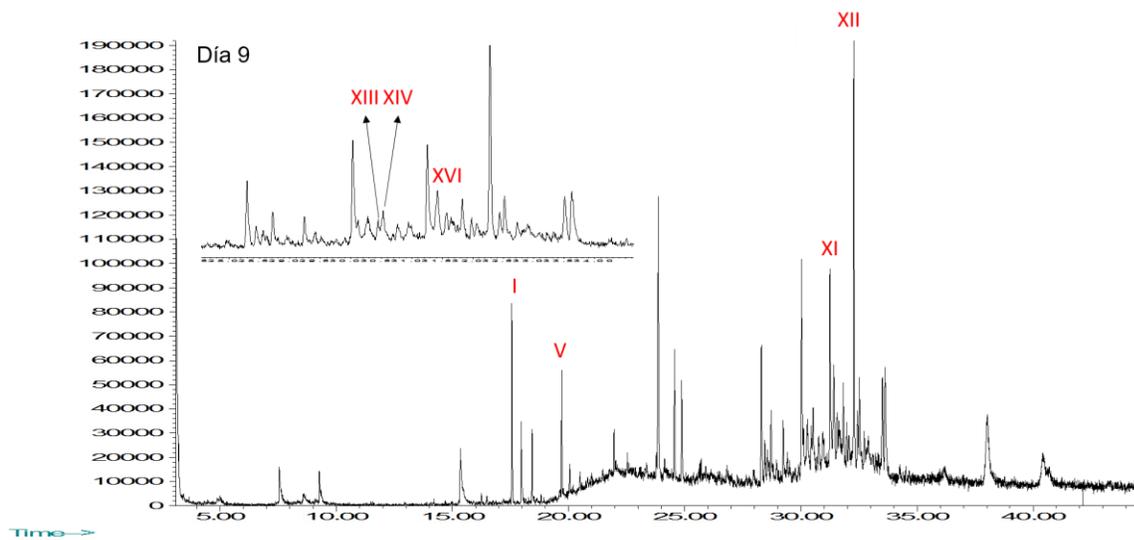
Anexo B: TIC de la composición del *P. eryngii* a lo largo de una FEL.

## B. Anexo B: TIC de la composición del *P. eryngii* a lo largo de una FEL.



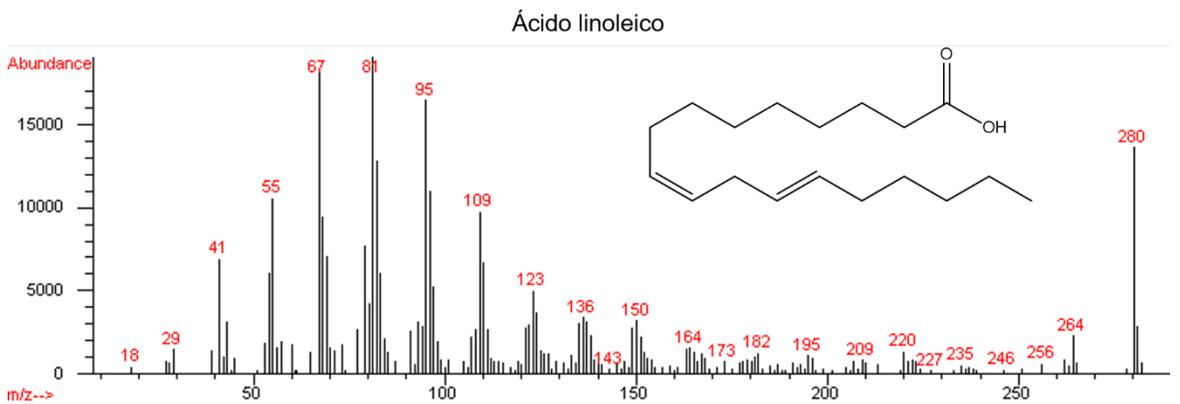
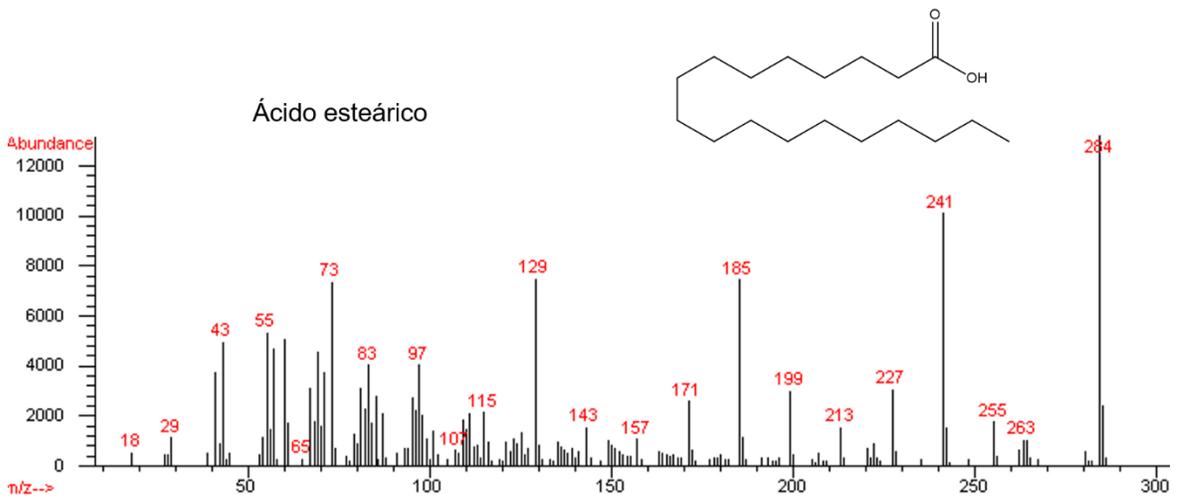


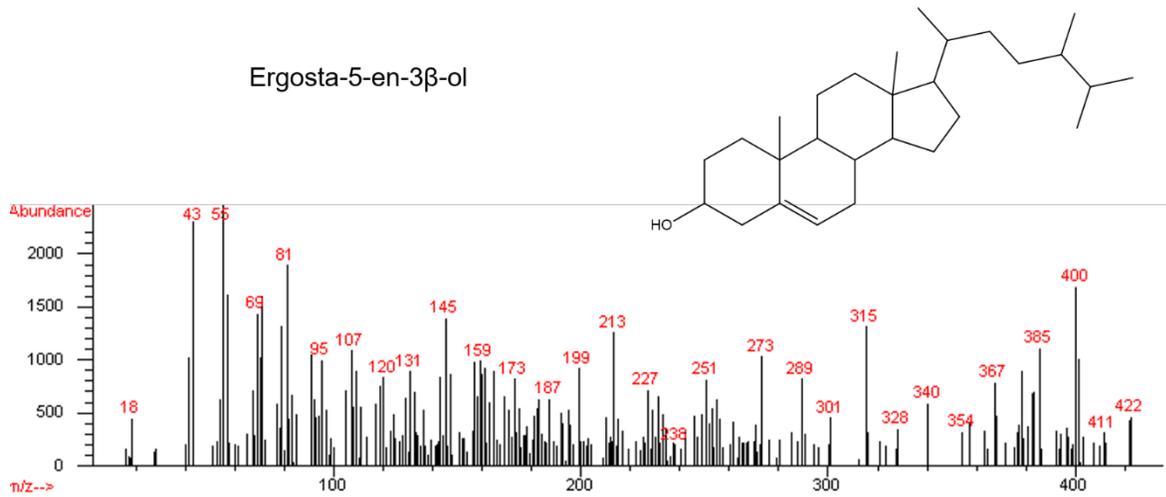
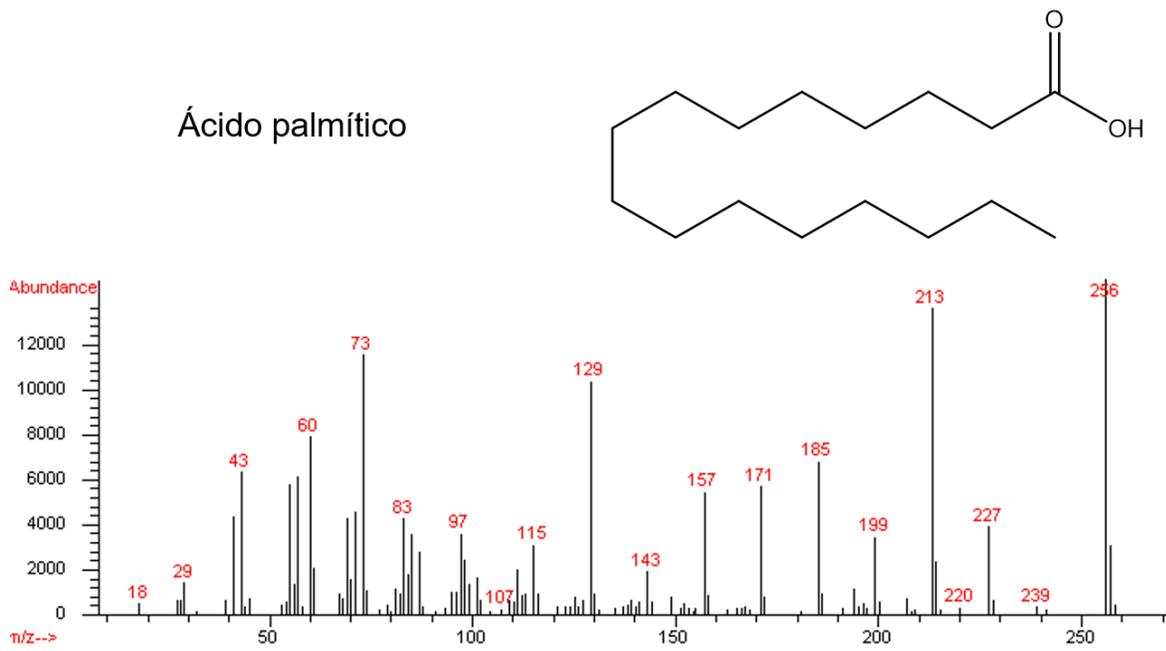
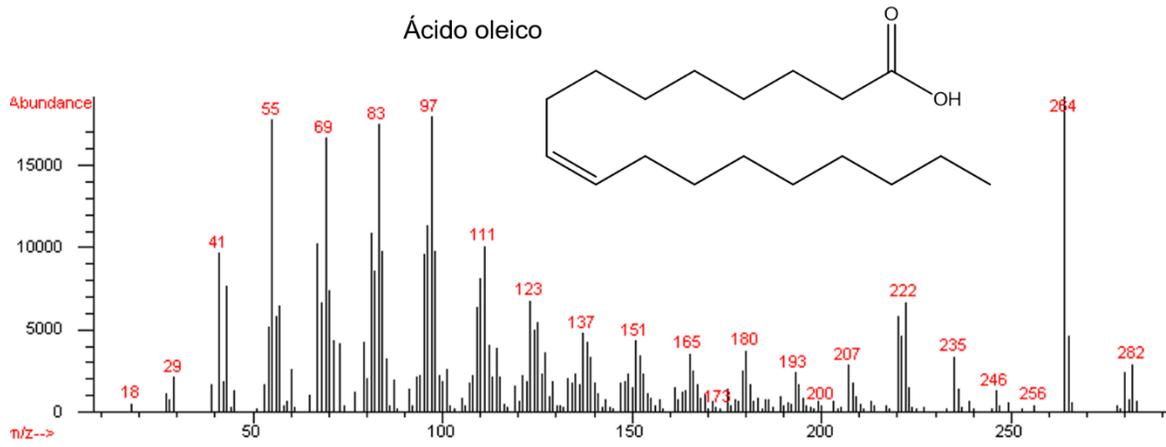


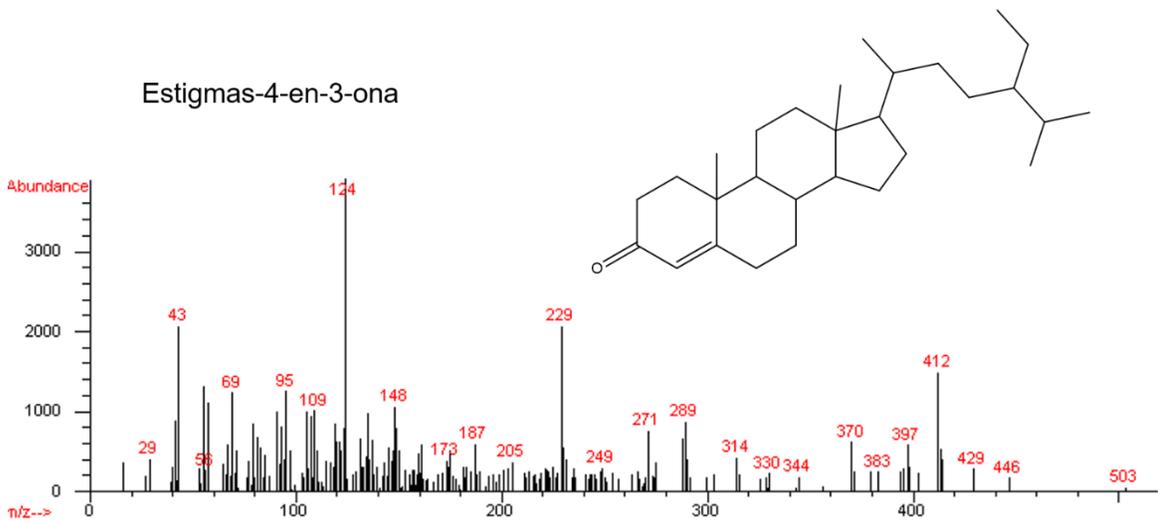
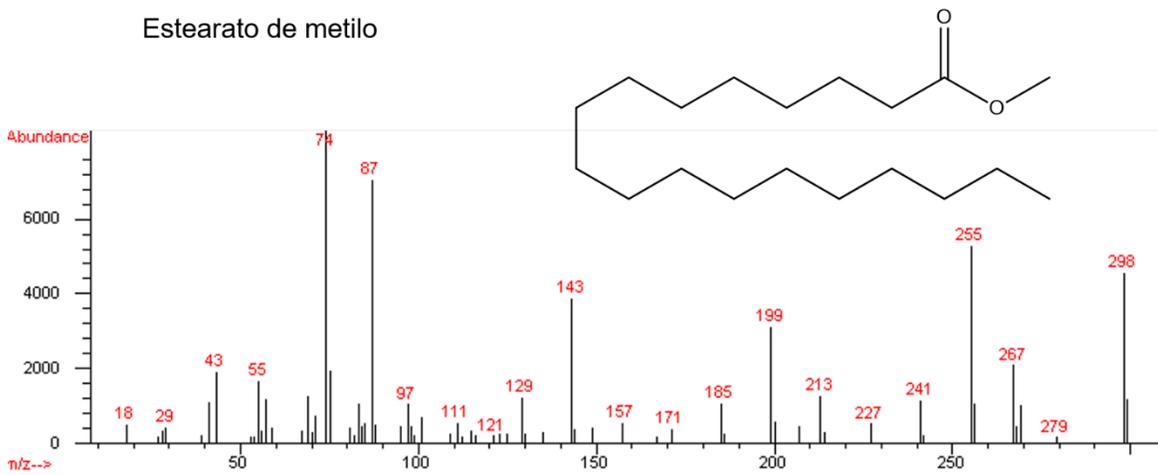
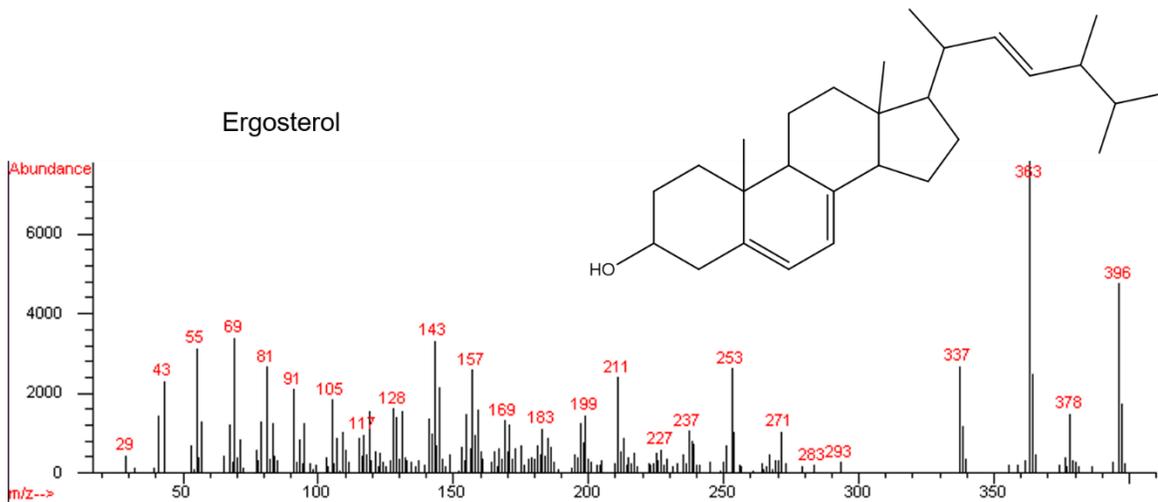


Número	Compuesto
I	Palmitato de etilo
II	Oleato de metilo
III	Linoleato de metilo
IV	Estearato de metilo
V	Palmitato de etilo
VI	Ácido palmítico
VII	Ácido oleico
VIII	Ácido linoleico
IX	Ácido esteárico
X	Ergosterol
XI	Estigmast-5-en-3 $\beta$ -ol
XII	Estigmast-4-en-3-ona
XIII	Ergosta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol
XIV	Ergosta-5-en-3 $\beta$ -ol
XV	Estigmast-5,22-dien-3 $\beta$ -ol
XVI	Amirina

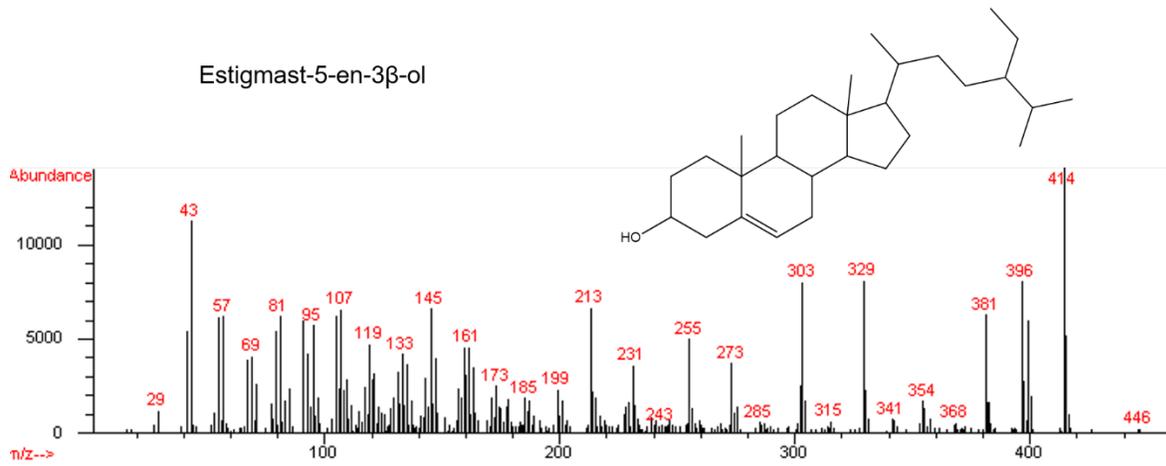
## C. Anexo: Espectros de masas de los diferentes compuestos



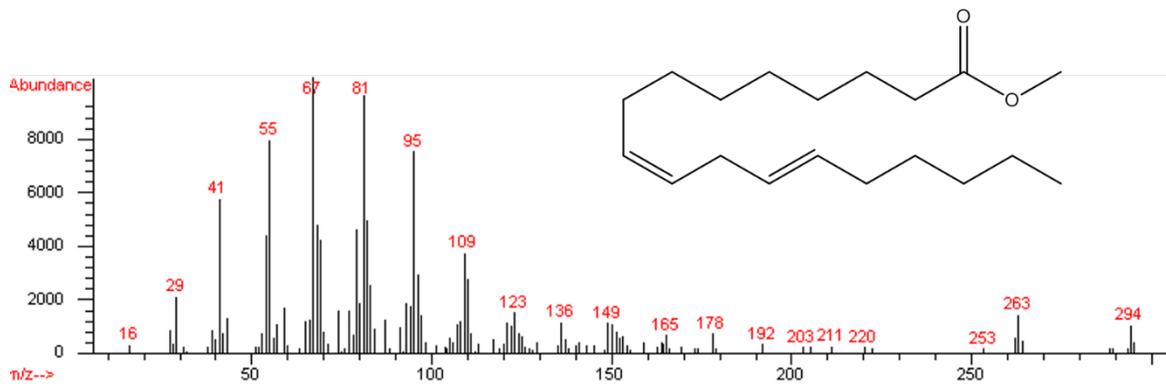


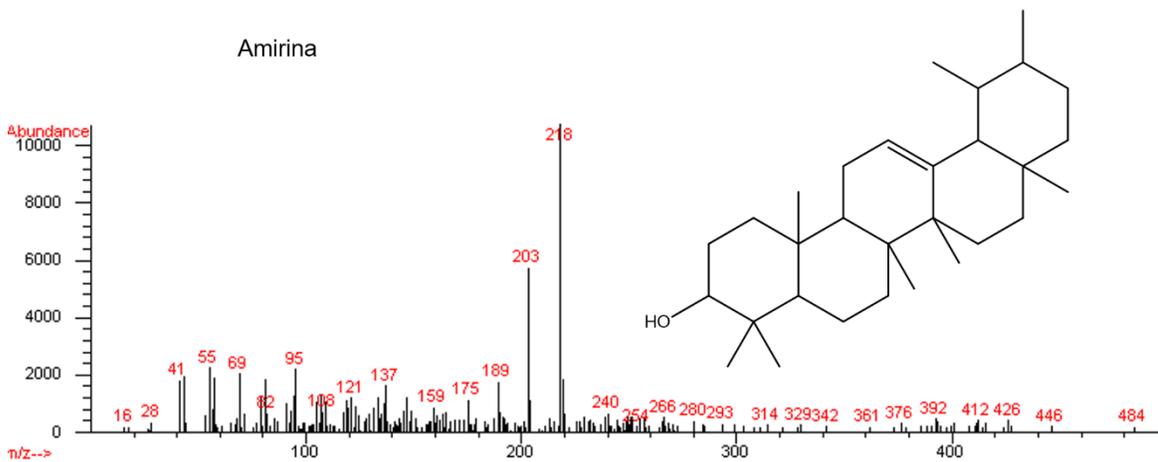
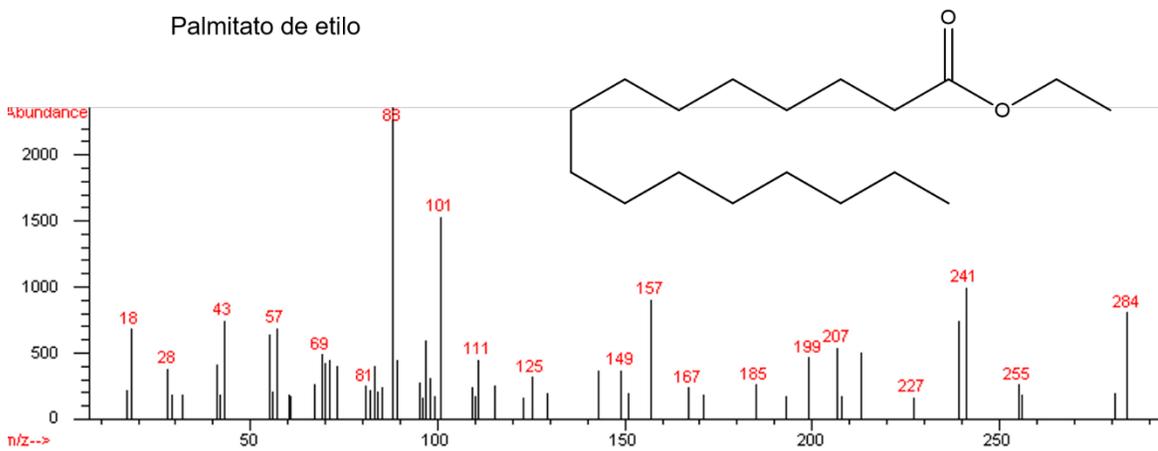
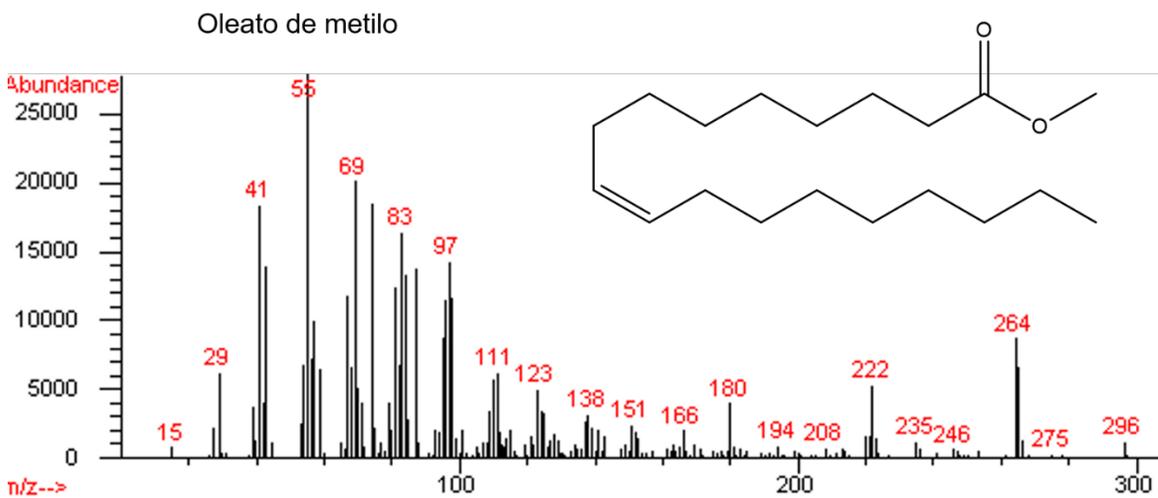


Estigmast-5-en-3 $\beta$ -ol



Linoleato de metilo







## Bibliografía

- (IFPR), I. F. P. R. I. (2016). *From promise to impact ending malnutrition by 2030*. Washington DC: Global Nutrition Report 2016.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2499/9780896295841>
- Alexander-Lindo, R. L., Morrison, E. Y. S. A., & Nair, M. G. (2004). Hypoglycaemic effect of stigmast-4-en-3-one and its corresponding alcohol from the bark of *Anacardium occidentale* (cashew). *Phytotherapy Research*, *18*(5), 403–407.  
<https://doi.org/10.1002/ptr.1459>
- Alves, M., Ferreira, I. F. R., Dias, J., Teixeira, V., Martins, A., & Pintado, M. (2012). A review on antimicrobial activity of mushroom (basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Planta Medica*, *78*(16), 1707–1718. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1315370>
- Avci, E., Avci, G. A., & Kose, D. A. (2014). Determination of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Medically Important Mushrooms Using Different Solvents and Chemical Composition via GC / MS Analyses. *Journal of Food and Nutrition Research*, *2*(8), 429–434. <https://doi.org/10.12691/jfnr-2-8-1>
- Baby, S., Johnson, A. J., & Govindan, B. (2015). Phytochemistry Secondary metabolites from *Ganoderma*. *Phytochemistry*, *114*, 66–101.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.03.010>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibensouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *6*(2), 71–79.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Barros, L., Falcão, S., Baptista, P., Freire, C., Vilas-Boas, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2008). Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chemistry*, *111*(1), 61–66.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.033>
- Belinky, P. A., Masaphy, S., Levanon, D., Hadar, Y., & Dosoretz, C. G. (1994). Effect of medium composition on 1-octen-3-ol formation in submerged cultures of *Pleurotus pulmonarius*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *40*(5), 629–633.  
<https://doi.org/10.1007/BF00173319>
- 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.  
<https://doi.org/10.1023/A:1016235122611>
- Bisen, P. S., Baghel, R. K., Sanodiya, B. S., Thakur, G. S., & Prasad, G. B. K. S. (2010).

Lentinus edodes: a macrofungus with pharmacological activities. *Current Medicinal Chemistry*, 17(22), 2419–2430. <https://doi.org/10.2174/092986710791698495>

Brizuela, M., García, L., Pérez, L., & Mansur, M. (1998). Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Rev Iberoam Micol*, 15, 69–74. Retrieved from <http://sites.google.com/site/microbiologytec/hongos/BASIDIOMICETOS.pdf>

Çağlarımak, N. (2007). The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula edodes* and *Pleurotus* species) and an estimated approach to the volatile compounds. *Food Chemistry*, 105(3), 1188–1194. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.021>

Carrera-Martinez, N, C., M, S., & P, M. (2010). *Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y perspectivas del siglo XXI. 1.* Mexico. Retrieved from [books.google.com.co/books?id=k3Ev9gzvlikC&pg=PA79&dq=hongos+basidiomicetos&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjn5eQ\\_qLOAhVNax4KHTWnCHcQ6AEIHDAA#v=onepage&q=hongos basidiomicetos&f=true](https://books.google.com.co/books?id=k3Ev9gzvlikC&pg=PA79&dq=hongos+basidiomicetos&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjn5eQ_qLOAhVNax4KHTWnCHcQ6AEIHDAA#v=onepage&q=hongos%20basidiomicetos&f=true)

Chang, B. V., & Chang, Y. M. (2016). Biodegradation of toxic chemicals by *Pleurotus eryngii* in submerged fermentation and solid-state fermentation. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 49(2), 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.04.012>

Chegwin-Angarita, C. (2014). M.Sc. Carolina Chegwin Angarita.

Chegwin-Angarita, C., & Nieto-Ramírez, I. J. (2014a). 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. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072014000100010>

Chegwin-Angarita, C., & Nieto-Ramírez, I. J. (2014b). 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. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072014000100010>

Chegwin Angarita, C. (2014). *INCIDENCIA DEL MEDIO Y DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO EN EL POTENCIAL COMO NUTRICEÚTICO DE TRES ESPECIES DEL GENERO Pleurotus.* Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá-Colombia. Retrieved from [internal-pdf://213.204.148.226/Tesis Profe Carolina Chegwin.pdf](https://internal-pdf://213.204.148.226/Tesis%20Profe%20Carolina%20Chegwin.pdf)

Chen, H. B., Chen, C. I., Chen, M. J., Lin, C. C., Kan, S. C., Zang, C. Z., ... Liu, Y. C. (2013). The use of mushroom hydrolysate from waste bag-log as the nitrogen source to mycelium biomass and exopolysaccharide production in *Pleurotus eryngii* cultivation. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(2), 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2012.11.006>

Chen, Y. K., Kuo, Y. H., Chiang, B. H., Lo, J. M., & Sheen, L. Y. (2009). Cytotoxic activities of 9,11-dehydroergosterol peroxide and ergosterol peroxide from the

- fermentation mycelia of *Ganoderma lucidum* cultivated in the medium containing leguminous plants on Hep 3B cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(13), 5713–5719. <https://doi.org/10.1021/jf900581h>
- Cheng, C. R., Yue, Q. X., Wu, Z. Y., Song, X. Y., Tao, S. J., Wu, X. H., ... Guo, D. A. (2010). Cytotoxic triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 71(13), 1579–1585. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.06.005>
- Cheng, Z. Bin, Xiao, H., Fan, C. Q., Lu, Y. N., Zhang, G., & Yin, S. (2013). Bioactive polyhydroxylated sterols from the marine sponge *Haliclona crassiloba*. *Steroids*, 78(14), 1353–1358. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2013.10.004>
- Cheung, P. C. K. (2010). The nutritional and health benefits of mushrooms. *Nutrition Bulletin*, 35, 292–299. <https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2010.01859.x>
- CLSI. (2009). Normas para realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos con discos.
- Corra, R. C. G., Brugnari, T., Bracht, A., Peralta, R. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp. (Oyster mushroom) related with its chemical composition: A review on the past decade findings. *Trends in Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.012>
- Cucaita Velandia, E. del P. (2007). *Estudio químico comparativo de metabolitos secundarios de hongos comestibles Laccaria laccata y Lentinula edodes y determinación de su variación respecto al estadio del hongo*. Universidad Nacional de Colombia-Bogotá.
- De Silva, D. D., Rapior, S., Sudarman, E., Stadler, M., Xu, J., Aisyah Alias, S., & Hyde, K. D. (2013). Bioactive metabolites from macrofungi: Ethnopharmacology, biological activities and chemistry. *Fungal Diversity*, 62(1), 1–40. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0265-2>
- Desbois, A. P., & Smith, V. J. (2010). Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1629–1642. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2355-3>
- Dewick, P. (2002). *A Biosynthetic Approach* (second, Vol. 5).
- Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Aggelis, G., & Philippoussis, A. (2016). Adaptation of *Volvariella volvacea* metabolism in high carbon to nitrogen ratio media. *Food Chemistry*, 196, 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.027>
- Dilika, F., Bremner, P. D., & Meyer, J. J. M. U. (2000). Antibacterial activity of linoleic and oleic acids isolated from *Helichrysum pedunculatum* : a plant used during circumcision rites. *Fitoterapia*, 71, 450–452.
- Donini, L. P., Bernardi, E., & Do Nascimento, J. S. (2006). Desenvolvimento in vitro de *Agaricus brasiliensis* em meios suplementados com diferentes farelos. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 41(6), 995–999. <https://doi.org/10.1590/S0100->

204X2006000600015

- Dyakov, M. Y., Kamzolkina, O. V, Shtaer, O. V, Bis'ko, N. A., Poedinok, N. L., Mikhailova, O. B., ... Efremenkova, O. V. (2011). Morphological characteristics of natural strains of certain species of basidiomycetes and biological analysis of antimicrobial activity under submerged cultural conditions. *Microbiology*, *80*(2), 274–285. <https://doi.org/10.1134/s0026261711020044>
- El-Kattan, M. H., & El-Sayed, S. A. (1988). Submerged Production of the Edible Fungi *Pleurotus sajor-caju* at Different pH Levels. *Zentralblatt Für Mikrobiologie*. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0232-4393\(88\)80089-1](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0232-4393(88)80089-1)
- FAO (Food and Agriculture Organisation of the United States). (2007). FAO Stat Database. Retrieved from [www.faostatfao.org/default.aspx](http://www.faostatfao.org/default.aspx)
- Fasidi, I. O. (1996). Studies on *Volvariella esculenta* (Mass) Singer: Cultivation on agricultural wastes and proximate composition of stored mushrooms. *Food Chemistry*, *55*(2), 161–163. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00082-8](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00082-8)
- Fasola, T. R., Gbolagade, J. S., & Fasidi, I. O. (2007). Food Chemistry Nutritional requirements of *Volvariella speciosa* (Fr. Ex. Fr.) Singer, a Nigerian edible mushroom. *Food Chemistry*, *100*, 904–908. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.061>
- Fazenda, M. L., Seviour, R., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2008a). Submerged Culture Fermentation of “Higher Fungi”: The Macrofungi. In S. S. Allen I. Laskin & M. G. Geoffrey (Eds.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. Volume 63, pp. 33–103). Academic Press. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164\(07\)00002-0](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164(07)00002-0)
- Fazenda, M. L., Seviour, R., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2008b). Submerged Culture Fermentation of “Higher Fungi”: The Macrofungi. *Advances in Applied Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(07\)00002-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(07)00002-0)
- Ferreira, I. C. F. R., Heleno, S. A., Reis, F. S., Stojkovic, D., Queiroz, M. J. R. P., Vasconcelos, M. H., & Sokovic, M. (2015). Chemical features of *Ganoderma polysaccharides* with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities. *Phytochemistry*, *114*, 38–55. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.10.011>
- Gaitán-Hernández, R. (2005). Evaluación in vitro del hongo comestible *Pleurotus eryngii*: Efecto de diferentes suplementos orgánicos en el crecimiento micelial y producción de cuerpos fructíferos. *Revista Mexicana de Micología*, (21), 77–84.
- Gan, K.-H., Kuo, S.-H., & Lin, C.-N. (1998). Steroidal Constituents of *Ganoderma applanatum* and *Ganoderma neo-japonicum*. *Journal of Natural Products*, *61*(11), 1421–1422. <https://doi.org/10.1021/np980184j>
- Gao, H., & Gu, W.-Y. (2007a). Optimization of polysaccharide and ergosterol production from *Agaricus brasiliensis* by fermentation process. *Biochemical Engineering*

- Journal*, 33, 202–210. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.10.022>
- Gao, H., & Gu, W.-Y. (2007b). Optimization of polysaccharide and ergosterol production from *Agaricus brasiliensis* by fermentation process. *Biochemical Engineering Journal*, 33(3), 202–210. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2006.10.022>
- Gern, R. M. M., Wisbeck, E., Rampinelli, J. R., Ninow, J. L., & Furlan, S. A. (2008). Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. *Bioresource Technology*, 99(1), 76–82. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.059>
- Grandmougin-Ferjani, A., Dalpé, Y., Hartmann, M. A., Laruelle, F., & Sancholle, M. (1999). Sterol distribution in arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytochemistry*, 50(6), 1027–1031. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00636-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00636-0)
- Gutiérrez, P., Martha, R., Martha, R., & Gutiérrez, P. (2005). Actividad antimicrobiana de ácidos grasos aislados de *Tubifex tubifex*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 36(1), 5–10.
- Guzman, G. (1990). *Identificación de los hongos comestibles, venenosos y alucinantes* (Quinta). México.
- Gyawali, R., & Ibrahim, S. A. (2014a). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46(0), 412–429. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.047>
- Gyawali, R., & Ibrahim, S. A. (2014b). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.047>
- Hamann, S., Lehnert, K., & Vetter, W. (2016). Esterified sterols and their contribution to the total sterols in edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*, 54, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.10.002>
- Hamza, A., Zouari, N., Zouari, S., Jdir, H., Zaidi, S., Gtari, M., & Neffati, M. (2016). Nutraceutical potential, antioxidant and antibacterial activities of *Terfezia boudieri* Chatin, a wild edible desert truffle from Tunisia arid zone. *Arabian Journal of Chemistry*, 9(3), 383–389. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.06.015>
- Hatvani, N., Hasegawa, R. H., Catarina, M., Kasuya, M., Cristina, M., Vanetti, D., ... Ferreira, I. C. F. R. (2005). Evaluación in vitro del hongo comestible *Pleurotus eryngii*: Efecto de diferentes suplementos orgánicos en el crecimiento micelial y producción de cuerpos fructíferos. *Revista Mexicana de Micología*, 50(21), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.012>
- Hearst, M., Nelson, D., Mccollum, G., Ballard, L. M., Millar, B. C., Moore, S., ... Rao, J. R. (2010). Antimicrobial properties of protein extracts from wild mushroom fungi and native plant species against hospital pathogens. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 2(December), 103–107. Retrieved from <http://www.academicjournals.org/jpp>

- Hu, J., Song, Y., Li, H., Mao, X., Zhao, Y., Shi, X., & Yang, B. (2014). Antibacterial and cytotoxic triterpenoids from the ethanol extract of *Dysoxylum densiflorum* (Blume) Miq. *Phytochemistry Letters*, *10*, 219–223. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.09.015>
- Huang, C. B., George, B., & Ebersole, J. L. (2010). Antimicrobial activity of n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms. *Archives of Oral Biology*, *55*(8), 555–560. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.05.009>
- Humfeld, H. (1948). The Production of Mushroom Mycelium (*Agaricus campestris*) in submerged Culture. *Science*, *107*. Retrieved from internal-pdf://0.116.212.12/The Production of Mushroom Mycelium (*Agaricus*).pdf
- Jain, S. C., Singh, B., & Jain, R. (2001). Antimicrobial activity of triterpenoids from *Heliotropium ellipticum*. *Fitoterapia*, *72*, 666–668.
- Jennings, D. H. (1995). *The physiology of fungal nutrition*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511525421>
- Jeong, Y. T., Jeong, S. C., Gu, Y. A., Islam, R., & Song, C. H. (2010). Antitumor and immunomodulating activities of Endo-biopolymers obtained from a submerged culture of *Pleurotus eryngii*. *Food Science and Biotechnology*, *19*(2), 399–404. <https://doi.org/10.1007/s10068-010-0056-4>
- Jing, N., Shi, J., Li, G., Sun, Z., & You, J. (2012). Determination of fatty acids from mushrooms using high performance liquid chromatography with fluorescence detection and online mass spectrometry. *FRIN*, *48*(1), 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.02.014>
- Jingjing, C., Dong, M., Yangyang, Y., Jieli, L., Hua, W., & Ling, L. (2012). Hepatoprotective and hypolipidemic effects of water-soluble polysaccharidic extract of *Pleurotus eryngii*. *Food Chemistry*, *130*(3), 687–694. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.110>
- Jo, H., Han, J. Y., Hwang, H., & Choi, Y. E. (2016).  $\beta$ -Amyrin synthase (EsBAS) and  $\beta$ -amyrin 28-oxidase (CYP716A244) in oleanane-type triterpene saponin biosynthesis in *Eleutherococcus senticosus*. *Phytochemistry*, *135*, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.12.011>
- Jonathan, S. G., & Fasidi, I. O. (2001). Effect of carbon, nitrogen and mineral sources on growth of *Psathyrella atroumbonata* (Pegler), a Nigerian edible mushroom. *Food Chemistry*, *72*, 479–483.
- Karaman, M., Jovin, E., Malbaša, R., Matavuly, M., & Popović, M. (2010). Medicinal and edible lignicolous fungi as natural sources of antioxidative and antibacterial agents. *Phytotherapy Research*, *24*(10), 1473–1481. <https://doi.org/10.1002/ptr.2969>
- Keller, A. C., Maillard, M. P., & Hostettmann, K. (1996). Antimicrobial steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola*. *Phytochemistry*, *41*(4), 1041–1046.

- [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00762-8](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(95)00762-8)
- Kikuchi, T., Maekawa, Y., Tomio, A., Masumoto, Y., Yamamoto, T., In, Y., ... Tanaka, R. (2016). Six new ergostane-type steroids from king trumpet mushroom ( *Pleurotus eryngii* ) and their inhibitory effects on nitric oxide production. *Steroids*, *115*, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.07.005>
- Kim, K. H., Choi, J. W., Choi, S. U., & Lee, K. R. (2010). Antibacterial Compounds from Mushrooms II: Lanostane Triterpenoids and an Ergostane Steroid with Activity Against *Bacillus cereus* Isolated from *Fomitopsis pinicola*. *Planta Medica*, *76*(5), 464–466. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1186194>
- Kimatu, B. M., Zhao, L., Biao, Y., Ma, G., Yang, W., Pei, F., & Hu, Q. (2017). Antioxidant potential of edible mushroom ( *Agaricus bisporus* ) protein hydrolysates and their ultrafiltration fractions. *Food Chemistry*, *230*, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.030>
- Kundu, A. P. (1994). <sup>13</sup>C Nmr Spectra of Pentacyclic Triterpenoids-a and Some Salient Features. *Phytochemistry*, *37*(6), 1. 1An T.T. and Thu T.N.H. (2006), Hóa phân tích, [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89569-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89569-2)
- Lakhanpal, T. N., & Rana, M. (2005). Medicinal and nutraceutical genetic resources of mushrooms, *3*(2), 288–303. <https://doi.org/10.1079/PGR200581>
- Lakhtar, H., Ismaili-Alaoui, M., Philippoussis, A., Perraud-Gaime, I., & Roussos, S. (2010). Screening of strains of *Lentinula edodes* grown on model olive mill wastewater in solid and liquid state culture for polyphenol biodegradation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *64*(3), 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.10.006>
- Lee, B. C., Bae, J. T., Pyo, H. B., Choe, T. B., Kim, S. W., Hwang, H. J., & Yun, J. W. (2004). Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, *35*(5), 369–376. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.12.015>
- Lee, J. S., Jung, W. C., Park, S. J., Lee, K. E., Shin, W. C., & Hong, E. K. (2013). Culture conditions and medium components for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides with *Paecilomyces japonica* in liquid culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *115*(4), 433–437. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.10.022>
- 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. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.04.009>
- Lee, Y.-L., Huang, G.-W., Liang, Z.-C., & Mau, J.-L. (2007). Antioxidant properties of three extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. *LWT - Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.04.002>
- Li, S., & Shah, N. P. (2014). Antioxidant and antibacterial activities of sulphated

- polysaccharides from *Pleurotus eryngii* and *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. *Food Chemistry*, 165, 262–270. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.110>
- Lin, E.-S., Wang, C.-C., & Sung, S.-C. (2006). Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.002>
- Liu, X.-T., Winkler, A., Schwan, W., Volk, T., Rott, M., & Monte, A. (2010). Antibacterial Compounds from Mushrooms I: A Lanostane-Type Triterpene and Prenylphenol Derivatives from *Jahnoporus hirtus* and *Albatrellus flettii* and Their Activities Against *Bacillus cereus* and *Enterococcus faecalis*. *Planta Medica*, 76(2), 182–185. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1186001>
- Liu, Y. W., Mei, H. C., Su, Y. W., Fan, H. T., Chen, C. C., & Tsai, Y. C. (2014). Inhibitory effects of *Pleurotus tuber-regium* mycelia and bioactive constituents on LPS-treated RAW 264.7 cells. *Journal of Functional Foods*, 7(1), 662–670. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.12.019>
- Lv, H., Kong, Y., Yao, Q., Zhang, B., Leng, F. wei, Bian, H. jiao, ... Bao, J. ku. (2009). Nebrodeolysin, a novel hemolytic protein from mushroom *Pleurotus nebrodensis* with apoptosis-inducing and anti-HIV-1 effects. *Phytomedicine*, 16(2–3), 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.07.004>
- Malheiro, R., Guedes de Pinho, P., Soares, S., César da Silva Ferreira, A., & Baptista, P. (2013). Volatile biomarkers for wild mushrooms species discrimination. *Food Research International*, 54(1), 186–194. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.010>
- Manu-Tawiah, W., & Martin, A. M. (1987). Chemical composition of *Pleurotus ostreatus* mycelial biomass. *Food Microbiology*, 4(4), 303–310. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0740-0020\(87\)80004-7](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0740-0020(87)80004-7)
- Maria, R., Gern, M., Wisbeck, E., Rampinelli, J. R., Ninow, J. L., & Furlan, S. A. (2007). Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.059>
- Mariga, A. M., Pei, F., Yang, W., Zhao, L., Shao, Y., Mugambi, D. K., & Hu, Q. (2014). Immunopotential of *Pleurotus eryngii* (DC. ex Fr.) Quel. *Journal of Ethnopharmacology*, 153(3), 604–614. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.03.006>
- Martínez-Carrera. (2000). Mushroom biotechnology in tropical America. *International Journal of Mushroom Sciences*, 3(1), 9–20.
- Masaphy, S., Levanon, D., & Henis, Y. (1996). Degradation of atrazine by the lignocellulolytic fungus *Pleurotus pulmonarius* during solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 56(2–3), 207–214. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00026-0](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524(96)00026-0)

- Mehrdad Jafarpour, A. J. and S. E. (2011). High Fiber media as the most efficient substrates for *Pleurotus florida* culture . *Archives of Biological Sciences*, 63(3), 889–895. <https://doi.org/10.2298/ABS1103889J>
- Meng, T.-X., Furuta, S., Fukamizu, S., Yamamoto, R., Ishikawa, H., Arung, E. T., ... Kondo, R. (2011). Evaluation of biological activities of extracts from the fruiting body of *Pleurotus citrinopileatus* for skin cosmetics. *Journal of Wood Science*, 57(5), 452. <https://doi.org/10.1007/s10086-011-1192-z>
- Mesa C. Urdaneta, Octoban; Rodríguez de Valero, Sofía; Fernandez, Viluzca; León de Pinto, Gladysz; Villalobos, Rafael, L. M. (2011). Comportamiento de *Malassezia furfur* en medios de cultivo con base en los exudados gomosos de *Spondias dulcis* y *Spondias mombin*. Producción de lipasa extracelular. *Kasmera*, 39(1), 10–18. Retrieved from [internal-pdf://61.151.238.3/Acidos grasos y aprovechamiento de carbohidrat.pdf](internal-pdf://61.151.238.3/Acidos%20grasos%20y%20aprovechamiento%20de%20carbohidrat.pdf)
- Miles., P. G., & Chang., S.-T. (2004). *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. (S. Edition, Ed.), CRC Press. United States of America. Retrieved from [internal-pdf://95.197.88.88/mushrooms cultivate.pdf](internal-pdf://95.197.88.88/mushrooms%20cultive.pdf)
- Miles, P., & Chang, S.-T. (1999). *Biología de las setas: Fundamentos básicos y acontecimientos actuales*. (P. Edición, Ed.), World Scientific. Hong Kong.
- Moonmoon, M., Uddin, M. N., Ahmed, S., Shelly, N. J., & Khan, M. A. (2010). Cultivation of different strains of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) on saw dust and rice straw in Bangladesh. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 17(4), 341–345. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.05.004>
- Moore, D., & Frazer, L. (2002). *Essential Fungal Genetics*. *Essential Fungal Genetics*. <https://doi.org/10.1017/S0016672303216165>
- NAIR, N. G., SONG, C. H., JIANG, J. Y., VINE, J. H., TATTUM, B., & CHO, K. Y. (1989). Lipid profile of *Pleurotus sajor caju*. *Annals of Applied Biology*, 114(1), 167–176. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1989.tb06797.x>
- Ng, M., & Yap, A. (2002). Inhibition of human colon carcinoma development by lentinan from shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*). *Journal of Alternative and Complementary Medicine (New York, N.Y.)*, 8(5), 581–589. <https://doi.org/10.1089/107555302320825093>
- Nieto, I. J., & Carolina Chegwin, A. (2008). Triterpenoids and fatty acids identified in the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 53(2), 1515–1517. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072008000200015>
- Nieto, I. J., & Chegwin-Angarita, C. (2013). THE EFFECT OF DIFFERENT SUBSTRATES ON TRITERPENOIDS AND FATTY ACIDS IN FUNGI OF THE GENUS *Pleurotus*. *Journal Chilean Chemical Society*, 58(1).
- Okamoto, T., Kodoi, R., Nonaka, Y., Fukuda, I., & Hashimoto, T. (2004). Lentinan from shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) suppresses expression of cytochrome P450 1A subfamily in the mouse liver. *BioFactors*, 21, 407–409.

- Öztürk, M., Tel-çayan, G., Muhammad, A., & Duru, M. E. (2015). *Mushrooms : A Source of Exciting Bioactive Compounds* (Vol. 45). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63473-3.00010-1>
- Öztürk, M., Tel-Çayan, G., Muhammad, A., Terzioğlu, P., & Duru, M. E. (2015). Chapter 10 - Mushrooms: A Source of Exciting Bioactive Compounds. In R. Atta ur (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. Volume 45, pp. 363–456). Elsevier. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63473-3.00010-1>
- Papaspyridi, L.-M., Aligiannis, N., Christakopoulos, P., Skaltsounis, A.-L., & Fokialakis, N. (2011). Production of bioactive metabolites with pharmaceutical and nutraceutical interest by submerged fermentation of *Pleurotus ostreatus* in a batch stirred tank bioreactor. *Italian Oral Surgery*, *1*(1), 1746–1752. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.257>
- Papaspyridi, L.-M., Katapodis, P., Gonou-Zagou, Z., Kapsanaki-Gotsi, E., & Christakopoulos, P. (2010a). Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibres content by *Pleurotus ostreatus* ATHUM 4438 under submerged culture. *Biochemical Engineering Journal*, *50*, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.04.008>
- Papaspyridi, L.-M., Katapodis, P., Gonou-Zagou, Z., Kapsanaki-Gotsi, E., & Christakopoulos, P. (2010b). Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibres content by *Pleurotus ostreatus* ATHUM 4438 under submerged culture. *Biochemical Engineering Journal*, *50*(3), 131–138. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2010.04.008>
- Pattar, M. (2010). *Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of western ghats of Karnataka, India* (Vol. 2). <https://doi.org/10.4103/0974-8490.62953>
- Pereira, E., Santos, A., Reis, F. S. F., Tavares, R. M., Baptista, P., Lino-Neto, T., ... Monte, A. (2013). Evaluation of biological activities of extracts from the fruiting body of *Pleurotus citrinopileatus* for skin cosmetics. *Food Chemistry*, *49*(1), 69–74. <https://doi.org/10.1007/s10086-011-1192-z>
- Popova, M., Trusheva, B., Gyosheva, M., Tsvetkova, I., & Bankova, V. (2009). Antibacterial triterpenes from the threatened wood-decay fungus *Fomitopsis rosea*. *Fitoterapia*, *80*, 263–266. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.02.008>
- Purnomo, A. S., Mori, T., Putra, S. R., & Kondo, R. (2013). Biotransformation of heptachlor and heptachlor epoxide by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *82*(0), 40–44. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.02.013>
- Rahman, T., & Choudhury, M. (2012). Shiitake Mushroom: A Tool of Medicine. *Bangladesh J Med Biochem*, *5*(1), 24–32.
- Reis, F. S., Barros, L., Martins, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Chemical composition

- and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study. *FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY*, 50, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.10.056>
- Ren, D., Wang, N., Guo, J., Yuan, L., & Yang, X. (2016). Chemical characterization of *Pleurotus eryngii* polysaccharide and its tumor-inhibitory effects against human hepatoblastoma HepG-2 cells. *Carbohydrate Polymers*, 138, 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.051>
- Ribeiro, B., Guedes De Pinho, P., Andrade, P. B., Baptista, P., & Valentão, P. (2009). Fatty acid composition of wild edible mushrooms species: A comparative study. *Microchemical Journal*, 93, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2009.04.005>
- Rizki, M., & Tamai, Y. (2011). Effects of different nitrogen rich substrates and their combination to the yield performance of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(7), 1695–1702. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0624-z>
- 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, 909–916. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.02.005>
- 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. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.02.005>
- Rojas, R. J. (2012). *Estudio químico y de potencial antimicrobiano del estípite de shiitake (Lentinula edodes) y su factibilidad de empleo como ingrediente nutraceútico en la preparación de alimento aviar*. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá, Bogotá-Colombia. Retrieved from internal-pdf://66.53.19.97/01197537.2012.pdf
- 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, 687–709. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.05.003>
- Sarangi, I., Ghosh, D., Bhutia, S. K., Mallick, S. K., & Maiti, T. K. (n.d.). Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2006.04.002>
- Schémaeza, B., Somda, I., Sereme, P., Adam, T., & Ouedraogo, A. (2013). Effects of Temperature and pH on Mycelium growth of *Phoma sorghina* Boerema Dorenbosch and Van Kesteren in vitro. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 1(24), 2054–2057. Retrieved from <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/Projects00/temph/enzyme.html>
- Scicchitano, P., Cameli, M., Maiello, M., Amedeo, P., Lorenza, M., Novo, S., ... Riabilitazione, P. (2014). Nutraceuticals and dyslipidaemia : Beyond the common therapeutics. *Journal of Functional Foods*, 6, 11–32.

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.12.006>

- Seki, H., Sawai, S., Ohyama, K., Mizutani, M., Ohnishi, T., Sudo, H., ... Muranaka, T. (2011). Triterpene functional genomics in licorice for identification of CYP72A154 involved in the biosynthesis of glycyrrhizin. *The Plant Cell*, 23(11), 4112–4123. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.082685>
- Shih, I.-L., Chou, B.-W., Chen, C.-C., Wu, J.-Y., & Hsieh, C. (2008a). Study of mycelial growth and bioactive polysaccharide production in batch and fed-batch culture of *Grifola frondosa*. *Bioresource Technology*, 99, 785–793. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.030>
- Shih, I.-L., Chou, B.-W., Chen, C.-C., Wu, J.-Y., & Hsieh, C. (2008b). Study of mycelial growth and bioactive polysaccharide production in batch and fed-batch culture of *Grifola frondosa*. *Bioresource Technology*, 99(4), 785–793. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.030>
- Skariyachan, S., Prasanna, A., Manjunath, S. P., Karanth, S. S., & Nazre, A. (2016). Exploring the medicinal potential of the fruit bodies of Oyster Mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Agaricomycetes), against multidrug-resistant bacterial isolates. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 18(3), 245–252. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v18.i3.70>
- Smiderle, F. R., Alquini, G., Tadra-sfeir, M. Z., Iacomini, M., Wichers, H. J., & Griensven, L. J. L. D. Van. (2013). *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1-6)-beta-D-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. *Carbohydrate Polymers*, 94(1), 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.12.073>
- 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. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.063>
- Stamets, P. (2000). *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. ( third edition, Ed.), TEN SPEED PRESS. China.
- Suárez, C., & Nieto, I. J. (2013). Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutracéuticos. *TITLEREVISTA*, 30(1), 1–8. Retrieved from internal-pdf://108.204.74.33/Cultivo biotecnológico de macrohongos comestib.pdf
- Suárez Arango, C., & Nieto, I. J. (2013). Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: Una alternativa en la obtención de nutracéuticos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2012.03.011>
- Sudirman, L. I., Lef6bvre, G., Kiffer, E., & Botton, B. (1994). Current Microbiology Purification of Antibiotics Produced by *Lentinus squarrosulus* and Preliminary Characterization of a Compound Active Against *Rigidoporus lignosus*, 29, 1–6.

- Sujatha, S., Anand, S., Sangeetha, K. N., Shilpa, K., Lakshmi, J., Balakrishnan, A., & Lakshmi, B. S. (2010). Biological evaluation of (3 $\beta$ )-STIGMAST-5-EN-3-OL as potent anti-diabetic agent in regulating glucose transport using in vitro model. *International Journal of Diabetes Mellitus*, 2(2), 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.ijdm.2009.12.013>
- Sun, Y., Hu, X., & Li, W. (2017). Antioxidant, antitumor and immunostimulatory activities of the polypeptide from *Pleurotus eryngii* mycelium. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 323–330. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.043>
- Surenjav, U., Zhang, L., Xu, X., Zhang, X., & Zeng, F. (2006). Effects of molecular structure on antitumor activities of (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -d-glucans from different *Lentinus Edodes*. *Carbohydrate Polymers*, 63(1), 97–104. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.08.011>
- Takaku, T., Kimura, Y., & Okuda, H. (2001). Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murrill and its mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 131, 1409–1413. Retrieved from [internal-pdf://204.238.222.62/Isolation of an Antitumor Compound from agaric.pdf](internal-pdf://204.238.222.62/Isolation%20of%20an%20Antitumor%20Compound%20from%20agaric.pdf)
- Taketlara, S., & Uida, K. K. (1979). Archives of Virology Antiviral Activity of Virus-Like Particles From *Lentinus edodes* (Shiitake) Brief Report. *Archives of Virology*, 59, 269–274.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.077>
- Valgas, C., Machado de Souza, S., A Smânia, E. F., & Smânia Jr, A. (2007). Screening Methods To Determine Antibacterial Activity of Natural Products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 369–380. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000200034>
- Vargas-Isla, R., Ishikawa, N. K., Vargas-Isla, R., Noemia, N., & Ishikawa, K. (2008). Optimal conditions of in vitro mycelial growth of *Lentinus strigosus*, an edible mushroom isolated in the Brazilian Amazon. *Mycoscience*, 49, 215–219. <https://doi.org/10.1007/s10267-007-0404-2>
- Vázquez, L. H., Palazon, J., Navarro-ocaña, A., Metropolitana, A., Xochimilco, U., & Biológicos, D. S. (2011). The Pentacyclic Triterpenes  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyrins: A Review of Sources and Biological Activities. *Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, 426, 478–502. <https://doi.org/10.5772/27253>
- Volkman, J. K. (2005). Sterols and other triterpenoids: Source specificity and evolution of biosynthetic pathways. *Organic Geochemistry*, 36(2), 139–159. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2004.06.013>
- Wang, J. T., Wang, Q., & Han, J. R. (2013). Yield, polysaccharides content and antioxidant properties of the mushroom *Agaricus subrufescens* produced on different substrates based on selected agricultural wastes. *Scientia Horticulturae*, 157, 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.04.006>

- Wikler, M. A., Cockerill, F. R., Bush, K., Dudley, M. N., Eliopoulos, G., Hardy, D., ... Zimmer, B. Métodos de dilución para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos de bacterias que crecen en condiciones aeróbicas., 29 § (2009).
- Won, D. P., Lee, J. S., Kwon, D. S., Lee, K. E., Shin, W. C., & Hong, E. K. (2011). Immunostimulating activity by polysaccharides isolated from fruiting body of *Inonotus obliquus*. *Molecules and Cells*. <https://doi.org/10.1007/s10059-011-0022-x>
- Wu, C. H., Popova, E. V, Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2009). Linoleic and  $\alpha$ -linolenic fatty acids affect biomass and secondary metabolite production and nutritive properties of *Panax ginseng* adventitious roots cultured in bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 47(1–3), 109–115. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2009.07.011>
- Wu, J.-Z., Cheung, P. C. K., Wong, K.-H., & Huang, N.-L. (2003a). 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. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00457-0](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00457-0)
- Wu, J.-Z., Cheung, P. C. K., Wong, K.-H., & Huang, N.-L. (2003b). Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer. Part 2: effect of carbon-to-nitrogen ratio of the culture medium on the content and composition of the mycelial dietary fibre. *Food Chemistry*, 85, 101–105. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.06.009>
- Wu, J., Cheung, P. C. K., Wong, K., & Huang, N. (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, 81, 389–393.
- Wu, J., Cheung, P. C. K., Wong, K., & Huang, N. (2004). Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer. Part 2: effect of carbon-to-nitrogen ratio of the culture medium on the content and composition of the mycelial dietary fibre. *Food Chemistry*, 85(1), 101–105. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.06.009>
- Wu, J., Suzuki, T., Choi, J.-H., Yasuda, N., Noguchi, K., Hirai, H., & Kawagishi, H. (2013). An unusual sterol from the mushroom *Stropharia rugosoannulata*. *Tetrahedron Letters*, 54, 4900–4902. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.06.142>
- Xiao, J. H., Chen, D. X., Xiao, Y., Liu, J. W., Liu, Z. L., Wan, W. H., ... Liu, A. Y. (2004). Optimization of submerged culture conditions for mycelial polysaccharide production in *Cordyceps pruinosa*. *Process Biochemistry*, 39(12), 2241–2247. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.11.026>
- Xu, N., Gao, Z., Zhang, J., Jing, H., Li, S., Ren, Z., ... Jia, L. (2017). Hepatoprotection of enzymatic-extractable mycelia zinc polysaccharides by *Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis*. *Carbohydrate Polymers*, 157, 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.082>

- Xue, Z., Li, J., Cheng, A., Yu, W., Zhang, Z., Kou, X., & Zhou, F. (2015). Structure Identification of Triterpene from the Mushroom *Pleurotus eryngii* with Inhibitory Effects Against Breast Cancer. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(3), 291–296. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0492-7>
- 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. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12096>
- Yang, H., Min, W., Bi, P., Zhou, H., & Huang, F. (2013a). Stimulatory effects of *Coix lacryma-jobi* oil on the mycelial growth and metabolites biosynthesis by the submerged culture of *Ganoderma lucidum*. *Biochemical Engineering Journal*, 76, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.04.012>
- Yang, H., Min, W., Bi, P., Zhou, H., & Huang, F. (2013b). Stimulatory effects of *Coix lacryma-jobi* oil on the mycelial growth and metabolites biosynthesis by the submerged culture of *Ganoderma lucidum*. *Biochemical Engineering Journal*, 76(0), 77–82. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.04.012>
- Yaoita, Y., Amemiya, K., Ohnuma, H., Furumura, K., Masaki, A., Matsuki, T., & Kikuchi, M. (1998). Sterol Constituents from Five Edible Mushrooms. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*, 46(6), 944–950. <https://doi.org/10.1248/cpb.46.944>
- Yaoita, Y., Kikuchi, M., & Machida, K. (2015). Terpenoids and sterols from mushrooms. *Studies in Natural Products Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63460-3.00001-8>
- Yildiz, S., Yildiz, Ü. C., Gezer, E. D., & Temiz, A. (2002). Some lignocellulosic wastes used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom. *Process Biochemistry*, 38(3), 301–306. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00040-7](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00040-7)
- 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(0), 319–338. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.05.013>
- Yoshikawa, K., Nishimura, N., Bando, S., Arihara, S., Matsumura, E., & Katayama, S. (2002). New Lanostanoids, Elfvingic Acids A–H, from the Fruit Body of *Elfvingia applanata*. *Journal of Natural Products*, 65(4), 548–552. <https://doi.org/10.1021/np0103160>
- Zagrean, V., Sbirciog, G., Zabut, M., & Mandru, I. (2016). Effect of Nutritive media and pH on mycelial growth of some *Pleurotus eryngii* strains in vitro. *Bulletin UASVM Horticulture*, 73(2), 276–278. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-hort>
- Zapata., P., Rojas., D., Fernández., C., Restrepo., G., Arroyave., M., Ramírez., D., ... Atehortúa., L. (2007). Producción de biomasa y exopolisacáridos de *Grifola frondosa* bajo cultivo sumergido utilizando fuentes de carbono no convencionales. *Revista de Escuela de Ingeniería de Antioquia, Medellín (Colombia)*, 7, 137–144. Retrieved from <internal-pdf://149.185.76.179/Producción de biomasa y exopolisacáridos de>

Gr.pdf

- 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), *14*(2), 197–203. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v14.i2.80>
- Zapata, P., Fr, W. C., Higher, P. K., Rojas, D., Atehortúa, L., Fxowxuh, V., ... Ri, S. (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*, *14*(2), 197–203.
- Zervakis, G., Philippoussis, A., Ioannidou, S., & Diamantopoulou, P. (2001). Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. *Folia Microbiologica*, *46*(3), 231. <https://doi.org/10.1007/BF02818539>
- Zhang, B.-B., & Cheung, P. C. K. (2011). A mechanistic study of the enhancing effect of Tween 80 on the mycelial growth and exopolysaccharide production by *Pleurotus tuber-regium*. *Bioresource Technology*, *102*(17), 8323–8326. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.021>
- Zhang, H., Tang, M., & Chen, H. (2010). Growth promotion of *Suillus luteus* by adenosine in vitro. *Mycoscience*, *51*(2), 139–143. <https://doi.org/10.1007/s10267-009-0018-y>
- Zhang, J., Zhong, J., & Geng, A. (2014a). Improvement of ganoderic acid production by fermentation of *Ganoderma lucidum* with cellulase as an elicitor. *Process Biochemistry*, *49*(10), 1580–1586. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.06.018>
- Zhang, J., Zhong, J. J., & Geng, A. (2014b). Improvement of ganoderic acid production by fermentation of *Ganoderma lucidum* with cellulase as an elicitor. *Process Biochemistry*, *49*(10), 1580–1586. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.06.018>
- Zheng, X., Xu, H., Ma, X., Zhan, R., & Chen, W. (2014). Triterpenoid saponin biosynthetic pathway profiling and candidate gene mining of the *Ilex asprella* root using RNA-Seq. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(4), 5970–5987. <https://doi.org/10.3390/ijms15045970>
- Zjawiony, J. K. (2004). Biologically Active Compounds from Aphylophorales (Polypore) Fungi 1. *Journal of Natural Products*, *67*, 300–310. <https://doi.org/10.1021/np030372w>
- Zou, X. (2006). Fed-batch fermentation for hyperproduction of polysaccharide and ergosterol by medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis*. *Process Biochemistry*, *41*(4), 970–974. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.10.030>