



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**TESIS DE DOCTOR EN CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

**Optimización del cultivo de *Ganoderma lucidum*.  
Evaluación de actividad y desarrollo de  
nutracéuticos.**

**Maximiliano Andrés Bidegain**

**Directores:**

**Dra. María Amelia Cubitto  
Dr. Santiago Palma**



**BAHÍA BLANCA**

**ARGENTINA**

**2017**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

TESIS DE DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

**OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO DE *Ganoderma lucidum*. EVALUACIÓN  
DE ACTIVIDAD Y DESARROLLO DE NUTRACÉUTICOS.**

MAXIMILIANO ANDRÉS BIDEGAIN

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2017



# PREFACIO

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, de la Universidad Nacional del Sur, y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otras. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS, CONICET-UNS) y el Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia durante el período comprendido entre Febrero de 2012 y Diciembre de 2016, bajo la dirección de la Dra. María Amelia Cubitto y el Dr. Santiago Palma.

Maximiliano Andrés Bidegain

mbidegain@criba.edu.ar

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Bahía Blanca, 06 de Febrero de 2017



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el .... / .... / ....., mereciendo  
la calificación de .....(.....)

*A mis dos grandes amores,  
Leonardo y Daniela.*

# AGRADECIMIENTOS

A mis directores, María Amelia Cubitto y Santiago Palma. A María Amelia por su paciencia, dedicación y ayuda, sin la cual no hubiera terminado esta Tesis. A Santiago por sus ideas y ayuda brindada en estos años.

A la Universidad Nacional del Sur, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y al CONICET, por su apoyo académico y económico.

Al equipo del Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles y Medicinales, Pablo, Soledad, Ricky, Débora y Ramiro, por haberme recibido en su lugar de trabajo, brindado su amistad y enseñado el mundo del cultivo de hongos.

Al grupo de la cátedra de Microbiología Industrial y de los Alimentos, Lorena, Gabriela y Patricia. A María Clara y Mauricio. Por su dedicación, su amistad y su ayuda incondicional, tanto dentro como fuera del laboratorio. En particular a Gabriela por su aporte en el estudio del potencial prebiótico.

A Néstor Curvetto y Silvia Delmastro, por sus ideas, y por darme la posibilidad de entrar al fascinante mundo de la ciencia.

A todos los colegas de docencia, especialmente a la cátedra de Farmacognosia, Alejandro, Nina, Ana y Soledad, por su apoyo y su amistad.

A Olga Pieroni, por su ayuda incondicional, sus valiosos aportes en el área de FT-IR, y su calidad humana.

A Diego Obiol. Por su amistad, y porque por esas vueltas del destino, si no fuera por él esta tesis no llevaría mi nombre.

A mi tía Adriana, por escucharme cuando lo necesito, por contactarme con el grupo de María Amelia y Néstor, y porque sin ella tampoco sería el autor de esta tesis.

A mi familia, los que están y los que ya no están, por darle sentido a lo que hago.

# RESUMEN

El hongo de la pudrición blanca *Ganoderma lucidum* posee numerosos compuestos bioactivos con potencial medicinal, principalmente triterpenoides, polisacáridos y polifenoles. El consumo de este hongo, utilizado como coadyuvante en terapias antitumorales, y en general como un promotor de la longevidad, ha aumentado considerablemente en los últimos años. El objetivo general de esta Tesis es estudiar alternativas para mejorar los rendimientos de producción de *G. lucidum* a partir de un residuo abundante de la agroindustria argentina, la cáscara de semilla de girasol (CSG), optimizar la obtención de productos activos y proponer el desarrollo de nutracéuticos.

El cultivo de *G. lucidum* en sustratos artificiales es un procedimiento necesario para suplir la creciente demanda internacional. La CSG ha sido empleada para el cultivo de hongos con buenos resultados. Sin embargo, *G. lucidum* produce rendimientos relativamente menores que otros hongos de especialidad comestibles. Con el fin de mejorar el rendimiento y la productividad de un cultivo de *G. lucidum* en un sustrato a base de CSG, se evaluó la optimización del sustrato mediante el agregado de distintos aceites vegetales y cobre. Se encontró que para la primera oleada, el aceite de oliva incrementó los rendimientos de basidiocarpos hasta un 30% mientras que el agregado de cobre (II) redujo el tiempo hasta la cosecha de 35 a 28 días. Cuando se agregaron juntos la productividad diaria se incrementó hasta un 78%.

Se evaluó la calidad microbiológica de un sustrato a base de CSG con y sin agregado de aceites vegetales, tratado por el sistema descrito por Curvetto et al. (1997). El análisis microbiológico del proceso de pasteurización muestra que el sistema es efectivo para la eliminación de grupos de microorganismos relacionados con la calidad sanitaria, aunque los mohos solo mostraron una disminución moderada.

Uno de los desafíos de la industria de productos nutracéuticos es el aseguramiento de la calidad de la materia prima. La composición química, cuali y cuantitativa, de un carpóforo depende de muchos factores. En esta Tesis se comparó la composición química de basidiocarpos obtenidos en diferentes sustratos (CSG y paja de arroz), con el agregado de diferentes aditivos (aceites vegetales y cobre) y distintas etapas de cultivo (primera o segunda oleada). El contenido de los principales grupos de compuestos bioactivos de *G. lucidum*, triterpenoides, carbohidratos de alto peso molecular y compuestos fenólicos de los basidiocarpos indican que la composición química del hongo es sensible a las condiciones de cultivo (sustrato,

aditivos, momento de cosecha). Por otro lado, la espectroscopia FT-IR resultó útil para la comparación cualitativa de los principales grupos funcionales presentes en el hongo y permitió diferenciar entre hongos cultivados en distintos sustratos.

Los hongos han sido postulados como fuentes potenciales de prebióticos. En una primera etapa se evaluó la capacidad del extracto acuoso, para sustentar el crecimiento de microorganismos con potencial probiótico. Las cepas pertenecientes al grupo de las bacterias lácticas presentaron un comportamiento variable en este extracto. A continuación, se evaluó la cinética de crecimiento en el extracto acuoso de dos cepas probióticas destinadas uso humano, *Bacillus subtilis* y *Saccharomyces boulardii*. Además se incluyó en la evaluación *Escherichia coli* ATCC 25922. *Bacillus subtilis* y *E. coli* mostraron mayor velocidad de crecimiento en el extracto que *S. boulardii*. Por último se evaluó el crecimiento de *B. subtilis* con una fracción purificada del extracto acuoso. El desempeño de *B. subtilis* en esta fracción fortalece la hipótesis de que esta cepa es capaz de hidrolizar los polisacáridos de cadena larga con enlaces glucosídicos  $\beta$  de la fracción acuosa de los extractos de *G. lucidum*.

Se desarrolló una nueva formulación nutracéutica que reúne a los extractos alcohólicos y acuosos de *G. lucidum* en una única presentación. Cuando se juntan en proporciones iguales un extracto alcohólico (rico en triterpenoides) y un extracto acuoso (rico en polisacáridos), parte de los compuestos presentes no son solubles en el nuevo solvente hidroalcohólico y precipitan. Se determinó que el 30% de los triterpenoides totales, y el 19% de los compuestos fenólicos, presentes en los extractos originales, precipitan al realizarse la mezcla. Por último, se estudió el efecto del agregado de un agente viscosante, Carbomer® 940, para retener estos compuestos en una suspensión hidroalcohólica. Estudios de la estabilidad y de la reología de las suspensiones, mostraron que una concentración de Carbomer® 940, entre 0,5 y 1% es adecuada para obtener una dispersión homogénea de los compuestos insolubles por agitación leve a moderada, con una viscosidad adecuada para su administración oral.

# ABSTRACT

White-rot mushroom *Ganoderma lucidum* has many bioactive compounds with medicinal potential, mainly triterpenoids, polysaccharides and polyphenols. Consumption of this mushroom, used as adjuvant in antitumor therapies, and in general as a promoter of longevity, has increased considerably in recent years. The general objective of this Thesis is the study of alternatives for improving the production yields of *Ganoderma lucidum* cultivated on sunflower seed hulls (SSH), an abundant residue of Argentina's agroindustry, enhancing the obtainment of bioactive products and propose the development of nutraceuticals.

Cultivation of *G. lucidum* in artificial substrates is a necessary procedure to supply the growing international demand. SSH has been used as substrate for mushroom cultivation with good results. However, *G. lucidum* produces relatively lower yields than other edible specialty mushrooms. In order to improve the yield and productivity of a *G. lucidum* crop in a SSH-based substrate, the optimization of the substrate by the addition of different vegetable oils and copper was evaluated. It was found that for the first flush, olive oil increased the yield of basidiocarps up to 30%, while the addition of copper (II) reduced the time to harvest from 35 to 28 days. When added together, daily productivity increased up to 78%.

The microbiological quality of a SSH-based substrate with or without vegetables oils, treated by the system described by Curvetto et al. (1997), was evaluated. The microbiological analysis of the pasteurization process shows that the system is effective in the elimination of groups of microorganisms related with sanitary quality, but molds showed only a moderate decrease.

One of the challenges of the nutraceutical product industry is the assurance of the quality of the raw material. The qualitative and quantitative chemical composition of a carpophore depends on many factors. In this Thesis the chemical composition of basidiocarps produced on different substrates (SSH and rice straw), with the addition of different additives (vegetables oils and copper) and different harvesting flushes (first or second flushes), were compared. The content of the main bioactive compound groups of *G. lucidum*, total triterpenoids, phenolic compounds and high molecular weight carbohydrates, of the basidiocarps indicates that the mushroom chemical composition is sensitive to cultivation conditions (substrate,

additives, harvest flush). On the other hand, FT-IR spectroscopy was useful for the qualitative comparison of the main functional groups present in the mushroom, and allowed the differentiation between mushrooms grown on different substrates.

Mushrooms have been postulated as potential sources of prebiotics. On a first stage, the capacity of the aqueous extract to support growth of microorganisms with probiotic potential was evaluated. Strains belonging to the group of lactic acid bacteria had a variable behavior in this extract. Next, the growth kinetics in the aqueous extract of two probiotic strains intended for human use, *Bacillus subtilis* y *Saccharomyces boulardii*, were evaluated. *Escherichia coli* ATCC 25922 was also included in the evaluation. *Bacillus subtilis* and *E. coli* showed higher growth rates in the extract than *S. boulardii*. Finally, growth of *B. subtilis* with a purified fraction of the aqueous extract was evaluated. The performance of *B. subtilis* in this fraction strengthens the hypothesis that this strain is capable of hydrolyzing the long chain polysaccharides with  $\beta$ -glucosidic bonds present in the aqueous fraction of the extracts of *G. lucidum*.

A new nutraceutical formulation that brings together the alcoholic and aqueous extracts of *G. lucidum* in a single presentation was developed. When an alcoholic extract (rich in triterpenoids) and an aqueous extract (rich in polysaccharides) are mixed in equal proportions, some of the constituents are not soluble in the new hydroalcoholic solvent and precipitate. It was determined that 30% of the total triterpenoids and 19% of the phenolic compounds present in the original extracts precipitate upon mixing. Finally, the effect of the addition of a thickener agent, Carbomer® 940, to retain these compounds in a hydroalcoholic suspension, was studied. Studies on the stability and rheology of the suspensions showed that a concentration of Carbomer® 940, between 0.5 and 1% is adequate to obtain a homogeneous dispersion of the insoluble compounds by mild to moderate agitation, with a viscosity suitable for oral administration.

# ABREVIATURAS

- ADN, ácido desoxirribonucleico
- AE, bacterias esporógenas aerobias
- ANMAT, Administración Nacional de Alimentos, Medicamentos y Tecnología Médica
- ANOVA, análisis de varianza
- BHI, infusión cerebro corazón
- BL, bacterias lácticas
- BSA, sero albúmina bovina
- CAA, Código Alimentario Argentino
- CSG, cáscara de semilla de girasol
- CSR, clostridios sulfito reductores
- CT, coliformes totales
- D.C., después de Cristo
- D<sub>1<sup>º</sup>F, días desde la inoculación hasta la primera oleada</sub>
- D<sub>2<sup>º</sup>F, días desde la inoculación hasta la segunda oleada</sub>
- D<sub>3<sup>º</sup>F, días desde la inoculación hasta la tercera oleada</sub>
- D<sub>CM</sub>, días de corrida del micelio
- DO, densidad óptica
- EB, eficiencia biológica
- Eq., equivalente
- Ext., extracto
- h, horas
- HR, humedad relativa
- IFN, interferón
- Il, interleukina
- Lev, levaduras
- MEA, malta, levadura y sucrosa en agar
- MP, producción de hongos
- MRS, Mann, Rogosa y Sharpe
- NK, natural killer
- PCA, Agar Recuento en Placa
- PDA, Agar Papa Dextrosa
- RHP, recuento de heterótrofas aerobias totales

rpm, revoluciones por minuto  
SPS, Sulfito-Polimixina-Sulfadiacina  
TNF, factor de necrosis tumoral  
TTC, trifenil tetrazolio cloruro  
UFC, unidades formadoras de colonias  
VIH, virus de la inmunodeficiencia humana  
YG, extracto de levadura – glucosa

# ÍNDICE

<b>PREFACIO</b> .....	<b>I</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>III</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>X</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>XV</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1    LOS HONGOS COMESTIBLES Y MEDICINALES .....	1
1.1.1 <i>El Reino Fungi</i> .....	1
1.1.2 <i>Propiedades nutricionales</i> .....	2
1.1.3 <i>Características medicinales</i> .....	4
1.1.4 <i>Mercado nacional e internacional de los hongos comestibles y medicinales</i> .....	5
1.2    EL HONGO <i>GANODERMA LUCIDUM</i> .....	6
1.2.1 <i>Taxonomía</i> .....	7
1.2.2 <i>Características morfológicas</i> .....	7
1.3    ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE <i>GANODERMA LUCIDUM</i> .....	9
1.3.1 <i>Efecto antitumoral</i> .....	10
1.3.2 <i>Efectos inmunomoduladores</i> .....	10
1.3.3 <i>Actividad antiinflamatoria</i> .....	11
1.3.4 <i>Actividad hepatoprotectora</i> .....	11
1.3.5 <i>Efecto antidiabetes</i> .....	11
1.3.6 <i>Funciones cardiovasculares y circulatorias</i> .....	11
1.3.7 <i>Poder antibiótico y antiviral</i> .....	11
1.3.8 <i>Actividad antioxidante</i> .....	12
1.3.9 <i>Actividad antiandrogénica</i> .....	12
1.3.10 <i>Toxicidad</i> .....	12
1.4    COMPOSICIÓN QUÍMICA DE <i>GANODERMA LUCIDUM</i> .....	13
1.4.1 <i>Triterpenoides</i> .....	13
1.4.2 <i>Polisacáridos</i> .....	14

1.4.3	<i>Proteínas</i> .....	15
1.4.4	<i>Otros compuestos</i> .....	15
1.5	LOS HONGOS MEDICINALES COMO NUTRACÉUTICOS, MICOTERÁPICOS Y SUPLEMENTOS DIETARIOS. ....	16
1.6	OBJETIVOS DE LA TESIS .....	18
<b>CAPÍTULO 2: OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO DE GANODERMA LUCIDUM EN UN SUSTRATO A</b>		
<b>BASE DE CÁSCARA DE SEMILLA DE GIRASOL. EFECTO DE ACEITES VEGETALES Y COBRE .....</b>		
<b>20</b>		
2.1	INTRODUCCIÓN.....	20
2.1.1	<i>El cultivo de hongos comestibles y medicinales</i> .....	20
2.1.2	<i>Producción del inóculo</i> .....	21
2.1.3	<i>Preparación del sustrato</i> .....	22
2.1.4	<i>Pasteurización del sustrato</i> .....	24
2.1.5	<i>Incubación o corrida del micelio</i> .....	24
2.1.6	<i>Desarrollo de los cuerpos de fructificación</i> .....	25
2.1.7	<i>Cultivo de Ganoderma lucidum</i> .....	25
2.1.8	<i>Optimización del cultivo de Ganoderma lucidum</i> .....	28
2.1.9	<i>Objetivos</i> .....	30
2.2	MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
2.2.1	<i>Cepa de Ganoderma lucidum</i> .....	30
2.2.2	<i>Aceites vegetales evaluados como aditivos del sustrato</i> .....	30
2.2.3	<i>Biomasa y crecimiento radial en placa</i> .....	30
2.2.4	<i>Test de crecimiento lineal</i> .....	31
2.2.4.1	Determinación de proteínas en el sustrato .....	32
2.2.5	<i>Producción de inóculo</i> .....	32
2.2.6	<i>Instalaciones para el cultivo de hongos del CERZOS (CONICET-UNS)</i> .....	33
2.2.7	<i>Preparación del sustrato, inoculación y sistema de bolsas</i> .....	35
2.2.8	<i>Evaluación microbiológica del sustrato antes y después del tratamiento térmico</i> ...	36
2.2.8.1	Recuento de bacterias heterótrofas aerobias y anaerobias facultativos mesófilas totales	37
2.2.8.2	Recuento de bacterias coliformes totales y Escherichia coli .....	37
2.2.8.3	Enterococos.....	38
2.2.8.4	Recuento de mohos y levaduras .....	38
2.2.8.5	Recuento de bacterias aerobias esporógenas (AE) y clostridios sulfito reductores (CSR) .	38
2.2.9	<i>Corrida del micelio, cosecha y rendimiento del cultivo</i> .....	38
2.2.10	<i>Procesamiento post-cosecha</i> .....	40
2.2.11	<i>Actividad de lacasas en el sustrato residual</i> .....	40
2.2.11.1	Extracción de lacasas .....	40
2.2.11.2	Determinación de la actividad de lacasas .....	40
2.2.12	<i>Análisis estadístico</i> .....	41
2.3	RESULTADOS.....	41

2.3.1	<i>Efecto de los aceites vegetales sobre el crecimiento radial del micelio</i> .....	41
2.3.2	<i>Efecto de los aceites vegetales sobre el crecimiento lineal del micelio</i> .....	43
2.3.2.1	pH del sustrato antes y después del tratamiento térmico.....	43
2.3.2.2	Evaluación del crecimiento lineal.....	44
2.3.2.3	Cuantificación de proteínas solubles en el sustrato colonizado .....	45
2.3.3	<i>Efecto de aceite de oliva y cobre en un cultivo a escala piloto</i> .....	47
2.3.3.1	Corrida del micelio .....	47
2.3.3.2	Parámetros de rendimiento de hongo.....	47
2.3.3.3	Contenido de agua en el sustrato y en el carpóforo .....	51
2.3.3.4	Actividad de lacasas .....	52
2.3.4	<i>Evaluación microbiológica del proceso de pasteurización a escala piloto del sustrato</i> 52	
2.4	DISCUSIÓN .....	54
2.4.1	<i>Efecto de aceites vegetales sobre el crecimiento del micelio</i> .....	54
2.4.2	<i>Cultivo de Ganoderma lucidum en cáscara de semilla de girasol a escala piloto.</i> <i>Efecto de aceite de oliva y cobre (II)</i> .....	55
2.4.3	<i>Evaluación microbiológica del proceso de pasteurización a escala piloto del sustrato</i> 57	
2.5	CONCLUSIONES.....	57
 <b>CAPÍTULO 3: INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO SOBRE LA COMPOSICIÓN</b>		
<b>QUÍMICA DEL BASIDIOCARPO DE GANODERMA LUCIDUM .....</b>		
3.1	INTRODUCCIÓN.....	59
3.1.1	<i>Efecto de las condiciones de cultivo sobre la calidad química de G. lucidum</i> .....	59
3.1.2	<i>Análisis mediante espectroscopia infrarroja (IR)</i> .....	61
3.1.3	<i>Objetivos</i> .....	62
3.2	MATERIALES Y MÉTODOS .....	63
3.2.1	<i>Muestras analizadas</i> .....	63
3.2.2	<i>Obtención de los extractos</i> .....	64
3.2.2.1	Extracción con etanol.....	64
3.2.2.2	Extracción con agua caliente .....	64
3.2.3	<i>Determinación del residuo seco en los extractos</i> .....	64
3.2.4	<i>Contenido de triterpenoides</i> .....	64
3.2.5	<i>Determinación de ácidos ganodéricos</i> .....	65
3.2.6	<i>Contenido de carbohidratos de alto peso molecular.</i> .....	65
3.2.7	<i>Contenido de compuestos fenólicos</i> .....	67
3.2.8	<i>Contenido de cobre</i> .....	67
3.2.9	<i>Espectrofotometría visible</i> .....	68
3.2.10	<i>Espectrofotometría FT-IR</i> .....	68

3.2.11	<i>Análisis estadístico</i> .....	68
3.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	68
3.3.1	<i>Residuo seco</i> .....	68
3.3.2	<i>Contenido de triterpenoides y ácidos ganodéricos</i> .....	70
3.3.3	<i>Contenido de carbohidratos de alto peso molecular</i> .....	72
3.3.4	<i>Contenido de compuestos fenólicos</i> .....	73
3.3.5	<i>Contenido de cobre</i> .....	75
3.3.6	<i>Espectrofotometría visible</i> .....	75
3.3.7	<i>Efecto del agregado de Cobre (II)</i> .....	78
3.3.8	<i>Efecto del agregado de aceites vegetales</i> .....	78
3.3.9	<i>Influencia del momento de la cosecha</i> .....	78
3.3.10	<i>Influencia del sustrato</i> .....	79
3.3.11	<i>Espectrofotometría FT-IR</i> .....	79
3.4	CONCLUSIONES.....	86
 <b>CAPÍTULO 4: ESTUDIO DEL POTENCIAL PREBIÓTICO DE LA FRACCIÓN DE POLISACÁRIDOS DE GANODERMA LUCIDUM</b> .....		<b>87</b>
4.1	INTRODUCCIÓN.....	87
4.1.1	<i>Objetivos</i> .....	89
4.2	MATERIALES Y MÉTODOS .....	89
4.2.1	<i>Obtención de extractos de polisacáridos</i> .....	89
4.2.2	<i>Microorganismos</i> .....	90
4.2.3	<i>Utilización del extracto crudo (E1) como medio de cultivo</i> .....	91
4.2.4	<i>Determinación de la cinética de crecimiento de las cepas de B. subtilis y S. boulardii en el extracto E1</i> .....	91
4.2.5	<i>Crecimiento con el extracto purificado E2</i> .....	92
4.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	92
4.3.1	<i>Utilización del extracto crudo (E1) como medio de cultivo</i> .....	93
4.3.2	<i>Determinación de la cinética de crecimiento de cepas de B. subtilis y S. boulardii en el extracto E1</i> .....	94
4.3.3	<i>Crecimiento de B. subtilis con la fracción purificada E2</i> .....	97
4.4	CONCLUSIONES.....	98
 <b>CAPÍTULO 5: FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA SUSPENSIÓN HIDROALCOHÓLICA</b> .....		<b>99</b>
5.1	INTRODUCCIÓN.....	99
5.1.1	<i>Productos a base de Ganoderma lucidum</i> .....	99
5.1.2	<i>Formulación de una suspensión hidroalcohólica</i> .....	103

5.1.3	<i>Objetivo</i> .....	104
5.1.4	<i>Objetivos particulares</i> .....	104
5.2	MATERIALES Y MÉTODOS .....	104
5.2.1	<i>Extracción alcohólica</i> .....	104
5.2.2	<i>Extracción acuosa</i> .....	104
5.2.3	<i>Extracción hidroalcohólica</i> .....	105
5.2.4	<i>Preparación de la infusión</i> .....	105
5.2.5	<i>Obtención de la mezcla hidroalcohólica</i> .....	105
5.2.6	<i>Redisolución del precipitado insoluble de las mezclas hidroalcohólicas</i> .....	105
5.2.7	<i>Caracterización química</i> .....	106
5.2.7.1	Residuo sólido .....	106
5.2.7.2	Contenido de triterpenoides totales .....	106
5.2.7.3	Contenido de carbohidratos de alto peso molecular .....	106
5.2.7.4	Contenido de compuestos fenólicos .....	106
5.2.8	<i>Formulación de la suspensión hidroalcohólica</i> .....	107
5.2.9	<i>Viscosidad</i> .....	107
5.2.10	<i>Sedimentación acelerada</i> .....	107
5.2.11	<i>Estabilidad física de la suspensión</i> .....	108
5.2.12	<i>Análisis de datos</i> .....	108
5.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	108
5.3.1	<i>Contenido de residuos sólidos</i> .....	109
5.3.2	<i>Contenido de triterpenoides totales</i> .....	110
5.3.3	<i>Contenido de carbohidratos de alto peso molecular</i> .....	111
5.3.4	<i>Contenido de compuestos fenólicos</i> .....	112
5.3.5	<i>Sedimentación acelerada, estabilidad de la suspensión y reología</i> .....	113
5.4	CONCLUSIONES.....	115
<b>CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>		<b>117</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>		<b>120</b>
<b>ANEXO I: RESULTADOS COMPLEMENTARIOS.....</b>		<b>133</b>
I.1	EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL PROCESO DE PASTEURIZACIÓN .....	133
I.2	ESPECTROS IR .....	133
<b>ANEXO II: MEDIOS DE CULTIVO .....</b>		<b>142</b>
<b>PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESO REALIZADAS EN EL MARCO DE ESTA TESIS..</b>		<b>143</b>
TRABAJOS PUBLICADOS EN REVISTAS INTERNACIONALES .....		143
PATENTES.....		143
TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS .....		144

# ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: BASIDIOCARPO DE <i>GANODERMA LUCIDUM</i> EN SU FORMA HABITUAL DE "SOMBRERO". POR JATLAS [CC BY-SA 2.5 (HTTP://CREATIVECOMMONS.ORG/LICENSES/BY-SA/2.5)], VIA WIKIMEDIA COMMONS. ....	8
FIGURA 2: FORMA DE "CUERNOS DE CIERVO" DE <i>GANODERMA LUCIDUM</i> . POR HOKKAIDO REISHI CO., LTD (TRABAJO PROPIO) [CC BY-SA 3.0 (HTTP://CREATIVECOMMONS.ORG/LICENSES/BY-SA/3.0)], VIA WIKIMEDIA COMMONS. ....	9
FIGURA 3: ESTRUCTURA BÁSICA DE LOS ÁCIDOS GANODÉRICOS. LAS CADENAS LATERALES R1 - R6 DETERMINAN EL TIPO DE ÁCIDO GANODÉRICO. ....	13
FIGURA 4: ESTRUCTURA DE ALGUNOS ÁCIDOS GANODÉRICOS (SANODIYA ET AL. 2009). ....	14
FIGURA 5: ESTRUCTURA BÁSICA DE LOS B-GLUCANOS DE <i>G. LUCIDUM</i> (DEEPALAKSHMI Y MIRUNALINI 2011). ....	15
FIGURA 6: ESQUEMA DE LAS TÉCNICAS Y LOS PASOS GENERALES DEL CULTIVO DE HONGOS (STAMETS Y CHILTON 1983). ....	22
FIGURA 7: VISTA EXTERIOR DE LA NAVE DE CULTIVO DE HONGOS. ....	33
FIGURA 8: SISTEMA HUMIDIFICADOR DE ALTA PRESIÓN POR BRUMA. ....	34
FIGURA 9: SISTEMA DE DISTRIBUCIÓN DE AIRE FILTRADO. ....	34
FIGURA 10: SISTEMA DE SUMINISTRO DE AIRE CALIENTE MEDIANTE CAÑÓN CALEFACTOR. ....	34
FIGURA 11: EQUIPO PARA DECONTAMINACIÓN DE SUSTRATO. ....	35
FIGURA 12: PREPARACIÓN DEL "TRONCO SINTÉTICO" EN BOLSAS DE POLIETILENO. ....	36
FIGURA 13: EVOLUCIÓN DE UN CULTIVO DE <i>GANODERMA LUCIDUM</i> . ....	39
FIGURA 14: A) DIÁMETRO, (B) SUPERFICIE Y (C) DENSIDAD MICELIAR SUPERFICIAL DE UNA COLONIA DE <i>GANODERMA LUCIDUM</i> EN UN CULTIVO EN MEDIO MEA DE 5 DÍAS CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ACEITE DE OLIVA. ....	43
FIGURA 15: PH DEL SUSTRATO A BASE DE CÁSCARA DE GIRASOL ADITIVADO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACEITE DE OLIVA, ANTES Y DESPUÉS DE ESTERILIZAR POR AUTOCLAVE. ....	44
FIGURA 16: INCREMENTO DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA SOLUBLE POR GRAMO DE SUSTRATO COLONIZADO CON RESPECTO AL SUSTRATO SIN INOCULAR. EFECTO DEL ACEITE DE GIRASOL. ....	45
FIGURA 17: INCREMENTO DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA SOLUBLE POR GRAMO DE SUSTRATO COLONIZADO CON RESPECTO AL SUSTRATO SIN INOCULAR. EFECTO DEL ACEITE DE CÁRTAMO. ....	46
FIGURA 18: INCREMENTO DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA SOLUBLE POR GRAMO DE SUSTRATO COLONIZADO CON RESPECTO AL SUSTRATO SIN INOCULAR. EFECTO DEL ACEITE DE OLIVA. ....	46
FIGURA 19: COMPARACIÓN DE FRUTOS DE LA PRIMERA OLEADA DE CINCO TRONCOS SINTÉTICOS REPRESENTATIVOS, LUEGO DE 27 DÍAS DESDE LA INOCULACIÓN. ....	49
FIGURA 20: ACTIVIDAD DE LACASAS EN EL SUSTRATO RESIDUAL TRAS UN CICLO DE CULTIVO DE TRES OLEADAS CON Y SIN ACEITE DE OLIVA Y/O COBRE. ....	52
FIGURA 21: TEMPERATURA DEL SUSTRATO DURANTE EL PROCESO DE PASTEURIZACIÓN. ....	53
FIGURA 22: EFECTO DEL TRATAMIENTO DE PASTEURIZACIÓN EN HORMIGONERA SOBRE INDICADORES MICROBIANOS. LOS RESULTADOS SON EL PROMEDIO DE AMBOS SUSTRATOS, EXPRESADOS COMO LOG <sub>10</sub> UFC/GRAMO DE SUSTRATO SECO. ....	53
FIGURA 23: MODOS NORMALES DE VIBRACIÓN DE UNA MOLÉCULA. ....	62

FIGURA 24: CURVA DE CALIBRADO REPRESENTATIVA DE ÁCIDO URSÓLICO POR EL MÉTODO DE LA VAINILLINA - ÁCIDO PERCLÓRICO.....	65
FIGURA 25: CURVA DE CALIBRADO REPRESENTATIVA DE GLUCOSA POR EL MÉTODO DE ANTRONA - ÁCIDO SULFÚRICO.....	66
FIGURA 26: CURVA DE CALIBRADO REPRESENTATIVA DE ÁCIDO GÁLICO POR EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU .....	67
FIGURA 27: ESPECTRO VISIBLE DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS .....	76
FIGURA 28: ESPECTRO VISIBLE DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS.....	77
FIGURA 29: CORRELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE POLIFENOLES Y LA ABSORBANCIA A 400 NM EN LOS EXTRACTOS ACUOSOS. ....	77
FIGURA 30: ESPECTROS IR DE BASIDIOCARPOS DE <i>G. LUCIDUM</i> CULTIVADOS EN CSG Y COSECHADOS ANTES DE LA MÁXIMA LIBERACIÓN DE ESPORAS (CCP1) O DESPUÉS (CCP2) .....	80
FIGURA 31: ESPECTROS IR DEL BASIDIOCARPO DE <i>G. LUCIDUM</i> CULTIVADO EN CSG CON O SIN ACEITE DE OLIVA Y/O COBRE (PRIMERA OLEADA).....	81
FIGURA 32: ESPECTROS IR DEL BASIDIOCARPO DE <i>G. LUCIDUM</i> CULTIVADO EN CSG CON DIFERENTES ACEITES VEGETALES (PRIMERA OLEADA).....	81
FIGURA 33: ESPECTROS IR DEL BASIDIOCARPO DE <i>G. LUCIDUM</i> CULTIVADO EN CSG CON O SIN ACEITE DE OLIVA O COBRE (SEGUNDA OLEADA).....	82
FIGURA 34: ESPECTROS IR DE BASIDIOCARPOS DE <i>G. LUCIDUM</i> CULTIVADOS EN CSG O PAJA DE ARROZ.....	83
FIGURA 35: ESPECTROS IR DEL BASIDIOCARPO DE <i>G. LUCIDUM</i> CULTIVADO EN PAJA DE ARROZ CON O SIN ACEITE DE OLIVA O COBRE (PRIMERA OLEADA). ....	84
FIGURA 36: ESPECTROS IR DEL BASIDIOCARPO DE <i>G. LUCIDUM</i> CULTIVADO EN PAJA DE ARROZ SIN SUPLEMENTOS (PRIMERA OLEADA) Y CON ACEITE DE OLIVA (SEGUNDA OLEADA). ....	84
FIGURA 37: ESPECTROS IR DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE BASIDIOCARPOS CULTIVADOS EN PAJA DE ARROZ O CSG.....	85
FIGURA 38: CRECIMIENTO DE <i>B. SUBTILIS</i> EN EL EXTRACTO E1 .....	95
FIGURA 39: CRECIMIENTO DE <i>SACCHAROMYCES CEREVICEAE</i> VAR <i>BOULARDII</i> EN EL EXTRACTO E1 .....	95
FIGURA 40: CRECIMIENTO DE <i>E. COLI</i> EN EL EXTRACTO E1 .....	96
FIGURA 41: VARIACIONES DE PH DETERMINADAS EN E1 DURANTE EL CULTIVO CON LAS DISTINTAS CEPAS .....	97
FIGURA 42: CRECIMIENTO DE <i>B. SUBTILIS</i> EN GLUCOSA Y E2.....	98
FIGURA 43: DISTINTOS PRODUCTOS A BASE DE <i>GANODERMA LUCIDUM</i> (LEE Y CHANG 2016). ....	101
FIGURA 44: CONTENIDO DE RESIDUO SÓLIDO EN UN VOLUMEN EQUIVALENTE A 10 ML DEL EXTRACTO ORIGINAL DE DISTINTOS EXTRACTOS Y PREPARACIONES. ....	110
FIGURA 45: CONTENIDO TOTAL DE TRITERPENOIDES EN UN VOLUMEN EQUIVALENTE A 10 ML DEL EXTRACTO ORIGINAL DE DISTINTOS EXTRACTOS Y PREPARACIONES. ....	111
FIGURA 46: CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS DE ALTO PESO MOLECULAR EN UN VOLUMEN EQUIVALENTE A 10 ML DEL EXTRACTO ORIGINAL DE DISTINTOS EXTRACTOS Y PREPARACIONES. ....	112
FIGURA 47: CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EN UN VOLUMEN EQUIVALENTE A 10 ML DEL EXTRACTO ORIGINAL, DE DISTINTOS EXTRACTOS Y PREPARACIONES. ....	112
FIGURA 48: VISCOSIDAD DINÁMICA DE UNA SUSPENSIÓN HIDROALCOHÓLICA CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CARBOMER® 940. ....	115

FIGURA 49: ESPECTROS IR DEL BASIDIOCARPO DE *GANODERMA LUCIDUM* CULTIVADO EN DISTINTOS SUSTRATOS.....141

# ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: CONDICIONES AMBIENTALES REQUERIDAS EN DISTINTOS ESTADIOS DEL CULTIVO DE <i>GANODERMA LUCIDUM</i> (STAMETS 1993; ZHOU ET AL. 2012; DATOS PROPIOS).....	26
TABLA 2: DIFERENTES SUSTRATOS UTILIZADOS PARA LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO DE <i>GANODERMA LUCIDUM</i> .....	26
TABLA 3: ESPECIES DE HONGOS COMESTIBLES CULTIVADOS EN CÁSCARA DE SEMILLA DE GIRASOL Y RENDIMIENTOS. ....	28
TABLA 4: SUPERFICIE DE LA COLONIA DE <i>GANODERMA LUCIDUM</i> LUEGO DE 5 Y 7 DÍAS DE CULTIVO EN UN MEDIO MEA CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACEITE DE GIRASOL Y ACEITE DE CÁRTAMO. ....	42
TABLA 5: BIOMASA Y DENSIDAD SUPERFICIAL DE LA COLONIA DE <i>GANODERMA LUCIDUM</i> LUEGO DE 7 DÍAS DE CULTIVO EN UN MEDIO MEA CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACEITE DE GIRASOL Y ACEITE DE CÁRTAMO. ....	42
TABLA 6: CRECIMIENTO LINEAL DEL MICELIO DE <i>GANODERMA LUCIDUM</i> EN 12 DÍAS EN UN MEDIO BASE DE CÁSCARA DE GIRASOL ADITIVADO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACEITES VEGETALES. ....	44
TABLA 7: CRECIMIENTO LINEAL DEL MICELIO DE <i>GANODERMA LUCIDUM</i> EN 12 DÍAS EN UN MEDIO DE CÁSCARA DE GIRASOL ADITIVADO CON DIFERENTES CONCENTRACIÓN DE ACEITE DE OLIVA. ....	45
TABLA 8: DÍAS PARA LA CORRIDA DEL MICELIO CON Y SIN ACEITE DE OLIVA Y/O COBRE. ....	47
TABLA 9: PARÁMETROS DE RENDIMIENTO DE LA PRIMERA OLEADA CON Y SIN ACEITE DE OLIVA Y/O COBRE.....	48
TABLA 10: PARÁMETROS DE RENDIMIENTO DE LA SEGUNDA Y TERCERA OLEADA CON Y SIN ACEITE DE OLIVA Y/O COBRE.....	50
TABLA 11: RENDIMIENTO ACUMULADO DE UN CULTIVO A TRES OLEADAS CON Y SIN ACEITE DE OLIVA Y/O COBRE.....	50
TABLA 12: CONTENIDO DE AGUA DEL SUSTRATO AL FINAL DE UN CICLO DE CULTIVO DE TRES OLEADAS (82 DÍAS) CON Y SIN ACEITE DE OLIVA Y/O COBRE.....	51
TABLA 13: ORIGEN DE LAS MUESTRAS DE HONGO ANALIZADAS .....	63
TABLA 14: CONTENIDO DE RESIDUO SECO (MG/G DE HONGO SECO) .....	69
TABLA 15: CONTENIDO DE TRITERPENOIDES Y ÁCIDOS GANODÉRICOS .....	71
TABLA 16: CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS DE ALTO PESO MOLECULAR.....	72
TABLA 17: CONTENIDO DE POLIFENOLES.....	73
TABLA 18: RELACIÓN ENTRE COMPUESTOS FENÓLICOS Y RESIDUO SECO .....	75
TABLA 19: ASIGNACIÓN DE LOS GRUPOS FUNCIONALES DE LOS PRINCIPALES PICOS DEL ESPECTRO IR .....	79
TABLA 20: MICROORGANISMOS EMPLEADOS PARA LOS ESTUDIOS DE POTENCIAL PREBIÓTICO.....	90
TABLA 21: CRECIMIENTO DE CEPAS PROBIÓTICAS EN E1 .....	94
TABLA 22: PARÁMETROS DE CRECIMIENTO OBTENIDOS EN EL EXTRACTO E1 .....	96
TABLA 23: ALGUNOS PRODUCTOS BASADOS EN <i>GANODERMA</i> DISPONIBLES EN EL MERCADO, CON SUS BENEFICIOS REPORTADOS (BATRA ET AL. 2013).....	102
TABLA 24: ASPECTO DE UNA SUSPENSIÓN HIDROALCOHÓLICA CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CARBOMER® 940 LUEGO DE LA APLICACIÓN DE UNA FUERZA CENTRÍFUGA DURANTE 1 MINUTO .....	113
TABLA 25: ALTURA DE SEDIMENTACIÓN RELATIVA DE UNA SUSPENSIÓN HIDROALCOHÓLICA CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CARBOMER® 940 A LOS 3, 11 Y 60 DÍAS DESDE SU PREPARACIÓN. ....	114

TABLA 26: EVOLUCIÓN DE LOS PRINCIPALES GRUPOS MICROBIOLÓGICOS DURANTE LA PASTEURIZACIÓN.....133

# CAPÍTULO 1:

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 LOS HONGOS COMESTIBLES Y MEDICINALES

#### 1.1.1 El Reino Fungi

Se estima que existen en el planeta entre 500.000 y 10.000.000 de especies de hongos, de las cuáles unas 100.000 están descritas (Wasser 2011). De las especies de hongos conocidas, aproximadamente 14.000 producen cuerpos reproductivos macroscópicos. De estos, más de 3.000 se consideran comestibles, y alrededor de 2.000 son hongos medicinales con una variedad de atributos para la salud (Chang y Miles 2004).

Los humanos prehistóricos probablemente utilizaron hongos recolectados en la naturaleza por su alto valor nutritivo y, posiblemente, por sus propiedades medicinales. Entre las pertenencias de “Ötzi, el hombre de hielo”, la momia natural de un hombre que vivió en los Alpes hace unos 5.300 años, se encontraron muestras secas de un hongo, *Piptoporus betulinus*, que probablemente utilizaba con fines antibióticos y laxantes (Halpern 2007). Las civilizaciones tempranas de los griegos, egipcios, romanos, chinos y aztecas apreciaron a los hongos como una delicia, conocían algunas de sus propiedades medicinales y los usaban habitualmente en ceremonias religiosas (Chang y Miles 2004). Históricamente el uso de hongos con fines medicinales se remonta a hace al menos 2.000 años, en la Medicina Tradicional China, pero sus propiedades recién han sido objeto de la investigación científica moderna desde los años 1960's (Pala y Wani 2011).

Los hongos son organismos eucariotas, unicelulares (levaduras) o multicelulares (micro y macrofilamentosos), que se pueden encontrar prácticamente en cualquier ambiente y sobre una gran diversidad de sustratos. Los hongos multicelulares típicamente crecen como hifas, con crecimiento apical, pero algunas veces pueden aparecer como levaduras. Los hongos poseen características suficientes y significativamente diferentes a las plantas y los animales como para ubicarlos en un reino separado: el Reino Fungi.

Los miembros del reino Fungi no contienen clorofila y por lo tanto no realizan fotosíntesis. Son heterótrofos, es decir dependen de nutrientes orgánicos preformados, al igual que

los animales. Sin embargo, difieren de los animales en que obtienen los nutrientes solubles absorbiéndolos a través de la pared celular y la membrana plasmática. Dependiendo del sustrato donde crecen los hongos pueden ser saprófitos cuando se alimentan de materiales en descomposición, parásitos cuando se alimentan de otros seres vivos y simbioses cuando viven en asociación con otros organismos vivos, y se benefician mutuamente. Los hongos cumplen una importante función ecológica en la descomposición de la materia orgánica. En efecto, los hongos son desensambladores moleculares, tomando compuestos complejos, como celulosa, lignina, carbohidratos y proteínas, y degradándolos a productos más simples.

Los hongos poseen paredes compuestas principalmente por quitina y glucanos, a diferencia de las paredes celulares de las plantas que están compuestas por celulosa, hemicelulosa y pectinas. El genoma del micelio vegetativo es típicamente haploide. De algunos hongos aún no se conoce la fase de reproducción sexual, y todos tienen la capacidad de reproducción asexual. La reproducción asexual se lleva a cabo a través de hifas haploides que originan esporas por medio de mitosis. La reproducción sexual consiste en la unión de dos hifas haploides compatibles que dan lugar a hifas dicarióticas, que en condiciones propicias formarán los carpóforos, y a su vez a esporas.

De acuerdo a sus características, los miembros del reino Fungi se encuentran divididos en cinco filos, Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota y Glomeromycota (Deacon 2006). Chang y Miles (2004) definen como “hongo” o “seta” al cuerpo de reproducción o carpóforo de los hongos macroscópicos (macromicetos) que pertenecen al filo Basidiomycota (basidiocarpos), o en menor medida al filo Ascomycota (ascocarpos). Estos cuerpos de reproducción pueden ser epigeos o hipogeos, como es el caso de las trufas. En caso de no presentar riesgos para la salud, cuando son carnosos y palatables pueden ser comestibles. También existen carpóforos leñosos, no palatables, que pueden consumirse en infusiones, sopas, tónicos, polvos, etc.

### **1.1.2 Propiedades nutricionales**

Los hongos son muy apreciados en gastronomía por su textura, sabor y aromas. Más allá de las reconocidas características culinarias de los hongos, por lo general, poseen un alto valor nutricional.

El contenido nutricional de los hongos es muy variable con la especie, la cepa, las condiciones de cultivo y las condiciones postcosecha. Por lo general, los hongos poseen un contenido alto de carbohidratos y proteínas, moderado en fibras y cenizas, y bajo en grasas (Chang y Miles 2004). Los hongos frescos suelen tener un alto contenido de agua, en torno al 75 – 90%.

En contenido de proteínas totales los hongos están por debajo de casi todas las carnes animales, pero muy por encima de la mayoría del resto de los alimentos, incluyendo a productos animales como la leche (Chang y Miles 2004). Las proteínas de los hongos contienen los nueve aminoácidos esenciales y tienen un valor biológico elevado, en torno a 72 y 99 (Boa 2004). La FAO ha recomendado el consumo de hongos en países subdesarrollados donde la malnutrición proteica es un problema común (Pala y Wani 2011).

De acuerdo a la especie, el contenido de grasas varía del 1,1 al 8,3% en base seca, con una alta proporción de ácidos grasos insaturados, a diferencia de las carnes animales que tienen una alta proporción de ácidos grasos saturados (Chang y Miles 2004). Además, los hongos son ricos en ácido linoleico, un aceite esencial (Günç Ergönül et al. 2013).

Los hongos son una buena fuente de varias vitaminas, incluyendo vitamina B, niacina, riboflavina, tiamina, biotina y ácido ascórbico. Los hongos son la única fuente no-animal de vitamina D. El ergosterol, presente en las paredes celulares de los hongos, puede ser convertido en vitamina D por radiación ultravioleta (Koyyalamudi et al. 2009). El contenido de vitamina D dependerá de las condiciones postcosecha, ya que un hongo expuesto a la luz solar, incluso por cortos tiempos, tendrá mayor concentración de esta vitamina.

Además, los hongos son una buena fuente de minerales. Su contenido depende de la composición del sustrato, ya que los minerales presentes en él son tomados por el micelio y luego trasladados a los carpóforos. Los constituyentes minerales mayoritarios son potasio (K), fósforo (P), sodio (Na), calcio (Ca) y magnesio (Mg), con menores cantidades de cobre (Cu), zinc (Zn), hierro (Fe), molibdeno (Mo) y cadmio (Cd). Es importante tener en cuenta que los hongos también bioacumulan minerales tóxicos, como plomo (Pb) y radiocesio (<sup>137</sup>Cs) (Yoshida et al. 1994; Kirchner y Daillant 1998), por lo que su presencia deberá ser evitada en los sustratos de cultivo.

### 1.1.3 Características medicinales

Los hongos son una vasta fuente natural de productos medicinales. Entre las sustancias con actividad biológica aisladas de hongos se pueden mencionar, polisacáridos de alto peso molecular, polisacáridos ligados a proteínas de bajo peso molecular, glicoproteínas, alcaloides, triterpenoides y proteínas fúngicas inmunomoduladoras (Fips) (Chang y Miles 2004; Pala y Wani 2011). Varios de los compuestos polisacáridos de hongos se encuentran en distintas fases de ensayo clínico y se utilizan, especialmente en Asia, para tratar cáncer y otras enfermedades.

La utilización de hongos en la Medicina Tradicional China se remonta a la antigüedad y su práctica ha quedado registrada en antiguos manuscritos chinos (Smith et al. 2002). A lo largo de la historia los hongos se han utilizado para tratar epilepsia, heridas, enfermedades de la piel, enfermedades coronarias, artritis reumatoidea, cólera, fiebres intermitentes, diaforesis, diarrea, disentería, resfríos y enfermedades hepáticas (Pala y Wani 2011). Entre los efectos medicinales reportados en diferentes especies de hongos se encuentran: actividad antibiótica, actividad antiviral, incluyendo actividad anti-HIV, efectos antitumorales, actividad antioxidante, efectos cardiovasculares y renales, actividad antiaterogénica, actividad hipoglucémica, entre otros (Lindequist et al. 2005; Wasser 2011). Existe un volumen creciente de reportes que describen estas actividades, tanto en ensayos *in vivo* e *in vitro* en animales, como en ensayos clínicos en humanos (Roupas et al. 2012).

Algunos autores concuerdan en definir a los hongos como “adaptógenos”. Los adaptógenos modifican la respuesta biológica mediante la promoción de factores positivos y eliminando los factores negativos del cuerpo humano. Algunos hongos pueden estimular la respuesta inmune, mejorando las funciones del cuerpo ya existentes que previenen y enfrentan a las enfermedades. Por otro lado, pueden actuar frente a un rango de enfermedades autoinmunes, como las alergias. Es por ello que se considera que estos hongos son inmunoreguladores, activando o disminuyendo la producción de glóbulos blancos de acuerdo a la circunstancia (Smith et al. 2002).

Los compuestos de algunas especies de hongos previenen la oncogénesis y la metástasis, y muestran acción antitumoral directa contra varios tipos de tumores. La evidencia científica muestra que la suplementación de la dieta con distintos hongos medicinales puede mejorar significativamente la condición fisiológica y la prognosis de pacientes con cáncer (Smith et al. 2002; Pala y Wani 2011).

Una ventaja importante de los hongos medicinales y sus extractos es que suelen mostrar toxicidades muy bajas cuando se consumen regularmente, siendo bien tolerados con ninguno o escasos efectos adversos (Roupas et al. 2012). Por sus propiedades medicinales y su baja toxicidad, los hongos son un grupo representativo de los alimentos denominados “funcionales”, es decir, aquellos que presentan un efecto saludable, más allá de su efecto puramente nutricional, mostrando ventajas en la prevención y tratamiento de enfermedades.

#### 1.1.4 Mercado nacional e internacional de los hongos comestibles y medicinales

La producción de hongos comestibles y medicinales se ha incrementado notablemente en las últimas décadas, lo que indica un creciente interés en su consumo por parte de la población. En particular, el crecimiento de la producción de hongos de especialidad (distintos de los champiñones), se debe fundamentalmente a que su cultivo no requiere de sustratos compostados, y, en consecuencia, los costos de inversión, la infraestructura, mano de obra y tiempo de cultivo, son menores. Además, uno de los principales atractivos del cultivo de estos hongos, como se verá más adelante, es la posibilidad de emplear para ello materiales residuales de la agroindustria. La producción de hongos cuenta con la posibilidad de obtener una importante cantidad de un producto alimenticio apreciado por el mercado, en pequeñas áreas y en cortos períodos de tiempo

En China, principal productor de hongos comestibles y medicinales del mundo, la producción de hongos cultivados creció de 60.000 toneladas en 1978 a 6.630.000 toneladas en 2000 (Chang y Miles 2004). Si bien la mayor parte del mercado se concentra en Asia y Europa, en los últimos años en Norteamérica se ha incrementado a un ritmo de entre el 20 y el 40% anual. En Estados Unidos, entre 1989 y 1995, las ventas de hongo Shiitake (*Lentinula edodes*) se duplicaron, las de Gírgola (*Pleurotus ostreatus*) aumentaron un 36% y, en general, la venta de hongos comestibles creció un 25% (Halpern 2007).

La producción de hongos comestibles y medicinales en América Latina representa alrededor del 1% de la producción mundial de hongos. Entre 1994 y 1997 la participación en el mercado mundial se incrementó del 0,2% al 0,8%, siendo, después de Asia, la región que mayor crecimiento experimentó (Chang y Miles 2004).

Es difícil calcular la producción de hongos en Argentina ya que no existen estadísticas oficiales. Se estima que en el año 2000 la producción anual alcanzó un total de 1.500 toneladas, aunque la crisis económica de 2001 provocó un brusco descenso (Albertó y

Gasoni 2003). Sin embargo, en los últimos años se evidenció una recuperación de los valores de producción acompañando el creciente interés por parte de los consumidores, y se estima que hacia 2009 la producción anual había alcanzado las 2.500 toneladas (Urrutibehety 2009). En Argentina se cultivan comercialmente tres especies de hongos comestibles, *Agaricus bisporus* (champiñón, desde 1941), *Pleurotus ostreatus* (gírgola, desde los años `80) y *Lentinula edodes* (shiitake, intermitentemente desde 1993), y el total de la producción se destina al consumo interno (Albertó y Gasoni 2003).

El creciente interés por parte de la población en el valor nutricional y medicinal de los hongos y los bajos niveles de consumo (en torno a 50 g/hab/año) comparado con otras regiones (por ejemplo, Europa, 2 kg/hab/año), la posibilidad de incorporar nuevas especies comestibles y medicinales que hoy no son cultivadas (entre ellas *Ganoderma lucidum*) y la posibilidad de exportar el excedente de la producción, hacen del cultivo de hongos una actividad con alto potencial de desarrollo en Argentina. En nuestro país, el cultivo de hongos comestibles es una actividad en desarrollo, representada por algunos grandes productores, pero principalmente por PYMES y emprendimientos familiares, con una fuerte tendencia al asociativismo. Esta actividad representa una alternativa económica promisoría para muchos productores agrícolas, ya que la demanda interna no ha sido cubierta por la producción local. Una de las características favorables para el desarrollo de la fungicultura en la Argentina, es que emplea como sustrato residuos de la actividad agropecuaria y de la agroindustria. La biodegradación de residuos lignocelulósicos llevada a cabo por los hongos degradadores primarios, como los llamados hongos de la “pudrición blanca” (por ejemplo: gírgolas, shiitake y reishi) es un proceso de importancia en el sector productivo, ya que se logran dos objetivos al mismo tiempo, la producción de alimentos y la reducción del impacto ambiental que genera la eliminación inadecuada de tales residuos (Postemsky et al. 2014). Además, los sustratos agotados de la producción de hongos pueden tener aplicación en otras actividades como biofertilizantes y fuentes de enzimas para la biorremediación (Hölker et al. 2004; Postemsky et al. 2016). Este panorama indica que es importante favorecer el desarrollo de la fungicultura en el país, ya que es una actividad productiva, amigable con el ambiente y generadora de empleo.

## 1.2 EL HONGO *GANODERMA LUCIDUM*

*Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst (Lingzhi en chino; Reishi, Mannentake o Sachitake en japonés; Youngzi en coreano) es una especie de la clase Agaricomycetes, que pertenece a la familia Ganodermataceae del orden Polyphorales. Este hongo es responsable de producir

podrición blanca en una gran cantidad de especies arbóreas y puede ser descrito como un hongo fitopatógeno. De acuerdo a la tradición China, Lingzhi también es conocido como el “milagroso zhi” o “hierba auspiciosa”, y usualmente se lo considera como un símbolo de augurios felices y como una fuente de buena fortuna, salud, longevidad, y hasta inmortalidad (Chang y Miles 2004).

El género *Ganoderma* está ampliamente distribuido desde el Amazonas hasta el sur de Norteamérica y en la mayor parte de Asia. Se lo encuentra con más frecuencia regiones subtropicales que en regiones templadas (Stamets 1993). Es un hongo muy raro en el medio natural (Upton 2006), lo que en parte explica las leyendas que han surgido a su alrededor en China.

### 1.2.1 Taxonomía

La taxonomía del género *Ganoderma* (del latín, *gano*, brillante, *derma*, piel) es muy compleja e incluye más de 250 especies descritas (Wasser 2005). Como resultado, el concepto de especie en el género ni está bien establecido ni es universalmente aceptado (Bishop et al. 2015). La incertidumbre en la identificación taxonómica de las especies de *Ganoderma* se debe mayormente a la gran variabilidad de las características macroscópicas y microscópicas del basidiocarpo. De acuerdo a Chang y Miles (2004), a grandes rasgos, el género *Ganoderma* puede dividirse en dos grupos: el complejo *G. lucidum* (del latín, *lucidus*, brillante, en referencia a la apariencia de la superficie del carpóforo) con píleo laqueado y el complejo *G. applanatum*, no-laqueado.

### 1.2.2 Características morfológicas

Las especies del complejo *Ganoderma lucidum* poseen carpóforos anuales con una cutícula laqueada amarilla a rojiza y una capa superior que es suave y usualmente está dispuesta en bandas concéntricas, con zonas de diferente color (**Figura 1**). Las áreas de nuevo crecimiento (bordes) son de color blanco, oscureciéndose hacia un amarillo amarronado y luego rojo amarronado cuando maduro. La forma del carpóforo es variable, de circular a semi-circular a arriñonada, 2-20 cm de ancho, 4-8 cm de espesor. La superficie a veces está cubierta por un polvo amarronado de esporas. Posee poros en el lado inferior, de color blanco que se torna marrón al ser tocado. El estípote, cuando está presente, es blanco a amarillo, eventualmente oscureciéndose hacia el marrón o negro, excéntrico o unido lateralmente al sombrero, usualmente sinuoso. El basidiocarpo fresco es suave, fresco, húmedo y algo correoso. Cuando se seca es duro y leñoso.

Cuando los niveles de dióxido de carbono son altos y los niveles de luz bajos (por ejemplo, en el interior de la cavidad formada por el sistema de raíces de un árbol caído), surgen hongos con estípites largos, habitualmente ramificados y sin “sombbrero”; esta rara forma se conoce como “cuernos de ciervo” (**Figura 2**) y es altamente valuada en Asia (Stamets 1993; Upton 2006).



Se observa la forma arrañonada y las bandas de crecimiento concéntrico, más claras hacia los bordes.

**Figura 1:** Basidiocarpo de *Ganoderma lucidum* en su forma habitual de “sommbrero”. Por jatlas [CC BY-SA 2.5 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.5>)], via Wikimedia Commons.



De acuerdo a las condiciones ambientales o de cultivo, *Ganoderma lucidum* puede perder su forma de “sombrero” y adquirir la forma de “cuernos de ciervo”.

**Figura 2: Forma de “cuernos de ciervo” de *Ganoderma lucidum*. Por Hokkaido Reishi Co., Ltd (trabajo propio) [CC BY-SA 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>)], via Wikimedia Commons.**

Cuando es molido, el basidiocarpo se fractura característicamente en hebras en vez de formar un polvo homogéneo. Estas hebras están compuestas principalmente por hifas generativas, de unión y esqueléticas, que se diferencian por el grosor de sus paredes y grado de ramificación.

*Ganoderma lucidum* produce esporas de color marrón rojizo, elipsoides con extremo romo, verrugosa, 9-12 x 5,5-8  $\mu\text{m}$ , doble pared, con pilares internos entre paredes que asemejan a columnas.

### 1.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE *GANODERMA LUCIDUM*

Desde hace mucho tiempo en China, *G. lucidum* ha sido conocido como una especie de panacea para curar todo tipo de enfermedades. Tradicionalmente se lo ha utilizado para mejorar la capacidad intelectual y la memoria, potenciar la sexualidad, promover la agilidad y la longevidad, tratar enfermedades hepáticas, distrofia muscular, neurastenia, envenenamiento, nefritis, hiperlipemia, artritis, asma, bronquitis, úlcera gástrica, arteriosclerosis, leucopenia, diabetes, insomnio y anorexia (Chang y Miles 2004; Wasser 2005; Russell y Paterson 2006;

Halpern 2007; Sanodiya et al. 2009; Ulbricht et al. 2010). Se mencionan a continuación brevemente algunas de las actividades biológicas atribuidas a diferentes extractos o sustancias aisladas de distintas partes de *G. lucidum*.

### 1.3.1 Efecto antitumoral

*Ganoderma lucidum* mostró efectos antineoplásicos en estudios en animales. En humanos la actividad antitumoral no está probada; sin embargo estudios clínicos sugieren que algunos compuestos de *G. lucidum* tienen utilidad como coadyuvantes en terapias tradicionales, mejorando algunos parámetros hematológicos, reduciendo los síntomas y mejorando la calidad de vida en pacientes con cáncer (Ulbricht et al. 2010). Estudios recientes mostraron que extractos de *G. lucidum* mejoraron la supervivencia y calidad de vida de pacientes tratados con quimio y radioterapia, pero no se observaron efectos cuando se lo administró solo (Jin et al. 2016).

La actividad antitumoral de *G. lucidum* se debería a la acción conjunta en distintos niveles de varios de sus componentes. Entre estas acciones se pueden mencionar la habilidad de los polisacáridos de mediar en el sistema inmune incrementando la producción de citoquinas, la inhibición de la ADN polimerasa y de la modificación postranscripcional de oncoproteínas (Wasser 2005). Algunos estudios han mostrado citotoxicidad directa de *G. lucidum* en células tumorales en animales (Upton 2006). También se ha reportado actividad anti-angiogénica en extractos alcohólicos y polisacáridos del cuerpo de fructificación (Batra et al. 2013).

### 1.3.2 Efectos inmunomodulatorios

Los efectos inmunomodulatorios de sustancias aisladas de *G. lucidum* incluyen mitogenicidad y activación de células inmunes efectoras como linfocitos T, macrófagos y células NK, lo que lleva a la producción de citoquinas incluyendo, IIs, TNF- $\alpha$ , e IFNs (Sanodiya et al. 2009). También se han reportado otros efectos como inhibición de mastocitos, activación de linfocitos B y del sistema de complemento (Wasser 2005). Tanto los polisacáridos, proteínas (LZ-8) y triterpenoides serían responsables de esta acción (Batra et al. 2013). El hongo *G. lucidum* también mostró efectos quimio y radioprotectores que son atribuidos a sus efectos en el sistema inmune (Sanodiya et al. 2009).

### 1.3.3 Actividad antiinflamatoria

Tradicionalmente *G. lucidum* se ha utilizado como agente antiinflamatorio para el tratamiento de asma y alergia. Distintos triterpenoides presentes en *G. lucidum* han mostrado potente actividad antiinflamatoria en ensayos animales (Sanodiya et al. 2009). Algunos ácidos ganodéricos y otros compuestos no triterpenoides han mostrado actividad inhibitoria de la liberación de histamina desde mastocitos y actividad antiinflamatoria en líneas celulares *in vitro* (Wasser 2005; Batra et al. 2013).

### 1.3.4 Actividad hepatoprotectora

Varios estudios han mostrado que *G. lucidum* exhibe actividad protectora contra daño de los hepatocitos inducido por compuestos químicos tóxicos, como cloroformo y d-galactosamina (Sanodiya et al. 2009). Si bien el mecanismo de acción no está definido se han sugerido varias posibilidades como la actividad antioxidante y anti-radical, modulación de enzimas hepáticas, inhibición de la enzima  $\beta$ -glucuronidaza, actividad antifibrótica y antiviral, modulación de la producción de NO, mantenimiento del calcio hepatocelular, homeostasis y efectos inmunomodulatorios (Wasser 2005; Batra et al. 2013).

### 1.3.5 Efecto antidiabetes

La fracción de polisacáridos de *G. lucidum* tiene potencial actividad hipoglucémica y antihiper glucémica. Estos efectos se deberían a la capacidad de los polisacáridos de *G. lucidum* de elevar los niveles séricos de insulina y su habilidad de mejorar la utilización de glucosa en tejidos periféricos y en el hígado (Upton 2006; Batra et al. 2013).

### 1.3.6 Funciones cardiovasculares y circulatorias

Estudios en animales y clínicos han mostrado que diversas fracciones de *G. lucidum* tienen actividad antihipertensiva y disminuyen significativamente los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre (Batra et al. 2013). También se ha reportado la habilidad de *G. lucidum* de inhibir la agregación plaquetaria (Upton 2006). Estudios *in vitro* en corazón de rana con una tintura de *G. lucidum* mostraron un efecto cardiotónico significativo (Upton 2006).

### 1.3.7 Poder antibiótico y antiviral

De acuerdo a varios estudios, algunos constituyentes de *G. lucidum* presentes en extractos acuosos y orgánicos, serían capaces de inhibir el crecimiento de bacterias gram-positivas y

gram-negativas (Batra et al. 2013). Otros compuestos, como la proteína aislada de carpóforo *Ganoderma lucidum*, mostraron potencial actividad antifúngica (Batra et al. 2013).

Además, estudios *in vitro* indican que algunos componentes de bajo peso molecular tendrían efecto inhibitorio contra el VIH, el virus Epstein-Barr, el virus del herpes simple, y otros virus. Por otro lado, un preparado de polisacáridos mostró actividad contra el virus de la Hepatitis B (Ulbricht et al. 2010). El mecanismo de acción aún no ha sido dilucidado, aunque estarían involucrados múltiples mecanismos en diferentes blancos. Se ha reportado que algunos triterpenoides actúan como potentes inhibidores de las enzimas ADN-polimerasas y VIH-1-proteasas (Sanodiya et al. 2009).

### 1.3.8 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante ha sido reportada en estudios en animales *in vivo* e *in vitro*, tanto en extractos acuosos como extractos orgánicos de *G. lucidum* (Batra et al. 2013).

### 1.3.9 Actividad antiandrogénica

Se ha reportado que algunos triterpenoides de *G. lucidum* tienen potente actividad inhibitoria 5 $\alpha$ -reductasa. Estudios clínicos y en animales mostraron que *G. lucidum* tiene gran potencial para el tratamiento de enfermedades mediadas por andrógenos, como la hiperplasia prostática benigna (Sanodiya et al. 2009; Batra et al. 2013).

### 1.3.10 Toxicidad

En experimentos en animales, los extractos de *G. lucidum* han mostrado muy baja toxicidad. En estudios clínicos algunos pacientes han reportado síntomas temporarios de somnolencia, sed, erupciones, hinchazón, micción frecuente, transpiración anormal y diarrea (Wasser 2005). También podrían presentarse interacciones con otros medicamentos. La actividad antiplaquetaria de *G. lucidum* puede presentar un efecto aditivo con medicaciones anticoagulantes como warfarina y aspirina. Por su acción inmunomoduladora puede interferir con la acción de drogas inmunosupresoras utilizadas en pacientes trasplantados.

El perfil de seguridad de *G. lucidum* está clasificado por la American Herbal Products Association como Clase 1: hierbas que pueden ser consumidas de forma segura cuando se utiliza apropiadamente (Upton 2006).

## 1.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE *GANODERMA LUCIDUM*

La diversidad en las acciones biológicas del hongo *Ganoderma lucidum* se puede atribuir al hecho de que está compuesto de una gran cantidad de sustancias químicas que pueden agruparse en diferentes grupos. El carpóforo, el micelio y las esporas de *G. lucidum* contienen más de 400 compuestos bioactivos diferentes (Wasser 2005). Entre ellas podemos encontrar alcaloides, aminoácidos y péptidos, elementos inorgánicos, esteroides, esterol, nucleótidos, elementos traza, ácidos grasos y ácidos orgánicos. Los dos grupos de compuestos con mayor actividad farmacológica parecen ser los triterpenoides y los polisacáridos.

### 1.4.1 Triterpenoides

Los triterpenos son un tipo de terpeno formado por seis unidades de isopreno. Se han identificado más de 140 triterpenoides en *Ganoderma lucidum*, divididos en 10 grupos diferentes de acuerdo a su estructura química y propiedades biológicas conocidas (Wasser 2005; Xia et al. 2014). Los triterpenoides predominantes son los ácidos ganodéricos A-Z (Upton 2006). Los ácidos ganodéricos están formados por cuatro unidades de isopreno cíclicas y dos lineales (Figuras 3 y 4).

Los triterpenoides son compuestos de bajo peso molecular que regulan directamente ciertas funciones celulares como la apoptosis, el ciclo celular y la angiogénesis. Los triterpenoides de *G. lucidum* tendrían efecto antioxidante, citotóxico, anti-metástasis, anti-VIH y neuroprotector (Bishop et al. 2015). Los triterpenoides son los que le dan al hongo su característico sabor amargo.

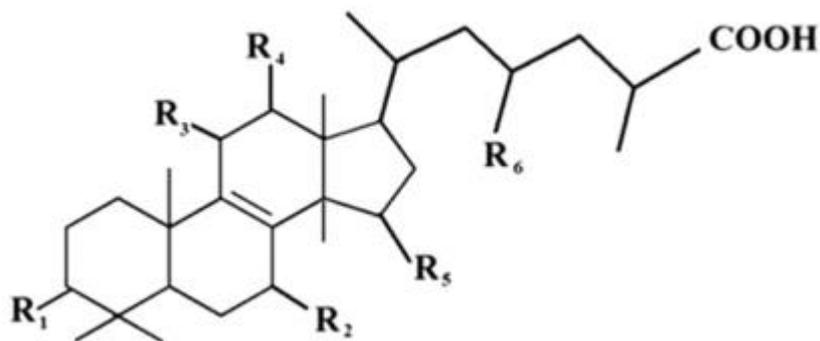


Figura 3: Estructura básica de los ácidos ganodéricos. Las cadenas laterales R1 - R6 determinan el tipo de ácido ganodérico.

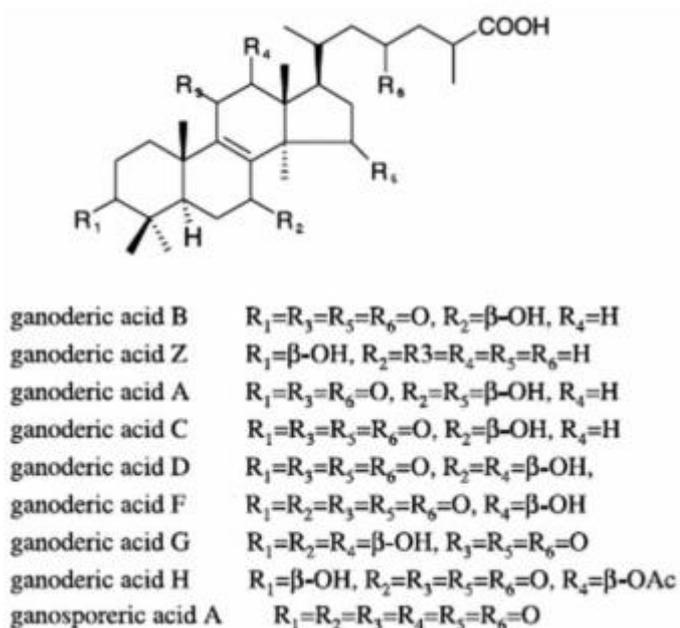


Figura 4: Estructura de algunos ácidos ganodéricos (Sanodiya et al. 2009).

#### 1.4.2 Polisacáridos

La mayoría de los polisacáridos de *Ganoderma lucidum* son de alto peso molecular (400.000 a 1.000.000 Da) y comprenden  $\beta$ -D-glucanos, heteropolisacáridos y glicoproteínas (Wasser 2005; Boh et al. 2007). La estructura básica de los glucanos es una cadena de  $\beta$ -1-3 D-glucopironano con cadenas laterales de 1-15 unidades de  $\beta$ -1-6 D monoglucil (**Figura 5**). La mayoría de los polisacáridos de *G. lucidum* son heteropolímeros compuestos principalmente por glucosa junto con xilosa, manosa, galactosa y fucosa, en diferentes conformaciones (Bishop et al. 2015). Los polisacáridos serían los principales responsables de la actividad inmunomoduladora observada en estudios en animales y clínicos (Bishop et al. 2015). Además de los polisacáridos solubles, *G. lucidum* posee una matriz del polisacárido quitina que no es digerible y que le confiere al hongo su dureza.

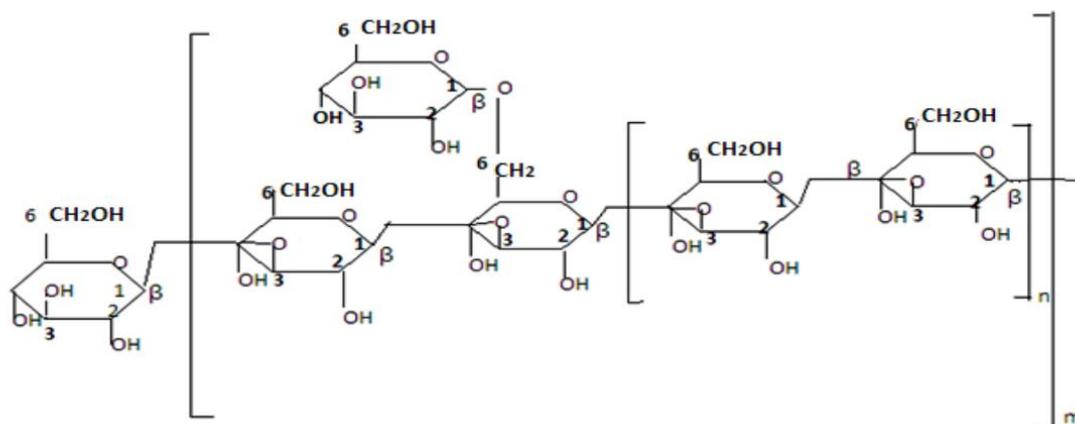


Figura 5: Estructura básica de los  $\beta$ -glucanos de *G. lucidum* (Deepalakshmi y Mirunalini 2011).

### 1.4.3 Proteínas

Varias proteínas con actividad medicinal han sido reportadas en *G. lucidum*. Una de ellas, LZ-8, fue aislada del micelio y tiene una secuencia similar a la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina, y ha mostrado actividad inmunomoduladora. LZ-8 tiene una estructura de 110 aminoácidos con un amino terminal acetilado, y una masa molecular de 12 kDa (Russell y Paterson 2006). También se han reportado complejos péptido-polisacárido con actividad antioxidante y antitumoral. Otra proteína aislada de *G. lucidum* ha sido denominada Ganodermina. Ganodermina tiene un peso molecular de 15 kDa y actividad antifúngica (Russell y Paterson 2006).

### 1.4.4 Otros compuestos

Los nucleósidos y nucleótidos adenina, adenosina, uracilo y uridina han sido aislados del micelio de algunas especies de *Ganoderma* (Russell y Paterson 2006). Adenosina ha mostrado tener actividad antiagregante. También se han aislado los alcaloides colina y betaína, además de los alcaloides nóveles ganoina, ganodina y ganoderpurina (Russell y Paterson 2006). Se ha reportado la presencia de compuestos fenólicos que estarían relacionados con la actividad antioxidante del hongo (Sliva 2003).

## 1.5 LOS HONGOS MEDICINALES COMO NUTRACÉUTICOS, MICOTERÁPICOS Y SUPLEMENTOS DIETARIOS.

Los “nutracéuticos” (contracción de *nutrición* y *farmacéutico*) pueden definirse como un producto aislado de un alimento, que se cree tiene un efecto beneficioso para la salud o para la prevención de enfermedades crónicas. Sin embargo, el término no está globalmente aceptado y no existe una definición regulatoria (Bishop et al. 2015). En la definición más amplia, el término incluye a los alimentos funcionales, a los suplementos dietarios y a los alimentos medicinales.

El Código Alimentario Argentino (CAA) define a los suplementos dietarios como “productos destinados a incrementar la ingesta dietaria habitual, suplementando la incorporación de nutrientes en la dieta de las personas sanas que, no encontrándose en condiciones patológicas, presenten necesidades básicas dietarias no satisfechas o mayores a las habituales”. Como todos los alimentos, se venden libremente. Las publicidades de los suplementos dietarios no pueden atribuirle “acciones y/o propiedades terapéuticas, que sugieran que es un producto medicinal o mencionen que diagnostica, cura, calma, mitiga, alivia, previene o protege de una determinada enfermedad. Sólo se admitirá incluir “ayuda a prevenir” o “ayuda a proteger”, siempre que dichas declaraciones resulten beneficiosas ante una enfermedad clásica por deficiencia de nutrientes” (Disposición ANMAT N° 4980/2005).

Por otro lado, la Administración Nacional de Alimentos, Medicamentos y Tecnología Médica (ANMAT) define como medicamento fitoterápico a “los medicamentos que contengan como principio activo drogas vegetales puras y/o mezclas definidas de estas y/o preparados de drogas vegetales, tradicionalmente usadas con fines medicinales, y que no contengan sustancias activas químicamente definidas o sus mezclas aun cuando fuesen constituyentes aislados de plantas, salvo los casos que así se justifiquen”. Los medicamentos (incluyendo los fito y micoterápicos) deben cumplir con tres requisitos básicos: seguridad, eficacia y calidad. Mientras que los suplementos dietarios son considerados alimentos y sólo deben cumplir con las buenas prácticas de manufactura. Las hierbas o sus extractos, con actividad farmacológica científicamente comprobada, que quieran ser comercializadas con indicaciones de uso medicinal, deben ser registradas en la categoría de medicamentos fitoterápicos. Dado que muchas de estas hierbas se encuentran registradas en el CAA, pueden también registrarse como suplementos dietarios, sólo que sin referencia a acciones terapéuticas (Debenedetti 2011).

Actualmente, en las sociedades occidentales existe una fuerte tendencia a lo natural y a buscar productos con un mayor valor agregado. Los hongos comestibles (champiñón de París, gírgolas, shiitake, entre los más conocidos) ya tienen una gran aceptación por los consumidores, considerándolos como un alimento nutritivo, de agradable sabor y beneficiosos para la salud. En el área de la herboterapia, son los hongos los que en la actualidad aportan a la industria farmacéutica una nueva fuente de productos con potencial acción terapéutica, visualizándose como las drogas del futuro, por lo que es válido pensar que el consumo de estos productos tenderá a incrementarse significativamente en los próximos años.

El interés creciente en medicinas tradicionales y el reconocimiento de las numerosas actividades biológicas de los hongos han llevado al desarrollo de los “nutracéuticos de hongos”. Un nutracéutico de hongos se define como un extracto refinado, o parcialmente refinado, del micelio o el carpóforo del hongo, que se consume en forma de gotas, comprimidos o cápsulas como suplemento dietario y que tiene potenciales aplicaciones terapéuticas (Wasser 2011).

En EEUU, el 42% de la población consume algún tipo de fitoterápico. El mercado de los fitomedicamentos aumentó sustancialmente después de la creación de la ley “Dietary Supplement Health and Education Act” del año 1994. Esta ley permite considerar a los medicamentos a base de hierbas y hongos como suplementos dietarios.

También en nuestro país gran parte de la sociedad consume hierbas medicinales siguiendo una cultura de tradición, obteniendo las hierbas de ambientes naturales o de ventas no controladas. Existe una demanda en aumento en los grandes centros urbanos donde se consumen como suplementos dietarios, o como fitoterápicos producidos en laboratorios farmacéuticos reconocidos. En Argentina existen muy pocos trabajos sobre su prevalencia; pero una indicación del tamaño de la población que los consume puede apreciarse en un estudio observacional sobre 245 entrevistados donde se concluyó que un tercio de las personas que asistían al centro de salud utilizaban medicinas alternativas y/o complementarias (Ruiz y Soso 2006); las mismas eran personas de mejores ingresos y en su mayoría de sexo femenino.

En Estados Unidos los productos derivados del hongo *Ganoderma lucidum* están regulados como suplementos dietarios. El hongo también está incluido en la *Farmacopea de la República Popular de China* (ed. año 2000) como un agente aprobado para el tratamiento de mareos, insomnio, palpitaciones, falta de aliento, tos y asma (Ulbricht et al. 2010). Los productos de

*Ganoderma* pueden ser vendidos como drogas de prescripción, o micoterápicos, en algunos países asiáticos, aunque internacionalmente se los publicita como suplementos dietarios (Bishop et al. 2015).

Entre 1991 y 1999 el mercado mundial de hongos medicinales, extractos de hongos medicinales y derivados, creció de USD 1,2 mil millones a USD 6 mil millones, de los cuáles USD 1,6 mil millones pueden atribuirse solo a *Ganoderma lucidum* (Smith et al. 2002; Chang y Miles 2004; Lindequist et al. 2005). En 2011 el mercado de los suplementos dietarios provenientes de hongos llegó a los USD 15 mil millones, representando un 10% del mercado total de los suplementos dietarios (Wasser 2011). En 2008 la producción mundial de *G. lucidum* era de 9.500 toneladas de las cuales 6.000 toneladas fueron producidas en China (Sanodiya et al. 2009).

## 1.6 OBJETIVOS DE LA TESIS

*Ganoderma lucidum* es económica y ecológicamente importante no solo como una fuente de productos medicinales y nutracéuticos, sino que, como hongo de la pudrición blanca, posee una batería enzimática que le permite descomponer compuestos como la lignina y la celulosa. Estos compuestos aparecen como constituyentes mayoritarios en muchos residuos agroindustriales, que pueden utilizarse como sustrato base para la producción del hongo. A su vez, el residuo biotransformado por acción del hongo puede ser utilizado como punto de partida de otras actividades productivas (Rinker 2002; Phan y Sabaratnam 2012; Postemsky et al. 2016), lo que fundamentaría un ciclo productivo sustentable de emisión cero.

En Argentina actualmente no existe producción comercial de *G. lucidum*. Esto se debe en parte a que su cultivo produce rendimientos menores al de otros hongos comestibles cultivables de especialidad y a que su consumo no está tan extendido en la población como el de gírgola o shiitake. Es por ello que es necesario, en primer lugar, optimizar su cultivo para mejorar los rendimientos, y además facilitar el consumo del hongo por parte de la población mediante el desarrollo de productos nutracéuticos.

Teniendo en cuenta la importancia y el gran potencial de desarrollo del hongo medicinal *G. lucidum* y sus productos derivados como actividad productiva sustentable en nuestro país y la región, el objetivo general de esta Tesis fue estudiar alternativas para mejorar los rendimientos de producción de *G. lucidum* a partir de un residuo abundante de la agroindustria

Argentina, buscando optimizar la obtención de productos activos con el fin de proponer el desarrollo de nutraceuticos.

Este objetivo general se abordó mediante los siguientes objetivos particulares:

1. Evaluar diferentes aceites vegetales y sulfato de cobre como estimuladores del crecimiento y fructificación optimizada de *G. lucidum* en sustrato a base de cáscara de semilla de girasol.
2. Evaluar el efecto de diferentes sustratos de cultivo sobre el contenido de compuestos bioactivos: polisacáridos, triterpenoides y polifenoles.
3. Estudiar el potencial prebiótico de los polisacáridos obtenidos de *G. lucidum*, sobre cepas de bacterias probióticas.
4. Desarrollar una formulación a partir del basidiocarpo de *G. lucidum* que conserve la mayor proporción de compuestos activos posible para su uso como nutraceutico.

## CAPÍTULO 2:

# OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO DE *Ganoderma lucidum* EN UN SUSTRATO A BASE DE CÁSCARA DE SEMILLA DE GIRASOL. EFECTO DE ACEITES VEGETALES Y COBRE

## 2.1 INTRODUCCIÓN

### 2.1.1 El cultivo de hongos comestibles y medicinales

El cultivo de hongos nació hacia el año 600 D.C. cuando *Auricularia auricula* fue por primera vez cultivada en China en troncos de madera. Le siguieron otros hongos, cultivados de manera similar, como *Flammulina velutipes* (800 D.C.) y *Lentinula edodes* (1000 D.C.). El mayor avance en el cultivo de hongos surgió en Francia alrededor de 1600 D.C. cuando *Agaricus bisporus* (champiñón) fue cultivado en un sustrato compostado (Chang y Miles 2004). El champiñón fue ganando popularidad en el mundo occidental y es aún hoy el hongo de cultivo más popular. En las últimas décadas, como consecuencia del perfeccionamiento de las técnicas de cultivo y el mejoramiento de las cepas, así como también de una mayor aceptación por parte del consumidor, el cultivo de hongos comestibles y medicinales se expandió en varios órdenes de magnitud (Kües y Liu 2000).

Las dos fases en el crecimiento y desarrollo de un hongo cultivado se conocen como estados **vegetativo** y **reproductivo**. En la jerga de los cultivadores de hongos el estado vegetativo se conoce como **fase de corrida del “spawn” o micelio**, y el estado reproductivo como **fase de fructificación**. El cultivo de hongos puede considerarse como la práctica de obtener cuerpos reproductivos mediante la repetición artificial de estas dos fases de crecimiento (Cho 2005).

Durante la fase de crecimiento vegetativo el micelio produce enzimas extracelulares que degradan los componentes lignocelulósicos del sustrato en compuestos más simples. Estos

compuestos más simples son solubles y pueden ser absorbidos por las hifas para ser utilizados en el metabolismo del hongo. Cuando la colonización del sustrato es completa se puede pasar del estado vegetativo al reproductivo. Este cambio en la fase de crecimiento se logra mediante ciertos estímulos ambientales que pueden ser aprovechados por el cultivador. Algunos de estos factores ambientales pueden ser: **temperatura, luz y cambio de la concentración de gases atmosféricos**. Estos factores, junto con la **humedad** ambiental y del sustrato, deben ser regulados y controlados, ya que son críticos en el crecimiento y desarrollo del hongo (Chang y Miles 2004).

El cultivo de hongos consiste en una serie de pasos definidos, cada uno con sus propios requisitos y procedimientos. Estos pasos son la producción del spawn o inóculo, la preparación e inoculación del sustrato, la corrida del spawn, el desarrollo de los cuerpos reproductivos y la cosecha (**Figura 6**).

### 2.1.2 Producción del inóculo

Se conoce como “**spawn**”, “**semilla**” o **inóculo**, al medio en el cual se ha desarrollado el micelio de un cultivo que tiene la capacidad genética para formar cuerpos de fructificación en condiciones apropiadas de cultivo, y que se utiliza para inocular el sustrato en el cultivo de hongos. El micelio del hongo se cultiva inicialmente en un medio nutritivo de agar. Este se utiliza para inocular al sustrato que servirá de portador del micelio. El sustrato utilizado para la producción del inóculo puede ser diferente a los materiales utilizados en el cultivo, o puede ser el mismo. Algunos de los sustratos utilizados en la producción del inóculo pueden ser granos (centeno, trigo, sorgo), paja de arroz cortada, residuos de algodón, cáscara de arroz, etc. (Chang y Miles 2004).

La preparación del inóculo es un proceso que debe realizarse bajo condiciones asépticas. Este paso es crítico para el cultivo de hongos ya que un micelio viejo, degenerado, no apto genéticamente para producir cuerpos de reproducción o contaminado microbiológicamente, afectará directamente el rendimiento del cultivo (Chang y Miles 2004).

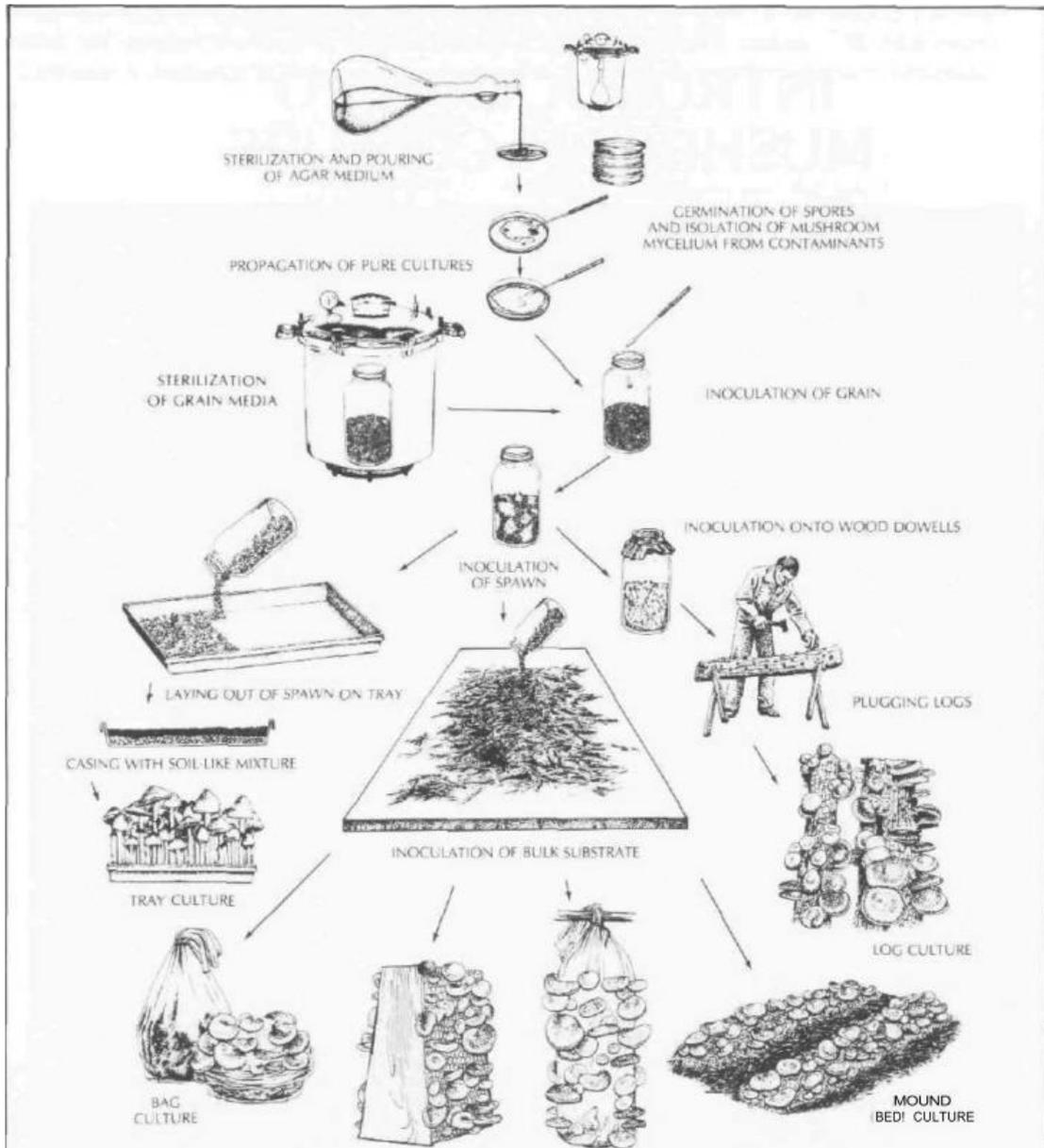


Figura 6: Esquema de las técnicas y los pasos generales del cultivo de hongos (Stamets y Chilton 1983).

### 2.1.3 Preparación del sustrato

Al ser heterótrofos, los hongos deben satisfacer todos sus requerimientos nutritivos desde el sustrato, a diferencia de las plantas que pueden sintetizar compuestos orgánicos a través de la fotosíntesis. Es por ello que la preparación del sustrato juega un rol más exhaustivo en la producción de hongos, que el del suelo en el crecimiento de las plantas superiores. El sustrato para el crecimiento de hongos debe ser apropiado tanto química como físicamente, como también tener un contenido microbiano apropiado. Su composición química

debe satisfacer las necesidades nutricionales del hongo y no poseer sustancias que inhiban su desarrollo. Por lo general, los hongos solo requieren una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, algunos minerales y vitaminas, y agua. La relación C:N es importante para el crecimiento del hongo y depende de cada especie. Las fuentes de carbono y nitrógeno suelen estar disponibles en el sustrato en forma de lignina, celulosa, hemicelulosa y proteínas. Como se indicó anteriormente, los hongos de la pudrición blanca, como *Ganoderma lucidum*, poseen una batería enzimática que les permite crecer directamente en el sustrato lignocelulósico sin la necesidad de realizar un procedimiento de compostaje previo. Al sustrato lignocelulósico básico se le pueden agregar suplementos nutricionales (por ejemplo, distintos tipos de granos) que aporten proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales (Stamets y Chilton 1983). También debe controlarse el pH con el agregado de sustancias que actúan como buffers, como el carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ).

Desde el punto de vista físico, el sustrato debe tener una adecuada capacidad de retención de agua y su estructura debe permitir una buena aireación en toda su masa. Esto se logra controlando el tamaño de partícula y con el agregado de yeso ( $\text{SO}_4\text{Ca}$ ), que ayuda a mantener a las partículas separadas y aireadas.

La microbiota presente en el sustrato no debe competir con el crecimiento del hongo, y por lo general se requieren procesos de pasteurización. La pasteurización reduce la carga microbiana original que pueda interferir con el desarrollo normal del hongo y por lo tanto tiene un efecto directo sobre el rendimiento final del cultivo.

El cultivo de hongos es el único proceso biotecnológico de gran escala que utiliza creativamente materiales lignocelulósicos (Stamets 1993). Todos los hongos de la pudrición blanca son degradadores de lignocelulosa y pueden utilizar madera como sustrato para el crecimiento miceliar o la producción de carpóforos (Smith et al. 2002). El método histórico de cultivo, que aún se practica principalmente en Asia o en producciones a baja escala, es directamente sobre troncos de madera dura. Este método, que se realiza al aire libre, produce hongos de buena calidad. Sin embargo, requiere condiciones climáticas apropiadas y al producir bajos rendimientos no es económicamente adecuado.

Actualmente la mayor parte de la producción a gran escala de hongos comestibles y medicinales se realiza sobre una gran diversidad de sustratos, muchos de ellos residuos agroindustriales con alto contenido lignocelulósico, empacados en bolsas de polipropileno para formar “troncos sintéticos”. Estos “troncos sintéticos” son en esencia biorreactores

formados por las tres fases requeridas por el hongo: (1) una fase sólida con el material lignocelulósico y el resto de los nutrientes, (2) una fase acuosa íntimamente asociada con la fase sólida y (3) una fase gaseosa continua con el ambiente externo (Smith et al. 2002).

#### **2.1.4 Pasteurización del sustrato**

La elaboración del sustrato para el cultivo de hongos comestibles y medicinales, es uno de los desafíos más importantes en la producción de los mismos. El desarrollo de microorganismos contaminantes competidores durante la etapa de corrida y fructificación del micelio puede generar problemas en los rendimientos. Además hay que tener en cuenta su influencia en la calidad sanitaria de un producto destinado al consumo humano. La pasteurización es un proceso simple, de fácil acceso para la mayoría de los productores, mediante el cual se trata de dar ventaja en la colonización del sustrato al micelio del hongo a cultivar. Sin embargo, los procedimientos se replican sin tener en cuenta los sustratos y aditivos, que podrían afectar el resultado de dicho tratamiento térmico.

#### **2.1.5 Incubación o corrida del micelio**

La corrida del micelio (o corrida del “spawn”) es la fase en la que el micelio crece desde el inóculo hacia el sustrato. Durante esta etapa se debe mantener la temperatura y humedad adecuada para la especie particular que se esté cultivando. Es importante controlar la temperatura del sustrato ya que en esta etapa el micelio produce calor. Temperaturas demasiado altas pueden inhibir o incluso matar al micelio. Para disminuir el riesgo de la termogénesis, la disposición de las bolsas en la sala de corrida de micelio debe ser tal que permita un adecuado flujo del aire.

Durante la fase vegetativa de incubación el crecimiento ocurre enteramente dentro del ambiente de la bolsa de plástico cerrada, donde el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y otros gases existen en condiciones de concentración relativamente altas. Pese a la presencia de pequeños orificios en las bolsas que permiten una lenta difusión de gases, en el centro de las bolsas se pueden alcanzar concentraciones de dióxido de carbono que exceden el 2% (Stamets 1993). La recirculación de aire dentro de la sala es necesaria para evitar la formación de bolsones de  $\text{CO}_2$  (tiende a acumularse junto al piso) y mantener una temperatura uniforme.

Las condiciones de corrida del micelio deben favorecer una rápida colonización del sustrato, de lo contrario pueden establecerse organismos competidores (Stamets y Chilton

1983). Una vez que se completa la colonización del sustrato debe inducirse la fructificación y pasar a la siguiente etapa.

### 2.1.6 Desarrollo de los cuerpos de fructificación

Una vez completa la colonización del sustrato, la bolsa se traslada a la “sala de fructificación”, se abre por un extremo y los niveles de concentración de dióxido de carbono se emparejan con el del ambiente (en torno al 0,035%). El cambio brusco de concentración de dióxido de carbono es uno de los estímulos para la formación de primordios. Estos son el primer estadio de diferenciación micelial que finalmente se desarrollarán en carpóforos.

Las condiciones ambientales de la sala de fructificación deben mantenerse en el rango óptimo ya que juegan un rol crucial en la formación del primordio y la producción de los cuerpos de fructificación. Las condiciones ambientales apropiadas, por lo general son diferentes de las condiciones de incubación y deber ser empíricamente determinadas para cada especie (Kües y Liu 2000).

La aparición de los cuerpos de reproducción se produce comúnmente en ciclos rítmicos que se conocen como “oleadas”. El estado de maduración al momento de la cosecha y el método de cosecha varía con la especie.

### 2.1.7 Cultivo de *Ganoderma lucidum*

*Ganoderma lucidum* es difícil de encontrar en estado natural y por lo tanto la cantidad de hongo silvestre no es suficiente para su explotación comercial (Sanodiya et al. 2009). Entonces su cultivo en sustratos sintéticos sólidos es esencial para abastecer la demanda creciente de los mercados internacionales. El cultivo artificial de *G. lucidum* se logró por primera vez a principios de la década de 1970 y, desde 1980 particularmente en China, la producción de *G. lucidum* se ha desarrollado rápidamente (Chang y Miles 2004; Zhou et al. 2012).

Su cultivo es más complejo que el de otras especies comerciales. El desarrollo del basidiocarpo requiere condiciones ambientales estables. El control de la temperatura y la humedad es crítico; la desecación de la superficie de crecimiento o una temperatura fuera del rango adecuado interrumpe el crecimiento del basidiocarpo. En la **Tabla 1** se detallan las condiciones ambientales óptimas para cada una de las principales fases del desarrollo de un cultivo de *G. lucidum*.

**Tabla 1: Condiciones ambientales requeridas en distintos estadios del cultivo de *Ganoderma lucidum* (Stamets 1993; Zhou et al. 2012; datos propios).**

	Corrida del micelio	Iniciación del primordio	Desarrollo del carpóforo
<b>Temperatura</b>	25-30 °C	18-25 °C	24-28 °C
<b>Humedad del sustrato</b>	60-65%	60-65%	60-65%
<b>Humedad del ambiente</b>	60-70%	85-90%	85-95%
<b>Niveles de CO<sub>2</sub></b>	Hasta 50.000 ppm	2.000-5.000 ppm 20.000-40.000 ppm (formas de “cuernos de ciervo”)	<2.000 ppm
<b>Luz</b>	Oscuridad	500 a 1.000 lx (fotoperiodo de 12 hs.)	1.000 a 3.000 lx (fotoperiodo de 12 hs.)

Por otro lado, *G. lucidum* puede crecer en sustratos sintéticos hechos de una variedad de residuos agroindustriales. De hecho varios residuos ricos en lignocelulosa han sido reportados en formulaciones de sustrato exitosas, tal como se resume en la **Tabla 2**.

**Tabla 2: Diferentes sustratos utilizados para la fermentación en estado sólido de *Ganoderma lucidum*.**

Sustrato	E.B.	Notas	Autor
Paja de arroz	15,3±3,8%	Ensayo a escala piloto. Ciclo de cultivo en dos oleadas; 55 a 65 días. Sustrato enriquecido con aceite de oliva 1%. Inóculo: 8%.	(Postemsky et al. 2014)
Paja de arroz + Salvado de trigo	27,5%	-	(Jandaik et al. 2013)
Aserrín de café : Café molido usado : Salvado de maíz	24,2±9,2%	Dos oleadas. Azúcar: 1%; Carbonato de calcio: 1%; Yeso:1%.	(Jaramillo 2010)

Sustrato	E.B.	Notas	Autor
: Cascarilla de algodón (35:35:10:17)			
Aserrín : Residuos de Té (80:20)	34,9%	Ciclo de cultivo de una o dos oleadas: 90 días. Humedad del basidiocarpio: 77%	(Peksen y Yakupoglu 2008)
Aserrín de álamo : Salvado de trigo (80:20)	20,8%	Ciclo de cultivo en tres oleadas: 72 días.	(Erkel 2009a)
Aserrín de roble : Salvado de maíz (80:20)	20,7%	Ciclo de cultivo en tres oleadas: 72 días.	(Erkel 2009a)
Aserrín de álamo : Salvado de trigo (80:20)	20,4%	Ciclo de cultivo en dos oleadas: 57 días. Sustrato enriquecido con melaza de maíz 1%.	(Erkel 2009b)
Aserrín de álamo : Salvado de trigo : Extracto de malta (85:10:5)	18,7%	-	(Azizi et al. 2012)
Aserrín de <i>Acacia</i> : Cáscara de semilla de algodón : Salvado de trigo : Polvo de maíz (35:35:20:6)	6,2%	Otros componentes: azúcar 1%, yeso 1%, carbonato de calcio 1%, fosfato dipostásico 1%.	(Changhai et al. 2013)
Residuo de caña de azúcar	12,9%	-	(Lakshmi 2013)
Médula de coco : residuos de pesca (1:1)	4,6%	-	(Lakshmi 2013)
Aserrín de <i>Alnus nepalensis</i>	15,7%	Ciclo de cultivo en una oleada: 60 días.	(Gurung et al. 2013)
Tallo de maíz (44%), vaina de frijol (22%), pulpa de café (11%).	8,2±1,4%	Con salvado de trigo y 69% humedad. Ciclo de cultivo en una oleada: 72 días.	(Bernabé-González et al. 2015)
Aserrín de Mango + Salvado de trigo (20%)	58,6%	Una oleada.	(Mehta et al. 2014)

E.B.: Eficiencia Biológica. [kg de carpóforo fresco / kg de sustrato seco] x 100%

La cáscara de semilla de girasol (CSG) constituye un producto residual abundante y barato de la industria del aceite de girasol. En 1999 se produjeron en el mundo más de 14 millones de toneladas de CSG (Chang y Miles 2004). La deposición de grandes cantidades de

este residuo agro-industrial presenta un problema para el ambiente porque se degrada muy lentamente en el suelo y usualmente se quema a campo abierto. Estudios previos han mostrado que la CSG puede ser usada como el principal componente en la formulación de un sustrato para cultivar hongos en troncos sintéticos, con buenos rendimientos. En la **Tabla 3** se resumen algunos de estos ensayos.

**Tabla 3: Especies de hongos comestibles cultivados en cáscara de semilla de girasol y rendimientos.**

Especie	EB	MP	Notas	Autor
<i>Pleurotus ostreatus</i>	60 – 112%	23 – 45%	Ciclo de cultivo en dos oleadas. Sustrato enriquecido con N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> y/o Mn(II).	(Curvetto et al. 2002b)
<i>Lentinula edodes</i>	102 – 112%	41 – 47%	Ciclo de cultivo en dos oleadas.	(Curvetto et al. 2002a)
<i>Ganoderma lucidum</i>	8,8%	3,5%	Ciclo de cultivo en una oleada: 25 días.	(Gonzalez Matute et al. 2002)
<i>Ganoderma lucidum</i>	10,0%	3,9%	Ciclo de cultivo en una oleada: 25 días. Con 5% salvado de trigo.	(Gonzalez Matute et al. 2002)
<i>Ganoderma lucidum</i>	9,9%	3,8%	Ciclo de cultivo en una oleada: 20 días. Con 5% extracto de malta	(Gonzalez Matute et al. 2002)
<i>Ganoderma lucidum</i>	23,2%	-	Dos oleadas en 79 días. Con 5% cebada y 100 ppm Cu (II).	(Gonzalez Matute et al. 2011)

E.B.: Eficiencia Biológica. [kg de carpóforo fresco / kg de sustrato seco] x 100%; Pr.H.: Producción de hongos. [kg de carpóforo seco / kg de sustrato seco] x 100%

### 2.1.8 Optimización del cultivo de *Ganoderma lucidum*

Usualmente, *Ganoderma lucidum* produce rendimientos relativamente bajos comparado con otros hongos comestibles cultivables (**Tabla 3**). Esto, junto con el alto valor de este hongo en el mercado internacional y la posibilidad de usar los basidiocarpos como una fuente

de compuestos bioactivos, hace que cualquier mejora en los rendimientos de cultivo sea una propuesta interesante con impacto económico.

La formación del cuerpo de fructificación está muy influenciada por las condiciones fisiológicas y el estado nutricional del micelio (Kües y Liu 2000). Es por ello, que un incremento en la producción de hongo en términos de rendimientos de cultivo puede ser alcanzado por el agregado de aditivos y suplementos para mejorar la calidad nutricional de un sustrato dado. Los aceites vegetales y fracciones particulares de sus ácidos grasos han mostrado poseer propiedades de estimulación de crecimiento en cultivos líquidos de *Grifola frondosa*, *Cordyceps militaris* y *G. lucidum* (Yang et al. 2000; Park et al. 2002; Hsieh et al. 2008). También, los aceites vegetales y ácidos grasos han demostrado estimular los rendimientos de cultivo de *Agaricus bisporus* y *Tricholoma matsutake* en sistemas de fermentación en estado sólido (Schisler 1967; Guerin-Laguette et al. 2003).

Por otro lado, estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio sobre la habilidad de *G. lucidum* para acumular Cu o Zn en los basidiomas mostraron un efecto estimulador en el rendimiento de cultivo cuando Cu (II) estaba incluido en la formulación del sustrato. También Tang y Zhu (2010) observaron un crecimiento en la biomasa cuando agregaron Cu (II) a un cultivo líquido sumergido. El cobre es un interesante elemento traza, que es esencial para el crecimiento normal en concentraciones en torno a  $10^{-7}$  y  $10^{-6}$  M. Mayores concentraciones pueden ser tóxicas (Chang y Miles 2004).

La información disponible sobre el efecto de los aceites vegetales y cobre sobre el crecimiento y el rendimiento de *G. lucidum* en sistemas de fermentación en estado sólido es limitada. Por lo tanto, en este capítulo se estudia el crecimiento del micelio de *G. lucidum* frente a distintas concentraciones de aceites vegetales en un medio semisólido en caja de Petri, y en un sistema de crecimiento lineal usando cáscara de girasol como sustrato. También se evalúan estos aceites, con y sin el agregado de Cu (II), sobre distintos parámetros de rendimiento en un sistema de cultivo a escala piloto, utilizando cáscara de girasol como sustrato base. Paralelamente, y dada su importancia en el éxito de un procedimiento de cultivo, se analiza la eficacia de un sistema de pasteurización en la reducción de la carga microbiana del sustrato.

### 2.1.9 Objetivos

1. Estudiar el efecto de aceites vegetales y Cu (II) sobre el crecimiento de *G. lucidum* y evaluar dichos aditivos en los rendimientos del hongo en un sustrato base de cáscara de girasol, a fin de proponer procedimientos de cultivo de mayor rentabilidad.
2. Analizar el efecto de un tratamiento de pasteurización a escala piloto descrito por Curvetto et al. (1997) en la calidad microbiológica de un sustrato a base de cáscara de girasol con y sin el agregado de aceite de oliva y cobre. Si bien este sistema ha sido propuesto y utilizado por el grupo desde hace varios años, no existían aun datos microbiológicos de dicho proceso.

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1 Cepa de *Ganoderma lucidum*

Para todos los ensayos de esta tesis se utilizó la cepa de *Ganoderma lucidum* E47 (Universidad de Guelph, Guelph, Ontario, Canadá). La cepa se cultivó en un medio MEA (ver Anexo II) a 25 °C en oscuridad.

### 2.2.2 Aceites vegetales evaluados como aditivos del sustrato

Los aceites vegetales evaluados fueron aceite de girasol (Molinos, Argentina), aceite de cártamo (disponible a granel en dietéticas) y aceite de oliva (Natura; Aceitera General Deheza, Argentina).

### 2.2.3 Biomasa y crecimiento radial en placa

Para estudiar el efecto de los aceites vegetales en la biomasa y crecimiento radial micelial de *G. lucidum* se utilizó un medio MEA adicionado con el aceite vegetal en estudio a distintas concentraciones (0%, 0,1%, 0,25%, 0,5% y 0,75% para aceite de girasol y de cártamo; 0%, 0,1%, 0,25%, 0,5%, 0,75%, 1,0% y 1,5% para aceite de oliva). Porciones de micelio de 6.5 mm de diámetro de un cultivo stock se inocularon en el centro de placas de Petri con medio MEA previamente esterilizado a 121 °C durante 15 minutos. Luego de incubar los cultivos a 25 °C en oscuridad por 5 o 7 días, se midió el diámetro, se estimó la biomasa, y se calculó la densidad superficial micelial.

La biomasa micelial se estimó de acuerdo a Sánchez y Viniegra-González (1996). Se fundió el medio agar sólido que contenía el micelio durante 1 minuto en un horno microondas (BGH, Mod. 16600, 1250 watts). Después el micelio fue removido suavemente con la

ayuda de unas pinzas y lavado en agua destilada. El exceso de líquido fue extraído con papel tisú y el micelio se secó en estufa a 60 °C hasta alcanzar un peso constante.

El diámetro de la colonia (n=7) se midió a los 5 y 7 días. La biomasa y la densidad superficial (n=5) se determinaron a los 7 días de crecimiento. En el caso del aceite de oliva, debido a un crecimiento más rápido de la colonia, el diámetro (n=15), la biomasa (n=11) y la densidad superficial (n=11) se determinaron a los 5 días de cultivo. En todos los casos los aceites fueron agregados al medio MEA durante la preparación del medio. Para lograr una distribución homogénea del aceite en el medio se emulsificó con 0,5% de gelatina y agitación vigorosa durante 1 minuto. Este procedimiento también se realizó en los tratamientos control sin aceite.

#### 2.2.4 Test de crecimiento lineal

Se evaluó el crecimiento miceliar en los sustratos enriquecidos con diferentes concentraciones de aceites vegetales utilizando el test de crecimiento lineal de Duncan (1997). Este tipo de ensayo está orientado a evaluar el comportamiento en el sustrato de cultivo, pero manteniendo las dimensiones de un ensayo de laboratorio. Cada sustrato (10 g), se empacó a una densidad aproximada de 0,5 g/mL en tubos de vidrio (20 cm de largo por 16 mm de ancho). Se realizaron 10 réplicas por tratamiento. Los tubos se cerraron por ambos extremos con tapones de algodón, y se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 60 minutos.

El sustrato en los tubos fue inoculado bajo condiciones asépticas por uno de los extremos con discos de agar de 16 mm que contenían el micelio del hongo en crecimiento activo, cultivado en medio MEA durante 7 días. Los tubos se incubaron en una estufa de cultivo a 25 °C, 80% de humedad relativa y oscuridad, durante 12 días. Al finalizar la incubación se midió la extensión del micelio a lo largo del tubo.

La formulación del sustrato consistió en 32,5% cáscara de girasol (provista por un productor local de aceite de girasol), 5% cebada perlada (*Hordeum vulgare*, comercialmente disponible), 2% SO<sub>4</sub>Ca, 0,5% Ca<sub>2</sub>CO y 60% agua. Los aceites vegetales se agregaron durante la preparación del sustrato. Para asegurar una distribución homogénea del aceite se emulsionó con 0,5% de gelatina y agitación vigorosa durante 1 minuto en agua, previo al agregado al medio. El mismo procedimiento se realizó en los tratamientos sin aceite. Se determinó el pH del medio antes y después de la esterilización. Para determinar el pH se suspendieron 5 gramos del sustrato en 100 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente durante 5 minutos.

Luego se dejó reposar la mezcla durante cinco minutos y se midió el pH de la porción líquida con un pHmetro (LT Lutron 207).

En un primer ensayo se estudiaron distintas concentraciones de los aceites vegetales (0%, 0,1%, 0,25%, 0,5% y 0,75%). De acuerdo a los resultados obtenidos en el primer ensayo, se realizó un segundo ensayo con distintas concentraciones de aceite de oliva (0%, 0,5%, 0,75%, 1,0% y 1,5%). Al finalizar la incubación se midió la extensión lineal del micelio.

#### 2.2.4.1 Determinación de proteínas en el sustrato

Cuando el micelio de *Ganoderma lucidum* crece las hifas se unen íntimamente con el sustrato por lo que no es posible realizar una determinación directa de la biomasa. En estos casos el contenido de proteína soluble puede considerarse como una medida indirecta (Córdova-López et al. 1996; Raimbault 1998). Con el fin de estimar el crecimiento de la biomasa miceliar, se analizó el incremento del contenido de proteína soluble en los sustratos colonizados con respecto al sustrato sin inocular.

Se retiró el sustrato colonizado de los tubos del primer ensayo de crecimiento lineal y las muestras se reunieron en un pool separado por tratamiento. Para la extracción de proteínas solubles se tomaron alícuotas de la muestra por triplicado (3,0 gramos, peso fresco), se dispersaron en 15 mL de un buffer fosfato 0,05 M (pH 7,0) y se homogeneizó en mortero durante 2 minutos. A continuación se centrifugó (10 min, 1.400 g, centrífuga ROLCO mod. 2036) y se determinó el contenido de proteínas solubles.

El contenido de proteínas solubles en los extractos se determinó mediante el test de Bradford utilizando sero albúmina bovina (BSA; cod. 05470; Sigma) como estándar (Bradford 1976). Alícuotas de 0,3 mL del extracto se mezclaron con 2 mL del reactivo de Bradford. Se dejó transcurrir la reacción durante 5 minutos y se leyó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (Genesys 20, Thermo Scientific). Los resultados se expresaron en contenido de proteína por gramo de sustrato colonizado seco ( $\mu\text{g eq. BSA/g}$ ). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### 2.2.5 Producción de inóculo

El inóculo (spawn) se preparó de acuerdo a Curvetto et al. (2004). Se llenaron botellas de un litro con 59,1% de grano de trigo (*Triticum durum*, disponible comercialmente), 0,1%  $\text{CaCO}_3$ , 0,8%  $\text{CaSO}_4$  y 40% agua por peso. Las botellas se esterilizaron en autoclave a 1 atm

por 90 minutos y se inocularon con micelio previamente cultivado en medio MEA. La incubación se realizó a 25 °C en la oscuridad por 10-15 días; las botellas se agitaron periódicamente para minimizar el aglutinamiento de los granos y permitir una mejor colonización.

### 2.2.6 Instalaciones para el cultivo de hongos del CERZOS (CONICET-UNS)

Los ensayos de cultivo de *Ganoderma lucidum* se realizaron a escala piloto en la nave de cultivo de hongos (**Figura 7**) perteneciente al Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles y Medicinales del CERZOS (CONICET-UNS). Esta nave de cultivo cuenta con una superficie de 200 m<sup>2</sup> destinada a la pasteurización del sustrato, corrida del micelio del hongo y fructificación. La sala de incubación cuenta con dos estufas eléctricas tipo radiador con termostato, y sistema extractor de aire. La sala de fructificación posee humidificación por bruma con sistema ventilador de alta presión y control de encendido automático (**Figura 8**), tubos fluorescentes de luz blanca con temporizador de encendido/apagado y sistema de distribución de aire con filtros HEPA (**Figura 9**) y un cañón calefactor a gas de 25.000 kcal con termostato (**Figura 10**).



**Figura 7:** Vista exterior de la nave de cultivo de hongos.

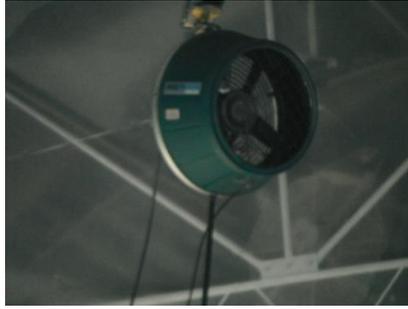


Figura 8: Sistema humidificador de alta presión por bruma.



Figura 9: Sistema de distribución de aire filtrado.



Figura 10: Sistema de suministro de aire caliente mediante cañón calefactor.

### 2.2.7 Preparación del sustrato, inoculación y sistema de bolsas

El sustrato para el cultivo de *Ganoderma lucidum* se formuló de la siguiente manera: 32,5% cáscara de girasol, 5% cebada perlada, 2%  $\text{SO}_4\text{Ca}$ , 0,5%  $\text{Ca}_2\text{CO}$  y 60% agua. A partir de los resultados obtenidos en los ensayos de crecimiento en placa y de crecimiento lineal, se evaluaron los efectos de la aditivación del sustrato base (control) con 1,5% de aceite de oliva con o sin el agregado de cobre (II) (60 ppm). Los aditivos a estudiar (aceites de oliva y cobre) se añadieron en el agua. La distribución uniforme del aceite se logró mediante la obtención de una emulsión con el agregado de gelatina al 0,5% y agitación vigorosa. En el caso de los controles se realizó el mismo procedimiento sin agregar el aceite.

La descontaminación de los sustratos se realizó en un sistema de descontaminación preparado *ad hoc* (Curvetto et al. 1997). El sistema está compuesto por una hormigonera acoplada a un mechero y una tapa metálica (**Figura 11**). El sustrato (37 kg) se calentó a 80 °C durante 3 horas con el tambor rotando alternativamente por 15 minutos y detenido por 15 minutos. Luego se dejó enfriar el sustrato por debajo de los 38 °C y se agregó el inóculo en una proporción del 8% (p/p) mezclando por rotación del tambor durante 15 minutos. La alta tasa de inoculación permite disminuir el riesgo de contaminación durante la fase de corrida de micelio, además de incrementar el rendimiento del cultivo (Postemsky et al. 2014).



Figura 11: Equipo para descontaminación de sustrato.

Se llenaron bolsas de polietileno (100 micras, 39,5 x 13,5 cm) con 0,8 – 0,9 kg de sustrato y se empacó hasta una densidad de 0,5 g/mL, bajo condiciones asépticas (**Figura 12**). Se cerró el extremo abierto de cada bolsa con un precinto de plástico y para permitir el intercambio de gases las bolsas se agujerearon uniformemente con un instrumento *ad-hoc* (ca. 4 agujeros por cm<sup>2</sup>). Cada tratamiento incluyó al menos 40 unidades experimentales (troncos sintéticos).

Todos los aditivos estudiados (aceites de oliva y cobre) fueron agregados antes de la descontaminación del sustrato.



**Figura 12: Preparación del "tronco sintético" en bolsas de polietileno.**

### **2.2.8 Evaluación microbiológica del sustrato antes y después del tratamiento térmico**

Para evaluar el comportamiento del sistema de pasteurización descrito previamente (ver sección 2.2.7) frente a las distintas composiciones de sustrato y su efecto sobre distintos grupos microbianos, se realizó el seguimiento durante un ciclo completo de pasteurización. Dicho seguimiento consistió en el control de temperaturas cada media hora y en la toma de muestras para el análisis microbiológico, cada hora (0, 1, 2 y 3 horas de tratamiento). En cada

muestreo se cuantificaron los siguientes grupos de microorganismos: heterótrofos mesófilos aerobios y anaerobios facultativos, coliformes totales (CT), *Escherichia coli*, bacterias esporógenas aerobias (AE), clostridios sulfito reductores (CSR), enterococos, hongos microfilamentosos y levaduras. El muestreo consistió en tomar 4 sub-muestras del sustrato con cuchara estéril (aprox. 2 g), de distintas regiones de la hormigonera (adelante, atrás, costado, profundidad). Las 4 sub-muestras se integraron en un recipiente de aluminio estéril para conformar la muestra total de la hormigonera y se mantuvieron refrigeradas hasta su procesamiento, dentro de las 12 horas de colectadas. El análisis se realizó para los sustratos con o sin aditivos descritos en la sección 2.2.7.

En el laboratorio cada muestra fue mezclada y se procedió al cuarteo hasta obtener una muestra de 3 g (peso húmedo) la cual se suspendió en un frasco con 27 ml de agua peptonada estéril (1% peptona de carne, 0,5 % NaCl, Britania, Argentina) y perlas de vidrio. Este diluyente es recomendado en lugar de solución fisiológica para recuperar células dañadas por procesos fisicoquímicos, tales como un tratamiento térmico. El frasco se colocó en agitador orbital a 500 rpm durante 5 minutos y se dejó reposar durante 30 segundos, y luego se tomó una alícuota y se realizaron diluciones decimales en solución fisiológica y se sembraron los medios correspondientes. La muestra restante fue destinada a la determinación de peso seco del sustrato. Para determinar el peso seco del sustrato se colocó la muestra en una estufa a 60 °C durante al menos 24 horas, hasta alcanzar un peso constante.

Todos los recuentos se expresaron como Unidades Formadoras de Colonias por gramo de sustrato seco (UFC/g seco).

#### 2.2.8.1 Recuento de bacterias heterótrofas aerobias y anaerobias facultativos mesófilas totales

Se utilizó la técnica de agar volcado. Un mililitro de la muestra o de sus diluciones decimales fue transferido a una placa Petri estéril, luego se volcaron 20 ml de Plata Count Agar (PCA, Merck, Alemania), fundido y enfriado a 45 °C. Las placas se incubaron a 30 °C durante 72 horas. Se contaron todas las colonias.

#### 2.2.8.2 Recuento de bacterias coliformes totales y *Escherichia coli*

Se procedió igual que en 2.2.8.1 pero en este caso se utilizó el Chromobrit® agar (Britania, Argentina). Las placas se incubaron 36 horas a 37 °C. Luego de la incubación, las colonias con centro rosado-rojizo, debido a la ruptura del sustrato magenta-Gal por la acción de la  $\beta$  galactosidasa, fueron reportadas como coliformes totales. Las colonias color azul o azul

oscuro a violeta en el centro, producido por la ruptura del X-glucurónido a partir de la  $\beta$ -D glucuronidasa, y verificadas como indol positivo, se contaron como *E. coli*.

#### 2.2.8.3 *Enterococos*

Este grupo se cuantificó por siembra en superficie en el medio KF streptococcus agar (Merck-Millipore) con la adicción de 2,3,5-trifenil tetrazolio cloruro (TTC). Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Se contaron las colonias rojas por la reducción del TTC, produciendo un formazán rojo y rodeadas de un halo amarillo por la producción de ácido.

#### 2.2.8.4 *Recuento de mohos y levaduras*

Este grupo se cuantificó por siembra en superficie en Agar Papa Dextrosa (PDA, Britania, Argentina), cuyo pH se ajustó a 3,5 con una solución estéril de ácido cítrico. Las placas se incubaron a 25 °C durante 5 días. Las colonias algodonosas fueron registradas como mohos y las cremosas como levaduras.

#### 2.2.8.5 *Recuento de bacterias aerobias esporógenas (AE) y clostridios sulfito reductores (CSR)*

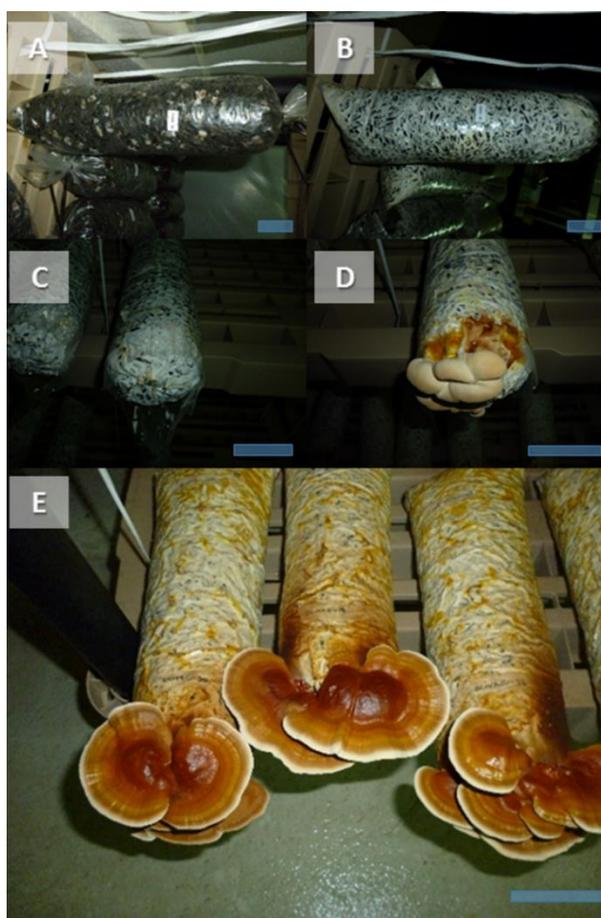
Una vez que se sembraron los medios para los grupos anteriores, la suspensión de sustrato se sometió a 80 °C durante 10 minutos, para seleccionar las endosporas. Luego se realizaron diluciones decimales y con las mismas se sembraron placas con medio PCA, para AE y Agar SPS (Agar Sulfito-Polimixina-Sulfadiacina) para CSR. Las placas de PCA se incubaron a 30 °C durante 72 horas y las placas SPS se incubaron en jarra de anaerobiosis con generadores de anaerobiosis (GENbag, Biomerieux) a 30 °C durante 5 días. Luego se contaron todas las colonias obtenidas en PCA y en el medio SPS, se contaron las colonias negras, debido a la reducción el sulfito a sulfuro que reacciona con el hierro para dar FeS.

### 2.2.9 **Corrida del micelio, cosecha y rendimiento del cultivo**

Una vez preparados los troncos sintéticos se colocaron horizontalmente en estantes y fueron incubados a 22 - 26 °C en oscuridad, hasta que el sustrato estuvo completamente colonizado y aparecieron los primeros signos de metabolitos secundarios (exudados amarillos, anaranjados y amarronados). En ese momento se movieron los troncos sintéticos a la sala de fructificación y se removieron los precintos plásticos para exponer el micelio maduro a las siguientes condiciones ambientales: 80-100% HR, 25-30 °C, fotoperiodo de 12 horas (irradiación con luz fluorescente blanca, 100-500 lux), y ventilación de aire adecuada. La **Figura 13** muestra distintas etapas de un cultivo de *G. lucidum*.

Para evitar la saturación del ambiente con gran cantidad de esporas, los hongos fueron cosechados cuando el borde amarillento más claro, en la zona activa de crecimiento, se redujo a menos de 1 cm, justo antes de completar la maduración del basidiocarpo y la máxima liberación de esporas

Los basidiocarpos se cosecharon con la ayuda de un escalpelo. Luego de la cosecha de la primera y segunda oleada, se movieron los troncos sintéticos a otra sección dentro de la sala de fructificación, para segregarlos de los troncos sintéticos que aún no habían sido cosechados.



(A) Tronco sintético recién preparado; (B) Colonización del sustrato completa, con aparición de los primeros exudados; (C) Apertura del extremo de la bolsa para inducir a la fructificación; (D) Formación de los primordios; (E) Basidiomas en fase de crecimiento. La barra de escala representa 10 cm.

**Figura 13: Evolución de un cultivo de *Ganoderma lucidum*.**

Para cada unidad experimental (tronco sintético) se obtuvo el tiempo de corrida del micelio en días ( $D_{CM}$ ) y el tiempo de cada oleada en días desde la inoculación ( $D_{1^oF}$ ,  $D_{2^oF}$ ,  $D_{3^oF}$ ).

El rendimiento de cultivo fue expresado como la eficiencia biológica [(kg. de hongo fresco/kg de sustrato seco) x 100%] de cada oleada (EB<sub>1°F</sub>, EB<sub>2°F</sub>, EB<sub>3°F</sub>) y eficiencia biológica acumulada. Como los basidiocarpos de *G. lucidum* se comercializan secos, también se calcularon los parámetros de rendimiento en base seca. La producción de hongo para cada oleada (MP<sub>1°F</sub>, MP<sub>2°F</sub>, MP<sub>3°F</sub>) y la producción total de hongo se calcularon como la eficiencia biológica pero considerando el peso seco de los hongos en vez del peso fresco. También se obtuvieron los porcentajes de unidades experimentales que mostraban basidiocarpos en cada oleada (%<sub>01°F</sub>, %<sub>02°F</sub>, %<sub>03°F</sub>).

### 2.2.10 Procesamiento post-cosecha

Inmediatamente luego de cosechar se tomó el peso fresco del basidiocarpo y se cortó en trozos longitudinales. El basidiocarpo troceado se colocó en bolsitas de tela de red *ad hoc* individualizadas, que permiten el flujo de aire caliente en su interior. Las bolsas con el basidioma en su interior fueron colocadas en una estufa a 60 °C durante 48 horas. Luego de tomar el peso seco, los basidiocarpos troceados y secos se reunieron por tratamiento en un pool y se almacenaron herméticamente para análisis posteriores.

### 2.2.11 Actividad de lacasas en el sustrato residual

#### 2.2.11.1 Extracción de lacasas

Las muestras se obtuvieron de las porciones medias de los troncos sintéticos (n = 16) donde la actividad de las lacasas es mayor (Postemsky et al. 2014). La determinación se realizó para los tratamientos del segundo ensayo de cultivo. Las muestras se mantuvieron a -18 °C hasta que se realizó la extracción de las lacasas. Se agregó agua destilada (30 mL) en tubos de vidrio de fondo plano de 50 mL que contenían 3,0 g de sustrato de hongo residual fresco. La mezcla se mortereó durante 0,5 minutos y se mantuvo a 4 °C durante 24 horas. Otra porción (10 g) de sustrato de hongo residual se utilizó para obtener el peso seco. Luego de 24 horas de extracción la muestra se comprimió (5 kg/cm<sup>2</sup>) para obtener una alícuota de extracto de enzima crudo, y su volumen fue medido. Los extractos fueron filtrados usando papel de filtro (J. prolab tipo JP -3003-4) y se almacenó a -18 °C hasta que la actividad de lacasas fue analizada.

#### 2.2.11.2 Determinación de la actividad de lacasas

La actividad de lacasas fue determinada por espectrofotometría usando siringaldazina (S7896; Sigma). Se determinó el incremento de la absorbancia a 525 nm ( $\epsilon_{525} = 65000$

$M^{-1}cm^{-1}$ ) como resultado de la oxidación del sustrato. La reacción enzimática se inició por adición de 25  $\mu$ l de una solución de siringaldazina en etanol (20 mmol/L) a 1 mL de extracto (concentración final 0,5 mmol/L). Un extracto sin siringaldazina fue utilizado como blanco. Las lecturas de absorbancia se obtuvieron a los 0,5, 1 y 2 minutos después de agregar siringaldazina. Muestras de alícuotas de extracto calentadas a 100 °C durante 10 minutos para desnaturalizar proteínas también fueron incluidas como controles. La unidad de actividad de lacasas se definió como la cantidad de enzima que oxida 1  $\mu$ mol de siringaldazina por minuto. La actividad de lacasas se expresó en base del peso seco del sustrato de hongo residual (unidades por kilogramo de peso seco).

### 2.2.12 Análisis estadístico

Los datos de los ensayos de crecimiento micelial y de producción de hongo fueron analizados por análisis de varianza de un factor (ANOVA). La separación de los valores medios se realizó mediante el test de Tukey. Los análisis se efectuaron utilizando el software Infostat (Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>)

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Efecto de los aceites vegetales sobre el crecimiento radial del micelio

Las **Tabla 4** y **Tabla 5** resumen los efectos del agregado de distintas concentraciones de aceite de girasol y aceite de cártamo sobre el micelio de *Ganoderma lucidum* en un cultivo en medio MEA en placa de Petri. Con aceite de girasol, la biomasa fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) para una concentración de aceite de 0,75%. Para un nivel de 0,10% de aceite de girasol la superficie de la colonia fue significativamente mayor tanto para los días 5 y 7. Dado que la biomasa no mostró cambios con respecto al control, la densidad superficial micelial fue menor, aunque no estadísticamente diferente del control. Para el rango de 0,1%-0,75% de aceite de girasol no se observaron cambios significativos en la densidad del micelio con respecto al control, pero si se observaron diferencias importantes y significativas entre la densidad superficial micelial observada a la mayor concentración (0,0070 g/cm<sup>2</sup>) y las menores concentraciones de aceite (0,0035 y 0,0040 g/cm<sup>2</sup> para 0,1% y 0,25%, respectivamente).

En el caso del aceite de cártamo no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el diámetro y la superficie de la colonia en el rango de concentraciones evaluado (0,1-0,75%). Sin embargo, se observó un incremento de la biomasa y la densidad miceliar superficial para las dos mayores concentraciones estudiadas.

**Tabla 4: Superficie de la colonia de *Ganoderma lucidum* luego de 5 y 7 días de cultivo en un medio MEA con diferentes concentraciones de aceite de girasol y aceite de cártamo.**

Conc. %	Superficie (cm <sup>2</sup> )			
	Aceite de Girasol		Aceite de Cártamo	
	Día 5	Día 7	Día 5	Día 7
<b>0,00%</b>	12,6 ± 2,8 <sup>B</sup>	32,9 ± 7,8 <sup>B</sup>	12,6 ± 2,8 <sup>AB</sup>	32,9 ± 7,8 <sup>AB</sup>
<b>0,10%</b>	26,1 ± 7,1 <sup>A</sup>	51,7 ± 11 <sup>A</sup>	13,9 ± 2,9 <sup>AB</sup>	36,7 ± 6,4 <sup>AB</sup>
<b>0,25%</b>	18,7 ± 3,5 <sup>B</sup>	45,4 ± 7,6 <sup>AB</sup>	8,5 ± 1,4 <sup>B</sup>	27,1 ± 3,6 <sup>B</sup>
<b>0,50%</b>	14,0 ± 3,8 <sup>B</sup>	38,7 ± 8,5 <sup>AB</sup>	12,2 ± 4,2 <sup>AB</sup>	38,1 ± 6,4 <sup>A</sup>
<b>0,75%</b>	19,3 ± 4,0 <sup>AB</sup>	45,6 ± 8,1 <sup>AB</sup>	14,4 ± 4,9 <sup>A</sup>	39,2 ± 5,0 <sup>A</sup>

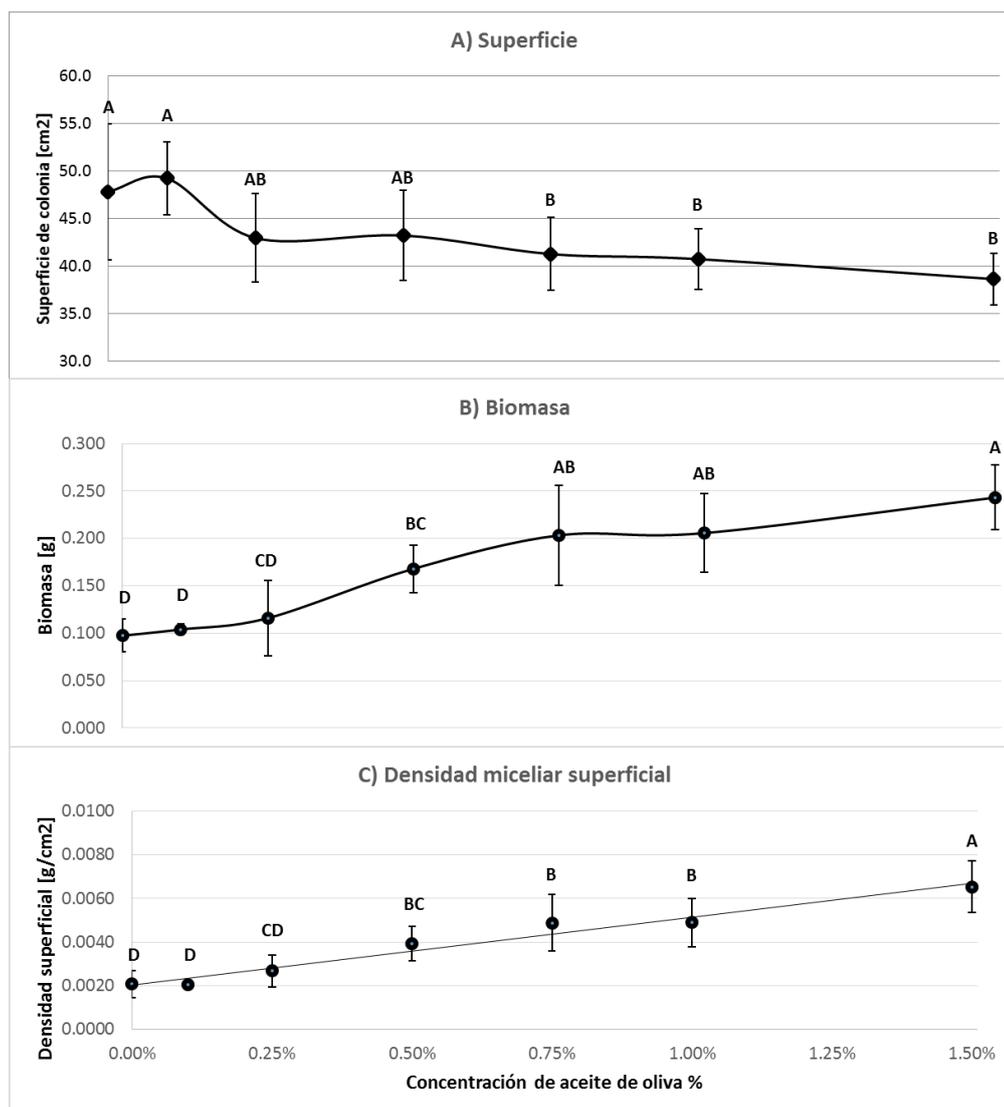
Medias con una letra común en una misma columna no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 5: Biomasa y densidad superficial de la colonia de *Ganoderma lucidum* luego de 7 días de cultivo en un medio MEA con diferentes concentraciones de aceite de girasol y aceite de cártamo.**

Conc. %	Aceite de Girasol		Aceite de Cártamo	
	Biomasa (g)	Densidad (g/cm <sup>2</sup> )	Biomasa (g)	Densidad (g/cm <sup>2</sup> )
<b>0,00%</b>	0,17 ± 0,03 <sup>B</sup>	0,0052 ± 0,0008 <sup>AB</sup>	0,17 ± 0,03 <sup>CD</sup>	0,0052 ± 0,0008 <sup>BC</sup>
<b>0,10%</b>	0,20 ± 0,02 <sup>B</sup>	0,0035 ± 0,0003 <sup>B</sup>	0,21 ± 0,03 <sup>BC</sup>	0,0051 ± 0,0007 <sup>BC</sup>
<b>0,25%</b>	0,17 ± 0,03 <sup>B</sup>	0,0040 ± 0,0011 <sup>B</sup>	0,12 ± 0,04 <sup>D</sup>	0,0045 ± 0,0010 <sup>C</sup>
<b>0,50%</b>	0,20 ± 0,02 <sup>B</sup>	0,0050 ± 0,0011 <sup>AB</sup>	0,29 ± 0,03 <sup>AB</sup>	0,0070 ± 0,0010 <sup>AB</sup>
<b>0,75%</b>	0,34 ± 0,06 <sup>A</sup>	0,0070 ± 0,0019 <sup>A</sup>	0,31 ± 0,07 <sup>A</sup>	0,0077 ± 0,0020 <sup>A</sup>

Medias con una letra común en una misma columna no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

La **Figura 14** muestra el efecto del agregado de distintas concentraciones de aceite de oliva sobre la superficie, la biomasa y la densidad superficial miceliar de *G. lucidum*. La adición de aceite de oliva en concentraciones de 0,75% a 1,5% redujo la superficie de la colonia ( $p < 0,05$ ) en el medio de agar hasta un 19% (en el nivel de concentración de 1,5%). Sin embargo, para esa concentración de aceite de oliva la biomasa obtenida fue un 150% mayor que en el control. La superficie miceliar superficial (g/cm<sup>2</sup>) se incrementó linealmente con la concentración de aceite de oliva hasta la mayor concentración ensayada ( $y = 0,3096x + 0,002$ ;  $r^2 = 0,9678$ ).



Medias con una letra común en un mismo gráfico no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

**Figura 14:** A) Diámetro, (B) superficie y (C) densidad micelial superficial de una colonia de *Ganoderma lucidum* en un cultivo en medio MEA de 5 días con distintas concentraciones de aceite de oliva.

## 2.3.2 Efecto de los aceites vegetales sobre el crecimiento lineal del micelio

### 2.3.2.1 pH del sustrato antes y después del tratamiento térmico

Se observó un incremento de la acidez después del tratamiento térmico en las muestras que contenían aceites vegetales, determinándose disminuciones de pH superiores a 0,3 unidades para los niveles más altos de aceite (**Figura 15**).

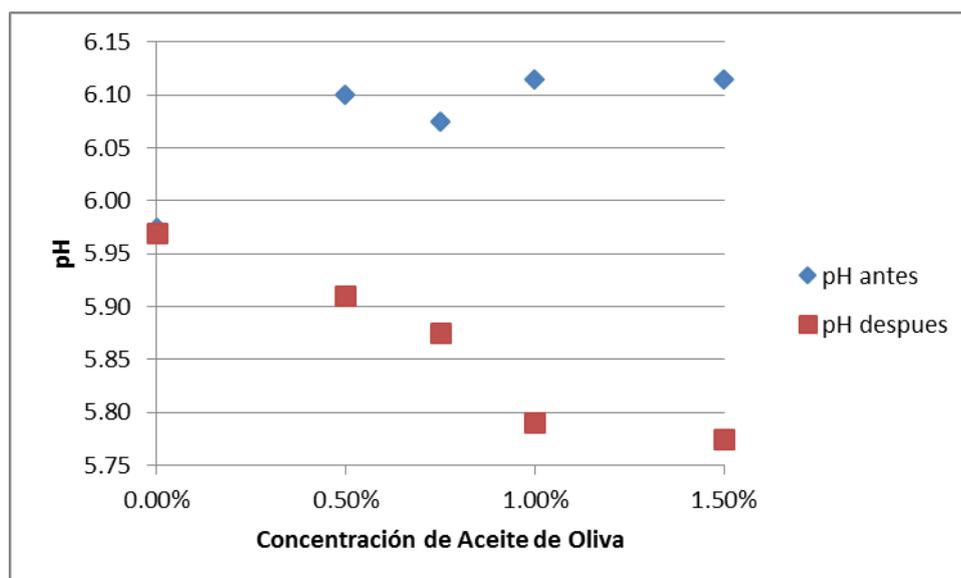


Figura 15: pH del sustrato a base de cáscara de girasol aditivado con diferentes concentraciones de aceite de oliva, antes y después de esterilizar por autoclave.

### 2.3.2.2 Evaluación del crecimiento lineal

Se evaluó el crecimiento lineal (cm) del micelio de *G. lucidum* en un sustrato a base de CSG con diferentes concentraciones de aceite de girasol, aceite de cártamo y aceite de oliva (Tabla 6). Con aceite de girasol no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) en el rango de concentraciones evaluado (0,1-0,75%). Sin embargo, para las mayores concentraciones evaluadas de aceite de cártamo y de oliva (0,75%) se midió una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de la extensión lineal del micelio con respecto al control.

Tabla 6: Crecimiento lineal del micelio de *Ganoderma lucidum* en 12 días en un medio base de cáscara de girasol aditivado con diferentes concentraciones de aceites vegetales.

Conc. %	Crecimiento lineal (cm.)		
	Aceite de Girasol	Aceite de Cártamo	Aceite de Oliva
0,00%	9,0 ± 0,2 <sup>A</sup>	9,0 ± 0,2 <sup>A</sup>	9,0 ± 0,2 <sup>A</sup>
0,10%	8,5 ± 0,2 <sup>A</sup>	8,6 ± 0,1 <sup>AB</sup>	9,0 ± 0,1 <sup>A</sup>
0,25%	8,9 ± 0,1 <sup>A</sup>	8,6 ± 0,1 <sup>AB</sup>	9,0 ± 0,2 <sup>A</sup>
0,50%	8,7 ± 0,1 <sup>A</sup>	8,5 ± 0,1 <sup>AB</sup>	8,5 ± 0,2 <sup>AB</sup>
0,75%	8,7 ± 0,2 <sup>A</sup>	8,4 ± 0,1 <sup>B</sup>	8,2 ± 0,2 <sup>B</sup>

Medias con una letra común en una misma columna no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Se realizó un segundo ensayo de crecimiento lineal (**Tabla 7**) para evaluar concentraciones crecientes de aceite de oliva (0,5-1,5%). También se observó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) del crecimiento lineal miceliar en el sustrato para la mayor concentración de aceite de oliva (1,5%).

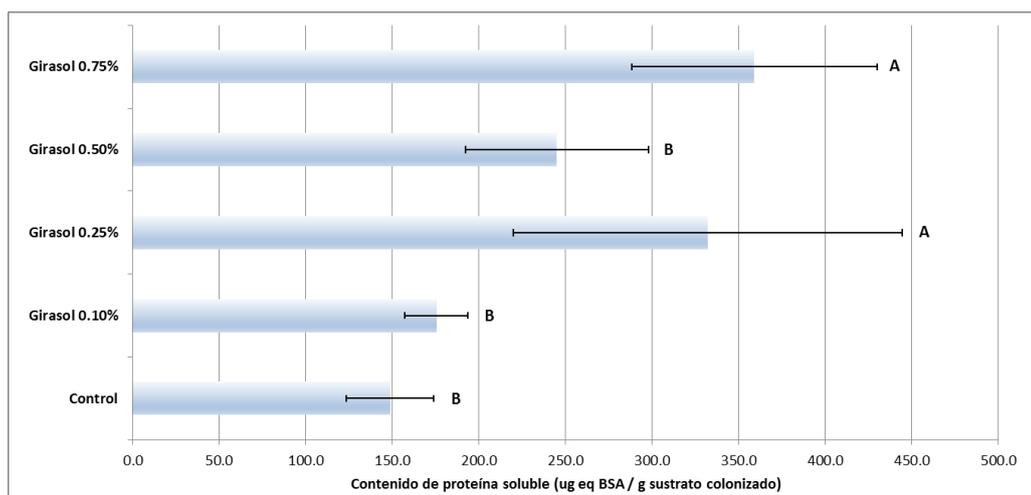
**Tabla 7: Crecimiento lineal del micelio de *Ganoderma lucidum* en 12 días en un medio de cáscara de girasol aditivado con diferentes concentración de aceite de oliva.**

Conc. %	Crecimiento lineal (cm.)	
	Aceite de Oliva	
0,00%	8,1	± 0,3 <sup>A</sup>
0,50%	8,1	± 0,5 <sup>A</sup>
0,75%	7,8	± 0,5 <sup>AB</sup>
1,00%	7,9	± 0,4 <sup>A</sup>
1,50%	7,4	± 0,4 <sup>B</sup>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

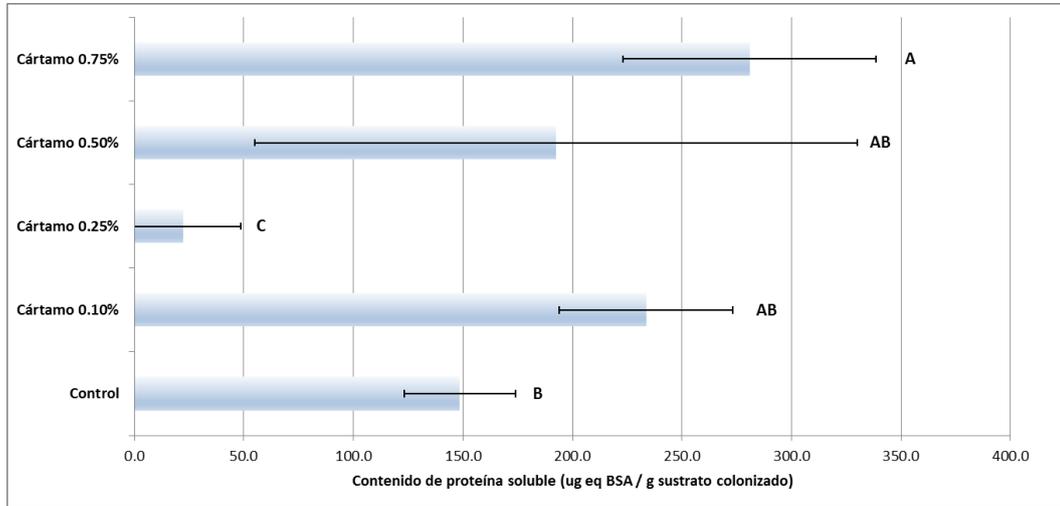
### 2.3.2.3 Cuantificación de proteínas solubles en el sustrato colonizado

Dado que el micelio del hongo se une íntimamente con el sustrato no es posible determinar directamente la biomasa. Sin embargo, puede estimarse indirectamente por medición de algunos componentes o de la actividad específica del micelio (Raimbault 1998). En este caso se midió el incremento de la proteína soluble en el sustrato colonizado, con respecto al sustrato sin inocular. Los resultados se presentan en las **Figuras 16, 17 y 18**.



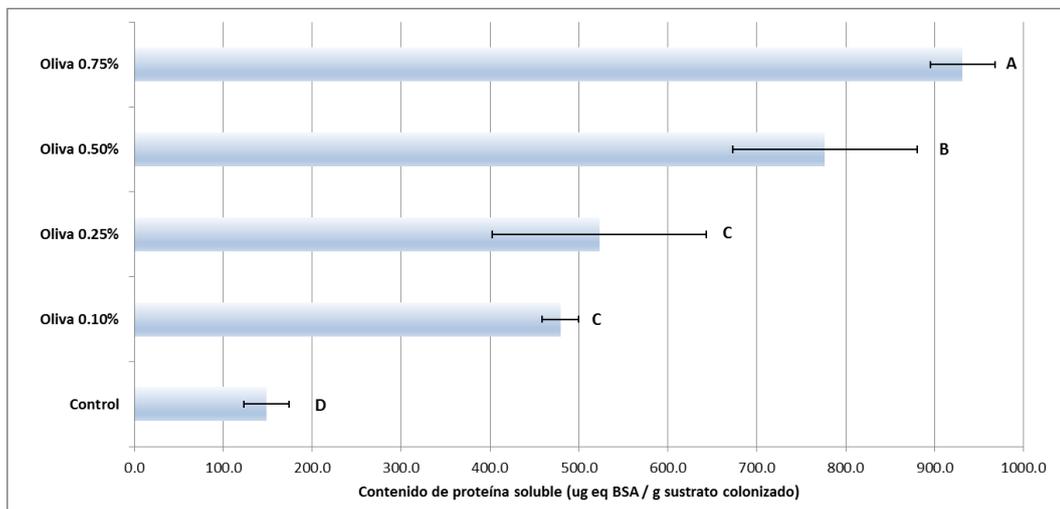
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

**Figura 16: Incremento del contenido de proteína soluble por gramo de sustrato colonizado con respecto al sustrato sin inocular. Efecto del aceite de girasol.**



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

**Figura 17:** Incremento del contenido de proteína soluble por gramo de sustrato colonizado con respecto al sustrato sin inocular. Efecto del aceite de cártamo.



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

**Figura 18:** Incremento del contenido de proteína soluble por gramo de sustrato colonizado con respecto al sustrato sin inocular. Efecto del aceite de oliva.

Para el aceite de girasol se observó un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) en los niveles de proteína soluble con respecto al control para las concentraciones 0,25% y 0,75%. También se observó un incremento estadísticamente significativo con 0,75% de aceite de cártamo. Todas las concentraciones ensayadas de aceite de oliva incrementaron los niveles de proteína soluble, y este incremento fue dosis – dependiente.

### 2.3.3 Efecto de aceite de oliva y cobre en un cultivo a escala piloto

#### 2.3.3.1 *Corrida del micelio*

La adición de 60 ppm de cobre (II) al sustrato incrementó significativamente la velocidad en la que el micelio colonizó el sustrato y comenzó a exudar metabolitos secundarios. El tiempo de incubación se redujo de 11 días a 7 días (**Tabla 8**). Por otro lado, la adición de 1,5% de aceite de oliva retrasó el tiempo de corrida del micelio a 14 días. Sin embargo, el aceite de oliva no tuvo efecto en el tiempo de corrida del spawn cuando Cu (II) también estaba presente en el sustrato.

**Tabla 8:** Días para la corrida del micelio con y sin aceite de oliva y/o cobre.

Formulación del sustrato	D <sub>CM</sub> (días)
Control	11±2 <sup>B</sup>
Cu (II) (60 ppm)	7±1 <sup>A</sup>
Aceite de oliva (1,5%)	14±1 <sup>C</sup>
Cu (II) (60 ppm) + Aceite de oliva (1,5%)	7±1 <sup>A</sup>

D<sub>CM</sub>: tiempo de corrida del micelio (días). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,01$ ).

#### 2.3.3.2 *Parámetros de rendimiento de hongo*

Las **Tablas 9, 10 y 11** muestran los parámetros de rendimiento para un cultivo de tres oleadas. La adición de 60 ppm de Cu (II) o 1,5% de aceite de oliva incrementaron los rendimientos de la primera oleada de *G. lucidum* en un 27% y 30%, respectivamente, comparados con el control. Cuando el Cu (II) y el aceite de oliva se agregaron juntos, la producción en base seca de la primera oleada se incrementó significativamente un 43% ( $p < 0,01$ ). También, la adición de Cu (II) redujo el tiempo hasta la cosecha de la primera oleada en 7 días, debido a una reducción tanto en los tiempos de corrida del micelio como de desarrollo de los basidiomas. El aceite de oliva (1,5%) no tuvo efecto en el tiempo necesario para el crecimiento,

desarrollo y maduración de los carpóforos; el incremento en el tiempo necesario para alcanzar la cosecha de la primera oleada se debió a una corrida del micelio más lenta. El incremento de los rendimientos del cultivo por la adición de Cu (II) y aceite de oliva, junto con la reducción del tiempo necesario para alcanzar la cosecha de la primera oleada, mejoró notablemente la productividad diaria de esta oleada en un 78% ( $p < 0,01$ ).

La **Figura 19** muestra una comparación de carpóforos producidos en troncos sintéticos representativos de cada tratamiento justo antes de la cosecha de la primera oleada. Los sustratos que contienen aceite de oliva o Cu (II) produjeron un mayor número de basidiocarpos comparados con el control.

**Tabla 9: Parámetros de rendimiento de la primera oleada con y sin aceite de oliva y/o cobre.**

Formulación del sustrato	% <sub>01°F</sub>	D <sub>1°F</sub> (días)	EB <sub>1°F</sub> (%)	MP <sub>1°F</sub> (%)	MP <sub>1°F</sub> diaria (%/día)
Control	100	35±3 <sup>B</sup>	12,6±1,6 <sup>A</sup>	3,0±0,4 <sup>A</sup>	0,087±0,011 <sup>A</sup>
Cu (II) (60 ppm)	100	28±1 <sup>A</sup>	16,0±2,3 <sup>B</sup>	3,8±0,4 <sup>B</sup>	0,137±0,015 <sup>C</sup>
Aceite de oliva (1,5%)	100	37±3 <sup>C</sup>	15,5±2,5 <sup>B</sup>	3,9±0,7 <sup>B</sup>	0,108±0,017 <sup>B</sup>
Cu (II) (60 ppm) + Aceite de oliva (1,5%)	100	28±1 <sup>A</sup>	18,1±1,9 <sup>C</sup>	4,3±0,5 <sup>C</sup>	0,155±0,018 <sup>D</sup>

%<sub>01°F</sub>: porcentaje de unidades experimentales que produjeron basidiocarpos en la primera oleada. D<sub>1°F</sub>: tiempo hasta la cosecha de la primera oleada (días). EB<sub>1°F</sub>: eficiencia biológica de la primera oleada (%). MP<sub>1°F</sub>: producción de hongos de la primera oleada (%). MP<sub>1°F</sub> diaria: producción de hongos de la primera oleada por día (%/día). Medias con una letra común en una misma columna no son significativamente diferentes ( $p > 0,01$ ).



**Figura 19:** Comparación de frutos de la primera oleada de cinco troncos sintéticos representativos, luego de 27 días desde la inoculación.

Los rendimientos de la segunda y tercera oleada fueron menores que los de la primera oleada (

**Tabla 10).** El aceite de oliva no tuvo efecto en los rendimientos de la segunda y tercera oleada. Sin embargo, la presencia de 60 ppm de Cu (II) disminuyó los rendimientos en esta etapa. En la segunda oleada, tanto la EB como el porcentaje de unidades experimentales que produjeron hongos fue marcadamente menor en los sustratos que contenían Cu (II). Más aún, el tiempo para alcanzar la segunda oleada fue mayor para el sustrato con cobre (29 días vs. 20 días en el control). Sin embargo, la presencia de 1,5% de aceite de oliva mejoró el número de troncos sintéticos con cobre que produjeron carpóforos en la segunda oleada (93,6% vs. 77%).

Solo la mitad o menos de las unidades experimentales con Cu (II) mostraron desarrollo de basidiomas para la tercera oleada, y la producción fue significativamente menor que los rendimientos obtenidos con los otros sustratos. Aproximadamente el 80% de los troncos sintéticos que no incluían Cu (II) mostraron desarrollo de carpóforos en la tercera oleada.

**Tabla 10: Parámetros de rendimiento de la segunda y tercera oleada con y sin aceite de oliva y/o cobre.**

Formulación del sustrato	Segunda oleada				Tercera oleada			
	% <sub>02<sup>o</sup>F</sub>	EB <sub>2<sup>o</sup>F</sub> (%)	MP <sub>2<sup>o</sup>F</sub> (%)	MP diaria(%/día)	% <sub>03<sup>o</sup>F</sub>	EB <sub>3<sup>o</sup>F</sub> (%)	MP <sub>3<sup>o</sup>F</sub> (%)	MP diaria (%/día)
Control	97,7	4,4±1,2 <sup>A</sup>	1,0±0,3 <sup>BC</sup>	0,053±0,022 <sup>A</sup>	81,4	2,3±0,9 <sup>A</sup>	0,7±0,2 <sup>B</sup>	0,05±0,015 <sup>A</sup>
Cu (II) (60 ppm)	77	3,1±1,3 <sup>B</sup>	0,7±0,3 <sup>A</sup>	0,027±0,016 <sup>B</sup>	45,8	1,6±0,7 <sup>A</sup>	0,5±0,1 <sup>A</sup>	0,035±0,012 <sup>A</sup>
Aceite de oliva (1,5%)	97,4	4,9±1,5 <sup>A</sup>	1,1±0,3 <sup>BC</sup>	0,058±0,017 <sup>A</sup>	79,4	2,1±1,1 <sup>A</sup>	0,7±0,2 <sup>B</sup>	0,053±0,025 <sup>A</sup>
Cu (II) (60 ppm) + Aceite de oliva (1,5%)	93,6	3,4±1,3 <sup>B</sup>	0,9±0,4 <sup>AB</sup>	0,031±0,018 <sup>B</sup>	51	2,2±1,3 <sup>A</sup>	0,6±0,2 <sup>AB</sup>	0,041±0,016 <sup>A</sup>

%<sub>02<sup>o</sup>F</sub>: porcentaje de unidades experimentales que produjeron basidiocarpos en la segunda oleada. EB<sub>2<sup>o</sup>F</sub>: eficiencia biológica de la segunda oleada (%). MP<sub>2<sup>o</sup>F</sub> producción de hongos de la segunda oleada (%). MP<sub>2<sup>o</sup>F</sub> diaria: producción de hongos de la segunda oleada por día (%/día). %<sub>03<sup>o</sup>F</sub>: porcentaje de unidades experimentales que produjeron basidiocarpos en la tercera oleada. EB<sub>3<sup>o</sup>F</sub>: eficiencia biológica de la tercera oleada (%). MP<sub>3<sup>o</sup>F</sub> producción de hongos de la tercera oleada (%). MP<sub>3<sup>o</sup>F</sub> diaria: producción de hongos de la tercera oleada por día (%/día). Medias con una letra común en una misma columna no son significativamente diferentes ( $p > 0,01$ ).

El rendimiento total del cultivo se presenta en la **Tabla 11** tanto como eficiencia biológica (EB) acumulada y producción de hongos total (MP). El aceite de oliva mejoró significativamente el rendimiento total en un 22%. Por otro lado, el Cu (II) no tuvo efecto en el rendimiento total después de tres oleadas.

**Tabla 11: Rendimiento acumulado de un cultivo a tres oleadas con y sin aceite de oliva y/o cobre.**

Formulación de sustrato	n	EB acumulada	MP acumulada
		(%)	(%)
Control	43	18,8±2,7 <sup>A</sup>	4,6±0,6 <sup>A</sup>
Cu (II) 60 ppm	48	19,2±3,5 <sup>A</sup>	4,6±0,7 <sup>A</sup>
Aceite de oliva 1.5%	39	22,0±4,0 <sup>B</sup>	5,6±0,9 <sup>B</sup>
Cu (II) 60 ppm + Aceite de oliva 1.5%	47	22,4±3,0 <sup>B</sup>	5,4±0,6 <sup>B</sup>

Medias con una letra común en una misma columna no son significativamente diferentes ( $p > 0,01$ ).

Considerando solo la primera oleada, el agregado de Cu (II) al sustrato indujo un incremento significativo en la productividad tanto por incrementar el rendimiento como por reducir el tiempo hasta la cosecha. Sin embargo, la primera oleada fue seguida de una importante disminución, de hasta 80%, en la productividad diaria. Las unidades experimentales que no produjeron carpóforos en la segunda o tercera oleada no fueron consideradas para calcular este valor. En el caso del sustrato control y de aquellos que contenían 1,5% de aceite de oliva, la productividad disminuyó gradualmente a largo de las oleadas, y el 30-35% del rendimiento total de hongo se dio en la segunda y tercera oleada.

### 2.3.3.3 Contenido de agua en el sustrato y en el carpóforo

Al finalizar el ciclo de cultivo de tres oleadas se observó una marcada disminución en el contenido de humedad (**Tabla 12**) en todos los troncos sintéticos (contenido inicial de agua, 60%). Sin embargo, la reducción fue incluso más abrupta en aquellos sustratos que contenían 60 ppm de Cu (II)

**Tabla 12: Contenido de agua del sustrato al final de un ciclo de cultivo de tres oleadas (82 días) con y sin aceite de oliva y/o cobre.**

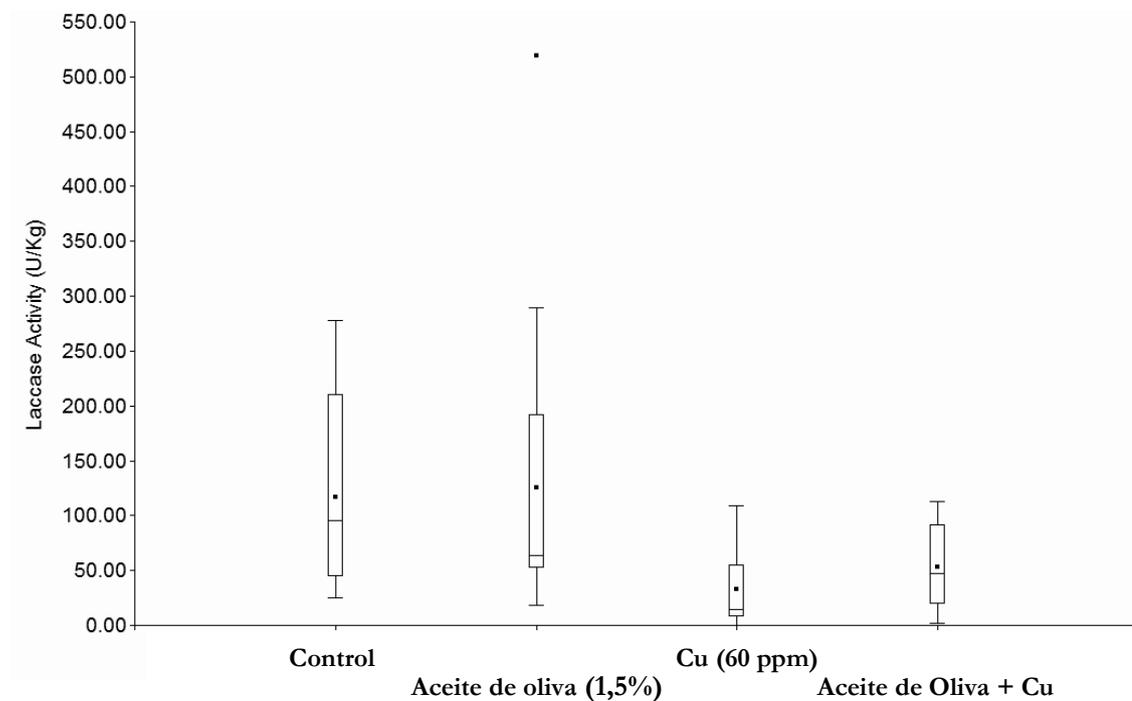
Formulación de sustrato	Humedad del sustrato (%)
Control	42,6±2,3 <sup>A</sup>
Cu (II) 60 ppm	32,6±4,2 <sup>B</sup>
Aceite de oliva 1,5%	39,3±5,3 <sup>A</sup>
Cu (II) 60 ppm + Aceite de oliva 1,5%	32,2±4,9 <sup>B</sup>

Medias con una letra común en una misma columna no son significativamente diferentes ( $p > 0,01$ ).

El contenido de agua en el carpóforo en la segunda y tercera oleada fue de 74-78%, sin diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ ). El contenido de agua de los carpóforos obtenidos en la tercera oleada fue de 61-67%. Comparado con las oleadas previas, la reducción en el contenido de agua fue significativa ( $p < 0,05$ ), pero, de nuevo, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ ).

### 2.3.3.4 Actividad de lacasas

La **Figura 20** muestra la actividad de lacasas de extractos acuosos obtenidos de sustratos residuales luego de tres oleadas de cosecha. En estas condiciones, la actividad de lacasas disminuyó notablemente en los sustratos que contenían Cu.



**Figura 20:** Actividad de lacasas en el sustrato residual tras un ciclo de cultivo de tres oleadas con y sin aceite de oliva y/o cobre.

### 2.3.4 Evaluación microbiológica del proceso de pasteurización a escala piloto del sustrato

La **Figura 21** muestra la curva de temperatura obtenida en las hormigoneras durante la pasteurización del sustrato a base de CSG. En cuanto al efecto del tratamiento térmico sobre los microorganismos estudiados, no se detectaron diferencias significativas entre las dos composiciones de sustrato ensayadas (**Tabla 26**). La **Figura 22** muestra los recuentos de los microorganismos indicadores a largo del proceso de pasteurización.

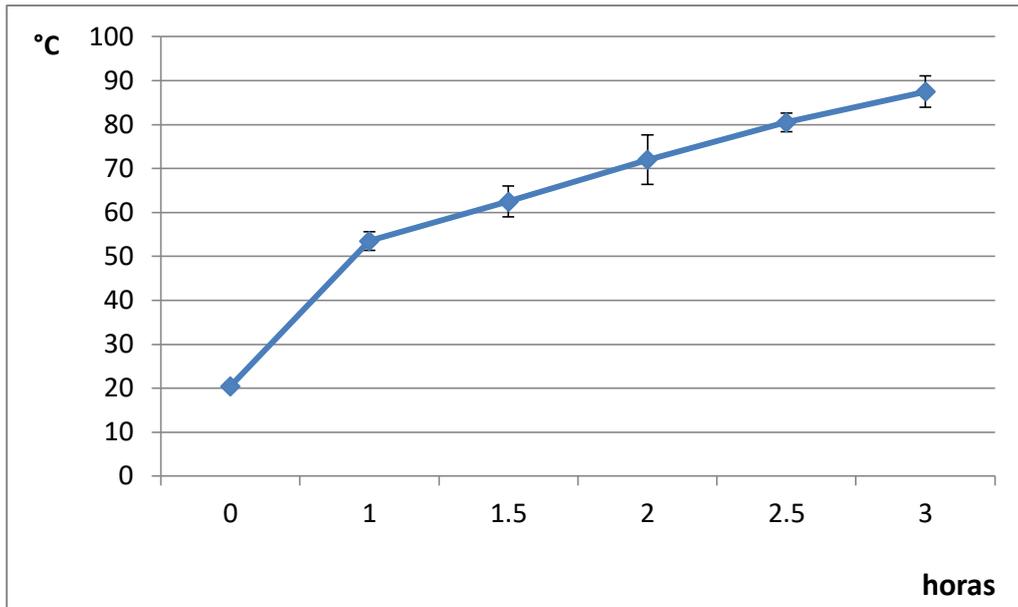


Figura 21: Temperatura del sustrato durante el proceso de pasteurización

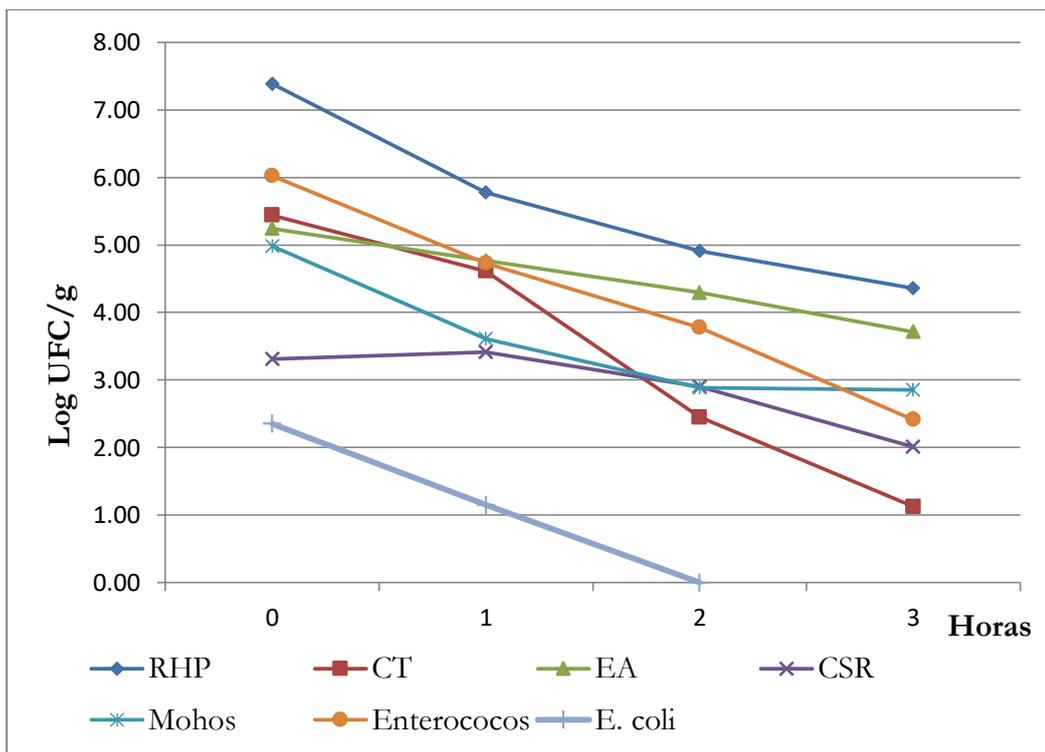


Figura 22: Efecto del tratamiento de pasteurización en hormigonera sobre indicadores microbianos. Los resultados son el promedio de ambos sustratos, expresados como  $\text{Log}_{10}$  UFC/gramo de sustrato seco.

## 2.4 DISCUSIÓN

### 2.4.1 Efecto de aceites vegetales sobre el crecimiento del micelio

Los residuos agroindustriales lignocelulósicos pueden ser eficientemente utilizados por basidiomicetes, quienes además de usarlos para su crecimiento producirán una cantidad de metabolitos que pueden tener un alto valor para la salud y el consumo humano (Kües y Liu 2000). Últimamente se ha puesto gran esfuerzo en cultivar *G. lucidum* en medios sólidos para la producción de carpóforos en residuos lignocelulósicos. Sin embargo, dado que el cultivo en sustratos sólidos requiere más tiempo que otros métodos para cultivar *G. lucidum*, varios estudios se han enfocado en optimizar el cultivo sumergido. La aditivación de los sustratos es uno de los mayores aspectos del cultivo de *G. lucidum* con el propósito de incrementar el rendimiento biológico mientras se reduce el tiempo requerido para la producción de hongos en medio sólido.

Los ensayos de crecimiento miceliar en medio de agar y los ensayos de crecimiento lineal (test de Duncan), permiten evaluar la formulación de distintos sustratos, con o sin suplementos y aditivos, rápidamente y a bajo costo. Estos estudios son útiles para evaluar el efecto de distintas formulaciones sobre la fase de crecimiento vegetativo del hongo, pero por lo general no aportan información sobre el potencial rendimiento del cultivo. En este caso, previo al ensayo de cultivo a escala piloto, se evaluó el efecto del agregado de distintas concentraciones de aceites vegetales (aceites de girasol, oliva y cártamo) en un medio MEA en placa de Petri y en un medio a base de CSG en un ensayo de crecimiento lineal.

El aceite de girasol y el aceite de cártamo estimularon la producción de biomasa y aumentaron la densidad miceliar superficial en un medio MEA en placa de Petri a las mayores concentraciones evaluadas. Los resultados de los ensayos lineales en un sustrato a base de CSG mostraron correlación con los resultados de los ensayos de crecimiento radial en medio MEA. A las mayores concentraciones evaluadas (0,75%), el aceite de girasol y el aceite de cártamo incrementaron el contenido de proteínas solubles, un indicador indirecto de la biomasa, en el sustrato colonizado. Por otro lado, el aceite de girasol no afectó la extensión lineal del micelio, mientras que aceite de cártamo la redujo a las mayores concentraciones.

Para el caso del aceite de oliva, en el rango de concentraciones estudiadas (0,1%-1,5%) se observó una estimulación dosis-dependiente en el crecimiento del micelio. Esta estimulación se evidenció en forma de un incremento lineal con la concentración de la biomasa y la densidad miceliar superficial en el medio MEA y un incremento de la proteína soluble en el

sustrato a base de CSG colonizado. También se observó una reducción en la extensión radial y lineal del micelio para las mayores concentraciones del aceite.

Los aceites vegetales evaluados en estas experiencias contienen diferentes proporciones de ácidos grasos insaturados. Mientras que el aceite de oliva es rico en ácido oleico (66-78%), los aceites de girasol y de cártamo tienen mayor contenido de ácido linoleico (59-62% y 76-79%, respectivamente) (Kostik et al. 2012; Orsavova et al. 2015). Esta diferente composición de ácidos grasos podría explicar las diferencias observadas entre el aceite de oliva y el aceite de girasol y de cártamo. Yang et al. (2000) demostraron en cultivos sumergidos de *G. lucidum*, que el ácido oleico es un estimulante del crecimiento miceliar, mientras que el ácido linoleico lo inhibe. El efecto estimulante de la biomasa del ácido oleico ha sido demostrado en cultivos sumergidos de otros hongos, como *Acremonium persicinum* (Stasinopoulos y Seviour 1990), donde también se observó un potente efecto inhibitor del ácido linoleico a altas concentraciones, pero estimulante a bajas concentraciones.

Se determinó el pH antes y después de la esterilización del sustrato por tratamiento térmico en autoclave. El pH de los sustratos que contenían aceite de oliva tendió a disminuir con la concentración de aceite. Esta disminución del pH se debería a la liberación de ácidos grasos desde triglicéridos.

#### **2.4.2 Cultivo de *Ganoderma lucidum* en cáscara de semilla de girasol a escala piloto. Efecto de aceite de oliva y cobre (II).**

Los valores de producción de hongo en base seca fluctuaron entre 4,6% y 5,6%, y fueron algo mayores a los observados por Gonzalez Matute et al. (2002) usando el mismo sustrato. Considerando la eficiencia biológica, esta fluctuó entre el 18,8% y el 22,4%, valores acordes a lo reportado para otros sustratos (**Tabla 2**). La mayor parte de la producción se obtuvo en la primera oleada. En general, la reducción del rendimiento de la segunda a tercera oleada fue menos marcada que de la primera a la segunda. Sin embargo, el contenido de humedad de los hongos de la tercera oleada fue menor que los de la primera y segunda oleadas.

Los resultados obtenidos en los ensayos de crecimiento radial y lineal del micelio de *Ganoderma lucidum* mostraron no solo que el micelio puede crecer sin inconvenientes en presencia de aceites vegetales, sino que a mayores concentraciones los aceites parecen estimular el crecimiento de la biomasa miceliar. De los aceites vegetales evaluados, el aceite de oliva

fue el que mostró los mejores resultados, es por ello que se decidió investigar su efecto en los parámetros de rendimiento de un cultivo a escala piloto.

La estimulación con el agregado de aceite de oliva se evidenció principalmente en la primera oleada y se debió a un mayor número de basidiocarpos formados por unidad experimental (**Figura 19**). Este resultado es similar al reportado por Schisler (1967) con *Agaricus bisporus* y aceite de oliva y otros aceites vegetales. El incremento de los rendimientos de cultivo podría ser el resultado de un mayor crecimiento de la biomasa miceliar causada por el aceite. Los ácidos grasos, en particular el ácido oleico, han sido vinculados al efecto de estimulación del crecimiento del aceite de oliva (Wardle y Schisler 1969; Yang et al. 2000; Park et al. 2002). El catabolismo de los ácidos grasos es complejo; pueden ser utilizados como fuente de energía y además los lípidos son esenciales en las paredes celulares (Chang y Miles 2004). La estimulación podría ser consecuencia de un incremento de la permeabilidad de la hifa (Stasinopoulos y Seviour 1990; Yang et al. 2000; Guerin-Laguette et al. 2003). Este fenómeno podría también explicar la ligera reducción en la superficie de la colonia, de la extensión lineal del micelio y los mayores tiempos de corrida del micelio producidos por aceite de oliva; los nutrientes estarían más fácilmente disponibles sin que la hifa tenga la necesidad de expandirse para explorar nuevo sustrato fresco. Por otro lado, los ésteres de sucrosa de los ácidos grasos han sido mencionados como inductores de la formación de carpóforos (Kües y Liu 2000).

La adición de 60 ppm de Cu (II) a la formulación del sustrato redujo significativamente el tiempo necesario tanto para la corrida del micelio como para el desarrollo y maduración de basidiocarpos en la primera oleada, y también incrementó el rendimiento en la primera oleada. Los tiempos más cortos hasta la cosecha de la primera oleada y el mayor rendimiento del cultivo contribuyeron al incremento observado de la productividad diaria.

Dado que el carbono utilizado por *G. lucidum* es de un carácter lignocelulósico, durante el crecimiento vegetativo el micelio produce un amplio rango de enzimas para degradar estos sustratos. Las lacasas son una familia de enzimas involucradas en esta función. Los metales pesados son importantes moduladores de la actividad de estas enzimas. Se ha reportado que el Cu (II) estimula tanto la producción como la actividad de lacasas fúngicas (Baldrian y Gabriel 2002; Cordi et al. 2007). Podría esperarse que la excreción y actividad mejorada de las enzimas líticas mejoraran la disponibilidad de nutrientes y facilitaran la colonización del sustrato. Postemsky et al. (2014) reportaron que el Cu estimuló la actividad de lacasas en la

primera oleada de un cultivo de *G. lucidum* en paja de arroz. Sin embargo, también podría inducir el agotamiento de nutrientes y del micelio. Esto se vuelve evidente por una reducción abrupta en los rendimientos de las cosechas de la segunda y la tercera oleadas, menor contenido de humedad en el sustrato, y menor actividad de lacasas luego de la tercera oleada. De hecho, la actividad de lacasas en el control fue similar a la observada tras una oleada en un sustrato de paja de arroz (Postemsky et al. 2014).

### 2.4.3 Evaluación microbiológica del proceso de pasteurización a escala piloto del sustrato

Cuando se realiza un cultivo de hongos en un sustrato lignocelulósico, por lo general es necesario realizar un tratamiento de pasteurización para disminuir la carga de microorganismos competidores en dicho sustrato. En este caso se evaluó la calidad microbiológica de un sustrato a base de CSG con y sin agregado de aceites vegetales, tratado por el sistema descrito por Curvetto et al. (1997).

Los resultados indican que el tratamiento fue muy efectivo al reducir algunos grupos de microorganismos relacionados a la calidad sanitaria del producto tales como coliformes totales y *E. coli*. Este grupo presentó la mayor pendiente de eliminación de viables y se alcanzaron niveles muy bajos o estuvieron por debajo del nivel de detección (*E. coli*) al final del proceso; seguidos por los enterococos, que habitualmente tiene una mayor resistencia a las altas temperaturas que los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Como era de esperar las bacterias esporógenas (AE y CSR) presentaron la menor pendiente de reducción de viables. Los mohos, principales posibles competidores del hongo a cultivar, mostraron un descenso moderado, logrando una reducción de 2 logaritmos con respecto a su número inicial. La mayor pendiente de pérdida de hongos viables luego de la primer hora de tratamiento pudo deberse a la muerte de las formas vegetativas, quedando la esporas y formas de resistencia con menor sensibilidad, que no pudieron ser eliminadas. Sin embargo, en nuestras experiencias, se han registrado pocos casos de contaminación, probablemente debido a la alta tasa de inoculación de *G. lucidum* utilizada.

## 2.5 CONCLUSIONES

De los aceites vegetales estudiados, el aceite de oliva fue el que mostró una mayor estimulación del crecimiento micelial. Los ensayos de crecimiento radial y lineal, sugieren una corrida de micelio más lenta, pero más robusta, con un aumento de la densidad micelial. Por

otro lado, la adición de 60 ppm de Cu (II) aceleró la corrida del micelio y aumentó los rendimientos de basidiocarpos en una primera oleada.

Desde un punto de vista económico, el uso de una formulación de sustrato de CSG que contenga tanto aceite de oliva como Cu (II), sería costo-eficiente para la producción de basidiocarpos de *G. lucidum*. La adición de 60 ppm de Cu (II) junto con 1,5% de aceite de oliva incrementó la productividad diaria hasta la primera oleada en un 78%, aumentando notablemente el rendimiento y reduciendo el tiempo hasta la cosecha. Debería notarse que el 80% de la producción total con esta formulación de sustrato se obtuvo en la primera oleada en solo 28 días.

Finalmente, el análisis microbiológico del proceso de pasteurización muestra que el sistema es efectivo para la eliminación de grupos de microorganismos relacionados con la calidad sanitaria, aunque los mohos solo mostraron una disminución moderada. Estos resultados indican que el sistema podría perfeccionarse para lograr una mayor eliminación de mohos viables a los fines de no poner en riesgo la producción.

## CAPÍTULO 3:

# INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO SOBRE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL BASIDIOCARPO DE *Ganoderma lucidum*

### 3.1 INTRODUCCIÓN

#### 3.1.1 Efecto de las condiciones de cultivo sobre la calidad química de *G. lucidum*

La seguridad y eficacia de cualquier producto mico o fitofarmacéutico es determinada por los compuestos que contiene. Para tener resultados terapéuticos reproducibles es necesario mantener constante el patrón y la concentración de los constituyentes del micoterápico. Uno de los propósitos del control de calidad es asegurar que cada unidad de dosaje contenga la misma cantidad de principio activo de un lote a otro (Busse 2000). Sin embargo, los fitomedicamentos son mezclas complejas que provienen de fuentes biológicas, caracterizadas por su variabilidad, y por lo tanto se deben dedicar grandes esfuerzos para garantizar una calidad adecuada y constante. Por ello deben estandarizarse no solo los métodos de manufactura del producto sino también los métodos de obtención de la materia prima.

El control de calidad es uno de los principales problemas que presenta la industria de los productos basados en *Ganoderma lucidum*. En un estudio realizado por Yang et al. (2012) se evaluó la calidad de 17 productos (16 cápsulas y un comprimido) derivados de Lingzhi (*Ganoderma spp.*). Los autores encontraron que la homogeneidad de la calidad de los productos era pobre, con considerables variaciones en la composición de triterpenoides y polisacáridos. Esto podría deberse a diferentes técnicas de preparación de los productos o a variaciones en las materias primas. De hecho, por lo general, los elaboradores de estos productos dependen de varias fuentes que les proveen carpóforos, las cuales suelen mostrar una variación considerable con respecto a la calidad (Chang y Miles 2004). Los carpóforos de los hongos son estructuras complejas, tanto morfológica como fisiológicamente, con variaciones

indudables en la composición química entre lotes. La composición química, cuali y cuantitativa, de un carpóforo va a depender de la cepa, de las condiciones de cultivo, de la composición básica del sustrato y del agregado de ingredientes suplementarios (Smith et al. 2002; Wasser 2005; Suárez Arango y Nieto 2013; Bishop et al. 2015). El nivel de compuestos activos en el hongo es difícil de controlar y la caracterización del perfil químico de *G. lucidum* es importante para facilitar el control de calidad de los productos (Bishop et al. 2015). En la Medicina Tradicional China (MTC) la calidad del hongo Lingzhi se determina por color, tamaño y forma. Los hongos grandes, de color rojo vivo y forma arriñonada son generalmente considerados de mejor calidad (Upton 2006). Sin embargo, no existe información disponible que correlacione estos caracteres con la composición química o la actividad farmacológica.

El efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de principios activos en *G. lucidum* ha sido estudiado principalmente en cultivos sumergidos. En general, en este tipo de cultivos, las condiciones de cultivo son críticas para el crecimiento de la biomasa y la producción de exopolisacáridos y ácidos ganodéricos (Yang y Liau 1998; Fang y Zhong 2002; Tang y Zhong 2003). Chang et al. (2006) observaron que el aceite de oliva estimula la producción de exopolisacáridos en medios líquidos. Por otro lado, en otro estudio, el aceite de oliva redujo el contenido de ácidos ganodéricos, mientras que el agregado de  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ , celulosa y malto-oligosacárido, estimularon su producción (Zhang et al. 2014). Zhou et al. (2013) demostraron que el agregado de coixenolide a un cultivo sumergido incrementa la producción de polisacáridos y exopolisacáridos. Se ha demostrado incluso que las condiciones de cultivo influyen sobre la configuración estructural de los exopolisacáridos producidos (Fraga et al. 2014).

En cuanto a la calidad química del basidiocarpo de *G. lucidum*, existen varios estudios que muestran la influencia de las condiciones de cultivo sobre la concentración de principios activos. Por ejemplo, se ha reportado que cuando el hongo crece en madera de cerezo produce mayor cantidad de triterpenoides pero crece más lentamente y produce menores rendimientos que cuando crece en roble (Upton 2006). Otros estudios han mostrado que el contenido de ácido ganodérico B, depende del estadio y lugar del cultivo (Ding et al. 1999). Lu et al. (2012) analizaron el contenido de triterpenoides, ácidos ganodéricos A y B, y polisacáridos, de basidiocarpos cultivados en diferentes zonas de China sobre diferentes sustratos (semilla de algodón y distintos tipos de maderas). Los autores encontraron diferencias significativas en el contenido de estos compuestos de acuerdo al lugar de origen, demostrando la

influencia de las condiciones de cultivo sobre la composición de los principales grupos medicinales del hongo. Más aún, Čilerdžić et al. (2014) determinaron que la actividad antibacteriana y antioxidante del hongo varía con las condiciones de cultivo y esta se correlaciona con el contenido de compuestos fenólicos.

En el capítulo anterior se observó que la adición de aceite de oliva y cobre a un sustrato a base de cáscara de semilla de girasol (CSG) tiene un efecto positivo sobre el rendimiento de un cultivo de *G. lucidum*. Sin embargo, es necesario conocer el efecto de estos aditivos sobre el contenido de compuestos bioactivos presentes en el basidiocarpo. También es importante conocer el efecto de las condiciones de cosecha (momento de la cosecha; primera o segunda oleada).

Por otro lado existen numerosos trabajos en los cuales se evalúan diferentes sustratos para el cultivo de *G. lucidum* (ver **Tabla 2**). Entre ellos la paja de arroz es uno de los agroresiduos más abundantes del mundo y ha demostrado buenos rendimientos en el cultivo de *G. lucidum* (Postemsky et al. 2014). Es concebible pensar que un elaborador de productos de *G. lucidum* obtenga su materia prima de diferentes fuentes. Es por ello que resulta interesante evaluar en un sustrato distinto a la CSG, en este caso paja de arroz, el contenido y perfil de compuestos bioactivos, así como también la respuesta frente al agregado de aditivos al sustrato.

### 3.1.2 Análisis mediante espectroscopia infrarroja (IR)

La Medicina Tradicional China (MTC) considera que la acción de una fitomedicina no se debe a un compuesto particular sino a la acción sinérgica de múltiples sustancias en una composición química compleja. Por lo tanto el análisis cuantitativo simple de uno o más marcadores químicos en una materia prima no puede representar bien su calidad (Song et al. 2013). Es por ello que se han desarrollado nuevas metodologías, como la toma de las “huellas dactilares” por cromatografía (generalmente HPLC), que permite evaluar la calidad de un producto o materia prima por la comparación de cromatogramas. Sin embargo, estos procedimientos suelen ser costosos, requieren un tiempo considerable, y utilizan un gran cantidad de solventes orgánicos de alta pureza.

Una alternativa para el análisis de fitomedicinas o materias primas complejas es la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), pues presenta la ventaja de ser un método no destructivo, rápido y efectivo, y que requiere una pequeña cantidad de muestra

(Choong et al. 2014). La región del espectro infrarrojo medio ( $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ) puede ser utilizada para estudiar las vibraciones fundamentales de las moléculas y la estructura rotacional vibracional asociada. Para que un modo vibracional de una muestra sea “activo” en el IR, tiene que estar asociado a cambios en el momento dipolar entre los átomos que componen un enlace. Existen seis modos normales de vibración: de *tensión*: simétrica y asimétrica; de *deformación en el plano*: tijereteo y balanceo y de *deformación fuera del plano*: aleteo y torsión, (**Figura 23**). Cada uno de estos modos de vibración se asocia a una frecuencia determinada. El espectro infrarrojo de una sustancia natural compleja consiste en muchas bandas de absorción superpuestas que representan los diferentes modos de vibración de la gran cantidad de constituyentes moleculares de la mezcla, por lo que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una muestra. Esta técnica también es útil para identificar plantas medicinales por sus picos de absorción característicos y determinar diferencias entre materias primas de distinto origen (Singh et al. 2010; Zhu y Tan 2015).



**Figura 23: Modos normales de vibración de una molécula**

### 3.1.3 Objetivos

1. Cuantificar y comparar el contenido de los principales grupos de compuestos bioactivos, triterpenoides, carbohidratos de alto peso molecular y polifenoles, en extractos obtenidos del basidiocarpo de una misma cepa de *Ganoderma lucidum* cultivada en cáscara de semilla de girasol y paja de arroz con y sin el agregado de aditivos (aceites vegetales y cobre).

2. Caracterizar y comparar los principales grupos químicos del basidiocarpo y de extractos alcohólicos de una misma cepa de *Ganoderma lucidum* cultivada en cáscara de semilla de girasol y paja de arroz con y sin el agregado de aditivos (aceites vegetales y cobre) mediante espectroscopia FT-IR.

## 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1 Muestras analizadas

Las muestras de hongo analizadas en este capítulo provienen de tres ensayos de cultivo diferentes con la misma cepa (*Ganoderma lucidum* E47, ver **sección 2.2.1**). Las muestras de hongo cultivado en sustrato de cáscara de semilla de girasol (CSG) con y sin aceite de oliva y/o cobre, fueron obtenidas durante los ensayos de optimización del cultivo en CSG (ver **Capítulo 2**). Las muestras cultivadas en paja de arroz fueron gentilmente provistas por el Dr. Pablo Postemsky y las condiciones de cultivo han sido previamente publicadas (Postemsky et al. 2014). Las muestras cultivadas en cáscara de semilla de girasol con y sin aceite de girasol o aceite de maíz se obtuvieron siguiendo los procedimientos y condiciones descriptos anteriormente (ver **secciones 2.2.7, 2.2.9 y 2.2.10**), pero los hongos fueron cosechados *después* de la desaparición del borde claro de crecimiento activo, tras el máximo de liberación de esporas. Se presenta en la **Tabla 13** un breve resumen de las muestras analizadas.

**Tabla 13: Origen de las muestras de hongo analizadas**

ID	Sustrato	Aditivos	Oleada	Notas
CCP1	CSG	Ninguno	Primera	
CCS1	CSG	Ninguno	Segunda	
CO15P1	CSG	Aceite de Oliva 1,5%	Primera	Estudios de la optimización de cultivo en CSG (ver Capítulo 2)
CO15S1	CSG	Aceite de Oliva 1,5%	Segunda	
CCuP1	CSG	Cobre 60 ppm	Primera	
COCuP1	CSG	Aceite de Oliva 1,5% + Cobre 60 ppm	Primera	
CCuS1	CSG	Cobre 60 ppm	Segunda	
CCP2	CSG	Ninguno	Primera	Cosechado luego de la desaparición del borde activo de crecimiento
CGP2	CSG	Aceite de Girasol 1,5%	Primera	
CMP2	CSG	Aceite de Maíz 1,5%	Primera	
PCP1	Paja de Arroz	Ninguno	Primera	Estudios de biodegradación de paja de arroz (Postemsky et al. 2014)
PO1P1	Paja de Arroz	Aceite de Oliva 1%	Primera	
PO1S1	Paja de Arroz	Aceite de Oliva 1%	Segunda	
POCuP1	Paja de Arroz	Aceite de Oliva 1% + Cobre 100 ppm	Primera	

CSG: cáscara de semilla de girasol

### 3.2.2 Obtención de los extractos

#### 3.2.2.1 Extracción con etanol

El basidiocarpo de *Ganoderma lucidum* previamente secado y troceado (ver sección 2.2.10) fue molido a hebras utilizando una picadora comercial (Moulinex, modelo AD5661). Se pesó exactamente alrededor de 1 gramo del basidiocarpo molido y se extrajo con 20 volúmenes de etanol 96% (Dorwil) durante 24 horas a temperatura ambiente. La extracción se realizó tres veces para agotar al material. Los extractos se filtraron con papel de filtro Whatmann (n° 41) y se reunieron en un pool. Los extractos se obtuvieron por triplicado.

#### 3.2.2.2 Extracción con agua caliente

El marco insoluble remanente de la extracción alcohólica se secó en estufa a 60 °C durante 24 horas y luego se extrajo con 20 volúmenes de agua destilada durante 4 horas a 80 °C, con agitación. Luego se dejó en reposo a temperatura ambiente hasta completar las 24 horas de extracción. El procedimiento se realizó tres veces para agotar el material. Los extractos se filtraron con papel de filtro Whatmann (n° 41) y se reunieron en un pool. Los extractos acuosos se obtuvieron por triplicado.

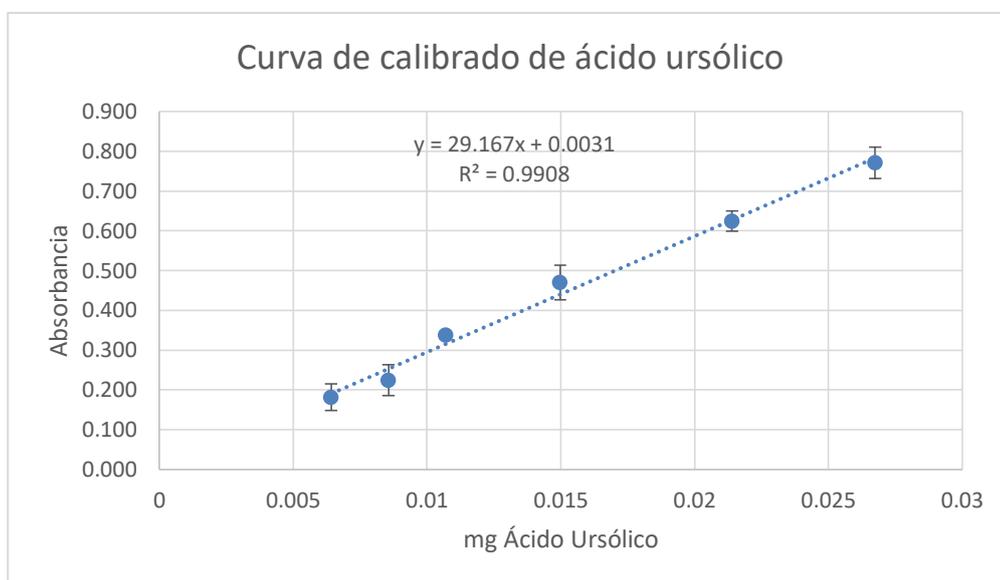
### 3.2.3 Determinación del residuo seco en los extractos

El residuo seco se determinó por evaporación del solvente en estufa a 60 °C hasta peso constante. La determinación se realizó por triplicado.

### 3.2.4 Contenido de triterpenoides

Para la valoración de triterpenoides se utilizó el método colorimétrico de la *vainillina* – *ácido perclórico*, utilizando una solución de ácido ursólico (Sigma) en etanol absoluto (Dorwill) (0,1 mg/mL) como estándar. Este método fue descrito por Few (1965) para la determinación de esteroides y posteriormente fue utilizado para la determinación de triterpenoides en *G. lucidum* (Cui et al. 2006; Chen et al. 2007; Lu et al. 2012). El método se adaptó para microplacas de 96 pocillos. Se colocó en los pocillos una alícuota determinada de estándar de ácido ursólico (60, 80, 100, 140, 200 y 250 µL) o de extracto etanólico y se llevó a sequedad por evaporación del solvente en estufa (60 °C) durante 24 horas. A continuación se agregó a cada pocillo 10 µL de vainillina (Sigma) en ácido acético glacial (Anedra) al 5% (p/v) y 35 µL de ácido perclórico (Cicarelli). Se calentó en estufa a 60 °C durante 45 minutos. Luego de enfriar

a temperatura ambiente durante 15 minutos se diluyó con 165  $\mu\text{L}$  de ácido acético glacial y se midió la absorbancia a 548 nm en lectora de microplacas (Biotek, Sinergy HTX). La curva de calibrado corresponde al promedio de la absorbancia de cuatro determinaciones vs. la concentración de ácido ursólico. Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado.



**Figura 24:** Curva de calibrado representativa de ácido ursólico por el método de la vainillina - ácido perclórico

### 3.2.5 Determinación de ácidos ganodéricos

Los ácidos ganodéricos son triterpenoides de baja polaridad que poseen uno o más grupos carboxilos ionizables a pH básico. Son insolubles en agua o soluciones ácidas, pero solubles en soluciones alcalinas.

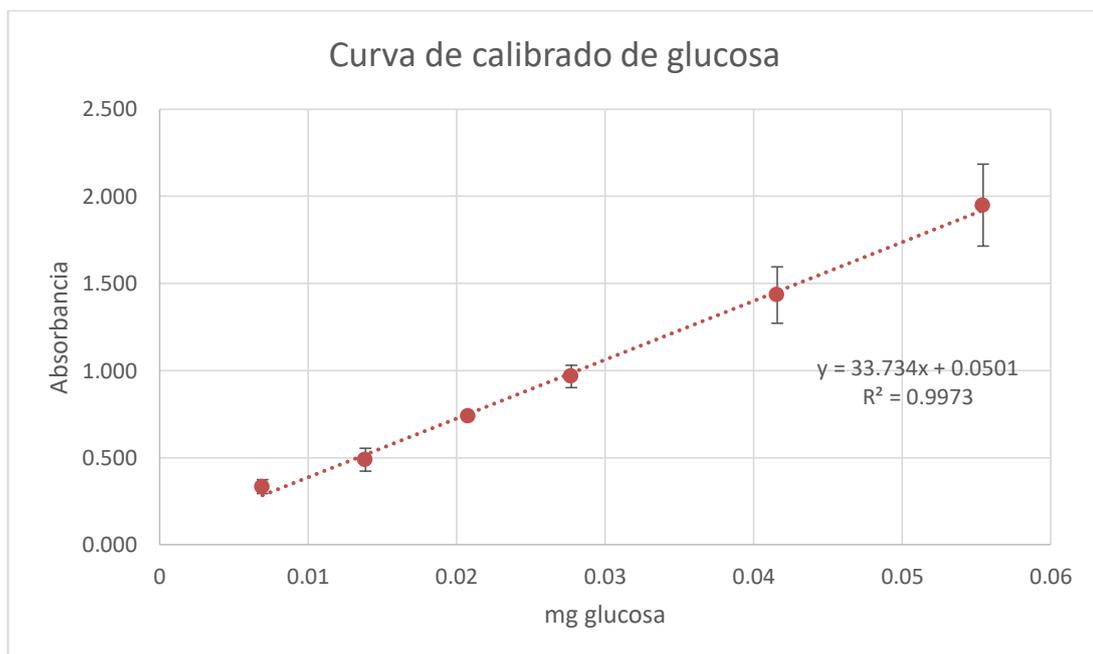
Para valorar el contenido de ácidos ganodéricos, se llevó a sequedad en estufa a 60 °C una cantidad determinada de extracto etanólico. Posteriormente se redisolvió en una solución de bicarbonato de sodio (Cicarelli) al 5%, separando el residuo insoluble por centrifugación a 8.000 rpm. La cuantificación se realizó por el método espectrofotométrico descrito anteriormente (**sección 3.2.4**), por cuadruplicado.

### 3.2.6 Contenido de carbohidratos de alto peso molecular.

La fracción de carbohidratos de alto peso molecular (polisacáridos y proteoglucanos) se separó de los de bajo peso molecular a través de un proceso de diálisis (c.o. 14.000 MW)

durante 72 horas contra agua corriente (las primeras 48 horas) y finalmente contra agua destilada (últimas 24 horas). La cuantificación de carbohidratos de alto peso molecular del extracto dializado se realizó mediante una adaptación del método descrito por Laurentin y Edwards (2003) en microplacas de 96 pocillos usando una solución de glucosa (Anedra) en agua destilada (1,4 mg/mL) como estándar.

Para realizar la curva de calibrado de glucosa se colocó en los pocillos una alícuota de la solución de glucosa (5, 10, 15, 20, 30 y 40  $\mu\text{L}$ ) y se completó el volumen a 40  $\mu\text{L}$  con agua destilada. Para la determinación de las muestras se agregó a cada pocillo una alícuota conocida del extracto acuoso dializado y se completó el volumen a 40  $\mu\text{L}$  con agua destilada. Las microplacas se llevaron a heladera durante 15 minutos. Luego se preparó una solución de antrona (Sigma) en ácido sulfúrico (Dorwill) (2 g/L) y se agregó 100  $\mu\text{l}$  de ese reactivo en cada pocillo. Finalmente se llevó la placa a estufa a 92  $^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos y luego se leyó la absorbancia a 630 nm en lectora de microplacas. Las determinaciones se hicieron por cuadruplicado.



**Figura 25:** Curva de calibrado representativa de glucosa por el método de antrona - ácido sulfúrico

### 3.2.7 Contenido de compuestos fenólicos

El contenido de compuestos fenólicos se determinó tanto en los extractos etanólicos como en los extractos acuosos. La valoración de compuestos fenólicos se realizó a través de un método espectrofotométrico mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato). Se utilizó una adaptación del método en microplacas de 96 pocillos descrito por Magalhaes et al. (2010) utilizando una solución de ácido gálico (Sigma) en agua (0,125 mg/mL) como estándar.

Se agregaron alícuotas de estándar (5, 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{L}$ ) o de extracto a los pocillos y se completó el volumen hasta 50  $\mu\text{L}$  con agua. Luego se adicionó 50  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:5 en agua del reactivo de Folin – Ciocalteu (Sigma). Finalmente se agregó 100  $\mu\text{L}$  de una solución de hidróxido de sodio 0,175 N y se midió la absorbancia a 760 nm en lectora de microplacas. Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado.

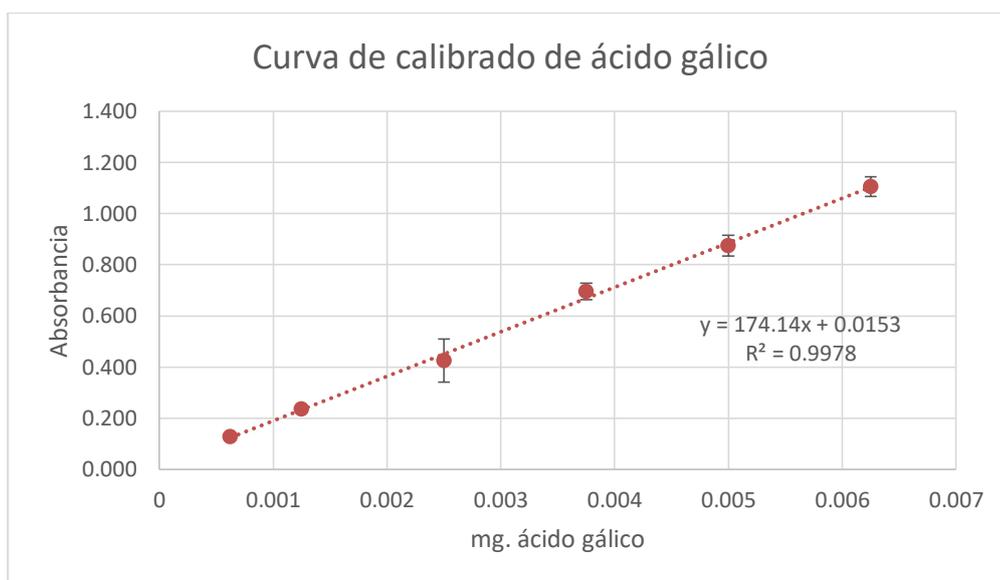


Figura 26: Curva de calibrado representativa de ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu

### 3.2.8 Contenido de cobre

El basidiocarpo seco y molido se digirió con 1,5 mL de  $\text{HNO}_3$  y  $\text{HClO}_4$  (2:1 v/v) durante 2 horas a 280  $^\circ\text{C}$  y se diluyó con agua bidestilada. El contenido de cobre se midió utilizando un espectrómetro de emisión óptica por plasma acoplado inductivamente (modelo 1000:III; Shimadzu).

### 3.2.9 Espectrofotometría visible

Con el fin de determinar diferencias en el color de los extractos, se midió el espectro de absorción entre 400 y 900 nm de los extractos acuosos y etanólicos. Para ello se colocaron 200  $\mu$ L de cada extracto en pocillos y se realizó un barrido espectral en lectora de microplacas con una resolución de 10 nm. Para cada longitud de onda se restó la absorción de un blanco de solvente (agua o etanol 96 %). Las lecturas se normalizaron por el peso de basidiocarpo utilizado para la extracción y representan la absorción de un extracto por gramo de hongo extraído en 20 volúmenes de solvente. Los espectros corresponden al promedio de tres extractos por tratamiento.

### 3.2.10 Espectrofotometría FT-IR

El registro de los espectros se obtuvo como dispersión en bromuro de potasio, KBr, (sólido en sólido, al 1 % peso en peso), utilizando el material seco proveniente de la molienda del basidiocarpo de *G. lucidum*. Se empleó un accesorio de reflectancia difusa (Avatar). Los extractos etanólicos (CCP1 y PCP1) se prepararon como película por evaporación del solvente sobre ventanas de KBr. En ambos casos, se utilizó un espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier (Nicolet-Nexus 470), con 64 escaneos de barrido dentro del intervalo de frecuencias del infrarrojo medio (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ). Los espectros se procesaron utilizando el software Omnic 32. Estas determinaciones se realizaron en el Laboratorio perteneciente al Área II, Química Orgánica, del Departamento de Química (UNS) bajo la supervisión y asesoramiento de la Dra. Olga Pieroni.

### 3.2.11 Análisis estadístico

Los resultados de las determinaciones se expresaron en mg de compuesto por g de carpóforo seco, y en relación al residuo seco (mg de compuesto / mg de residuo seco x 100%). Los datos fueron analizados por análisis de varianza de un factor (ANOVA). La separación de los valores medios se realizó mediante el test de Tukey. Los análisis se efectuaron utilizando el software Infostat.

## 3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.3.1 Residuo seco

El residuo seco representa el total de compuestos extraídos del basidiocarpo y es una medida de la eficiencia de extracción. La **Tabla 14** resume la cantidad de residuo seco extraída

por gramo de hongo en las extracciones alcohólica y acuosa. Además se presenta el total de residuo seco extraído (extracción alcohólica más extracción acuosa).

**Tabla 14: Contenido de residuo seco (mg/g de hongo seco)**

Muestra	Residuo Seco (mg/g de hongo)					
	Ext. Alcohólico		Ext. Acuoso		Total	
CCP1	135 ± 12	AB	162 ± 13	BC	296 ± 17	AB
CCS1	128 ± 10	ABC	151 ± 4,9	CD	274 ± 10	BC
CO15P1	117 ± 10	CDE	182 ± 7,3	A	303 ± 13	A
CO15S1	111 ± 12	DE	137 ± 10	DE	252 ± 7,3	DEF
CCuP1	126 ± 11	BCD	172 ± 8,3	AB	296 ± 13	AB
CCuS1	118 ± 9,7	DE	150 ± 7,6	CD	266 ± 16	CD
COCuP1	111 ± 9,1	DE	183 ± 4,0	A	295 ± 10	AB
CCP2	136 ± 11	AB	119 ± 8,3	FG	254 ± 17	CDE
CGP2	89,1 ± 5,1	F	108 ± 6,2	G	197 ± 7,9	H
CMP2	82,9 ± 9,1	F	144 ± 6,0	CD	228 ± 9,3	G
PCP1	143 ± 10	A	120 ± 4,8	FG	264 ± 13	CD
PO1P1	111 ± 13	DE	117 ± 13	FG	229 ± 23	FG
PO1S1	115 ± 12	DE	122 ± 9,6	FG	239 ± 10	EFG
POCuP1	109 ± 9,1	E	127 ± 13	EF	236 ± 13	EFG

Se presenta la media ± el desvío estándar. Letras diferentes en la misma columna indican medias significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

La eficiencia total de extracción varió entre 197 y 303 mg/g de hongo seco. La eficiencia de la extracción acuosa fluctuó entre 108 y 183 mg/g de hongo seco, mientras que la de la extracción alcohólica varió entre 82,9 y 143 mg / g de hongo seco.

En general, los hongos cosechados después del máximo de liberación de esporas (CCP2, CGP2 y CMP2) presentaron menores eficiencias de extracción, probablemente por translocación de compuestos a la espora. En el caso del sustrato sin aditivos, la reducción se produjo principalmente en los extractos acuosos, lo que indicaría una pérdida de compuestos de carácter polar. Con la presencia de 1,5% de aceite de girasol se obtuvo significativamente ( $p < 0,05$ ) menos residuo sólido en ambos extractos con respecto al sustrato sin aditivo en la misma condición de cosecha (CCP2), mientras que con aceite de maíz (1,5%) se redujo de manera similar el residuo seco en los extractos alcohólicos, pero aumentó significativamente en los extractos acuosos.

Comparando sustratos (paja de arroz y cáscara de semilla de girasol), no se observaron diferencias significativas para el extracto alcohólico, pero se observó un menor valor en el extracto acuoso en el caso de los hongos cultivados en paja de arroz.

En paja de arroz, la adición de aceite de oliva o aceite de oliva y cobre no modificó la eficiencia de extracción en los extractos acuosos pero la redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) en los extractos alcohólicos. La adición de aceite de oliva y/o cobre en el sustrato de cáscara de semilla de girasol no modificó la eficiencia de extracción total, pero se observó, en presencia de aceite de oliva, un incremento de la eficiencia en los extractos acuosos en detrimento de la eficiencia de los extractos alcohólicos, lo que indicaría un aumento de compuestos polares y una disminución de los apolares.

En general, las eficiencias de extracción en carpóforos de la segunda oleada fueron menores a la de carpóforos de la primera oleada.

### 3.3.2 Contenido de triterpenoides y ácidos ganodéricos

Los triterpenoides y ácidos ganodéricos de *G. lucidum* están involucrados en muchas de las acciones biológicas adjudicadas al hongo, y son responsables de su característico sabor amargo. La **Tabla 15** resume el contenido de triterpenoides en relación al carpóforo (mg Eq. ácido ursólico/g) y al residuo seco (%), y de ácidos ganodéricos en relación al carpóforo (mg Eq. ácido ursólico/g) y a los triterpenoides totales (%). El contenido de triterpenoides totales varió entre 32,7 y 48,6 mg Eq. ácido ursólico/g y el de ácidos ganodéricos entre 10,8 y 22,4 mg Eq. ácido ursólico/g. Estos valores son similares a los reportados por otros autores (Sukarno et al. 2004; Lu et al. 2012).

Tabla 15: Contenido de triterpenoides y ácidos ganodéricos

Muestra	Triterpenoides (mg Eq. ácido ursólico/g)		Triterpenoides (% Re- siduo Seco)		Ácidos ganodéricos (mg Eq. ácido ursó- lico/g)		Ácidos ganodéricos (% Triterpenoides)	
CCP1	37,8 ± 3,6	CD	28,2% ± 3,9%	F	19,2 ± 0,9	BCD	51,2% ± 5,4%	AB
CCS1	39,6 ± 7,0	C	28,3% ± 3,6%	EF	20,4 ± 1,1	ABCD	53,7% ± 14,3%	AB
CO15P1	37,4 ± 4,5	CD	30,8% ± 4,6%	DEF	20,7 ± 1,6	ABC	56,4% ± 10,8%	A
CO15S1	38,2 ± 7,2	CD	34,7% ± 6,9%	CDEF	22,4 ± 2,2	A	60,5% ± 13,6%	A
CCuP1	42,3 ± 3,0	BC	33,7% ± 5,4%	CDEF	21,9 ± 2,7	A	51,8% ± 6,1%	AB
CCuS1	38,2 ± 3,5	CD	33,2% ± 4,7%	CDEF	22,3 ± 2,7	A	58,4% ± 6,6%	A
COCuP1	48,6 ± 4,5	A	44,4% ± 4,9%	A	17,8 ± 1,6	DEF	36,1% ± 3,2%	C
CCP2	39,3 ± 2,5	C	29,0% ± 3,6%	DEF	13,5 ± 0,5	G	34,0% ± 2,2%	C
CGP2	32,7 ± 2,7	D	36,3% ± 4,4%	BCDE	10,8 ± 0,8	H	33,4% ± 4,7%	C
CMP2	32,7 ± 3,9	D	39,0% ± 7,5%	ABC	16,2 ± 1,2	EF	50,5% ± 8,6%	AB
PCP1	39,1 ± 3,2	C	27,4% ± 2,2%	F	16,3 ± 1,2	EF	42,0% ± 4,1%	BC
PO1P1	37,4 ± 4,8	CD	34,2% ± 5,9%	CDEF	18,1 ± 3,2	CDE	49,4% ± 11,2%	AB
PO1S1	41,7 ± 3,4	BC	36,9% ± 4,9%	ABCD	21,2 ± 1,8	AB	50,8% ± 6,6%	AB
POCuP1	47,6 ± 5,2	AB	43,9% ± 4,5%	AB	15,5 ± 1,7	FG	33,1% ± 7,4%	C

Se presenta la media  $\pm$  el desvío estándar. Letras diferentes en la misma columna indican medias significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el contenido de triterpenoides totales de carpóforos cultivados en CSG y paja de arroz sin aditivos. Sin embargo, la adición de cobre y aceite de oliva estimuló significativamente ( $p < 0,05$ ) la producción de triterpenoides entre un 22 y 28% tanto en CSG como paja de arroz. Por otro lado, la adición de aceite de maíz o aceite de girasol, redujeron el contenido de triterpenoides totales un 17%.

El contenido de ácidos ganodéricos representó entre el 33,1 y el 60,5% de los triterpenoides totales. Se observó que con la adición de aceite de oliva y cobre se redujo la proporción de ácidos ganodéricos de 51,2% a 36,1% en CSG, y de 42,0% a 33,1% en paja de arroz. En ambos casos la reducción se debió a un aumento de los triterpenoides totales sin observarse una disminución significativa del contenido de ácidos ganodéricos. Por otro lado se observó una reducción significativa tanto en el contenido de ácidos ganodéricos como su relación con respecto a los triterpenoides totales en los hongos cosechados tras la máxima liberación de esporas. El contenido de ácidos ganodéricos depende del estadio de cultivo (Ding et al. 1999; Liu et al. 2012). En estas condiciones de cosecha, el contenido de ácidos ganodéricos, y su proporción con respecto a los triterpenoides totales, se incrementó con la adición de aceite de maíz.

### 3.3.3 Contenido de carbohidratos de alto peso molecular

La fracción de carbohidratos de alto peso molecular incluye principalmente polisacáridos y proteoglucanos. A esta fracción se le atribuye acción inmunomoduladora. La **Tabla 16** muestra el contenido de carbohidratos de alto peso molecular por gramo de basidiocarpo seco (mg Eq. glucosa/g) y su relación con respecto al residuo seco total (%). El contenido total de carbohidratos de alto peso molecular fluctuó entre 8,0 y 16,3 mg Eq. glucosa/g. Estos valores fueron similares a los reportados por otros autores (Chin et al. 2011; Lu et al. 2012; Pan et al. 2013; Mai et al. 2015).

**Tabla 16: Contenido de carbohidratos de alto peso molecular**

<b>Muestra</b>	<b>Carbohidratos Alto PM (mg Eq. glucosa/g)</b>	<b>Carbohidratos Alto PM (% Residuo Seco)</b>
CCP1	14,0 ± 2,7 ABC	8,6% ± 1,8% BC
CCS1	12,2 ± 1,5 BCD	8,1% ± 0,5% BC
CO15P1	11,7 ± 1,6 CDE	6,4% ± 0,8% BC
CO15S1	11,2 ± 2,1 CDE	8,1% ± 1,1% BC
CCuP1	9,3 ± 2,1 DE	5,4% ± 1,3% BC
CCuS1	12,0 ± 2,7 BCD	8,0% ± 1,9% BC
COCuP1	9,4 ± 1,8 DE	5,2% ± 1,1% C
CCP2	9,3 ± 0,5 DE	7,9% ± 0,5% BC
CGP2	8,0 ± 0,8 E	7,5% ± 0,9% BC
CMP2	8,7 ± 1,0 DE	6,0% ± 0,8% BC
PCP1	16,3 ± 4,5 A	13,7% ± 3,7% A
PO1P1	15,6 ± 4,2 AB	13,3% ± 5,1% A
PO1S1	15,0 ± 2,3 ABC	12,3% ± 1,7% A
POCuP1	9,9 ± 0,7 DE	7,9% ± 0,7% BC

Se presenta la media ± el desvío estándar. Letras diferentes en la misma columna indican medias significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el contenido de carbohidratos de alto peso molecular entre hongos cultivados en CSG y paja de arroz sin aditivos. La adición de cobre (II) al sustrato redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) el contenido de carbohidratos de alto peso molecular entre un 33 a 39%, tanto en CSG como en paja de arroz. En CSG esta reducción fue solo evidente para carpóforos cosechados en la primera oleada. Asimismo se observó una reducción en el contenido de carbohidratos de alto peso molecular en las muestras cosechadas tras la máxima liberación de esporas. Esto podría deberse a una

translocación de polisacáridos hacia la espora y coincide con lo observado para el residuo seco del extracto acuoso.

### 3.3.4 Contenido de compuestos fenólicos

La propiedad antioxidante de los hongos está correlacionada con el contenido de compuestos fenólicos (Pala y Wani 2011). El contenido de compuestos fenólicos solubles en alcohol, de compuestos fenólicos solubles en agua y el total de compuestos fenólicos por gramo de hongo seco se presenta en la **Tabla 17**. El contenido total de compuestos fenólicos varió entre 5,5 y 9,5 mg Eq. ácido gálico/g, mientras que los compuestos fenólicos solubles en agua fluctuaron entre 2,6 y 6,5 mg Eq. ácido gálico/g. El contenido de polifenoles solubles en etanol se ubicó entre 2,5 y 4,6 mg Eq. ácido gálico/g.

**Tabla 17: Contenido de polifenoles**

Muestra	Compuestos fenólicos (mg Eq. ácido gálico/g)					
	Ext. Alcohólico		Ext. Acuoso		Total	
CCP1	2,8 ± 0,2	CD	4,0 ± 0,6	CD	6,8 ± 0,7	DE
CCS1	2,5 ± 0,1	F	3,8 ± 0,2	CDE	6,3 ± 0,2	EF
CO15P1	2,8 ± 0,2	C	5,1 ± 0,5	B	7,9 ± 0,3	B
CO15S1	2,5 ± 0,1	EF	3,6 ± 0,5	DE	6,1 ± 0,5	FG
CCuP1	2,9 ± 0,3	C	6,5 ± 0,5	A	9,5 ± 0,5	A
CCuS1	2,9 ± 0,2	C	4,4 ± 0,4	C	7,3 ± 0,5	CD
COCuP1	3,4 ± 0,2	B	6,1 ± 0,5	A	9,4 ± 0,5	A
CCP2	4,6 ± 0,3	A	2,9 ± 0,4	FG	7,5 ± 0,4	BC
CGP2	3,2 ± 0,2	B	2,6 ± 0,4	G	5,8 ± 0,4	FGH
CMP2	2,5 ± 0,3	F	4,4 ± 0,5	C	6,8 ± 0,6	DE
PCP1	2,7 ± 0,1	CDE	2,8 ± 0,4	FG	5,6 ± 0,4	GH
PO1P1	2,5 ± 0,1	DEF	2,9 ± 0,3	FG	5,5 ± 0,3	H
PO1S1	2,7 ± 0,1	CDEF	3,0 ± 0,2	FG	5,7 ± 0,3	FGH
POCuP1	4,5 ± 0,3	A	3,4 ± 0,4	EF	7,8 ± 0,5	BC

Se presenta la media ± el desvío estándar. Letras diferentes en la misma columna indican medias significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Los hongos cultivados en paja de arroz tuvieron menor contenido de compuestos fenólicos totales que los cultivados en CSG. Esto se debió a un menor contenido de compuestos fenólicos solubles en agua. La adición de cobre al sustrato aumentó significativamente el contenido de compuestos fenólicos totales, tanto en paja de arroz como en CSG. Sin embargo, este aumento se debió en CSG a un aumento de los compuestos fenólicos solubles en agua, mientras que en paja de arroz se debió a un aumento de los compuestos fenólicos

solubles en alcohol, lo que indica una diferencia estructural entre los compuestos analizados. Por otro lado, la adición de aceite de oliva incrementó significativamente ( $p < 0,05$ ) el contenido de compuestos fenólicos solubles en agua en CSG pero no tuvo efecto en paja de arroz. El aceite de oliva aporta al sustrato una fracción compleja de compuestos fenólicos polares (Boskou et al. 2006) que podrían ser absorbidos por el micelio de *G. lucidum* (Aksu 2005). Sin embargo, la paja de arroz puede actuar como un adsorbente eficiente de compuestos fenólicos polares (Amin et al. 2012), lo que en este sustrato estaría limitado el acceso del micelio de *G. lucidum* a estos compuestos.

Con respecto al momento de la cosecha se observó un leve aumento en el nivel de compuestos fenólicos totales en la muestra cosechada tras la desaparición del borde de crecimiento activo. Sin embargo, se observaron grandes diferencias en la distribución de estos compuestos, siendo en la muestra cosechada más tarde mucho mayor el contenido de compuestos fenólicos solubles en alcohol, pero mucho menor el de solubles en agua ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, la adición de aceite de girasol redujo el contenido de compuestos fenólicos solubles en alcohol sin alterar el contenido de compuestos fenólicos solubles en agua. De igual manera, el aceite de maíz redujo el contenido de compuestos fenólicos solubles en alcohol, pero incrementó en de los solubles en agua.

Finalmente, no se observaron grandes diferencias en los contenidos de compuestos fenólicos de los basidiocarpos de la segunda oleada.

La **Tabla 18** presenta la relación entre compuestos fenólicos y el residuo seco. Se observó una fuerte correlación positiva entre el contenido de compuestos fenólicos y el residuo seco en el extracto acuoso, excepto en los hongos cultivados en CSG con el agregado de cobre, donde se observó un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) de la relación.

Tabla 18: Relación entre compuestos fenólicos y residuo seco

Muestra	Polifenoles/Residuo seco (%)					
	Ext. Alcohólico		Ext. Acuoso		Total	
CCP1	2,1% ± 0,3%	GHI	2,5% ± 0,4%	D	2,3% ± 0,3%	EFG
CCS1	1,9% ± 0,1%	I	2,6% ± 0,1%	D	2,3% ± 0,1%	FG
CO15P1	2,4% ± 0,1%	FG	2,8% ± 0,2%	BCD	2,6% ± 0,2%	CDEF
CO15S1	2,3% ± 0,3%	FGHI	2,6% ± 0,3%	CD	2,4% ± 0,2%	EFG
CCuP1	2,4% ± 0,4%	FG	3,8% ± 0,2%	A	3,2% ± 0,3%	AB
CCuS1	2,5% ± 0,3%	EF	2,8% ± 0,3%	BCD	2,7% ± 0,2%	CDE
COCuP1	3,0% ± 0,3%	CD	3,3% ± 0,3%	AB	3,2% ± 0,2%	AB
CCP2	3,3% ± 0,4%	BC	2,5% ± 0,4%	D	2,9% ± 0,3%	BCD
CGP2	3,6% ± 0,4%	AB	2,5% ± 0,4%	D	3,0% ± 0,2%	ABC
CMP2	2,9% ± 0,2%	DE	3,1% ± 0,4%	BC	3,0% ± 0,2%	ABC
PCP1	1,9% ± 0,1%	HI	2,4% ± 0,3%	D	2,1% ± 0,1%	G
PO1P1	2,3% ± 0,3%	FGH	2,7% ± 0,4%	CD	2,5% ± 0,2%	DEF
PO1S1	2,4% ± 0,2%	FG	2,5% ± 0,3%	D	2,4% ± 0,1%	EFG
POCuP1	4,1% ± 0,4%	A	2,7% ± 0,4%	CD	3,3% ± 0,3%	A

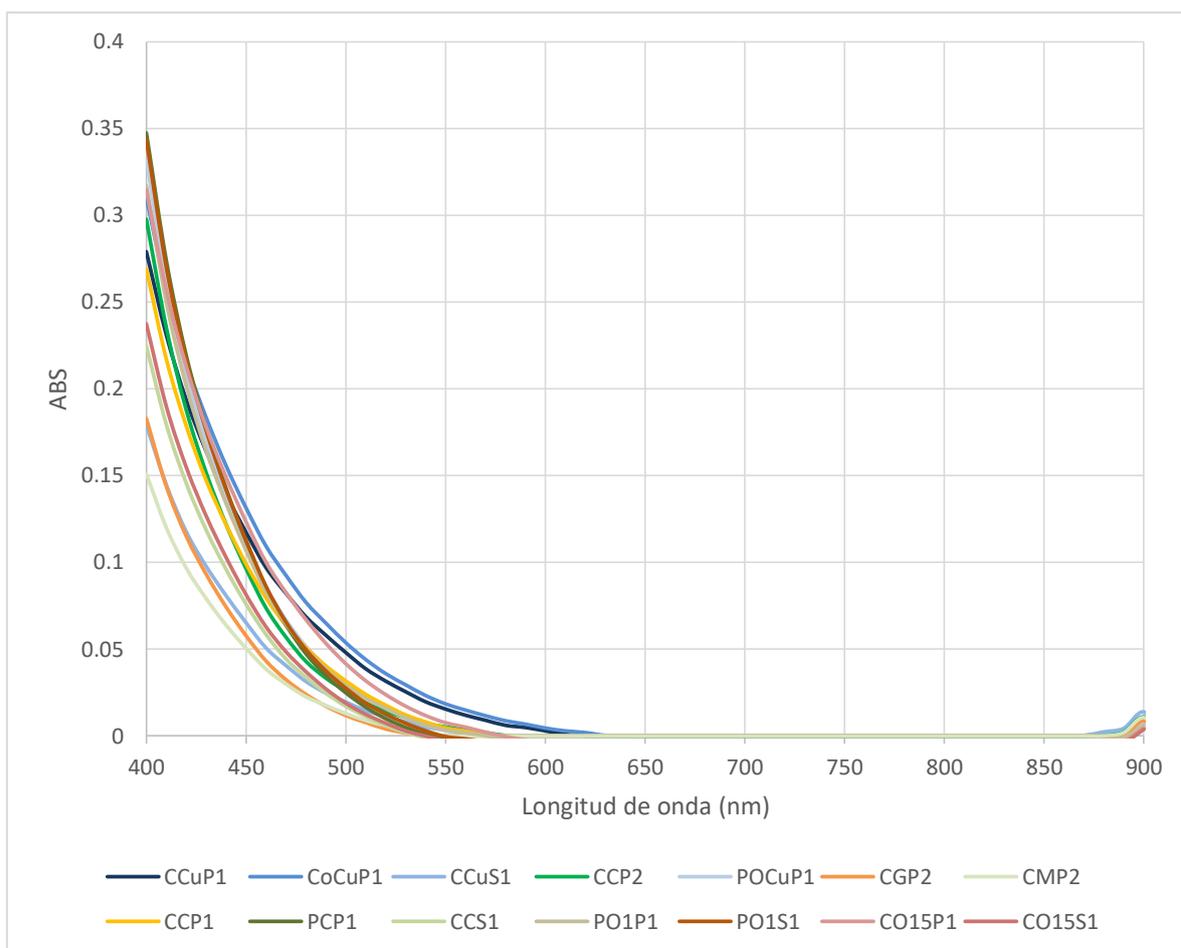
Se presenta la media  $\pm$  el desvío estándar. Letras diferentes en la misma columna indican medias significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.5 Contenido de cobre

Se observó un incremento de 145-155% en el contenido de Cu, desde 53 a 130-135 mg/kg, en los carpóforos que provenían de sustratos enriquecidos con este mineral. Este resultado concuerda con lo reportado por Gonzalez Matute et al. (2011). El cobre es un micronutriente esencial para la salud humana (Uauy et al. 1998), por lo que este resultado es interesante desde un punto de vista nutricional y medicinal. El mayor contenido de Cu contribuiría a enriquecer con este mineral a los productos nutracéuticos derivados del basidio-carpo.

### 3.3.6 Espectrofotometría visible

La **Figura 27** muestra el espectro de absorción de los extractos etanólicos. Se observa una banda ancha de absorción entre 400 – 500 nm similar en todos los extractos, con diferencias en las intensidades de la banda.



**Figura 27: Espectro visible de los extractos alcohólicos**

La **Figura 28** muestra el espectro de absorción de los extractos acuosos. Al igual que en los extractos etanólicos se observa una banda ancha de absorción entre 400 – 550 nm, pero de mayor intensidad. Además se observan grandes diferencias en las intensidades de absorción. De acuerdo a la intensidad del pico los extractos se separaron en tres grupos: los de mayor intensidad (pico a 400 nm entre 0.850 – 0.950) corresponden a los hongos cultivados en CSG con el agregado de cobre, los de intensidad media (absorbancia en 400 nm entre 0.550 – 0.680) a la mayor parte de los hongos cultivados en CSG, y los de menor intensidad (absorbancia en 400 nm entre 0.350 – 0.400) corresponden a los hongos cultivados en paja de arroz y el resto de los cultivados en CSG. Se observó además que el pico de absorción se corresponde fuertemente con el contenido de compuestos fenólicos en el extracto acuoso (**Figura 29**). Por lo tanto estos compuestos podrían ser los pigmentos responsables del color del extracto.

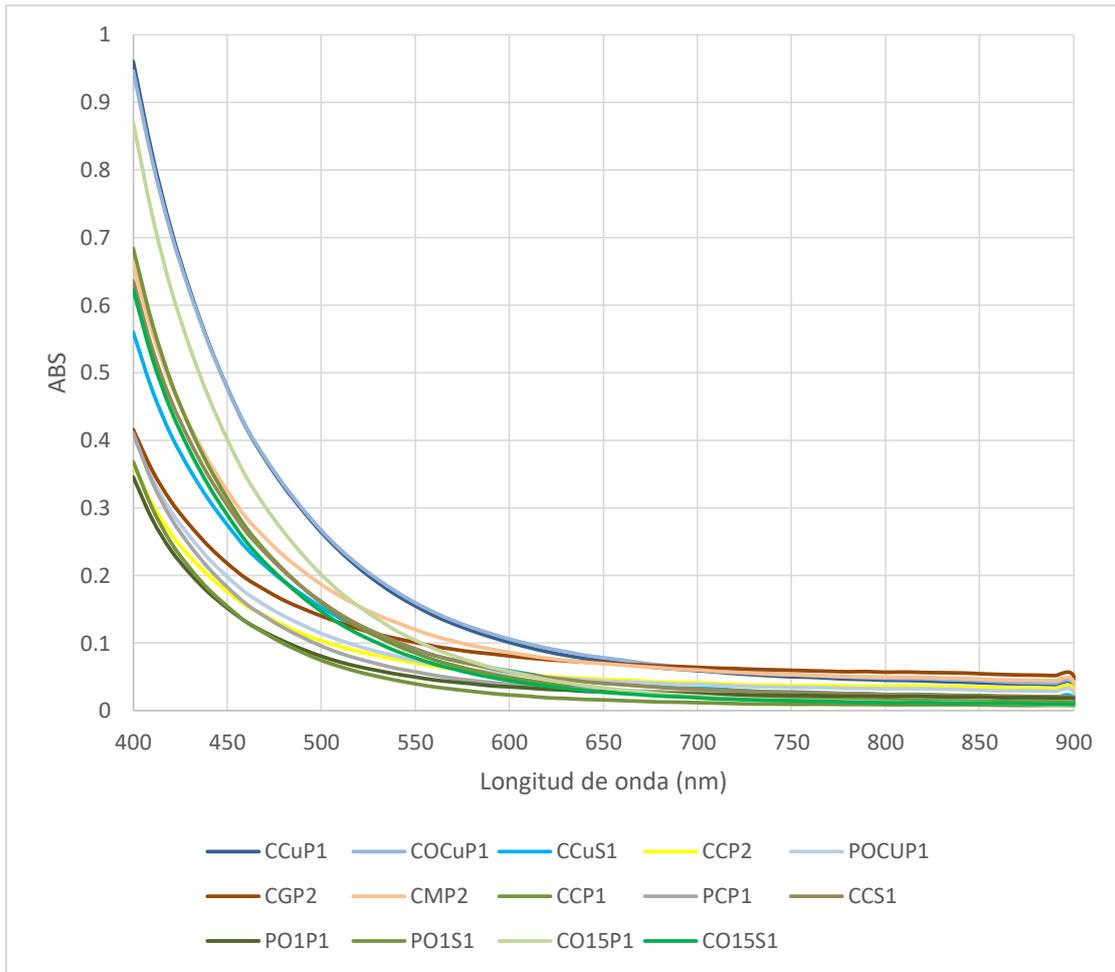


Figura 28: Espectro visible de los extractos acuosos

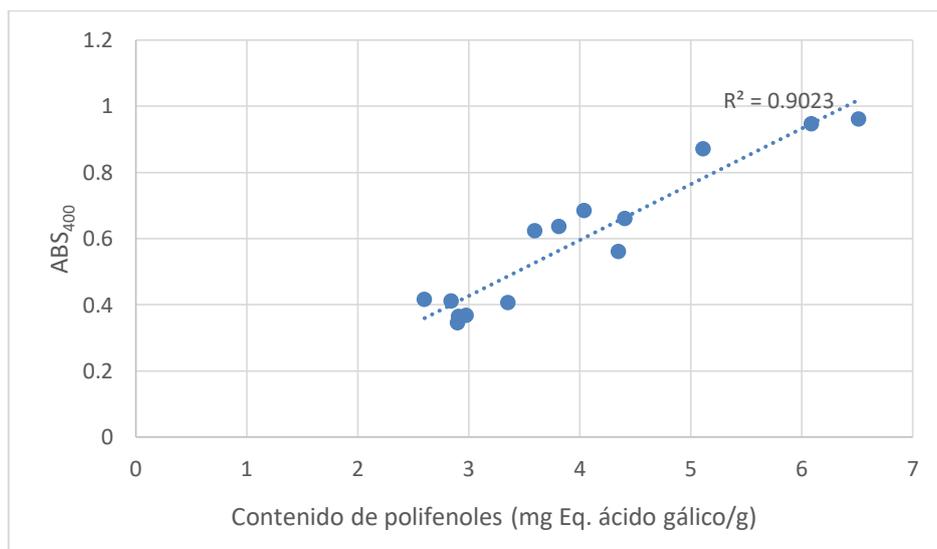


Figura 29: Correlación entre el contenido de polifenoles y la absorbancia a 400 nm en los extractos acuosos.

### 3.3.7 Efecto del agregado de Cobre (II)

En términos generales, el agregado de cobre a los sustratos de cultivo incrementó el contenido de triterpenoides y compuestos fenólicos en los extractos estudiados. Esto podría deberse a una estimulación en la producción de estos compuestos, ya que su contenido no solo aumentó en términos de cantidad absoluta extraída por gramo de hongo, sino que se incrementó en relación a la del resto de los compuestos extraídos (residuo seco). El cobre es un conocido inductor de la enzimas lacasas (Kuhar y Papinutti 2014). La mayor actividad de las enzimas lacasas promovería una mayor degradación de la lignina presente en el sustrato, hacia compuestos fenólicos de menor peso molecular, que podrían ser absorbidos por la hifa. Además, existen reportes de la estimulación de la producción de ácidos ganodéricos por la presencia de iones  $\text{Cu}^{2+}$  en el medio (Tang y Zhu 2010).

Por otro lado, la presencia de cobre disminuyó el contenido de carbohidratos de alto peso molecular, siendo esta disminución más marcada en sustrato de paja de arroz. También se determinó un aumento significativo del contenido de cobre en el basidiocarpo cuando este mineral se agregó al sustrato.

### 3.3.8 Efecto del agregado de aceites vegetales

Se estudió el efecto del agregado de aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de girasol. La adición de aceite de oliva no tuvo grandes efectos sobre el contenido de los principales grupos químicos estudiados, pero incrementó ligeramente el contenido de compuestos fenólicos polares cuando se cultivó en CSG.

La adición de aceite de maíz y aceite de girasol redujeron ligeramente los contenidos de triterpenoides y compuestos fenólicos. Sin embargo, la proporción con el resto de los compuestos extraídos no varió o incluso aumentó. Esto podría deberse a una mayor presencia de fibra insoluble en el hongo, lo que “diluye” el contenido del resto de los compuestos en el hongo. Las menores eficiencias de extracción observadas en aceite de girasol y aceite de maíz apoyan esta hipótesis.

### 3.3.9 Influencia del momento de la cosecha

Al cosechar tras la desaparición del borde claro de crecimiento, luego de la liberación máxima de esporas, no se detectaron cambios en el contenido de triterpenoides totales, pero

disminuyó el contenido y proporción de ácidos ganodéricos. Además disminuyó el contenido de carbohidratos de alto peso molecular y se modificó la proporción de compuestos fenólicos, aumentando los solubles en alcohol en detrimento de los solubles en agua. Con respecto a la oleada de cultivo, no se observaron diferencias significativas entre hongos de la primera y segunda oleada cultivados en sustratos sin aditivos. Sin embargo, la influencia de los aditivos no fue evidente en hongos obtenidos durante la segunda oleada, revirtiéndose los efectos observados en la primera oleada.

### 3.3.10 Influencia del sustrato

No se observaron diferencias importantes entre los hongos cultivados en CSG y paja de arroz, excepto en el contenido de compuestos fenólicos solubles en agua, que fue menor para los hongos cultivados en paja de arroz.

### 3.3.11 Espectrofotometría FT-IR

En todos los espectros infrarrojos de las muestras provenientes de CSG o paja de arroz como sustratos, se observa un alto grado de asociación por formación de puentes de hidrógeno, puesto en evidencia por las anchas bandas entre 4000 y 2500  $\text{cm}^{-1}$ , y la poca resolución y el aspecto ensanchado de las restantes.

Teniendo en cuenta las diferentes zonas de absorción, es posible hacer una asignación cualitativa de los grupos funcionales presentes en el material registrado, teniendo en cuenta las diferentes zonas de absorción. Estas se resumen en la **Tabla 19**.

**Tabla 19: Asignación de los grupos funcionales de los principales picos del espectro IR**

---

3600-2400:	-OH; -NH (alcoholes, fenoles, ácidos, aminas y amidas primarias y secundarias) <sup>1</sup>
2980-2720:	-CH- (metilo, metileno y metino en alquilos sustituyentes y/o esqueleto hidrocarbonado alifático) <sup>1</sup>
1650-1600:	C=O (amidas, cetonas y ácidos altamente asociados) <sup>1</sup> y C=C (alquenos y/o aromáticos) <sup>1</sup>
1550-1500:	C=C (aromáticos y/o alquenos) <sup>1</sup> ; C=O (carboxilatos) <sup>1</sup> y N-H (aminas y amidas primarias y secundarias) <sup>2</sup>
1500-1200:	-CH- (metilo y metileno en cadenas alquílicas) <sup>2</sup> y -OH (alcoholes, fenoles y ácidos) <sup>2</sup>
1200-970:	C-O (alcoholes, fenoles, éteres) <sup>1</sup> y -CH- (esqueléticas de ciclos) <sup>2</sup>
800-400:	-CH- (anillos saturados e insaturados aromáticos) <sup>3</sup>

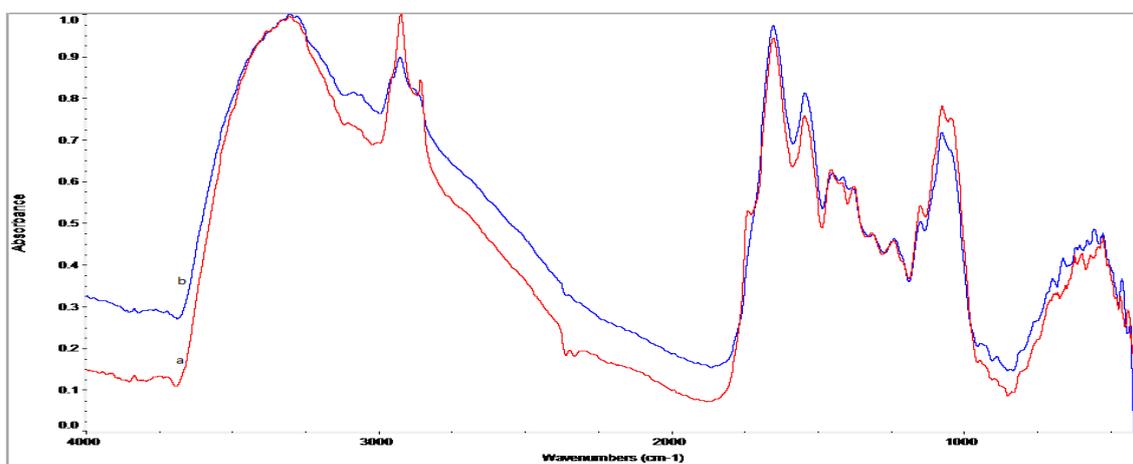
---

<sup>1</sup> vibraciones de tensión; <sup>2</sup> vibraciones de deformación en el plano; <sup>3</sup> vibraciones de deformación fuera del plano

---

Si bien, resulta casi imposible determinar a partir del espectro infrarrojo, cuáles son los componentes individuales de este material, puede resumirse en base a las bandas de absorción anteriormente enunciadas, que intervienen en su contenido en forma mayoritaria, proteínas, lípidos y azúcares. Este resultado es concordante con lo informado por Choong et al. (2011) en un estudio sobre extractos crudos y por Zhu y Tan (2015).

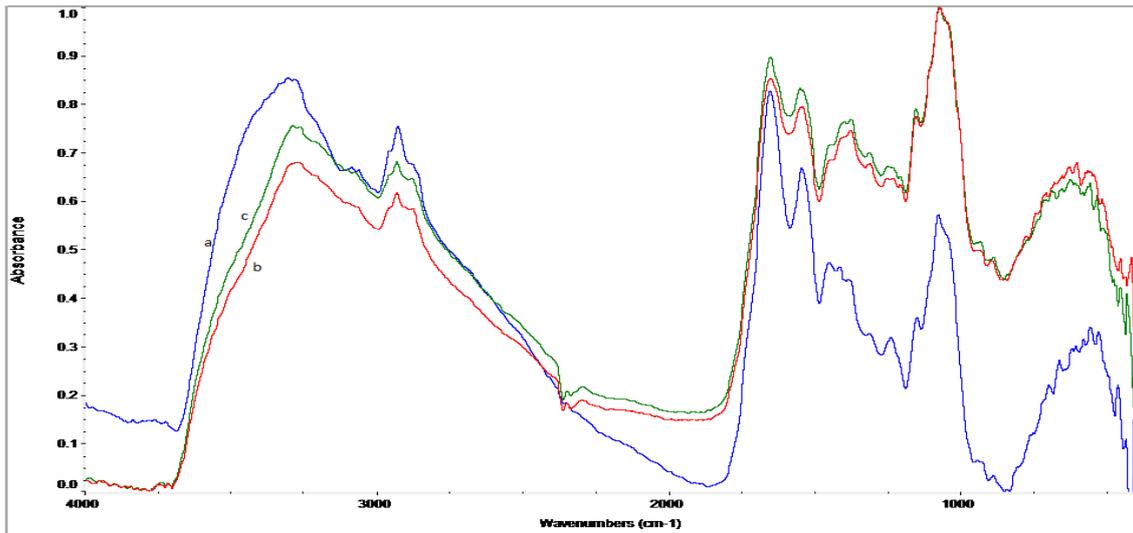
La comparación de los espectros obtenidos a partir del material cultivado sobre CSG, permite deducir que tanto en la primera como en la segunda oleada sin suplementos, las bandas de absorción, tanto en posición como en intensidad y forma, no muestran variaciones significativas (**Figura 30**); de esta observación puede inferirse que sobre este sustrato, la oleada de cosecha no tiene marcada influencia.



a) CCP1 b) CCP2

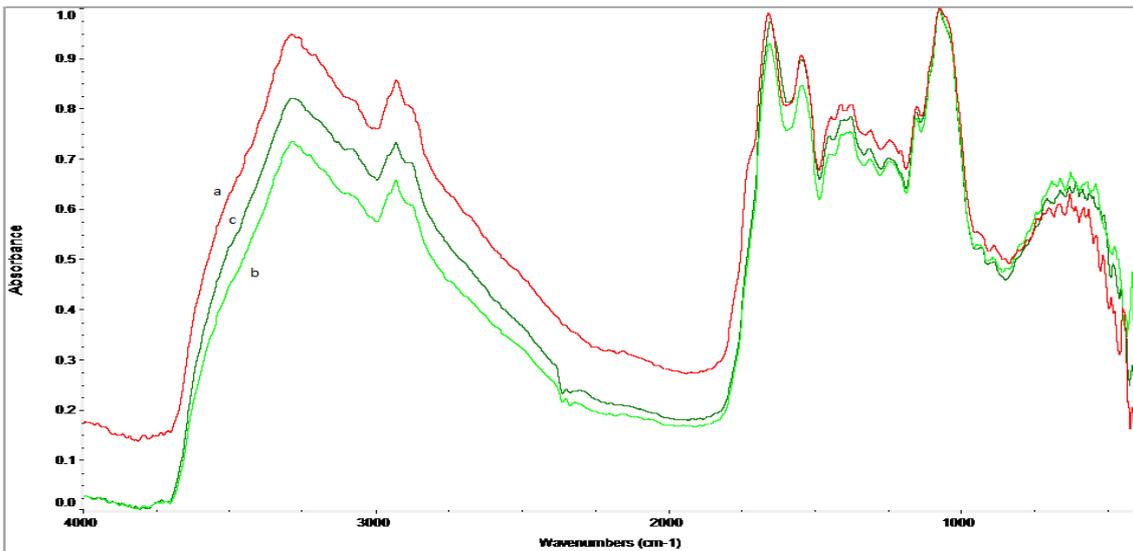
**Figura 30:** Espectros IR de basidiocarpos de *G. lucidum* cultivados en CSG y cosechados antes de la máxima liberación de esporas (CCP1) o después (CCP2)

Por otra parte, está más marcada la región correspondiente a las uniones carbono-hidrógeno saturadas y/o de grupos alquílicos sustituyentes ( $2980\text{-}2720\text{ cm}^{-1}$ ), aparece en todos los casos con intensidad; y a medida que se hacen los agregados de aceites y/o de cobre, se ven mejor resueltas las bandas en  $1650$  y  $1550\text{ cm}^{-1}$  (sin variación de la intensidad relativa entre ambas), con un incremento moderado de la banda entre  $1200$  y  $970\text{ cm}^{-1}$  (**Figuras 31, 32 y 33**). Estas diferencias permitirían suponer que la adición de aceites y/o de cobre incrementaría el contenido de proteínas, lípidos, glúcidos y fenoles, involucrando las funciones  $\text{-NH-}$ ,  $\text{-OH}$ ,  $\text{-CH-}$ ,  $\text{C=O}$  y  $\text{C-O}$ .



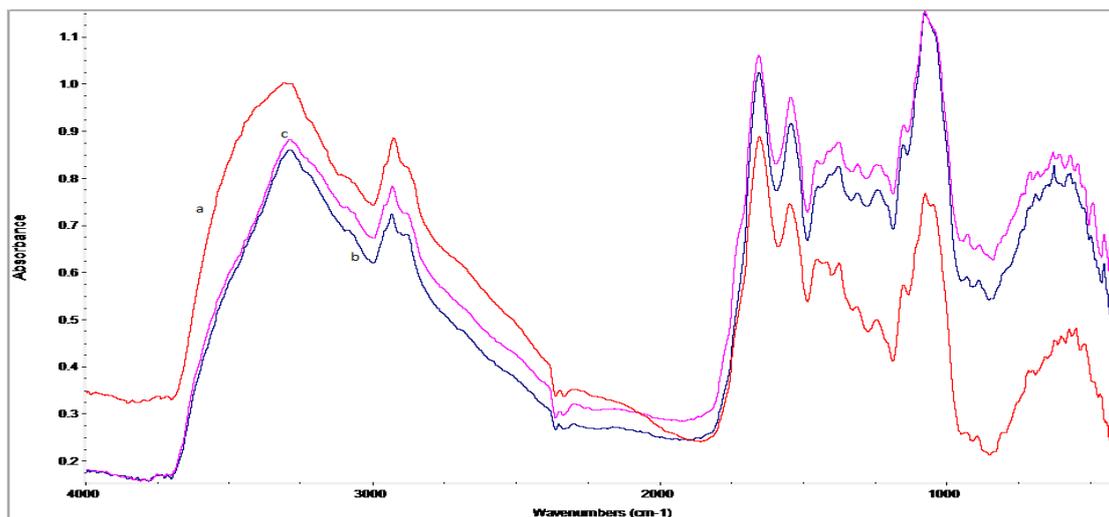
a) Sin aditivos b) Con aceite de oliva y cobre c) Con cobre

Figura 31: Espectros IR del basidiocarp de *G. lucidum* cultivado en CSG con o sin aceite de oliva y/o cobre (primera oleada)



a) Con aceite de girasol b) Con aceite de maíz c) Con aceite de oliva

Figura 32: Espectros IR del basidiocarp de *G. lucidum* cultivado en CSG con diferentes aceites vegetales (primera oleada).

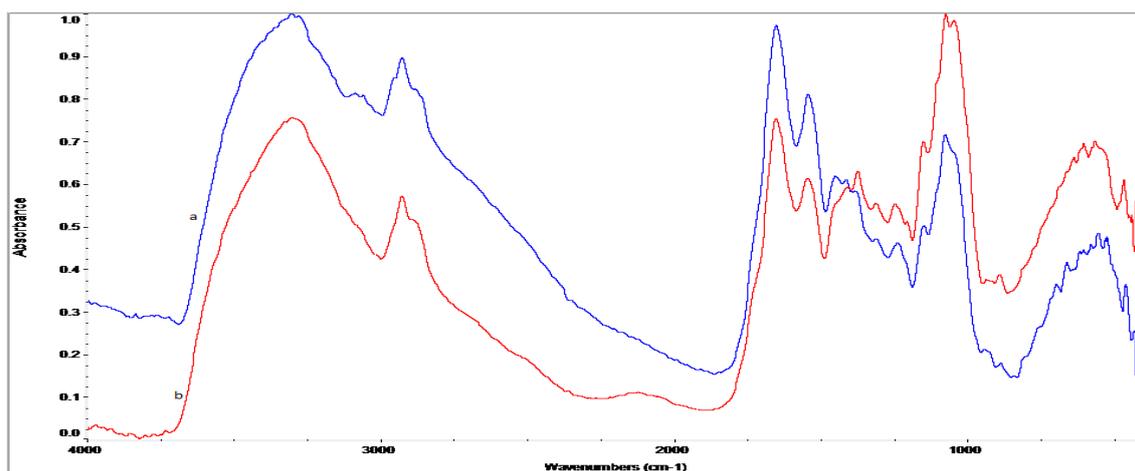


a) Sin aditivos b) Con aceite de oliva c) Con cobre

**Figura 33:** Espectros IR del basidiocarpio de *G. lucidum* cultivado en CSG con o sin aceite de oliva o cobre (segunda oleada)

Los espectros infrarrojos de las muestras provenientes de paja de arroz, son semejantes a los espectros infrarrojos de las muestras provenientes de CSG (**Figura 34**), lo que significa que las absorciones (y por ende, los grupos funcionales), son coincidentes para ambos sustratos.

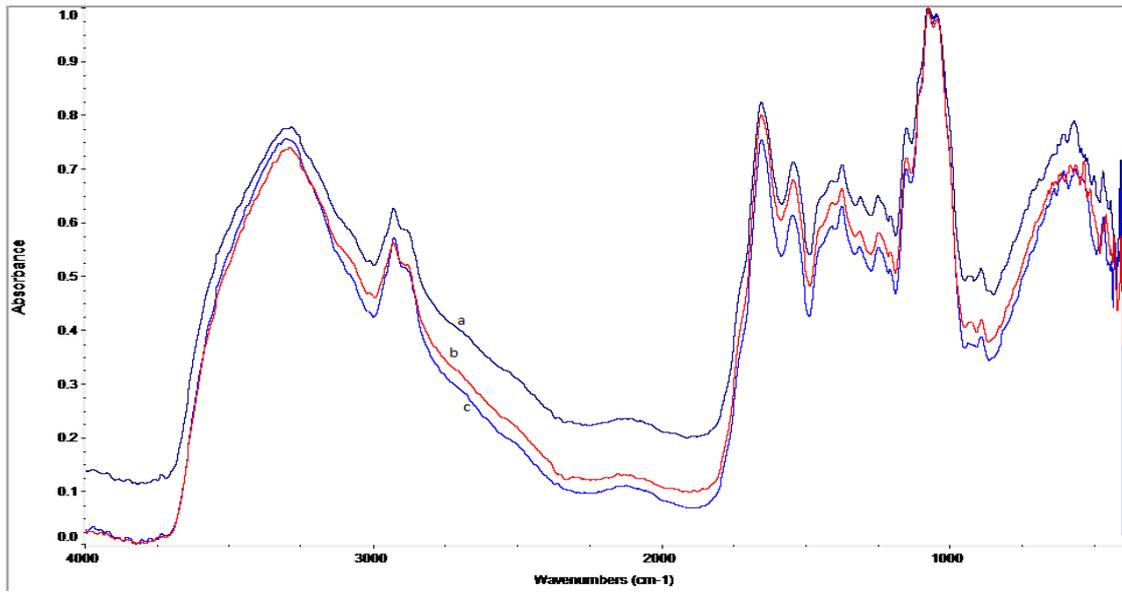
Las vibraciones de tensión  $\text{-OH}$ ,  $\text{NH-}$ ,  $\text{C-H}$ ,  $\text{C=O}$ ,  $\text{C=C}$  y  $\text{C-O}$ , sumadas a las de deformación  $\text{N-H}$  y  $\text{C-H}$ , manifiestan la presencia de alcoholes, fenoles, ácidos, aminas, amidas, alcanos, alquenos y aromáticos, que pueden en su conjunto, como en el caso anterior, pertenecer a proteínas, lípidos y sacáridos. El marcado incremento de las intensidades en las absorciones comprendidas entre  $1250$  y  $400\text{ cm}^{-1}$  para paja de arroz como sustrato permite inferir que el total de las funciones oxigenadas y nitrogenadas mencionadas, se hallan en mayor proporción que en CSG.



a) CSG b) Paja de arroz

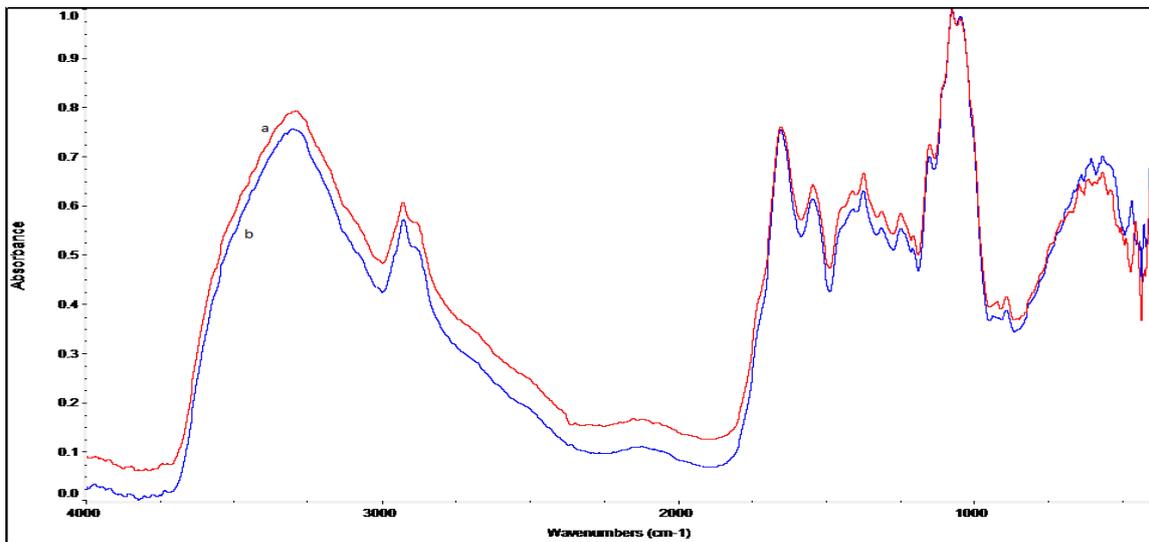
Figura 34: Espectros IR de basidiocarpos de *G. lucidum* cultivados en CSG o Paja de arroz

Para las muestras provenientes de paja de arroz como sustrato, la comparación de los espectros correspondientes a primera oleada sin suplementos, y a primera oleada con aceite y/o cobre (**Figura 35**), arroja como resultado una coincidencia plena en las bandas, tanto en su forma como en su posición, sin diferencias apreciables en las intensidades de las mismas. Esto permitiría inferir que el agregado de suplementos al sustrato de paja de arroz o el tiempo de cosecha como segunda oleada (**Figura 36**), no provoca modificaciones sustanciales sobre los grupos funcionales presentes en la estructura química del material, que sea detectable por medio de este método espectroscópico.



a) Con aceite de oliva. b) Sin aditivos. c) Con aceite de oliva y cobre

Figura 35: Espectros IR del basidiocarpo de *G. lucidum* cultivado en paja de arroz con o sin aceite de oliva o cobre (primera oleada).



a) Segunda oleada. Con aceite de oliva. b) Primera oleada. Sin suplementos.

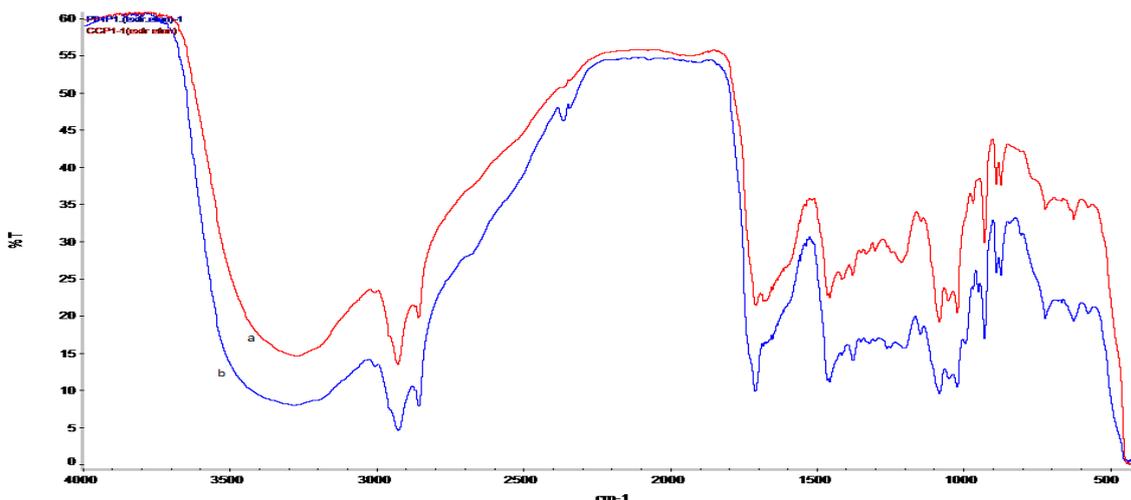
Figura 36: Espectros IR del basidiocarpo de *G. lucidum* cultivado en paja de arroz sin suplementos (primera oleada) y con aceite de oliva (segunda oleada).

Con el fin de establecer si los constituyentes químicos podían variar con relación al material seco original proveniente de cáscara de girasol y de paja de arroz, se obtuvieron los extractos etanólicos de cada uno de ellos.

La primera conclusión que surge de los espectros registrados, es que la concentración de los componentes que pasan a la fase alcohólica es muy baja, razón por la cual los valores de absorbancia resultan muy minimizados y se hace necesario mostrar los resultados en transmitancia por ciento.

Tal como se puede ver en la **Figura 37**, hay bandas intensas y bien resueltas entre 3000 y 2800  $\text{cm}^{-1}$  (tensiones C-H de alquílicos) y en 1700  $\text{cm}^{-1}$  (tensión C=O), con un ensanchamiento (sin resolución) en 1650  $\text{cm}^{-1}$  (tensión C=O de amidas y carboxilatos, deformación de enlaces N-H); permanecen las bandas entre 1200 y 1000  $\text{cm}^{-1}$  (tensiones C-O y C-N); aparecen con forma aguda e intensidad media bandas entre 1000 y 800  $\text{cm}^{-1}$  (deformaciones fuera del plano C-H) y hay una simplificación de la zona entre 750 y 500  $\text{cm}^{-1}$  (deformaciones fuera del plano C-H en anillos de sacáridos).

En términos generales, pueden asignarse entonces, funciones oxigenadas (carbonílicas e hidroxiladas) y nitrogenadas (amídicas); cadenas alquílicas e insaturaciones de tipo cíclicas y olefínicas, por lo que es posible concluir que el etanol extrae del total de componentes, aquellos con esqueleto hidrocarbonado alquílico, parcialmente insaturado que contienen funciones de tipo ácido graso y/o fenol, terpenos y/o azúcares con bajo grado de polaridad.



a) CSG b) Paja de arroz

**Figura 37:** Espectros IR del extracto etanólico de basidiocarpos cultivados en paja de arroz o CSG

### 3.4 CONCLUSIONES

Previo a esta tesis no existían estudios que analicen la composición química del basidiocarpo de *G. lucidum* cultivado en distintos sustratos con o sin diferentes aditivos bajo condiciones controladas de cultivo (cepa, temperatura, humedad, etc.). El contenido de los principales grupos de compuestos bioactivos de *G. lucidum*, triterpenoides, carbohidratos de alto peso molecular y compuestos fenólicos, y los espectros IR de los basidiocarpos indican que la composición del hongo es sensible a las condiciones de cultivo (sustrato, aditivos, momento de cosecha). Esto resalta la necesidad de estandarizar las condiciones de cultivo con el fin de asegurar una composición química reproducible entre lotes.

Por otro lado, la espectroscopia FT-IR resultó útil para la comparación cualitativa de los principales grupos funcionales presentes en el hongo y permitió diferenciar entre hongos cultivados en distintos sustratos e incluso con distintos aditivos. Sin embargo, no se pudo correlacionar la variación de la intensidad de los picos con la variación del contenido de los principales grupos bioactivos del hongo.

Por último, sería importante extender la caracterización química al micelio y las esporas para evaluar su variabilidad con las condiciones de cultivo. En cuanto a la espectroscopia FT-IR es necesario continuar el análisis de los extractos e intentar establecer correlaciones con el contenido químico para permitir una rápida evaluación de la materia prima.

# CAPÍTULO 4:

## ESTUDIO DEL POTENCIAL PREBIÓTICO DE LA FRACCIÓN DE POLISACÁRIDOS DE *Ganoderma lucidum*

### 4.1 INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 30 años los compuestos con propiedades prebióticas han suscitado un gran interés entre investigadores de ámbitos como la nutrición, la biomedicina y la industria de alimentos. A lo largo estos años se han propuesto diferentes definiciones, persistiendo todavía hoy el debate de si éstas reflejan todas las propiedades que pueden presentar los prebióticos. Gibson et al. (2004), revisaron este concepto y definieron los prebióticos como: “ingredientes que al ser fermentados selectivamente dan lugar a cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota intestinal, confiriendo beneficios tanto para la salud como para el bienestar del individuo”. Básicamente un prebiótico se define como un compuesto no digerible por el consumidor, pero que puede ser utilizado como fuente de carbono y energía por un número limitado de microorganismos; este hecho causa una modificación selectiva en la microbiota intestinal, que favorecería la salud de hospedador (Zhou et al. 2010). La mayoría de los prebióticos en el mercado son oligosacáridos con diferentes estructuras moleculares, presentes habitualmente en la dieta, como oligofruktanos de origen vegetal. Debido al gran potencial de los prebióticos en la alimentación, se han impulsado investigaciones tendientes a evaluar nuevas fuentes y compuestos con estas propiedades. Muchos estudios han propuesto el potencial de polisacáridos complejos de cadena larga. Los hongos han sido postulados como fuentes potenciales de prebióticos como quitina, hemicelulosa, glucanos, mananos, xilanos y galactanos (Aida et al. 2009; Quigley 2010). Entre los compuestos activos más estudiados se destacan los glucanos de cadena larga, incluyendo homo y hetero glucanos, con enlaces glucosídicos  $\beta$  1-3,  $\beta$ 1-4 y  $\beta$  1-6, obtenidos de hongos comestibles (Manzi y Pizzoferrato 2000). Los hongos *Ganoderma lucidum* (Reishi), *Lentinula edodes* (Shiitake) y *Pleurotus ostreatus* (Gírgola) han sido propuestos como fuentes de glucanos con efecto prebiótico (Djordjevic et al. 2009; Mohd Hamim et al. 2010). Recientemente se ha reportado el rol de polisacáridos de *G. lucidum* en la modulación de la microbiota intestinal.

El tracto gastrointestinal está habitado por una compleja comunidad de microorganismos. El colon es el principal sitio de colonización microbiana; se considera que la microbiota nativa está compuesta por más de 500 diferentes especies (Blaut et al. 2002). La composición de microorganismos intestinales se denomina “microbiota” intestinal, mientras que la totalidad de los genes de la microbiota se conoce como “microbioma”. Los genes del microbioma intestinal superan a los genes del cuerpo humano en aproximadamente 150 veces. La microbiota intestinal ha pasado de considerarse como un comensal acompañante, a ser un «órgano metabólico», con funciones en la nutrición, la regulación de la inmunidad y la inflamación sistémica (Hattori y Taylor 2009; Round y Mazmanian 2009), además de prevenir la colonización del intestino por microorganismo patógenos.

La microbiota intestinal puede ser seriamente afectada por tratamiento con antibióticos, otros medicamentos y/o la alimentación. El suministro de microorganismos eficientes que puedan recolonizar el intestino mejorando la función intestinal es una opción terapéutica y preventiva importante. El desarrollo de un suplemento dietético a base de microorganismos vivos que afecta beneficiosamente al animal huésped mejorando su equilibrio intestinal, dio lugar al término probiótico, que ha recorrido un largo camino desde los primeros conceptos propuestos por Élie Metchnikoff (1845-1916) hasta nuestro días. Según la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS), un probiótico es todo aquel microorganismo vivo que, administrado en la cantidad adecuada, proporciona beneficios a la salud del receptor (FAO/WHO, 2001). Las cepas probióticas tienen la capacidad de realizar la exclusión competitiva de patógenos, protegen el epitelio intestinal, brindan beneficios nutricionales y además participan de procesos de inmunomodulación.

Como se indicó anteriormente, el compuesto prebiótico sería selectivamente consumido por algunos microorganismos beneficiosos, generando una modificación en la microbiota intestinal. Por lo tanto, los estudios de selección de compuestos prebióticos se basan, en primera instancia, en evaluar si pueden ser utilizados por cepas probióticas. Los principales géneros de bacterias que se han estudiado como objeto de esta selección corresponden al grupo de las bacterias lácticas (BL), entre los que se reconocen numerosas cepas con capacidad probiótica, particularmente géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Zubillaga et al. 2001; Roberfroid 2002; Su et al. 2007a; Wang 2009). En los últimos años, se han extendido los estudios sobre el efecto de los prebióticos en cepas probióticas de otros grupos tales como bacterias del género *Bacillus* y levaduras (Nyangale et al. 2014).

Por último, los simbióticos se definen como una combinación de microorganismos probióticos y compuestos prebióticos. Los probióticos y prebióticos al combinarse en un simbiótico pueden tener un comportamiento sinérgico, mejorando el efecto que tienen al administrarse por separado. El uso de simbióticos como promotores de la salud está aún poco definido y los estudios son escasos. En humanos, la aplicación de simbióticos ha mostrado resultados prometedores en el tratamiento de determinadas enfermedades inflamatorias del intestino y en la inmunosenescencia ocasionada por la vejez (Quigley 2011; Jirillo et al. 2012).

#### 4.1.1 Objetivos

En nuestro conocimiento hasta la fecha no se han realizado estudios del potencial prebiótico de la fracción de polisacáridos de *Ganoderma lucidum* E 47 cultivado en CSG. Por lo tanto el objetivo de los estudios detallados en este capítulo fue determinar si los extractos de polisacáridos de *Ganoderma lucidum* cultivado en sustrato de CSG, podrían ser utilizados como fuentes de carbono y energía por cepas microbianas con propiedades probióticas.

### 4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.2.1 Obtención de extractos de polisacáridos

Como se indicó anteriormente (ver **sección 2.2.10**) los basidiocarpos de *G. lucidum* fueron secados en estufa y posteriormente molidos a hebras utilizando una picadora comercial. El basidiocarpo molido y seco se extrajo con 20 volúmenes de etanol (Dorwil) al 96%. Este tratamiento no solo permite eliminar lípidos, sino también desactivar enzimas y remover algo del material soluble, incluyendo azúcares simples, aminoácidos y fenoles. El material insoluble remanente de la extracción alcohólica se secó en estufa a 60 °C durante 24 horas y luego se extrajo con 20 volúmenes de agua destilada durante 4 horas a 80 °C, con agitación, dejando reposar a temperatura ambiente durante 20 h. Esta operación se repitió 2 veces más. Cada uno de los tres extractos se filtró con papel Whatmann (n° 41) y se reunieron en un pool. Esta fracción (E1) constituye el extracto crudo, que por las características de la extracción estará enriquecido en polisacáridos, pero también posee proteínas y carbohidratos de bajo peso molecular. El pH de E1 se determinó en 5,9, por lo que para su utilización en los cultivos se lo llevó a 6,8.

La purificación de la fracción E1 prosiguió con una desproteínización mediante el reactivo de Sevag (cloroformo:butanol 4:1, v/v). Luego se trató el extracto con  $\alpha$  amilasa (cod. A4551; Sigma) y se dializó (c.o. 14.000) durante 72 h; las primeras 48 h contra agua corriente y las últimas 24 h contra agua destilada. Los polisacáridos se aislaron por precipitación con 4

volúmenes de etanol en frío y se obtuvo un polvo (E2), de color marrón avellana, compuesto principalmente por  $\beta$ -glucanos.

#### 4.2.2 Microorganismos

En las experiencias se utilizaron cepas de bacterias lácticas provenientes de la colección del laboratorio de Microbiología Industrial y de los Alimentos de la UNS (LMIA), aislados durante estudios previos, destinados al aislamiento y selección de probióticos para uso veterinario (Sica et al. 2010; Sica et al. 2012; Lopez Cazorla et al. 2014). También se utilizaron cepas de especies probióticas aisladas de productos farmacéuticos para uso humano. En la **Tabla 20** se listan las cepas utilizadas en el estudio. Las cepas se conservaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI, Britania, Argentina) con 20% de glicerol como crioprotector. Previo a cada experiencia las cepas de bacterias lácticas fueron cultivadas en caldo Mann, Rogosa Sharpe (MRS. Biokar, Francia), *Bacillus subtilis* se cultivó en BHI y *S. boulardii* en caldo Extracto de levadura-Glucosa (YG) preparado a partir de sus componentes (2 % glucosa, 0,5% Extracto de levadura, Britania, Argentina).

**Tabla 20: Microorganismos empleados para los estudios de potencial prebiótico**

Cepa	Origen
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>Tolerans</i> F2*	LMIA
<i>Weissella viridescens</i> F4*	LMIA
<i>Weissella viridescens</i> F9*	LMIA
<i>Weissella viridescens</i> F10*	LMIA
<i>Weissella viridescens</i> F11*	LMIA
<i>Lactobacillus pentosus</i> S14*	LMIA
<i>Lactobacillus pentosus</i> S15*	LMIA
<i>Pediococcus pentosaceus</i> S17*	LMIA
<i>Pediococcus pentosaceus</i> S18*	LMIA
<i>Lactobacillus pentosus</i> S19*	LMIA
<i>Enterococcus mundtii</i> S20*	LMIA
<i>Enterococcus mundtii</i> S21*	LMIA
<i>Enterococcus mundtii</i> S20*	LMIA
<i>Bacillus subtilis</i>	Total Flora (Roux Ocefa)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	Floratil (Temis Lostalo)

\* Genbank: FJ892726 al 46, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

#### 4.2.3 Utilización del extracto crudo (E1) como medio de cultivo

En una primera etapa se intentó determinar si el extracto acuoso E1, sin ningún tipo de agregado, podía sustentar el crecimiento de las cepas indicadas en la **Tabla 20**. Cada una de las cepas se cultivó como se indica en **4.2.2** durante 24 horas a 30 °C. Cinco mililitros de cada cultivo se centrifugaron a 1.600 *g*, durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante, las células se resuspendieron en agua destilada, se agitó en vortex durante 1 minuto y se volvió a centrifugar. Esta operación se repitió 2 veces más para obtener un inóculo libre de nutrientes provenientes del medio de cultivo. La absorbancia (densidad óptica, DO) de las suspensiones se ajustó a una DO<sub>550</sub> de 0,25 (10<sup>8</sup> cél/mL) (Thermo Spectronic Genesys 20, Thermo Electron Corporation, MA, USA). Tubos con 5 ml de E1 autoclavado, (15 min a 1 atm), pH ajustado a 6,8, se inocularon con 100 µl de las suspensiones de las cepas. Los tubos se incubaron a 30 °C y diariamente se controló la aparición de turbidez comparando con controles sin inocular. Las cepas se ensayaron por triplicado. Los resultados fueron consignados como (++) : turbidez evidente dentro de las 24 h de cultivo, (+) : turbidez evidente entre las 48-72 h, (d) : turbidez débil luego de 72 h de cultivo, (-) : No se observó turbidez luego de 72 h.

#### 4.2.4 Determinación de la cinética de crecimiento de las cepas de *B. subtilis* y *S. boulardii* en el extracto E1

Para esta experiencia se seleccionaron cepas de las dos especies calificadas como probióticos de uso humano, *B. subtilis* y *S. boulardii*. Cada uno de ellas se cultivó como se indica en **4.2.2**. En esta experiencia se incluyó *Escherichia coli* ATCC 25922 que es una cepa comensal del intestino. Los inóculos se obtuvieron como se indica en **4.2.3**. En esta oportunidad, tubos Falcón con 35 ml de E1 estéril, con el pH ajustado a 6,8, se inocularon con 1 ml de la suspensión de células. Se incluyeron controles sin inocular. Cada cepa se ensayó por triplicado. Los tubos fueron incubados en forma estática en un baño termostatzado a 35 °C durante 24 hs. Periódicamente se tomaron alícuotas de 1 ml para leer la absorbancia a una longitud de onda 580 (DO<sub>580</sub>) (en la cual se determinó la menor absorción del extracto, manteniendo buena sensibilidad al recuento UFC/ml). Paralelamente en algunos tiempos se realizó el recuento de viables en placa, para corroborar las absorbancias leídas. Para lo cual se aplicó un micrométodo en multiplaca, 20 µl de la muestra se agregaron a microcubetas con 180 µl de solución fisiológica estéril, se realizaron diluciones decimales sucesivas y se sembraron en

Agar para Recuento en Placa (PCA, Merck, Alemania) por la técnica de diseminación en superficie. Las placas se incubaron a 35 °C durante 48 horas. Se contaron todas las colonias, y el resultado fue expresado como Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mililitro.

Los valores de  $DO_{580}$  se graficaron vs tiempo en un gráfico de dispersión de donde se obtuvo la recta de tendencia y la ecuación correspondiente, cuya pendiente se utilizó para determinar la constante específica de crecimiento ( $\mu$ ). A partir de la siguiente ecuación

$$\text{Ln DO}_f = \mu \cdot t + \text{Ln DO}_i$$

donde  $DO_f$  corresponde a la  $DO_{580}$  leída en el tiempo  $t$  y  $DO_i$  la  $DO_{580}$  del tiempo inicial. Por lo tanto la pendiente de la recta de tendencia obtenida será es igual a  $\mu$ . A partir de  $\mu$  se calculó el valor del tiempo de generación o duplicación:  $g = 0,69/\mu$

#### 4.2.5 Crecimiento con el extracto purificado E2

En esta experiencia se utilizó la cepa de *Bacillus subtilis*, que demostró mejor desempeño en el extracto E1 y una cepa de *E. coli*. El extracto E2, obtenido como se indica en 4.2.1, se trata de una fracción purificada conformada principalmente por polisacáridos de cadena larga con enlaces glucosídicos tipo  $\beta$ . Por lo tanto se utilizó como ingrediente en un caldo basado en el medio MRS (De Man, Rogosa y Sharpe) (De Man et al. 1960). En este caso se preparó el MRS sin ninguna fuente de carbono (Su et al. 2007b), salvo extracto de levadura a una concentración 0,05%, lo cual es la mitad de lo habitual en dicho medio (ver **Anexo II**), que en este caso debería proveer micronutrientes y factores de crecimiento. Como fuente de carbono y energía se agregó 2% de extracto E2 liofilizado (MRSE2). Los inóculos de *B subtilis* y *E. coli* provinieron de sendos cultivos de 24 h en MRS con glucosa, lavado y preparado como se indica en 4.2.3. El caldo MRSE2 estéril fue inoculado con 100  $\mu$ l de la suspensión. Los cultivos se incubaron a 35 °C durante 24 h. El crecimiento se monitoreó midiendo cada hora la densidad óptica a 580 nm. Se incluyeron cultivos con glucosa en MRS2 como control positivo y controles sin inocular. Se determinó la constante específica de crecimiento ( $\mu$ ) como se indica en 4.2.4.

### 4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por su consistencia leñosa y sabor amargo una de las formas más tradicionales para consumir los carpóforos de *G. lucidum* es mediante infusiones, que incluyen un hervor prolongado del hongo seco y molido en hebras. De este modo el consumidor bebe la fracción

acuosa, compuesta por los triterpenoides solubles en agua, proteínas, minerales y principalmente los glúcidos capaces de persistir al tratamiento térmico. Teniendo en cuenta esta forma de consumo, en una primera etapa se decidió evaluar la capacidad de este extracto, para sustentar el crecimiento de microorganismos con potencial probiótico.

#### 4.3.1 Utilización del extracto crudo (E1) como medio de cultivo

En la **Tabla 21** se muestran los resultados de la primera experiencia, donde se evaluó el potencial del extracto E1 como medio de cultivo para varias cepas con potencial probiótico. El extracto se empleó en la forma que se obtuvo, sin ningún agregado de nutrientes, ni modificación de la concentración de sus componentes.

Las cepas pertenecientes al grupo de las bacterias lácticas presentaron un comportamiento variable en el extracto E1. Una causa podría ser la baja concentración de mono y disacáridos fermentables y la imposibilidad de utilizar glúcidos de mayor tamaño. Otra posibilidad es que luego del tratamiento térmico prolongado es probable que algunos factores nutricionales como vitaminas hayan disminuido en forma significativa. Es sabido que muchos miembros de este grupo suelen presentar auxotrofias. Sin embargo, es una buena perspectiva que cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* (F2 y S19) o muy relacionadas filogenéticamente al mismo como *Weisella* (F4), y cepas del género *Pediococcus*, hayan mostrado crecimiento en E1. La cepa de *Bacillus subtilis* proveniente de un producto farmacéutico, fue la más eficiente y mostró crecimiento en las primeras 24 h de cultivo. Las características metabólicas de este género y su gran potencial enzimático probablemente le dieron ventajas sobre las demás cepas (Ludwig et al. 2009).

Tabla 21: Crecimiento de cepas probióticas en E1

Cepas	Crecimiento*
F2 <i>Lb. paracasei</i>	+
F4 <i>Weissella viridescens</i>	+
F9 <i>Weissella viridescens</i>	-
F10 <i>Weissella viridescens</i>	<b>d</b>
F11 <i>Weissella viridescens</i>	-
S14 <i>Lb. pentosus</i>	-
S15 <i>Lb. pentosus</i>	-
S17 <i>Pediococcus pentosaceus</i>	+
S18 <i>Pediococcus pentosaceus</i>	<b>d</b>
S19 <i>Lactobacillus pentosus</i>	++
S20 <i>Enterococcus mundtii</i>	-
S21 <i>Enterococcus mundtii</i>	-
<i>Sacharomyces Cereviceae var boulardii</i>	+
<i>Bacillus subtilis</i>	++

\* (++): turbidez evidente dentro de las 24 h de cultivo, (+): turbidez evidente entre las 48 y 72 h, (d): turbidez débil luego de 72 h, (-): no se observó turbidez luego de 72 h.

#### 4.3.2 Determinación de la cinética de crecimiento de cepas de *B. subtilis* y *S. boulardii* en el extracto E1

Esta experiencia tuvo el objetivo de determinar la cinética de crecimiento que las cepas ensayadas podían expresar en el extracto E1. Este estudio se realizó con dos cepas probióticas destinadas a uso humano, de las especies *B. subtilis* y *S. boulardii*. Además se incluyó *E. coli* ATCC 25922; esta cepa no patógena es parte de una especie de amplia distribución como comensal del intestino de los animales homeotermos. Las Figuras 38, 39 y 40 muestran las rectas obtenidas DO<sub>580</sub> vs tiempo. Para la determinación de la cinética, se utilizaron solo los puntos dentro de la fase exponencial para cada cepa. La Tabla 22 muestra un resumen de los resultados obtenidos en esta experiencia.

*Bacillus subtilis* y *E. coli* mostraron mayor velocidad de crecimiento en E1 que *S. boulardii*. Este hecho es lógico ya que *S. boulardii* es eucariota, y estos organismos por lo general poseen tiempos de duplicación mayores que los procariotas. La respuesta de *B. subtilis* es coincidente con lo observado en la primera experiencia.

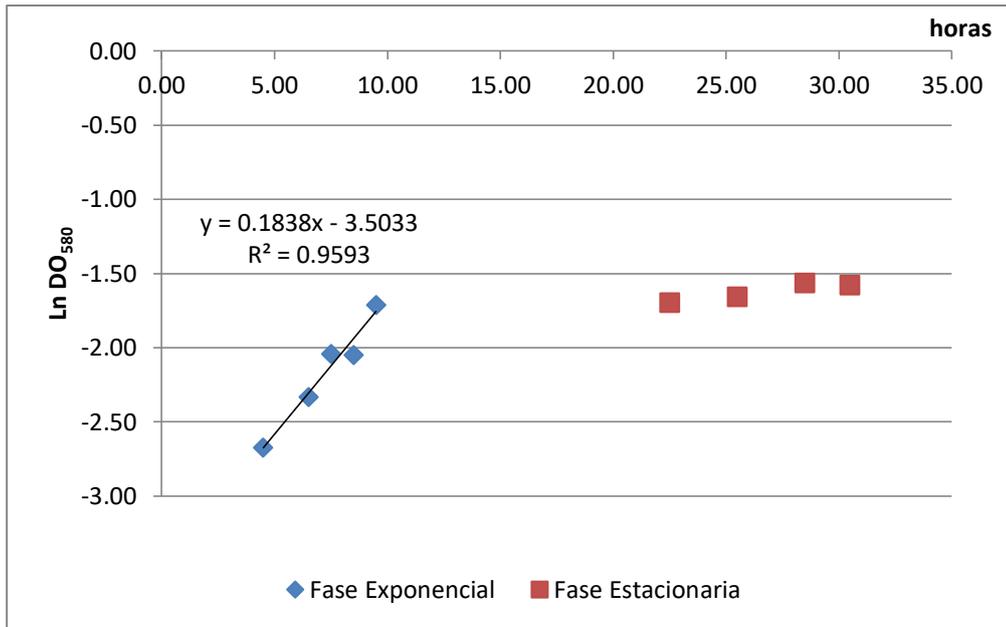


Figura 38: Crecimiento de *B. subtilis* en el extracto E1

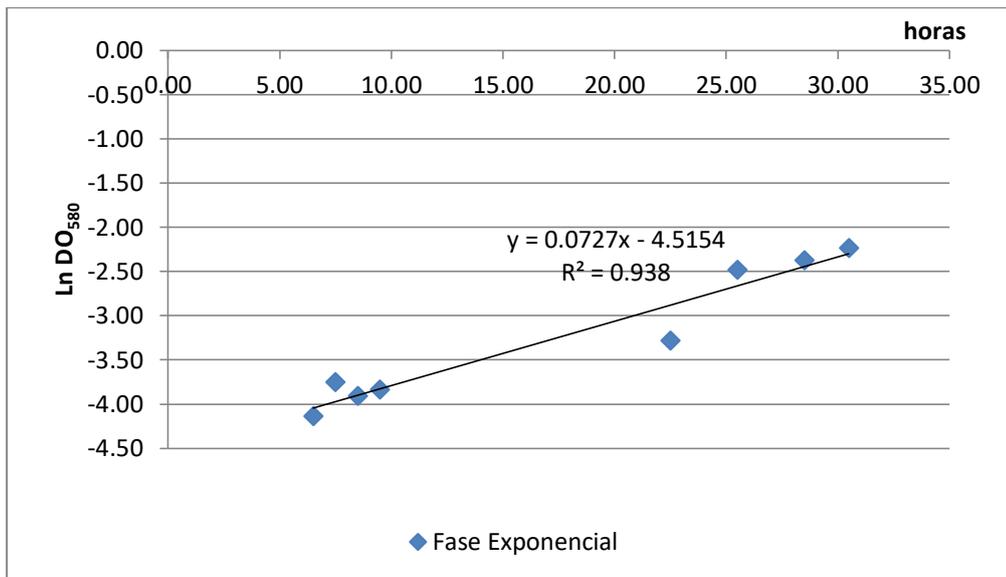


Figura 39: Crecimiento de *Saccharomyces cereviceae var boulardii* en el extracto E1

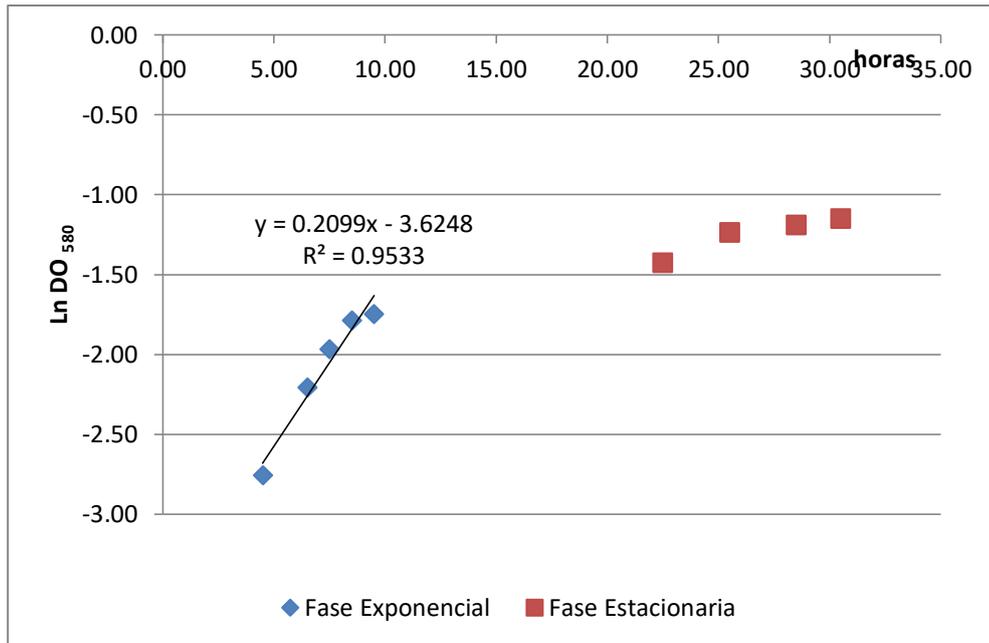


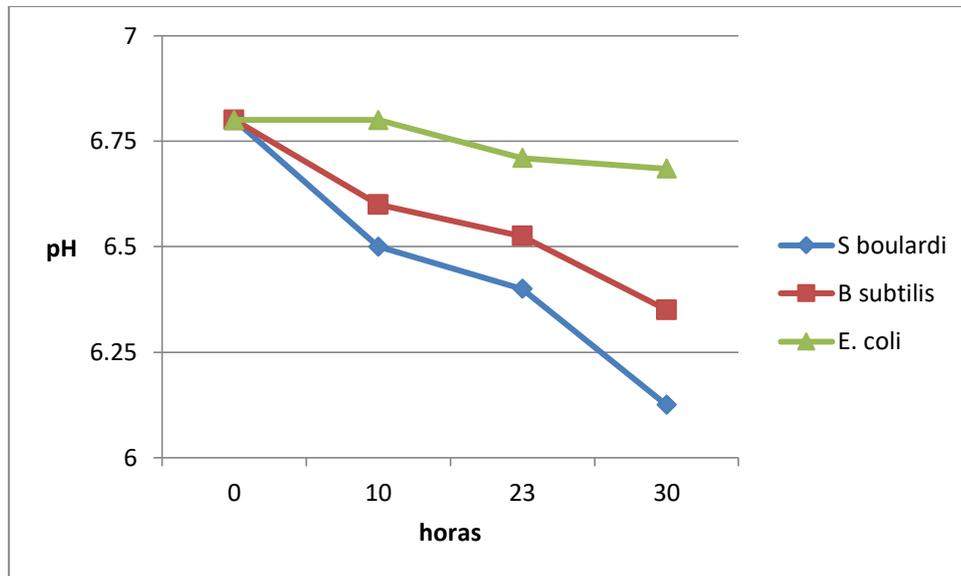
Figura 40: Crecimiento de *E. coli* en el extracto E1

Tabla 22: Parámetros de crecimiento obtenidos en el extracto E1

Cepa	$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$g$ ( $\text{h}$ )= $0,69/\mu$
<i>B subtilis</i>	0,184	3.75
<i>S. boulardii</i>	0.073	9.45
<i>E. coli</i>	0.210	3.28

La velocidades de crecimiento de *B subtilis* y *E. coli* observadas en E1 son menores a las usualmente observadas en medio nutritivos con glucosa. Este resultado probablemente sea causado por la presencia de nutrientes más complejos y/o por la necesidad de sintetizar algún factor de crecimiento ausente en el medio. El hecho de que el extracto también puede ser utilizado por un miembro habitual de la microbiota intestinal, podría verse como una pérdida de la “exclusividad” del sustrato, sin embargo, *E. coli* cumple importantes funciones en el intestino, entre ellas, la síntesis de las vitaminas K2 y B12. Además, las cepas patógenas de este grupo suelen tener perfiles metabólicos distintos. De todas formas, sería importante profundizar estos resultados en futuros estudios. Los cambios de pH detectados en el medio (Figura 41), indican que probablemente *E coli* utilizó otro tipo de nutrientes distinto a los glúcidos y/o los glúcidos que pudo utilizar eran insuficientes para sustentar el crecimiento,

optando por otras fuentes, probablemente proteicas. Tanto *B. subtilis* como *S. boulardii* generaron un cambio significativo de pH, haciendo suponer la fermentación de glúcidos.



**Figura 41:** Variaciones de pH determinadas en E1 durante el cultivo con las distintas cepas

Una opción para beneficiar directamente al desempeño de una cepa probiótica, sería que prebiótico y probiótico se consuman juntos en un simbiótico. Esto favorecería que el probiótico sea el primero en utilizar el extracto, frente a otras cepas presentes en el intestino.

#### 4.3.3 Crecimiento de *B. subtilis* con la fracción purificada E2

En la **Figura 42** se observa el crecimiento de *B. subtilis* en el MRS modificado, con el extracto purificado E2 (MRSE2) y con glucosa (MRS2). La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) obtenida en E2 es de  $0,227 \text{ h}^{-1}$ , lo cual corresponde a un tiempo de generación ( $g$ ) de 3 h. Con glucosa se determinó una  $\mu$  de  $0,58 \text{ h}^{-1}$ , que corresponde a un  $g$  de 1,20 h. Estas diferencias son razonables teniendo en cuenta la fácil asimilación de la glucosa por estos microorganismos. No se observó crecimiento de la cepa de *E. coli*, en el MRSE2, en el tiempo de la experiencia, y en el medio con glucosa se obtuvo una  $\mu$  de  $0,80 \text{ h}^{-1}$ .

El desempeño de *B. subtilis* en el cultivo con el Extracto E2, fortalece la hipótesis que esta cepa es capaz de hidrolizar los polisacáridos de cadena larga con enlaces glucosídicos  $\beta$  de la fracción acuosa de los extractos de *G. lucidum*.

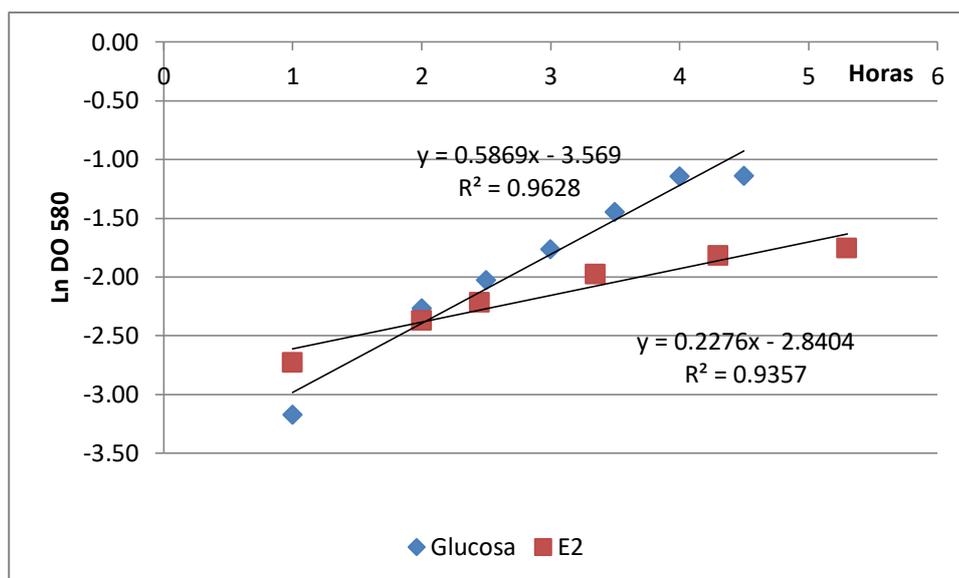


Figura 42: Crecimiento de *B. subtilis* en glucosa y E2

#### 4.4 CONCLUSIONES

La utilización del extracto crudo E1 por parte de miembros del grupo de las bacterias lácticas, con potencial probiótico, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Weissella* (cepas F2, F4, S17, y S19), así como cepas de otros organismos probióticos provenientes de productos farmacéuticos presentes en el mercado nacional (*Bacillus subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*), abre una buena perspectiva para el estudio de los extractos acuosos de *G. lucidum* cultivado en sustrato base de CSG como prebióticos. Cabe destacar que el proceso para obtener el extracto acuoso crudo es económico, puede liofilizarse (resultados no mostrados), incorporarse a los alimentos o asociarse al probiótico en un nuevo producto. La cinética de crecimiento obtenida por *B. subtilis* en el extracto purificado E2, indica que los polisacáridos de *G. lucidum* pueden ser utilizados por la cepa probiótica y generar un crecimiento aceptable comparado con la glucosa.

Estos resultados justifican y sirven de base para ampliar los estudios, los cuales son necesarios para profundizar el conocimiento sobre la utilización de los  $\beta$ -glucanos de *G. lucidum* por cepas microbianas probióticas, ampliar a mayor cantidad de cepas, evaluar los efectos sobre la actividad competitiva del probiótico frente a patógenos y determinar *in vivo* la presencia de efectos inmunomodulares en el hospedador.

# CAPÍTULO 5:

## FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA SUSPENSIÓN HIDROALCOHÓLICA

### 5.1 INTRODUCCIÓN

#### 5.1.1 Productos a base de *Ganoderma lucidum*

La Medicina Tradicional China (MTC) mantiene como uno de los ejes centrales de su filosofía, que la efectividad de una droga natural en su acción medicinal no es producto de un único componente químico claramente definido, sino que se debe a la acción sinérgica de las muchas sustancias que la componen (Williamson 2001; Rather et al. 2013). Este concepto también se aplica a la fitomedicina moderna. En muchos casos se ha observado que la potencia de los extractos naturales disminuye a medida que continúa la purificación hacia fracciones más aisladas o compuestos específicos (Carmona y Pereira 2013). Los efectos sinérgicos no solo implican una mayor efectividad y potencia, sino que también reducen los efectos adversos y evitan posibles resistencias al actuar por múltiples vías (Rather et al. 2013).

El principio de sinergia cobra especial relevancia en el caso de *Ganoderma lucidum*, por su composición compleja y por ser una de las principales especies medicinales utilizadas por los practicantes de la MTC tanto en China como en Europa (Williamson et al. 2013). Son varias las investigaciones que sugieren que al menos algunos de los efectos beneficiosos de *G. lucidum* y otros hongos medicinales se deberían a la acción conjunta de dos o más grupos de compuestos (Bishop et al. 2015). Por ejemplo, en la actividad anti-cancerígena, distintos compuestos de *G. lucidum* modulan diferentes mecanismos no relacionados entre sí (Russell y Paterson 2006). Es así como la actividad citotóxica de algunos triterpenoides (ácidos ganodéricos Z, Y, X, W, V, T; lucialdehídos A, B, C) (Wu et al. 2001; Lindequist et al. 2005) sumada a la acción inmunoestimulante, antitumoral y antimutagénica de algunos polisacáridos de alto peso molecular (Wasser 2002), sería responsable de las propiedades observadas tanto en modelos animales *in vivo* como en ensayos clínicos (Wasser 2005). La actividad antiviral de *G. lucidum* es otro ejemplo de la acción conjunta de varios compuestos sobre distin-

tas dianas. Esta acción se debería al efecto directo de moléculas de bajo peso molecular (triterpenoides como el ganoderiol F, ganodermanontriol y ácido ganodérico B) sobre las enzimas virales y la síntesis de ácidos nucleicos virales, sumado al efecto indirecto inmunomodulador de los polisacáridos (Lindequist et al. 2005)

Entre el 80 y el 85% de todos los productos de hongos medicinales son obtenidos del carpóforo (Lindequist et al. 2005). Aunque comestible, el carpóforo de *G. lucidum* es duro, leñoso y amargo. La biodisponibilidad de sus compuestos bioactivos sería poca o nulamente aprovechada por su consumo directo. Es por ello que el carpóforo se consume habitualmente en forma de infusiones. Sin embargo, para lograr una adecuada extracción de los principios activos se requieren largos tiempos de extracción con agua caliente (dos horas o más), lo que limita su consumo a solo la parte más dedicada de la población. Esta es una de las razones por la que existen en el mercado diversas formulaciones de *G. lucidum* que acercan sus propiedades benéficas al resto de la población, que de otra manera no estaría dispuesta a su consumo. Hay un gran número de productos de *G. lucidum* disponibles, variando en la parte del hongo procesada, el método de extracción y también el modo de administración (Bishop et al. 2015). Entre ellos podemos encontrar comprimidos, cápsulas, formas farmacéuticas acuosas, alcohólicas e hidroalcohólicas, y distintos tipos de presentaciones cosemecéuticas como jabones, cremas y champús (**Figura 43** y **Tabla 23**). Sin embargo, la mayoría de las presentaciones que existen en el mercado se enfocan principalmente en uno u otro grupo de compuestos. Es así que encontramos presentaciones enfocadas en los polisacáridos (comprimidos, cápsulas, polvos liofilizados) o en los triterpenoides (tinturas). Debido a las diferentes estructuras químicas y propiedades fisicoquímicas de los principales grupos bioactivos presentes en *G. lucidum*, estos compuestos son solubles en diferentes solventes, siendo por ejemplo los polisacáridos solubles en agua, mientras que los triterpenoides lo son preferentemente en solventes más apolares. La solubilidad diferencial de estos grupos de compuestos explica en parte porque es difícil encontrar en el mercado actual productos que contengan más de una fracción en una misma formulación.



Whole *Ganoderma lucidum*  
([www.hokkaido-reishi.net/](http://www.hokkaido-reishi.net/))



*Ganoderma* capsule  
([www.alohamedicinals.com/reishi-compare.htm](http://www.alohamedicinals.com/reishi-compare.htm))



*Ganoderma lucidum* slices  
([www.mikei.com/en/products.html](http://www.mikei.com/en/products.html))



Soap  
([www.dxnusa.com](http://www.dxnusa.com))



Facial care products  
([www.dxnusa.com](http://www.dxnusa.com))



Broken *Ganoderma* spores  
([www.ireishi.com](http://www.ireishi.com))



*Ganoderma* tea  
([www.online-ganoderma.com/quick\\_order\\_form.asp](http://www.online-ganoderma.com/quick_order_form.asp))



*Ganoderma* coffee  
([uk.dxnneurope.eu](http://uk.dxnneurope.eu))

Figura 43: Distintos productos a base de *Ganoderma lucidum* (Lee y Chang 2016).

**Tabla 23: Algunos productos basados en *Ganoderma* disponibles en el mercado, con sus beneficios reportados (Batra et al. 2013).**

Productos comerciales	Componentes	Beneficios
DXN <i>Ganoderma</i> (RG y GL)	Cápsulas con extractos de <i>G. lucidum</i>	Suplementos para la salud
Organo Gold <i>Ganoderma</i>	Cápsulas	Suplementos para la salud
Organo Gold <i>Ganoderma lucidum</i> mycelium capsules	Contiene extracto de micelio de <i>G. lucidum</i>	Refuerza el sistema inmune
Organo Gold organic <i>Ganoderma</i> spores capsules	Contiene extracto de polvo de espora (pared-rota) de <i>G. lucidum</i>	Refuerza el sistema inmune
Reishi mushroom powder	Extracto 100% concentrado de <i>G. lucidum</i>	Incrementa el sistema inmune
<i>Ganoderma</i> HG capsule	Contiene extracto de <i>Coriolus versicolor</i> , extracto de <i>G. lucidum</i> y polvo de esporas con pared rota	Mejora la inmunidad, previene el hígado alcohólico y el hígado graso
Reishi (Gano) immune and energy support tea	Contiene extracto de hongo <i>Ganoderma</i> y té negro	Mejora la función inmune y beneficia el sueño y la memoria
<i>Ganoderma</i> chocolate™	Contiene <i>Ganoderma</i> combinado con cacao	Incrementa el sistema inmune
<i>Ganoderma</i> 2-in-1™ classic café style black coffee	Contiene café suplementado con extractos de <i>Ganoderma</i>	Mejora la energía y la resistencia, alivia dolores musculares y de articulaciones
Ganozhi toothpaste	Contiene extracto de <i>Ganoderma</i>	----
Gano massage oil	Contiene extractos de <i>Ganoderma</i> y aceite de palma.	Mejor para lesiones leves, quemaduras y calambres

Productos comerciales	Componentes	Beneficios
Ganozhi shampoo	pH balanceado con extracto de <i>Ganoderma</i> y vitamina B <sub>5</sub>	Nutre el folículo capilar y promueve el crecimiento de nuevo cabello

### 5.1.2 Formulación de una suspensión hidroalcohólica

Al mezclar en partes iguales un extracto acuoso con otro alcohólico de *G. lucidum*, parte de los compuestos presentes en las soluciones originales precipita, ya que no son solubles en la mezcla hidroalcohólica resultante. Esta fracción insoluble podría eliminarse por filtración o directamente realizando la extracción con solventes hidroalcohólicos (“tinturas”). Sin embargo, cualquiera de estas dos opciones no ponderaría una cantidad indeterminada de compuestos que podrían tener influencia sobre la efectividad del producto final. Una opción que permitiría conservar a este grupo de compuestos sería mediante la formulación de una suspensión hidroalcohólica por el agregado de un agente viscosante. La Farmacopea Internacional en su cuarta edición (World Health Organization 2006), define a una suspensión oral como “preparaciones líquidas para uso oral que contienen uno o más ingredientes activos suspendidos en un vehículo apropiado. Para suspensiones orales que contienen más de un ingrediente activo, algunos de los de ellos pueden estar en solución”. En este caso la formulación estaría formada por un vehículo hidroalcohólico, un agente estabilizante de la suspensión, los compuestos de *G. lucidum* solubles en la mezcla hidroalcohólica y los compuestos insolubles en la mezcla suspendidos de manera homogénea en el vehículo. La dispersión homogénea de los compuestos insolubles es fundamental para asegurar la uniformidad de contenido (Barker 2013). Los agentes estabilizantes de la suspensión suelen ser agentes viscosantes que impiden o retrasan la sedimentación de los compuestos insolubles dispersos (Alonso González 1999). Al momento de formular una suspensión se deben considerar dos factores: la velocidad de sedimentación y la redispersabilidad del sedimento (Barker 2013). Una baja velocidad de sedimentación sería óptima; sin embargo, la redispersabilidad del sedimento es más importante para asegurar una exactitud de dosis reproducible.

En el caso de la formulación de una suspensión hidroalcohólica de *G. lucidum* es importante contar con un agente espesante que sea compatible tanto con el agua como el alcohol. Los Carbomer® (o Carbopol®) son polímeros reticulados del ácido poliacrílico que tienen la capacidad de absorber y retener agua. Los códigos de Carbomer (934, 934P, 940, etc.) son indicativos de su peso molecular y componentes específicos del polímero. Carbomer® tiene la capacidad de formar geles tanto en agua, como en alcohol o una mezcla de ambos, por lo

que resulta un agente con gran potencial para ser utilizado en la formulación de una suspensión hidroalcohólica de *G. lucidum*.

### 5.1.3 Objetivo

Evaluar la formulación de un producto físicamente estable, que contenga la mayor cantidad de compuestos bioactivos del basidiocarpo de *G. lucidum* disueltos o suspendidos de manera homogénea en el vehículo.

### 5.1.4 Objetivos particulares

1. Caracterizar dos extractos del carpóforo de *Ganoderma lucidum*, uno acuoso y otro alcohólico, y cuantificar la cantidad de compuestos de cada grupo que precipita en una mezcla 1:1 de estos extractos.
2. Comparar el producto final, una suspensión hidroalcohólica de administración oral, con un extracto hidroalcohólico y una infusión acuosa evaluando diferencias cuantitativas en la composición que puedan justificar el procesado extra de la formulación.
3. Estudiar la formulación y estabilidad física de la suspensión hidroalcohólica, seleccionando la concentración adecuada de Carbomer® 940.

## 5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.2.1 Extracción alcohólica

Para obtener los extractos alcohólicos se maceró una cantidad determinada de basidiocarpo seco y molido, obtenido en la primera oleada de un cultivo en cáscara de semilla de girasol sin aditivos (ver **Capítulo 2**), con 20 volúmenes de etanol (Dowil, 96%) durante 24 horas. El extracto alcohólico se recuperó por centrifugación y se filtró con papel de filtro tipo Whatman (n° 41). Una parte del extracto se utilizó para la obtención de la mezcla hidroalcohólica y el resto se almacenó a -18 °C para posteriores determinaciones. El marco sólido remanente se conservó para realizar la extracción acuosa. Los extractos alcohólicos se prepararon por cuadruplicado.

### 5.2.2 Extracción acuosa

El marco remanente de la extracción alcohólica se secó en estufa a 60 °C durante 24 horas. La extracción se realizó con 20 volúmenes de agua destilada, calentando a 80 °C, con agitación moderada, durante 4 horas. Luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante

20 horas. El extracto acuoso se recuperó por centrifugación y se filtró con papel de filtro tipo Whatman (n° 41). Una parte del extracto se utilizó para la obtención de la mezcla hidroalcohólica, y el resto se almacenó a -18 °C para posteriores determinaciones. Los extractos acuosos se obtuvieron por cuadruplicado.

### **5.2.3 Extracción hidroalcohólica**

Una cantidad determinada de basidiocarpo seco y molido, obtenido en la primera oleada de un cultivo en cáscara de semilla de girasol sin aditivos, se extrajo con 20 volúmenes de una mezcla (1:1) de agua destilada y etanol (96%), por digestión a 80 °C, con agitación moderada, durante 4 horas. A continuación se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 horas. El extracto se separó del marco por centrifugación, se filtró con papel de filtro tipo Whatman (n° 41) y se almacenó a -18 °C para posteriores determinaciones. La extracción hidroalcohólica se realizó por cuadruplicado.

### **5.2.4 Preparación de la infusión**

Para preparar la infusión se agregaron 20 partes de agua destilada a una cantidad determinada de basidiocarpo seco y molido, obtenido en la primera oleada de un cultivo en cáscara de semilla de girasol sin aditivos, y se calentó a 80 °C durante dos horas. A continuación se clarificó por centrifugación y filtración con papel de filtro tipo Whatman (n° 41). Las infusiones se obtuvieron por cuadruplicado.

### **5.2.5 Obtención de la mezcla hidroalcohólica**

La mezcla hidroalcohólica se obtuvo por combinación de los extractos alcohólicos y acuoso en una relación 1:1. Se dejó en reposo un par de horas y se observó la aparición de un precipitado insoluble. La mezcla se clarificó por centrifugación y se almacenó a -18 °C para posteriores determinaciones. El sedimento se secó en estufa a 60 °C durante 24 horas y se conservó para su redisolución. Las mezclas hidroalcohólicas se realizaron por cuadruplicado.

### **5.2.6 Redisolución del precipitado insoluble de las mezclas hidroalcohólicas**

El sedimento insoluble en la mezcla hidroalcohólica, previamente secado, se redisolvió en agua destilada utilizando un volumen equivalente al que se encontraba disuelto originalmente. La porción insoluble en agua se recuperó por centrifugación y se secó en estufa a 60 °C durante 24 horas. Este precipitado insoluble en agua se disolvió en un volumen de etanol 96° equivalente al volumen original, observándose la completa disolución del mismo.

De esta forma se obtuvieron dos soluciones, una acuosa y otra alcohólica, por cada réplica de la mezcla hidroalcohólica. Estas soluciones contienen los compuestos insolubles en la mezcla de los extractos en proporción 1:1, en una concentración igual a la del extracto original.

### 5.2.7 Caracterización química

Se realizaron las siguientes determinaciones en el extracto acuoso, extracto alcohólico, extracto hidroalcohólico, infusión, mezcla hidroalcohólica, solución de compuestos insolubles en la mezcla y solubles en agua y solución de compuestos insolubles en la mezcla y solubles en etanol.

#### 5.2.7.1 *Residuo sólido*

El contenido de residuo sólido se determinó por evaporación del solvente en estufa a 60 °C hasta peso constante. La determinación se realizó por triplicado.

#### 5.2.7.2 *Contenido de triterpenoides totales*

Los triterpenoides totales se cuantificaron de acuerdo a lo descrito en la **sección 3.2.4**. La determinación se realizó por cuadruplicado.

#### 5.2.7.3 *Contenido de carbohidratos de alto peso molecular*

Esta determinación se realizó solo para los extractos o soluciones acuosas e hidroalcohólicas, y no se realizó para los extractos o soluciones alcohólicas.

Para valorar el contenido de carbohidratos de alto peso molecular se tomó una alícuota conocida de muestra y se dializó durante 3 días con membrana de diálisis (c.o. 14.000 MW) contra agua corriente (dos días) y agua destilada (un día) para los extractos acuosos, o contra una solución de etanol (96°):agua (1:1) para los extractos hidroalcohólicos.

La determinación se realizó de acuerdo al protocolo detallado en la **sección 3.2.6**. La determinación se realizó por cuadruplicado.

#### 5.2.7.4 *Contenido de compuestos fenólicos*

La cuantificación de compuestos fenólicos se realizó de acuerdo a lo descrito en la **sección 3.2.7**. La determinación se realizó por cuadruplicado.

### 5.2.8 Formulación de la suspensión hidroalcohólica

Para obtener las suspensiones hidroalcohólicas se utilizó un extracto alcohólico y un extracto acuoso preparados con se describió previamente (**secciones 5.2.1 y 5.2.2**). Para estabilizar la suspensión se probaron cuatro concentraciones distintas de Carbomer® 940 (0,1%, 0,3%, 0,5% y 1,0%). Se tomaron 50 mL del extracto acuoso y se agregó lentamente Carbomer® en cantidad suficiente para alcanzar la concentración deseada en el producto final. Se agitó bien para favorecer una distribución homogénea y se dejó reposar al menos una hora. A continuación se agregó lentamente y manteniendo agitación, 50 mL del extracto alcohólico para obtener la suspensión hidroalcohólica final. Las suspensiones hidroalcohólicas estabilizadas se almacenaron en frascos de vidrio color caramelo de 200 mL a temperatura ambiente.

### 5.2.9 Viscosidad

El efecto de las distintas concentraciones de Carbomer® 940 sobre la viscosidad dinámica de las suspensiones hidroalcohólicas se determinó en un reómetro rotacional Paar Physica modelo MCR301 (Anton Paar GmbH, Austria), usando una geometría de platos paralelos (diámetro 50 mm, separación 2 mm), con control de temperatura. Se colocó una alícuota de la suspensión en el plato inferior del reómetro. El plato superior se hizo descender hasta la muestra y se removió el exceso de la misma. La viscosidad dinámica se midió a 20 °C para una tasa de corte de entre 1 y 100 1/s. Estas determinaciones se realizaron en el Área de Ingeniería de Alimentos de la Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI) bajo la supervisión del Dr. Diego Genovese.

### 5.2.10 Sedimentación acelerada

Se realizó una prueba acelerada de la estabilidad de la suspensión evaluando el efecto de la fuerza centrífuga sobre la misma. Se colocaron 10 mL de cada muestra en un tubo de vidrio y se centrifugó durante 1 min (Labofuge 200, Kendra, Alemania), a mayores  $g$  cada vez, buscando signos visibles de sedimentación. La aparición de sedimentación se evaluó visualmente de acuerdo a la siguiente escala: (-) no hay sedimentación visible, (+/-) ligera sedimentación, (+) sedimentación que se redispersa fácilmente con agitación moderada, (++) marcada sedimentación que redispersa con agitación moderada, (+++) marcada sedimentación que no redispersa con agitación moderada.

### 5.2.11 Estabilidad física de la suspensión

La estabilidad física de la suspensión se evaluó a los 3, 11 y 60 días. El comportamiento de sedimentación se midió como la relación entre la altura del sedimento ( $h_s$ ) y la altura original de la suspensión ( $h_0$ ) para 15 mL de suspensión guardados en tubos de vidrio de fondo plano de 15 mL y 5 cm de altura (Barker 2013).

### 5.2.12 Análisis de datos

Los datos de los ensayos fueron analizados por análisis de varianza de un factor (ANOVA). La separación de los valores medios se realizó mediante el test de Tukey. Para realizar las comparaciones los resultados se agruparon en contenido teórico o esperado de la mezcla (contenido en el extracto alcohólico + contenido en el extracto acuoso) y contenido real de la mezcla (contenido en la mezcla hidroalcohólica + contenido en la solución de precipitado insoluble en la mezcla y soluble en agua + contenido en la solución de precipitado insoluble en la mezcla y soluble en etanol). Diferencias estadísticamente significativas entre el contenido esperado y real de las mezclas, indicarían posibles errores durante su preparación. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el desvío estándar de un volumen equivalente a 10 mL del extracto original. Es necesario tener en cuenta que en el caso de las mezclas, durante su preparación se produce una dilución a la mitad (el contenido de 10 mL del extracto original se encuentra en 20 mL de la mezcla), por lo que, a fines comparativos, los gráficos se refieren al contenido en 20 mL de mezcla. Los análisis se efectuaron utilizando el software Infostat.

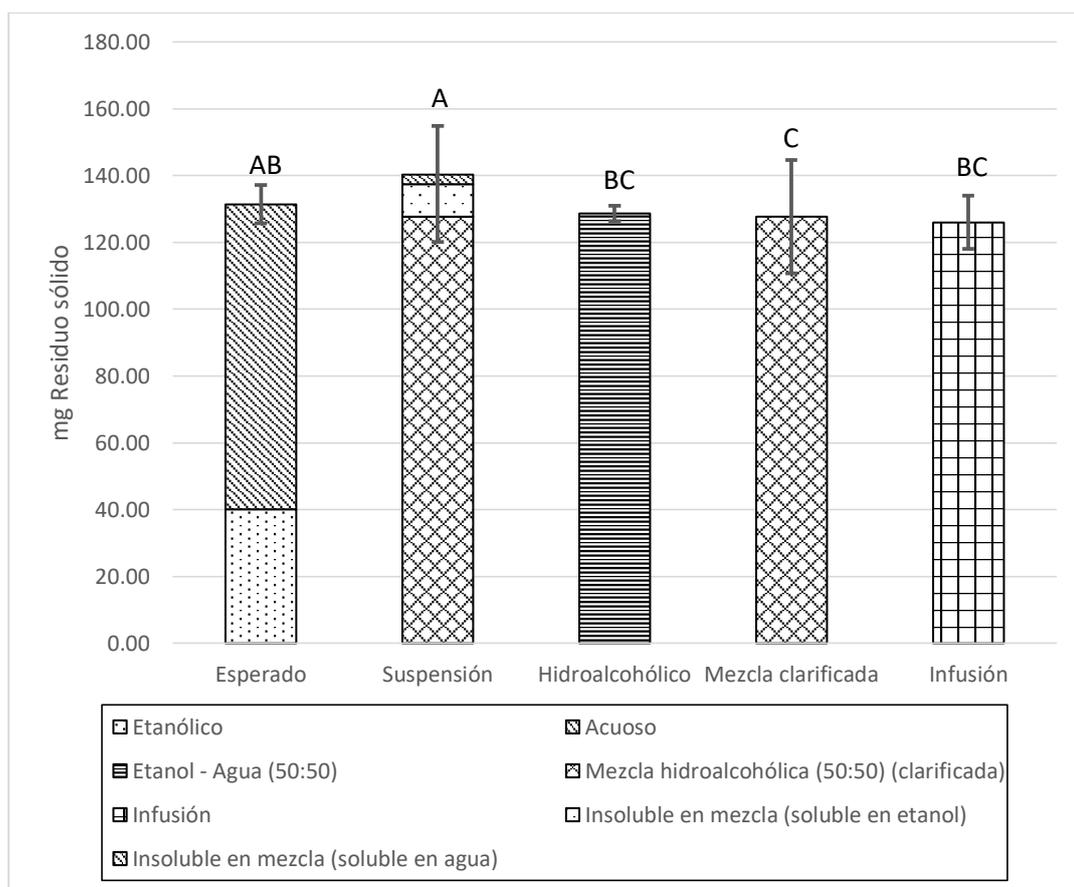
## 5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El proceso propuesto, en trámite de patentamiento, para la obtención de la suspensión hidroalcohólica de *G. lucidum*, comienza con la maceración del basidiocarpo seco y molido con una cantidad apropiada de alcohol 96% durante 24 horas hasta asegurar la mayor extracción de compuestos posible. A continuación se realiza una decocción con un volumen apropiado de agua, calentando durante 4 horas para asegurar la mayor extracción de compuestos posible. Finalmente se mezclan ambos extractos, previamente filtrados para eliminar partículas remanentes de la extracción, en proporciones iguales, agregando como agente viscosante Carbomer® 940 en una concentración adecuada para asegurar la estabilidad de la suspensión formada.

### 5.3.1 Contenido de residuos sólidos

El residuo sólido representa el contenido total de compuestos presentes en los extractos y las formulaciones. En la **Figura 44** se compara el valor esperado de residuo sólido en 20 mL de las mezclas (1:1) o 10 mL de los extractos originales. El extracto acuoso aporta casi el 70% de los compuestos totales presentes en la mezcla final. Por otro lado, al mezclar ambos extractos en partes iguales, alrededor del 9% de los compuestos totales presentes en uno u otro extracto, precipitan. Aunque pequeña, esta fracción de compuestos insolubles es estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) y es responsable del fuerte enturbiamiento observado al realizar la mezcla. De los compuestos que precipitan, la mayor parte (77%) proviene del extracto alcohólico.

No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los contenidos de residuo seco del extracto hidroalcohólico, la infusión y la mezcla clarificada, pero el contenido de los tres fue ligeramente menor ( $p < 0,05$ ) que el de la suspensión.



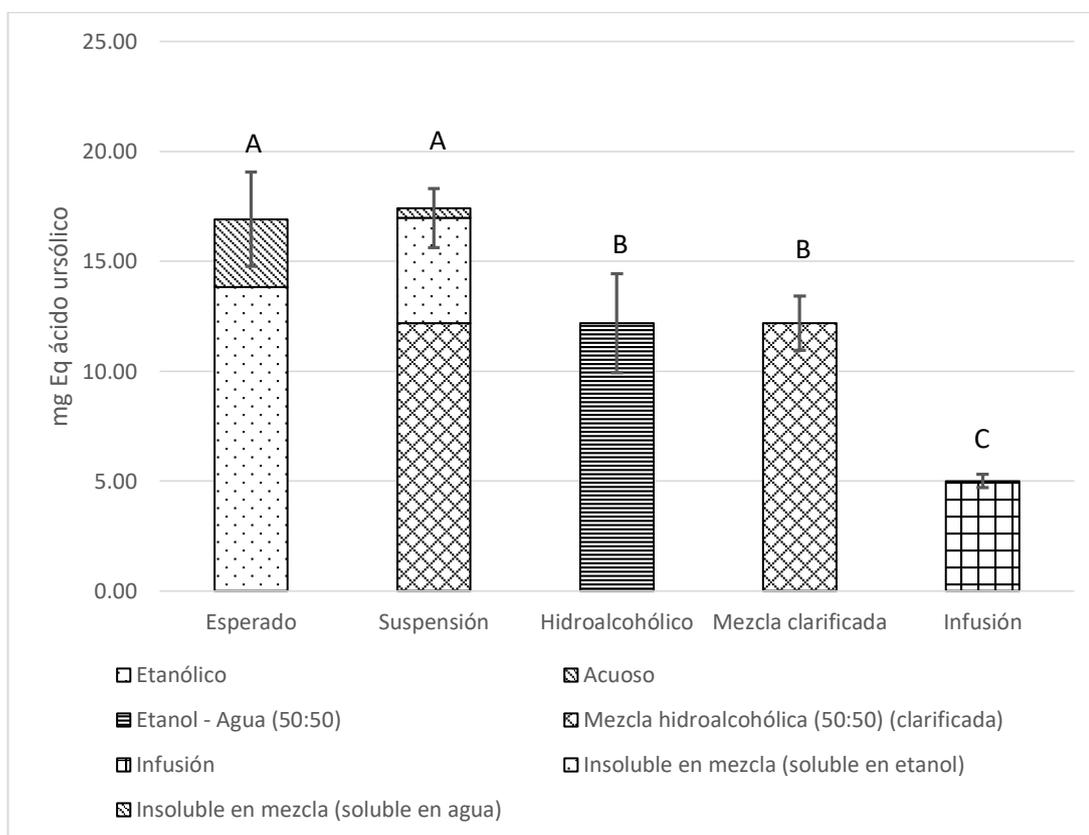
En las mezclas se considera un volumen de 20 mL para compensar el efecto de dilución a la mitad propio la preparación. Valores con una misma letra no difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p > 0,05$ ).

**Figura 44:** Contenido de residuo sólido en un volumen equivalente a 10 mL del extracto original de distintos extractos y preparaciones.

### 5.3.2 Contenido de triterpenoides totales

La **Figura 45** muestra el contenido de triterpenoides totales en 20 mL de las mezclas (1:1) o 10 mL de los extractos originales. El extracto alcohólico fue el responsable del mayor aporte de triterpenoides a la mezcla (más del 80%). Por otro lado, alrededor de un 30% de los triterpenoides, la mayoría proveniente del extracto alcohólico, no son solubles en soluciones hidroalcohólicas y precipitaron al realizar la mezcla. Además, del total de compuestos que precipitan durante la mezcla, los triterpenoides representaron más del 40% del total. Estos resultados implican que una alta proporción de los triterpenoides totales, uno de los principales grupos bioactivos de *G. lucidum*, se perdería durante la clarificación de la mezcla.

Se observaron también diferencias significativas en el contenido de triterpenoides totales del extracto hidroalcohólico y la infusión. El contenido de ambos fue menor ( $p < 0,05$ ) que el de la suspensión hidroalcohólica, y a su vez el de la infusión fue un 58% menor ( $p < 0,05$ ) que el del extracto hidroalcohólico.



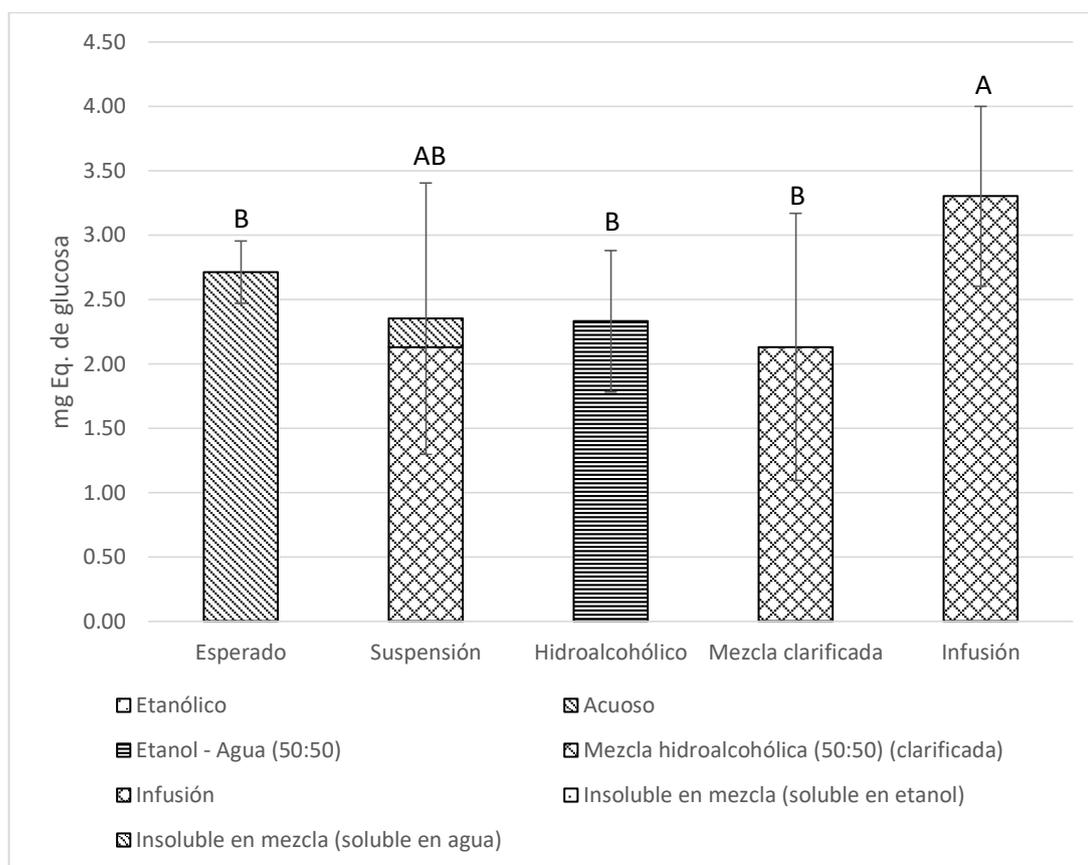
En las mezclas se considera un volumen de 20 mL para compensar el efecto de dilución a la mitad propio la

preparación. Valores con una misma letra no difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p > 0,05$ ).

**Figura 45: Contenido total de triterpenoides en un volumen equivalente a 10 mL del extracto original de distintos extractos y preparaciones.**

### 5.3.3 Contenido de carbohidratos de alto peso molecular

La **Figura 46** muestra el contenido de carbohidratos del alto peso molecular en 20 mL de las mezclas (1:1) o 10 mL de los extractos originales. Los carbohidratos de alto peso molecular corresponden principalmente a polisacáridos y proteoglucanos. La cantidad de carbohidratos de alto peso molecular que precipitan por la mezcla (1:1) de los extractos acuosos y alcohólicos no fue estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ). En cuanto a la comparación de los distintos extractos y preparación, la infusión mostró un contenido significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que el extracto hidroalcohólico y la mezcla clarificada.

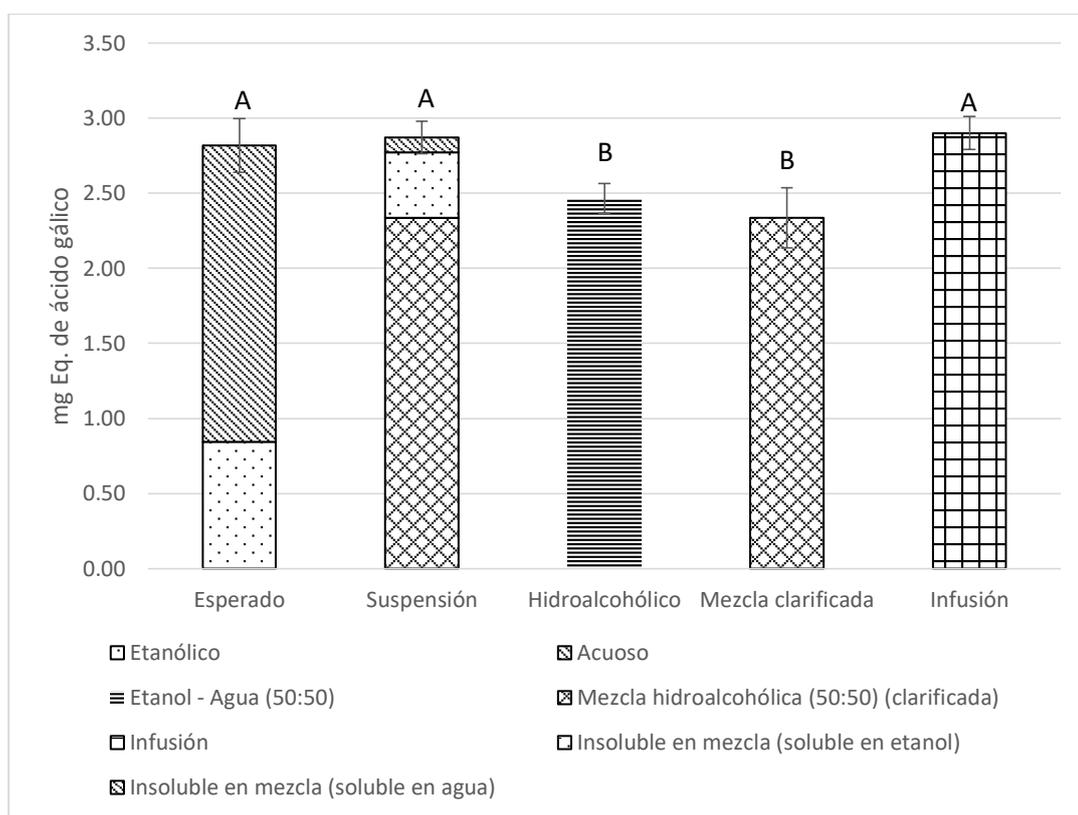


En las mezclas se considera un volumen de 20 mL para compensar el efecto de dilución a la mitad propio la preparación. Valores con una misma letra no difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p > 0.05$ ).

Figura 46: Contenido de carbohidratos de alto peso molecular en un volumen equivalente a 10 mL del extracto original de distintos extractos y preparaciones.

### 5.3.4 Contenido de compuestos fenólicos

El contenido de compuestos fenólicos en 20 mL de las mezclas (1:1) o 10 mL de los extractos originales se muestra en la **Figura 47**. El extracto acuoso aportó la mayor cantidad, alrededor del 70%, de compuestos fenólicos a la mezcla (1:1). Casi el 19% de los compuestos fenólicos precipitaron al realizarse la mezcla siendo este valor estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ). De los compuestos fenólicos que precipitaron, la mayor parte (81%) pertenecían al extracto alcohólico. Por otro lado el contenido de compuestos fenólicos en el extracto hidroalcohólico fue menor al contenido en la suspensión, pero no se observaron diferencias entre la suspensión y la infusión.



En las mezclas se considera un volumen de 20 mL para compensar el efecto de dilución a la mitad propio la preparación. Valores con una misma letra no difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Figura 47: Contenido de compuestos fenólicos totales en un volumen equivalente a 10 mL del extracto original, de distintos extractos y preparaciones.

### 5.3.5 Sedimentación acelerada, estabilidad de la suspensión y reología

La caracterización química de los extractos y las preparaciones mostró que una cantidad apreciable de los triterpenoides y compuestos fenólicos, dos de los principales grupos bioactivos de *G. lucidum*, se pierden durante la preparación y clarificado de una mezcla (1:1) de los extractos acuoso y alcohólico. Esta pérdida puede evitarse mediante la formulación de una suspensión que mantenga a estos compuestos dispersos de manera homogénea en el preparado. La suspensión puede lograrse mediante el agregado de un agente viscosante. En este caso se evaluaron los efectos de distintas concentraciones de Carbomer® 940 (0,1, 0,3, 0,5 y 1%) sobre la estabilidad y reología de la suspensión.

Los estudios de sedimentación acelerada permiten predecir rápidamente la estabilidad de la suspensión en el tiempo. En la **Tabla 24** se muestra la estabilidad acelerada de las suspensiones hidroalcohólicas estabilizadas con distintas concentraciones de Carbomer® 940. Para una concentración de 1% no se observaron cambios en la suspensión para todas las fuerzas g evaluadas.

**Tabla 24:** Aspecto de una suspensión hidroalcohólica con distintas concentraciones de Carbomer® 940 luego de la aplicación de una fuerza centrífuga durante 1 minuto

g	Concentración de Carbomer® 940			
	0,10%	0,30%	0,50%	1,00%
114,5	++	-	-	-
144,9	++	+/-	-	-
178,9	++	+/-	-	-
216,4	++	+/-	+/-	-
257,6	+++	+/-	+/-	-
302,3	+++	+	+/-	-
350,6	+++	+++	+/-	-
402,5	+++	+++	+/-	-
547,8	+++	+++	++	-

(-) no hay sedimentación visible, (+/-) ligera sedimentación, (+) sedimentación que se redispersa fácilmente con agitación moderada, (++) marcada sedimentación que redispersa con agitación moderada, (+++) marcada sedimentación que no redispersa con agitación moderada.

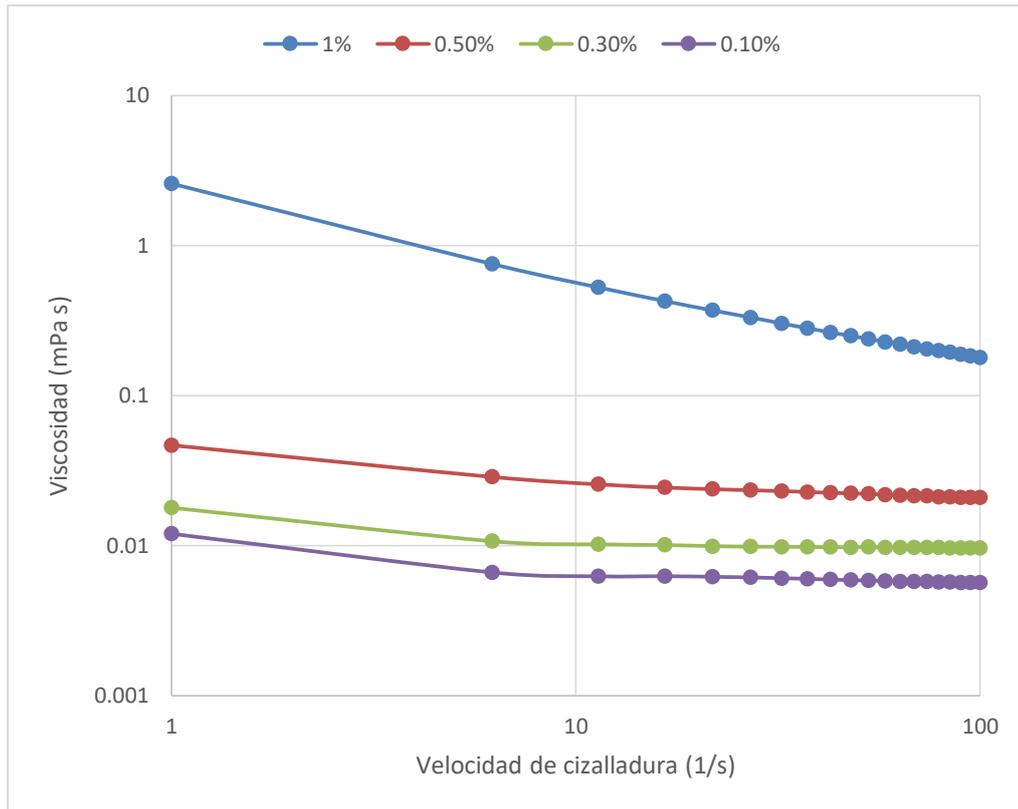
La **Tabla 25** muestra la altura de sedimentación en las suspensiones con distintas concentraciones de Carbomer® 940 en 3, 11 y 60 días desde su preparación. Para una concentración de 0,1% se observó una rápida sedimentación de las partículas en suspensión, que fue total en menos de 3 días. En el otro extremo, para una suspensión estabilizada con 1%

de Carbomer® 940 no se observó sedimentación apreciable en el periodo estudiado (60 días). Para el resto de las concentraciones estudiadas se produjo sedimentación completa de las partículas en suspensión antes de los 60 días desde la preparación pero, para las concentraciones 0,3 y 0,5% el sedimento se resuspendió fácilmente con agitación leve a moderada. Sin embargo, para una concentración de 0,1% se requirió una agitación vigorosa para lograr una adecuada resuspensión del sedimento.

**Tabla 25: Altura de sedimentación relativa de una suspensión hidroalcohólica con distintas concentraciones de Carbomer® 940 a los 3, 11 y 60 días desde su preparación.**

Concentración	Altura de sedimentación relativa ( $h_s/h_0$ )		
	3 días	11 días	60 días
<b>0,10%</b>	0,2	0,2	0,2
<b>0,30%</b>	0,84	0,3	0,2
<b>0,50%</b>	0,9	0,56	0,2
<b>1,00%</b>	1	1	1

Los estudios reológicos de las suspensiones con distintas concentraciones de Carbomer® 940 (**Figura 48**) muestran un comportamiento no Newtoniano del tipo pseudo-plástico. Este comportamiento es el ideal para la formulación de una suspensión ya que presenta alta viscosidad a bajas velocidades de cizalladura (durante almacenamiento), y baja viscosidad a altas velocidades de cizalladura (durante agitación) (Swarbrick et al. 2013). La viscosidad aumentó exponencialmente con la concentración de Carbomer® 940 ( $\log(\eta) = -0,3894x + 0,1603$ ,  $R^2 = 0,9981$ ) y se correlacionó directamente con la estabilidad de la suspensión.



**Figura 48: Viscosidad dinámica de una suspensión hidroalcohólica con diferentes concentraciones de Carbomer® 940.**

La suspensión obtenida con el agregado de 1% de Carbomer® 940 fue la que mayor estabilidad mostró a lo largo del tiempo; sin embargo, la formulación presenta una viscosidad elevada que dificulta el flujo desde el envase contenedor. Por otro lado, la formulación con 0,5% de Carbomer® 940 mostró una viscosidad más adecuada para su administración, y si bien se observó sedimentación completa en menos de dos meses, las partículas del sedimento pudieron resuspenderse fácilmente con agitación moderada. Entonces, se estableció que una concentración de entre 0,5 y 1% de Carbomer® 940 es adecuada para obtener una suspensión hidroalcohólica de *G. lucidum* estable y de fácil administración.

## 5.4 CONCLUSIONES

Con el fin de obtener una formulación nutracéutica que contenga la mayor parte de compuestos bioactivos de *G. lucidum* se mezclaron dos extractos del hongo, uno alcohólico y otro acuoso. Aproximadamente el 9% de los compuestos presentes en los extractos originales no son solubles en la mezcla hidroalcohólica resultante y precipitan. Este precipitado incluye al 30% de los triterpenoides totales, y al 19% de los compuestos fenólicos, presentes

en los extractos originales. Ambos grupos de compuestos son importantes en la actividad biológica del hongo, por lo que es interesante conservarlos en la formulación final del producto nutracéutico. Es por ello que se estabilizó la mezcla resultante con el agregado de un agente viscosante, Carbomer® 940, para obtener una suspensión hidroalcohólica de *G. lucidum*. Estudios de la estabilidad y de la reología de las suspensiones, mostraron que una concentración de Carbomer® 940, entre 0,5 y 1% es adecuada para obtener una dispersión homogénea de los compuestos insolubles por agitación leve a moderada, con una viscosidad adecuada para su administración oral. Finalmente, la formulación propuesta permitió conservar mayor contenido de triterpenoides y de compuestos fenólicos frente a presentaciones tradicionales como el extracto hidroalcohólico (“tinturas”) o infusiones.

## CAPÍTULO 6:

# CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

El trabajo de investigación realizado en el marco de esta Tesis permitió optimizar el rendimiento de un cultivo de *Ganoderma lucidum* en un sustrato a base de cáscara de semilla de girasol. Esto se logró mediante el agregado de aditivos, aceite de oliva y cobre (II), al sustrato. La adición de 60 ppm de Cu (II) junto con 1,5% de aceite de oliva aumentó el rendimiento del cultivo y redujo el tiempo hasta la primera cosecha a solo 28 días. Los resultados obtenidos sugieren que el aceite de oliva estimuló el desarrollo del micelio mientras que el Cu (II) aceleró su crecimiento. Si bien el Cu (II) probablemente actúa por estimulación de las enzimas lacasas, son necesarios nuevos estudios para comprender los mecanismos de acción de estos aditivos sobre el crecimiento de *G. lucidum*.

Se ha desarrollado y escalado el protocolo para el cultivo de Reishi en forma controlada, con insumos locales de bajo costo y óptimo rendimiento para producir un alimento funcional de alto valor, sin el agregado de ningún agroquímico, logrando así, una producción orgánica y sustentable. El manejo optimizado de la tecnología de producción de *G. lucidum* permitirá obtener mejores precios y asegurar calidad, cantidad y continuidad en el suministro; por lo cual es factible su transferencia al ámbito productivo

El análisis químico de los basidiocarpos mostró que el contenido de los principales grupos de compuestos bioactivos de *G. lucidum*, triterpenoides, carbohidratos de alto peso molecular y compuestos fenólicos, varía con el sustrato empleado para el cultivo, el agregado de aditivos y el momento de cosecha. Por lo tanto es necesario estandarizar las condiciones de cultivo, no solo para obtener los mejores rendimientos, sino para asegurar una composición química reproducible entre lotes. Para ello es necesario realizar nuevos estudios que permitan correlacionar las diferentes condiciones (por ejemplo concentración de aditivos) con el rendimiento del cultivo y el contenido de los principales compuestos bioactivos del hongo. A partir de estas diferencias observadas, resulta también interesante estudiar el efecto de las condiciones de cultivo sobre alguna de las actividades biológicas atribuidas a *G. lucidum*.

Se estudió la utilidad de la espectroscopia FT-IR para el análisis de los principales grupos funcionales presentes en el hongo. El patrón de los principales picos de los espectros del basidiocarpo se mantuvo con las diferentes condiciones de cultivo, pero se observaron diferencias en las intensidades de los mismos. Esto indica variaciones cuantitativas, pero no cualitativas, en el contenido químico del basidiocarpo de acuerdo a las condiciones de cultivo. Sin embargo, no se pudo correlacionar la variación de la intensidad de los picos con la variación del contenido de los principales grupos bioactivos del hongo. Sería interesante establecer correlaciones entre los espectros y el contenido químico del hongo, que permitan una rápida evaluación de su composición química. Por otro lado, esta técnica podría ser útil para el control de calidad, con el fin de identificar rápidamente la especie de hongo y detectar posibles adulteraciones. Para ello, es necesario extender el estudio de los espectros IR a distintas cepas y especies de hongo con el fin de establecer una base de datos.

El análisis microbiológico del proceso de pasteurización muestra que el sistema es efectivo para la eliminación de grupos de microorganismos relacionados con la calidad sanitaria. Sin embargo, ya que los mohos solo mostraron una disminución moderada, el sistema podría perfeccionarse para lograr una mayor eliminación de mohos viables a los fines de no poner en riesgo la producción.

El extracto acuoso crudo del basidiocarpo de *G. lucidum* soportó el crecimiento de cepas probióticas del grupo de las bacterias lácticas, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Weisella*, así como también de cepas provenientes de productos farmacéuticos presentes en el mercado nacional (*Bacillus subtilis* y *Saccharomyces cereviceae* var. *boulardii*). Por otro lado, la cinética de crecimiento obtenida por *B. subtilis* en un extracto acuoso purificado, indica que los polisacáridos de *G. lucidum* pueden ser utilizados por la cepa probiótica. Los resultados obtenidos justifican futuros estudios en la utilización de los  $\beta$ -glucanos de *G. lucidum* por cepas microbianas probióticas. También sería interesante ampliar a mayor cantidad de cepas y evaluar los efectos sobre la actividad competitiva del probiótico frente a patógenos y determinar *in vivo* la presencia de efectos inmunomodulares en el hospedador.

Por último, se desarrolló una formulación nutracéutica que contiene la mayor parte de los compuestos bioactivos de *G. lucidum*. Esta formulación en una suspensión formada por la mezcla de un extracto acuoso y otro alcohólico del basidiocarpo y estabilizada por el agregado de Carbomer® 940. Esta formulación retuvo el 30% de los triterpenoides totales, y el 19% de los compuestos fenólicos que no son solubles en la mezcla hidroalcohólica 1:1. Son

necesarios mayores estudios para determinar la identidad química de estos compuestos que precipitan y estudiar su potencial actividad biológica. Finalmente, estudios de la estabilidad y de la reología de las suspensiones, mostraron que una concentración de Carbomer® 940, entre 0,5 y 1% es adecuada para obtener una dispersión homogénea de los compuestos insolubles por agitación leve a moderada, con una viscosidad adecuada para su administración oral.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aida FMN a., Shuhaimi M, Yazid M, Maaruf a. G (2009) Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Trends Food Sci Technol* 20:567–575. doi: 10.1016/j.tifs.2009.07.007
- Aksu Z (2005) Application of biosorption for the removal of organic pollutants: A review. *Process Biochem* 40:997–1026. doi: 10.1016/j.procbio.2004.04.008
- Albertó E, Gasoni L (2003) Producción de Hongos Comestibles en la Argentina. *Idia XXI* 5:70–76.
- Alonso González AC (1999) Formas líquidas orales. En: Vila Jato JL (ed) *Tecnología Farmacéutica - Volumen 2*. pp 25–54
- Amin MN, Mustafa AI, Khalil MI, Rahman M, Nahid I (2012) Adsorption of phenol onto rice straw biowaste for water purification. *Clean Technol Environ Policy* 14:837–844. doi: 10.1007/s10098-012-0449-6
- Azizi M, Tavana M, Farsi M, Oroojalian F (2012) Yield Performance of Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) P. Karst. (Higher Basidiomycetes), Using Different Waste Materials as Substrates. *Int J Med Mushrooms* 14:521–527. doi: 10.1615/IntJMedMushr.v14.i5.110
- Baldrian P, Gabriel J (2002) Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiol Lett* 206:69–74.
- Barker S (2013) Suspensions. En: Aulton ME, Taylor KMG (eds) *Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines*, 4<sup>a</sup> edn. Elsevier,
- Batra P, Sharma AK, Khajuria R (2013) Probing Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes): A Bitter Mushroom with Amazing Health Benefits. *Int J Med Mushrooms* 15:127–143. doi: 10.1615/IntJMedMushr.v15.i2.20
- Bernabé-González T, Cayetano-Catarino M, Bernabé-Villanueva G, Romero-Flores A, Ángel-Ríos D, Pérez-Salgado J (2015) Cultivation of *ganoderma lucidum* on agricultural by-products in Mexico. *Micol Apl Int* 27:25–30.
- Bishop KS, Kao CHJ, Xu Y, Glucina MP, Paterson RRM, Ferguson LR (2015) From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. *Phytochemistry*.

- doi: 10.1016/j.phytochem.2015.02.015
- Blaut M, Collins MD, Welling GW, Doré J, van Loo J, de Vos W (2002) Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut flora project. *Br J Nutr* 87:S203. doi: 10.1079/BJN/2002539
- Boa E (2004) *Los hongos silvestres comestibles*.
- Boh B, Berovic M, Zhang J, Zhi-Bin L (2007) *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnol Annu Rev* 13:265–301. doi: 10.1016/S1387-2656(07)13010-6
- Boskou D, Tsimidou M, Blekas G (2006) *Polar Phenolic Compounds*, Second Edi. AOCS Press
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–54.
- Busse W (2000) The significance of quality for efficacy and safety of herbal medicinal products. *Drug Inf J* 34:15–23.
- Carmona F, Pereira AMS (2013) Herbal medicines: Old and new concepts, truths and misunderstandings. *Brazilian J Pharmacogn* 23:379–385. doi: 10.1590/S0102-695X2013005000018
- Chang S-T, Miles PG (2004) *Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*. CRC Press LLC
- Changhai Z, Hanguo S, Jimin C, Lijing P, Miaobin Z, Congling H, Shufen L (2013) Study on Culture Medium of *Ganoderma lucidum* in Zhuhai. *Chinese Agric Sci Bull* 29:187–191.
- Chen Y, Xie M-Y, Gong X-F (2007) Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. *J Food Eng* 81:162–170. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2006.10.018
- Chin S, Law C, Cheng P (2011) Effect of drying on crude ganoderic acids and water soluble polysaccharides content in *Ganoderma lucidum*. *Int J Pharm Pharm Sci* 3:1–6.
- Cho SB (2005) ¿Que es un Hongo? En: *Manual del Cultivador de Hongos - Cultivo del Hongo Ostra*. pp 1–4
- Choong Y-K, Sun S-Q, Zhou Q, Lan J, Lee H-L, Chen X-D (2014) Verification of *Ganoderma* (lingzhi) commercial products by Fourier Transform infrared spectroscopy

- and two-dimensional IR correlation spectroscopy. *J Mol Struct* 1069:60–72. doi: 10.1016/j.molstruc.2013.11.049
- Choong YK, Sun S-Q, Zhou Q, Ismail Z, Rashid BAA, Tao J-X (2011) Determination of storage stability of the crude extracts of *Ganoderma lucidum* using FTIR and 2D-IR spectroscopy. *Vib Spectrosc* 57:87–96. doi: 10.1016/j.vibspec.2011.05.008
- Ćilerdžić J, Vukojević J, Stajić M, Stanojković T, Glamočlija J (2014) Biological activity of *Ganoderma lucidum* basidiocarps cultivated on alternative and commercial substrate. *J Ethnopharmacol* 155:312–319. doi: 10.1016/j.jep.2014.05.036
- Cordi L, Minussi RC, Freire RS, Durán N (2007) Fungal laccase: copper induction, semi-purification, immobilization, phenolic effluent treatment and electrochemical measurement. *African J Biotechnol* 6:1255–1259.
- Córdova-López J, Gutiérrez-Rojas M, Huerta S, Saucedo-Castañeda G, Favela-Torres E (1996) Biomass estimation of *Aspergillus niger* growing on real and model supports in solid state fermentation. *Biotechnol Tech* 10:1–6.
- Cui Z-W, Xu S-Y, Sun D-W, Chen W (2006) Extraction by Combined Microwave-Vacuum and Conventional Vacuum Drying. *Dry Technol* 24:595–599. doi: 10.1080/07373930600626792
- Curvetto NR, Delmastro S, Devalis R (1997) Low cost method for decontaminating sunflower seed hull-based substrate in the cultivation of *Pleurotus* edible mushrooms. *Mushroom Res* 6:25–28.
- Curvetto NR, Figlas D, Delmastro S (2002a) Sunflower seed hulls as substrate for the cultivation of shiitake mushrooms. *Horttechnology* 5:652–655.
- Curvetto NR, Figlas D, Devalis R, Delmastro S (2002b) Growth and productivity of different *Pleurotus ostreatus* strains on sunflower seed hulls supplemented with N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and/or Mn(II). *Bioresour Technol* 84:171–6.
- Curvetto NR, Gonzalez Matute R, Figlas D, Delmastro S (2004) Cultivation of oyster mushrooms on sunflower seed hull substrate. En: *Mushroom Growers Handbook 1 - Oyster Mushroom Cultivation*. MushWorld, Seoul, pp 101–106
- Deacon JW (2006) *Fungal Biology*. Blackwell Publishing
- De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Bacteriol* 23:130–135. doi: 10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x

- Debenedetti S (2011) Suplementos dietarios con drogas vegetales o extractos. Dosis Capacit. 2.01.06 DOSIS-04911-0811-0.
- Deepalakshmi K, Mirunalini S (2011) Therapeutic properties and current medical usage of medicinal mushroom: *Ganoderma lucidum*. *Int J Pharm Sci Res* 2:1922–1929.
- Ding P, Zhen Y, Lai X, Xu H (1999) Effects of places and stages on the contents of ganoderic acid B from *Ganoderma lucidum*. *J Chinese Med Mater* 22:271–272.
- Djordjevic B, Škugor S, Jørgensen SM, Øverland M, Mydland LT, Krasnov A (2009) Modulation of splenic immune responses to bacterial lipopolysaccharide in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed lentinan, a beta-glucan from mushroom *Lentinula edodes*. *Fish Shellfish Immunol* 26:201–209. doi: 10.1016/j.fsi.2008.10.012
- Duncan KW (1997) An ecophysiological approach to the evaluation, modification and production of mushroom growing media. *Mushrooms News* 45:12–27.
- Erkel EI (2009a) The effect of different substrate mediums on yield of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. *J Food, Agric Environ* 7:841–844.
- Erkel EI (2009b) Yield performance of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst cultivation on substrates containing different protein and carbohydrate sources. *African J Agric Res* 4:1331–1333.
- Fang Q-H, Zhong J-J (2002) Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem* 37:769–774. doi: 10.1016/S0032-9592(01)00278-3
- Few JD (1965) Some New Steroid Colour Reactions. *Analyst* 90:134–146.
- Fraga I, Coutinho J, Bezerra RM, Dias A a, Marques G, Nunes FM (2014) Influence of culture medium growth variables on *Ganoderma lucidum* exopolysaccharides structural features. *Carbohydr Polym* 111:936–46. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.05.047
- Gibson GR, Probert HM, Loo J Van, Rastall RA, Roberfroid MB (2004) Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* 17:259. doi: 10.1079/NRR200479
- Gonzalez Matute R, Figlas D, Devalis R, Delmastro S, Curvetto N (2002) Sunflower seed hulls as a main nutrient source for cultivating *Ganoderma lucidum*. *Micol Apl Int* 14:2–7.
- Gonzalez Matute R, Serra A, Figlas D, Curvetto NR (2011) Copper and zinc bioaccumulation

- and bioavailability of *Ganoderma lucidum*. *J Med Food* 14:1273–9. doi: 10.1089/jmf.2010.0206
- Guerin-Laguette A, Vaario L-M, Matsushita N, Shindo K, Suzuki K, Lapeyrie F (2003) Growth stimulation of a Shiro-like, mycorrhiza forming, mycelium of *Tricholoma matsutake* on solid substrates by non-ionic surfactants or vegetable oil. *Mycol Prog* 2:37–43. doi: 10.1007/s11557-006-0042-7
- Günç Ergönül P, Akata I, Kalyoncu F, Ergönül B (2013) Fatty Acid Compositions of Six Wild Edible Mushroom Species. *Sci World J* 2013:1–4. doi: 10.1155/2013/163964
- Gurung OK, Budathoki U, Parajuli G (2013) Effect of Different Substrates on the Production of *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) Karst. *Our Nat* 10:191–198. doi: 10.3126/on.v10i1.7781
- Halpern GM (2007) *Healing Mushrooms*. Square One Publishers, Garden City Park
- Hattori M, Taylor TD (2009) The Human Intestinal Microbiome: A New Frontier of Human Biology. *DNA Res* 16:1–12. doi: 10.1093/dnares/dsn033
- Hölker U, Höfer M, Lenz J (2004) Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:175–186. doi: 10.1007/s00253-003-1504-3
- Hsieh C, Wang H-L, Chen C-C, Hsu T-H, Tseng M-H (2008) Effect of plant oil and surfactant on the production of mycelial biomass and polysaccharides in submerged culture of *Grifola frondosa*. *Biochem Eng J* 38:198–205. doi: 10.1016/j.bej.2007.07.001
- Jandaik S, Singh R, Sharma M (2013) Comparative Growth Characteristics and Yield Attributes of Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes) on Different Substrates in India. *Int J Med Mushrooms* 15:497–503. doi: 10.1615/IntJMedMushr.v15.i5.70
- Jaramillo CL (2010) Simple methodology for the cultivation of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* in Colombian coffee farms. En: *Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI*. p 397
- Jin X, Ruiz Beguerie J, Sze DM, Chan GC (2016) *Ganoderma lucidum* (Reishi mushroom) for cancer treatment. En: Jin X (ed) *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK,

- Jirillo E, Jirillo F, Magrone T (2012) Healthy Effects Exerted by Prebiotics, Probiotics, and Symbiotics with Special Reference to their Impact on the Immune System. *Int J Vitam Nutr Res* 82:200–208. doi: 10.1024/0300-9831/a000112
- Kirchner G, Daillant O (1998) Pb, <sup>226</sup>Ra and radioactive cesium by fungi. *Sci Total Environ* 222:63–70.
- Kostik V, Memeti S, Bauer B (2012) Fatty acid composition of edible oils and fats. *J Hyg Eng ...* 112–116.
- Koyyalamudi SR, Jeong S-C, Song C-H, Cho KY, Pang G (2009) Vitamin D<sub>2</sub> Formation and Bioavailability from *Agaricus bisporus* Button Mushrooms Treated with Ultraviolet Irradiation. *J Agric Food Chem* 57:3351–3355. doi: 10.1021/jf803908q
- Kües U, Liu Y (2000) Fruiting body production in Basidiomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:141–52.
- Kuhar F, Papinutti L (2014) Optimization of laccase production by two strains of *Ganoderma lucidum* using phenolic and metallic inducers. *Rev Argent Microbiol* 46:144–9. doi: 10.1016/S0325-7541(14)70063-X
- Lakshmi SS (2013) In Vivo utilization of seafood processing wastes for cultivation of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* using agro-industrial waste. *Asian J Pharm Clinical Res* 6:51–54.
- Laurentin A, Edwards CA (2003) A microtiter modification of the anthrone-sulfuric acid colorimetric assay for glucose-based carbohydrates. *Anal Biochem* 315:143–145. doi: 10.1016/S0003-2697(02)00704-2
- Lee BSS, Chang YS (2016) *Ganoderma* – Jekyll and Hyde mushrooms. *Agric Sci J* 2:21–31.
- Lindequist U, Niedermeyer THJ, Jülich W-D (2005) The pharmacological potential of mushrooms. *Evid Based Complement Alternat Med* 2:285–99. doi: 10.1093/ecam/neh107
- Liu J, Kurashiki K, Fukuta A, Kaneko S, Suimi Y, Shimizu K, Kondo R (2012) Quantitative determination of the representative triterpenoids in the extracts of *Ganoderma lucidum* with different growth stages using high-performance liquid chromatography for evaluation of their 5 $\alpha$ -reductase inhibitory properties. *Food Chem* 133:1034–1038. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.01.034
- Lopez Cazorla A, Sica MG, Brugnoli LI, Marucci PL, Cubitto M a. (2014) Evaluation of

- Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* isolated from Jenyn's sprat (*Ramnogaster arcuata*) as probiotic for juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *J Appl Ichthyol* 31:88–94. doi: 10.1111/jai.12496
- Lu J, Qin J-Z, Chen P, Chen X, Zhang Y-Z, Zhao S-J (2012) Quality Difference Study of Six Varieties of *Ganoderma lucidum* with Different Origins. *Front Pharmacol* 3:57. doi: 10.3389/fphar.2012.00057
- Ludwig W, Schlefer K, Whitman W (2009) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, New York
- Magalhaes LM, Santos F, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC (2010) Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta* 83:441–447. doi: 10.1016/j.talanta.2010.09.042
- Mai DS, Binh TT, Thi T, Xi U, Thi N, Tram N, Suong NK (2015) Optimizing the polysaccharide extraction from the Vietnamese Lingzhi (*Ganoderma lucidum*) via enzymatic method. *J Food Nutr Sci* 3:111–114. doi: 10.11648/j.jfns.s.2015030102.31
- Manzi P, Pizzoferrato L (2000) Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chem* 68:315–318. doi: 10.1016/S0308-8146(99)00197-1
- Mehta S, Jandaik S, Gupta D (2014) Effect of Cost-Effective Substrates on Growth Cycle and Yield of Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes) from Northwestern Himalaya (India). *Int J Med Mushrooms* 16:585–591.
- Mohd Hamim HM, Shuhaimi M, Yazid AM, Ali AM, Anas OM, Asilah AT, Wahab MN, Shukor MYA (2010) Growth of probiotic bacteria in trypticase phytone yeast medium supplemented with crude polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Malays J Microbiol* 6:47–56.
- Nyangale EP, Farmer S, Keller D, Chernoff D, Gibson GR (2014) Effect of prebiotics on the fecal microbiota of elderly volunteers after dietary supplementation of *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086. *Anaerobe* 30:75–81. doi: 10.1016/j.anaerobe.2014.09.002
- Orsavova J, Misurcova L, Ambrozova JV, Vicha R, Mlcek J (2015) Fatty Acids Composition of Vegetable Oils and Its Contribution to Dietary Energy Intake and Dependence of Cardiovascular Mortality on Dietary Intake of Fatty Acids. *Int J Mol Sci* 16:12871–90. doi: 10.3390/ijms160612871
- Pala SA, Wani AH (2011) Mushrooms: The entities with multifarious medicinal properties. *J*

- Pharm Res 4:4721–4726.
- Pan K, Jiang Q, Liu G, Miao X, Zhong D (2013) Optimization extraction of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its immunity and antioxidant activities. *Int J Biol Macromol* 55:301–6. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.01.022
- Park J-P, Kim S-W, Hwang H-J, Cho Y-J, Yun J-W (2002) Stimulatory effect of plant oils and fatty acids on the exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. *Enzyme Microb Technol* 31:250–255. doi: 10.1016/S0141-0229(02)00099-6
- Peksen A, Yakupoglu G (2008) Tea waste as a supplement for the cultivation of *Ganoderma lucidum*. *World J Microbiol Biotechnol* 25:611–618. doi: 10.1007/s11274-008-9931-z
- Phan C-W, Sabaratnam V (2012) Potential uses of spent mushroom substrate and its associated lignocellulosic enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol* 96:863–73. doi: 10.1007/s00253-012-4446-9
- Postemsky PD, Delmastro SE, Curvetto NR (2014) Effect of edible oils and Cu (II) on the biodegradation of rice by-products by *Ganoderma lucidum* mushroom. *Int Biodeterior Biodegradation* 93:25–32. doi: 10.1016/j.ibiod.2014.05.006
- Postemsky PD, Marinangeli PA, Curvetto NR (2016) Recycling of residual substrate from *Ganoderma lucidum* mushroom cultivation as biodegradable containers for horticultural seedlings. *Sci Hortic (Amsterdam)* 201:329–337. doi: 10.1016/j.scienta.2016.02.021
- Quigley EMM (2010) Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacol Res* 61:213–218. doi: 10.1016/j.phrs.2010.01.004
- Quigley EMM (2011) Therapies Aimed at the Gut Microbiota and Inflammation: Antibiotics, Prebiotics, Probiotics, Synbiotics, Anti-inflammatory Therapies. *Gastroenterol Clin North Am* 40:207–222. doi: 10.1016/j.gtc.2010.12.009
- Raimbault M (1998) General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electron J Biotechnol* 1:174–188. doi: 10.2225/vol1-issue3-fulltext-9
- Rather MA, Bhat BA, Qurishi MA (2013) Multicomponent phytotherapeutic approach gaining momentum: Is the “one drug to fit all” model breaking down? *Phytomedicine* 21:1–14. doi: 10.1016/j.phymed.2013.07.015
- Rinker D (2002) Handling and using “spent” mushroom substrate around the world.

- Mushroom Biol Mushroom Prod 44–61.
- Roberfroid M (2002) Functional food and its application to prebiotics. *Dig Liver Dis* 34:S105–S110.
- Round JL, Mazmanian SK (2009) The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 9:313–323. doi: 10.1038/nri2515
- Roupas P, Keogh J, Noakes M, Margetts C, Taylor P (2012) The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence. *J Funct Foods* 4:687–709. doi: 10.1016/j.jff.2012.05.003
- Ruiz PM, Soso L (2006) Prevalencia y costo de las medicinas alternativas .
- Russell M, Paterson R (2006) Ganoderma - a therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry* 67:1985–2001. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.07.004
- Sánchez C, Viniegra-González G (1996) Detection of highly productive strains of *Pleurotus ostreatus* by their tolerance to 2-deoxy-D-glucose in starch-based media. *Mycol Res* 100:455–461. doi: 10.1016/S0953-7562(96)80143-2
- Sanodiya BS, Thakur GS, Baghel RK, Prasad GBKS, Bisen PS (2009) *Ganoderma lucidum*: a potent pharmacological macrofungus. *Curr Pharm Biotechnol* 10:717–42.
- Schisler LC (1967) Stimulation of yield in the cultivated mushroom by vegetable oils. *Appl Microbiol* 15:844–50.
- Sica MG, Brugnoli LI, Marucci PL, Cubitto MA (2012) Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from an estuarine environment for application in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) farming. *Antonie Van Leeuwenhoek* 101:869–879. doi: 10.1007/s10482-012-9703-5
- Sica MG, Olivera NL, Brugnoli LI, Marucci PL, Lopez Cazorla AC, Cubitto M a (2010) Isolation, identification and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from the Bahía Blanca Estuary. *Rev Biol Mar Oceanogr* 45:389–397.
- Singh SK, Jha SK, Chaudhary A, Yadava RDS, Rai SB (2010) Quality control of herbal medicines by using spectroscopic techniques and multivariate statistical analysis. *Pharm Biol* 48:134–141. doi: 10.3109/13880200903059388
- Sliva D (2003) *Ganoderma lucidum* (Reishi) in cancer treatment. *Integr Cancer Ther* 2:358–64. doi: 10.1177/1534735403259066
- Smith JE, Rowan NJ, Sullivan R (2002) Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of

- biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. *Biotechnol Lett* 24:1839–1845.
- Song X-Y, Li Y-D, Shi Y-P, Jin L, Chen J (2013) Quality control of traditional Chinese medicines: a review. *Chin J Nat Med* 11:596–607. doi: 10.1016/S1875-5364(13)60069-2
- Stamets P (1993) *Growing gourmet and medicinal mushrooms*. Ten Speed Press, Berkeley
- Stamets P, Chilton JS (1983) *The Mushroom Cultivator*, 1st Editio. Agarikon Press
- Stasinopoulos SJ, Seviour RJ (1990) Stimulation of exopolysaccharide production in the fungus *Acremonium persicinum* with fatty acids. *Biotechnol Bioeng* 36:778–82. doi: 10.1002/bit.260360804
- Su P, Henriksson A, Mitchell H (2007a) Food microbiology Selected prebiotics support the growth of probiotic mono-cultures in vitro. *Anaerobe* 13:134–139.
- Su P, Henriksson A, Mitchell H (2007b) Selected prebiotics support the growth of probiotic mono-cultures in vitro. *Anaerobe* 13:134–139. doi: 10.1016/j.anaerobe.2007.04.007
- Suárez Arango C, Nieto IJ (2013) Biotechnological cultivation of edible macrofungi: an alternative for obtaining nutraceuticals. *Rev Iberoam Micol* 30:1–8. doi: 10.1016/j.riam.2012.03.011
- Sukarno N, Aini A, Sumarna V, Rohaeti E, Darusman L (2004) Development of *Ganoderma lucidum* on soft and hard wood logs and determination of organic germanium and ganoderic acid content of the fruiting body produced. *J Mushroom Sci Prod* 2:157–162.
- Swarbrick J, Rubino J, Rubino OP (2013) *Coarse Dispersions*. En: Felton L (ed) *Remington - Essential of Pharmaceutics*. Pharmaceutical Press,
- Tang Y-J, Zhong J-J (2003) Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme Microb Technol* 32:478–484. doi: 10.1016/S0141-0229(02)00338-1
- Tang Y-J, Zhu L-W (2010) Improvement of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharide biosynthesis by *Ganoderma lucidum* fermentation under the inducement of Cu<sup>2+</sup>. *Biotechnol Prog* 26:417–23. doi: 10.1002/btpr.352
- Uauy R, Olivares M, Gonzalez M (1998) Essentiality of copper in humans. *Am J Clin Nutr* 67:952S–959S.
- Ulbricht C, Abrams TR, Bent S, Boon H, Costa D, Dacey C, Guilford J, Giese N, Grimes

- Serrano JM, Hackman DA, Scully L, Rusie E, Shaffer M, Varghese M, Vijarian N, Weissner W, Welch S, Wong D, Woods J (2010) Reishi Mushroom (*Ganoderma lucidum*): Systematic Review by the Natural Standard Research Collaboration. *J Soc Integr Oncol* 8:148–159.
- Upton R (2006) Reishi Mushroom. Standards of Analysis, Quality Control, and Therapeutics. En: Upton R (ed) *American Herbal Pharmacopoeia and Therapeutic Compendium. The American Herbal Pharmacopoeia*,
- Urrutibehety G (2009) *Hacer del cultivo de hongos una actividad productiva destacada. La Cap. Mar del Plata*
- Wang Y (2009) Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Res Int* 42:8–12.
- Wardle K, Schisler LC (1969) The Effects of Various Lipids on Growth of Mycelium of *Agaricus Bisporus*. *Mycologia* 61:305–314.
- Wasser S (2005) Reishi or Ling Zhi (*Ganoderma lucidum*). *Encycl Diet Suppl* 603–622. doi: 10.1081/E-EDS-120022119
- Wasser SP (2002) Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:258–74. doi: 10.1007/s00253-002-1076-7
- Wasser SP (2011) Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:1323–1332. doi: 10.1007/s00253-010-3067-4
- Williamson EM (2001) Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine* 8:401–9. doi: 10.1078/0944-7113-00060
- Williamson EM, Lorenc A, Booker A, Robinson N (2013) The rise of traditional Chinese medicine and its materia medica: A comparison of frequency and safety of materials and species used in Europe and China. *J Ethnopharmacol* 1–10. doi: 10.1016/j.jep.2013.06.050
- World Health Organization (ed) (2006) *The International Pharmacopoeia, 4<sup>a</sup> edn. World Health Organization*
- Wu TS, Shi LS, Kuo SC (2001) Cytotoxicity of *Ganoderma lucidum* triterpenes. *J Nat Prod* 64:1121–2.

- Xia Q, Zhang H, Sun X, Zhao H, Wu L, Zhu D, Yang G, Shao Y, Zhang X, Mao X, Zhang L, She G (2014) A Comprehensive Review of the Structure Elucidation and Biological Activity of Triterpenoids from *Ganoderma* spp. *Molecules* 19:17478–17535. doi: 10.3390/molecules191117478
- Yang F-C, Ke Y, Kuo S-S (2000) Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. *Enzyme Microb Technol* 27:295–301.
- Yang F-C, Liao C-B (1998) The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. *Process Biochem* 33:547–553. doi: 10.1016/S0032-9592(98)00023-5
- Yang J, Chen Y, Leong N, Zhao J, Duan J, Tang Y, Li S, Green V (2012) Quality evaluation of different products derived from *Ganoderma*. *J Med Plants Res* 6:1969–1974. doi: 10.5897/JMPR11.1668
- Yoshida S, Muramatsu Y, Ogawa M (1994) Radiocesium concentrations in mushrooms collected in Japan. *J Environ Radioact* 22:141–154. doi: 10.1016/0265-931X(94)90019-1
- Zhang J, Zhong J-J, Geng A (2014) Improvement of ganoderic acid production by fermentation of *Ganoderma lucidum* with cellulase as an elicitor. *Process Biochem*. doi: 10.1016/j.procbio.2014.06.018
- Zhou H, Bi P, Wu X, Huang F, Yang H (2013) Improved Polysaccharide Production in Submerged Culture of *Ganoderma lucidum* by the Addition of Coixenolide. *Appl Biochem Biotechnol*. doi: 10.1007/s12010-013-0623-2
- Zhou Q-C, Buentello JA, Gatlin DM (2010) Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 309:253–257. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.09.003
- Zhou X-W, Su K-Q, Zhang Y-M (2012) Applied modern biotechnology for cultivation of *Ganoderma* and development of their products. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:941–63. doi: 10.1007/s00253-011-3780-7
- Zhu Y, Tan ATL (2015) Discrimination of Wild-Grown and Cultivated *Ganoderma lucidum* by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometric Methods. *Am J Anal Chem* 6:480–491. doi: 10.4236/ajac.2015.65047
- Zubillaga M, Weill R, Postaire E, Goldman C, Caro R, Boccio J (2001) Effect of probiotics

## BIBLIOGRAFÍA

and functional foods and their use in different diseases. *Nutr Res* 21:569–579.

## ANEXO I:

### RESULTADOS COMPLEMENTARIOS

#### I.1 EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL PROCESO DE PASTEURIZACIÓN

Tabla 26: Evolución de los principales grupos microbiológicos durante la pasteurización

Tiempo h	RHP	CT	<i>E. coli</i>	AE	CSR	Mohos	Lev	Enterococos
Sustrato 1								
0	7,33	5,40	2,18	5,24	3,31	4,96	4,83	5,93
1	6,07	4,60	1,70	4,94	3,41	3,83	2,71	4,72
2	4,96	2,40	1,00	4,54	2,90	2,87	< 1	3,86
3	4,53	0,95	< 1	3,80	2,01	3,01	< 1	2,44
Sustrato 2								
0	7,44	5,48	2,30	5,24	3,42	5,00	5,02	6,12
1	5,48	4,62	1,48	4,59	3,44	3,40	2,83	4,74
2	4,86	2,51	< 1	4,04	2,95	2,90	< 1	3,70
3	4,20	1,30	< 1	3,63	2,36	2,70	< 1	2,39

Sustrato 1: cáscara de girasol, 5% cebada perlada, 2% SO<sub>4</sub>Ca, 0,5% Ca<sub>2</sub>CO y 60% agua;  
Sustrato 2: cáscara de girasol, 5% cebada perlada, 2% SO<sub>4</sub>Ca, 0,5% Ca<sub>2</sub>CO, 60% agua y 1,5 % de aceite de Oliva.

RHP: Recuento de heterótrofas Aerobias Totales, CT: Coliformes totales, AE: Bacterias esporógenas aerobias, CSR: Clostridios sulfito reductores, Lev: Levaduras

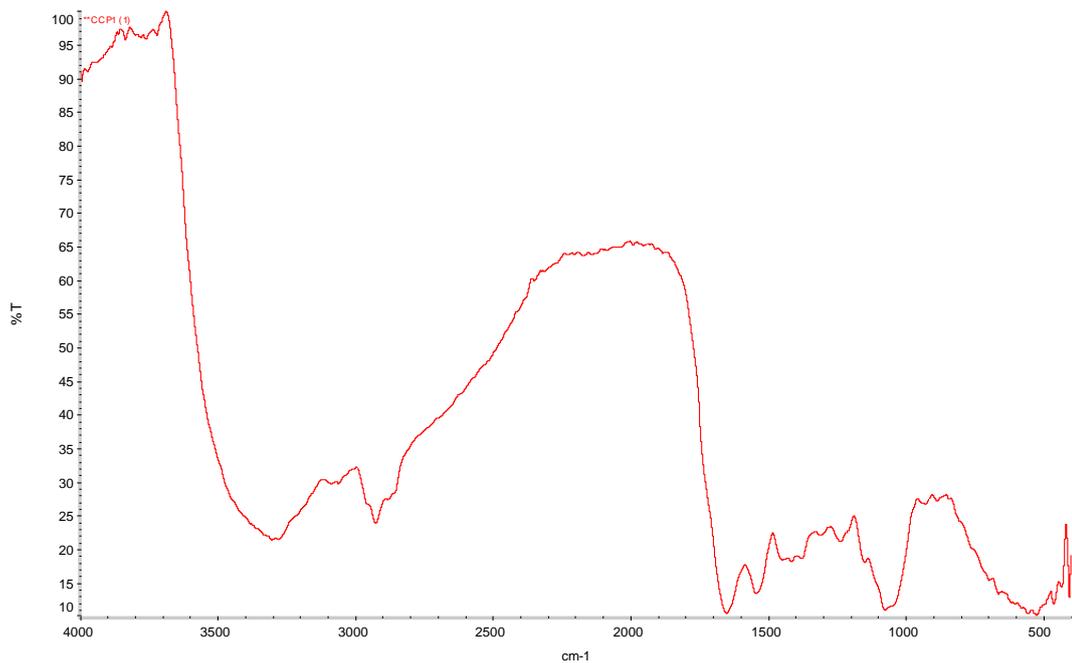
#### I.2 ESPECTROS IR

Se presentan a continuación los espectros IR, en Transmitancia%, del basidiocarpo de *Ganoderma lucidum* cultivado en los siguientes sustratos:

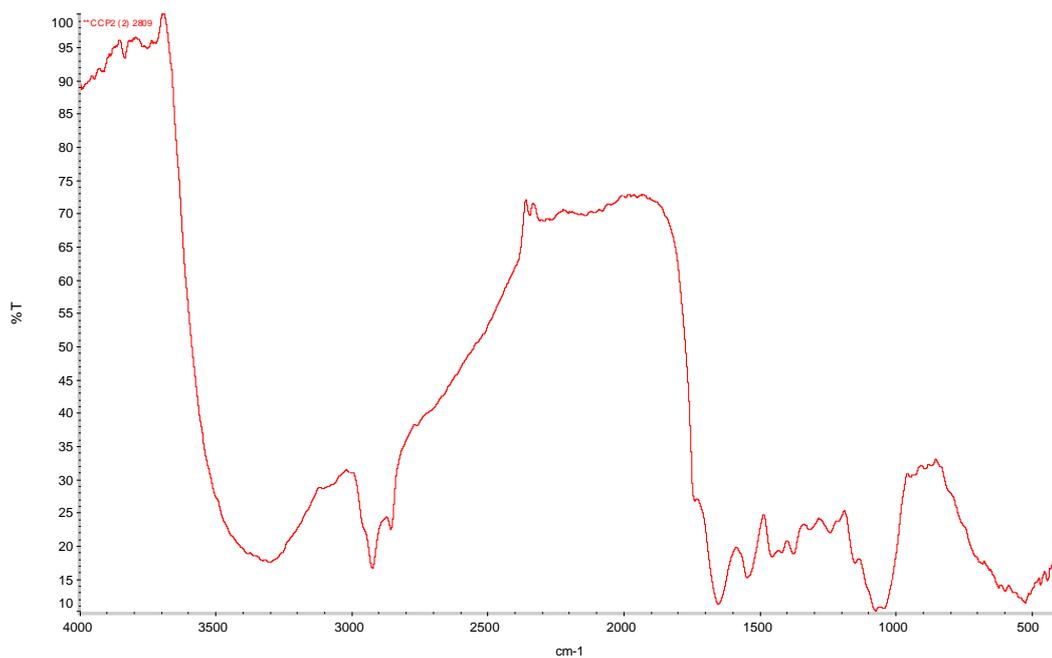
- Cáscara de girasol sin aditivos; primera oleada; ensayo 1
- Cáscara de girasol sin aditivos; primera oleada; ensayo 2
- Cáscara de girasol sin aditivos; segunda oleada
- Cáscara de girasol con aceite de girasol 1.5%
- Cáscara de girasol con aceite de maíz 1.5%

- f) Cáscara de girasol con aceite de oliva 1.5%; primera oleada
- g) Cáscara de girasol con aceite de oliva 1.5%; segunda oleada
- h) Cáscara de girasol con sulfato de cobre 60 ppm; primera oleada
- i) Cáscara de girasol con sulfato de cobre 60 ppm; segunda oleada
- j) Cáscara de girasol con sulfato de cobre 60 ppm y aceite de oliva 1.5%
- k) Paja de arroz sin aditivos
- l) Paja de arroz con aceite de oliva 1%; primera oleada
- m) Paja de arroz con aceite de oliva 1%; segunda oleada
- n) Paja de arroz con aceite de oliva 1% y sulfato de cobre 100 ppm

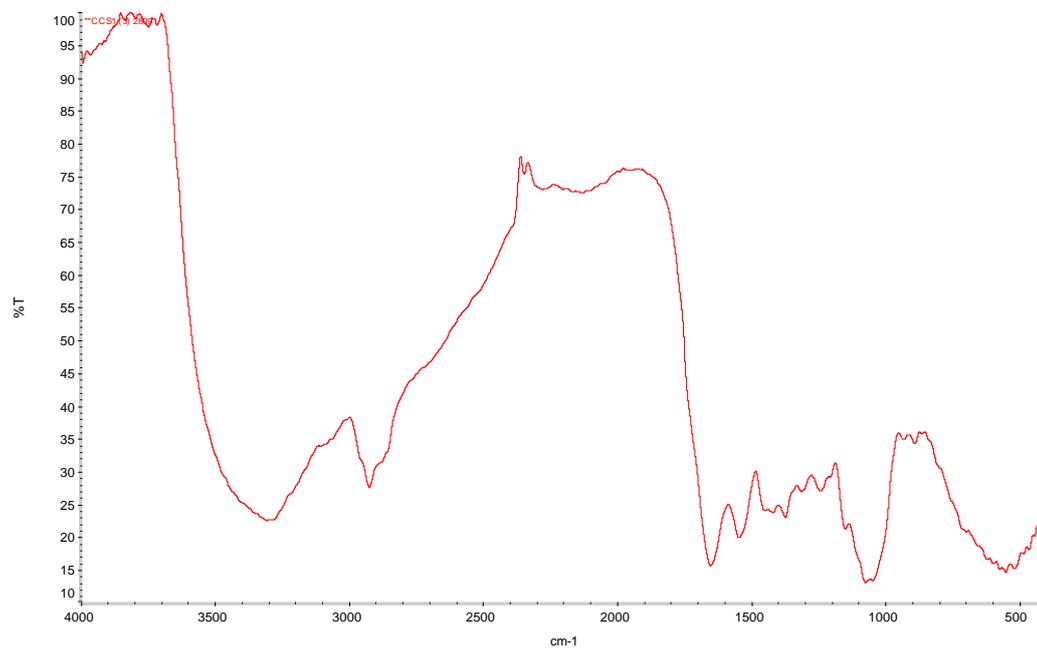
a)



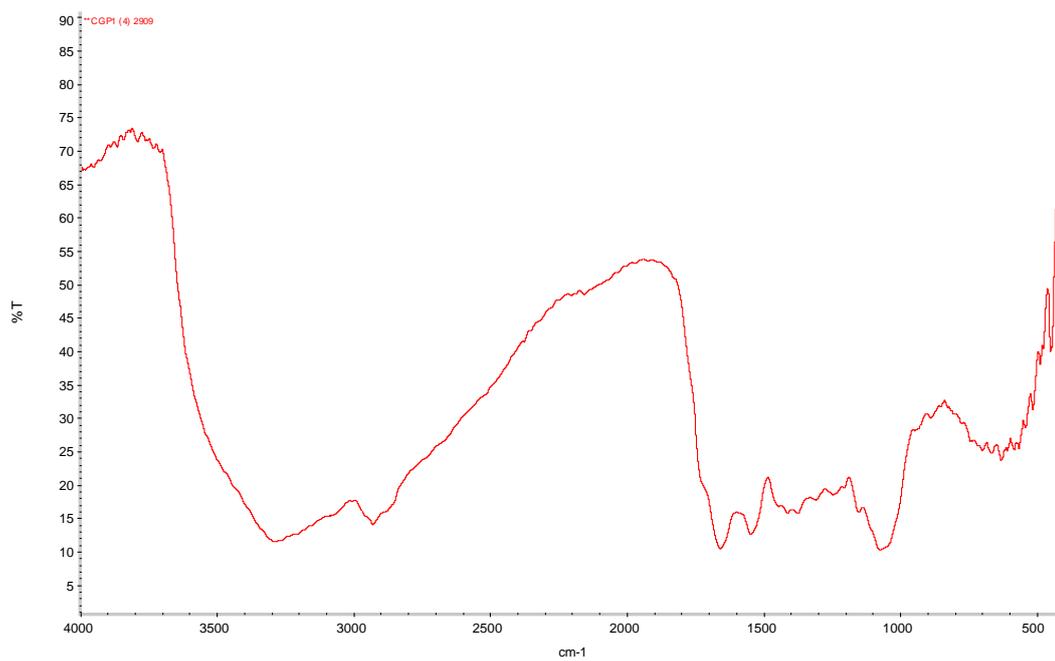
b)



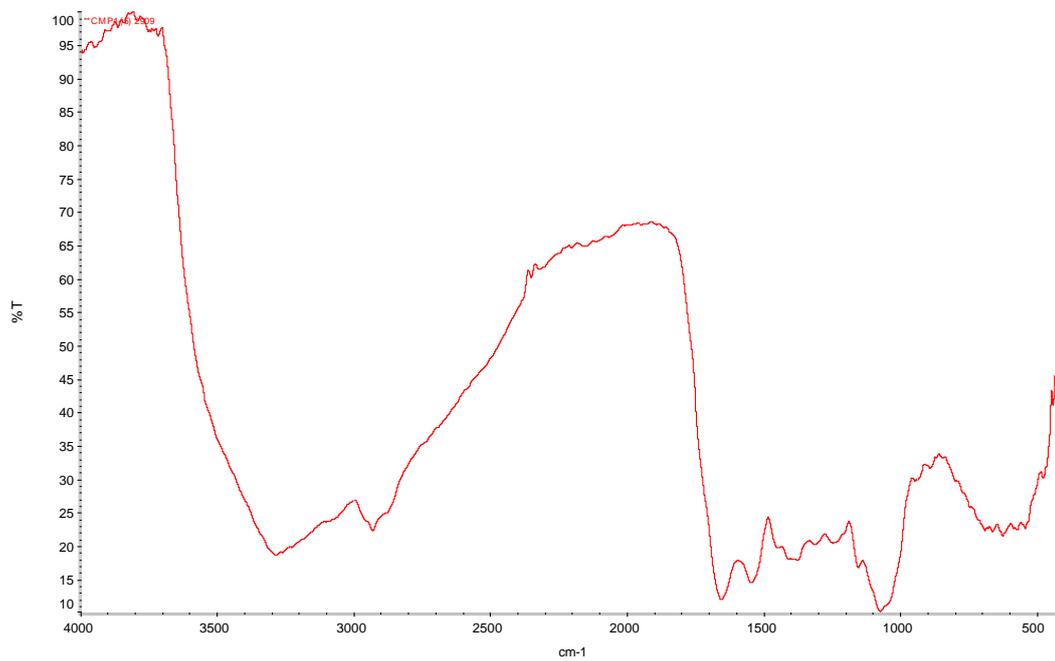
c)



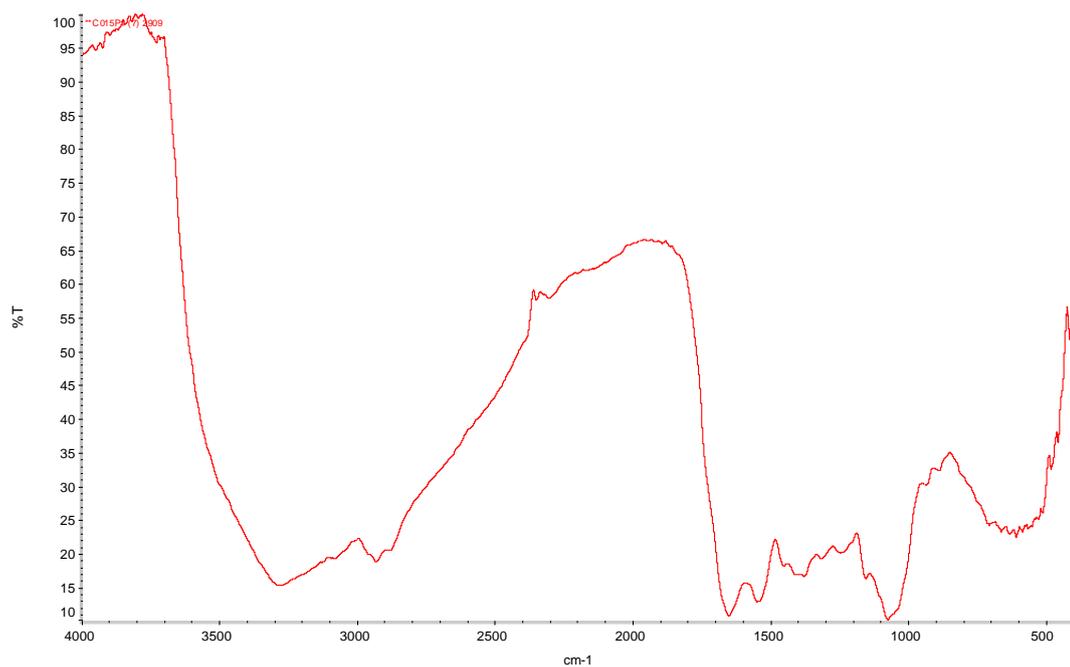
d)



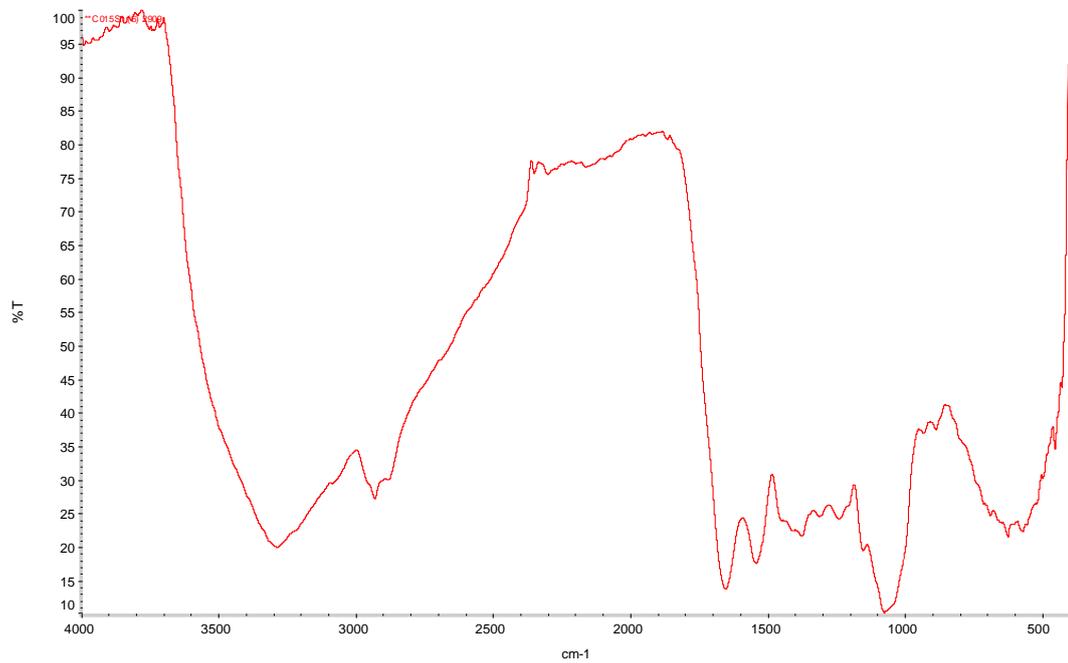
e)



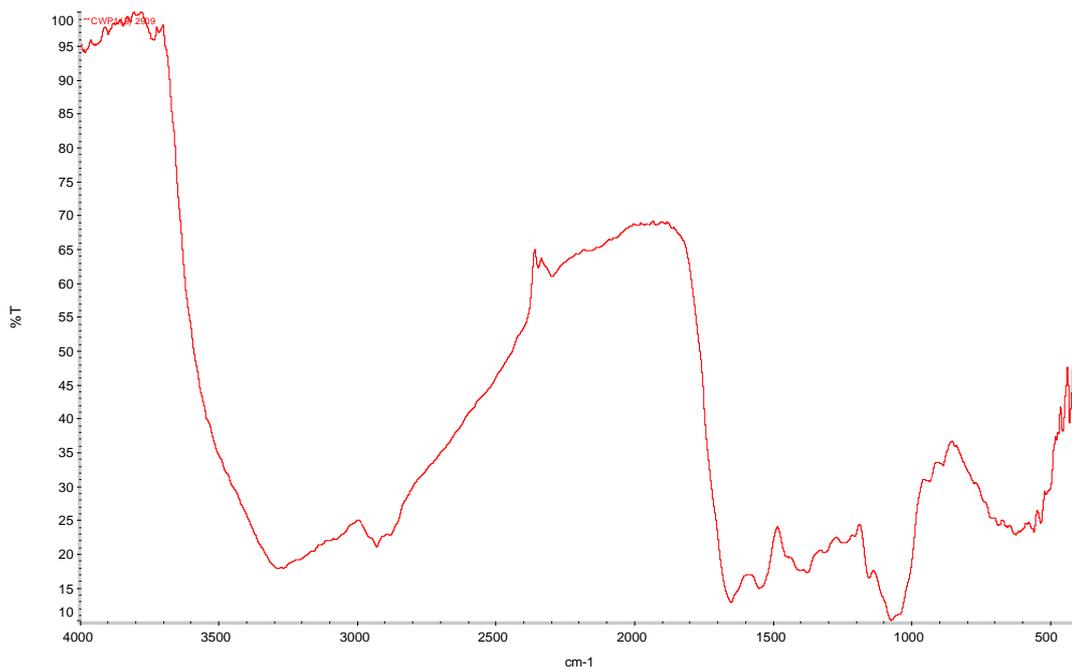
f)



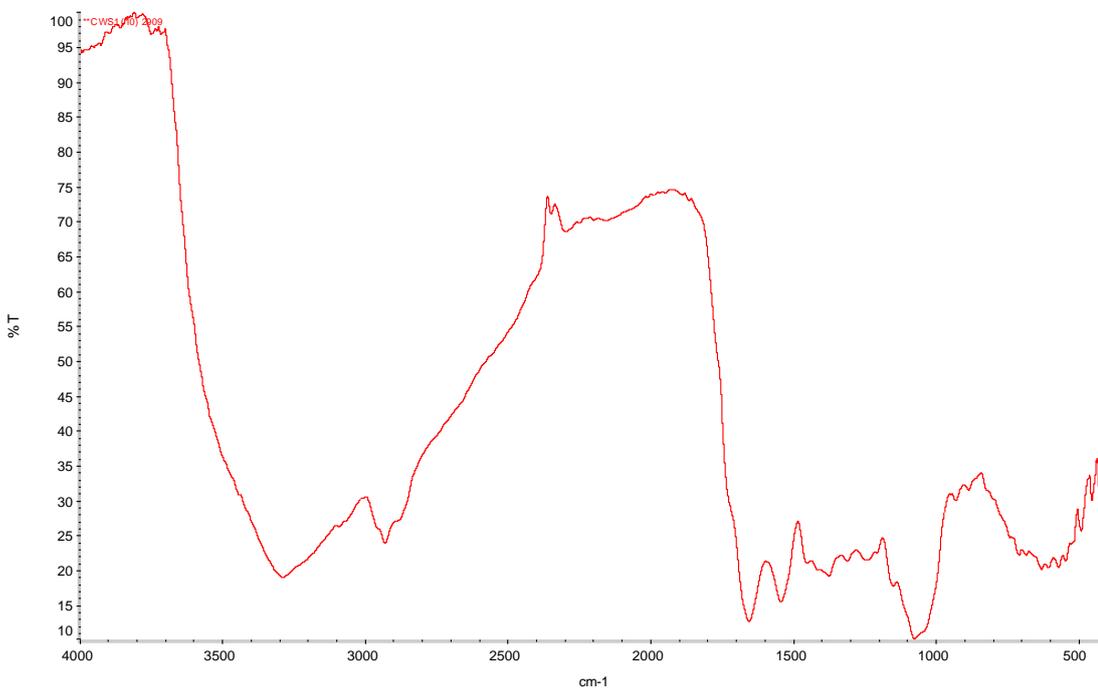
g)



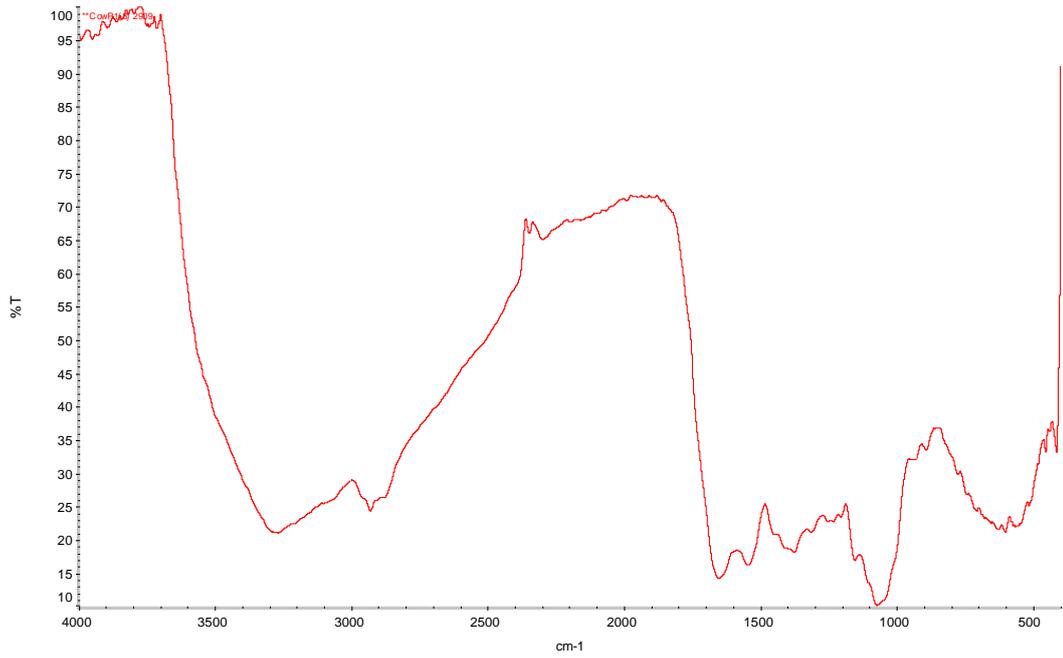
**h)**



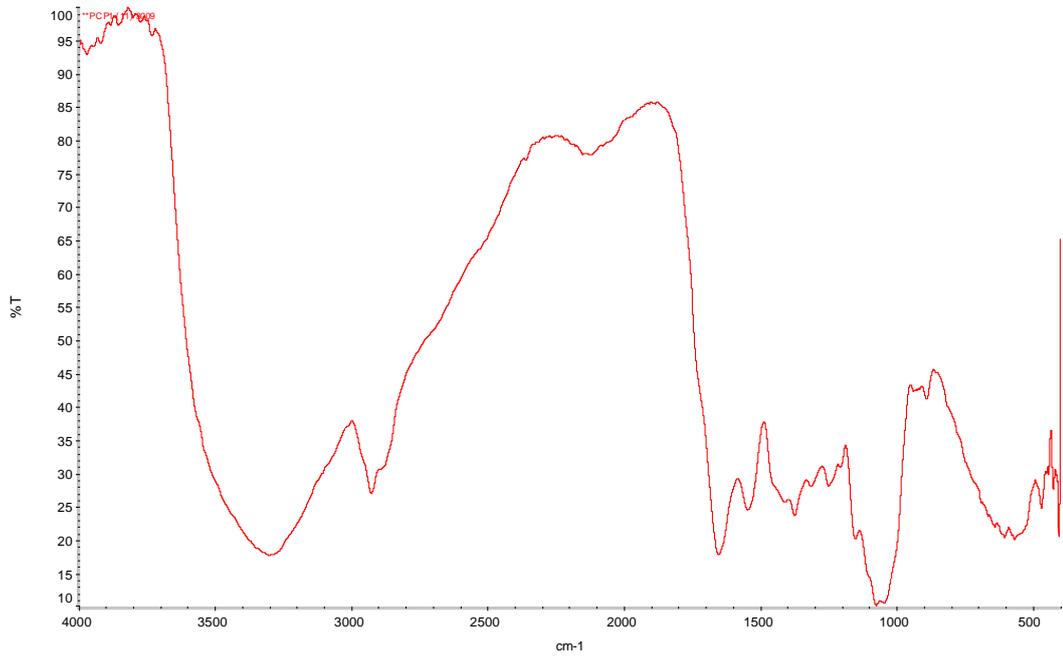
**i)**



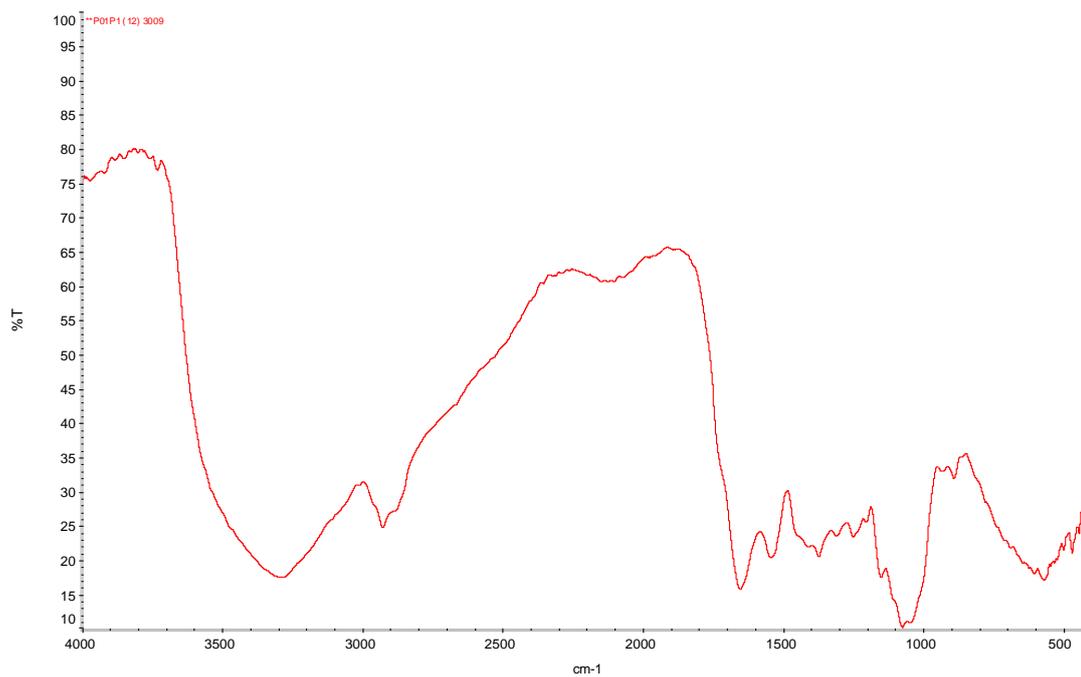
j)



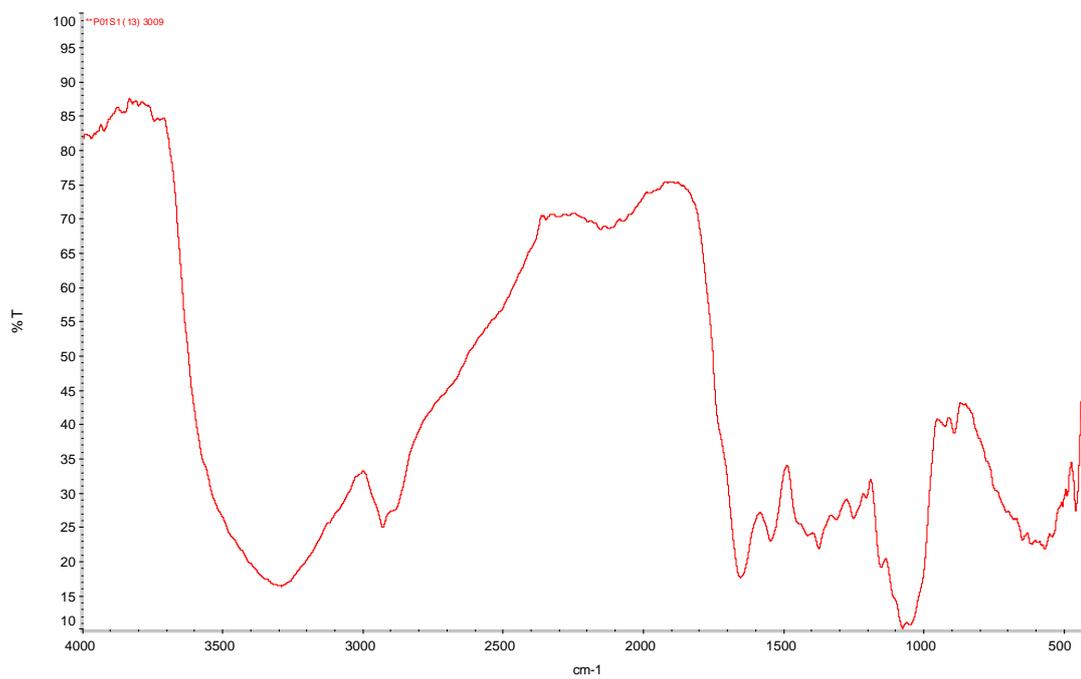
k)



l)



m)



n)

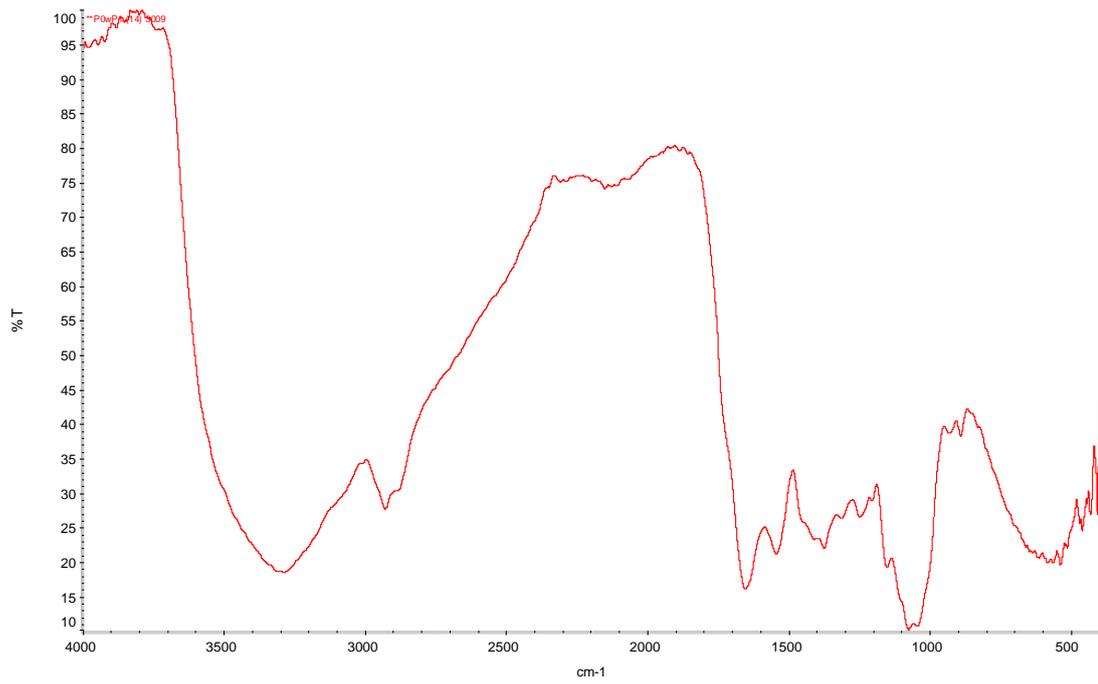


Figura 49: Espectros IR del basidiocarpio de *Ganoderma lucidum* cultivado en distintos sustratos

## ANEXO II: MEDIOS DE CULTIVO

**Agar Papa Dextrosa (PDA):** 4 g infusión de Papa, 20 g dextrosa y 15 g agar, por litro; pH: 5,6.

**Agar Sulfito-Polimixina-Sulfadiacina (SPS):** 0,5 g citrato férrico, 10 g extracto de levadura, 15 g hidrolizado pancreático de caseína, 0,01 g polimixina B sulfato, 0,12 g sulfadiacina, 0,5 g sulfito sódico, 0,1 g tioglicolato sódico y 15 g agar, por litro.

**Chromobrit® agar:** 10 g tripteína, 1 g piruvato de sodio, 5 g peptona de soya, 1 g nitrato de potasio, 1 g L-triptofano, 0,2 g lauril sulfato de sodio, 2,5 g fosfato dipotásico, 5 g extracto de levadura, 0,1 g X-GUD, 0,1 g Magenta GAL, 0,1 g IPTG y 15 g agar, por litro.

**Extracto levadura glucosa (YG):** 0,5 g extracto de levadura, 2 g glucosa, por litro.

**Infusión Cerebro Corazón (BHI):** 200 g infusión de cerebro de ternera, 250 g infusión corazón vacuno, 10 g peptona, 5 g cloruro de sodio, 2 g glucosa, 2,5 g fosfato disódico, por litro; pH: 7,4.

**KF streptococcus agar:** 10 g de digeridoo enzimático de tejido animal, 10 g extracto de levadura, 5 g cloruro de sodio, 10 g glicerofosfato de sodio, 20 g maltosa, 1 g lactosa, 0,4 azida de sodio, 0,015 g púrpura de bromocresol, 20 g agar, por litro; pH: 7,2.

**MEA (malta, levadura y sucrosa en agar):** 20 g extracto de malta, 2 g de extracto de levadura, 10 g sucrosa y 20 g agar, por litro; pH 6

**De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) completo:** 10 g proteosa peptona, 10 g extracto de carne, 5 g extracto de levadura, 20 g dextrosa, 1 g polisorbato 80, 2 g citrato de amonio, 5 g acetato de sodio, 0,1 g MgSO<sub>4</sub>, 0,05 g MnSO<sub>4</sub> y 2 g K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H, por litro.

**MRS base:** 0,5 g extracto de levadura, 1 g polisorbato 80, 2 g citrato de amonio, 5 g acetato de sodio, 0,1 g MgSO<sub>4</sub>, 0,05 g MnSO<sub>4</sub> y 2 g K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H por litro.

**Plate Count Agar (PCA):** 5 g triptona, 1 g dextrosa, 2,5 g extracto de levadura, 12 g agar, por litro; pH: 7,0

# PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESO REALIZADAS EN EL MARCO DE ESTA TESIS.

## TRABAJOS PUBLICADOS EN REVISTAS INTERNACIONALES

**Bidegain, M.A.**, Postemsky, P.D.; Pieroni, O.; Palma, S.; Cubitto, M.A. Relationship between *Ganoderma lucidum* cultivation conditions and the chemical composition of basidiomes. Formulation and evaluation of a nutraceutical suspension. *Trabajo en evaluación*.

**Bidegain, M. A.**, Cubitto, M. A., & Curvetto, N. R. (2015). Optimization of the Yield of Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes), Cultivated on a Sunflower Seed Hull Substrate Produced in Argentina: Effect of Olive Oil and Copper. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 17(11), 1095–1105. <http://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v17.i11.100>

Casoni AI, **Bidegain M**, Cubitto M a, Curvetto N, Volpe M a (2015) Pyrolysis of sunflower seed hulls for obtaining bio-oils. *Bioresource Technology* 177:406–409. doi: 10.1016/j.biortech.2014.11.105

Postemsky PD, **Bidegain MA**, González-Matute R, Figlas ND, Cubitto MA (2017) Pilot-scale bioconversion of rice and sunflower agro-residues into medicinal mushrooms and laccase enzymes through solid-state fermentation with *Ganoderma lucidum*. *Bioresource Technology* 231:85–93. doi: 10.1016/j.biortech.2017.01.064

## PATENTES

**Bidegain, M. A.**, Cubitto, M. A., Curvetto, N. R. & Palma, S. D. (2017). Método de obtención de una suspensión hidroalcohólica de *Ganoderma lucidum*. Tramitado en IMPI bajo el N° 20170100864. 05/04/2017

## TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS

### PRESENTACIÓN ORAL

1. **Bidegain, M.**; Postemsky P.; González Matute R.; Figlas D., Devalis R.; Delmastro S.; Pereyra Huertas C.; Curvetto N.; Cubitto MA. “Optimización de la Producción del Hongo Medicinal Reishi (*Ganoderma lucidum*) para el Desarrollo de Nutracéuticos y Fitoterápicos”. **V Jornadas Académicas RedVITEC**. Córdoba, 20 – 21 de Noviembre de 2014.

### PRESENTACIÓN DE PÓSTERS

1. Liberatti, J; **Bidegain MA**; Sica MG; Cubitto MA. “Evaluación del potencial prebiótico de la fracción de polisacáridos del hongo medicinal *Ganoderma lucidum* (Reishi) cultivado en sustrato e cáscara de girasol”. XCII Jornadas Argentinas de Microbiología y Jornadas Bioquímicas del Sur Argentino. Bahía Blanca, 7 – 9 de Junio de 2017.
2. Viceconte FR; Vela Gurovic MS; **Bidegain MA**; Cubitto MA. “Evaluación microbiológica del potencial antitumoral de extractos de *Ganoderma lucidum*.” XCII Jornadas Argentinas de Microbiología y Jornadas Bioquímicas del Sur Argentino. Bahía Blanca, 7 – 9 de Junio de 2017.
3. **Bidegain MA**; Sica, MG; Cubitto, MA. “Potencial prebiótico de polisacáridos del hongo medicinal *Ganoderma lucidum* (Reishi) sobre una cepa prebiótica de *Bacillus subtilis*. XIV Congreso Argentino de Microbiología. Rosario, 26 al 30 de Septiembre de 2016.
4. Postemsky, P.; **Bidegain, M.**; Devalis, R.; Figlas, D.; Gonzalez Matute, R.; Delmastro, S.; Curvetto, N.; Cubitto, MA. ”Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales del Arroz Para el Cultivo del Hongo Medicinal *Ganoderma lucidum*”. **V Jornadas Académicas RedVITEC**. Córdoba, 20 – 21 de Noviembre de 2014.
5. **Bidegain, M.**; Cubitto, M.; Brugnioni, L.; Sica, G.; Devalis, R.; Curvetto, R. “Efecto del aceite de oliva sobre el crecimiento del hongo medicinal Reishi (*Ganoderma lucidum*) cultivado en un sustrato a base de cáscara de semilla de girasol. **XIII Congreso**

- Argentino de Micología.** Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 24 a 27 de Agosto de 2014. Publicado en la revista Lilloa – Vol. 51 – Supl. I, pág 200, 2014.
6. Panelista en la **TERCERA JORNADA DE INTERCAMBIO DE PRODUCCIÓN CIENTÍFICO TECNOLÓGICA (III JIPCiTe)**, Bahía Blanca, 05 de Diciembre de 2013
  7. Ferronato, María J.; Obiol, Diego J.; **Bidegain, Maximiliano A.**; Gandini, Ariel N.; Alonso, Eliana N.; Salomón, Débora G.; Cubitto, María A.; Curvetto, Néstor R.; Curino, Alejandro C.; Facchinetti, María M. “Efectos de *Ganoderma lucidum* sobre líneas celulares de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello”. **LVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica**, Mar del Plata, 20 al 23 de Noviembre de 2013. Publicado en la revista Medicina – Vol. 73 – Supl. III, pag. 118, 2013.
  8. Formica, M; **Bidegain, M.**; Curvetto, N.; Cubitto, M.; Palma, S. “Uso de la criomolienda como alternativa en el diseño de formas farmacéuticas de *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst.”. **XLV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental**, Mar del Plata, 20 al 23 de Noviembre de 2013. Publicado en la revista Medicina, Vol. 73, Supl. III, pag. 157-158, 2013.
  9. **Bidegain, Maximiliano**; Cubitto, María Amelia; Curvetto, Néstor. “Obtención de triterpenoides de *Ganoderma lucidum* cultivado en un sustrato a base de cáscara de girasol”. **VIII Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología**, Mar del Plata, 18 al 22 de Noviembre de 2013.
  10. **Bidegain, Maximiliano**; Casoni, Andrés; Volpe, Mara; Curvetto, Néstor; Cubitto, María Amelia. “Transformación de la cáscara de girasol por *Ganoderma lucidum* para la obtención de productos útiles por pirólisis”. **VIII Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología**, Mar del Plata, 18 al 22 de Noviembre de 2013.
  11. Brugnoli, L. I.; Marucci, P. L., Sica, M. G.; **Bidegain, M.**, Cubitto, M. A. “Evaluación de un proceso de pasteurización de sustratos para el cultivo del hongo Reishi (*Ganoderma lucidum*)”, **XIII Congreso Argentino de Microbiología**, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 23 al 26 de Septiembre de 2013. Publicado en la Revista Argentina de Microbiología, Vol. 45, Supl. I, pag. 105.

12. **Bidegain, Maximiliano;** Casoni, Andrés; Volpe, Mara; Curvetto, Néstor; Cubitto, María Amelia. “Aprovechamiento de la cáscara de girasol en el cultivo de *Ganoderma lucidum* y obtención de productos por pirolisis del sustrato residual”. **I Jornada Anual de Intercambio de Becarios y Tesistas del CONICET Bahía Blanca “Medioambiente y Preservación”**, Bahía Blanca, 16 de Agosto de 2013.