

Tesis de Doctorado en Farmacia

**“Valoración farmacéutica y nutricional de cepas
de *Ganoderma* spp.”**

Fátima Regina Viceconte

Director/a: María Soledad Vela Gurovic

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Farmacia, de la Universidad Nacional del Sur, y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. 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 2018 y diciembre de 2022, bajo la dirección de la Dra. María Soledad Vela Gurovic. La presentación de este manuscrito fue llevada a cabo bajo la supervisión de la Dra. María Amelia Cubitto.

Farm. Fátima R. Viceconte



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Subsecretaría de Posgrado

La presente tesis ha sido aprobada el 23/05/2025
mereciendo la calificación de 10 (SOBRESALIENTE)

AGRADECIMIENTOS

Ardua veritatem, que puede traducirse como “a través de las dificultades hacia la verdad”, es el lema adoptado por la Universidad Nacional del Sur y que consta en su escudo oficial. En el camino transitado durante y a lo largo este trabajo de tesis, en ocasiones arduo, me encontré con personas valiosas a las que les estaré siempre agradecida. Muchos de los ensayos pudieron llevarse a cabo mediante un trabajo colaborativo. Quiero agradecer:

A la Universidad Nacional del Sur, por formarme académicamente, fomentar mi pensamiento crítico y expandir mi horizonte profesional.

Al CONICET, por el apoyo económico que posibilitó llevar a cabo este trabajo de investigación.

A María Amelia Cubitto y todo el LHCyM de CERZOS-CONICET (Pablo, Ramiro, Ricky, Débora, Maxi), donde inicié mi camino en la investigación. Por dedicar su tiempo en transmitir los conocimientos que necesité y ser de gran apoyo en momentos difíciles.

A Soledad Vela Gurovic por la dirección de todos los ensayos realizados y su significativo aporte en el campo de la química, la microbiología y la farmacia.

A María Inés Prat e integrantes de la cátedra de Inmunología-UNS (Marcelo, Ileana), por la coordinación de los ensayos inmunoquímicos y la cálida bienvenida en su laboratorio.

Al equipo del LIUC-UNS (Andrea, Nati, Anabella, Magalí), por su asistencia continua en los ensayos analíticos y su compañía en largas jornadas de trabajo.

A María Gabriela Sica, por su trato cordial y por recibirme tan amablemente en su laboratorio durante el desarrollo de los ensayos de actividad biológica.

A los integrantes de los distintos servicios UNS-CONICET: LANAQUI (Claudio), GENeTyC (Juan Rodrigo y Ana Clara), Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear (Tavo Fernández) y LABSPA. También a Diego Navarro (CIHIDECAR-UBA-CONICET).

A Cristian Gallo, por su ayuda desinteresada en el área de la bioinformática, y por su asistencia en problemas técnicos. También al grupo de investigación de Genética molecular y genómica vegetal de CERZOS-CONICET (Alicia Carrera, Marina Díaz y Daniela Soresi) y a Agustina Gutiérrez, por el trabajo en colaboración en la identificación molecular de las cepas en estudio.

A Viviana Cambi, por prestarme su disposición y ayuda académica en un momento difícil.

A Klaus Neuhaus y a Ilias Lagkouvardos, por el trabajo de secuenciación y análisis de datos durante el estudio de la microbiota intestinal.

A los amigos de siempre, los que me dejó la carrera de Farmacia y el CERZOS, por sus consejos, apoyo, y todo lo compartido. También a mis compañeros de oficina, de sala y a cada integrante del instituto y de la universidad; cada persona que me crucé en este camino estará siempre en mi memoria.

A mis papás, mis hermanos y mi cuñado, por la compañía, el aliento constante, y por creer en mi incluso en los momentos que yo no pude hacerlo.

A Fede, por su inmenso amor y por compartir su vida conmigo.

RESUMEN

Ganoderma spp. comprende varias especies de hongos reconocidos mundialmente por sus propiedades medicinales, como la estimulación física en situaciones de estrés, mejoras en el sistema inmunológico y la regulación del colesterol, siendo los polisacáridos y los terpenoides los principales compuestos bioactivos. La especie más conocida es *G. lucidum*, utilizada como remedio ancestral por más de 2000 años. En la última década, la comercialización de productos a base de *Ganoderma* y el mercado de suplementos dietarios con hongos medicinales ha experimentado mundialmente un aumento significativo, incluso en Argentina.

Recientemente en Argentina se han introducido diversos productos basados en *G. lucidum* destinados a mejorar funciones vitales. Si bien esta especie ha sido incluida recientemente en el Código Alimentario Argentino dentro de los hongos comestibles, estos productos carecen aún de una regulación específica. La taxonomía del género *Ganoderma* es compleja, lo que dificulta su completo desarrollo como producto medicinal. Por esto, resulta necesario combinar métodos morfológicos, quimiotaxonómicos y moleculares para una correcta identificación.

Esta tesis se propuso determinar los factores que influyen en la variabilidad de las propiedades medicinales y nutricionales de los suplementos alimentarios a base de *Ganoderma* spp. Además, se buscó establecer protocolos y procedimientos para controlar dichas variables, demostrar la seguridad y eficacia de los productos, y generar información necesaria para futuros estudios clínicos.

Se cultivaron seis cepas de *Ganoderma* en el Laboratorio de Hongos Comestibles y Medicinales del CERZOS (Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida CONICET/UNS), mediante fermentación en estado sólido. Cuatro de ellas mostraron un rendimiento prometedor de biomasa, y fueron identificadas taxonómicamente mediante métodos moleculares. Dos cepas fructificaron en sustrato sólido, mientras que las otras dos no pudieron obtenerse por este método, recurriéndose al cultivo líquido para obtener biomasa. Se realizaron análisis morfológicos, de

antagonismo y de perfiles proteicos para confirmar la identidad de las cepas. También, se analizó la composición nutricional y la inocuidad alimentaria de los micelios y basidiomas.

Las cepas identificadas fueron *G. sessile*, *G. lingzhi*, *G. oregonense*, y una perteneciente al género *Phellinus*. Se observaron diferencias en los rendimientos de biomasa y polisacáridos entre *G. sessile* y las otras especies en cultivo líquido. Este último método demostró ser más efectivo para la producción de polisacáridos en términos de duración y productividad. Las cepas se diferenciaron en el contenido de proteínas, carbohidratos y fibra dietaria total, mientras que todas mostraron un perfil de seguridad adecuado.

Finalmente, se aislaron, purificaron y analizaron químicamente los polisacáridos del cultivo líquido de *G. sessile*. Se estudió su efecto en la microbiota intestinal de voluntarios sanos mediante fermentación *in vitro*, empleando un producto comercial a base de *G. lucidum* como comparador. *G. sessile* resultó contener heteropolisacáridos complejos, disímiles a los hallados en *G. lucidum*. Las diferencias químicas se acompañaron con efectos diferenciales *in vitro*, donde los polisacáridos de *G. sessile* incrementaron significativamente la producción de metabolitos antiinflamatorios en todos los casos estudiados. *G. sessile*, especie frecuentemente recolectada en América, mostró ser prometedora para la producción de polisacáridos bioactivos y la fabricación de suplementos dietarios.

ABSTRACT

Ganoderma spp. includes several fungal species known for their medicinal properties, including physical stimulation in stressful situations, immune system improvements, and cholesterol regulation, with polysaccharides and terpenoides being the most bioactive components. *Ganoderma lucidum* is the most well-known species, having been used as an ancient remedy for over 2000 years. In the last decade, the commercialization of *Ganoderma* products and the market for dietary supplements containing medicinal mushrooms has seen a significant increase worldwide, including Argentina.

Several products based on *G. lucidum* have recently been introduced in Argentina with the goal of improving crucial health functions. Although this species has recently been included in the Argentine Food Code among edible mushrooms, these products still lack specific regulation. *Ganoderma* taxonomy is complex, which complicates its full development as a therapeutic product. The need of combining morphological, chemotaxonomic, and molecular methods for accurate identification has been emphasized.

This thesis aimed to identify the factors that influence the variability of the medicinal and nutritional properties of *Ganoderma* spp.-based food supplements. Furthermore, it sought to establish protocols and procedures for controlling these variables, demonstrating product security and efficacy, and generating data for future clinical studies.

Six *Ganoderma* strains were grown in the CERZOS Laboratory of Edible and Medicinal Fungi, by solid state fermentation. Four of these strains had promising biomass yield and were taxonomically identified using molecular methods. Two strains fructified in solid substrate, but the other two could not be obtained using this method, hence liquid cultivation was used to obtain biomass. Morphological, antagonism, and proteomic analyses were performed to confirm the identity of the strains. The nutritional composition and food safety of mycelia and basidiomes were also studied.

Strains were identified as *G. sessile*, *G. lingzhi*, *G. oregonense*, and one of them showed to belong to the *Phellinus* genus. There were differences in biomass and polysaccharide yields between *G. sessile* and other liquid-cultured strains. The liquid culture proved to be more efficient in terms of time and productivity for the production of polysaccharides. The strains differed in their protein, carbohydrate, and total fiber content, yet all demonstrated an appropriate safety profile.

Finally, polysaccharides from *G. sessile* liquid culture were isolated, purified, and chemically analyzed. The effect on the gut microbiota of healthy volunteers was studied using *in vitro* fermentation and a commercial product based on *G. lucidum* as a comparator. *G. sessile* had complex heteropolysaccharides, which were not found in *G. lucidum*. The chemical differences were accompanied by distinct *in vitro* effects, with *G. sessile* polysaccharides significantly increasing the production of antiinflammatory metabolites in all cases. *G. sessile*, a commonly collected species in America, has proven to be promising for the production of bioactive polysaccharides and the manufacture of dietary supplements.

ABREVIATURAS

p/p: peso en peso

p/v: peso en volumen

µg: Microgramo

µL: Microlitro

µm: Micrómetro.

µS: microsiemens

°C: Grados Celsius

a.C.: antes de Cristo

ADN: ácido desoxirribonucleico

ANOVA: Análisis de varianza

AOAC: *Association of Official Agricultural Chemists*

BHT: Butil Hidroxi Tolueno

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

BOLD: *Barcode of Life Data System*

BSA: Albúmina de suero bovino.

BSTFA: N,O-bis(trifluoro)acetamida.

CAA: Código Alimentario Argentino

CAZimes: Carbohydrate-Active enZymes

CD: Células dendríticas

CG-EM - Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas

CICUAE: Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación

CL: cultivo líquido

CL-IES-EM: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de ionización por electrospray

cm: Centímetro.

CS: *Ganoderma* sp. CS

d. C.: después de Cristo

d: día

DEAE-celulosa: Dietilaminoetil celulosa

d.i.: diámetro interno

DL₅₀: Dosis letal 50

DMAPP: Difosfato de Dimetilalilo.

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico (por su sigla en inglés)

E47: *Ganoderma* sp. E47

EC: Número de entrada enzimática (*Enzyme Commission*)

EFSA: *European Food Safety Authority*

EII: enfermedad inflamatoria intestinal

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EPS: Exopolisacáridos.

F/B: *Firmicutes/Bacteroidetes*

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

FD: Fibra Dietaria

FDA: *Food and Drug Administration*

FDA: Fibra Dietaria Ácida, en el análisis de fibra detergente

FDI: Fibra Dietaria Insoluble

FDN: Fibra Dietaria Neutra, en el análisis de fibra detergente

FDS: Fibra Dietaria Soluble

FDT: Fibra Dietaria Total

FES: Fermentación en Estado Sólido.

FP: *Ganoderma* sp. FP.

FT-IR: Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier

g: gramos

GA: Ácidos ganodéricos

GC-EM: Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (por sus siglas en inglés)

GK: *Ganoderma* sp. GLK.

GL PSP: *Ganoderma lucidum* polisacáridos purificados

GLM: *Ganoderma lingzhi* micelio

GO: *Ganoderma* sp. GO.

GPC: Cromatografía de Permeación en Gel

GPC-HPLC: Cromatografía de Permeación en Gel-Cromatografía Líquida de Alta Resolución

GRAS: *Generally Recognized as Safe*

GRN: Número de reconocimiento general

GS PSNP: *Ganoderma sessile* polisacáridos no purificados

GS PSP: *Ganoderma sessile* polisacáridos purificados

GS: *Ganoderma sessile*

GSB: *Ganoderma sessile* basidioma

GSM: *Ganoderma sessile* micelio

H: humedad

h: horas

HAMT: Heterótrofos aerobios mesófilos totales

HCl: Ácido Clorhídrico

HCyM: Hongos Comestibles y Medicinales.

HMBC: *Heteronuclear Multiple Bond Connectivity*

HPLC: cromatografía líquida de alta performance

HPSEC: Cromatografía de Exclusión de Tamaño de Alta Presión

HSQC: *Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy*

Hz: Hercio

IDR: Ingesta Diaria Recomendada

CGB: Clusters de Genes Biosintéticos

IFN- γ : Interferón gamma

IgA: Inmunoglobulina A

IKI: Iodo -KI (reactivo de Melzer).

IL-2: Interleucina 2

IL-4: Interleucina 4

IMC: Índice de Masa Corporal

IPP: Difosfato de Isopentenilo.

ISO: Organización Internacional de Normalización

ITS: *Internal Transcribed Spacer*

K-BGLU: *Mixed-linkage Beta-Glucan Assay (McCleary Method)*

kDa: Kilodaltons

KEGG: Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto

KOH: Hidróxido de Potasio

K-YBGL: *Beta-Glucan Assay (Yeast & Mushroom)*

L⁻¹: por litro

LB: Linfocitos B

LBHCyM: Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles y Medicinales

LEB: *Lentinula edodes* basidioma

LMR: Límite máximo para residuos

LSU: *Large Subunit*

LT: Linfocitos T

m: metros

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos

MeOH: Metanol

min: Minutos

ML: Máxima verosimilitud.

mL: Mililitros

mm Hg: Milímetros de mercurio

mm: Milímetro.

Mn: Peso molecular promedio numérico

Mp: Peso molecular en el máximo del pico

MTC: Medicina Tradicional China

Mw: Peso molecular promedio pesado

MYG: Extracto de malta, extracto de levadura, glucosa (medio líquido).

n.d.: no detectado

n.v.: nombre vulgar

N: nitrógeno

NF-kB: Factor nuclear kappa B

NK: Células asesinas naturales

NMP: Número Más Probable

NOAEL: Nivel sin efectos adversos observados

NOESY-ROESY: Espectroscopia de correlación nuclear

NRP: Péptidos No Ribosómicos.

Números CE: Números de clasificación de enzimas.

OMG: Organización Mundial de Gastroenterología

OMS: Organización Mundial de la Salud

OTU: Unidad Taxonómica Operativa.

PBS: Buffer fosfato salino.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PDA: *Potato Dextrose Agar* (Agar Papa-Dextrosa)

pH: potencial de hidrógeno

PK: Policétidos

PKC: Proteína quinasa C

POB: *Pleurotus ostreatus* basidioma

ppm: partes por millón

PPS: Pérdida por Secado

PS: Polisacáridos

PSGL: Polisacáridos de *Ganoderma lucidum*.

PSGS: Polisacáridos de *Ganoderma sessile*

PSHS: Polisacáridos Hidrosolubles.

PSP: Extracto purificado de polisacáridos

PULs: Loci de utilización de polisacáridos (por sus siglas en inglés)

Ref.: Referencia

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RNA: ácido ribonucleico (por su sigla en inglés)

rpb2: RNA polymerase II second largest subunit (Segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II)

R.U.: Reino Unido

s.l.: *sensu lato*

s.s.: *sensu stricto*

SCFA: Ácidos grasos de cadena corta

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio.

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

spp.: especies (plural)

T1-T7: Tratamientos 1-7

TA: Temperatura Ambiente

TBS: *Tris Buffered Saline*

TEF1- α : *Translation Elongation Factor 1-alpha*

TM: Tonelada de mercancía

TLR: Toll-like receptor

Tmax: Tiempo máximo (tiempo que tarda en alcanzar la concentración máxima)

TMF: Trasplante de microbiota fecal

UE: Unión Europea

UFC: Unidades formadoras de colonia

USP: *United States Pharmacopoeia*

UV: Ultravioleta

VPH: Virus del Papiloma Humano

vs.: versus (contra)

vvm: ventilación voluntaria máxima

WB: Western Blot (Inmunotransferencia)

Δ : Delta (indicando cambio o diferencia)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Usos culturales de los hongos.

Figura 2. Especies de HCyM con más publicaciones científicas hasta julio de 2021, según los criterios mencionados en el Anexo Introducción, Tabla 1.

Figura 3 A. Georreferenciación de las especies de HCyM más investigadas hasta julio de 2021, según la información publicada en bases de datos, siguiendo en los criterios mencionados en el Anexo Introducción, Tabla 1. B. Cantidad de especies por país. C. Variabilidad intraespecífica de las especies en estudio; se muestran las especies que presentaban hasta julio de 2021 un número de ingresos en *Mycobank* igual o superior al promedio (12).

Figura 4. Cultivo de hongos en la industria biotecnológica.

Figura 5. Esquema del cultivo mediante fermentación en estado sólido.

Figura 6. Crecimiento en test lineal (mm d⁻¹) de las cepas de *Ganoderma* spp. en los tratamientos T1-3 en el día número 18 de cultivo.

Figura 7. Fotografías del test lineal de crecimiento de las cepas de *Ganoderma* spp. en el tratamiento T2 en el día número 18 de cultivo.

Figura 8. Esquema del procedimiento empleado en el cultivo líquido de *Ganoderma* spp.

Figura 9. Basidiomas inmaduros de *Ganoderma* E47 (arriba) y *Ganoderma* E27 (abajo) creciendo en "troncos sintéticos" con sustrato de CSG (T2), durante el primer *flush* de crecimiento.

Figura 10. Rendimiento en biomasa y polisacáridos de las cepas de *Ganoderma* spp. fructificantes en FES, en g Kg⁻¹ de sustrato húmedo

Figura 11. Crecimiento lineal, en mm d⁻¹, del test lineal de las cepas *Ganoderma* spp. CS y *Ganoderma* spp. GO (izquierda). CS y GO en el día 21 de cultivo en sustrato T6 (derecha).

Figura 12. Cultivo sumergido de *Ganoderma* spp.

Figura 13. Estructura general de una espora fúngica.

Figura 14. Representación esquemática de parte del operón ADN_r que indica las posiciones de los cebadores utilizados para generar *primers* de ITS y LSU.

Figura 15. Morfología de *Ganoderma* sp. E47.

Figura 16. Morfología de los micelios de *Ganoderma* sp. GO (A) y *Ganoderma* sp. CS (B).

Figura 17. Árbol filogenético derivado del internal transcribed spacer (ITS) de cepas de *Phellinus* spp.

Figura 18. Árboles filogenéticos de 57 cepas de *Ganoderma* spp.

Figura 19. Árbol filogenético derivado del análisis del gen TEF1- α de 60 aislamientos de *Ganoderma* spp.

Figura 20. Test de antagonismo somático.

Figura 21. Titulación de anticuerpos específicos contra el basidioma de *Ganoderma* sp. E47.

Figura 22. Caracterización inmunoquímica de micelios y basidiomas.

Figura 23. Estructuras químicas de las vitaminas D2 y D3.

Figura 24. Esquema de la conversión del ergosterol en vitamina D2 vía radiación ultravioleta (UV).

Figura 25. A. Actividades biológicas y sus metabolitos responsables de los HCyM de mayor consumo y más investigadas hasta julio de 2021, según los criterios mencionados en el Anexo Introducción, Tabla 1. Entre paréntesis se indica el número de especies asociadas a la variable. B. Actividades biológicas y metabolitos discriminados por especie.

Figura 26. Representación del modelo de sándwich propuesto para la pared celular de *Pleurotus tuber-regium* de acuerdo a extracciones secuenciales realizadas sobre el basidioma, con los porcentajes relativos de las correspondientes capas, según lo reportado por Chen y Cheung (2014).

Figura 27. Representación de las diferencias estructurales de los betaglucanos según su fuente de origen.

Figura 28. Resumen de los procedimientos analíticos sobre los polisacáridos del cultivo líquido de *G. sessile* E47.

Figura 29. Aspecto de los polisacáridos de *G. sessile* E47 obtenidos en cultivo líquido luego de su precipitación y post-liofilización y molienda.

Figura 30. Perfil obtenido en DEAE-celulosa de los polisacáridos de *G. sessile* E47 obtenidos en cultivo líquido, eluidos con agua y con concentraciones crecientes de NaCl.

Figura 31. Cromatogramas obtenidos en columna Sephadex G-200 de cada una de las fracciones separadas mediante DEAE-celulosa (a-d para las fracciones A-D).

Figura 32. Cromatogramas obtenidos mediante GP-HPLC de las fracciones purificadas A D

Figura 33. Cromatogramas obtenidos del análisis de monosacáridos mediante CG-EM de los polisacáridos purificados de *G. lucidum* (GL PSP), y del CL de *G. sessile* E47 (GS PSP) junto con sus fracciones FA-FD.

Figura 34. Espectros HSQC de los polisacáridos purificados de *G. lucidum* (GL PSP), y del CL de *G. sessile* E47 (GS PSP) junto con sus fracciones FA-FD en la región de carbonos anoméricos en tres regiones del espectro (1-3).

Figura 35. Espectros HSQC en la región de carbonos anoméricos de los polisacáridos extraídos de los basidiomas de *G. sessile* E47 (GSB), *P. ostreatus* P04 (POB) y *L. edodes* L15 (LEB), y de los micelios de *G. sessile* E47 (GSM), *G. lingzhi* CS (GLM) y *G. oregonense* GO (GOM), obtenidos a 300K en D2O con la adición de 5 % DMSO-d₆ para su calibración.

Figura 36. Representación gráfica de la composición porcentual de los polisacáridos crudos y purificados del cultivo líquido de *G. sessile* E47 en base a los resultados de los métodos K-YBGL y K-BGLU, y del análisis de monosacáridos.

Figura 37. Espectros HSQC y HMBC en tres regiones, con sus correlaciones asignadas, del extracto de triterpenoides obtenido de basidiomas de *G. sessile* E47.

Figura 38. Mecanismos directos e indirectos de los metabolitos bacterianos y su rol en el mantenimiento de la integridad intestinal.

Figura 39. Mecanismos de síntesis de SCFA a partir del metabolismo de los carbohidratos

Figura 41. Perfiles taxonómicos basales.

Figura 42. ACoP por individuo

Figura 43. Diversidad alfa por individuo

Figura 44. Efecto de los polisacáridos en la composición microbiana.

Figura 45. Relación *Firmicutes/Bacteroidetes* en cada uno de los controles y tratamientos.

Figura 46. Niveles de SCFA acetato, propionato y butirato, en mg g⁻¹ de materia fecal.

Figura 47. Resultados del análisis de correlación, por individuo, entre cada SCFA y las contribuciones enzimáticas incrementadas significativamente en el tratamiento con PSGS.

Anexo 1, Figura 1. Árboles obtenidos de los análisis filogenéticos derivados de LSU (arriba) y β -tubulina (abajo) para *Ganoderma* spp.

Anexo 1, Figura 2. Estructuras secundarias predichas de las moléculas de ARNr, región ITS1.

Anexo 1, Figura 3. Confirmación de la compatibilidad somática para cada una de las cepas de *Ganoderma* en estudio.

Anexo 1, Figura 4. Western Blot de inhibición.

Anexo 2, Figura 1. Equipo de extracción Soxhlet empleado en este estudio.

Anexo 2, Figura 2. Determinación de proteínas.

Anexo 2, Figura 3. Cromatogramas correspondientes a los estándares de las vitaminas detectadas, junto con los espectros de absorción extraídos en los tiempos de retención correspondientes a cada vitamina.

Anexo 2, Figura 4. Cromatogramas correspondientes al análisis de vitaminas hidrosolubles en basidiomas de: A) *Ganoderma sessile* E47, B) *Pleurotus ostreatus* P04 y C) *Lentinula edodes* L15, con los espectros de absorción extraídos en los tiempos de retención correspondientes a cada vitamina.

Anexo 2, Figura 5. Análisis de vitamina E mediante CG-EM.

Anexo 2, Figura 6. Cromatogramas obtenidos por CG-EM de: 1) estándar de metil éster de ácido linoleico, y 2) de muestras de ácidos grasos correspondientes a basidiomas de: A) *Ganoderma sessile* E47, B) *Pleurotus ostreatus* P04 y C) *Lentinula edodes* L15.

Anexo 2, Figura 7. Cromatogramas obtenidos por CG-EM de los perfiles de esteroides y espectros de masas extraídos a los tiempos de retención correspondientes al basidioma de *Ganoderma sessile* E47.

Anexo 2, Figura 8. Cromatogramas obtenidos por CG-EM de los perfiles de esteroides y los espectros de masas extraídos a los tiempos de retención correspondiente al basidioma de *Pleurotus ostreatus* P04.

Anexo 2, Figura 9. Cromatogramas obtenidos por CG-EM de los perfiles de esteroides y los espectros de masas extraídos a los tiempos de retención correspondiente al basidioma de *Lentinula edodes* L15.

Anexo 2, Figura 10. Cromatogramas obtenidos por CG-EM de los estándares de pesticidas determinados sobre la matriz de trabajo (A), y los correspondientes espectros de masas extraídos a los tiempos de retención de cada compuesto (B).

Anexo 2, Figura 11. Cromatogramas obtenidos por CG-EM de los basidiomas de: A. *Ganoderma sessile* E47, B. *Pleurotus ostreatus* P04 y C. *Lentinula edodes* L15 luego del análisis de pesticidas.

Anexo 3, Figura 1. A. Secuencia de la separación de las fracciones A-D en columna de DEAE-celulosa. B. Aspecto de las fracciones A-D.

Anexo 3, Figura 2. Cromatograma de los estándares de dextrano empleados para la calibración en la determinación de peso molecular por GPC.

Anexo 3, Figura 3. Análisis de monosacáridos. A) Cromatograma de los estándares de monosacáridos obtenido mediante GC-EM de los derivados acetilados, y B) sus espectros de masas correspondientes.

Anexo 3, Figura 4. Análisis de monosacáridos. Espectros de masas correspondientes a los monosacáridos identificados en los polisacáridos purificados del cultivo líquido de *G. sessile* E47.

Anexo 3, Figura 5. Espectro HSQC completo de polisacáridos purificados de *G. sessile* E47. Se presenta en un recuadro una región del espectro ^{13}C -NMR para más detalle.

Anexo 3, Figura 6. Espectro HSQC completo de las fracciones A-D de los polisacáridos purificados de *G. sessile* E47. Se presenta en recuadros regiones de los espectros ^{13}C -NMR para más detalle.

Anexo 3, Figura 8. A. Aspecto del extracto de triterpenos aislados de los basidiomas de *G. sessile* E47 disueltos en el solvente deuterado. B. Sus correspondientes espectros de ^1H -NMR y ^{13}C -NMR.

Anexo 3, Figura 9. Espectros HSQC y HMBC completos de los triterpenos aislados de los basidiomas de *G. sessile* E47.

Anexo 4, Figura 1. Geles de agarosa de las muestras extraídas de ADN.

Anexo 4, Figura 2. Cromatogramas correspondientes a la separación de SCFA mediante cromatografía gaseosa.

Anexo 4, Figura 3. Índices A y B, calculados para cada individuo en relación a los niveles de SCFA antes y después de la fermentación.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proveniencia de las cepas empleadas en este estudio y su inicial denominación.

Tabla 2. Composición proximal de los hongos en estudio. Los valores se expresan en g 100 g⁻¹ de peso seco.

Tabla 3. Contenido de fibra (mg Kg⁻¹ peso seco) y polisacáridos hidrosolubles (% p/p peso seco) de las cepas estudiadas, y su comparación con valores reportados para setas comerciales y silvestres.

Tabla 4. Fibra dietaria determinada mediante el método de detergentes (ANKOM).

Tabla 5. Composición de minerales de basidiomas de *G. sessile* y micelios (M) de *Ganoderma* spp. cultivados.

Tabla 6. Contenido de vitaminas hidro y liposolubles, en mg 100 g⁻¹ de peso seco, y su comparación con valores reportados para setas silvestres y comerciales.

Tabla 7. Composición de ácidos grasos y esteroides en muestras de basidiomas de *G. sessile*, *P. ostreatus* y *L. edodes*.

Tabla 8. Parámetros derivados de la curva de calibrado construida para cada pesticida y sus parámetros de calidad verificados.

Tabla 9. Resultados obtenidos en la determinación de pesticidas en basidiomas de *G. sessile*, *P. ostreatus* y *L. edodes*.

Tabla 10. Contenido de metales pesados en basidiomas de *G. sessile*, *P. ostreatus* y *L. edodes*, y en micelios de cepas de *Ganoderma* spp., y su comparación con los límites establecidos por entidades regulatorias.

Tabla 11. Resultados del análisis microbiológico de basidiomas y micelios de *Ganoderma* spp., junto con basidiomas de *P. ostreatus* y *L. edodes*, y su comparación con los límites establecidos por entidades regulatorias.

Tabla 12. Análisis de monosacáridos mediante CG-EM.

Tabla 13. Correlaciones H/C obtenidas de los espectros HSQC de los polisacáridos purificados del CL de *G. sessile*, y extraídos de *G. lucidum*.

Tabla 14. Asignaciones de las correlaciones H/C (ppm) obtenidas de los espectros HSQC de los polisacáridos purificados del CL de *G. sessile* de acuerdo a los átomos de la molécula.

Tabla 15. Análisis nutricional de los polisacáridos obtenidos por precipitación del sobrenadante del cultivo líquido de *Ganoderma sessile* E47.

Tabla 16. Análisis de fibra de los polisacáridos no purificados del cultivo líquido de *G. sessile* (g 100 g⁻¹ SBS*).

Tabla 17. Cuantificación de glucanos por los métodos K-YBGL y K-BGLU, en mg 100 g⁻¹ secos.

Tabla 18. Correlaciones de los espectros de HSQC y HMBC que permiten clasificar a los triterpenoides de *Ganoderma* según Huang *et al.* (2020).

Anexo Introducción, Tabla 1. *Dataset* de las especies de HCyM de mayor consumo y más investigadas en el mundo.

Anexo 1, Tabla 1. Lista de los números de acceso y referencias de las secuencias empleadas en el análisis filogenético derivado del *internal transcribed spacer* (ITS) para *Phellinus* spp.

Anexo 1, Tabla 2. Lista de los números de acceso y referencias de las secuencias empleadas en los análisis filogenéticos derivados de ITS, TEF1- α , LSU y β -tubulina para *Ganoderma* spp.

Anexo 2, Tabla 1. Longitudes de onda de los máximos de absorción y tiempos de retención correspondientes a las vitaminas hidrosolubles analizadas.

Anexo 2, Tabla 2. Longitudes de onda de los máximos de absorción y tiempos de retención correspondientes a las vitaminas D2 y D3.

Anexo 2, Tabla 3. Tiempos de retención y pesos moleculares de los ácidos grasos identificados.

Anexo 2, Tabla 4. Tiempos de retención y pesos moleculares de los esteroides identificados.

Anexo 2, Tabla 5. Comparación entre la composición porcentual de los basidiomas de los hongos analizados en este estudio y lo reportado en bibliografía.

Anexo 2, Tabla 6. Comparación entre la composición porcentual de los micelios de los hongos analizados en este estudio y lo reportado en bibliografía para el micelio de *G. lucidum*.

Anexo 2, Tabla 8. Comparación entre los métodos de análisis de fibra más empleados.

Anexo 2, Tabla 9. Comparación entre los requerimientos microbiológicos establecidos en la Farmacopea Estadounidense (USP) en su monografía para el polvo de *G. lucidum* y en su apartado para suplementos dietarios no estériles, y por la Farmacopea Argentina (FNA) en su sección para productos no estrictamente estériles.

Anexo 2, Tabla 10. Microorganismos analizados y medios de cultivo empleados en el análisis de calidad microbiológica, según indicado en USP- USP-NF 2006 (USP 29-NF 24), Microbial enumeration tests, nutritional and dietary supplements <2021>.

Anexo 3, Tabla 1. Valores de Mp, Mn, Mw y Mz de las fracciones A-D obtenidas mediante cromatografía en DEAE-celulosa de los polisacáridos de *G. sessile* E47 en cultivo líquido.

Anexo 4, Tabla 1. Datos asociados a los individuos donantes de materia fecal.

Anexo 4, Tabla 2. Resultados de la cuantificación y análisis de calidad del ADN, número de unidades taxonómicas y número de lecturas (*reads*) por muestra analizada post secuenciación de la región V3-V4 del gen 16S.

Anexo 4, Tabla 3. Abundancias relativas de los géneros determinantes de los enterotipos en los individuos analizados según Arumugam *et al.* (2011) y Yang *et al.* (2019).

Anexo 4, Tabla 4. Enzimas relacionadas con la síntesis y/o el metabolismo de los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) y con el metabolismo de los carbohidratos (CARB) cuyas contribuciones

dentro del microbioma, predichas por PICRUSt, mostraron incrementos en la fermentación con los PS de *G. sessile* E47.

Anexo 4, Tabla 5. Contribuciones microbianas a enzimas involucradas en la síntesis y/o metabolismo de los SCFA, y sus incrementos respecto a los controles en los individuos en las fermentaciones con los polisacáridos de *G. sessile* E47 (PSGS) y *G. lucidum* (PSGL).

Anexo 4, Tabla 6. Contribuciones microbianas a enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, y sus incrementos respecto a los controles en los individuos en las fermentaciones con los polisacáridos de *G. sessile* E47(PSGS) y *G. lucidum* (PSGL).

Anexo 4, Tabla 7. Incrementos promedio de SCFA acetato (Acet.), propionato (Prop.), butirato (But.), isobutirato (Isobut.), isovalerato (Isoval.) y valerato (Val.), por individuo, observados luego de la fermentación con los polisacáridos de *G. sessile* E47 (PSGS) y de *G. lucidum* (PSGL).

CONTENIDO

Prefacio	ii
Agradecimientos	iii
Resumen	v
Abstract	vii
Abreviaturas	ix
Índice de figuras	xv
Índice de tablas	xxi
1. Introducción.....	1
1.1. La biología de los hongos y sus funciones en el ecosistema.....	2
1.2. Hongos funcionales para el ser humano: usos culturales, recolección y producción industrial.....	4
1.2.1. Hongos comestibles y medicinales: especies de mayor consumo y más investigadas en el mundo.....	7
1.2.2. Relevancia de <i>Ganoderma lucidum</i> entre los hongos medicinales.....	10
Potencial medicinal, tamaño del mercado y estado regulatorio.....	12
1.3. Riesgos asociados a los macromicetos.....	14
1.3.1. Los macromicetos como patógenos.....	14
Bioseguridad de <i>Ganoderma</i>	15
1.3.2. Intoxicaciones producidas por macromicetos. Importancia del control de calidad del sustrato en hongos de consumo.....	16
1.4. Objetivos de la tesis.....	18
2. Capítulo 1. Cultivo e identificación de cepas de <i>Ganoderma</i> spp.	19
2.1. Parte I. Obtención de biomasa mediante fermentación en estado sólido (FES)	20
2.1.1. Introducción.....	20
La fermentación en estado sólido (FES).....	22
2.1.2. Objetivo	26
2.1.3. Materiales y métodos.....	27
Selección de cepas mediante test de crecimiento lineal en sustratos lignocelulósicos.....	27
Test lineal de crecimiento.....	27
Escalado en "troncos sintéticos".....	28
2.1.4. Análisis estadístico	29
2.1.5. Resultados y discusión	30
2.2. Parte II. Cultivo de cepas no fructificantes en FES	32
2.2.1. Introducción.....	32

El cultivo líquido o sumergido.....	32
2.2.2.Objetivo.....	34
2.2.3.Materiales y métodos.....	35
Test lineal de crecimiento en sustratos adicionales.....	35
Cultivo líquido.....	35
2.2.4.Análisis estadístico.....	37
2.2.5.Resultados	37
2.3. Parte III. Identificación taxonómica de las cepas cultivadas.	39
2.3.1.Introducción.....	39
Análisis morfológico.....	40
Test de antagonismo entre cepas.....	41
Análisis filogenético.....	42
Caracterización inmunoquímica.....	44
2.3.2.Objetivo.....	45
2.3.3.Materiales y métodos.....	45
Análisis morfológico.....	45
Análisis filogenético.....	46
Test de antagonismo entre cepas.....	47
Caracterización inmunoquímica.....	47
2.3.4.Disponibilidad de los datos en plataformas públicas.....	50
2.3.5.Resultados.....	50
Análisis morfológico.....	50
Análisis filogenético.....	53
Test de antagonismo entre cepas.....	56
Caracterización inmunoquímica.....	57
2.4. Discusión general.....	59
2.5. Conclusiones.....	64
3. Capítulo 2. Análisis nutricional y de inocuidad alimentaria.....	66
3.1. Parte I. Análisis nutricional	67
3.1.1.Introducción.....	67
Diferencias en la composición química entre estructuras fúngicas.....	68
3.1.2.Objetivo.....	69
3.1.3.Materiales y métodos.....	70
Análisis de la composición nutricional.....	70
Fibra dietaria.....	70
Polisacáridos hidrosolubles.....	70

Análisis elemental.....	71
Cuantificación de vitaminas.....	71
Perfil de ácidos grasos y esteroides.....	72
3.1.4. Análisis estadístico.....	73
3.1.5. Resultados y discusión.....	73
Análisis nutricional.....	73
Contenido de fibra dietaria y polisacáridos hidrosolubles.....	75
Análisis elemental.....	79
Contenido de vitaminas hidro y liposolubles.....	80
Perfil de ácidos grasos y esteroides.....	83
3.2. Parte II. Inocuidad alimentaria.....	84
3.2.1. Análisis de pesticidas provenientes de sustrato sólido.....	84
Introducción.....	84
Objetivo.....	85
Materiales y métodos.....	86
Análisis estadístico.....	87
Resultados y discusión.....	87
3.2.2. Contenido de metales pesados.....	89
Introducción.....	89
Objetivo.....	90
Materiales y métodos.....	90
Resultados y discusión.....	90
3.2.3. Calidad microbiológica.....	92
Introducción.....	92
Objetivo.....	93
Materiales y métodos.....	93
Análisis estadístico.....	93
Resultados y discusión.....	94
3.3. Conclusiones generales.....	96
4. Capítulo 3. Caracterización de principios activos.....	97
4.1. Introducción.....	98
4.1.1. Los polisacáridos en los macromicetos.....	100
Extracción, purificación y elucidación estructural de los polisacáridos.....	106
4.1.2. Triterpenos y triterpenoides.....	108
4.2. Objetivo.....	111
4.3. Materiales y métodos.....	111
4.3.1. Análisis de polisacáridos.....	111

Extracción de polisacáridos.....	112
Purificación y fraccionamiento.....	112
Análisis de distribución de peso molecular.....	112
Análisis de monosacáridos.....	113
Análisis de polisacáridos por RMN.....	113
Análisis nutricional.....	114
Cuantificación de β -glucanos.....	114
Comparaciones con material de referencia.....	114
4.3.2. Análisis de compuestos triterpenoides por RMN.....	115
Extracción de triterpenoides.....	115
Análisis por RMN.....	115
4.4. Resultados y discusión.....	115
Análisis de polisacáridos.....	115
Análisis de triterpenoides.....	128
4.5. Conclusión.....	131
5. Capítulo 4. Evaluación de la potencia biológica.....	132
5.1. Introducción.....	133
5.1.1. <i>Ganoderma</i> en el estado de salud y de enfermedad.....	133
5.1.2. Polisacáridos de <i>Ganoderma</i> en el mantenimiento de la salud.....	136
5.1.3. Seguridad del consumo de productos a base de <i>Ganoderma</i>	139
Seguridad del consumo de polisacáridos de <i>Ganoderma</i>	141
5.1.4. Otros componentes bioactivos de <i>Ganoderma</i>	143
5.1.5. La microbiota. Idea de holobiontes.....	145
Microbiota y salud.....	146
Clasificación de la microbiota intestinal.....	149
Metabolismo bacteriano.....	150
Síntesis de SCFA a partir de la degradación de los carbohidratos.....	154
Modelos de estudio de la microbiota intestinal.....	156
Terapias basadas en el microbioma.....	157
5.2. Objetivo e hipótesis	160
5.3. Materiales y métodos.....	161
5.3.1. Preparación de polisacáridos.....	161
5.3.2. Fermentación in vitro.....	162
Recolección de muestras fecales.....	162
Fermentación.....	162
Análisis de SCFA.....	163
Extracción de ADN y secuenciación.....	164

Análisis del amplicón del gen ARNr 16S	164
5.3.3. Análisis de datos y estadística.....	165
5.3.4. Análisis del potencial metabólico.....	166
5.4. Resultados y discusión.....	166
5.4.1. Análisis de los perfiles taxonómicos basales.....	166
5.4.2. Efecto de los polisacáridos en el consorcio bacteriano.....	168
5.4.3. Efecto de los polisacáridos en la producción de metabolitos bioactivos.....	175
5.4.4. Análisis de correlación entre variables.....	178
5.5. Conclusión.....	183
6. Conclusiones finales y perspectivas.....	185
7. Referencias.....	188
Anexo Introducción.....	231
Anexo 1.....	235
Anexo 2.....	252
Anexo 3.....	277
Anexo 4.....	284
Producción científica en el marco de esta tesis.....	295
Financiamiento.....	296



1. Introducción

*“ ¿Qué haces cuando tu mundo empieza a desmoronarse?
Yo salgo a pasear, y,
si tengo mucha suerte,
encuentro algún que otro hongo.
Me devuelven el ánimo;
no solo –como las flores– por sus abrumadores colores y olores,
sino porque además brotan de forma inesperada,
recordándome mi buena fortuna por estar allí
justo en ese momento. ”*
Anna Lowenhaupt Tsing,
Los hongos del fin del mundo.
Sobre la posibilidad de vida en las ruinas capitalistas

1.1. La biología de los hongos y sus funciones en el ecosistema

Los hongos se han definido como un grupo de organismos eucariotas, sin clorofila, con nutrición heterótrofa, unicelulares (levaduras) o multicelulares (hongos micro y macrofilamentosos). Los multicelulares típicamente crecen como hifas, con crecimiento apical, aunque veces pueden aparecer como levaduras. Los hongos poseen características suficientes y significativamente diferentes a las plantas y los animales para ser ubicados en un reino separado: el Reino *Fungi*. Dentro de este conjunto se incluyen varios linajes de organismos eucariotas filogenéticamente no relacionados, uno de ellos conocido como hongos verdaderos o *fungi sensu stricto*, grupo monofilético compuesto por Basidiomycota, Ascomycota, Zygomycota y Chytridiomycota. Los macromicetes, o Macromycetes, constituyen un grupo de organismos del reino *Fungi* generalmente pertenecientes a las divisiones Ascomycota y Basidiomycota que, en condiciones especiales, desarrollan un esporocarpo ("seta") que crece debajo del suelo (hipogeo) o sobre el suelo (epigeo) (Rathore *et al.*, 2019, Singh y Passari, 2018). En los últimos diez años, las nuevas tecnologías de secuenciación de ADN han revolucionado los estudios de taxonomía y diversidad de hongos, lo que ha permitido estimar un número de especies entre 11,7 a 13,2 millones, frente al 1,5 estimado en el año 2002 (Redecker, 2002). No obstante, hasta la fecha sólo han sido descritas alrededor de 150000 (Hyde, 2022).

Los hongos se encuentran en todos los ecosistemas y muestran una gran diversidad de estilos de vida, viviendo como saprobios de materia orgánica en descomposición o en simbiosis con otros organismos. Normalmente, las hifas de los hongos filamentosos se alejan unas de otras para formar la típica colonia, con un frente de crecimiento centrífugo. Este crecimiento de hifas puede ocurrir con o sin separación de los compartimentos celulares de la pared celular, lo que se conoce como tabicación (Powers-Fletcher *et al.*, 2016). El crecimiento apical continuo da como resultado una red compleja de hifas denominada micelio, un organismo exploratorio e invasivo. Las esporas son productos de la reproducción sexual y asexual, y actúan como unidades principales de dispersión en los hongos. La mayoría de las esporas que se depositan en un sustrato apropiado, en condiciones ambientales favorables, germinan para producir uno o más tubos germinales y un

nuevo micelio fúngico. Excepto en las especies estériles, las esporas de todos los hongos pueden entrar en una fase latente, durante la cual el metabolismo se reduce aproximadamente en un 50 %. En las primeras etapas de la fase vegetativa, durante la germinación de la espora, pueden ocurrir fusiones entre los tubos germinales de las esporas agrupadas. Posteriormente, en el interior de la colonia vegetativa en maduración, se producen numerosas fusiones de hifas, lo cual resulta esencial para la comunicación dentro de la colonia, la translocación de agua y nutrientes, y el mantenimiento de la homeostasis (Trinci *et al.*, 2001). Asimismo, de ocurrir fusión entre hifas de dos progenitores, comenzará el ciclo sexual, que conducirá también a anastomosis, pero esta vez en estructuras especializadas, los esporocarpos. Así, lo que comúnmente se conoce como hongo es en realidad un organismo con tres estructuras distintas: esporas, micelio y seta o esporocarpo.

Se ha postulado que los animales estarían más estrechamente relacionados con los hongos que con cualquier otro reino. Los hongos llegaron a la tierra hace más de mil millones de años, desarrollando la capacidad de digerir los alimentos externamente mediante la secreción de ácidos y enzimas en su entorno inmediato, y luego absorbiendo nutrientes mediante cadenas celulares en forma de red, el micelio. Muchos de ellos se asociaron con plantas en una alianza que habría permitido que estas habitaran la tierra hace unos 700 millones de años, aprovechando la capacidad degradativa de los hongos de la que carecían (Heckman *et al.*, 2001; Redecker, 2002). Se ha propuesto la existencia un clado monofilético de organismos eucariotas que son ancestros comunes de algunas formas unicelulares flageladas junto a los hongos verdaderos (*Fungi*) y los animales verdaderos (*Animalia*), los opistocontes. Un rasgo característico de los hongos ha sido su capacidad adaptativa, demostrado por su resurgimiento post catástrofes naturales y extinciones masivas, actuando como regeneradores ambientales y creando nuevas alianzas simbióticas (Stamets, 2005).

La mayoría de las estructuras fúngicas son pobres candidatas a la conservación durante largos períodos de tiempo como fósiles. Sumado a la escasa cantidad de características morfológicas únicas de las hifas de los hongos, ha sido difícil establecer registros fósiles fúngicos (Edwards *et al.*, 2018; Krings *et al.*, 2018; Taylor *et al.*, 2015). *Prototaxites* fue el organismo más grande (con

más de 8 m de alto) presente en la tierra durante un período de 50 millones de años, hace 420-370 millones de años, aparecido por primera vez antes del dominio de las plantas vasculares (Graham *et al.*, 2010). El hallazgo de fósiles de estos organismos demuestra que los hongos fueron miembros importantes de los ecosistemas terrestres hasta hace 500 millones de años, si bien la evidencia filogenética molecular sugiere que serían mucho más antiguos (Moore *et al.*, 2020).

Los hongos participan en el reciclaje de biomasa (liberando nutrientes para las plantas), como componentes de las redes alimentarias (siendo parte de la nutrición de grandes y pequeños animales), como también en las transformaciones geológicas que producen y modifican los suelos (Gadd, 2016, 2017; Robson, 2017) y la recuperación y revalorización de elementos de tierras raras u otros metales preciosos procedentes de residuos (Boczonádi *et al.*, 2019). Están íntimamente involucrados en transformaciones biogeoquímicas a gran y pequeña escala, tanto en hábitats acuáticos como terrestres, con mayor influencia en este último, al participar en transformaciones orgánicas e inorgánicas, ciclos de elementos, de rocas y minerales (Fomina y Skorochod, 2020; Kirtzel *et al.*, 2017; Robson, 2017; Zhang *et al.*, 2021). Muchos de estos procesos son relevantes para el uso potencial de los hongos en la biotecnología ambiental, como la biorremediación (Burford *et al.*, 2003; Conceição *et al.*, 2018; Robson, 2017; Moore *et al.*, 2020). Existen asociaciones mutualistas entre hongos y raíces de plantas que ha contribuido a la evolución del ecosistema terrestre, las micorrizas. Actualmente, se sabe que unas 6000 especies de hongos y unas 240000 especies de plantas forman micorrizas (Moore *et al.*, 2020). Los hongos micorrízicos también conectan a las plantas en comunidades volviéndolas más resistentes al estrés y las perturbaciones que cuando se hallan en solitario. Las interconexiones de micorrizas forman una red a través de la cual pueden tener lugar transferencias de nutrientes y moléculas de señalización de planta a planta, de planta a hongo y de hongo a planta, llamada habitualmente “el internet de las plantas” (*wood wide web*) (Castro-Delgado *et al.*, 2020).

1.2. Hongos funcionales para el ser humano: usos culturales, recolección y producción industrial

La recolección de setas para la alimentación es una tradición milenaria comparable a la recolección de numerosos frutos del bosque. Varias setas silvestres, tales como *Cantharellus cibarius*, *Morchella esculenta*, *M. deliciosa* y *M. elata*, las trufas (*Tuber melanosporum* y *Tuber magnatum* y *Tricholoma matsutake*), han alcanzado, incluso, el nivel de explotación comercial. Muchas de estas especies tienen una tradición y una mística asociada, y se hallan presentes en festivales y mercados asociados con eventos folclóricos. En Europa, principalmente en Francia e Italia, la mayoría de las trufas son recolectadas por cazadores que utilizan a cerdos y perros que las hallan mediante el olfato. En la tradición japonesa, el matsutake u hongo de pino (*Tricholoma matsutake*) es considerado un obsequio especial que debe ser apreciado por quien lo recibe, tradición que persiste en la actualidad. *Morchella* spp. (n.v. Morilla), un Ascomycota cuyas especies en la Patagonia argentina se encuentran asociadas a bosques nativos de *Astrocedrus chilensis* (ciprés de la cordillera) y *Nothofagus antártica* (ñire), fructifica en primavera y produce grandes ascomas, comercializados en ferias de en todo el mundo (Moore *et al.*, 2020). Según el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), las setas pueden utilizarse como sustituto de las verduras en la dieta en una proporción de 1:1 (Łysakowska *et al.*, 2023).

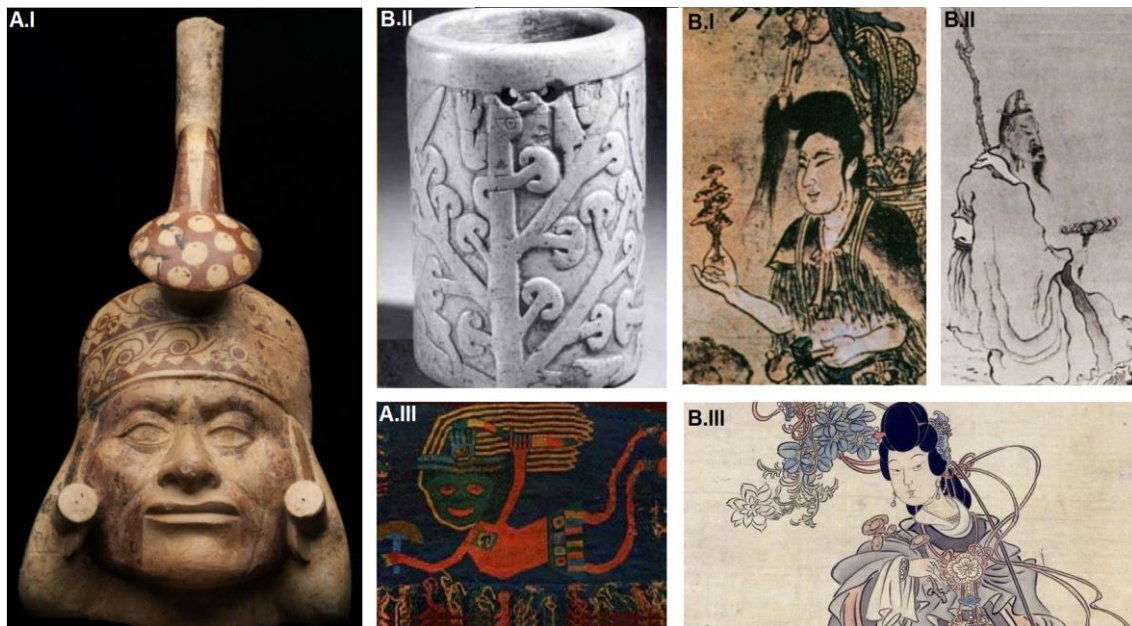
Los hallazgos arqueológicos han puesto en evidencia que los hongos han sido utilizados por el hombre desde antes de la historia registrada, tanto con fines alimentarios como medicinales y espirituales. Las representaciones más antiguas conocidas de hongos se han encontrado en África en petrografías de principios del año 9000 a. C., lo que sugiere que ya entonces desempeñaban un papel importante en los rituales humanos (Samorini, 1992). Por ejemplo, ha sido demostrado el uso extensivo de hongos en el Perú prehispánico, donde se encontraron imágenes de hongos en cerámica, objetos de metal y textiles de una variedad de culturas importantes del norte y sur, así como de la costa y la sierra del país. Los hongos (realistas o abstractos) estaban asociados con lo que parecen ser personalidades de alta autoridad, chamanes/curanderos y víctimas de sacrificios (Figura 1.A) (Trutmann, 2012). El rol espiritual y religioso de los hongos en las sociedades antiguas se centra principalmente en el consumo de hongos con sustancias psicoactivas. Los aztecas y chichimecas fueron los primeros usuarios registrados de hongos con la sustancia

psicodélica psilocibina contenida en hongos del género *Psilocibe*, a los que denominaron “*teonanácatl*” (“carne de dios”). Por otra parte, en el norte de Europa y el norte de Asia es de particular importancia cultural el hongo *Amanita muscaria*, cuyos principios activos ejercen, efectos dissociativos. Anecdóticamente, se ha reportado que nombre *Amanita caesarea*, debe su nombre a ser la su variedad preferida de Julio César; según testigos este hongo “*Sólo se servía al Emperador, y sólo en los platos más preciados*”(Yamin-Pasternak, 2007).

Si bien han sido una fuente importante de alimentos y medicinas durante muchos años, la demanda de hongos silvestres creció bruscamente a principios de la década de 1980 hasta alcanzar la escala comercial actual (Peintner *et al.*, 2013). El cultivo de setas es, por mucho, y excluyendo a las levaduras, la mayor industria biotecnológica del mundo, con una cosecha total de varios millones de toneladas métricas cada año (Moore *et al.*, 2020). Entre los géneros de hongos más cultivados se encuentran los denominados “hongos de especialidad” (un grupo de macromicetes, excluidos los champiñones, tradicionalmente calificados como hongos exóticos, apreciados por sus propiedades culinarias en la cocina *gourmet* y por su valor medicinal), como lo son las diversas especies del género *Pleurotus*, y diferentes variedades del hongo *Lentinula edodes* (Shiitake). A mediados de la década de 1970, el champiñón (*Agaricus* sp.) representaba más del 70 % de la producción mundial total de setas. Actualmente, debido a la diversificación del mercado, representa aproximadamente el 45 %, a pesar de que el tonelaje de producción se ha multiplicado al menos diez veces. Esta diversificación, impulsada por el creciente interés de los consumidores por una variedad más amplia de setas, generó la incorporación al mercado de Shiitake fresco y hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) (Royse *et al.*, 2017). Otras especies incorporadas, aunque en mercados locales, han sido Enoki (*Flammulina velutipes*), Shimeji (*Hypsizygus marmoreus*) y King Oyster (*P. eryngii*) (Stamets, 1994).

Figura 1. Usos culturales de los hongos. A. Demostraciones artísticas antiguas de la relevancia cultural de los hongos; **A.I.** Figura de cerámica de la cultura Moche con hongo saliendo de su

cabeza, representando el uso médico y quizás espiritual de los hongos¹; **A.II.** Vaso ornamentado con setas, Cupisnique, Perú²; **A.III.** Figura chamánica voladora con una seta en mano³. **B.** Figuras relevantes de la tradición china sosteniendo a *Lingzhi* en sus manos: **B.I.** Shennong, Dios de la agricultura, pintura de la época de la dinastía Liao⁴; **B.II.** El poeta chino Tao Yuanming, por Chen Hongshou⁵; B.III. Diosa Luo también, por Ren Xiong de la dinastía Qing – 221-207 a.C⁶.



1.2.1. Hongos comestibles y medicinales: especies de mayor consumo y más investigadas en el mundo

La biomasa fúngica es considerada un alimento de alta calidad por su buen contenido de proteína (normalmente 20-30 % del peso seco), su bajo contenido de grasa, por ser fuente de fibra dietaria y carbohidratos, y por contener vitaminas, especialmente del complejo B. Por sus cualidades, el producto ha ganado popularidad como alimento saludable vegetariano alternativo a la carne y con

¹ Fuente: Museo Peabody 16-62-30/F729, accedido desde <http://vicuna.ru/index.php/moche-warrior/porra-2/>

² Fuente: Museo Metropolitano 1978.412.113, Trutmann 2012.

³ Fuente: de Borhegyi 2010.

⁴ Fuente: Lin y Yang, 2019.

⁵ Fuente: Zavadskaya 1977.

⁶ Fuente: <https://www.mundoreishi.com/cultura-de-ganoderma-lucidum/#ftoc-heading-1>.

una estructura fibrosa similar (Derbyshire y Delange, 2021; Finnigan *et al.*, 2019). Del total de especies de hongos descubiertas, unas 2000 se consideran comestibles, y más de 200 especies de hongos silvestres son consideradas medicinales (Hyde, 2022; Margret *et al.*, 2013). Los hongos medicinales se han posicionado como alimentos de nueva generación con un creciente interés para los consumidores, caracterizados por su alto contenido de compuestos biológicamente activos, incluidos componentes de la fibra dietaria, triterpenos, compuestos fenólicos y esteroides. Su efecto beneficioso sobre el organismo se genera mediante la mejora de su salud general y el aporte nutricional, y exhiben, entre otros, efectos anticancerígenos, antioxidantes, antidiabéticos e inmunomoduladores. Además, se ha establecido que estos hongos aceleran el metabolismo, ayudan a combatir la obesidad y ralentizan el envejecimiento (Łysakowska *et al.*, 2023). El perfil químico de los hongos medicinales varía según la especie, la cepa, las condiciones de cultivo, el grado de madurez y la estructura fúngica, todo esto determinado en gran medida por factores ambientales (acceso al agua, luz, radiación ultravioleta) y biológicos (tipo de sustrato u hospedador, presencia de hongos competidores) (Barros *et al.*, 2007; Elkhateeb y Ghoson, 2022; Łysakowska *et al.*, 2023). La diversidad de especies de hongos y de sus grupos de genes de biosíntesis de metabolitos destaca el potencial casi ilimitado para el descubrimiento de fármacos y la biología sintética (Bills y Gloer, 2017).

Sin embargo, los mecanismos detallados de los efectos de los hongos medicinales en el organismo humano aún requieren estudios clínicos a largo plazo que confirmen sus efectos, la seguridad de su uso y su dosificación. En los últimos años un gran número de especies de hongos comestibles y medicinales (HCyM) cultivadas y de productos derivados se incorporaron al mercado mundial, al mismo tiempo que la cantidad de publicaciones científicas relacionadas aumentó exponencialmente, y con ello la necesidad de una correcta identificación de las especies para asegurar que esas propiedades nutricionales y/o medicinales estén garantizadas (Figura 2). A su vez, conocer la geolocalización de las especies permite la asignación correcta de la taxonomía a especímenes incógnitas, además de orientar acerca de las condiciones necesarias para el crecimiento de cada una de ellas. Esta información puede conocerse a partir de los depósitos de

los especímenes existentes en bases de datos, como *BOLD systems* (<https://www.boldsystems.org>) (Figura 3.A,B.). La identificación de las especies puede ser más difícil en aquellas que poseen registros con categorías de subespecie o variedad ("var."). El número de ingresos o registros de una especie en bases de datos específicas de hongos, como *Mycobank*, es un indicador de la variabilidad intraespecífica (Figura 3.C). A pesar de ser una herramienta útil para identificar especies, las bases de datos públicas pueden presentar un alto índice de asignaciones taxonómicas incorrectas en el caso de los hongos medicinales. Por lo tanto, es recomendable llevar a cabo una reevaluación taxonómica al trabajar con especies medicinales (Jargalmaa *et al.*, 2017).

Figura 2. Especies de HCyM con más publicaciones científicas hasta julio de 2021, según los criterios mencionados en el Anexo Introducción, Tabla 1. Se seleccionaron las especies que superaban la media de cantidad de publicaciones científicas. Se aplicó el método de *clusters* para agrupar las especies según número de publicaciones y número de ensayos clínicos, empleando software Tableau Public 2021.1, que aplica el algoritmo *k-means*. Los valores debajo de cada especie indican número de publicaciones y, entre paréntesis, el número de ensayos clínicos asociados a la especie.

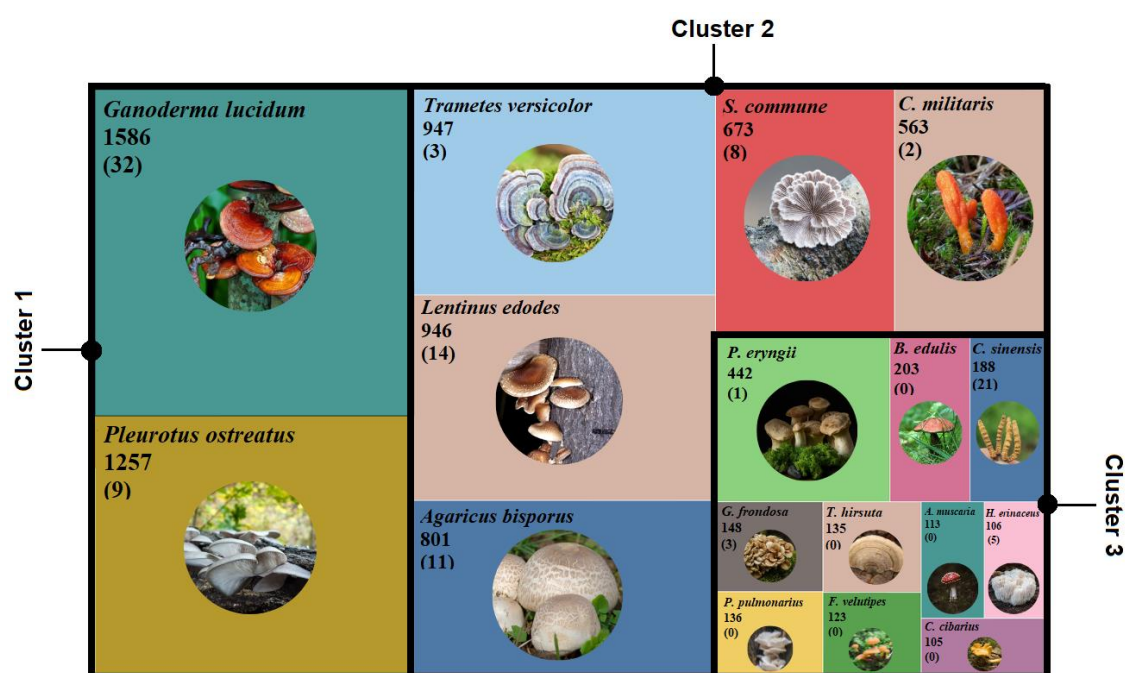
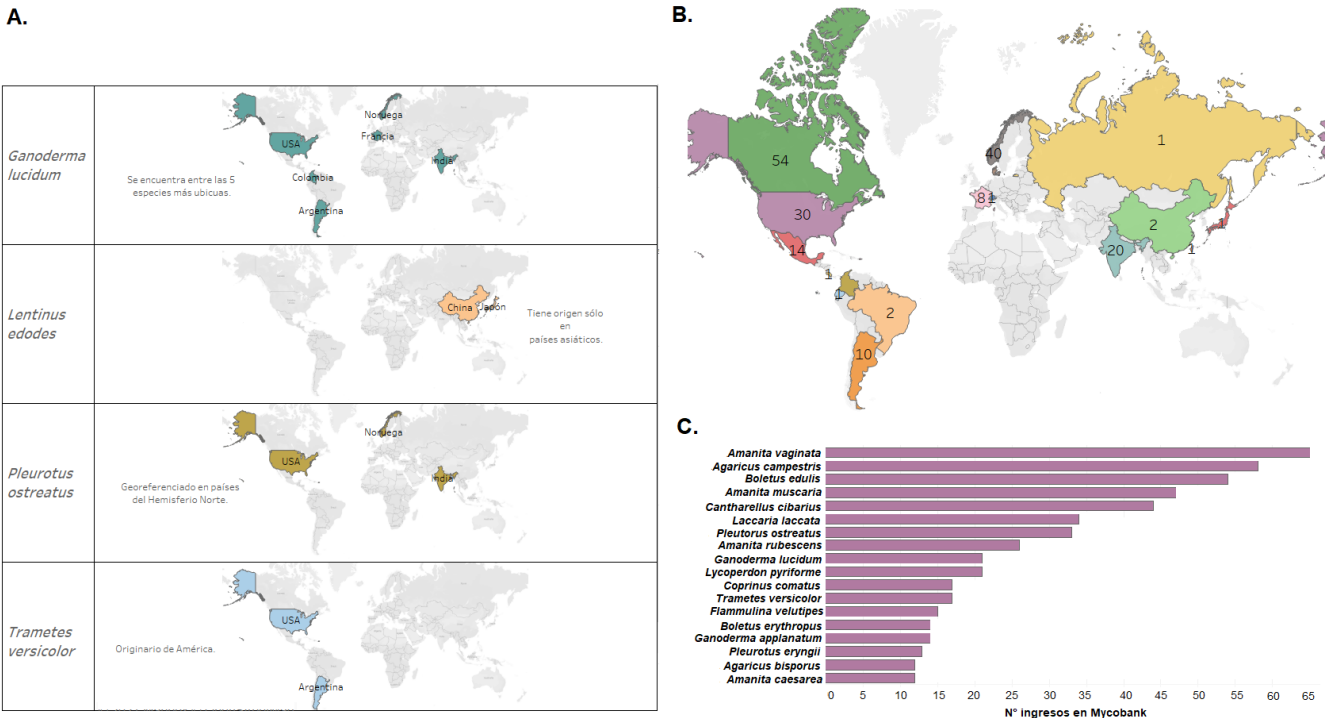


Figura 3. A. Georreferenciación de las especies de HCyM más investigadas hasta julio de 2021, según la información publicada en bases de datos, siguiendo en los criterios mencionados en el Anexo Introducción, Tabla 1. B. Cantidad de especies por país. C. Variabilidad intraespecífica de las especies en estudio; se muestran las especies que presentaban hasta julio de 2021 un número de ingresos en *Mycobank* igual o superior al promedio (12).



1.2.1. Relevancia de *Ganoderma lucidum* entre los hongos medicinales

Ganoderma lucidum posee una historia de más de 6800 años en China, y su uso cultural se remonta al 5000 a.C. Es conocido por documentos medicinales chinos de 2000 años de antigüedad como su medicina más valiosa, “la hierba de la vida eterna”, buscado por emperadores, lo que demuestra su asociación con un alto estatus desde la antigüedad (Hobbs, 1986). Este hongo fue comparado por el emperador Qianlong de China (1735-1796) con el sándalo púrpura o el jade blanco en un poema, destacando su valor inestimable y su rareza (Loyd y Blanchette, 2019). *Ganoderma* proviene del latín *gan*, que significa “brillante” y *derm*, que significa “piel”; *lucidum* también significa “brillante”, debido a su apariencia. En China es conocido como Lingzhi, que significa “planta espiritual” o “seta del árbol de la vida”. En la tradición japonesa se le conoce

como Reishi, que significa " seta divina o espiritual", nombre que podría estar relacionado con la transformación de Buda en rishi, o "sabio del bosque". Otro nombre, Mannentake, significa "seta de los diez mil años" o "seta de la inmortalidad" (Rogers, 2012).

Históricamente, la cultura china ha considerado el Lingzhi como una "hierba" mágica, símbolo de buena fortuna y cargado de un poder misterioso. El taoísmo jugó un papel importante en la promoción de este hongo, ya sea con fines médicos o no. Tao Hong-Jing, importante farmacólogo y alquimista chino, creía que "uno puede comer Lingzhi sin preocuparse por la dosis". En la literatura china, desde la antigüedad se pueden encontrar numerosos mitos y poemas que mencionan el amor, la adoración y las creencias de la gente sobre Lingzhi (Figura 1.B). Escrito en el 100 a.C., el *Shennong Materia Medica*, que reúne las experiencias adquiridas por los antiguos médicos chinos, fue el primer libro farmacéutico en documentar a *G. lucidum*. El libro enumera una suma de materiales en categorías según sus efectos medicinales y tóxicos en los humanos; la más alta categoría, alcanzada por aquellos con eficacia medicinal sin toxicidad conocida, fue la asignada a Lingzhi (Ling y Yang, 2019). Consecuentemente, los aspectos supersticiosos asociados a Lingzhi fueron criticados (Lin, 2009). Por otro lado, el Compendio de Materia Médica (1518-1593) registra que *G. lucidum* es adecuado para personas de cualquier constitución, puede tratar enfermedades mentales, nutrir el bazo y el estómago, aumentar la sabiduría, mejorar la memoria y promover la longevidad. El valor medicinal del género *Ganoderma* fue reconocido oficialmente en el año 2000 con la publicación de la Farmacopea China, y un año más tarde, con la inclusión de las especies *G. lucidum*, *G. sinensis* y *G. tsugae* en la lista de especies de hongos medicinales que pueden usarse en alimentos saludables por parte del Ministerio de Salud de China (He *et al.*, 2023).

El Reishi silvestre es relativamente raro, y casi todos los productos comerciales derivan de su cultivo en ambientes controlados. El hongo prefiere hospedadores de madera dura y, en Japón, crece casi exclusivamente de forma silvestre en los ciruelos. En algunas partes del Sudeste Asiático, puede hallárselo sobre palmeras (Rogers, 2012). Debido a su distribución irregular en la naturaleza y a su creciente demanda como producto medicinal, los esfuerzos se han volcado

hacia su cultivo (S. Wachtel-Galor *et al.*, 2011). En Asia, varios *Ganoderma* spp. se comercializan en forma de nutraceuticos, bebidas saludables, en polvo, y en diversas formas de suplementos dietarios. Este género ha demostrado gran plasticidad fenotípica (observado como una variación en la morfología del basidioma), influenciada en gran medida por factores extrínsecos, como el clima, la disponibilidad de nutrientes y el entorno geográfico, más que con la variación genotípica. Dentro del género, la morfología de los basidiomas puede variar significativamente, no obstante en ocasiones esta variabilidad puede deberse a identificaciones erróneas, ya que la taxonomía del complejo *Ganoderma lucidum* ha sido descrita como “caótica” (Moore *et al.*, 2020).

Potencial medicinal, tamaño del mercado y estado regulatorio. Durante los últimos 2000 años, *G. lucidum* ha pasado de ser una medicina antigua muy preciada a ser empleado en la elaboración de nutraceuticos dentro de una industria valuada en varios mil millones de dólares. El tamaño del mercado de *G. lucidum* y sus especies emparentadas, que incluye alimentos y bebidas, productos farmacéuticos, nutraceuticos y suplementos dietéticos, cosméticos y de cuidado personal, ha crecido considerablemente en los últimos años, valuado en 2,5 mil millones (USD) en 2013 (Bishop *et al.*, 2015) y que se estima alcanzará los 5.07 mil millones (USD) en 2025 a una tasa de crecimiento anual del 9 %. En esta industria, operan principalmente a escala global al menos unas 34 compañías. Según reportes, este crecimiento puede atribuirse al creciente interés por la medicina tradicional, una mayor conciencia sobre la salud y el bienestar, sumado al aumento de investigaciones y publicaciones en la temática, y la expansión de la industria de suplementos dietéticos (The Business Research Company, 2025) (Figura 2).

El basidioma, el micelio y las esporas de *G. lucidum* contienen más de 400 compuestos bioactivos diferentes, incluidos principalmente triterpenoides, polisacáridos, nucleótidos, esteroides, ácidos grasos, proteínas/péptidos y oligoelementos (Wasser, 2005). Los productos a base de *Ganoderma* pueden comercializarse como medicamentos recetados en algunos países asiáticos, aunque internacionalmente la mayoría se dispensan como suplementos dietéticos, y varían en términos de la estructura del hongo procesada, el método de extracción y el modo de administración, ya sea en forma de tónicos, comprimidos/cápsulas o polvos (Lai, 2004). En la mayoría de los casos,

el etiquetado del producto se limita a declaraciones de beneficios para la salud (Bishop *et al.*, 2015). Las propiedades medicinales reconocidas por las entidades regulatorias internacionales en materia de alimentos como la FDA (*Food and Drug Administration*) y la EFSA (*European Food Safety Authority*) incluyen la estimulación física ante situaciones de stress, mejoras en el funcionamiento del sistema inmune y el mantenimiento de los niveles normales de colesterol. Según la USP (*United States Pharmacopeia*) se reconocen como principios activos dos grupos químicos, los polisacáridos y los terpenoides. Si bien aún se encuentran en proceso de clasificación, las especies de *Ganoderma* se encuentran incluidas en el *Codex Alimentarius* en el grupo de los hongos comestibles (código VF 3066, ALINORM 10/33/24, Apéndice IX, FAO-OMS). Tradicionalmente, es el basidioma de *G. lucidum*, y sus especies emparentadas, la estructura consumida y considerada fuente las actividades biológicas reportadas (Hsu y Cheng, 2018). Menos estudiados, pero con valioso potencial para el desarrollo de agentes terapéuticos, son su micelio (Berger *et al.*, 2022) y sus esporas (Plazas *et al.*, 2020). La propagación del micelio a escala de fermentador no ha sido vastamente explotada (Berger *et al.*, 2022); no obstante, actualmente se comercializan ciertos productos a base de extracto estandarizado de micelio de *Ganoderma*, principalmente conteniendo betaglucanos. Las esporas de este hongo tienen una estructura resistente. Se requiere un esfuerzo continuo para desarrollar métodos eficientes que rompan la pared de las esporas y extraigan biocompuestos con alto rendimiento a bajo costo (Soccol *et al.*, 2016). Más aún, ha sido señalado que hasta la fecha no se han reportado artículos que comparen la eficiencia entre extractos de diferentes estructuras, necesario para identificar los beneficios de las esporas de *G. lucidum* sobre sus otras estructuras (Thuy *et al.*, 2023).

En nuestro país se comercializan diversos productos basados en *G. lucidum*, según declaran sus rótulos, tanto importados como de industria nacional, destinados a mejorar funciones vitales. Si bien esta especie ha sido incluida recientemente entre los hongos comestibles del Código Alimentario Argentino, estos productos carecen aún de una regulación específica. Así, para alcanzar su máximo potencial económico y medicinal, es necesario abordar los desafíos relacionados al esclarecimiento de su taxonomía, a la identificación de los componentes activos,

y a establecer rangos de dosis segura y terapéutica discriminada por metabolito para cada tipo de enfermedad. A su vez, es necesario optimizar las condiciones de crecimiento para aumentar la producción, maximizar los ingredientes activos, garantizar la pureza, y realizar ensayos clínicos para proporcionar pruebas convincentes de sus beneficios para la salud (Bishop *et al.*, 2015).

1.3. Riesgos asociados a los macromicetes

1.3.1. Los macromicetes como patógenos

Los hongos parásitos y patógenos infectan los tejidos vivos de plantas, animales y otros hongos, causando lesiones y enfermedades que aumentan la presión de selección sobre sus hospedadores. Los hongos son los principales fitopatógenos, siendo responsables de importantes pérdidas de la producción agrícola mundial (Moore *et al.*, 2020). Alrededor del 10 % de los macromicetes patógenos que pudren la madera atacan principalmente las maderas blandas (Sigoillot *et al.*, 2012); constituyen un grupo fisiológico de hongos pertenecientes a Basidiomycota y en menor medida a Ascomycota que atacan preferentemente las maderas de coníferas y han sido los más destructivos en productos de madera estructurales en descomposición (Niego *et al.*, 2023). Antes del desarrollo de los fungicidas, las enfermedades fúngicas causaban periódicamente una devastación masiva de los cultivos. Tanto en animales como en plantas, un gran número de enfermedades fúngicas ha causado graves mortandades y extinciones de especies en la naturaleza, poniendo en peligro la seguridad alimentaria (Moore *et al.*, 2020).

Entre los animales, las enfermedades emergentes infecciosas fúngicas han reducido la abundancia de poblaciones en anfibios, murciélagos e incluso corales en muchas especies y en grandes áreas geográficas (Moore *et al.*, 2020), siendo causadas principalmente por hongos microfilamentosos. Los hongos entomopatógenos a menudo matan o incapacitan gravemente a una variedad de especies de insectos (Mantzoukas *et al.*, 2022). Dentro de los macromicetes, *Cordyceps militaris* y especies de *Ophiocordyceps* han sido bien documentados como parásitos de insectos. Por otro lado, los hongos que infectan a humanos sanos lo hacen casi exclusivamente en forma de levadura; es decir, se limita a especies con dimorfismo. La capacidad de asumir diversas formas es fundamental para infectar a los humanos, ya que muchos ingresan al cuerpo en forma de

propágulos, esporangiosporas o conidias que se dispersan en el aire. Un caso particular de especies de Basidiomycetes que han sido reportadas como causantes de enfermedades en humanos son *Cryptococcus* spp. (Köhler *et al.*, 2015); no obstante, pese a su clasificación como Basidiomycota, la reproducción sexual de *Cryptococcus*, bajo su forma teleomorfa, perfecta o micelial *Filobasidiella*, sólo ha podido observarse *in vitro* (Puchades Reig, 2016). Este género, junto a otros miembros de la microbiota cutánea humana que predominan como levaduras en el hospedador (*Malassezia furfur*, *Trichosporon*), son oportunistas en pacientes con catéteres venosos y en inmunodeprimidos (Köhler *et al.*, 2015).

Bioseguridad de *Ganoderma*. En particular, *Ganoderma* se clasifica como agente del grupo de riesgo I (bajo riesgo individual y comunitario), considerando que no causa enfermedades a trabajadores de laboratorio y animales, según la clasificación establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) e indicado en la NORMA IRAM 80059 en consenso con el MERCOSUR, donde el género no es incluido dentro de los hongos con riesgo biológico. En cuanto al riesgo medioambiental, *Ganoderma* spp. puede invadir patogénicamente árboles heridos provocando pudrición. Los árboles afectados pueden decaer o morir. Los basidiomas de *Ganoderma* producen millones de basidiosporas que se liberan en diversas condiciones ambientales y durante meses. El desarrollo del hongo puede producirse desde las raíces de los árboles infectados hasta las sanas, infectando las raíces principales o laterales, a menudo a través de una herida (Sinclair y Lyon, 2005). Por ejemplo, *G. brownii* es la especie más prevalente reportada en el estado de California y se ha asociado con árboles caídos y pudriciones del tronco en cítricos (Adaskaveg y Ogawa, 1990; California Department of Food and Agriculture, 2021). *G. boninense* es un patógeno que puede atacar las plantas de palma aceitera en Indonesia (Sukariawan *et al.*, 2021). Otro ejemplo es *G. adspersum*, especie introducida en ese mismo estado y causante de una importante descomposición de la madera y pudrición de las raíces de los almendros en el Valle Central. En Italia, *G. adspersum* infecta pinos que deben ser talados luego de la infección (California Department of Food and Agriculture, 2017; De Simone y Annesi, 2012).

No obstante, el hongo es un reciclador eficiente más que un patógeno *per se* y, esencialmente, la enfermedad es una consecuencia del biodeterioro prolongado. Se ha reportado que la tasa de ataque de *Ganoderma* es mayor en plantas longevas que en plantas jóvenes, propensión que aumenta en suelos con baja fertilidad. Aun así, los síntomas de la enfermedad tardan años en desarrollarse, y el porcentaje de infección suele ser bajo (1-2%) (Paterson, 2007; Sukariawan *et al.*, 2021). Más aún, no se ha logrado causar una infección efectiva con basidiosporas en ensayos de viabilidad sobre palmas, lo que probablemente refleja la agresividad relativamente baja de *Ganoderma* y la necesidad de un inóculo grande para que la infección ocurra (Rees *et al.*, 2012). Por otro lado, *Ganoderma* no representaría riesgo medioambiental/fitosanitario en nuestra región, al encontrarse ausente dentro de la lista de las plagas establecidas por el COSAVE (Comité de Sanidad Vegetal del Cono Sur), tanto en Argentina como en Uruguay, Paraguay, Perú, Chile, Bolivia y Brasil (COSAVE, 2021).

1.3.1. Intoxicaciones producidas por macromicetes. Importancia del control de calidad del sustrato en hongos de consumo

La intoxicación por ingestión de setas en el ser humano es un fenómeno estacional, y suele producirse por la ignorancia y por confusión con las especies comestibles, siendo especialmente frecuente en regiones donde existe una tradición popular de recolección en campo. Estas intoxicaciones pueden clasificarse según el periodo de latencia de aparición de la sintomatología, siendo de unos pocos minutos hasta varias horas. Las intoxicaciones con periodo de latencia breve suelen ser menos severas, entre las que se encuentran el síndrome gastrointestinal (causado por especies de los géneros *Lactarius*, *Russula*, *Boletus*, *Tricholoma*, *Entoloma*, *Clitocybe*, *Omphalotus*, *Scleroderma*, *Agaricus*, *Chlorophillum*, *Hebeloma* e *Hypholoma*), el síndrome muscarínico (causado por *Amanita muscaria* y *A. pantheriana*), el síndrome alucinógeno (causado, entre otros, por especies de *Psilocybe*), el síndrome cardiovascular (causado por *Coprinus atramentarius* y *Clitocybe claviceps* y el hemolítico (causado por *Amanita rubescens* y *Paxillus involutus*). El cuadro clínico de las intoxicaciones con periodo de latencia prolongada es, por lo general, más severo, e incluye complicaciones tales como la hepatotoxicidad y

nefrotoxicidad, y pueden ser potencialmente mortales dependiendo de la dosis ingerida y de la demora en el tratamiento. La intoxicación por setas hepatotóxicas (síndrome faloideo) es la más importante ya que supone aproximadamente el 90 % del total de los envenenamientos que provocan la muerte en Europa. Los hongos responsables son *Amanita phalloides*, *A. virosa*, *A. verna*, *Lepiota brunneoincarnata* y *Galerina* spp., con *A. phalloides* como prototipo de seta hepatotóxica. El cuadro clínico que se produce tras el consumo de estas setas se debe a sus toxinas, fundamentalmente la amatoxina o amanitina (Cameán y Repetto, 2006).

Respecto al consumo de HCyM, la seguridad de su uso durante condiciones especiales como el embarazo, la lactancia y en niños aún no ha sido debidamente reportada. Los compuestos bioactivos que se encuentran en los hongos, como sucede también con ciertas hierbas, pueden limitar potencialmente la absorción de nutrientes, oligoelementos y vitaminas. Como norma general, se ha destacado la recomendación de evitar el consumo excesivo de setas en personas mayores y niños, además de la precaución en personas bajo tratamientos medicamentosos o que consumen habitualmente hierbas, debido a la posibilidad de interacciones con sus compuestos bioactivos (Łysakowska *et al.*, 2023). Se ha reportado que el consumo de hongos Shiitake puede provocar una reacción cutánea alérgica en personas sensibles, probablemente causada por el ingrediente natural lentinano (Stephany *et al.*, 2016). Sin embargo, estos son casos raros que ocurren en personas sensibilizadas, y por lo general luego del consumo del hongo crudo (Hoek-Van Den Hil y Van Asselt, 2019).

En general, es importante realizar un seguimiento de los procedimientos de la cadena de suministro de hongos. Ciertos contaminantes, como metales pesados, pesticidas (fitosanitarios) y residuos de medicamentos veterinarios, pueden ser transferidos a los hongos silvestres o cultivados a través del *compost* o sustrato. Por lo tanto, se debe conocer y controlar el sustrato de partida para detectar riesgos químicos para la salud humana, incluyendo el registro de las concentraciones encontradas y los datos de consumo. A su vez, dado el aumento de las importaciones de productos a base de setas procedentes de otros países, los productos ingresados

deben ser supervisados para verificar el cumplimiento de las normas de inocuidad alimentaria (Hoek-Van Den Hil y Van Asselt, 2019).

1.5. Objetivos de la tesis

La comunidad científica internacional dedicada al estudio de los HCyM reconoce la necesidad de ensayos adecuados para evaluar la calidad de los productos y la necesidad de estudios integrales que contemplen no solo el rendimiento en biomasa de la producción, sino también el valor nutricional y medicinal del producto. Así mismo, toma cada vez más importancia el estudio de las variaciones químicas y medicinales entre cepas. La presente tesis se propuso determinar los factores que influyen en la variabilidad de las propiedades medicinales y nutricionales de los suplementos alimentarios a base de cepas *Ganoderma* spp. cultivadas en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles y Medicinales de CERZOS-CONICET-BB (LBHCyM), estableciendo protocolos y procedimientos para demostrar seguridad y eficacia del producto, y, de esta manera, recolectar información necesaria para iniciar estudios clínicos. En particular, se propuso evaluar diferencias en las características de cultivo como rendimientos y tiempo de fructificación. Posteriormente, se buscó determinar y caracterizar el contenido de componentes biológicamente activos, así como su valor nutricional, acompañado por la evaluación de la seguridad alimentaria de los productos obtenidos. Finalmente, estimar la potencia inmunomoduladora de los productos y de esta manera, evaluar la factibilidad de su empleo como alimentos funcionales. Los aportes de esta tesis contribuirán al desarrollo de metodologías de análisis, identificación y control de calidad de hongos comestibles y medicinales, escasamente estudiados desde el punto de vista medicinal en nuestro país. A su vez, la caracterización química y biológica contribuirá al diseño de productos de consumo humano destinados a mejorar el estado de salud de individuos sanos y enfermos.



2. Capítulo 1

Cultivo e identificación de cepas de *Ganoderma* spp.

*“Así, pues, observar es contentarse con ver.
Ver sistemáticamente pocas cosas.
Ver aquello que, en la riqueza un tanto confusa de la representación,
puede ser analizado, reconocido por todos
y recibir así un nombre que cualquiera podrá entender.”*
Michel Foucault, *Las palabras y las cosas*.

2.1. Parte I

Obtención de biomasa mediante fermentación en estado sólido (FES)

2.1.1 Introducción

El término “hongos de la pudrición de la madera” no refiere a una especie o un taxón, sino a un grupo de hongos que incluye aquellas especies que crecen en diversas formas de sustratos de madera, como madera en pie, madera muerta, madera caída y madera en descomposición (Wendiro *et al.* 2019). Estos hongos requieren agua libre para que las enzimas fúngicas puedan secretarse y luego los productos alimenticios utilizables puedan volver a difundirse en el hongo (Srivastava *et al.*, 2013). Según el tipo de descomposición que provocan, estos hongos pueden clasificarse en hongos de la pudrición blanca, hongos de la pudrición parda o marrón y hongos de la pudrición blanda (Schwarze *et al.*, 2001). Más específicamente, los hongos de la pudrición blanca pueden degradar lignina, celulosa y/o hemicelulosa, representando el 90 % del total de hongos de la pudrición de la madera y mostrando una gran diversidad. Los hongos de la pudrición parda no pueden degradar la lignina, sino que modifican sus propiedades químicas (Li *et al.*, 2022), mientras que “pudrición blanda” refiere a la pudrición causada por ciertos ascomicetos y hongos asexuales.

La mayoría de las especies que descomponen la madera pertenecen a la división *Basidiomycota* (Basidiomycetes), y normalmente se clasifican como hongos de la pudrición blanca o parda (Riley *et al.*, 2014). Los ascomicetos comprenden una pequeña cantidad de hongos que también pueden degradar la celulosa o la hemicelulosa (Liers *et al.*, 2011). Debido a su mayor abundancia dentro de los basidiomicetos y a su capacidad de degradar tanto celulosa, hemicelulosa como lignina, los hongos de la pudrición blanca son los macromicetes con más interés en su cultivo. La maquinaria biológica que permite la degradación de las macromoléculas presentes en los sustratos se compone de enzimas intracelulares y extracelulares específicas. Entre ellas, las celobiohidrolasas, las endoglucanasas y las glucosidasas son las principales enzimas extracelulares que degradan las

cadena larga de celulosa, mientras que las endoxilasas y las endomanasas, son enzimas hemicelulolíticas intracelulares (Tengerdy y Szakacs, 2003; Philippoussis, 2009). La lignina, por su parte, presenta mayor dificultad para ser degradada, y son las lignina peroxidasas, las manganeso peroxidasas y las lacasas las principales enzimas extracelulares encargadas de su catabolismo (Hatakka, 1994; Philippoussis, 2009).

Los hongos han sido desde la antigüedad un componente alimentario en diferentes culturas alrededor del mundo (Kaliyaperumal *et al.*, 2018). Esta demanda mundial está relacionada, entre otros factores, con su sabor atractivo, sus propiedades nutricionales, y, en algunas regiones, con su accesibilidad y disponibilidad comercial (Boonsong *et al.*, 2016), siendo las setas más consumidas *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* y *Pleurotus* spp. (Rathore *et al.*, 2017). Entre 2013 y 2017, Asia representó un aumento de la productividad del 80,5 %, Europa del 13,2 %, América del 5,5 %, Oceanía del 0,5 % y, finalmente, África del 0,3 % de la producción mundial de setas y trufas, valor que rondaba los 10,2 millones de toneladas en 2017 (Martinez-Medina *et al.*, 2021). En la actualidad, casi todos los hongos de interés medicinal son obtenidos en grandes cantidades mediante cultivo artificial en sustrato sólido. El cultivo de hongos de especialidad es el uno de los pocos procesos biotecnológicos a gran escala que utilizan creativamente materiales lignocelulósicos (Stamets 2000; Smith *et al.*, 2002).

En cuanto a los productos obtenidos a partir del cultivo de los hongos de especialidad, ha sido señalado que la producción de los compuestos de interés depende de la etapa de crecimiento, es decir, micelio, primordios y carpóforo maduro (Chen *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013). Tal como ha sido reportado para el género *Ganoderma*, los compuestos fenólicos se acumulan principalmente en el basidioma. Las variaciones en las concentraciones podrían estar relacionadas con la expresión de ciertos genes de codificación de proteínas, ya que se encontró que estaban regulados positivamente en la transición de micelios a primordios y luego disminuidos en la transición de primordios a cuerpos fructíferos (Chen *et al.*, 2012). Además, los polisacáridos y los compuestos fenólicos pueden ser traslocados desde los carpóforos hacia las esporas en cultivos maduros, como fue observado para *Ganoderma* sp. (Bidegain, 2017). Por otro lado, dado que ciertos metabolitos

secundarios son producidos en respuesta al estrés ambiental, los carpóforos silvestres presentan en general mayor concentración de compuestos antioxidantes y mayor actividad antioxidante que los cultivados. El método de extracción de los compuestos desde su matriz es la tercera variable a considerar (Campi *et al.*, 2023).

La fermentación en estado sólido (FES). La fermentación en estado sólido (FES) se define como cualquier proceso de fermentación que ocurra en ausencia o casi ausencia de líquido libre, empleando un sustrato inerte (materiales sintéticos) o un sustrato natural (materiales orgánicos) como soporte sólido (Elisashvili, 2012). Es el método que permite la obtención de esporocarpos (también llamados basidiomas, basidios o basidiocarpos en los basidiomicetos) a partir de inóculos de micelio. Estas estructuras fúngicas aparecen comúnmente luego de completar ciclos rítmicos de cultivos conocidos como oleadas o *flushes*, cuya cantidad y duración del intervalo puede variar dependiendo de las condiciones de cultivo y la especie cultivada (Bidegain, 2017; García Rollán, 1985) hasta agotar el sustrato. Una gran variedad de materiales lignocelulósicos ha sido empleada exitosamente como sustrato para su biotransformación por parte de hongos comestibles y medicinales (Philippoussis *et al.* 2009; Economou, Diamantopoulou y Philippoussis, 2017). La producción comercial de hongos, tanto a pequeña como a gran escala, ha demostrado ser un proceso eficiente en el que los materiales lignocelulósicos generan productos con valor nutricional, debido a la capacidad degradativa de estos organismos (Martínez-Carrera *et al.*, 2000; Chiu y Moore, 2009; Philippoussis, 2009). El cultivo artificial busca emular el crecimiento natural de ciertas especies de hongos en la madera muerta de árboles bajo determinadas condiciones climáticas; así, el cultivo en troncos representa un importante negocio en China, Japón y Corea del Sur. No obstante, no existe una única variedad que pueda fructificar durante todo el año, lo que obliga a considerar una combinación de diferentes cepas si se quiere conseguir una producción continua, como en el caso de *Lentinula*. Desde hace décadas, la tendencia principal ha sido el cultivo en bolsas de plástico conteniendo una variedad de sustratos (los llamados “troncos sintéticos”) dentro de invernaderos, donde es posible controlar las condiciones ambientales (Chang y Miles, 2004).

El cultivo de hongos comestibles y medicinales mediante FES a partir de materiales lignocelulósicos constituye una alternativa cada vez más presente en la revalorización de residuos agroindustriales. Este método de cultivo consiste en la biotransformación energéticamente eficiente de sustratos sólidos en alimentos, medicamentos y biomoléculas, entre otros, al mismo tiempo que se reduce el impacto ambiental que puede originar la eliminación inadecuada de esos residuos (Postemsky *et al.*, 2014). Además, constituye un pretratamiento de la biomasa para futuros usos (Chen, 2013) e incluso es reconocido como método de biorremediación en ambientes contaminados (Barh *et al.*, 2019). Entre los representantes del grupo de setas cultivadas se encuentran *Pleurotus* spp. y *Lentinula edodes* (Philippoussis, 2009). Por su parte, *G. lucidum* ha sido tradicionalmente cultivado en sustratos sólidos a base de granos, viruta o madera (Chang, Tsai y Houn, 2006; Simonić *et al.*, 2008) (Figura 4.A).

Uno de los sustratos empleados en la FES es la cáscara de semilla de girasol (CSG, *Helianthus annuus* L.) proveniente de la industria de oleaginosas, residuo muy abundante en Argentina (Postemsky *et al.*, 2017) cuya disposición en grandes cantidades plantea un problema medioambiental. Se ha indicado que, junto con el arroz, representan cultivos importantes en las zonas agrícolas de Argentina y Uruguay, con producciones de 1,4-3,9 TM por año, según las estadísticas de la FAO de 2018. Luego del procesamiento del grano, entre el 20 % y el 50 % de la biomasa permanece como cáscaras de semillas de girasol, biomasa de baja densidad cuyo transporte resulta económicamente inviable y poco práctico (Postemsky *et al.*, 2019). Los mercados de la cáscara de la semilla de girasol son limitados; se han utilizado en ocasiones como forraje para rumiantes, pero el alto contenido de lignina las convierte en mal candidato para alimento animal. Consecuentemente, este residuo termina eliminándose mediante quema para obtener energía térmica en las instalaciones de procesamiento, o, incluso, enterrándose en el suelo, práctica perjudicial para la salud de los campos ya que las cáscaras suelen ser portadoras de un hongo patógeno vegetal, *Sclerotinia sclerotiorum*. Otros usos competitivos para los incluyen su uso como lecho para animales y su quema como combustible (Smith *et al.*, 2021). Por otra parte, la composición química de la CSG (cuyos principales macronutrientes orgánicos son lípidos,

carbohidratos, proteínas y una proporción de lignina alrededor del 20-25 % del peso total) lo convierte en un material atractivo para los hongos de la pudrición blanca (Curvetto *et al.*, 2005). De hecho, el cultivo de *Ganoderma* sp. ha sido optimizado con éxito en sustrato a base de CSG y aceite vegetal y cobre como aditivos (Bidegain, 2017) como resultado del trabajo pionero llevado a cabo por el LBHCyM (Curvetto *et al.*, 1997).

En la actualidad, entre el 80 % y el 85 % de todos los productos a base de hongos comestibles y medicinales se derivan de carpóforos que han sido cultivados comercialmente o recolectados en el medio silvestre. Sólo el 15 % se basan en extractos de micelio, y un pequeño porcentaje se obtiene a partir de filtrados de cultivo. Sin embargo, la producción de esporomas suele tardar varios meses, y resulta difícil controlar la calidad del producto final; además, la producción se ve afectada significativamente por cambios ambientales como la temperatura ambiente, la humedad y la exposición a la luz. Más aún, el uso de sustratos lignocelulósicos podría dificultar el proceso de purificación del producto. Por esta razón, el cultivo sumergido o líquido (CL) de hongos comestibles y medicinales ha recibido especial atención como alternativa prometedora y reproducible para la producción eficiente de micelio y metabolitos de hongos, donde la agitación continua del medio permite la difusión ilimitada de nutrientes y la generación de un sistema homogéneo. (Elisashvili, 2012) (Figura 4.B). Este último, a su vez, ha sido tradicionalmente el método de producción de compuestos bioactivos y enzimas provenientes de una amplia variedad de microorganismos.

Figura 4. Cultivo de hongos en la industria biotecnológica. A. Cultivo mediante FES de Reishi en una “granja de hongos” en Hunan, China.⁷ **B.** Cultivo líquido de micelio en biorreactores o tanques de fermentación de la empresa Mushlabs, Hamburgo, Alemania.⁸

⁷ Fuente:

https://www.facebook.com/mushroom.china/?paipv=0&eav=Afbz6m5KBW7TNyFn_C5j6bELRh_JJN_SVFh4-kW2ozTYBiIm5XqmmR9kTcsdvvRmtDk&_rdc

⁸ Fuente: <https://www.foodnavigator.com/Article/2022/07/07/Mushroom-mycelium-is-the-food-of-the-future-Meet-the-biotech-company-developing-a-new-generation-of-sustainable-food>



Los parámetros a controlar durante la FES están estrechamente relacionados con la regulación metabólica de los microorganismo (Chen, 2013). El crecimiento de los hongos sobre sustratos de lignocelulosa es particularmente sensible a los cambios morfológicos y fisiológicos que conducen a la esporulación. La limitación de nutrientes, la desviación de la humedad y temperatura óptimas, los productos tóxicos del metabolismo y el impedimento estérico se encuentran entre los factores que pueden desencadenar el inicio de la esporulación. La producción de esporas puede ser un resultado deseado en algunos casos, aunque en otros, como la producción de biomasa o enzimas, debe evitarse. Durante el diseño del proceso, la estructura del sustrato lignocelulósico, su cambio durante la fermentación, su conductividad térmica y el contenido de humedad y la transferencia de masa de oxígeno son los principales puntos a considerar (Tengerdy y Szakacs, 2003). El sustrato sólido proporciona una fuente de carbono y de nitrógeno (cuya proporción ideal dependerá de la especie cultivada), factores de crecimiento y otros nutrientes, y sirve como portador para la unión de microorganismos, donde las hifas en crecimiento deben encontrar puntos de ataque accesibles (Chen, 2013). Los parámetros más críticos a controlar son la humedad, la temperatura y el suministro de oxígeno. Debido a la naturaleza aeróbica del proceso, la producción de calor es muy alta (además, no se disipa fácilmente debido a la mala conductividad térmica de la matriz sólida, así como a la naturaleza predominantemente estática de la FES) por lo que su eliminación es importante para evitar gradientes térmicos. El tipo de inóculo (esporas o células vegetativas), a la vez que su densidad, es otro factor que afecta al

proceso. Este es agregado en un máximo de 20-30 % del peso seco del sustrato (Tengerdy y Szakacs, 2003).

La temperatura se controla mediante evaporación forzada, utilizando una corriente de aire de humedad variable y reponiendo la humedad evaporada mediante pulverización de agua. La transferencia de masa de oxígeno se regula mediante la densidad de empaquetamiento del sustrato y mediante una agitación suave (balanceo, volteo, entre otros métodos); esta también puede verse facilitada por la oscilación de la temperatura y la presión (Tengerdy y Szakacs, 2003). La mayoría de los hongos capaces de ser utilizados en FES tienen requerimientos de a_w de entre 0,8 y 0,9; el aumento del contenido de agua dificulta la extensión del micelio (Gowthaman *et al.*, 2001) y la distribución del oxígeno, lo que puede generar bolsones de anaerobiosis. Por otro lado, el agregado de aditivos al sustrato puede tener un efecto positivo sobre el rendimiento de biomasa y la producción de metabolitos, como el caso de los compuestos fenólicos en *Ganoderma* sp. con el agregado de aceite de oliva y cobre en sustrato de CSG (Bidegain, 2017). El micelio de los hongos de la pudrición blanca secreta ácidos durante su crecimiento, por lo que el pH del sustrato tiende a disminuir a medida que estos se acumulan. El rango de pH óptimo para el micelio de la mayoría de las especies de hongos es ligeramente ácido (5,0-7,0), y su crecimiento se inhibe a un pH demasiado bajo. Cabe mencionar que estas condiciones de crecimiento pueden no ser las óptimas para la fructificación o la producción de metabolitos secundarios específicos. No obstante, los valores mencionados son los valores de pH iniciales, que pueden variar a medida que avanza la fermentación. En la FES, el control del pH es prácticamente imposible debido al sistema heterogéneo. A menudo se utilizan materiales con capacidad tampón como sustrato para eliminar los efectos adversos de los valores cambiantes del pH (Junior Letti *et al.*, 2017).

2.1.2. Objetivo

El LBHCyM se ha dedicado durante años al estudio del cultivo de hongos comestibles y medicinales mediante fermentación en estado sólido de residuos agroindustriales como la cáscara de semilla de girasol (CSG) y la paja de arroz, contando con una vasta experiencia en la producción de blanco de hongos (*spawn*), y habiendo optimizado el cultivo mediante FES de

diferentes cepas de hongos comestibles y medicinales, como *Pleurotus* spp., *Lentinula* spp., *Grifola* spp. y *Ganoderma* spp. El objetivo de esta sección fue seleccionar cepas de *Ganoderma* spp. en base a su crecimiento en sustratos sólidos a base de cáscara de semilla de girasol, sustrato proporcionado por un productor local de aceite de girasol, para su posterior cultivo a mayor escala mediante FES.

2.1.3. Materiales y métodos

Selección de cepas mediante test de crecimiento lineal en sustratos lignocelulósicos. Se seleccionaron 6 cepas de *Ganoderma* spp. depositadas en la colección de hongos de CERZOS-CONICET-UNS para ser evaluados en base a su rendimiento en sustratos sólidos. La Tabla 1 detalla las características de las cepas en estudio. La denominación de cada una, en esta instancia, se remite a la especie asignada en el momento del su depósito. Su proveniencia refiere a la empresa o persona que proveyó el material.

Tabla 1. Proveniencia de las cepas empleadas en este estudio y su inicial denominación.

Código	Depositada como	Proveniencia
E47	<i>G. lucidum</i>	Universidad de Guelph CANADA
E27	<i>G. lucidum</i>	Universidad de Guelph, CANADA
GLK	<i>G. lucidum</i>	Ivy Choi, Seul, COREA
FP	<i>G. lucidum</i>	Fungi Perfecti®
CS	<i>G. oregonense</i>	Recolectada (Coronel Suárez, Argentina 37°28'00"S 61°56'00"O)
GO	<i>G. oregonense</i>	Fungi Perfecti®

Test lineal de crecimiento. Para la evaluación del rendimiento de cada cepa en base a su capacidad de crecimiento en sustrato de CSG (proporcionado por CARGILL SACI, Bahía Blanca, Argentina) se realizó el test lineal desarrollado por Duncan *et al.* (1997). Se analizaron tres variaciones en la composición de este sustrato. Cada variante de sustrato fue preparada añadiendo los componentes sólidos y el agua, dejándola reposar hasta el día siguiente. Luego, se colocó cada mezcla de sustrato en tubos de vidrio y estos se descontaminaron en autoclave durante 2 horas a

121 °C (1 atm). Finalmente, se determinó su pH y conductividad final. Los sustratos seleccionados fueron los siguientes:

T1: 28 % p/p de CSG, 0,6 % p/p CaSO₄, 0,1 % p/p CaCO₃ y 71,3 % p/p de agua, pH 5,7, conductividad 1275 µS.

T2: 26,4 % p/p de CSG, 1,6 % p/p de cebada (*Hordeum vulgare*), 0,6 % p/p CaSO₄, 0,1 % p/p CaCO₃ y 71,3 % p/p de agua, pH 5,7, conductividad 1326 µS.

T3.: 26,4 % p/p de CSG, 1,6 % p/p de cebada, 0,6 % p/p CaSO₄, 0,1 % p/p CaCO₃, 0,3 % p/p de aceite de oliva y 71 % p/p de agua, pH 5,6, conductividad 1461 µS.

Para cada cepa se preparó un total de 10 tubos de vidrio con una composición de sustrato según cada tratamiento (n=10), los cuales se inocularon en uno de los extremos del tubo con porciones circulares de micelio tomadas con sacabocados desde un cultivo en agar MYG (extracto de malta-extracto de levadura- glucosa, por sus siglas en inglés). Los tubos fueron incubados durante 18 a 24 días a 22 °C según lo descrito por Curvetto *et al.* (2005).

Se tomaron mediciones del crecimiento desde el punto de siembra hasta el frente de micelio en mm día⁻¹ a los 10, 18 y 24 días. Al día 24, el sustrato colonizado fue separado del no colonizado (n=5) y secado en estufa hasta peso constante (50 °C, 3 días). El porcentaje de colonización (PC) fue calculado de la siguiente manera y expresado en g de sustrato colonizado por 100 g de sustrato:

$$PC = \frac{\text{Peso seco sustrato colonizado (g)}}{\text{Peso seco sustrato colonizado (g)} + \text{Peso seco sustrato no colonizado (g)}} \times 100$$

Escalado en "troncos sintéticos". Para la obtención de basidiomas, se procedió a la preparación de los llamados "troncos sintéticos" empleando sustrato de CSG suplementado con cebada (T2) siguiendo el procedimiento descrito por Curvetto *et al.* (2005), como se detalla a continuación. La "semilla de hongo" o *spawn* se preparó en botellas con una mezcla de 59,1 % de grano de trigo (*Triticum durum*, disponible comercialmente), 40 % de agua, 0,1% de CaCO₃ y 0,8 % de CaSO₄ en peso. Luego, estas se esterilizaron a 121 °C y 1 atm durante 90 minutos; posteriormente se inocularon con micelio de cada cepa proveniente de placas de cultivo con agar MYG. El inóculo se incubó a 25 °C en oscuridad durante 15 a 20 días agitando periódicamente. El sustrato se

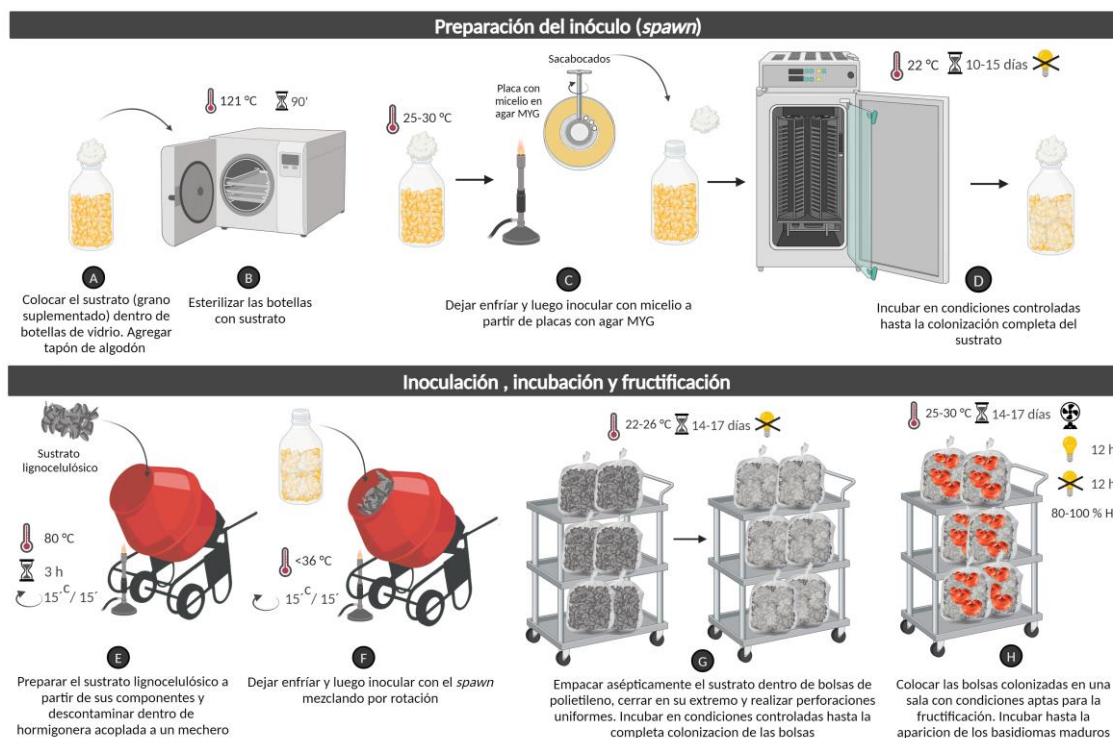
preparó mediante la mezcla de sus componentes y se descontaminó siguiendo una técnica previamente desarrollada (Curvetto *et al.*, 1997) dentro de una hormigonera acoplada a un mechero y una tapa metálica). El sustrato se calentó a 80 °C durante 3 horas con el tambor rotando alternativamente por 15 minutos y detenido por 15 minutos. Luego, se dejó enfriar por debajo de los 38 °C y se agregó el inóculo en una proporción del 7% (p/p) mezclando por rotación durante 15 minutos. Los “troncos sintéticos” se prepararon de la siguiente manera: se empaquetó 1 kg de sustrato a una densidad aproximada de 0,5 g mL⁻¹ en bolsas de polipropileno de 100 µm de 20 cm de largo por 16 cm de ancho. Las bolsas (20 por cada cepa) se cerraron y se les realizaron micro perforaciones en toda su superficie; luego fueron colocadas en una cámara de crecimiento en oscuridad a 22-26 °C durante 14-17 días hasta la colonización completa del sustrato por parte del micelio y la aparición de metabolitos secundarios (exudados amarronados). Posteriormente los troncos sintéticos se colocaron en estanterías en una sala de fructificación con las siguientes condiciones ambientales que propician el desarrollo de los basidios: 80-100 % de humedad relativa, 25-30 °C, fotoperiodo de 12 horas (irradiación con luz fluorescente blanca, 100-500 lux), y ventilación de aire adecuada. La Figura 5 esquematiza el procedimiento de cultivo.

Los basidiomas maduros fueron colectados realizando cortes al ras de su unión al sustrato. Posteriormente se los secó en oscuridad en estufa con ventilación constante a 60 °C durante 48 h. Los polisacáridos fueron extraídos según el protocolo propuesto por la Farmacopea de Estados Unidos (USP) para *G. lucidum* polvo de basidioma (Anexo 1, Protocolo N°2) y luego cuantificados mediante el método del fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) (Anexo 1, Protocolo N°3). Se calcularon los rendimientos de biomasa (g de hongo seco kg de sustrato húmedo⁻¹) y de polisacáridos (g de polisacáridos secos kg de sustrato húmedo⁻¹). El rendimiento de cultivo fue calculado también como la eficiencia biológica porcentual [(kg de hongo fresco kg de sustrato seco⁻¹) x 100 %] de cada oleada y como eficiencia biológica porcentual acumulada.

2.1.4. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de doble vía empleando el *software* GraphPad Prism. En caso de existir diferencias entre las medias se realizó posteriormente el test de Bonferroni de comparación múltiple.

Figura 5. Esquema del cultivo mediante fermentación en estado sólido.



2.1.5. Resultados y discusión

Test lineal de crecimiento. Las tasas de crecimiento para cada cepa y tratamiento se presentan en la Figura 6. El análisis estadístico mediante ANOVA de doble vía mostró que un 92,1 % de la varianza total fue debida a la cepa, mientras que el tratamiento representó sólo un 4,0 % de la varianza total. La interacción resultó ser significativa ($p < 0,0001$) por lo que se procedió al análisis entre medias según el tratamiento.

En general, se encontraron diferencias significativas entre cepas para todos los tratamientos, con tres excepciones. Una de ellas correspondiente a la comparación entre GLK y FP cultivadas en T2, otra correspondiente a GLK y CS, y a CS y GO en T3, donde las diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$). La suplementación con cebada (T2) mejoró el rendimiento en todas las cepas respecto a la cáscara sin aditivos (T1) ($p < 0,05$). Sin embargo, el agregado de aceite de oliva (T3) al sustrato suplementado con cebada (T2) sólo mejoró significativamente el rendimiento en

Ganoderma sp. GLK ($p<0,05$). *Ganoderma* sp. E47 fue la cepa con mayor velocidad de crecimiento. Los porcentajes de colonización en T2 fueron significativamente diferentes entre las cepas ($p<0,001$) exceptuando a CS y E27, y a GLK y FP, cuyas medias no difirieron significativamente ($p>0,05$). El mayor valor fue alcanzado por E47 (100 %, n=5), seguida por GO (76,26 % $\pm$ 1,51), E27 (56,10 % $\pm$ 1,59), CS (54,55 % $\pm$ 3,04), FP (31,18 % $\pm$ 1,67) y finalmente GK (28,16 % $\pm$ 2,33) (Figura 7).

Al finalizar este ensayo se optó por seleccionar aquellas cepas prometedoras para su cultivo en FES a mayor escala. Estas fueron E47, E27, CS y GO, todas ellas con un porcentaje de colonización superior al 50 % del sustrato en el test lineal de crecimiento. Debido a su escaso crecimiento luego de 24 días de cultivo, las cepas GLK y FP no fueron consideradas para los posteriores ensayos.

Figura 6. Crecimiento en test lineal (mm d⁻¹) de las cepas de *Ganoderma* spp. en los tratamientos T1-3 en el día número 18 de cultivo. CS: *Ganoderma* sp. CS, GO: *Ganoderma* sp. GO, E47: *Ganoderma* sp. E47, GK: *Ganoderma* sp. GLK, FP: *Ganoderma* sp. FP.

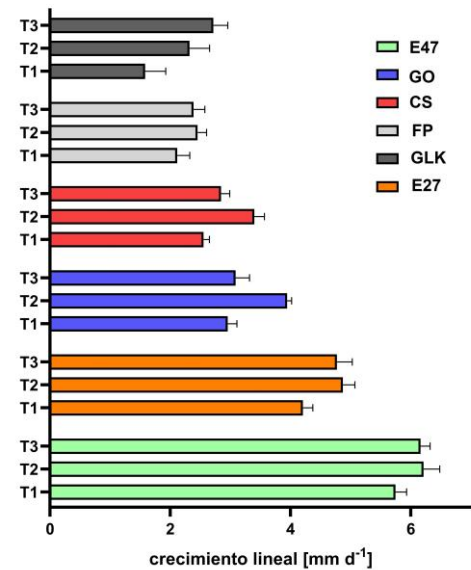
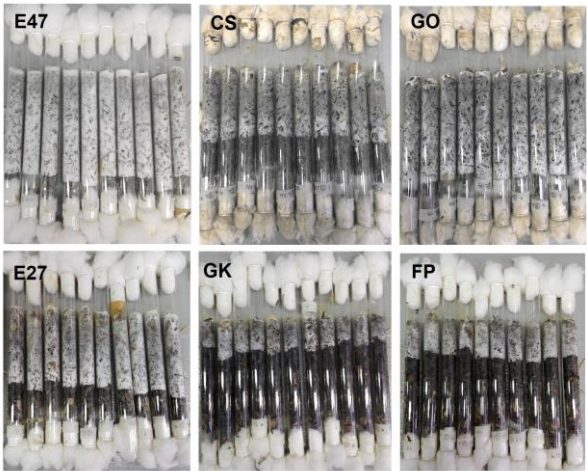


Figura 7. Fotografías del test lineal de crecimiento de las cepas de *Ganoderma* spp. en el tratamiento T2 en el día número 18 de cultivo. CS: *Ganoderma* sp. CS, GO: *Ganoderma* sp. GO, E47: *Ganoderma* sp. E47, GK: *Ganoderma* sp. GLK, FP: *Ganoderma* sp. FP.

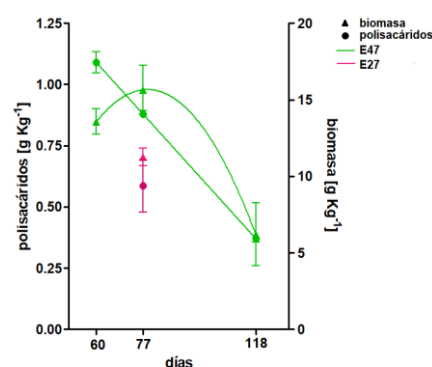


Escalado en “troncos sintéticos”. Solo *Ganoderma* sp. E47 y *Ganoderma* sp. E27 produjeron basidiomas en las condiciones ensayadas (Figura 8). *Ganoderma* sp. E47 fructificó en tres oleadas de cultivo, que comenzaron los días 60, 77 y 188 de cultivo, respectivamente, pudiéndose recolectar un total de 547,01 g. Luego del cultivo de *Ganoderma* spp. E27 sólo se obtuvo una oleada de crecimiento a partir del día 77 de cultivo con un rendimiento total de 159,49 g de biomasa (Figura 9). El rendimiento en biomasa de E47 resultó ser superior al de E27 en la primera ($p<0,05$) y segunda ($p<0,01$) oleada de cosecha, y luego inferior al de E27 en el tercer *flush* de cultivo ($p<0,01$). En cuanto al contenido de polisacáridos crudos, E47 presentó un rendimiento decreciente respecto de la oleada de cosecha, aunque ambas cepas no se diferenciaron significativamente en ninguna de las oleadas ($p>0,05$). La eficiencia biológica porcentual de E47 mostró la misma tendencia que el rendimiento en biomasa a través de las cosechas, con valores de $6,42 \pm 0,05$, $7,01 \pm 0,21$ y $2,72 \pm 0,85$ en el primero, segundo y tercer *flush*, respectivamente, y alcanzando una eficiencia acumulada de $16,14 \pm 0,42$, mientras que en la única cosecha de E27 fue de $2,94 \pm 0,80$. Tal como ha sido reportado, en la mayoría de las FES de lignocelulosa la conversión del sustrato rara vez excede el 30-40 % (Tengerdy y Szakacs, 2003).

Figura 8. Basidiomas inmaduros de *Ganoderma* E47 (arriba) y *Ganoderma* E27 (abajo) creciendo en “troncos sintéticos” con sustrato de CSG (T2), durante el primer *flush* de crecimiento.



Figura 9. Rendimiento en biomasa y polisacáridos de las cepas de *Ganoderma* spp. fructificantes en FES, en g Kg⁻¹ de sustrato húmedo. El eje x indica el número de días correspondiente a cada oleada de crecimiento para E47 (3) y E27 (1).



Parte II

Cultivo de cepas no fructificantes

2.2.1. Introducción

Tal como fue descrito anteriormente, las cepas *Ganoderma* sp. CS y *Ganoderma* sp. GO, a pesar de haber desarrollado buena tasa de crecimiento en el test lineal con CSG como sustrato, no produjeron basidiomas en las condiciones antes ensayadas. Entre la variedad de sustratos empleados en el cultivo de setas, el aserrín de álamo (*Populus alba*) ha sido previamente testeado en diferentes proporciones como sustrato en el cultivo de *Lentinula edodes*, con el fin de subsanar la ausencia de ciertos macro o micro nutrientes orgánicos e inorgánicos que limitantes para el crecimiento, como también de factores de crecimiento tales como vitaminas (Curvetto *et al.*, 2002, 2005). El aserrín de pino (*Pinus* spp.) también ha sido testeado como sustrato lignocelulósico en el cultivo de cepas del género *Pleurotus* (Camassola *et al.*, 2013).

El cultivo líquido o sumergido. En la producción de hongos, el CL consiste en inocular la biomasa en un medio líquido, obteniéndose como producto final el micelio y sus biomoléculas. En comparación con la FES, el CL se ha mostrado prometedor debido a su corto tiempo de cultivo, al menor riesgo de contaminación y a la alta eficiencia de producción de biomasa micelial y metabolitos bioactivos (Kim *et al.*, 2004; Lin y Yang, 2006; Cui, Yang y He, 2015). Sin embargo, el requerimiento de agitación, de controlar la temperatura y la necesidad de mantener condiciones de esterilidad durante la producción, todos ellos factores críticos durante el CL, representan un incremento en los costes productivos; además, el procesamiento *downstream* requiere la eliminación de grandes volúmenes de agua (Doriya *et al.*, 2016), lo que lo vuelve un método menos sustentable que la FES, más aún si el sustrato empleado no es un residuo.

Se han desarrollado diversas técnicas y estrategias de cultivo sumergido de hongos medicinales, dependiendo de las características fisiológicas y morfológicas de los hongos y de su comportamiento en diferentes condiciones ambientales, siendo las técnicas más utilizadas el cultivo discontinuo o en *batch* en matraces con agitación y en fermentadores de laboratorio (Elisashvili, 2012). El cultivo sumergido ha ido incrementando su desarrollo desde hace varios años al considerarse un método óptimo para la producción de biomasa de manera uniforme y reproducible destinados a la fabricación de productos farmacéuticos y suplementos dietarios (Smith *et al.*, 2002). Este método de cultivo también ha sido estudiado por integrantes del LBHCyM para cepas de *Ganoderma* spp. (Curvetto *et al.*, 2002), según lo reportado previamente en cuanto a medio y condiciones de cultivo aptos para *G. lucidum* (Yang y Jeng, 1987; Yang y Liao, 1998a, 1998b).

Numerosos estudios han demostrado que la tasa de crecimiento del micelio y la tasa de producción de compuestos bioactivos varían con las condiciones ambientales y la composición del medio, incluida la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, el pH, la aireación y agitación (Elisashvili, 2012). En general, se considera que la temperatura óptima para el cultivo líquido de Ascomycota y Basidiomycota varía entre los 20 y los 30 °C (Osińska-Jaroszuk *et al.*, 2015). Las intensidades de agitación y aireación promueven la transferencia de masa de sustratos, productos y oxígeno. Sin embargo, una agitación excesiva puede dañar las hifas y afectar negativamente el crecimiento y la formación del producto; además, la agitación puede generar la aglomeración de partículas, dificultando la transferencia de gases. La velocidad de agitación óptima representa un equilibrio entre la transferencia de oxígeno al medio y la fuerza de corte, los cuales aumentan al aumentar la velocidad de agitación. Por lo tanto, debe establecerse un equilibrio entre los efectos positivos y negativos de la agitación (Elisashvili, 2012). En cultivos en Erlenmeyer la cantidad de oxígeno disuelto se modula considerando la relación óptima entre volumen agregado y capacidad máxima del recipiente (Yang y Liao, 1998). En cultivos líquidos en biorreactores, donde es posible insuflar aire o gases, ciertos estudios han observado que una tasa de aireación alta (1,2 vvm) favorece el crecimiento celular, mientras que tasas de aireación menores mejoran la producción de exopolisacáridos (EPS). Además, se observó que el peso molecular de los EPS obtenidos con

diferentes de tasas de aireación estarían estrechamente correlacionados con su actividad antioxidante (Lung y Chang, 2011).

EL pH del medio puede afectar la función de la membrana celular, la absorción de nutrientes, la morfología y estructura celular, la actividad enzimática, y biosíntesis de productos. Si bien se han reportado varios estudios sobre los efectos de este parámetro, la mayoría de ellos se han realizado en matraces donde el pH no es controlado durante el cultivo. Respecto a la fuente de carbono, si bien la mayoría de las investigaciones utilizan la glucosa, se han comparado los efectos de diferentes azúcares sobre el crecimiento de los hongos y la producción de metabolitos (Elisashvili, 2012). Por otro lado, el micelio fúngico exhibe diferentes fenotipos de acuerdo a las condiciones de fermentación en CL, incluidos el filamentoso, el coagulado y el granular o en *pellets*. El cambio en la morfología tiene un efecto importante en la síntesis de metabolitos (Ding *et al.*, 2012). De hecho, se ha reportado que existe un tamaño crítico de los pellets de micelio, que una vez superado genera sitios donde el oxígeno es limitante, condición que disminuye el pH y que incrementaría la concentración de ácidos ganodéricos. La generación de agregados de micelio ha sido entonces un factor a manipular cuando quiere aumentarse la producción de ácidos ganodéricos en *G. lucidum* (Tang y Zhong, 2003). Por el contrario, si el objetivo es incrementar la síntesis de polisacáridos, debe mantenerse una óptima oxigenación y disgregación de los *pellets* (Wagner *et al.*, 2003).

2.2.2. Objetivo

En este apartado se buscó evaluar la posibilidad de emplear sustratos alternativos a la cáscara de girasol para obtener basidiomas de las cepas *Ganoderma* spp. CS y GO mediante FES. A su vez, se propuso evaluar la factibilidad de llevar a cabo el cultivo sumergido de estas cepas, monitoreando en cada método sus respectivos rendimientos. Adicionalmente, y considerando que el CL es un método apto para la obtención de polisacáridos (Chang, Tsai y Houn, 2006), se analizó el contenido de estas macromoléculas producido por cada cepa como indicador adicional de la *performance* de cada una de ellas en cultivo sumergido. A fines comparativos, se incluyó a la cepa *Ganoderma* spp. en los ensayos realizados sobre cultivo líquido.

2.2.3. Materiales y métodos

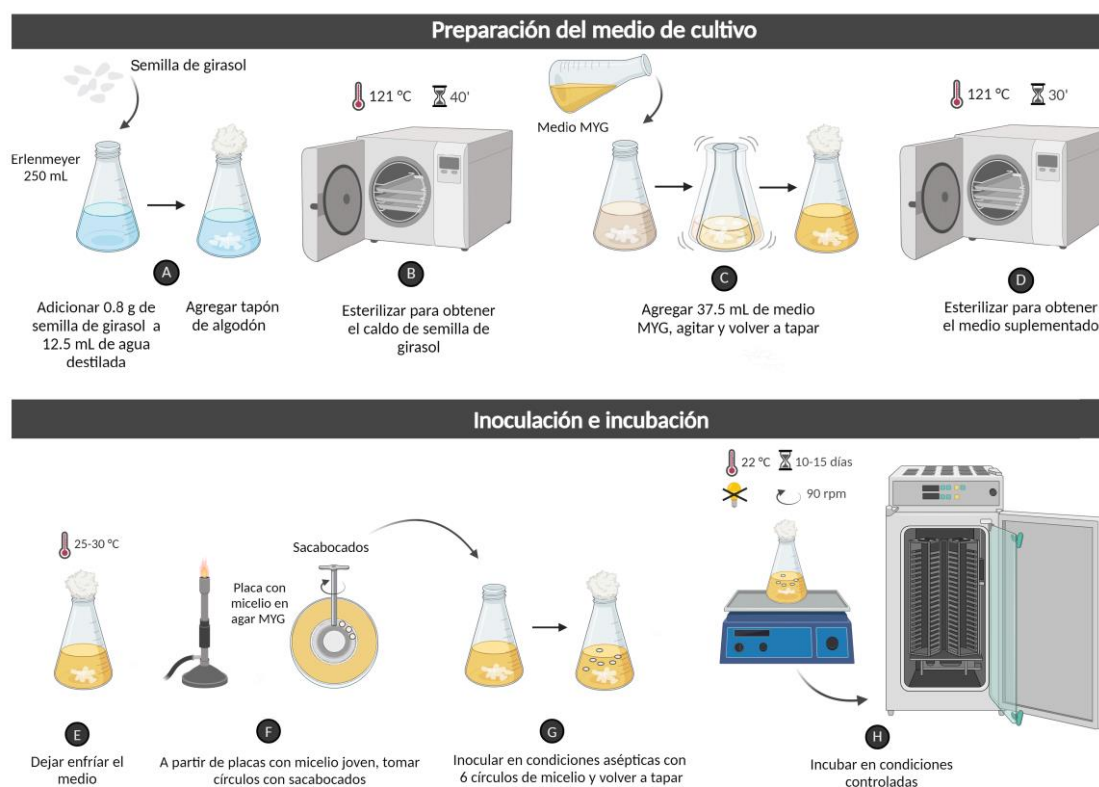
Test lineal de crecimiento en sustratos adicionales. *Ganoderma* spp. CS y *Ganoderma* spp. GO fueron testeados en sustratos lignocelulósicos adicionales para su cultivo en FES. Estos tratamientos incluyeron aserrín de pino y álamo, solos y en combinación con CSG como sustratos siguiendo lo publicado en estudios previos (Curvetto *et al.*, 2002, 2005; Camassola *et al.*, 2013), los cuales fueron los siguientes (los pH indicados corresponden a la medición post esterilización en autoclave): **T4.** 28,3 % p/p aserrín de álamo, 0,6 % (p/p) CaSO_4 , 0,1 % (p/p) CaCO_3 y 71 % p/p agua, pH: 5,6, conductividad 850 μS ; **T5.** 28,3 % p/p aserrín de pino, 0,6 % (p/p) CaSO_4 , 0,1 % (p/p) CaCO_3 y 71 % p/p agua pH: 5,4, conductividad 630 μS ; **T6.** 22,7 % (p/p) aserrín de álamo, 5,6 % (p/p) cáscara de girasol, 0,6 % (p/p) CaSO_4 , 0,1 % (p/p) CaCO_3 y 71 % p/p agua, pH: 6,0, conductividad 820 μS y **T7.** 22,7 % aserrín de pino, 5,6 % (p/p) cáscara de girasol, 0,6 % (p/p) CaSO_4 , 0,1 % (p/p) CaCO_3 y 71 % p/p agua, pH: 5,4, conductividad 660 μS .

Cultivo líquido. El cultivo líquido se realizó empleando caldo MYG suplementado con caldo de semilla de girasol, basado en un estudio previo, donde el agregado de este suplemento mostró incrementar la producción de polisacáridos de *Ganoderma* spp. (Curvetto *et al.*, 2002). El procesamiento de las semillas de girasol en autoclave produce ciertas sustancias minerales y orgánicas de valor nutricional para el hongo, incluidos carbohidratos solubles e insolubles, lípidos, aminoácidos, vitaminas y pectinas (Park *et al.* 1997). La pectina de girasol retiene agua, gelifica y posee una alta viscosidad a valores de pH entre 3-7, condición que favorece la uniformidad del micelio (Curvetto *et al.*, 2002). Otros estudios han demostrado que el agregado de aceite de semilla de girasol, junto con otros aceites vegetales, estimuló el crecimiento micelial y la producción de EPS. En general, se sabe que los aceites vegetales y sus sustancias relacionadas promueven la excreción de polisacáridos extracelulares de hongos en condiciones de cultivo líquido, posiblemente relacionado con una modificación de la estructura de la membrana celular que aumenta su permeabilidad (Elisashvili, 2012). Otra explicación supone que los aceites afectan

directamente el nivel de síntesis de enzimas involucradas en la formación de EPS (Park *et al.*, 2002).

La preparación del cultivo líquido, con algunas modificaciones, fue la siguiente: 0,8 g de semilla de girasol (For good®, adquirida en supermercado) fueron adicionados a Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 12,5 mL de agua destilada. Se prosiguió a su esterilización en autoclave a 121 °C durante 40 minutos. Posteriormente, se adicionó 37,5 mL de medio líquido MYG (20 % extracto de malta, 2 % extracto de levadura, 10 % glucosa, preparado a partir de sus componentes), se mezcló el contenido y se esterilizó nuevamente a 121 °C durante 30 minutos. El medio esterilizado fue enfriado e inoculado con seis secciones circulares de 7 mm de diámetro tomadas con sacabocados de agar MYG de micelio joven de *Ganoderma* spp. CS y GO. *Ganoderma* spp. E47 fue incluida en el estudio a fines comparativos, y se realizaron controles del medio de cultivo sin inocular. Los cultivos fueron incubados en oscuridad bajo agitación continua a 90 rpm y a 22 °C durante 10-15 días. Esta velocidad de agitación se eligió para evitar efectos nocivos en la producción de polisacáridos que podrían causar velocidades mayores (Yang and Liao, 1998). La Figura 10 muestra un esquema del procedimiento de cultivo. Transcurrido el tiempo de cultivo, se sometieron a ultrasonido durante 30 minutos a fin de extraer los endoglucanos, en fracciones de 10 minutos cada una para evitar calentamiento excesivo y posible degradación de polisacáridos. El contenido de cada recipiente se centrifugó a $650 \times g$ durante 20 minutos. Luego, se colectó la biomasa, se enjuagó con agua destilada y se secó a 80 °C hasta peso constante. Los polisacáridos crudos fueron precipitados del medio de cultivo mediante la adición de cuatro volúmenes de etanol 95 %, centrifugando a $650 \times g$ durante 10 minutos y luego secados a 60 °C (para más detalle del procedimiento ver Anexo 1, Protocolo N°4). Se realizaron tres réplicas de cultivo para cada cepa y control.

Figura 10. Esquema del procedimiento empleado en el cultivo líquido de *Ganoderma* spp.



2.2.4. Análisis estadístico

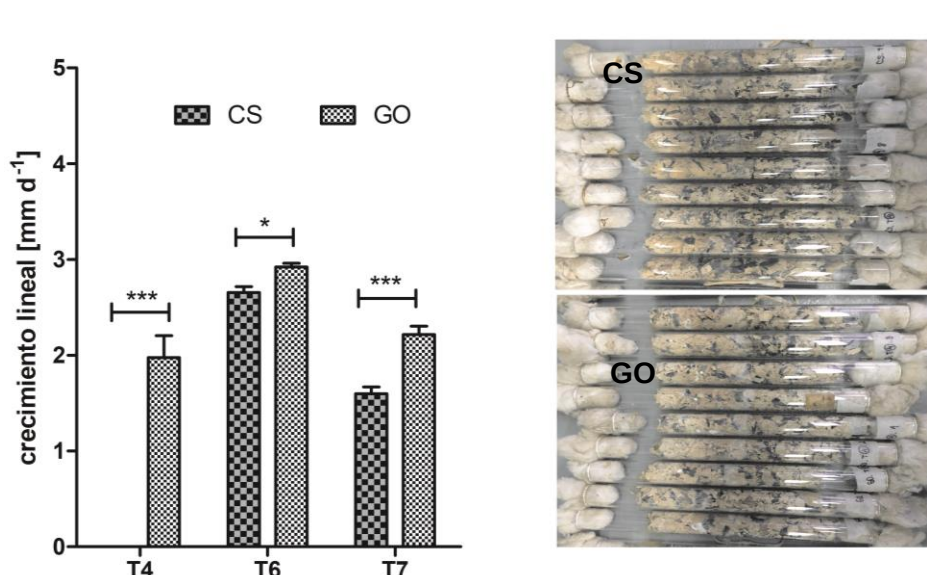
Los resultados del test lineal en sustratos adicionales fueron analizados mediante ANOVA de doble vía y posterior test de Bonferroni de comparación múltiple. Las diferencias entre los rendimientos de biomasa y polisacáridos en cultivo líquido se establecieron en el día de máxima producción para cada especie analizada mediante ANOVA de una vía seguido por el test de Bonferroni. El ajuste de modelos (lineales o no lineales con efectos mixtos) se estimó mediante la interfase R que ofrece el programa Infostat (Pinheiro y Bates 2004, Di Rienzo *et al.* 2020).

2.2.5. Resultados

Ninguno de los tratamientos adicionales condujo a mejores resultados en *Ganoderma* sp. CS y *Ganoderma* spp. GO (Figura 11). Si bien para ambas cepas en sustrato de álamo más CSG el crecimiento fue mayor en comparación a los demás tratamientos adicionales ($p < 0,001$), éste no superó al rendimiento obtenido en el primer test lineal para CSG suplementada con cebada (T2), siendo inferior para GO ($p < 0,001$) y sin diferencias significativas ($p > 0,05$) para CS. Ninguna de

las cepas mostró crecimiento luego de 21 días de cultivo en aserrín de pino, mientras que sólo GO desarrolló crecimiento micelial en aserrín de álamo ($p<0,001$).

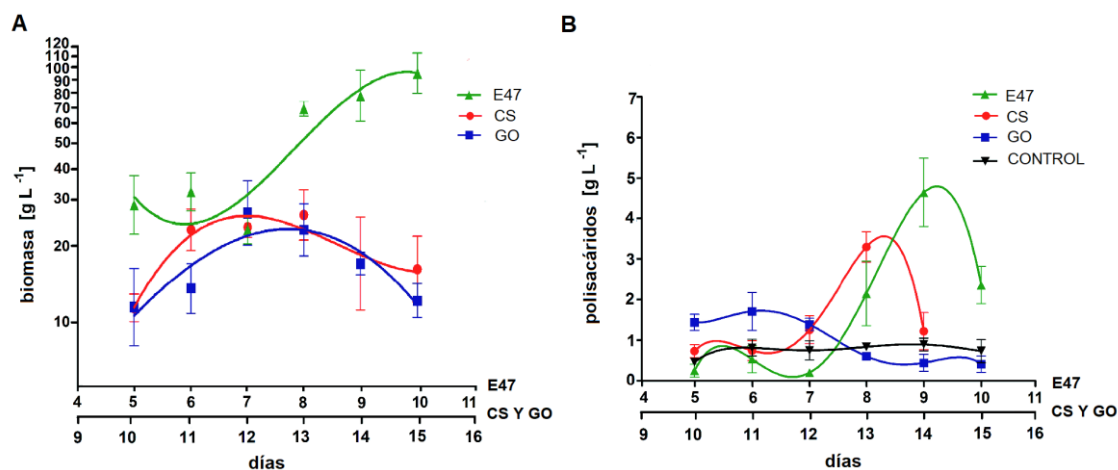
Figura 11. Crecimiento lineal, en mm d^{-1} , del test lineal de las cepas *Ganoderma* spp. CS y *Ganoderma* spp. GO (izquierda). CS y GO en el día 21 de cultivo en sustrato T6 (derecha).



Los niveles máximos de biomasa obtenidos en cultivo líquido fueron alcanzados luego de 10, 12 y 13 días de cultivo para E47, GO y GL, respectivamente (Figura 12). Estos valores fueron significativamente diferentes entre las tres cepas ($p<0,05$). Luego de realizar la comparación múltiple del test de Newman-Keuls, la máxima producción de biomasa para E47 fue significativamente diferente respecto a las otras dos cepas ($p<0,05$), mientras que CS y GO no difirieron entre ellas. Este test fue elegido entre los test *post-hoc* disponibles en el *software* por ser más poderoso y confiable que el test de Tukey en la detección de diferencias entre medias de los grupos. Los máximos rendimientos de polisacáridos se obtuvieron a los días 9, 11 y 13 para E47, GO y GL respectivamente. Se encontraron diferencias significativas entre los niveles máximos de polisacáridos de E47 y GO ($p<0,05$), mientras que este valor para CS no fue significativamente diferente respecto a las otras dos cepas ($p>0,05$).

Figura 12. Cultivo sumergido de *Ganoderma* spp. A. Rendimiento de biomasa en gramos por litro de cultivo (semilogarítmico) producido por el micelio de *Ganoderma* sp. E47 (E47),

Ganoderma sp. GO (GO) y *Ganoderma* sp. CS (CS). El eje x superior muestra la escala de tiempo de E47 y la inferior, de GO y CS. **B.** Rendimiento de polisacáridos en gramos por litro de cultivo. El control indica el contenido de polisacáridos propios del medio de cultivo sin inocular. Las ecuaciones ajustadas y los valores de ajuste de los modelos se presentan en el Anexo 1, Data 1.



2.3. Parte III

Identificación taxonómica de las cepas cultivadas

2.3.1. Introducción

Dentro de los Basidiomicetos, las especies del género *Ganoderma* se distribuyen mundialmente (Pilotti, 2005). Crecen como parásitos facultativos en los troncos y ramas de árboles vivos y muertos, y viven como saprofitos en árboles en descomposición. Las especies de *Ganoderma* son valoradas en todo el mundo por sus diversas propiedades medicinales y beneficios para la salud, especialmente en relación con los polisacáridos y su actividad inmunomoduladora (Bishop *et al.*, 2015; Cao *et al.*, 2018), siendo *G. lucidum* la especie tipo dentro del género (Moncalvo y Ryvarden, 1997).

El género *Ganoderma* es uno de los más complejos dentro de los *Polyporales* y respecto a su taxonomía existe una gran confusión, lo que constituye una barrera contra su completo desarrollo

como producto medicinal (Moncalvo, 2005; Zhou *et al.*, 2015; Papp, 2019). En 2018, el *Index Fungorum* contenía 445 registros de especies de *Ganoderma*, pero se estima que existen solo 80 especies de este género alrededor del mundo, lo que sugiere que muchos de esos registros son, en realidad, sinónimos (Hapuarachchi *et al.*, 2018). La situación taxonómica se vuelve aún más compleja al existir miembros morfológicamente similares a *Ganoderma* en los géneros *Fomes*, *Polyporus* y *Tomophagus* (Paterson, 2006). A su vez, *G. lucidum* es el nombre más erróneamente usado dentro del género (Papp, 2019), a menudo confundido con, por ejemplo, *G. lingzhi*, siendo ambas las especies medicinales más reconocidas.

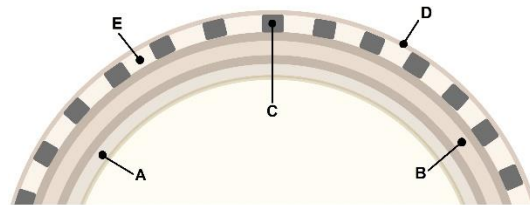
La incorrecta identificación de las especies conlleva a una inconsistencia entre los distintos reportes relacionados con las propiedades medicinales (Szedlay, 2002), ya que las diferencias en los perfiles metabólicos se asocian a diferentes actividades biológicas. Esta inconsistencia ha sido perpetuada por décadas debido a que la clasificación de *Ganoderma* spp. se ha basado solo en la morfología de los basidiomas y de las esporas. Por lo antes mencionado, resulta crucial asignar correctamente la especie de hongos a la hora de identificar aquellos a los que se les atribuye propiedades medicinales. Se ha propuesto que es necesaria la combinación de métodos morfológicos, quimiotaxonómicos y moleculares para realizar asignaciones taxonómicas invariables (Richter *et al.*, 2015; Welti *et al.*, 2015).

Análisis morfológico. La familia *Ganodermataceae* cuenta con una gran representatividad dentro de los poliporales, y en ella se han reconocido 7 géneros, estos son, *Amauroderma*, *Foraminispora*, *Furtadoa*, *Ganoderma*, *Haddowia*, *Humphreya* y *Polyporopsis* (Costa-Rezende *et al.*, 2017; Richter *et al.*, 2015). Los miembros de esta familia son, en general, cosmopolitas y se diferencian del resto de los miembros de los Polyporales por tener un tipo particular de basidiosporas con doble pared (Moncalvo, 2000), que en *G. lucidum* (W. Curt.: Fr.) son típicamente ovoideas, equinuladas y truncadas en el ápice. Dentro del género *Ganoderma* las especies producen dos tipos de basidiomas, laqueados con una cara superior brillante, y no laqueados (Pilotti, 2005; Smith and Sivasithamparam, 2000a).

Tanto la forma de las basidiosporas como la estructura del sombrero han sido los primeros caracteres taxonómicos empleados en la sistemática de setas. Un esquema de la estructura de las

basidiosporas se presenta en la Figura 13. El *episporium* o *eusporium*, la pared consecutiva al *endosporium*, está compuesto principalmente por quitina y glucanos, al ser el encargado de la producción de microfibrillas. Esto le confiere la característica de ser impermeable a soluciones calientes de KOH, dándole al *episporium* una apariencia hialina e impidiendo, además, la coloración del *endosporium*. En esporas ornamentadas, el *episporium* puede contener sustancias amiloides que reaccionan con el reactivo de Melzer. En estas esporas, tanto el *perisporium* como el *ectosporium* pueden desaparecer en la madurez, volviéndose el *exosporium* la pared más externa, momento en el cual se habla de *endo* y *myxosporium* (Halbwachs y Bässler, 2015) (Figura 13). Estas particularidades son tenidas en cuenta por varios autores a la hora de describir la morfología de las esporas de *Ganoderma*.

Figura 13. Estructura general de una spora fúngica. A. *endosporium*; B. *episporium* (*eusporium*); C. *exosporium*; D. *ectosporium*; E. *perisporium*. Basado en Halbwachs *et al.* (2015), Cléménçon *et al.* (2012), y Largent *et al.* (1978).



Test de antagonismo entre cepas. Con el fin de sortear los inconvenientes que acarrea la identificación de especies en base a la morfología de los basidiocarpos, se han investigado métodos alternativos y/o complementarios para la asignación taxonómica. Entre ellos, el test de antagonismo permite evidenciar la presencia de hifas con distinta carga genética cuando estas son puestas en contacto (Zhang *et al.*, 2017). Las interacciones que involucran a hongos y bacterias dan lugar a interacciones positivas (cooperación) y negativas (competencia). El intercambio de moléculas de señalización entre microorganismos co-ocurrentes puede inducir la producción de enzimas tales como oxidasas degradantes de lignina o compuestos que permiten a un hongo establecerse y proteger su territorio, y, por lo tanto, sus nutrientes.

La incompatibilidad somática en los hongos a menudo se evidencia mediante interacciones combativas entre especies, como pueden ser la formación de pigmentos, de líneas elevadas de

micelio denso, zonas de escaso crecimiento, entre otras. A menudo, se denominan líneas de antagonismo a las regiones con estas características en medios de crecimiento donde se enfrentan cepas fúngicas (Worrall, 1997). La competencia entre los hongos puede conducir a reacciones antagónicas, donde los extremos de las hifas individuales muestran granulación, hinchazón o vacuolización, resultantes de la permeabilización celular. Durante el alorreconocimiento pueden ocurrir dos reacciones, estas son la prevención de la anastomosis somática y la interacción macroscópica, fácilmente observable en un medio de crecimiento en estado sólido (Krause *et al.*, 2020).

Análisis filogenético. Durante décadas y tal como se ha mencionado anteriormente, la clasificación de *Ganoderma* spp. se ha basado únicamente en la morfología del basidioma y de sus esporas dado el valor taxonómico aportado por su ornamentación. Sin embargo, la asignación taxonómica basada en análisis morfológico ha mostrado ser inconsistente al tratarse de un género de gran plasticidad en sus caracteres fenotípicos, los cuales dependen de la localización geográfica, de factores ambientales o del tipo de células fúngicas estudiadas (Moncalvo, Wang y Hseu, 1995; Gottlieb, Ferrer y Wright, 2000; Szedlay, 2002; Papp, 2019). Es por esto que las clasificaciones establecidas de esta manera han llevado a incertidumbre, a establecer delimitaciones de especies ambiguas y a hacer un uso erróneo del nombre de las especies (Papp, 2019).

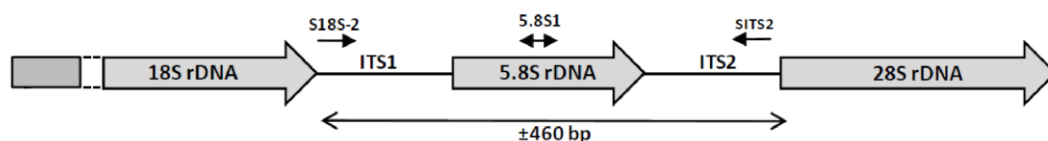
El código de barras genético (*DNA barcode*) asociado a una especie es la región de su genoma que puede ser utilizada para la identificación de ésta, distinguiendo variaciones inter e intraespecíficas. En la actualidad, el análisis del código de barras genético (*DNA barcoding*) es la herramienta más aceptada para la identificación de especies de *Ganoderma* (Zhou *et al.*, 2015; Jargalmaa *et al.*, 2017; Papp, 2019). Estudios iniciales realizados por Moncalvo *et al.* (1995a,b) ya evidenciaban el poder del *barcoding* de ADN ribosomal en la taxonomía de la familia *Ganodermataceae*. Sin embargo, cierto número de secuencias que han sido depositadas en bases de datos públicas derivan de una identificación incorrecta de la especie, por lo que el análisis filogenético resulta erróneo si las fallas no son corregidas en estas plataformas (Jargalmaa *et al.*,

2017; Papp, 2019). Szedlay (2002) ha sugerido un análisis multifacético basado en el uso de secuencias de ADN ribosomal y métodos subsidiarios que asistan a una diferenciación entre especies cercanas. Tanto la biogeografía como el apareamiento (*mating*) han sido considerados entre las herramientas de más valor en la delimitación de especies (Papp, 2019). En particular, dado que el taxón *Ganoderma* ha sido restringido geográficamente (Papp, 2019), la biogeografía ha contribuido enormemente a los análisis filogenéticos *multilocus* de la familia *Ganodermataceae* (Zhang *et al.*, 2017).

Dentro de los métodos secundarios de estudios de análisis filogenético, las características del cultivo y el análisis del apareamiento han sido tempranamente reconocidos como herramienta para la resolución de especies muy emparentadas o con morfología similar (Moncalvo, 2000). En el estudio de Zhang *et al.*, (2017) se infieren relaciones filogenéticas a partir del análisis de estructuras secundarias y del polimorfismo de nucleótidos de secuencias ITS1 (*Internal Transcribed Sequence 1*), complementado con el test de compatibilidad somática para definir especies biológicas, considerado por Moncalvo *et al.*, (1995a) un factor fundamental en la taxonomía de *Ganoderma*. Adicionalmente, el estudio de patrones de isoenzimas en electroforesis ha sido empleado en la clasificación de *Ganoderma* spp. (Huie y Di, 2004) y se ha propuesto como una herramienta rápida para la identificación de especies (Smith y Sivasithamparam, 2000). Entre los marcadores quimiotaxonómicos de *Ganoderma* spp. típicamente se encuentran los triterpenoides y polisacáridos, ambos reconocidos como sus principales componentes (Paterson, 2006). No obstante, la clasificación en base a estos marcadores debe ser validada con filogenia molecular a fin de evitar confusiones. Hennicke *et al.* (2016) han mostrado exitosamente que *G. lucidum sensu stricto* y *G. lingzhi*, identificados mediante técnicas moleculares, difieren en su perfil de triterpenoides. Sin embargo, la interpretación de los perfiles cromatográficos puede no ser una tarea simple considerando que para *Ganoderma* spp. han sido descritos más de 300 triterpenoides (Lin y Yang, 2019). Además, dependerá del tejido del hongo en cuestión, ya que los triterpenoides se han reportado mayoritariamente en basidiomas y esporas de *Ganoderma* spp. Las secuencias de genes nucleares y mitocondriales han sido de elección para los micólogos desde el surgimiento de las técnicas de análisis filogenético dada la facilidad de acceso a los cebadores

complementarios a dichas secuencias y a su carácter conservado (Thon y Royse, 1999). Las secuencias de ITS han representado gran utilidad en el desarrollo del análisis del código de barras genético de los hongos como herramienta de análisis filogenético (Jargalmaa *et al.*, 2017; Schoch *et al.*, 2012). Dentro del género *Ganoderma*, los primeros estudios en búsqueda de marcadores moleculares para la resolución de su taxonomía han empleado secuencias ITS y LSU (*partial Large Subunit rDNA*) (Figura 14) (Moncalvo *et al.*, 1994, 1995, 2000; Jargalmaa *et al.*, 2017). Entre los genes codificantes de proteínas con funciones metabólicas o estructurales, surgió el interés del estudio de 13 genes de tubulina en la investigación de relaciones entre hongos a todos los niveles, resultando ser efectivas en estudios filogenéticos de grupos complejos (Thon y Royse, 1999). En la actualidad, otros *loci* tales como el factor de elongación 1- α (*tef1- α*) y la segunda secuencia de la subunidad mayor de la ARN polimerasa II (*rpb2*) han contribuido a la resolución de relaciones evolutivas ambiguas entre especies de *Ganoderma* spp. (Liu, Whelen y Hall, 1999; Matheny *et al.*, 2007; Jargalmaa *et al.*, 2017). Por otro lado, el análisis de las estructuras secundarias de la secuencia ITS1 resultó ser útil en la delimitación de grupos en análisis filogenéticos de *Ganoderma*, donde las especies emparentadas tenían una estructura conservada en común (*core*) (Zhang *et al.* 2017).

Figura 14. Representación esquemática de parte del operón ADN_r que indica las posiciones de los cebadores utilizados para generar *primers* de ITS y LSU.



Caracterización inmunoquímica. El perfil proteico, es decir la composición de proteínas, de los productos biológicos puede ser empleada como marcador químico en la identificación de su origen botánico, tal como se ha hecho, por ejemplo, para granos de polen (Baroni *et al.*, 2002; Bianchimano *et al.*, 2014). Las proteínas son, junto a los polisacáridos y por su naturaleza química, antígenos por definición, capaces de desencadenar una respuesta inmunológica al

ingresar al organismo de humanos y otros mamíferos si son reconocidos como moléculas no propias. Dada esta cualidad, son empleadas en el desarrollo de inmunoensayos tales como ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) y Western Blot (WB) o inmunoblot. Las proteínas pueden ser separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en base a su peso molecular para evaluar los perfiles proteicos de diferentes productos. Más aún, si luego estas proteínas son transferidas a una membrana o soporte de modo que puedan unirse a anticuerpos específicos, la sensibilidad y especificidad de su identificación se incrementa.

2.3.2. *Objetivo*

Por todo lo mencionado, esta sección tuvo como objetivo establecer la identidad de las cepas de *Ganoderma* en estudio, mediante un estudio filogenético basado en la región ITS1-5,8S-ITS2 (ITS), el factor de alargamiento de la traducción 1- α (TEF1- α), la región LSU y el gen de β -tubulina, incluyendo también el análisis de la biogeografía, el análisis fenotípico, el análisis morfológico de micelios y basidiomas, el análisis de los perfiles de proteínas, el antagonismo micelial, e inmunoensayos. Además de la identificación y caracterización, se propuso evaluar las variaciones entre las cepas en estudio y las estructuras fúngicas analizadas. A fines comparativos, se incluyó en los estudios inmunoquímicos a las especies y cepas *Pleutorus ostreatus* P04 y *Lentinula edodes* L15, ambas cultivadas en el marco de otros estudios del LBHCyM.

2.3.3. *Materiales y métodos*

Análisis morfológico. Se observaron los basidiomas recientemente cosechados y secados al aire a temperatura ambiente y se determinaron las características de interés taxonómico. Se optó por coleccionar basidiomas maduros en los que haya cesado el crecimiento, momento en el que las basidiosporas se depositan en la cara superior, al mismo tiempo que el margen cambia de color blanco a marrón (Hennicke *et al.* 2016). Se establecieron comparaciones morfológicas con basidiomas de *Ganoderma*. Se realizaron cortes transversales en solución de KOH 5 % y agua destilada, y se analizaron bajo microscopio óptico (Leica, Suiza) mediante la aplicación Suite LAS EZ versión 3.4.0, Leica Microsystems (Suiza) para la observación de las basidiosporas. La

caracterización microscópica del micelio se realizó sobre preparados a partir de agar MYG teñidos con Floxina B.

Análisis filogenético. El análisis filogenético de las cepas de *Ganoderma* spp. se realizó con la colaboración de la Dra. Marina Díaz y la Dra. Alicia Carrera e integrantes del grupo de Genética Molecular y Genómica Vegetal (CERZOS-CONICET-UNS). Las cepas analizadas corresponden a las presentadas previamente en la Tabla 1. Se tomó micelio de la superficie de placas de agar con medio MYG (extracto de malta-extracto de levadura-glucosa, preparado a partir de sus componentes) de cada una de las cepas y se lo sometió a una corriente de nitrógeno líquido en mortero estéril. El extracto total de ADN fue obtenido siguiendo el método CTAB (Rogers y Bendich, 1985). Posteriormente se amplificaron mediante PCR la secuencia parcial del 18S, la secuencia completa de ITS1 (5.8S) e ITS2, y la secuencia parcial del 28S empleando cebadores ITS1f/ITS4 (White *et al.*, 1990; Gardes y Bruns, 1993). Para *Ganoderma* spp. GO también se amplificó la secuencia del gen TEF1- α (*translation elongation factor 1- α*). Para la región 28S del gen nuclear ribosomal ARN (LSU), se utilizaron cebadores LSU1Fd/LR5 (Quaedvlieg *et al.*, 2011) según lo descripto por Loyd (2018). El gen parcial de β -tubulina se amplificó con cebadores β -tubulin_F/ β -tubulin_R (Park *et al.*, 2012). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un cicladador programable PTC-100TM (MJ Research, Inc., CA/MA, USA) y los productos de reacción fueron clonados en pGEM®-T Easy Vector System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos se purificaron empleando el Sistema de purificación Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) y fueron secuenciados en ambas direcciones por el Servicio de INTA Castelar (Buenos Aires, Arg.). Las secuencias obtenidas fueron luego analizadas mediante BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) como análisis preliminar para evaluar su identidad.

Las relaciones filogenéticas fueron inferidas mediante el método RAxML en el *software* Geneious 11.0.5 (Kearse *et al.*, 2012) usando el modelo evolutivo GTR (*general time reversible*). Este método de análisis filogenético fue seleccionado entre los métodos discretos y basados en matrices de distancias disponibles en la actualidad, dada su robustez y su enfoque multiparamétrico de análisis. La verosimilitud del árbol obtenido respecto a la matriz de datos

inicial mediante máxima verosimilitud (*maximum likelihood*, ML) se debe a que en su modelo probabilístico considera la frecuencia de aparición de los nucleótidos, así como la frecuencia de sustituciones en los mismos como rasgos evolutivos, entre otros parámetros. A su vez, este método permite la incorporación de modelos evolutivos a fin de inferir el número real de eventos evolutivos presentes en el conjunto de datos, tal como el de Kimura. Este método evolutivo, comúnmente empleado, supone la existencia de tasas de mutación diferentes durante la estimación de la distancia evolutiva, dependiendo del tipo de nucleótido. Para un análisis de la fiabilidad estadística del árbol o los árboles estimados mediante ML, se seleccionó la técnica *bootstrapp*, la cual consiste en un método computacional que realiza un re-muestreo brindando intervalos de confianza de la filogenia (Felsenstein, 1985; Ren, Ishida y Akiyama, 2013). El análisis *bootstrap* se realizó con un número de 1000 réplicas.

Test de antagonismo entre cepas. El antagonismo entre las cepas *Ganoderma* spp. se realizó según lo reportado por Zhang *et al.* (2017). Brevemente, se añadieron inóculos de cultivos en pico de flauta de cada cepa almacenada a 2-8 °C a placas de agar MYG y se dejó crecer los cultivos. Se transfirieron discos de agar de 7 mm de diámetro con sacabocados a placas con PDA (papa-dextrosa-agar) y luego de medio PDA a medio de aceleración (3,5 % sacarosa, 0,5 % peptona, 0,25 % extracto de levadura, 0,1 % KHPO₄. H₂O, 0,05 % MgSO₄.7H₂O, 0,005 % cloruro de tiamina, 1,5 % de agar, pH 5,5, preparado a partir de sus componentes). Todos los cultivos se mantuvieron a 22 °C durante 1-2 semanas. Como control negativo de antagonismo, se enfrentaron discos de agar correspondientes a la misma cepa en medio MYG y medio de aceleración.

Caracterización inmunoquímica. Los siguientes ensayos se realizaron bajo la supervisión de la Dra. María Inés Prat, y con la colaboración de Ileana Lencinas y el Dr. Marcelo Galvez en el Laboratorio de Inmunología-INBIOSUR-CONICET-UNS.

A) Preparación de los extractos proteicos. Se extrajeron las proteínas de basidiomas y micelios de las diferentes cepas para luego ser caracterizadas. Los extractos fueron preparados según lo descripto por Bianchimano *et al.* (2014). Se pesó exactamente alrededor de 0,1 g de material y se removieron los lípidos con 100 mL de acetona en baño frío durante 10 minutos. La extracción se

realizó a 4 °C durante 24 horas con agitación constante en 10 ml de agua destilada. Cada extracto fue liofilizado y luego resuspendido en 1 mL de agua destilada. El contenido de proteínas fue determinado por el método de Bradford (Bradford, 1976) empleando seroalbúmina bovina (BSA) como estándar para la construcción de la curva de calibrado. En el estudio se incluyeron, además, basidiomas de *Pleurotus ostreatus* P04 y *Lentinula edodes* L15, cultivados en el LBHCyM en sustrato de CSG y paja de arroz (Mercedes, Corrientes, Argentina), respectivamente (Postemsky *et al.*, 2019, 2017).

B) Preparación de anticuerpos policlonales. En este estudio, se obtuvieron anticuerpos policlonales específicos contra el basidioma de *Ganoderma* sp. E47 como herramienta útil en la evaluación de los perfiles antigénicos de las cepas en estudio. El bioensayo fue llevado a cabo de acuerdo al Protocolo Número 122/2018 "Valorización farmacéutica y nutricional de cepas de *Ganoderma* para la formulación de suplementos dietarios" aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso Animal (CICUAE) bajo la resolución CDBByF 287/18 del Consejo del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur.

Dos conejos neozelandeses hembras de 3 meses de edad y 3 kg de peso fueron inoculados con partes iguales de extracto proteico de *Ganoderma* sp. E47 y adyuvante de Freud (0,5 mL de volumen total) vía subcutánea, en intervalos de dos semanas durante un período de 60 días (Tarlo *et al.*, 1979). Al comienzo y durante el plan de inoculación se tomaron muestras de sangre de ambos conejos. El título de anticuerpos fue determinado mediante ELISA indirecto (Voller *et al.*, 1978) en microplacas de 96 wells (JetBiofil) y lector de microplacas Nunc MaxiSorp Strips, como la dilución del suero "anti- *Ganoderma* sp. E47" obtenido que produce la mitad de la respuesta máxima.

C) ELISA de inhibición. Se evaluó la existencia de reactividad cruzada entre proteínas del basidioma de *Ganoderma* sp. E47 y el micelio de la misma cepa, así como también micelios de *Ganoderma* sp. GO y *Ganoderma* sp. CS, y el basidioma de *Ganoderma* sp. E27 mediante ELISA de inhibición (Bernardes *et al.* 2010). A fines comparativos, se incluyeron en el estudio extractos

de basidiomas de *Pleurotus ostreatus* (P04) y *Lentinula edodes* (L15), siendo estas dos últimas setas cultivadas en el LBHCyM-CERZOS.

Las microplacas fueron cubiertas con 1 µg de proteínas de basidioma de *Ganoderma* sp. E47 durante 1 h. Luego, fueron bloqueadas con solución al 3 % de BSA en buffer fosfato salino (PBS) a 4 °C *overnight*. Las microplacas fueron lavadas seis veces con solución del surfactante no iónico Tween 20 al 0,05 % en PBS y luego incubadas con el suero "anti- *Ganoderma* sp. E47", el cual había sido previamente incubado a 4 °C *overnight* con diluciones seriadas de los extractos proteicos de todas las muestras en un rango desde 0,001 a 200 µg mL⁻¹. Se empleó BSA como inhibidor inespecífico. Finalmente, las microplacas se enjuagaron y se inició la reacción colorimétrica con orto-fenilenediamina (OPD, Sigma) y 30 vol. H₂O₂, y luego fue detenida con ácido sulfúrico 4 N. El nivel de IgG anti- *Ganoderma* sp. E47 residual no inhibida se determinó a 490 nm.

D) Electroforesis en gel, Western Blot (WB) y WB de inhibición. Un total de 15 µg de proteínas de cada especie fueron separados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-Tricina 12,5 % (SDS-PAGE) (Schägger y von Jagow, 1987). El gel resultante fue teñido con Coomassie Brilliant Blue R-250. Las condiciones de la corrida fueron las siguientes: 90 V, 44 mA, 4 h. Para el inmunoblot para IgG específica, se realizó un SDS-PAGE con las especificaciones antes descriptas. Las proteínas separadas fueron luego transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham) empleando buffer 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20 % metanol, pH 8,3, en un sistema Hoefer TE 22, Amersham Pharmacia Biotech (Burnette, 1981). La membrana fue bloqueada con TBS (*Tris Buffered Saline*, 50 mM Tris-HCl HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4) en 5 % de leche descremada a 4 °C *overnight*. Al día siguiente, fue lavada seis veces con Tween 20 al 0,05 % en TBS y luego incubada con el suero "anti-*Ganoderma* sp. E47" diluido 1/300 con leche descremada al 1 % y Tween 20 al 0,05 % en TBS a temperatura ambiente durante 1 h. Al finalizar seis lavados con TBS-Tween, la membrana fue incubada 1 h con anticuerpos IgG de cabra "anti-conejo" marcados con peroxidasa. Luego de enjuagar la membrana, las bandas proteicas fueron detectadas con el kit ECL (Pierce, Thermo Scientific). Como ensayo confirmatorio de lo observado en el

WB, se llevó a cabo un WB de inhibición (Bernardes *et al.*, 2010). Para este, se separaron 15 µg de proteínas del basidioma de *Ganoderma* sp. E47 mediante SDS-PAGE y se las transfirió a una membrana de nitrocelulosa siguiendo el protocolo antes descrito. La membrana fue cortada en cada calle, y cada tira fue incubada con el suero específico “anti-*Ganoderma* sp. E47”, preincubado a 4°C toda la noche con proteínas de las especies que hayan demostrado reactividad cruzada en los ensayos anteriores o con BSA, a una concentración final de 100 µg mL⁻¹ de suero. El protocolo continúa como fue anteriormente descrito. Las bandas residuales de *Ganoderma* sp. E47 no inhibidas fueron visualizadas con el kit ECL.

2.3.4. Disponibilidad de los datos en plataformas públicas.

Las secuencias ITS de *Ganoderma* sp. GO, *Ganoderma* sp. CS y *Ganoderma* sp. E47 fueron enviadas a *GenBank* bajo los números de acceso MT196416, MT196417, y MT196418, respectivamente, y las secuencias *TEF1-α* bajo los accesos MW281494, MW281495, y MW281496. Los alineamientos correspondientes están disponibles en TreeBASE (S26866).

2.3.5. Resultados

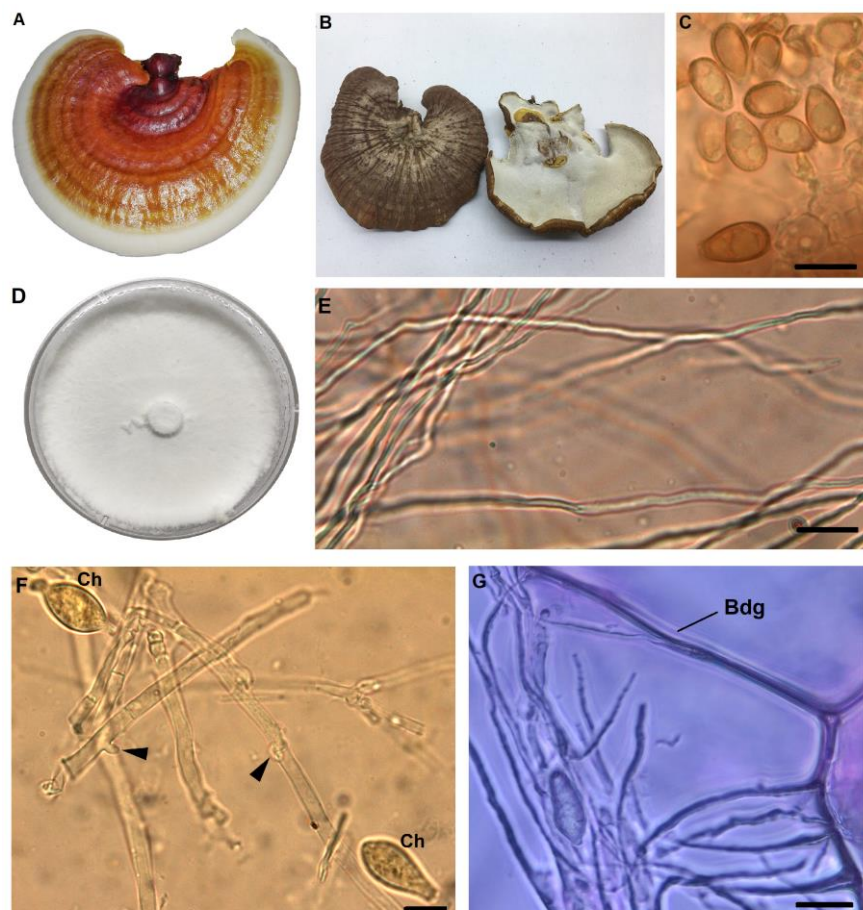
Análisis morfológico. Los basidiomas de *Ganoderma* sp. E47 cultivados mediante FES en sustrato CSG fueron laqueados con una coloración marrón-anaranjada, reniformes o dimidiados y sésiles. El tamaño del basidioma mostró variaciones en su tamaño dependiendo del número de oleada de cultivo, desde unos 10 cm de largo en la primera cosecha, mostrando una tendencia a disminuir el tamaño, y alcanzando un promedio de 2,5 cm de ancho en la tercera oleada de cosecha. El himenóforo poroso mostró poros de forma circular a irregular, con una regularidad de 6 por mm, y 100-150 µm de diámetro, eventualmente fusionados con uno o dos poros adyacentes. Las basidiosporas fueron ovoides, con doble pared, ornamentación suave y truncadas en el ápice. La pared más externa (probablemente el *ectosporium*) fue delgada y oscura. A fines prácticos, para la determinación de las medidas se utilizó la nomenclatura dual *endosporium-myxosporium* para denominar a las paredes interna y externa, respectivamente (Figura 13). Las basidiosporas, con espículas o espinas que protruyen desde el *endosporium* hacia el *myxosporium*,

presentaron las siguientes dimensiones: 10,1-10,3 μm de largo por 6,0-6,8 μm de ancho, incluyendo al *myxosporium*, y 8,8-9,7 μm de largo por 4,9-5,8 μm de ancho considerando solo al *endosporium*.

El micelio fue denso y blanco, con textura algodonosa en la madurez en placas con medio MYG. Por otra parte, la observación del micelio obtenido de esta cepa en el mismo medio de cultivo mediante microscopía óptica permitió la observación de un sistema hifal trimítico hialino. Las hifas generativas presentaron regularmente fíbulas (*clamps*) y fueron positivas para el reactivo de Melzer (IKI+), con diámetro 3,2–3,9 μm . Se observaron hifas esqueléticas largas (0,9–1,8 μm de diámetro) e hifas conectivas con bifurcaciones (1,6–1,8 μm de diámetro). En cultivos de una semana de edad se observó la presencia de clamidosporas tanto terminales como no terminales, dextrinoides y lisas, IKI+, con forma elíptica a obpiforme, con paredes hialinas y de dimensiones $17,1 \pm 2,9 \mu\text{m}$ de largo $\times$ $10,4 \pm 1,5 \mu\text{m}$ de ancho (Figura 15).

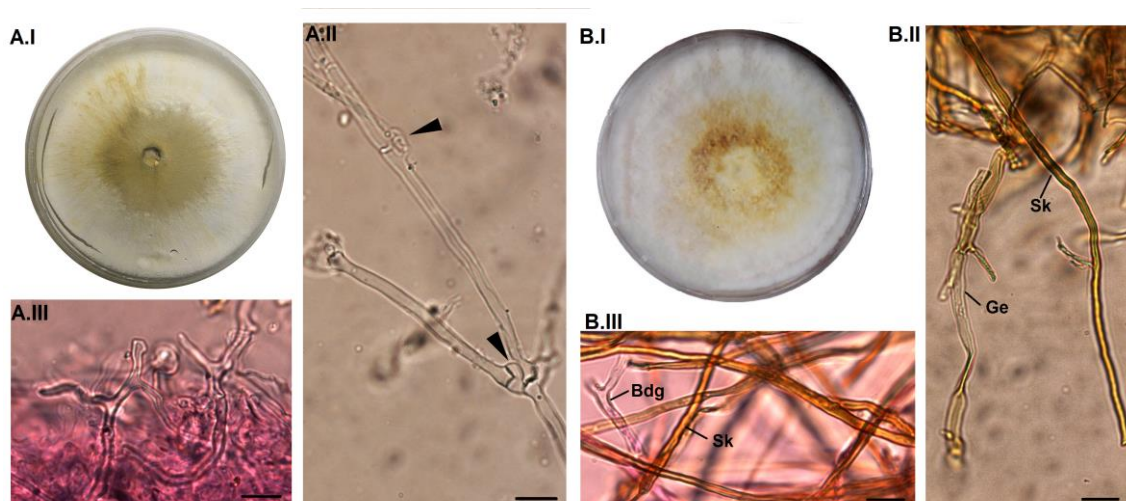
Figura 15. Morfología de *Ganoderma* sp. E47. Basidioma (A-C): A. Basidioma fresco

laqueado; B. Basidiomas secos. C. Basidiosporas lisas observadas en agua destilada. Micelio (D-G): D. Micelio de una semana de edad en medio MYG; E. Hifas esqueléticas; F. Hifas generativas con fíbulas o septos (flechas) y clamidosporas (Ch); G. Hifas conectivas (Bdg), teñidas con Floxina B. Barras: 10 μm .



En ausencia de basidiomas de estas especies, el análisis morfológico de GO y CS fue realizado sobre el micelio. El micelio de *Ganoderma* sp. GO fue blanco a levemente amarillo en la madurez en medio MYG, con hifas generativas (2,9–4,6 μm de diámetro) fibuladas, escasas hifas esqueléticas (0,9–1,6 μm de diámetro), e hifas conectivas ramificadas de paredes gruesas (1,7–2,6 μm de diámetro), todas ellas negativas al reactivo de Melzer (IKI–). El micelio de *Ganoderma* sp. CS fue de blanco a amarronado en la madurez, de textura lanosa en el medio de cultivo antes mencionado. El sistema hifal (IKI–) fue trimítico y hialino, con hifas generativas (2,4–3,6 μm de diámetro) raramente fibuladas, hifas esqueléticas amarronadas y largas (1,9–2,3 μm de diámetro) e hifas conectivas bifurcadas (1,1–1,8 μm de diámetro). Ni *Ganoderma* sp. GO ni *Ganoderma* sp. CS presentaron clamidosporas luego de dos semanas de cultivo en medio MYG. Por otra parte, los basidiomas de la cepa E27 mostraron una morfología marcadamente diferente a la observada en *Ganoderma* sp. E47, ramificados durante su estadio de primordios blanquecinos, y luego con sombreros de crecimiento efuso-reflejo, amarronados y adquiriendo una coloración rojiza, pudiendo observarse en grupos (Figura 8).

Figura 16. Morfología de los micelios de *Ganoderma* sp. GO (A) y *Ganoderma* sp. CS (B). A.I. y B.I. Micelio de dos semanas de edad en placas con MYG. A.II. Hifas generativas con fíbulas o septos (flechas) en agua destilada; A.III. Hifas conectivas ramificadas teñidas con Floxina B; B.II. Hifas esqueléticas (Sk) largas y amarronadas, e hifas generativas (Ge); B.III. Hifas conectivas (Bdg) bifurcadas y abundantes hifas esqueléticas (Sk) teñidas con Floxina B. Barras: 10 μm .



Análisis filogenético. Todas las cepas amplificaron las secuencias de ITS y LSU. Sin embargo, en la cepa *Ganoderma* sp. E27 el gen de beta tubulina no fue amplificado. Luego de ingresar la secuencia de ITS correspondiente a esta última cepa en la base de datos BLAST, la misma resultó ser similar en más de un 92 % y con un porcentaje de cobertura mayor al 90 % con respecto a especies del género *Phellinus*. Luego de la construcción del árbol filogenético con secuencias de *Phellinus* de bibliografía, se infirió que su clasificación previa como *Ganoderma* sp. era errónea (Figura 17). Las secuencias empleadas para la construcción del árbol filogenético en base a secuencias de ITS de *Phellinus* se enlistan en Anexo 1, Tabla 1.

De acuerdo con la filogenia obtenida a partir de secuencias ITS (Figura 18.A) y la taxonomía definida por Cao *et al.* (2012), Wang *et al.* (2012) y Loyd (2018), *Ganoderma* sp. CS fue identificada como *G. lingzhi*. *Ganoderma* sp. E47 fue identificada como *G. sessile*, siendo *G. resinaceum* de Europa su vecino más próximo, formando ambas especies dos grupos claramente resueltos en el árbol filogenético de regiones ITS1 (Figura 18.B). *Ganoderma* sp. GO quedó incluido en el clado definido por *G. lucidum* de Europa y por *G. tsugae*-*G. oregonense* de América, de acuerdo con lo reportado por Zhou *et al.* (2015) y Loyd (2018). La resolución entre *G. tsugae* y *G. oregonense* no fue posible mediante filogenia ITS ni ITS1. El análisis de las estructuras secundarias de las regiones ITS1 de *Ganoderma* sp. GO (MT196417), *Ganoderma* sp. CS (MT196416), y *Ganoderma* sp. E47 (MT196418) se correspondieron con las estructuras básicas de *G. tsugae*-*G. oregonense* grupo 2 (Anexo 1, Figura 2A), *G. lingzhi* (Anexo 1, Figura 2C), y *G. sessile* grupo 2 (Anexo 1, Figura 2D.II), respectivamente. Este último análisis confirmó la filogenia antes establecida, aunque tampoco permitió la separación de las especies *G. tsugae*-*G. oregonense*. Este inconveniente fue resuelto a partir del análisis filogenético del gen *TEF1-α* (Figura 19) donde ambas especies conformaron claramente clados separados, quedando *Ganoderma* sp. GO incluido en el grupo *G. oregonense*. Los árboles resultantes del análisis filogenético de las cepas de *Ganoderma* con secuencias de referencia para LSU y beta tubulina se muestran en el Anexo 1, Figura 1.

Figura 17. Árbol filogenético derivado del *internal transcribed spacer* (ITS) de cepas de *Phellinus* spp. Con un recuadro se señala la secuencia analizada en este estudio. La secuencia de ITS de *Phellinus conchatus* (GQ383703) se incluyó como *outgroup*.

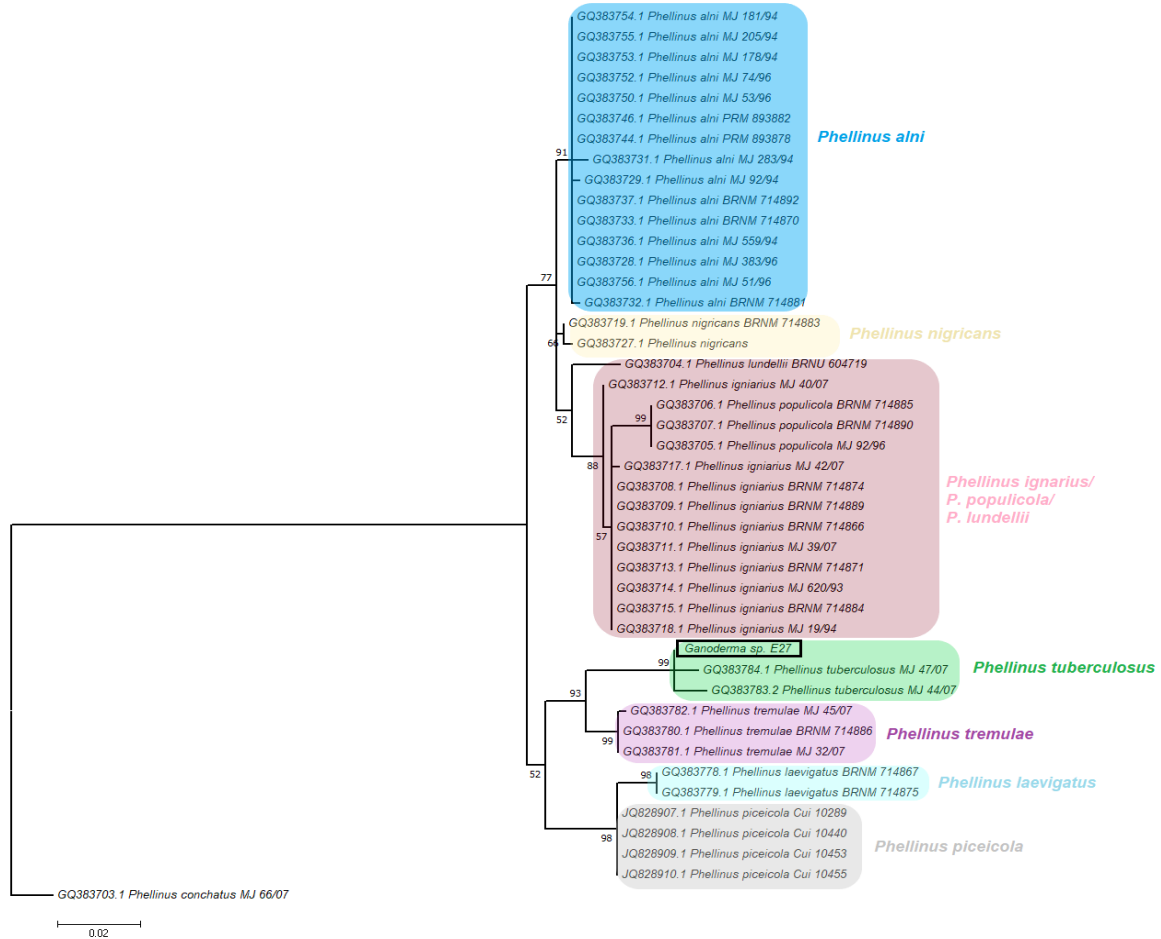


Figura 18. Árboles filogenéticos de 57 cepas de *Ganoderma* spp. A. Árbol derivado del *internal transcribed spacer* (ITS). B. Árbol filogenético derivado de regiones ITS1 extraídas de secuencias en A. El origen geográfico de las secuencias se muestra después de los *accession numbers*. Las cepas para las cuales se propuso una identificación corregida se muestran con un asterisco (*). Las secuencias depositadas en este estudio se destacan con recuadros. La secuencia de ITS de *Tomophagus colossus* (KY646210) se incluyó como *outgroup*. Las secuencias empleadas para la construcción del árbol filogenético se enlistan en el Anexo 1, Tabla 2.

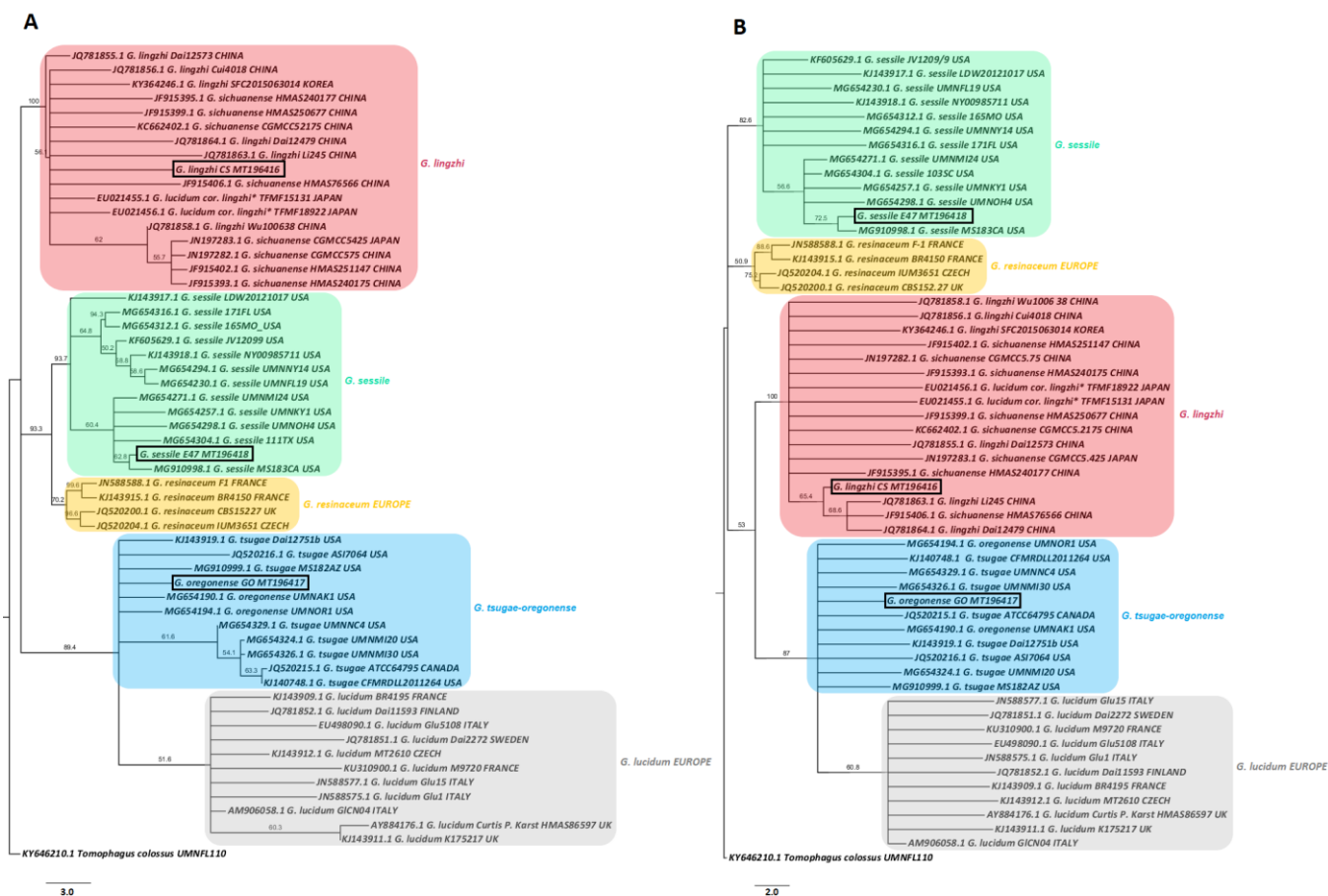
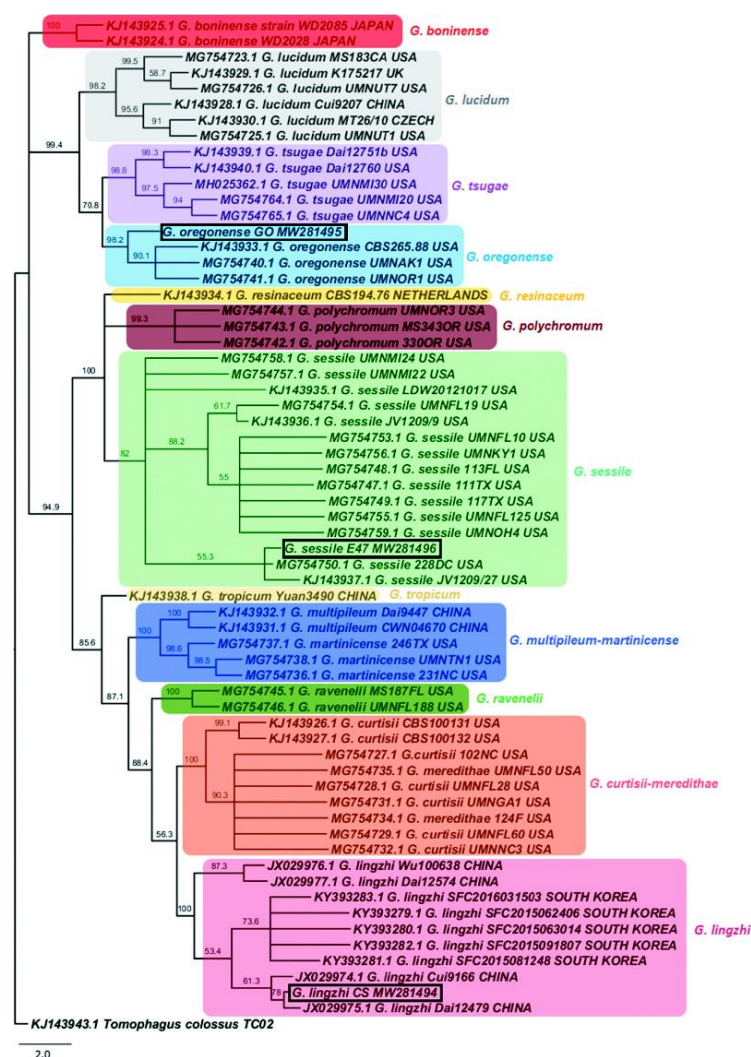


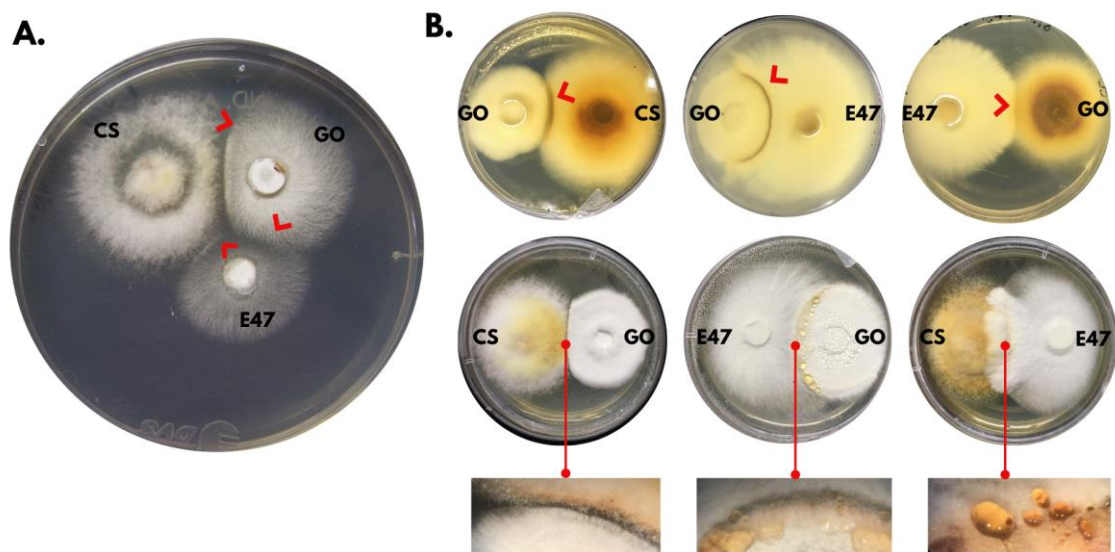
Figura 19. Árbol filogenético derivado del análisis del gen *TEF1-α* de 60 aislamientos de *Ganoderma* spp. El origen geográfico de las secuencias se muestra después de los *accession numbers*. Las secuencias depositadas en este estudio se destacan con recuadros. La secuencia de *TEF1-α* de *Tomophagus colossus* (KJ143943.1) se incluyó como *outgroup*. Las secuencias empleadas para la construcción del árbol filogenético se enlistan en el Anexo 1, Tabla 2.



Test de antagonismo entre cepas. El antagonismo en medio de aceleración entre micelios de las tres cepas de *Ganoderma*, recientemente identificadas filogenéticamente, se evidenció por la presencia de zonas demarcadas en las regiones de enfrentamiento, caracterizadas por áreas de escaso crecimiento, e incluso presencia de sustancias coloreadas (Figura 20). Como prueba confirmatoria de la compatibilidad entre micelios de la misma especie, no se observaron reacciones de antagonismo al enfrentar discos de agar de la misma cepa (Anexo 1, Figura 3).

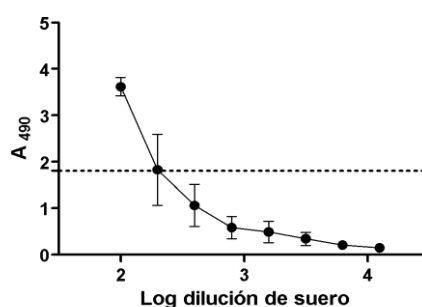
Figura 20. Test de antagonismo somático. A. Placa con co-crecimiento de las tres cepas de *Ganoderma*. **B.** Enfrentamientos de a pares, vistos desde el dorso de las placas (arriba) y vista superior (abajo). Las líneas rojas señalan una vista aumentada de las regiones de antagonismo. Cada una de las cepas enfrentadas se encuentra identificada con sus siglas. Flechas rojas: zonas

de antagonismo. Medio de cultivo: medio de aceleración. GL: *Ganoderma* sp. CS; GO: *Ganoderma* sp. GO; GS: *Ganoderma* sp. E47.



Caracterización inmunoquímica. El título de anticuerpos en el suero "anti-*G. sessile* E47" fue determinado mediante la gráfica de absorbancia a una longitud de onda de 490 nm versus el logaritmo de la dilución de suero empleada en el ELISA indirecto (Figura 21). El resultado permitió seleccionar a la dilución 1/300 como óptima para emplear en los siguientes ensayos.

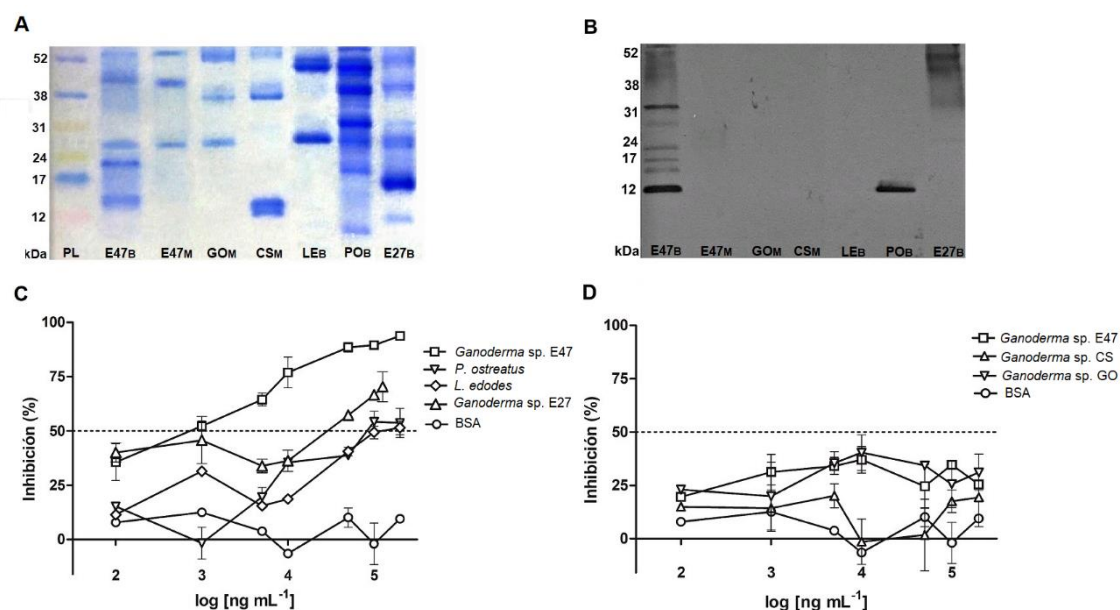
Figura 21. Titulación de anticuerpos específicos contra el basidioma de *Ganoderma* sp. E47.



Como puede observarse en el gel de electroforesis (Figura 22.A), todas las muestras mostraron perfiles proteicos diferentes. El basidioma de *Ganoderma* sp. E47 presentó bandas en el rango de los 12 y los 52 kDa, tres de las cuales fueron compartidas con su respectivo micelio. El micelio de *Ganoderma* sp. GO mostró una banda entre 24 y 31 kDa en común con el basidioma y el

micelio de *Ganoderma* sp. E47, y otra alrededor de 37 kDa compartida con el micelio de *Ganoderma* sp. CS. Esta última cepa mostró bandas no compartidas con el resto de las muestras, alrededor de 12 kDa. Por su parte, el basidioma de E27 también presentó bandas entre los 12 y los 52 kDa, y una banda por debajo de los 12 kDa. El WB (Figura 22.B) reveló la presencia de un único antígeno común entre los basidiomas de *P. ostreatus* y *Ganoderma* sp. E47. Evidentemente, este antígeno sólo estaría presente en basidiocarpos, puesto que ninguna de las proteínas de las muestras de micelio obtenidas en cultivo líquido evidenció reacción con los anticuerpos “anti-basidioma de *Ganoderma* sp. E47”, incluso la muestra correspondiente al respectivo micelio de E47. Por otra parte, *Ganoderma* sp. E27 (*Phellinus* sp.) mostró en el WB compartir al menos tres antígenos en la región de 31-52 kDa con el basidioma de *Ganoderma* sp. E47. Esta reactividad cruzada entre géneros también pudo verse en el ELISA de inhibición, donde el basidioma de *Phellinus* sp. alcanzó niveles de inhibición superiores al 50 %. Finalmente, la reactividad cruzada entre anticuerpos contra el basidioma de *Ganoderma* sp. E47 y los extractos proteicos mostró ser moderada para los basidiocarpos y negativa para los micelios (Figura 22.C,D) El WB de inhibición se correspondió con lo observado en el inmunoblot sin inhibir (Anexo 1, Figura 4).

Figura 22. Caracterización inmunoquímica de micelios y basidiomas. **A.** Extractos proteicos de basidiomas de *Ganoderma* sp. E47 (E47), *Ganoderma* sp. E27 (E27), *L. edodes* (LE) y *P. ostreatus* (PO) obtenidos en FES (B), y micelios de *Ganoderma* sp. E47 (E47), *Ganoderma* sp. CS (CS), y *Ganoderma* sp. GO (GO) obtenidos en cultivo líquido (M). PL: marcadores de peso molecular. **B.** Western Blot de los extractos proteicos revelado con suero “anti- basidioma de *Ganoderma* sp. E47”. **C.** Reactividad cruzada mediada por IgG entre proteínas de basidiomas de *Ganoderma* sp. E47 y basidiomas de *Ganoderma* sp. E47, *P. ostreatus*, *L. edodes* y *Ganoderma* sp. E27 (E27). BSA: seroalbúmina bovina. **D.** Reactividad cruzada mediada por IgG entre proteínas del basidioma de *Ganoderma* sp. E47 y su respectivo micelio, y micelios y basidiomas de las demás especies estudiadas.



2.4. Discusión general

De las 6 cepas empleadas originalmente en este estudio, 4 de ellas (E47, E27, CS y GO) fueron seleccionadas mediante test lineal por su buen rendimiento en el sustrato de CSG (T2) para su posterior cultivo a mayor escala en troncos sintéticos. E47 y E27 fructificaron en este sustrato luego de uno y dos meses de cultivo, respectivamente. Durante la primera y segunda oleada de crecimiento, la producción de biomasa de E47 fue superior a la de E27. CS y GO no fructificaron en las condiciones ensayadas, por lo que se testearon nuevos sustratos. Sin embargo, los rendimientos de estas dos cepas en los sustratos alternativos no fueron superiores a lo observado en T2, por lo que se optó por obtener su biomasa mediante cultivo líquido. La cepa E47, la cual mostró la mayor velocidad de crecimiento y el mayor porcentaje de colonización en T2, como así buenos rendimientos de cultivo en troncos sintéticos, también fue cultivada mediante CL para establecer comparaciones. Más aun, los resultados indicaron que E47 fue también la cepa de mayor velocidad de crecimiento y producción de polisacáridos en cultivo líquido.

G. lingzhi (CS) y *G. sessile* (E47) fueron identificadas fácilmente mediante la filogenia de ITS, confirmado también por el análisis de las estructuras secundarias de ITS1. De acuerdo con lo reportado por Papp (2019), *G. lingzhi* es originaria del Este y Sureste de Asia, Bangladesh y el sur de India. A su vez, es la especie más presente en el mercado mundial de *Ganoderma*. Es por

esto que se deduce que *G. lingzhi* CS sería una especie introducida en Argentina, tal como ha sido sugerido para *G. lucidum* en Estados Unidos (Loyd 2018). No se han reportado colecciones con representantes de *G. lingzhi* en Argentina para establecer comparaciones (Gottlieb *et al.* 2000). Ni la filogenia de ITS-ITS1 ni la visualización de las diferencias en las estructuras de ARNr permitieron resolver entre *G. tsugae* y *G. oregonense*. Tal como fue reportado por Loyd (2018), para separar ambas especies es necesario recurrir al análisis de otro locus tal como el *TEF1-α*, lo que fue concordante con nuestros resultados para *G. oregonense* GO. Por otra parte, el árbol filogenético construido con secuencias ITS del género *Phellinus* permitió clasificar a la cepa E27 como *Phellinus* sp., especie que además había demostrado un rendimiento diferencial a E47 en cultivo sólido.

La morfología de los basidiomas y esporas de E47 fue consistente por lo descripto para *G. sessile* por Zhou *et al.* (2015) y Loyd *et al.* (2019), y la morfología de su micelio fue similar a lo reportado por Zhou *et al.* (2015) para esta especie. Las hifas ramificadas observadas en GO con forma “de cuerno de ciervo” (Figura 16A.III) fue descripto como una característica de *G. oregonense*, *G. zonatum*, y *G. meredithiae* (Adaskaveg y Gilbertson, 1986; Badalyan *et al.*, 2019). La ausencia de clamidosporas en esta especie fue consistente con la taxonomía de *G. lucidum* (Moncalvo 2000; Loyd 2018), teniendo en cuenta que *G. oregonense* es considerada la especie americana de *G. lucidum*. Cao *et al.* (2012) describieron para *G. lingzhi* un sistema hifal trimítico, IKI-, con hifas generativas raramente fibuladas y abundantes hifas esqueléticas, lo que concuerda con lo observado en *Ganoderma* sp. CS. Tal como reportaron Cao *et al.* (2012) y Hapuarachchi *et al.* (2019), no se observaron clamidosporas en esta cepa. La aparición de zonas de antagonismo en test de compatibilidad entre cada par de micelios en placas de agar confirmó la divergencia genética, indicando que las cepas empleadas en el test serían diferentes especies. Una reacción observada con frecuencia sobre el estrés biótico que genera el alorreconocimiento es la producción de pigmentos. La granulación en las hifas, estructuras similares a un gel oscuro y vacuolas observadas en las interacciones fúngicas pueden estar asociadas a muerte celular consecuente del micoparasitismo, o a la falta de nutrientes producto de la competencia. Se ha

reportado la presencia de pigmentos amarillos y marrones en interacciones fúngicas (Boddy, 2000; Hynes *et al.*, 2007), colores que se identificaron en otros estudios como glucósido de quercetina (producido para bloquear los inhibidores de la biosíntesis de melanina) o como carotenoides.

Ha sido reportado que *G. sessile* cuenta con una maquinaria enzimática que le permite la colonización efectiva de la biomasa lignocelulósica en estado sólido (Philippoussis y Diamantopoulou, 2012; Loyd *et al.*, 2019). La especie ha demostrado características prometedoras de crecimiento micelial, que también han sido observadas en la producción de biomateriales (Attias *et al.*, 2021, 2020; Nussbaum *et al.*, 2023). Además, se ha indicado que *G. sessile* preferentemente infecta árboles vivos, mientras que *G. lucidum* crece principalmente de forma saprotrófica en la naturaleza (Beck *et al.*, 2018). Si bien este comportamiento parece estar relacionado con la preferencia de carbohidratos simples o complejos en el sustrato más que con su concentración, estos metabolismos aparentemente diferenciales dentro del género ofrecen una base prometedora para futuras investigaciones sobre diversos tipos de sustratos *in vitro* (Nussbaum *et al.*, 2023). La infección por *G. sessile* ocurriría principalmente por esporas que infectan heridas en la parte inferior del tronco o en las raíces leñosas. Entre la gama de hospedadores se hallan incluidos robles, arces, nogales, acacias, álamos y manzanos silvestres. Especialistas han enviado advertencias para los arboristas del este de Estados Unidos sobre la detección de infecciones causadas por *G. sessile* en árboles urbanos, palmeras y pinos (Luley y Loyd, 2017).

Tal como se ha observado en *G. lucidum*, el contenido de polisacáridos en micelio es superior al hallado en basidiomas (Heleno *et al.* 2012), lo que puede explicar el alto contenido de PS en cultivo líquido de *G. sessile* E47 en este estudio, donde el hongo crece como micelio, en comparación a la producción de estos compuestos en cultivo sólido. En cuanto al rendimiento de PS para *G. lucidum*, fue reportado ser de 5,7 g L⁻¹ al día 13 de cultivo (Wagner *et al.*, 2004), aunque no fue provista información acerca de la identificación de la especie. La mayor velocidad de crecimiento y la mayor producción de polisacáridos de E47 respecto a CS y GO podrían estar

relacionadas a su perfil de crecimiento. Considerando que estos compuestos son producidos por hifas metabólicamente activas, el hecho de generar biomasa en mayor cantidad y más rápidamente podría explicar, al menos en parte, su productividad en polisacáridos. Loyd *et al.* (2019) propusieron que la performance de *G. sessile*, capaz de crecer exitosamente en cultivo líquido y sólido, podría estar relacionada a la producción de clamidosporas, una característica diferencial que se ha visto en *Ganoderma* sp. E47 respecto a *Ganoderma* sp. CS (*G. lingzhi*) y *Ganoderma* sp. GO (*G. oregonense*) en este estudio. Además, las diferencias observadas en la morfología de las hifas (IKI+ para *G. sessile* E47, e IKI- para *G. lingzhi* CS y *G. oregonense* GO) podrían estar vinculadas a diferencias en los tipos de polisacáridos presentes en la pared celular (Morton, 1986).

Los hongos producen varios tipos de polisacáridos según las necesidades biológicas y en respuesta a condiciones externas e internas. Estos biopolímeros poseen un papel importante en la transmisión de información para diversos procesos biológicos, como la germinación de las esporas, la reproducción sexual, el dimorfismo y los sistemas de defensa y adaptación. Ha sido reportado que los polisacáridos juegan un rol crucial como receptores de información química durante la fusión en hongos filamentosos (Fleißner y Herzog, 2016; Barbosa y de Carvalho Junior, 2020). Cuando es necesario, los hongos producen y excretan polisacáridos extracelulares (exopolisacáridos) que, en general, actúan como importantes modificadores de la viscosidad, tanto en ambientes húmedos como secos. La producción de exopolisacáridos contribuye al mantenimiento de un ambiente húmedo, propicio para la obtención de nutrientes, el crecimiento y la reproducción (Donot *et al.*, 2012; Barbosa y de Carvalho Junior, 2020). Conocer los roles que los exopolisacáridos cumplen en la biología del hongo productor puede contribuir al desarrollo de técnicas de optimización de la producción.

Muchos estudios han descrito la mejora de la producción de EPS al optimizar los medios y las condiciones de fermentación en cultivo líquido, incluyendo el control de pH, agitación y suministro de oxígeno, manipulación de las concentraciones de los azúcares del medio, realización de cultivos alimentados o continuos, selección de tanques fermentadores, modificación del inoculo inicial, entre otros (Alsaheb *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 1999; Kim *et al.*,

2006; Tang y Zhong, 2003). Se ha reportado que un aumento en la viscosidad del medio líquido puede deberse al incremento de la producción de exopolisacáridos, como mecanismo fúngico para reducir el estrés hidrodinámico generado por la agitación y la aireación en el reactor (Agudelo-Escobar *et al.*, 2017). Se ha visto que el pH para el crecimiento celular óptimo es más bajo que el pH para la formación de EPS (Lee *et al.*, 1999; Mi Kim *et al.*, 2006). Esto indica la posibilidad de un proceso de fermentación en dos fases, donde el pH es mantenido bajo al inicio de la fermentación y hasta que la biomasa alcanza el crecimiento exponencial, seguido de una fase con un pH superior adaptado para la síntesis óptima de EPS. La estrategia antes mencionada se demostró con éxito para la producción de EPS en *G. lucidum* y *Antrodia camphorata* (Lee *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2006; Shu y Lung, 2004). Respecto a la composición del medio de cultivo, se ha observado, por ejemplo, que los niveles más altos de polisacáridos extracelulares en *G. lucidum* se obtienen adicionando nuevamente glucosa cuando este azúcar comienza a disminuir en el medio de cultivo (Wagner *et al.*, 2003).

En este estudio, *G. sessile* E47 produjo $4,52 \pm 0,83$ g L⁻¹ de polisacáridos el día 9 de cultivo en matraces agitados sin optimización del cultivo, lo que destaca a la cepa como un productor comercial eficiente de polisacáridos. Existen múltiples estrategias de optimización de la producción de exopolisacáridos en cultivo líquido que ya han sido puestas a punto para especies de *Ganoderma* en la industria biotecnológica. Sin embargo, dicha optimización es posible solo si es acompañada por un conocimiento más completo y sistemático de la fisiología y el metabolismo de la síntesis de los EPS.

En hongos, y en particular en *Ganoderma* spp., las proteínas inmunomoduladoras son ampliamente reconocidas, pudiendo encontrarse tanto en micelio, esporas y esporoma. Dentro de estas proteínas, las más descritas son las lectinas y las enzimas (Huie y Di, 2004). Relativo a la antigenicidad de las proteínas, ha sido reportada la existencia tanto de antígenos compartidos como también únicos en esporas y basidiomas (Gupta *et al.*, 2000). Las lectinas y otras proteínas inmunomoduladoras de alrededor de 12-18 kDa son encontradas frecuentemente en el micelio (Kawagishi *et al.*, 1997; Jeurink *et al.*, 2008), mientras que las proteínas aisladas de esporas y

cuerpos de fructificación, al tratarse de enzimas, poseen un rango mayor de pesos moleculares (Vilá-Héreter, Rivera-Mariani y Bolaños-Rosero, 2017; Kumakura *et al.*, 2019). El basidioma de *Ganoderma* sp. E47 y, en particular, el micelio de *Ganoderma* sp. CS, evidenciaron la presencia de bandas intensas que se encuentran en el rango de pesos moleculares propuestos para la proteína inmunomoduladora LZ-8, aislada del micelio de *G. lingzhi* (Kino *et al.*, 1989). Esas bandas no se observaron en los perfiles proteicos de los micelios de E47 y GO. Los resultados demuestran que, en general, las proteínas serían específicas de especie y tejido. Debe ser estudiado si las diferencias en la composición proteica entre micelios y basidiomas de la misma especie acarrearán diferencias en las propiedades medicinales.

2.5. Conclusiones

Los métodos moleculares permitieron establecer la identificación de las cepas de interés. Basado en un análisis filogenético *multilocus*, las cepas *Ganoderma* sp. GO, *Ganoderma* sp. CS y *Ganoderma* sp. E47 fueron clasificadas como *G. oregonense*, *G. lingzhi* y *G. sessile*, respectivamente, nomenclatura que se empleará en los próximos capítulos. El análisis morfológico, los perfiles proteicos y antigénicos, como también el test de antagonismo confirmaron la filogenia establecida y demostraron ser herramientas útiles para tal fin. La clasificación taxonómica de un género tan complejo como lo es *Ganoderma* no debería realizarse en base a descripciones morfológicas, sino que en análisis morfológico debe ser un ensayo complementario a la identificación molecular.

G. sessile E47, además de fructificar con buenos rendimientos en sustrato sólido, mostró una mejor *performance* en cultivo sumergido respecto al resto de las cepas de *Ganoderma*, representando una buena alternativa para la producción de polisacáridos a mayor escala. Estos resultados evidenciaron las diferencias en el crecimiento y en la producción de polisacáridos entre especies comúnmente confundidas de *Ganoderma*. Las posibles diferencias fisicoquímicas entre los polisacáridos de *G. sessile* E47 y las cepas medicinales validadas de *Ganoderma*, que contribuyan a un mejor entendimiento de sus diferentes *performances* en cultivo, deben ser

estudiadas. Es necesario demostrar las potenciales propiedades terapéuticas de esta especie, tema que se abordará en el capítulo 4 de esta tesis.

3. Capítulo 2



Análisis nutricional y de inocuidad alimentaria

*"A meal is a structured social event
which structures others in its turn."*
(Una comida es un acontecimiento social estructurado
que, a su vez, estructura a otros.)
Mary Douglas, Deciphering a Meal (1972)

3.1. Parte I

Análisis nutricional

3.1.1 Introducción

En las últimas décadas, el mercado de los hongos comestibles ha crecido en variedad y en cantidad como resultado de la expansión de la industria de su cultivo (Sadler, 2003). Su palatabilidad, su valor nutricional y sus propiedades medicinales son algunas de las cualidades apreciadas por sus consumidores. Dado su alto contenido de agua, la proporción de macronutrientes en los hongos frescos es relativamente baja, así como también lo es su aporte energético. Según lo reportado para basidiomas de especies como *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus* spp. y *Volvariella volvacea*, el contenido proteico representa un 19-35 % del peso seco del hongo, lo que los posiciona debajo de la mayoría de las carnes animales, pero cercano o incluso por encima de ciertos productos de origen animal, como la leche, y de ciertos vegetales (Crisan y Sands, 1978).

A diferencia de otros alimentos como las frutas y las verduras, las setas no cuentan con un marco regulatorio en cuanto a límites de contaminantes y criterios de aseguramiento de la calidad claramente definidos. Algunas setas como *Ganoderma* spp. son consideradas alimentos con beneficios para la salud o fuente de productos con propiedades nutricionales y medicinales. Para estas cuestiones, la regulación gubernamental en torno al consumo de setas difiere según el país en cuestión o la autoridad sanitaria pertinente, siendo regulados tanto como alimentos o como suplementos dietarios. La Unión Europea (UE) ha introducido en su directiva EC 258/97 el concepto de "nuevo alimento" para aquellos productos que no se utilizaban como alimentos o ingredientes alimentarios antes de 1997. Acorde a esta normativa, los productos derivados de hongos formadores de setas, como el micelio deshidratado o los betaglucanos aislados del esporomas de ciertas cepas, han sido catalogados desde ese momento como nuevos alimentos. Entre las especies reguladas se encuentran *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* y *P. eryngii* (UE 2015/2283). No obstante, dentro de la UE las setas cuentan con un historial de seguridad en su consumo, por lo que el acceso al mercado no se haya sujeto a

regulaciones adicionales. Por otro lado, es notable la cantidad de productos a base de *G. lucidum* comercializados en el mercado estadounidense en forma de suplementos dietarios que, hasta la fecha, no han sido evaluados por nuevas normativas de calidad por parte de la Administración de alimentos y medicamentos de EE.UU. (FDA) desde 1994 (Wu *et al.*, 2017). Por lo antes mencionado, es necesario asegurar tanto la inocuidad alimentaria (considerada como la ausencia, a niveles seguros y aceptables, de peligro en los alimentos que puedan dañar la salud de los consumidores), la calidad nutricional, como la composición de metabolitos y compuestos bioactivos de las setas en todas las variedades de productos, antes que estos sean puestos en el mercado.

Argentina no es la excepción, y en los últimos años se han introducido en nuestro país una variedad de productos a base de *Ganoderma* destinados a la mejora de las funciones vitales, incluyendo el polvo micromolido del basidioma, tinturas y extractos de diferente composición, de elaboración nacional e importados, según indica su rotulado. Hasta 2024, la comercialización de productos a base de este hongo constituía un acto ilegal por no ser considerado alimento en nuestro país. La incorporación de *Ganoderma lucidum* en el apartado referido a hongos comestibles del Código Alimentario Argentino (CAA) fue debatida mediante una presentación de representantes del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) durante la 150° Reunión Ordinaria de la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL), celebrada los días 28 y 29 de junio de 2023 en Paraná, Entre Ríos. Finalmente, esta especie fue incluida en dicho código mediante la Resolución Conjunta 11/2024 (RESFC-2024-11-APN-SCS#MS). Por su parte, la Farmacopea Argentina Séptima edición ha dejado a estos productos sin referencia para su regulación, careciendo de información acerca de *Ganoderma* u otros hongos de valor medicinal.

Diferencias en la composición química entre estructuras fúngicas. Las diferencias morfológicas entre las estructuras fúngicas (carpóforo maduro, micelio cultivado en sustratos lignocelulósicos, en placas de agar o en tanques fermentadores) resultan de la expresión genética diferencial como consecuencia de una exposición de las células a diferentes condiciones de humedad relativa,

presión de oxígeno, luz, temperatura, fuerza cortante y nutrientes. La transición de células miceliales dicarióticas a primordios y carpóforo maduro es fluida. Los basidiomicetos no pasan demasiado tiempo en el estado monocariótico, y dos micelios haploides monocarióticos pueden fusionarse (plasmogamia) formando un micelio dicariótico. Dentro del basidio, dos núcleos diferentes de dos micelios dicarióticos pueden fusionarse (cariogamia), formando un núcleo diploide que entra en la meiosis; este proceso da como resultado cuatro nuevas esporas monocárnicas con genomas ligeramente diferentes, por lo que estas estructuras difieren de sus progenitores en sus propiedades bioquímicas (Berger *et al.*, 2022). Estudios sobre HCyM demostraron que muchos genes se expresan diferencialmente en micelios, primordios y basidiomas. En estos últimos se halló una mayor actividad de genes asociados con la respuesta al estrés, la biogénesis de ribosomas, la biosíntesis de arginina y de esteroides (Lu *et al.*, 2020). Esta expresión o actividad diferencial puede llevar a que ciertos componentes se encuentren en diferentes cantidades entre las estructuras fúngicas. Por ejemplo, aunque se ha reportado que en micelios y carpóforos la concentración total de proteínas y su valor biológico son similares, la concentración y la estructura de los polisacáridos presentan diferencias (Berger *et al.*, 2022). Los carpóforos, a su vez, acumulan metales pesados como Ni, Pb, Cd y Cr, y otros elementos como Cu, Zn, Fe y Mn (Ghahremani-Majd y Dashti, 2015). Por otro lado, en cultivo líquido de diferentes cepas de *A. bisporus* y de *L. edodes* se observó que el crecimiento y la producción de metabolitos dependen de la cepa y el sustrato (Sarris *et al.*, 2020).

3.1.2. Objetivo

En esta sección se propuso analizar nutricionalmente a los basidiomas y micelios de las cepas de *Ganoderma* obtenidas y seleccionadas en el anterior capítulo, incluyendo la determinación de macro y micronutrientes, el contenido de fibra, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales, polisacáridos hidrosolubles, perfil de ácidos grasos y esteroides, a fin de evaluar el valor nutricional de estos productos. Para tal fin, se realizaron comparaciones con valores reportados para setas comerciales y silvestres, y se incluyó también a los basidiomas de *P. ostreatus* P04 y *L. edodes* L15 cultivados en el laboratorio.

3.1.3. Materiales y métodos

Los protocolos experimentales detallados de cada determinación se encuentran en el Anexo 2, Protocolos N°1-10. Para el análisis de basidiomas, se partió de muestras secadas en estufa y posteriormente molidas utilizando una picadora comercial. En el caso de los micelios, exceptuando el procedimiento de determinación de humedad, el cual se llevó a cabo por el método de secado en estufa, los demás ensayos se realizaron sobre material colectado y liofilizado. El análisis de vitaminas y el perfil de ácidos grasos y esteroides solo fue realizado sobre basidiomas.

Análisis de composición nutricional. Para la determinación de humedad, cenizas y lípidos totales se siguieron los métodos propuestos por la *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC International) números AOAC 934.01, AOAC 942.05 y AOAC 960.39, respectivamente. El análisis de proteínas crudas se realizó mediante el método *Semi-micro Kjeldahl* (Fawcett, 1954) multiplicando el valor de nitrógeno por el factor 4,38, considerando una digestibilidad proteica del 70 % (Bano *et al.*, 1988).

Fibra dietaria. El contenido de fibra dietaria total, soluble e insoluble se determinó mediante el Método 1- Megazyme (basado en el método AOAC 991.43) empleando las soluciones de amiloglucosidasa de *A. niger* (A9913, para uso en TDF-100A, SIGMA, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), de proteasa de *B. licheniformis* (P4860, ≥ 2.4 U/g, SIGMA, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y de α -amilasa (FAA, ANKOM Technology, Macedonia, NY).

El contenido de este macronutriente fue adicionalmente cuantificado mediante los *Métodos 5 y 6* (ANKOM Technology) para la determinación de Fibra Detergente Ácido (FDA) y Fibra Detergente Neutro (FDN), respectivamente, empleados en el análisis de alimentos y forrajes fibrosos.

Polisacáridos hidrosolubles. Los polisacáridos del basidioma y de los micelios se extrajeron siguiendo el procedimiento descrito en el Anexo 1, Protocolo N°2, basado en la monografía de *G. lucidum*, polvo de basidioma de la Farmacopea estadounidense (USP 41-NF 36, *Ganoderma lucidum* fruiting body powder. USP, Rockville, MD, 2: 4632-4635); posteriormente fueron

hidrolizados con ácido sulfúrico 72 % (Rajaratnam *et al.*, 1959) y luego cuantificados mediante el método de Dubois *et al.* (1956).

Análisis elemental. El análisis multielemental fue llevado a cabo en LANAQUI (CERZOS UNS-CONICET, Argentina); las muestras secas de basidiomas fueron digeridas usando ácido nítrico pro-análisis Merck en un digestor de microondas MARS-5, CEM Corporation, USA, según las siguientes normas y procedimientos: Tejido biológico: Norma SW-3052 (potencia: 400 W; Presión (máx.): 800 psi; Temperatura (máx.): 180 ° C; tiempo: 15 min.). Los elementos fueron analizados utilizando un Espectrómetro de Emisión Atómica por Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-AES), Shimadzu 9000 Simultáneo de Alta Resolución según norma EPA 200.7 empleando calibración acuosa externa con patrones-estándares certificados Chem-Lab, Zedelgem B-8210, Bélgica y agua ultrapura (Water Purification Systems Millipore - Milli Q, modelo Elix Technology Inside 10 (Merck, FRANCIA); características: 0,05 $\mu\text{S cm}^{-1}$ de conductividad eléctrica – 18,2 $\text{M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ de resistividad (25 °C).

Cuantificación de vitaminas. Se analizaron las vitaminas B1 (tiamina), C (ácido ascórbico), B2 (riboflavina), B3 (nicotinamida), B6 (piridoxina), B9 (ácido fólico) y B12 (cianocobalamina) mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) empleando estándares externos. Las muestras fueron extraídas y luego hidrolizadas con fosfatasa alcalina (Wiener Lab, Argentina) según lo reportado por Kall *et al.* (2003). El análisis cromatográfico se llevó a cabo en cromatógrafo Waters 600 Controller Chromatograph equipado con detector de arreglo de diodos y con columna Reprosil ODS-2, 5 μm 200 x 4,6 mm (Dr. Maisch, Alemania). El volumen de inyección fue de 10 μL , flujo 0,2 mL min^{-1} , temperatura de columna 30 °C. La fase móvil fue establecida en solución acuosa de ácido trifluoracético 0.01 % y metanol en proporción 95:5 durante 4 minutos, luego cambiando a 2:98 en 6 minutos y mantenido durante 20 minutos.

Para la determinación de vitamina D2 y D3, las muestras fueron sometidas a saponificación y extraídas según lo reportado por Lumley (1993). Posteriormente fue analizado un volumen de 10 μL de las muestras en acetonitrilo mediante HPLC en modo isocrático con acetonitrilo: metanol

91:9 como fase móvil, flujo 0,8 mL min⁻¹. El análisis de vitamina E fue realizado mediante Cromatografía gaseosa-Espectrometría de Masas (CG-EM). 1 g de cada muestra pulverizada fue suspendida en 37,5 mL de etanol y extraída bajo reflujo durante 45 minutos (Lumley 1993). Luego de enfriarlo, el extracto fue filtrado y lavado dos veces con 5 mL de etanol. Posteriormente, los lavados y filtrados fueron combinados y evaporados a sequedad bajo presión reducida. Finalmente, el residuo fue acetilado siguiendo el procedimiento descrito por Hammann *et al.* (2016). El agente de derivatización consistió en una mezcla 2:1 de piridina: anhídrido acético. El producto acetilado fue extraído con hexano y lavado sucesivamente con HCl 5 % v/v y NaHCO₃ 5% p/v y secado finalmente con Na₂SO₄. El análisis fue llevado a cabo en un cromatógrafo 7890B acoplado a espectrómetro de masas 5977A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) con impacto electrónico como modo de ionización y energía de 70 eV. Se inyectó 1 µL de las muestras en una columna capilar HP-5Ms (30 m × 0.25 mm d.i. × 0.25 µm de espesor de film). Las condiciones del análisis fueron las siguientes: temperatura del inyector 225 °C, detector a 280 °C, flujo de helio de 0,75 mL min⁻¹, relación de Split 20:1. La temperatura fue programada de la siguiente manera: comenzando en 150 °C durante 1 minuto, luego incrementándose hasta 260 °C a 25 °C min⁻¹ y luego aumentándose hasta 280 °C a 5 °C min⁻¹. Como estándar externo se empleó α-tocoferol (Sigma).

Perfil de ácidos grasos y esteroides. Las muestras fueron sometidas a hidrólisis siguiendo el método AOAC 996.06. Los ácidos grasos libres fueron extraídos con CHCl₃: MeOH (2:1) y metilados con HCl 10 % en metanol. Para el análisis de esteroides, las muestras fueron preparadas según lo indicado en la USP 2018 (*Ganoderma lucidum fruiting body powder - COMPOSITION, Content of triterpenoic acids*) y luego acetiladas siguiendo lo indicado por Hammann *et al.* (2016).

Ambos extractos fueron analizados por CG-EM bajo las condiciones antes descritas para vitamina E, con las siguientes modificaciones. La temperatura del horno fue seteada en 100 °C durante 4 minutos y luego aumentada a un ritmo de 5 °C min⁻¹ a una temperatura final de 240 °C. Tanto el perfil de ácidos grasos como el de esteroides fueron expresados en porcentajes relativos.

La cuantificación del ácido linoleico se realizó mediante estándar externo con metil éster de ácido linoleico (estándar analítico, Supelco, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

3.1.4. Análisis estadístico

Las muestras fueron analizadas por triplicado y el resultado expresado como la media y su desvío estándar. Para las comparaciones con valores de referencia se empleó el test t con la corrección de Welch para la comparación de medias con diferentes varianzas. En los casos en que los desvíos no fueran reportados en bibliografía, se analizó el intervalo del 95 % de confianza. Se consideraron significativas las diferencias con $p < 0,05$. Para la comparación múltiple entre muestras se realizó la prueba de ANOVA de una o doble vía con *post-test* de Bonferroni empleando el *software* GraphPad Prism 5.00.

3.1.5. Resultados y discusión

Análisis nutricional. Se presentan en forma tabular los resultados de las determinaciones del contenido de humedad y macronutrientes de basidiomas y micelios (Tabla 2) y en forma comparativa con valores publicados por otros autores para cada género (Anexo 2, Tabla 1). La conversión de nitrógeno a proteínas se realizó empleando el factor $N \times 4,38$. El contenido de carbohidratos totales se obtuvo sustrayendo de la composición total (100 % en base seca), la suma de los porcentajes de proteínas, lípidos totales y cenizas.

Tabla 2. Composición proximal de los hongos en estudio. Los valores se expresan en g 100 g⁻¹ de peso seco.

<i>Humedad</i> ¹		<i>Cenizas</i>		<i>Lípidos</i>		<i>Proteínas</i>		<i>Carbohidratos</i>		
Método	AOAC 934.01	AOAC	AOAC	AOAC		semi-micro	2			
		942.05	960.39	KJELDAHL						
<u>Basidioma</u>										
<i>G. sessile</i>	86,9±0,6	a	4,58±0,38	a	3,90±0,14	a	15,78±1,71	a	77,09±1,24	a
<i>P. ostreatus</i>	82,8±0,8	b	9,23±0,06	bb	2,62±0,24	a	22,53±2,30	b	65,62±3,68	b

<i>L. edodes</i>	83,7±0,4	b	6,92±0,14	ab	1,84±0,16	a	21,87±0,95	a	68,63±0,45	b
Micelio										
<i>G. sessile</i>	5,09±0,47	c	4,59±0,66	a	4,21±0,25	a	29,31±1,89	b	61,89±3,96	c
<i>G. lingzhi</i>	12,53±0,2	d	4,15±0,01	a	2,90±0,30	a	14,81±0,42	c	78,11±0,98	a
<i>G. oregonense</i>	7,00±0,41	c	2,15±0,74	ac	3,74±0,34	a	9,40±0,44	d	84,70±2,13	d

¹ g 100 g⁻¹ peso fresco; ² calculados mediante diferencia [100 – (g proteínas + g lípidos + g cenizas)]. Para cada columna, las filas con una letra diferente (en negrita) en el mismo orden difieren al menos significativamente ($p < 0,05$).

El factor $N \times 6,25$, empleado en ocasiones en la determinación de proteínas, deriva de la asunción de un contenido de nitrógeno proteico del 16 %. Este valor es correcto si se trata de proteínas de origen animal, donde, además, la digestibilidad de estos nutrientes ronda el 100 %. Sin embargo, en las setas el contenido de nitrógeno de las proteínas purificadas es desconocido o diferente (Chang y Miles, 1989). Por ejemplo, para el purificado proteico de *Agaricus campestris* fue reportado un 11,8 % de nitrógeno (Fitzpatrick *et al.*, 1946), mientras que en *Pleurotus ostreatus* fue de 15,2 % en peso seco (Bano y Rajarathnam, 1988). Las proteínas fúngicas raramente son digeribles en un 100 % a diferencia de aquellas de origen animal, y este valor es estimado entre un 60 % y un 70 % según ciertos autores (Bano y Rajarathnam, 1988). La fracción no digerible de los hongos incluye proteínas, aminoácidos y quitina (Tshinyangu y Hennebert, 1996). Este contenido de nitrógeno no proteico en forma de quitina, un polisacárido de N-glucosamina, contribuye a la disminución del coeficiente de digestibilidad (Bano y Rajarathnam, 1988). Por las razones mencionadas, un resultado más aproximado del contenido crudo de proteínas en setas se obtiene empleando un factor equivalente a 70 % $N \times 6,25$, es decir, $N \times 4,38$, considerando que sólo un 70 % del nitrógeno fúngico es de origen proteico (Chang y Miles, 1989; Tshinyangu y Hennebert, 1996). Por otra parte, ciertos autores indican que debería emplearse un factor derivado de la determinación del porcentaje de nitrógeno sobre las proteínas purificadas del hongo en cuestión, si se quiere excluir de la cuantificación al nitrógeno no proteico (Bano y Rajarathnam, 1988; Chang y Miles, 1989). Las setas suelen contener cantidades de proteínas similares o incluso mayores a los vegetales; sin embargo y por lo antes expuesto, estos valores pueden estar

sobreestimados dado a incertezas en cuanto a la digestibilidad de las proteínas fúngicas y a otros errores asociados con el factor utilizado en el cálculo de nitrógeno proteico, debido a la presencia de nitrógeno no proteico interferente como la quitina (Kalač, 2013).

Exceptuando los basidiomas de *P. ostreatus* y *L. edodes*, el resto de las muestras analizadas presentaron diferencias significativas en la humedad porcentual, siendo mayor en los basidiomas de *G. sessile* E47. El contenido de lípidos fue semejante en todas las setas y micelios, no superando el 4,5 % del peso seco. El valor más alto de proteínas fue hallado en los basidiomas de *P. ostreatus* P04 y en el micelio de *G. sessile* E47, seguido por los basidiomas de *L. edodes* L15 y *G. sessile* E47. En cuanto a los carbohidratos, todas las muestras presentaron valores superiores al 50 % de peso seco, y el micelio de *G. oregonense* GO fue la muestra con mayor contenido de este macronutriente. Salvo por el contenido de lípidos, *P. ostreatus* P04 y *L. edodes* L15 no se diferenciaron en su composición proximal.

En general, no se encontraron diferencias significativas entre la composición de los basidiomas de este estudio y lo reportado en la literatura (Anexo 2, Tabla 5). La única excepción corresponde al contenido de cenizas en *P. ostreatus* P04 cultivado en agro-residuos, el cual fue superior a la referencia en alrededor de un 2 % (Sharif *et al.*, 2016). En el caso de los micelios (Anexo 2, Tabla 6), la bibliografía es menos abundante que para basidiomas en cuanto a composición química y nutricional. La composición proximal de los micelios de este estudio se comparó con lo reportado para el micelio de *G. lucidum* (Sethy *et al.* 2017). En particular, *G. sessile* E47 se diferenció de la referencia en el contenido de proteínas, presentando un valor superior al doble respecto a lo reportado ($p=0,004$). Esta cepa y *G. lingzhi* CS superaron a lo reportado en el contenido de cenizas ($p\leq 0,03$). *G. sessile* E47 también superó el contenido de lípidos ($p\leq 0,02$) junto a *G. oregonense* GO. *G. oregonense* GO, por su parte, presentó un contenido proteico inferior a lo reportado ($p=0,01$).

Contenido de fibra dietaria y polisacáridos hidrosolubles. Existen varios criterios de clasificación de la fibra en base a sus características, tales como su solubilidad, su viscosidad, si son o no fermentables y si ejercen funciones biológicas (Slavin, 2013). En términos generales, se

considera fibra dietaria (FD) a los carbohidratos y a la lignina, compuestos que no son degradados por las enzimas digestivas del hombre ni absorbidos en el intestino delgado. A su vez, se define como fibra funcional a aquellos carbohidratos aislados de sus fuentes no digeribles que tienen efectos fisiológicos benéficos en los humanos. La fibra total es entonces la suma de la fibra dietaria y la fibra funcional (Institute of Medicine, 2002; Slavin *et al.*, 2009; Slavin, 2013). El consumo de fibra dietaria ha sido respaldado por numerosas investigaciones que destacan sus beneficios, tales como la prevención de enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer, el mantenimiento de la salud y la regulación del peso corporal. Además, los β -glucanos componentes de la fibra dietaria soluble (FDS) poseen un particular interés por sus efectos hipoglucemiantes e hipocolesterolemiantes. Por ejemplo, el mecanismo responsable de la actividad reguladora de la glucemia postprandial se asocia a la viscosidad de los β -glucanos en el tracto gastrointestinal, al dificultar el acceso de las enzimas digestivas a los gránulos de almidón (Ng *et al.*, 2017). Si bien los productos tradicionalmente consumidos como fuente de fibra han sido del tipo cereales, recientemente, los hongos comestibles han comenzado a emplearse como fuente de este nutriente (Codex committee on nutrition y foods for special dietary uses, 2004; Bonfante-Fasolo *et al.*, 1990).

Tabla 3. Contenido de fibra (mg Kg⁻¹ peso seco) y polisacáridos hidrosolubles (% p/p peso seco) de las cepas estudiadas, y su comparación con valores reportados para setas comerciales y silvestres. Las diferentes letras entre pares de columnas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

		FDT ^a	FDI ^b	FDS ^c	PSHS ^d
Basidioma	<i>G. sessile</i> Ref.	62,27±2,06a	59,75±0,35a	2,58±0,40a	1,07±0,01a
		35,0±1,7	20,0±3,4	3	1,54±0,02
		Nile y Park (2014)	Nile y Park (2014)	Nile y Park (2014)	Taofiq <i>et al.</i> (2017)
	<i>P. ostreatus</i> Ref.	31,78±1,98b	28,96±1,84b	3,81±1,58a	3,62±0,49ab
		37,0±2,6	21,0±2,6	8,1	3,3
		Nile y Park (2014)	Nile y Park (2014)	Nile y Park (2014)	Ellefsen <i>et al.</i> (2021)
	<i>L. edodes</i> Ref..	31,78±1,98b	2,96±1,84b	4,62±0,13aa	3,62±0,49a
		32,0±3,1	14,0±1,3	12,5	9,69±0,08
		Nile y Park (2014)	Nile y Park (2014)	Nile y Park (2014)	Ziaja-Sołtys <i>et al.</i> (2020)
Micelio	<i>G. sessile</i>	47,99±2,38c	38,6±0,86c	10,81±0,71bb	0,88±0,14a
	<i>G. lingzhi</i>	43,43±0,83d	37,13±0,45c	6,89±0,40 ca	0,33±0,12ac

<i>G. oregonense</i>	22,82±1,89 ^e	15,39±0,91 ^d	8,76±0,78 ^{cb}	0,15±0,01 ^{ac}
Ref.	30,95-34,17±1,2	19,39	11,56	-
	Papaspyridi <i>et al.</i> , (2009); Ulziijargal y Mau, (2011)	Ulziijargal y Mau (2011)	Ulziijargal y Mau (2011)	-

^aFibra Dietaria Total, ^bFibra Dietaria Insoluble, ^cFibra Dietaria Soluble, ^dPolisacáridos Hidrolubles.

Los resultados del análisis de fibra y polisacáridos hidrosolubles se resumen en la Tabla 3. Entre las muestras de este estudio, en general, se hallaron diferencias en los contenidos de FDT y FDI. Exceptuando *L. edodes* L15 y *P. ostreatus* P04, el resto de las muestras difirieron en el contenido de fibra dietaria total, siendo el basidioma de *G. sessile* E47 el de mayor valor ($p<0,001$) y el micelio de *G. oregonense* GO, el de menor valor ($p<0,001$). El basidioma de *G. sessile* E47 y el micelio de *G. oregonense* GO mostraron también el mayor y el menor contenido de fibra insoluble, respectivamente ($p<0,001$).

Los contenidos de fibra dietaria total e insoluble y de polisacáridos solubles del basidioma de *G. sessile* fueron mayores a lo reportado para *Ganoderma* spp. ($p<0,05$, $p<0,01$ y $p<0,001$, respectivamente), mientras que no se diferenció de la referencia en fibra soluble ($p=0,0695$). *P. ostreatus* P04 de este estudio solo difirió de su referencia en el contenido de PSHS ($p<0,05$), mientras que para *L. edodes* L15 se hallaron diferencias para todas las fracciones analizadas ($p\leq 0,05$) exceptuando para FDT ($p>0,05$). En los micelios, tanto *G. sessile* E47 como *G. lingzhi* CS superaron significativamente en el contenido FDT y FDI respecto de lo publicado para micelio de *Ganoderma* ($p\leq 0,03$). Por su parte, los valores de fibras total e insoluble en *G. oregonense* GO fueron menores a lo publicado ($p<0,01$ y $p=0,006$). Todos los micelios mostraron contenidos de fibra soluble menores a lo reportado ($p\leq 0,04$).

Tanto la composición de las fracciones FDS como de FDI han sido descritas para el reino plantas, por lo que la interpretación de este tipo de fibras en hongos no es tan clara. Sharif *et al.* (2017) reportaron un contenido de fibra en *G. lucidum* comercial del 54,1 % en peso seco, siendo el valor más alto en comparación a otros hongos estudiados como *Lentinula* y *Pleurotus*, y más cercano al hallado en *G. sessile* E47 de este estudio. Sin embargo, los autores no detallaron la composición de la fracción soluble e insoluble, y al indicarse que la determinación de este nutriente se realizó

según el método AOAC, se estima que se trata de fibra cruda o total. Dado el alto contenido de fibra de *G. sessile* E47 puede deducirse que la mayor parte de los carbohidratos de esta seta corresponden a estas macromoléculas, lo que destaca junto al bajo contenido de lípidos, su igualmente bajo contenido calórico (Sharif *et al.*, 2016).

La quitina es uno de los tipos de fibra que puede ser categorizado como FDI en hongos. Otros materiales fúngicos como los beta-glucanos, clasificados como polisacáridos del tipo no-almidón, pueden ser tanto solubles como insolubles dependiendo del tipo de monosacáridos y de ramificaciones que presenten, como también de su peso molecular (de Jesus *et al.*, 2018), y han sido reportados como los principales componentes de la fibra soluble en hongos (Mudgil *et al.*, 2017). La fracción de polisacáridos solubles (PSS) fue extraída siguiendo el método USP. El contenido de PSS fue menor en *G. sessile* E47 cultivado en agro-residuos que lo reportado para *Ganoderma* spp. comercial y silvestre.

El análisis de las fracciones de fibra detergente neutro y ácido es menos evidente en setas al tratarse de métodos interpretados para productos vegetales. Van Soest *et al.* (1991) describen al método de FDN como el apropiado para una estimación de la fibra insoluble. Esto podría explicar la cercanía en los valores de FDI y FDN en *G. sessile* E47 (no difieren significativamente, $p > 0,05$) si bien el término fibra detergente neutro incluye fracciones como hemicelulosa, lignina y celulosa, no presentes en hongos. El contenido de ambas fracciones de fibra detergente fue notablemente inferior en micelios respecto a basidiomas (Tabla 4). Por otra parte, Stelmock *et al.* (1985) reportan que el contenido de quitina en mariscos puede ser estimado mediante el método de FDA, pudiendo indicar que este polímero estaría presente en la fracción ácida. En lo referente a valores publicados de fibra detergente en setas, han sido reportados valores de FDA, FDN y hemicelulosa para especies como *Lentinus* sp. (Mongueau y Brassard, 1989) aunque los autores no discuten acerca de este último polisacárido, no habiendo datos reportados disponibles para *Ganoderma* spp. Una comparación entre los métodos más empleados para el análisis de fibra se presenta en el Anexo 2, Tabla 8.

Tabla 4. Fibra dietaria determinada mediante el método de detergentes (ANKOM).

		FDN ^a	FDA ^b	"Lignina" ^c	"Celulosa" ^c	"Hemicelulosa" ^c
Método	Cepa	ANKOM technology, Método 6	ANKOM technology, Método 5	ANKOM technology, Método 8	ANKOM technology, Métodos 5 y 8	ANKOM technology, Métodos 5 y 6
Basidioma	<i>G. sessile</i>	61.58 ± 1.14	34.67 ± 0.37	6.35 ± 0.63	28.74 ± 0.25	25.21 ± 1.51
	<i>P. ostreatus</i>	24.50 ± 0.53	6.56 ± 0.94	1.24 ± 0.12	5.32 ± 1.06	12.17 ± 0.76
	<i>L. edodes</i>	27.02 ± 1.21	11.53 ± 1.45	0.74 ± 0.31	15.50 ± 1.28	15.50 ± 1.28
Micelio	<i>G. sessile</i>	17.50 ± 0.66	8.42 ± 0.39	2.06 ± 1.20	6.35 ± 1.40	9.08 ± 0.28
	<i>G. oregonense</i>	12.57 ± 0.71	7.13 ± 0.55	1.00 ± 0.37	6.14 ± 0.18	6.35 ± 1.40
	<i>G. lingzhi</i>	30.05 ± 1.20	8.90 ± 0.83	1.87 ± 0.12	9.08 ± 2.01	20.97 ± 0.80

^aFibra Detergente Neutro, ^bFibra Detergente Ácido, ^clas fracciones se indican entre comillas al haber sido descriptas para vegetales.

Análisis elemental. Salvo ciertas excepciones, el contenido de los 13 elementos analizados en *G. sessile* cultivado en FES se encontró dentro del rango de valores reportados tanto para setas cultivadas como silvestres (Tabla 5). Dentro de las excepciones, el contenido de calcio resultó menor a lo reportado, mientras que zinc y cobre se hallaron en cantidades dos y tres veces superiores a lo reportado, respectivamente. Los micelios de *Ganoderma* spp. superaron notoriamente en el contenido de sodio al basidioma de *G. sessile* E47. Dada la ausencia de datos de referencia para esta especie, era esperado hallar diferencias al realizarse comparaciones respecto a cepas *Ganoderma* spp. diferentes. Tal como fue reportado por otros autores, el nivel de selenio se halló debajo del límite de detección (0,1 mg Kg⁻¹).

Tabla 5. Composición de minerales de basidiomas de *G. sessile* E47 y micelios (M) de *Ganoderma* spp. cultivados.

Minerales	Basidioma						Micelio					
	<i>G. sessile</i>	Ref.	<i>P. ostreatus</i>	Ref.	<i>L. edodes</i>	Ref.	<i>G. sessile</i>	<i>G. lingzhi</i>	<i>G. oregonense</i>	Ref.		
K^a	9,6	7,4 [1]	25,6	21-42 [1,5]	21,6	26 [5]	6,2	9,3	7,4	4,8 [10]		
Mg^a	1,0	0,9 [1]	1,3	1,1-1,2 [1,5]	0,9	1,1-1,5 [5]	1,5	1,8	1,9	1,46 [10]		
P^a	4,7	5,0 [1]	9,1	5-9 [1,5]	8,0	5,8-9 [5]	4,5	5,6	4,6	4,65 [10]		
S^a	2,5	1,1-1,9 [2]	2,6	1,3 [6]	4,6	1,8 [6]	2,1	2,0	1,5	2,25 [10]		
Na^b	21,9	8,4-245 [1,2]	203	220-1400 [7]	38,7	168 [1]	404	620	580	73 [10]		
Ca^b	656	1092 [1]	35,7	169-613 [1,5]	139	121 [1]	1389	526	1250	1301 [10]		
Fe^b	66,1	121 [1]	83,8	51-136 [1,5]	45,0	69 [1]	50,7	40,3	48,0	115 [10]		
Cu^b	39,9	12 [1]	13,2	10-28 [1,5]	9,3	11 [1]	22,8	37,0	79,0	5 [10]		
Mn^b	5,7	11 [1]	8,0	4,0-11 [1,5]	18,5	13 [1]	16,5	15,3	22,1	55 [10]		
Zn^b	43,5	22 [1]	52,3	46-83 [5]	50,7	67,1 [1]	46,4	66,2	71,4	21 [10]		
Cr^b	0,056	0,21 [3]	0,160	0,3 [8]	0,245	1,4 [9]	4,0	0,319	1,4	1 [10]		
Ni^b	0,041	0,76-1,50 [4]	0,114	0,136-0,665 [8]	0,317	1,82 [4]	0,862	0,527	0,577	1 [10]		

Se	< 0,1	n.d.	[1]	< 0,1	n.d.	[1]	< 0,1	n.d.	[1]	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	[10]
^a g kg ⁻¹ peso seco; ^b mg kg ⁻¹ peso seco; [1] Nile y Park (2014); [2] Obodai <i>et al.</i> (2017); [3] Rashid <i>et al.</i> (2018); [4] Zhu <i>et al.</i> (2011); [5] Mattila <i>et al.</i> (2001); [6] Roy <i>et al.</i> (2015); [7] Falandysz y Borovička (2013); [8] Rashid <i>et al.</i> (2018); [9] Longvah y Deosthale (1998); [10] Cohen <i>et al.</i> (2014).														

Contenido de vitaminas hidro y liposolubles. Los resultados de la cuantificación de vitaminas en basidiomas se muestran en la Tabla 6. Los cromatogramas de los estándares de las vitaminas halladas y de las muestras analizadas se presentan en el Anexo 2, Figura 3 y en el Anexo 2, Figura 4, respectivamente. Para el análisis de vitamina E, los cromatogramas y espectros de masas del estándar de tocoferol y de las muestras de basidiomas se muestran en el Anexo 2, Figura 5.

Tabla 6. Contenido de vitaminas hidro y liposolubles, en mg 100 g⁻¹ de peso seco, y su comparación con valores reportados para setas silvestres y comerciales. Las diferentes letras entre pares de columnas indican diferencias significativas (*p*<0.05).

	<i>G. sessile</i>	Ref.		<i>P. ostreatus</i>	Ref.		<i>L. edodes</i>	Ref.	
B1	1,20 ±0,21 a	1,79±0,12 a	[1]	3,74±0,24 a	0,3±0,01 b	[5]	5.19±0.28 a	0.009±0.0003 b	[9]
B2	4,07±0,06 a	1,27±0,014 b	[2]	n.d. ^a	1,62±0,08	[5]	n.d.	1,8	[7]
		5,98±0,19 b	[1]						
B3	0,79±0,05 a	9,20±0,01 b	[2]	0,41±0,04 a	4,44 ± 0,04 b	[6]	n.d.	3,88	[10]
B6	5,85±0,20 a	0,71 b	[3]	n.d.	0,07±0,001	[5]	n.d.	0,29	[10]
B9	n.d.	n.d.	[2]	n.d.	0,64	[7]	n.d.	0,3	[7]
B12	n.d.	n.d.	[1,2]	n.d.	0,0006	[7]	n.d.	0,0008	[7]
C	n.d.	n.d	[1]	n.d.	3,38 ± 0,13	[5]	0,28±0.05 a	3,5 b	[11]
D ₂ /D ₃	n.d.	n.r.	[1]	n.d.	0,0003	[7]	n.d.	0,001	[7]
E ^c	188,9±13,3 a	55±0,5 b	[4]	54,3±1,7 a	6±0,8 b	[8]	48,8±1,6 a	9±0,4 b	[8]

^a n.d. no detectado; ^b n.r. no reportado; ^c vitamina E como α-tocoferol en µg 100 g⁻¹ peso seco. [1] Chan *et al.* (2015); [2] Kivrak (2015); [3] El Sheikh (2022); [4] Obodai *et al.* (2017); [5] Jaworska *et al.* (2015); [6] Çağlarirmak (2007); [7] Mattila *et al.* (2001); [8] Reis *et al.* (2012); [9] Furlani y Godoy (2008); [10] Ho *et al.* (2020); [11] Breene (1990).

L. edodes L15 mostró el mayor contenido de tiamina, superando significativamente a *P. ostreatus* P04 (*p*<0,05) y *G. sessile* (*p*<0,01). Al comparar los valores obtenidos en los hongos de este estudio con lo reportado en bibliografía, *G. sessile* E47 no difirió de lo reportado (*p*>0,05), mientras que *Pleurotus* y *Lentinula* superaron a los valores publicados (*p*<0,001). Respecto al

resto de las vitaminas del grupo B, sólo se halló riboflavina en *G. sessile* E47, y el contenido fue inferior a lo reportado para *G. tsugae* (Chan *et al.* 2015), pero superior a lo hallado en *G. adpersum* ($p<0,01$) (Kivrak, 2015). La vitamina B6 también fue hallada únicamente en *G. sessile*, superando al valor reportado para *G. lucidum* ($p<0,01$). De igual forma se halló vitamina B3 en *G. sessile* E47 y en *P. ostreatus* P04, y los contenidos no difirieron entre las cepas ($p>0,05$). En ambos casos, los contenidos fueron significativamente inferiores a los reportes en cada género ($p<0,01$ y $p<0,001$, para *Ganoderma* y *Pleurotus*, respectivamente). Al igual que en las referencias, no se detectaron las vitaminas B9, B12 y C en el basidioma de *G. sessile* E47 (Tabla 6). Es sabido que la vitamina C se encuentra en mayor cantidad en hongos frescos y tiende a disminuir durante el almacenamiento, lo que puede correlacionarse con el bajo o nulo contenido de esta vitamina en los hongos de este estudio. En sus escasos reportes en hongos, la vitamina B12 ha sido hallada tanto en trazas como en altas cantidades ($0-140 \mu\text{g } 100^{-1} \text{ g peso húmedo}$). Cuando se detecta en setas silvestres, es probable que derive de los microorganismos presentes en la superficie (Mattila *et al.*, 2012), por lo que es esperable que no sea detectable en hongos cultivados.

G. sessile E47 superó significativamente a *P. ostreatus* P04 y *L. edodes* L15 en los niveles de vitamina E ($p<0,01$). Las cepas de este estudio presentaron contenidos de esta vitamina superiores a la bibliografía, encontrándose dentro del rango reportado para especies de hongos silvestres (Grangeia *et al.*, 2011; Kozarski *et al.*, 2015; Obodai *et al.*, 2017). Dada la alta sensibilidad de los tocoferoles a la luz y la temperatura, los periodos de procesamiento y los procesos de conservación aceleran la degradación de estos nutrientes, por lo que se espera encontrar mayores cantidades de estos nutrientes en hongos frescos (Kalač, 2013; Stojković *et al.*, 2014). No obstante, ha sido publicado que el aceite de oliva, adicionado a los sustratos empleados, incrementa significativamente el contenido de compuestos fenólicos solubles en agua, al aportar una fracción compleja de compuestos fenólicos polares (Boskou *et al.* 2006) que podrían ser absorbidos por el micelio, como fue indicado para *G. lucidum* (Bidegain, 2017). Por otro lado, no se detectó vitamina D en los basidiomas de los hongos estudiados. En las setas, la producción de esta vitamina es estimulada mediante la exposición a la radiación solar o UV (Cardwell *et al.*,

2018). Que los hongos de este estudio no hayan sido expuestos a radiación natural o artificial durante su cultivo, como tampoco durante el secado, puede explicar la ausencia de vitamina D. No obstante, es sabido que el contenido de esta vitamina puede incrementarse naturalmente a partir de ergosterol y, de esta manera, convertir a los hongos en fuente de este nutriente, aunque esta técnica sería más eficiente en el micelio, donde la concentración del ergosterol es mayor (Berger *et al.*, 2022; Cardoso *et al.*, 2017). Al exponerse a radiación, el ergosterol contenido en la pared celular de los hongos es transformado en pre-vitamina D₂, la cual puede ser luego isomerizada por efecto térmico a ergocalciferol (vitamina D₂) en un proceso dependiente de la temperatura (Figuras 23 y 24) (Cardwell *et al.*, 2018; Jasinghe *et al.*, 2007; Keegan *et al.*, 2013). Entre los métodos empleados para incrementar los niveles de vitamina D₂ en hongos comerciales se encuentra la exposición postcosecha de los esporomas a la luz solar en períodos de 15-120 minutos y a lámparas fluorescentes UV o con pulsos UV (Cardwell *et al.*, 2018; Urbain y Jakobsen, 2015). La otra forma existente de vitamina D, la vitamina D₃ (colecalciferol) es producida a partir del 7-dehidrocolesterol en la piel, en una reacción de dos etapas en el cual ocurre una ruptura en el anillo B debido a radiaciones UV-B. De esta manera se genera la pre-vitamina D₃ que luego se isomeriza a vitamina D₃ en un proceso termosensible no catalítico (Bikle, 2014). D₂ difiere químicamente de D₃ por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 22 y 23, y un grupo metilo en el C24 de la cadena lateral (Figura 16). Ambas vitaminas pueden metabolizarse en el hígado y riñón humanos para dar lugar a la forma activa de la vitamina D.

Figura 23. Estructuras químicas de las vitaminas D₂ y D₃.

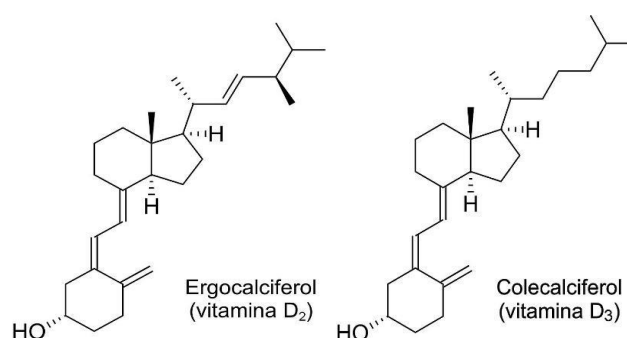


Figura 24. Esquema de la conversión del ergosterol en vitamina D2 vía radiación ultravioleta (UV). Basado en Cardwell *et al.*, 2018.



El valor nutricional de los hongos depende de varios factores, entre los cuales se encuentran la identidad o especie en cuestión (Kinge *et al.* 2016) y la composición del sustrato, siendo esta última variable de mayor importancia (Belewu, 2003; Karmani *et al.*, 2022; Kinge *et al.*, 2016). Por lo tanto, es esperable hallar diferencias con datos de bibliografía, donde, además de tratarse en ocasiones de especies diferentes, difieren los sustratos empleados.

Perfil de ácidos grasos y esteroides. La composición porcentual de ácidos grasos y esteroides se presenta en la Tabla 7. Los cromatogramas y espectros de masas del estándar de ácido linoleico y del perfil de ácidos grasos en las muestras se presentan en el Anexo 2, Figura 6. Los cromatogramas y espectros de masas del perfil de esteroides en las muestras analizadas se muestran en el Anexo 2, Figuras 7, 8 y 9. A pesar del bajo contenido graso de *G. sessile*, se evidenció la presencia de un ácido graso esencial poliinsaturado como lo es el ácido linoleico (C18:2). Seguido en abundancia se encontró el ácido palmítico (C16:0), de acuerdo con lo reportado por Taofiq *et al.* (2017). El contenido de ácido linoleico en *G. sessile* E47 ($60,62 \pm 5,20$ mg 100 g⁻¹ peso seco) fue inferior al máximo valor hallado en una serie de cepas de *G. lucidum* y *G. sinense* silvestres (392,05 mg 100 g⁻¹ peso seco) (Lv *et al.*, 2012). No obstante, el contenido de este ácido en *G. sessile* se halló dentro del rango publicado en ese estudio (Tabla 7). En este último estudio, los autores no presentaron desvíos estándar; sin embargo, al considerar el intervalo del 95 % de confianza, las diferencias fueron confirmadas. Estudios previos sobre el extracto hexánico de esta cepa, rico en ácidos grasos de cadena larga, destacaron su potencial uso como adyuvantes en terapia contra el cáncer (Vela Gurovic *et al.*, 2018). El ergosterol, precursor de la vitamina D2, fue el esteroide encontrado en mayor cantidad, tal como fue reportado para *G. lucidum* cultivado

(Chimyaem *et al.*, 2019). Como se indicó anteriormente, este compuesto puede convertirse en vitamina D2 al irradiar los basidiomas.

Tabla 7. Composición de ácidos grasos y esteroides en muestras de basidiomas de *G. sessile* E47, *P. ostreatus* P04 y *L. edodes* L15.

Ácidos grasos ^a	<i>G. sessile</i>	Ref.	<i>P. ostreatus</i>	Ref.	<i>L. edodes</i>	Ref.
C15:0	0,89	0,8-2,7 [1]	n.d.	0,4-1,5 [5]	0,51	25,0 ^c [7]
C16:0	19,10	21,3 [2]	10,44	11,2 [6]	12,79	10,3 [6]
C18:0	n.d.	5,8 [2]	1,36	1,6 [6]	12,23	1,6 [6]
C18:2 ^b	80,01	42,4 [2]	88,20	68,9 [6]	74,46	81,1 [6]
Ácido Linoleico ^c	62,29	21,45-392 [3]	131,93	1663,2 [7]	128,69	1044,5 [7]
Esteroides^a						
Ergosterol	73,21	36,89 [4]	93,75	73,59-91,4 [8,9]	75,68	73,59 [9]
Ergostadienol	26,79	18,7 [4]	n.d. ^d	3,1-4,7 [8,9]	13,51	3,91 [9]
Neoergosterol	n.d.	n.r. ^e [4]	n.d.	3,58 [8]	10,81	n.r. [10]
Neoergosterona	n.d.	n.r. [4]	6,25	0,4-1,2 [11]	n.d.	n.r. [10]

^aPorcentajes relativos; ^bmetil éster de ácido linoleico; ^cmg 100 g⁻¹ peso seco; ^dno detectado; ^eno reportado; [1] Martínez *et al.* (1991); [2] Taofiq *et al.* (2017); [3] Lv *et al.* (2012); [4] Chimyaem *et al.* (2019); [5] Kavishree *et al.* (2008); [6] Reis *et al.* (2012); [7] Woldegiorgis (2014); [8] Kanagasabapathy *et al.* (2011); [9] Hammann *et al.* (2016); [10] Prasad *et al.* (2017); [11] Milovanovic *et al.* (2021).

3.2. Parte II

Inocuidad alimentaria

3.2.1. Análisis de pesticidas provenientes del sustrato sólido

Introducción

La biorremediación es un proceso por el cual sustancias orgánicas e inorgánicas, causantes de contaminación o polución, son degradadas por microorganismos. Numerosos estudios han demostrado la capacidad inherente de las setas de degradar compuestos, gracias a sus enzimas extracelulares (Barh *et al.*, 2019; Nyanhongo *et al.*, 2007), que le confieren efectividad en la

degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos, colorantes sintéticos, nitrotoluenos, herbicidas y pesticidas, entre otros (Aken *et al.*, 1999; Barh *et al.*, 2019; Haritash and Kaushik, 2009). Los macromicetes desempeñan un papel vital en la absorción de contaminantes mediante dos procesos: la bioacumulación, que involucra procesos activos dependientes del metabolismo, donde se transportan contaminantes al interior de la célula y en parte a los componentes intracelulares; y la biosorción, que consiste en la fijación selectiva de iones de metales pesados u otros contaminantes a la biomasa independientemente de la energía metabólica. Otros mecanismos pueden estar involucrados en la biosorción, como la formación de complejos en superficie, el intercambio iónico, la precipitación y la unión covalente (Barh *et al.*, 2019). Los hongos biotransforman los pesticidas y demás compuestos xenobióticos induciendo cambios sustanciales en su estructura química, originando, en general, moléculas menos tóxicas (Cerniglia, 1997).

Como fue mencionado en el Capítulo 1, la fermentación en estado sólido ha sido tradicionalmente el método de obtención de numerosos HCyM, y consiste en la biotransformación de sustratos sólidos en alimentos, medicamentos y biomoléculas. Al ser el desecho mayoritario del agro y la industria, los agro-residuos representan el recurso renovable más abundante del mundo. Consecuentemente, con el auge de la producción de alimentos mediante tecnologías sustentables emerge la preocupación por parte de entidades gubernamentales y organismos internacionales acerca de la calidad de los productos obtenidos luego de la biotransformación de los sustratos a base de agro-residuos (World Health Organization, 2019). Considerando que el cultivo de setas representa un ejemplo de economía circular, basado en la reutilización de desechos agrícolas para la producción de alimentos o suplementos dietarios, surge la pregunta de si estos productos son seguros para el consumo humano, y si cumplen con estándares internacionales de calidad alimentaria. Por esto, al tratarse de setas producidas a partir de agro-residuos, se requieren análisis exhaustivos que evalúen más allá del contenido en metales pesados y su comparación con la ingesta máxima permitida (Fang *et al.*, 2014; Khani *et al.*, 2017; Rashid *et al.*, 2018).

Objetivo

Por lo antes mencionado, si los basidiomas serán destinados a consumo, se desprende la necesidad de considerar la posible transferencia de pesticidas desde el sustrato empleado para la producción de setas. Por otro lado, considerar la posible biotransformación de las sustancias contaminantes implicaría la búsqueda de sus posibles metabolitos en el basidioma. Sin embargo, un método analítico de este estilo requeriría de estándares de esos metabolitos que no se encuentran disponibles en el mercado.

El objetivo de este estudio fue determinar a los fitosanitarios cipermetrina y clorpirifós⁹ en basidiomas de *G. sessile* E47, pesticidas de uso frecuente en cultivos de girasol en la región de la cual provienen los agro-residuos empleados como sustrato en este estudio (Castaño, 2018), a fin de evaluar la posible transferencia de estos compuestos a los basidiomas. Ambos se encuentran, además, dentro del listado de pesticidas a determinar propuesto por la USP. Como material comparativo, se incluyeron en el análisis basidiomas de *P. ostreatus* P04 y *L. edodes* L15.

Materiales y métodos

La preparación de las muestras se realizó según lo descripto por Dallegrave *et al.* (2016). 0,1 g de basidioma pulverizado fue disuelto en 0,1 mL de acetonitrilo grado HPLC (Panreac Applied Chem GmbH, Darmstadt, Alemania). Posteriormente se realizó un *clean-up* mediante extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos STRATA C18-E de nivel máximo de carga 1g/6mL (Phenomenex, Torrance, CA). La cuantificación se realizó mediante curva de calibrado, preparada adicionando los estándares de ambos pesticidas a una matriz libre de estos compuestos (*matrix-matched calibration*). La matriz libre de pesticidas fueron gírgolas deshidratadas orgánicas (Las Isletas, Chivilcoy, Buenos Aires, Argentina) y los estándares clorpirifós (DOW Agrosience, Indianapolis, IN) y cipermetrina (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Alemania) de grado analítico. La determinación se realizó mediante CG-EM con los siguientes parámetros: gas portador helio a 1 ml min⁻¹ a flujo constante, *delay* de solvente 4,5 minutos con una temperatura del inyector y de

⁹ La comercialización y uso de clorpirifós fueron prohibidos en territorio argentino por RESOL-2021-414-APN-PRES#SENASA. No obstante, SENASA establece un LMR de 0.01 mg kg⁻¹, límite que rige actualmente.

la línea de transferencia de 250°C. La temperatura de la fuente de iones fue de 230 °C, y la del cuadrupolo 150°C. La temperatura se elevó de 50°C a 250°C a 5 °C min⁻¹ y luego a 121 °C min⁻¹ hasta 280°C. El volumen de inyección fue de 2 µL. Los procedimientos detallados se presentan en el Anexo 2, Protocolo 12. El análisis de los espectros se realizó utilizando la herramienta AMDIS 2.66 (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System for GC/MS, <https://chemdata.nist.gov/>).

Análisis estadístico

Cada *pool* de muestra seca y pulverizada y de estándar fueron analizados por triplicado y el resultado expresado como la media y su desvío estándar. Se calcularon los siguientes parámetros de calidad analítica: veracidad en términos de porcentaje de recuperación (PR), precisión (CV), linealidad, y los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de los dos pesticidas.

Resultados y discusión

Los parámetros de cada curva de calibrado, así como los de calidad analítica del método cromatográfico, verificados según los requisitos de la Comunidad Económica Europea (Commission Decision No. 2002/657/EC, 2002), se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Parámetros derivados de la curva de calibrado construida para cada pesticida y sus parámetros de calidad verificados.

	Tiempo de retención (min)	Ord. al origen	Pendiente	R ²	Porc. de recuperación (%)	Límite de detección (mg kg ⁻¹)	Límite de cuantificación (mg kg ⁻¹)	Linealidad (mg kg ⁻¹)	Precisión (CV %)
Cipermetrina	16,5 a 16,9	2616 ± 1130	30090 ± 1820	0,9856	103	0,032	0,107	0,107 a 1,07 (<i>p</i> <0,2)	12
Clorpirifós	9,9	104,1 ± 57,78	1478 ± 136,2	0,9593	92	0,022	0,107	0,107 a 1,07 (<i>p</i> <0,2)	19

Los contenidos de pesticidas en muestras de basidiomas de *G. sessile* E47, *P. ostreatus* P04 y *L. edodes* L15 muestran en la Tabla 9. Los cromatogramas y espectros de masas de estándares y muestras se presentan en el Anexo 2, Figura 10 y Anexo 2, Figura 11.

Tabla 9. Resultados obtenidos en la determinación de pesticidas en basidiomas de *G. sessile* E47, *P. ostreatus* P04 y *L. edodes* L15.

Pesticidas		<i>G. sessile</i>	<i>P. ostreatus</i>	<i>L. edodes</i>	Límites	Ref.
Clorpirifós (etil)	mg Kg ⁻¹ PS ^a	<0,022	<0,022	<0,022	0,2	USP ^{c,d}
	mg Kg ⁻¹ PH ^d	<0,003	<0,003	<0,003	0,05	UE ^e
Cipermetrina (todos los isómeros)	mg Kg ⁻¹ PS	0,220±0,093	0,305±0,086	0,282±0,044	1	USP ^{c,d}
	mg Kg ⁻¹ PH	0,029±0,012	0,052±0,015	0,046±0,007	0,05	UE ^e

^apeso seco; ^bpeso húmedo; ^cUSP-NF 2018, 41-NF 36, *G. lucidum* fruiting body powder, 2:4632-5; ^dUSP-NF 2018, 41-NF 36, Articles of botanical origin, Pesticide residues analysis <561>, 4: 6279-92; ^eUE 2016/60.

La desventaja de determinar la seguridad de estos productos basándose en los residuos de pesticidas es que las setas, a diferencia de otros cultivos, carecen de una regulación clara. La reglamentación en torno a los límites aceptados de pesticidas en alimentos es continuamente actualizada. El 18 febrero de 2020, la Comisión Europea estableció que el límite máximo para residuos (LMR) de clorpirifós y metil-clorpirifós en alimentos y piensos sea tal que no supere el nivel mínimo de detección de los métodos analíticos. En cuanto a la reglamentación estadounidense, el Código de Regulaciones Federal (CFR, USA) cita a los hongos comestibles, incluyendo *Ganoderma* spp., como grupo 21 dentro de los productos de cultivo, aunque no hay establecidos límites de pesticidas específicamente. Considerando a los vegetales como el grupo más cercano a las setas, para cipermetrina el LMR se encuentra entre 0,1 y 0,2 mg Kg⁻¹ de peso fresco (CFR 40, IE, 180C, 180.418), y para clorpirifós, entre 0,05 y 1,0 mg Kg⁻¹ (CFR 40, IE, 180C, 180.419), dependiendo del tipo de vegetal. El Codex Alimentarius (Pesticide Database, FAO, OMS) establece para las setas límites para deltametrina y permetrina de 0,05 y 0,1 mg Kg⁻¹ de peso fresco, respectivamente, mientras que no establece valores regulatorios para cipermetrina.

Un estudio realizado sobre champiñones y Shiitake presentes en el mercado de China constató la presencia de los pesticidas organofosforados metidatión, forato y acepato. Exceptuando el acepato, los otros dos pesticidas excedieron los niveles máximos permitidos en ese país. En ese mismo estudio, se hallaron pesticidas piretroides en muestras de champiñón, aunque dentro de los niveles permitidos localmente (Wang *et al.*, 2013). De acuerdo a los LMR establecidos por la UE antes mencionados, los estándares de clorpirifós fueron alcanzados por los hongos del presente estudio, ya que este pesticida no fue detectado por el método analítico. Con respecto a

cipermetrina, esta se halló debajo del LMR (incluyendo desvíos estándar) establecido en la USP para suplementos dietarios y productos de origen botánico. Cabe destacar que se observaron resultados similares tanto en hongos cultivados en CSG como en paja de arroz, indicando la ubiquidad del pesticida hallado.

3.2.2. Contenido de metales pesados

Introducción

Plomo, cadmio, hierro, cobre, manganeso, zinc, cobalto, cromo, níquel, magnesio, aluminio, estaño y arsénico han sido seleccionados como metales traza representativos cuyos niveles en el medio ambiente representan un índice fiable de contaminación ambiental. Metales como hierro, cobre, zinc y manganeso son considerados esenciales ya que desempeñan un papel importante en los sistemas biológicos, mientras que el aluminio y el plomo son metales no esenciales y tóxicos, incluso en trazas (Ünak *et al.*, 2007). No obstante, los metales esenciales también pueden producir efectos tóxicos cuando su ingesta es excesiva. Ha sido señalado que las concentraciones de los metales pesados en los macromicetes son considerablemente más altas que las de cultivos de hortalizas y frutas. Se sabe que muchas especies de hongos silvestres comestibles acumulan grandes concentraciones de metales pesados como plomo, cadmio, hierro, cobre, manganeso, zinc, cromo, níquel, aluminio y mercurio (Zhu *et al.*, 2011), en particular si crecen sobre suelos o sustratos contaminados. Se ha indicado que los niveles de metales encontrados en hongos silvestres son considerablemente más altos que los de los cultivados, lo que se debe no solo a diferencias en la composición y contaminación del sustrato, sino también a la edad del micelio, que puede durar varios años en la naturaleza, en comparación con sólo unos pocos meses en cultivo (Kalac y Svoboda, 2000).

Con respecto a los esporomas, se ha reportado que las concentraciones de los elementos generalmente dependen de la especie. Si bien la composición del sustrato es un factor importante, existen grandes diferencias en la absorción de metales individuales, estableciéndose factores de bioconcentración para cada metal. También, ha sido indicado que en estas estructuras fúngicas suelen acumularse cadmio, mercurio y cobre que migran desde el sustrato. Respecto a la edad del

esporoma o su tamaño, si bien resultan de menor importancia, algunos autores han informado concentraciones más altas de metales en estructuras más jóvenes, debido a que transporte de los metales desde el micelio al esporocarpio ocurre durante el inicio de la fructificación. Esta concentración disminuye luego durante el aumento de la masa del esporoma, la concentración de metales disminuye.

En acuerdo, la EFSA (*European Food Safety Authority*) establece límites para estos elementos en setas, y la USP provee de los valores máximos permitidos para suplementos dietarios a base de *G. lucidum*. Por su parte, el Codex Alimentarius no establece explícitamente límites de metales pesados para hongos comestibles o setas (CODEX STAN 193-1995).

Objetivo

Esta sección se propuso evaluar los niveles de metales pesados y reportar posibles contaminaciones que representarían un peligro para la salud, realizando comparaciones con normativas internacionales pertinentes. A su vez, se monitorearon diferencias entre cepas y estructuras del hongo en la capacidad de bioacumulación de metales de interés toxicológico, incluyendo también a los basidiomas de *P. ostreatus* P04 y *L. edodes* L15 cultivados en el laboratorio.

Materiales y métodos

Las mismas muestras empleadas para el análisis elemental fueron analizadas en su contenido de plomo, mercurio, arsénico y cadmio (ver sección 3.1.3, Análisis elemental).

Resultados y discusión

Los contenidos de metales pesados en muestras de basidiomas y micelios analizados en este estudio se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Contenido de metales pesados en basidiomas de *G. sessile* E47, *P. ostreatus* P04 y *L. edodes* L15, y en micelios de cepas de *Ganoderma* spp., y su comparación con los límites establecidos por entidades regulatorias.

Metales pesados		Basidiomas			Micelios			Límites	Ref.
		<i>G. sessile</i>	<i>P. ostreatus</i>	<i>L. edodes</i>	<i>G. sessile</i>	<i>G. lingzhi</i>	<i>G. oregonense</i>		
As	mg Kg ⁻¹ PS ^a	1,3	1,4	1,4	1,7	1,5	1,4	2,0	USP ^c
	mg Kg ⁻¹ PH ^b	0,17	0,24	0,23	-	-	-	-	-
Cd	mg Kg ⁻¹ PS	0,22	0,21	0,13	0,16	0,14	0,24	0,5	USP ^c
	mg Kg ⁻¹ PH	0,028	0,036	0,021	-	-	-	0,2 ^d /1,0 ^e	EU ^{d,e}
Hg^g	mg Kg ⁻¹ PS	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	1,0	USP ^c
	mg Kg ⁻¹ PH	<0,01	<0,02	<0,02	-	-	-	0,1	EU ^f
Pb	mg Kg ⁻¹ PS	1,29	0,56	0,87	1,04	1,40	1,20	5,0	USP ^c
	mg Kg ⁻¹ PH	0,17	0,10	0,14	-	-	-	0,2 ^d /3,0 ^e	EU ^{d,e}

Ref.: referencia; ^aPeso seco; ^bpeso húmedo; ^cUSP-NF 2018, 41-NF 36, *G. lucidum* fruiting body powder; ^dEU 520/2011; ^eEFSA EC 1881/2006 para setas (*L. edodes* y *P. ostreatus*) en mg Kg⁻¹ PH; ^fEFSA EC 1881/2006 para suplementos dietarios incluyendo *Ganoderma* spp. en su forma comercializada; ^gtotal.

Hasta la fecha no hay límites internacionales establecidos para arsénico en hongos consumidos como alimento. En este estudio, las cepas cumplieron con los requerimientos para cadmio y plomo, tanto como alimento como suplemento dietario. El arsénico se encontró en concentraciones inferiores, aunque cercanas, al límite propuesto por la USP para suplementos dietarios, en particular en el micelio de *G. sessile* E47. La presencia de este metal pesado en muestras obtenidas mediante cultivo sumergido podría deberse a componentes del medio de cultivo tales como el agua. Un estudio realizado sobre *L. edodes* cultivado halló que la concentración más alta de arsénico total fue de 1,3 mg kg⁻¹ en muestras de China (Pei *et al.*, 2015), similar a lo hallado en este estudio. Otra investigación en China mostró que el arsénico inorgánico estaba cerca del nivel máximo establecido en ese país en la mitad de las muestras (Chen *et al.*, 2018). Para muestras de *L. edodes* de Polonia, se concluyó que el consumo contribuiría significativamente a la ingesta de arsénico (Hoek-Van Den Hil y Van Asselt, 2019; Mleczek *et al.*, 2017).

Mleczek *et al.* (2017) también informaron niveles de cadmio de hasta 6,15 mg kg⁻¹ de peso seco en muestras de *L. edodes* obtenidas entre 2009 y 2015 en Polonia, niveles que se indicaron como preocupantes, ya que podrían llevar a exceder la ingesta semanal tolerable. La EFSA menciona a las setas como productos alimenticios que pueden contener altos niveles de cadmio. Sin embargo, al consumirse en menor cantidad que otros productos que contienen cadmio (como cereales, productos de cereales, verduras, nueces y legumbres, raíces o patatas con almidón y carne y

productos cárnicos), no contribuirían de manera significativa a la exposición al cadmio (EFSA, 2009); no obstante, dadas las tendencias actuales hacia el consumo de setas, el aporte de cadmio en estos productos debería considerarse. Los niveles de mercurio se encontraron debajo del límite de detección del método en todas las muestras, el cual a su vez es inferior a los límites para alimentos y suplementos establecidos para este metal. Si bien debido a la falta de réplicas de las muestras analizadas no puede hacerse un análisis estadístico, no se observaron grandes diferencias entre los niveles de los metales pesados entre cepas de *Ganoderma* ni entre micelios y basidiomas de *Ganoderma* spp. Respecto a la bioacumulación especie-específica, parecería haber una tendencia en *Ganoderma* spp. a bioacumular plomo en mayor medida en comparación con las otras especies de basidiomicetos estudiadas (Tabla 10).

3.2.3. Calidad microbiológica

Introducción

En la industria alimentaria de productos frescos hay un continuo foco en disminuir el riesgo sanitario que puede causar la contaminación microbiológica de los productos, factor que también afecta la calidad y la vida de estante de esos alimentos (Kim *et al.*, 2016; Schill *et al.*, 2021). En particular, tanto el contenido de humedad de los hongos frescos, de entre 80 % y 90 %, como su carga microbiana inicial, influyen en la estabilidad del producto durante el almacenamiento (Rossouw y Korsten, 2017; Siyoum *et al.*, 2016). Sensorialmente, los cambios en el color, la textura y el *flavor* de los hongos post cosecha denotan su deterioro, producto del aumento de la actividad enzimática propia y bacteriana (Schill *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2018). Además de los factores intrínsecos del producto, la calidad se ve afectada por factores extrínsecos ambientales post cosecha, como la temperatura de refrigeración, el nivel de humedad ambiente y las características del empaquetado. La contaminación por patógenos, que representan un riesgo para la salud, puede ocurrir ya sea en la planta procesadora (a partir de materiales de cultivo de hongos o del entorno de procesamiento) como también en el sitio de venta (Schill *et al.*, 2021). Por todo

lo mencionado, resulta crítico el control de variables durante la producción y luego en los momentos de cosecha y postcosecha.

Objetivo

El objetivo de esta sección fue determinar la calidad microbiológica en micelios y basidiomas, y comparar los resultados obtenidos con los límites establecidos por entidades regulatorias.

Materiales y métodos

Se realizaron los test microbiológicos propuestos por la USP para suplementos dietarios basados en el basidioma de *G. lucidum* (USP 41-NF 36, *Ganoderma lucidum* fruiting body powder. MICROBIAL ENUMERATION TESTS. USP, Rockville, MD, 2: 4632-4635). Para los análisis se partió de muestras secas y pulverizadas, conservadas en frascos herméticos en desecador por un período inferior a 6 meses post cosecha. Para el recuento de heterótrofos aerobios mesófilos totales (HAMT)¹⁰, se siguieron los procedimientos descritos en la norma International Standard Organization ISO 4833-1:2013. El recuento de mohos y levaduras se realizó según la norma ISO 21527-2:2008. Los resultados fueron expresados según lo indicado en la norma ISO 7218:2007. Los medios de cultivo y las condiciones de incubación empelados, así como una comparación entre los límites establecidos por entidades oficiales, se muestran en Anexo 2, Tabla 9 y Anexo 2, Tabla 10.

Análisis estadístico

Se generaron *pools* de muestras de cada lote de basidiocarpos y de micelios molidos y secos. El tiempo transcurrido desde la cosecha hasta el análisis fue de 1,5 años para los basidiomas y de 6 meses para los micelios. Las muestras fueron analizadas por triplicado y el resultado expresado como la media y su desvío estándar. Se consideraron significativas las diferencias con $p < 0,05$.

¹⁰ Corresponde a la denominación "aerobios mesófilos totales" de la USP, y a la determinación de "aerobios viables totales" de la FNA.

Para la comparación múltiple entre muestras se realizó la prueba de ANOVA de una o doble vía con *post-test* de Bonferroni empleando el *software* GraphPad Prism 5.00.

Resultados y discusión

Los resultados del análisis microbiológico son presentados en la Tabla 11. La reglamentación en cuanto a la inocuidad microbiológica es aún menos clara para hongos comestibles que el resto de los criterios de inocuidad alimentaria, y para establecer un parámetro de calidad debe recurrirse, en ocasiones, a los requisitos establecidos para productos afines. El Codex Alimentarius establece que los hongos comestibles secos deben estar libres de microorganismos en una cantidad que pueda representar un riesgo para la salud, aunque no especifica límite alguno (CODEX STAN 39-1981). La Comisión Reguladora europea (EC) No 2073/2005 en criterios microbiológicos para alimentos no establece criterios para hongos comestibles secos. Sin embargo, en cuanto a frutas y afines listas para el consumo existen criterios tales como la ausencia de *Salmonella* en 25 g y un recuento de *Escherichia coli* menor a 100 UFC g⁻¹. Si se recurre a normativas de productos farmacéuticos, como lo son las farmacopeas, las exigencias son mayores que para alimentos, debiéndose cumplir, además de criterios microbiológicos generales, requerimientos de ausencia de microorganismos específicos.

En estudios realizados en polvo de basidiomas de *Lentinula edodes* comercial ha sido reportado un recuento de bacterias mesófilas aerobias de $3,3 \pm 1,6$ en logaritmo de UFC g⁻¹ en muestras del producto comercializado seco (Kim *et al.*, 2016), siendo superior al valor reportado en este estudio ($p < 0,0001$). En ausencia de regulaciones microbiológicas para setas como alimentos y calculadas en peso seco, se realizó la comparación con los criterios de la USP para calidad microbiológica en suplementos dietarios. Así, las muestras cumplieron con los límites para HAMT y enterobacterias¹¹. No se hallaron diferencias significativas en los recuentos de HAMT entre basidiomas y micelios, ni entre cepas de *Ganoderma* ($p > 0,05$). Por su parte, los micelios mostraron mejor calidad microbiológica en cuanto a los recuentos de mohos y levaduras respecto

¹¹ Corresponde a bacterias Gram negativas tolerantes a bilis en la USP.

de los basidiomas estudiados ($p<0,05$), no difiriendo significativamente entre cepas ($p>0,05$). Esto podría deberse a la diferencia en el método de secado empleado en basidiomas y micelio (en estufa y mediante liofilización, respectivamente), considerando la mayor efectividad de la liofilización en disminuir el contenido de humedad y a su vez la actividad de agua, reduciendo así la actividad microbiológica (Casp y Abril, 2003). El recuento de mohos y levaduras del basidioma de *G. sessile* E47 excedió mínimamente el límite propuesto, mientras que *G. lingzhi* CS y *G. oregonense* GO mostraron recuentos debajo, aunque cercanos, al límite. Sin embargo, vale aclarar que la USP 2018 no exige recuento de estos microorganismos en la monografía de *G. lucidum*. Por otro lado, y tal como fue mencionado anteriormente, los apartados considerados de USP y de la FNA exigen como requerimiento adicional la ausencia de *E. coli* y *Salmonella*. Mientras que la ausencia del primer microorganismo podría asegurarse por el recuento negativo de Enterobacterias, si los productos a base de los hongos estudiados pretenden emplearse para la fabricación de productos farmacéuticos, deberá analizarse también la presencia del segundo. Finalmente, si los hongos secos o sus productos derivados planean formularse como suplementos dietarios, en Argentina, el código alimentario (Capítulo XVII, Artículo 1340) exige también la ausencia de *E. coli* en 1g, de *Salmonella* en 25 g y de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo en 0,1 g.

Tabla 11. Resultados del análisis microbiológico de basidiomas y micelios de *Ganoderma* spp., junto con basidiomas de *P. ostreatus* y *L. edodes*, y su comparación con los límites establecidos por entidades regulatorias. Las medias con igual letra (en negrita) en una misma fila, no difieren significativamente ($p>0.05$).

Microbiología	Basidioma				Micelio		Límites	Ref.
Log UFC ^a g ⁻¹ PS ^b	<i>G. sessile</i>	<i>P. ostreatus</i>	<i>L. edodes</i>	<i>G. sessile</i>	<i>G. oregonense</i>	<i>G. lingzhi</i>		
Heterótrofos aerobios mesófilos totales	1,48±0,17 a	1,78±0,25 a	2,87±0,24 a	2,82±0,58 a	2,00±0,56 a	1,70±0,44 a	5	USP ^{c,d}
Mohos y levaduras	3,04±0,17 a	2,84±0,04 a	2,68±0,10 a	1,11±0,21 b	0,81±0,21 b	1,50±0,08 b	3	USP ^{c,e}
Enterobacterias (<i>Enterobacteriaceae</i>)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<10 ⁵	USP ^{c,d}

^aUnidades formadoras de colonia, ^bpeso seco, ^cUSP-NF 2018 (USP 41-NF 36). *Ganoderma lucidum* fruiting body powder. USP, Rockville, MD, 2: 4632-4635. ^dUSP-NF 2018 (USP 41-NF 36). Microbial enumeration tests- Nutritional and Dietary Supplements <2021>. Rockville, MD, 2: 8153-8158. ^eUSP-NF 2006 (USP 29-NF 24). Microbiological attributes of non-sterile Nutritional and Dietary Supplements <2023>. Rockville, MD, 3087.

3.3. Conclusiones generales

Si se considera una porción de 3 g de polvo seco (aproximadamente una cucharada sopera), porción recomendada por día por proveedores de setas como superalimento, y para una dieta de 2000 calorías, el basidioma de *G. sessile* E47 aporta un 1 % de la ingesta diaria recomendada (IDR %) ¹² de proteínas (50 g día⁻¹), 0,2 % de la IDR de lípidos (60 g día⁻¹), 2 % de la IDR de hidratos de carbono (130 g día⁻¹) y un 6,2 % de la IDR de fibra (30 g día⁻¹) ¹³. Considerando al micelio de esta cepa, una porción equivalente aporta un 1,7 % de la IDR de proteínas, un 0,2 % de la IDR de lípidos, 1,4 % de la IDR de carbohidratos y un 4,8 % de la de fibra dietaria.

Las cepas de *Ganoderma* de este estudio mostraron propiedades nutricionales comparables a las de otros hongos comestibles en el mercado, como también adecuado perfil de inocuidad alimentaria. Sin embargo, se hallaron diferencias entre cepas y respecto a la estructura del hongo analizada, por lo que ambas variables deben considerarse a la hora de caracterizar los productos de consumo. A su vez, la presencia de pesticidas y demás contaminantes provenientes del sustrato sólido en el producto de consumo, dependiente en ocasiones de la especie/cepa en cuestión y afectada por los tiempos de cultivo, es una variable que debe tenerse en cuenta si se desea cumplir con estándares internacionales.

¹² Dietary Reference Intakes (DRIs). Dietary Reference Intakes of Nutrients-Based Reference Values. These Are Established by Nutrition Board of National Academy of Sciences; National Academy Press: Washington, DC, USA, 2004; Disponible online: <http://www.nap.edu>.

¹⁰ Dietary Reference Intakes (DRIs). The Essential Guide to Nutrient Requirements; National Academy Press: Washington, DC, USA, 2006; Disponible online: <https://www.nap.edu/read/11537/chapter/45>.



4. Capítulo 3

Caracterización de principios activos

*“La química es la rama de la filosofía natural en la que se han hecho
y pueden hacerse los más grandes progresos;
ésta es la razón por la cual la he convertido en mi especialidad;
pero al mismo tiempo, no he descuidado las demás ramas de la ciencia.
Sería un mal químico
si me dedicara a esa parcela del saber humano.
Si su deseo es llegar a ser verdaderamente un hombre de ciencia
y no un mero experimentador,
le aconsejo que se aplique en todas las ramas de la filosofía natural,
incluidas las matemáticas. ”*

Mary Shelley, *Frankenstein o el moderno Prometeo*

4.1. Introducción

El metabolismo de una célula u organismo puede definirse como una serie de procesos químicos que involucran sustancias denominadas metabolitos, llevados a cabo mediante un conjunto de reacciones enzimáticas que producen compuestos orgánicos biológicamente significativos. Los metabolitos primarios derivan del metabolismo del mismo nombre, y se caracterizan por originarse de vías biosintéticas fundamentales y similares en todos los organismos, y por presentar estructuras químicas y actividades fisiológicas relativamente simples presentes durante todo el ciclo de vida de los organismos en los que se producen. Los metabolitos secundarios son producidos por rutas biosintéticas más complejas, y generalmente no son esenciales para el crecimiento del organismo productor, sino que tienen funciones significativamente más específicas, a veces relacionadas con la especie o incluso con las cepas que los producen. Sin embargo, en ocasiones se subestima la importancia de los metabolitos secundarios debido a que sus funciones son, a menudo, desconocidas o no comprendidas en su totalidad. Por esto, suele considerarse que la clasificación depende del contexto, de modo que algunos metabolitos secundarios, como pigmentos, protectores solares, sideróforos, antibióticos, toxinas y feromonas, resultan esenciales para la supervivencia en la naturaleza. De hecho, se ha establecido que la línea entre el metabolismo secundario y primario puede ser difusa y, a veces, los metabolitos primarios pueden comportarse como metabolitos secundarios, o incluir moléculas simples derivadas directamente del metabolismo primario, como alcoholes, azúcares y ácidos orgánicos (Bills y Gloer, 2017).

A diferencia de los genes necesarios para la síntesis de los metabolitos primarios, que se encuentran dispersos por todo el genoma fúngico, los genes que codifican actividades enzimáticas de síntesis de metabolitos secundarios están dispuestos de forma contigua como *clusters* de genes biosintéticos (CGB). En hongos y bacterias, los metabolitos secundarios generalmente se sintetizan bajo ciertas condiciones de cultivo después de una fase de crecimiento exponencial. La activación transcripcional y epigenética de los CGB son el resultado de señales ambientales, y dependen de la etapa de desarrollo de los hongos productores (Keller, 2019). El número de

metabolitos secundarios identificados en hongos es elevado, y actualmente solo se conocen unos pocos. Los principales pertenecen a cuatro familias químicas: policétidos (PK), terpenoides, péptidos no ribosómicos (NRP) y policétidos/péptidos no ribosómicos quiméricos (NRP/PK). Los metabolitos secundarios se sintetizan a partir de sustratos metabólicos primarios, entre los que destaca la acetil-CoA como precursor de policétidos y terpenoides. Cada ruta biosintética de estos metabolitos comienza con enzimas específicas, y se completa con la actividad de otras que introducen modificaciones adicionales a la molécula (Keller, 2019; Avalos y Limón, 2021).

Los hongos comestibles y medicinales, silvestres y cultivados, producen una variedad de compuestos bioactivos de bajo y alto peso molecular, que incluyen alcaloides, lectinas, lípidos, peptidoglicanos, fenoles, polisacáridos, proteínas, péptidos ribosómicos y no ribosómicos, esteroides y terpenoides (Badalyan *et al.*, 2019) (Figura 25). Los estudios fitoquímicos y farmacológicos que utilizan métodos analíticos modernos han demostrado que los polisacáridos son uno de los componentes principales de los hongos (Zhang *et al.*, 2007; Badalyan *et al.*, 2019). Entre ellos, se ha indicado que los β -glucanos fúngicos con alto contenido de enlaces glicosídicos del tipo β -1,3 y β -1 poseen actividades inmunomoduladoras y antitumorales. Se estima que alrededor de un 80-85 % de los productos de los hongos medicinales son β -glucanos con este tipo de uniones, tal como el lentinano extraído de *L. edodes*. Debido a su menor toxicidad, relativa a la ocurrencia de efectos adversos, han sido propuestos como una alternativa terapéutica complementaria destinada al mantenimiento del estado de la salud durante el tratamiento con quimioterápicos (Ramberg *et al.*, 2010; Badalyan *et al.*, 2019). Sin embargo, la evidencia clínica es aún escasa, y es necesario mejorar la calidad metodológica de los estudios que afirman la actividad biológica de los hongos medicinales, tal como el efecto de *G. lucidum* en la supervivencia a largo plazo de pacientes con cáncer. También, resulta crucial la producción de meta-análisis periódicos de los estudios clínicos producidos, a fin de actualizar el estado del arte (Jin *et al.*, 2016).

Figura 25. A. Actividades biológicas y sus metabolitos responsables de los HCyM de mayor consumo y más investigadas hasta julio de 2021, según los criterios mencionados en el Anexo

Introducción, Tabla 1. Entre paréntesis se indica el número de especies asociadas a la variable.

B. Actividades biológicas y metabolitos discriminados por especie.



Numerosos triterpenos, esteroides y esterol presentes en los hongos medicinales poseen actividad antibacteriana, antimicótica, antiviral y citotóxica, entre otras. Hasta el momento, en 22 especies de *Ganoderma* spp. se han detectado unos 431 metabolitos secundarios, de los cuales 380 triterpenoides y 30 esteroides (triterpenos del tipo lanostano tales como los ácidos ganodéricos y lucidénicos, triterpenos pentacíclicos, sesquiterpenoides, entre otros), como también alcoholes, aldehídos, alcaloides, ésteres y lactonas, han mostrado tener actividad biológica (Baby *et al.*, 2015; Badalyan *et al.*, 2019). Según reportes, los ácidos triterpénicos serían los causantes del sabor amargo de los basidiomas de ciertas cepas de *Ganoderma* spp. (Kubota y Asaka, 1982; Nishitoba *et al.*, 1985; Hennicke *et al.*, 2016).

4.1.1. Los polisacáridos en los macromicetes

Los polisacáridos (PS) son macromoléculas compuestas por varios monosacáridos unidos por enlaces O-glucosídicos. El número de estas unidades estructurales y la presencia o ausencia de ramificación difieren para cada polímero. Una clasificación común de polisacáridos se basa en la identidad de sus monómeros. Así es como pueden hallarse homopolisacáridos y heteropolisacáridos. Los homopolisacáridos, o polisacáridos homogéneos, están compuestos por un solo tipo de monosacárido, y reciben el nombre del tipo de osas que los componen (por ejemplo, el glucano está compuesto por unidades de glucosa, el manano por el monómero manosa). Sus funciones en la naturaleza varían desde servir de reserva de energía (almidón y glucógeno) hasta ser componentes estructurales (quitina y celulosa). Los heteropolisacáridos se componen de al menos dos tipos de monosacáridos, solos o unidos a proteínas, que forman, por ejemplo, la matriz extracelular y la pared de peptidoglucano de las bacterias (Teijón, 2006). La heterogeneidad en la composición de los monosacáridos es consecuencia de en la complejidad de la ruta biosintética de los polisacáridos (Ma *et al.*, 2018).

En los hongos, los polisacáridos de los Basidiomycetes son más complejos en comparación con aquellos de los Ascomycetes, especialmente en términos de composición de monosacáridos y proporción molar de heteropolisacáridos. Más aún, se han encontrado diferencias en la composición de monosacáridos de los polisacáridos del esporomas, del micelio o el caldo de fermentación de una misma cepa (Wang *et al.*, 2017). Estos polímeros poseen características químicas diferenciales, como hiperramificación, y grupos químicos y pesos moleculares variados. Las ramificaciones promueven varios tipos de enlaces químicos durante las interacciones moleculares, desde enlaces simples hasta enlaces cruzados más complejos (Chen *et al.*, 2019). Los polisacáridos hiperramificados producidos por los hongos tienen como objetivo modificar las condiciones físicas y químicas del medio ambiente en que viven. El movimiento, generado a través del crecimiento y la expansión de las hifas, es impulsado por la producción de polisacáridos hiperramificados, que ayudan a reducir la fricción con el sustrato (Finlay *et al.*, 2009; Barbosa y de Carvalho Junior, 2020; Rosling *et al.*, 2009).

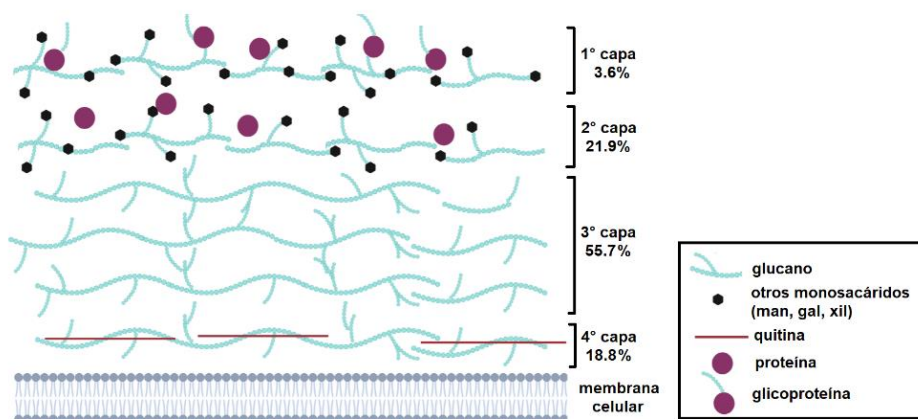
La biosíntesis y acumulación de los polisacáridos suele ocurrir después de la fase exponencial de crecimiento del microorganismo o al principio de la fase estacionaria (Osińska-Jaroszuk *et al.*, 2015). Los polisacáridos producidos por microorganismos pueden clasificarse, según su ubicación en la célula, en tres grupos principales; estos son los polisacáridos citosólicos, que sirven de fuente de carbono y energía para la célula, los polisacáridos estructurales formadores de pared celular, incluidos peptidoglicanos y lipopolisacáridos, y los exopolisacáridos (EPS), mayormente del tipo heteropolisacáridos, secretados al entorno extracelular en forma de cápsulas (mantenidas unidas a la pared celular), o de biopelículas. (Donot *et al.*, 2012; Mahapatra y Banerjee, 2013). Estos polisacáridos cumplen varias funciones en la célula microbiana, como la protección contra el estrés biótico ante la presencia de competidores, y contra el estrés abiótico, como las variaciones de temperatura, la desecación y la intensidad de la luz o el pH. Sin embargo, los EPS suelen definirse por el método de separación o extracción empleado. Tanto los polisacáridos solubles como los estructurales o ligados contienen polímeros exudados de microorganismos, además de productos de lisis celular y de hidrólisis de macromoléculas (Osińska-Jaroszuk *et al.*, 2015). Los polisacáridos excretados llevan consigo varios compuestos orgánicos como hormonas, feromonas y pigmentos (Francia *et al.*, 2011; Barbosa y de Carvalho Junior, 2020; Sun *et al.*, 2015).

Las vías biosintéticas de los polisacáridos involucran, sistemáticamente, la síntesis de precursores de azúcares nucleotídicos (UDP-glucosa, UDP-galactosa, GDP-manosa), el ensamblaje de unidades repetitivas de monosacáridos, y el proceso de polimerización. En el caso de los EPS, se adiciona finalmente el paso de excreción del polisacárido al espacio extracelular, en el que participan transportadores lipídicos (Donot *et al.*, 2012). Las enzimas involucradas en las rutas de biosíntesis de los precursores de azúcares de nucleótidos están estrechamente relacionadas con la producción de polisacáridos fúngicos. Tal como se mencionó en el capítulo 1 de esta tesis, si bien muchos estudios han descrito la mejora de la producción de EPS mediante la optimización del medio y las condiciones de cultivo líquido, las características estructurales y las rutas biosintéticas de las moléculas de EPS son muy complejas, y los intentos de mejorar su producción

deben acompañarse de un conocimiento más extenso y sistemático de las características fisiológicas y del metabolismo de estas macromoléculas en hongos como *Ganoderma* (Ma *et al.*, 2018).

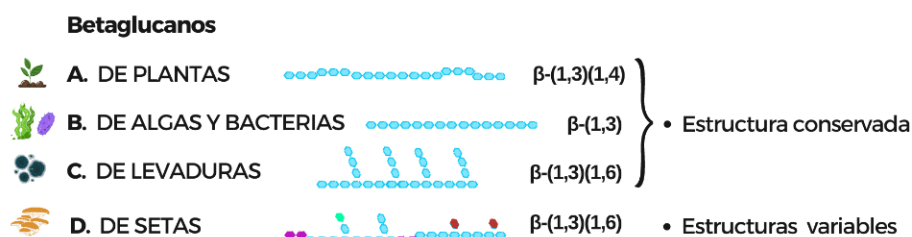
Las paredes celulares de los macromicetes contienen típicamente un 50-60 % en peso seco de glucanos, entre un 20-30 % de glicoproteínas y una pequeña porción de quitina, componentes considerados fuente de fibra dietaria con beneficios para la salud de los humanos. Su composición química varía en las diferentes instancias del desarrollo del ciclo de vida del hongo, incluyendo micelio, esclerocio y esporoma, y posee características que la diferencian de la pared celular de hongos filamentosos y levaduras (Chen y Cheung, 2014; Kang *et al.*, 2018). En el estudio estructural de estas paredes se ha determinado que los glucanos β -1,3-/1,6 altamente ramificados se ubican en la superficie celular y los glucanos β -1,3 lineales, asociados con la quitina cristalina, mientras que los glucanos α -1,3 conforman una matriz amorfa en toda la pared celular (Di Mario *et al.*, 2008; Chen y Cheung, 2014). Un modelo estudiado ha sido el de *Pleurotus tuber-regium*, donde los autores han propuesto un modelo de sándwich para representar la cantidad y naturaleza química de los componentes de la pared celular extraídos secuencialmente del basidioma de esta especie (Chen y Cheung, 2014) (Figura 26).

Figura 26. Representación del modelo de sándwich propuesto para la pared celular de *Pleutorus tuber-regium* de acuerdo a extracciones secuenciales realizadas sobre el basidioma, con los porcentajes relativos de las correspondientes capas, según lo reportado por Chen y Cheung (2014). Creada con <https://www.biorender.com/>.



Entre los polisacáridos de origen natural, los β -glucanos, formados por monómeros de glucosa con uniones β -O-glicosídicas, representan a unos de los polisacáridos más reconocidos por sus propiedades terapéuticas y funcionales (Wasser, 2010; Talbott *et al.*, 2013). Los β -glucanos se encuentran de forma natural en muchos alimentos, incluyendo hongos comestibles y medicinales, cereales como avena, cebada, trigo y centeno, bacterias, levaduras y algas (Murphy *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2022). Estas moléculas muestran gran variabilidad estructural según su origen, y de la fuente dependerá la presencia o no de ramificaciones, como así su longitud. En cereales o derivados de granos generalmente presentan enlaces glucosídicos del tipo 1,3 y 1,4 sin ramificaciones, variando la proporción de enlaces 1,3:1,4, el peso molecular y la presencia de grandes estructuras de celulosa. En bacterias y algas, los β -glucanos también presentan estructura lineal, pero solo de enlaces β -1,3 (Savelkoul, Chanput y Wichers, 2013; Hu *et al.*, 2022). Los glucanos β -1,6 se encuentran únicamente en hongos y en algunos miembros del filo Chromista, (Bartnicki-Garcia, 1968; Sietsma *et al.*, 1969) y, a diferencia de los β -glucanos de cereales, los β -glucanos fúngicos (considerados uno de los tipos más valiosos de fibra dietaria) varían entre especies según el grado y la distribución de las ramificaciones. Aquellos derivados de levaduras poseen un esqueleto lineal β -1,3 con largas cadenas ramificadas β -1,6 (Murphy *et al.*, 2020). Por otro lado, en los β -glucanos presentes en las setas (*Grifola frondosa*, *Schizophyllum commune*, *Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor*, *Inonotus obliquus*, *Phellinus linteus*, *Flammulina velutipes*, *Cordyceps sinensis*, entre otros) las ramificaciones β -1,6 son cortas (Savelkoul, Chanput y Wichers, 2013). La Figura 27 ilustra las diferencias estructurales de los β -glucanos según su origen.

Figura 27. Representación de las diferencias estructurales de los betaglucanos según su fuente de origen. Los monómeros azules representan a la glucosa, mientras que los de diferente color indican la presencia de monosacáridos diferentes.



Las investigaciones han demostrado que los polisacáridos derivados de los macromicetes pueden tener efectos positivos significativos sobre los niveles de glucosa en sangre, el peso corporal, la resistencia a la insulina, la inflamación, la endotoxemia y la composición de la microbiota del intestino, al tiempo que preservan la integridad de la barrera intestinal (Zhao *et al.*, 2023). Se ha demostrado que las actividades biológicas atribuidas a los glucanos dependen de varios aspectos relacionados con sus propiedades fisicoquímicas, tales como la composición de monosacáridos, la naturaleza de los enlaces glucosídicos, la presencia y localización de ramificaciones en las cadenas de monosacáridos, la disposición espacial, el peso molecular, la solubilidad y la viscosidad, entre otras (Zhu *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2020). Aunque la investigación sobre los glucanos se encuentra en auge, la elucidación de los mecanismos farmacológicos a nivel molecular, requisito indispensable para el desarrollo de medicamentos y productos que los contengan, no es aún completa.

Debido a sus potenciales beneficios para la salud, los polisacáridos de hongos comestibles y medicinales se pueden utilizar como aditivos en diversos productos alimenticios para mejorar su valor nutricional, aprovechando sus propiedades promotoras de la salud (Lu *et al.*, 2018; Olawuyi y Lee, 2019). También, se ha explotado su actividad antioxidante en bebidas (XuJie *et al.*, 2008), e incluso su potencial conservador de cepas probióticas al ser incluidos en concentraciones del 0,1 al 0,5% en yogures (Chou *et al.*, 2013). Más aún, debido a sus propiedades antioxidantes y antienviejecimiento, estos polisacáridos han sido incluidos en cosméticos y productos de cuidado personal. Por ejemplo, los polisacáridos de *Tremella fuciformis* pueden proteger a las células de la piel contra daño causado por la radiación UV al disminuir la generación de especies reactivas de oxígeno e inhibir de la expresión de metaloproteinasas de matriz, además de mejorar la hidratación y elasticidad de la piel (Wen *et al.*, 2016). Otra aplicación estudiada ha sido su mezcla

con diversos materiales para incrementar la resistencia y tenacidad en la producción de materiales de envasado de alimentos (Zhao *et al.*, 2023).

Extracción, purificación y elucidación estructural de los polisacáridos. Los polisacáridos son moléculas polares, a menudo hidrosolubles, e insolubles en solventes orgánicos, por lo que el agua es el solvente más comúnmente empleado en los métodos de extracción, incluyendo la extracción ácida y alcalina y el método de enzimólisis. En el caso de los polisacáridos intracelulares, el principio fundamental de la extracción radica en la ruptura de la pared celular en condiciones que eviten su desnaturalización (Song *et al.*, 2018; H. Zhang *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2007). Entre los métodos de extracción de polisacáridos intracelulares desarrollados en los últimos años se encuentran la extracción con ultrasonido, con microondas, con CO₂ supercrítico y la extracción con agua subcrítica, entre otros (Ren *et al.*, 2019). En el caso de los polisacáridos extracelulares, al ser excretados al medio extracelular, y, en general, no permanecer adheridos, son fácilmente extraíbles (Osemwegie *et al.*, 2020) y los procesos de extracción no requieren los procedimientos de lisis de la pared celular.

Los polisacáridos extraídos de productos naturales contienen numerosas impurezas, por lo que los polisacáridos crudos requieren pasos adicionales de purificación. Por su naturaleza hidrofílica, las proteínas son generalmente coextraídas junto a los polisacáridos, y su separación representa un paso clave en el proceso de purificación de estos últimos. Los procedimientos implican una separación selectiva de las proteínas mediante precipitación desnaturalizante. Otras impurezas en ocasiones removidas son los pigmentos (mayormente compuestos fenólicos), eliminados mediante técnicas de decolorización (Ren *et al.*, 2019).

La purificación profunda resulta esencial para estudiar la relación entre la estructura y la actividad biológica de los polisacáridos, ya que, tras su extracción, suelen coexistir como mezclas de cadenas de diferentes grados de polimerización. Entre las técnicas de purificación se encuentran la purificación física, la purificación cromatográfica y la precipitación química. La precipitación, adecuada para polisacáridos con grandes diferencias en solubilidad y peso molecular, implica el agregado de químicos como sales de amonio cuaternario de cadena larga y metales formadores

de complejos. Por su parte, la separación cromatográfica mediante cromatografía en columna, se destaca como un método eficiente para la purificación de componentes naturales. En particular, el uso combinado de la cromatografía de intercambio aniónico con DEAE (dietilaminoetil)-celulosa y la cromatografía en columna de gel (GPC) es ampliamente aplicado en la purificación de polisacáridos (Ren *et al.*, 2019).

La cromatografía de intercambio aniónico se utiliza comúnmente como la etapa principal para la purificación de polisacáridos crudos (Xie *et al.*, 2013), y se basa en principios de adsorción y partición mediante el uso de resinas. Durante la separación, se ajustan las condiciones de pH para la adsorción y la elución de polisacáridos ácidos y neutros. Posteriormente, la GPC permite separar diferentes polisacáridos basándose en la capacidad de ciertos geles con estructura de red porosa tridimensional de actuar como tamices moleculares. La separación depende de la velocidad de movimiento de los polisacáridos con diferentes tamaños y formas moleculares en la columna cromatografica (Ren *et al.*, 2019), y la columna de gel específica debe seleccionarse según la masa molecular relativa del polisacárido (Zhu *et al.*, 2016).

A la hora de analizar la estructura de los polisacáridos, ciertos autores recomiendan priorizar la elucidación de la estructura primaria por sobre las estructuras avanzadas. Uno de los métodos de análisis de la estructura primaria radica en la determinación de la homogeneidad de los polisacáridos mediante cromatografía de permeación en gel y HPLC con detector de índice de refracción diferencial (RID). La determinación del peso molecular también es una característica de la estructura de los polisacáridos que influye en las propiedades fisicoquímicas y la actividad farmacológica. Para su análisis se emplean la cromatografía de exclusión de alto rendimiento (HPSEC), la GPC, MALDI-TOF-MS, entre otros métodos. La estructura primaria se completa con el análisis de los monosacáridos y del tipo de unión de los polisacáridos (Ren *et al.*, 2019).

Por su parte, la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) se destaca como una técnica confirmatoria del tipo de enlaces glicosídicos presentes, su configuración (alfa o beta), y proporciona información sobre el número de monosacáridos en la estructura repetitiva (Ren *et al.*, 2019). En la RMN unidimensional, detalles específicos de las señales del grupo terminal en los

espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN resultan útiles en la inferencia de del tipo de residuo presente (H. Zhang *et al.*, 2016). Métodos más avanzados como la RMN bidimensional permiten un análisis más detallado de las estructuras de los monosacáridos y de los enlaces glicosídicos (Ren *et al.*, 2019).

Los polisacáridos son polímeros altamente hidrófilos debido a su gran cantidad de grupos hidroxilo, que les permiten formar estructuras de red tridimensionales, principalmente mediante enlaces de hidrógeno, y, adicionalmente, mediante fuerzas de van der Waals y enlaces covalentes, entre otras. Además, la cadena del polisacárido posee un alto grado de libertad y flexibilidad, que posibilita la asociación entre cadenas y complejiza su conformación espacial (Ren *et al.*, 2019). Aunque las investigaciones sobre las estructuras tridimensionales son menos abundantes que las referidas a las estructuras primarias, existe evidencia que demuestra la fuerte influencia de la conformación espacial sobre la bioactividad de los polisacáridos (Patel *et al.*, 2013; Tao *et al.*, 2015). La microscopía electrónica de barrido (SEM) proporciona imágenes de alta resolución que revelan la estructura tridimensional y la rugosidad superficial de los polisacáridos, permitiendo caracterizar estructuralmente polisacáridos individuales y realizar el seguimiento durante la separación y purificación. Entre otras técnicas de análisis de la estructura espacial de los polisacáridos se encuentran la microscopía de fuerza atómica (AFM) y la difracción de rayos X (Ren *et al.*, 2019).

4.1.2. Triterpenos y triterpenoides

Los terpenos son una gran familia de productos químicos derivados de la molécula de cinco carbonos de difosfato de isopentenilo (IPP) y de difosfato de dimetilalilo (DMAPP). Cuando a la estructura de carbono-hidrógeno de los terpenos se adicionan grupos funcionales, se originan los terpenoides (Agger, Lopez-Gallego y Schmidt-Dannert, 2009; Palenzuela *et al.*, 2021; González-Hernández *et al.*, 2023). Estos compuestos pueden ser producidos por dos vías biosintéticas diferentes, la vía de la desoxixilulosa-5-fosfato y la vía del mevalonato, siendo esta última la única vía identificada hasta la fecha en hongos. Muchos terpenoides de bajo peso molecular producidos por hongos son volátiles (Avalos y Limón, 2021). Estos compuestos son constituyentes

estructurales de otro grupo de metabolitos que se forman a través del enlace de unidades de isopreno (hemiterpenos C₅, monoterpénos C₁₀, sesquiterpenos C₁₅, diterpenos C₂₀, sesterpenos C₂₅, triterpenos C₃₀, tetraterpenos C₄₀).

Una vez sintetizado el esqueleto terpenoide inicial, diferentes enzimas, llamadas en general terpenos sintasas, introducen diversas modificaciones químicas hasta generar la estructura final. Entre las terpenoides sintasas que intervienen en la formación de cadenas lineales, existe un tipo característico conocido como terpenoides ciclasas, en gran parte responsables de la enorme diversidad de terpenoides que se encuentran en la naturaleza. En algunos casos, se añade a la estructura una molécula no terpenoide, dando origen a los meroterpenoides (Avalos y Limón, 2021; Shankar y Sharma, 2022). La mayoría de los triterpenoides de interés farmacológico producidos por los basidiomicetos se originan a partir del lanosterol, un terpenoide tetracíclico de 30 carbonos (Kimura *et al.*, 2010), que es también una molécula intermediaria de la síntesis del ergosterol (Sayari *et al.*, 2021; González-Hernández *et al.*, 2023).

Las funciones de estas moléculas en los hongos incluyen el transporte de electrones, la formación de membranas y paredes celulares, la defensa química contra los depredadores y el establecimiento de relaciones simbióticas, entre otras. Su sabor amargo y sus propiedades antimicrobianas naturales permiten disuadir a los predadores no deseados. Al igual que para otros metabolitos secundarios, la regulación de la transcripción de genes del metabolismo de los terpenoides responde a factores o estímulos ambientales (temperatura, luz, pH, presencia de especies reactivas) y nutricionales (fuente de carbono, nitrógeno, oxígeno). Uno de los nutrientes más relevantes en la producción de los terpenoides fúngicos es el nitrógeno; por ejemplo, se ha visto que la presencia de nitratos y el bajo contenido de amoníaco induce la transcripción de genes que codifican para terpenos sintasas. Por otro lado, se ha reportado que ciertas fuentes de carbono como la glucosa pueden tener un impacto negativo en la síntesis de metabolitos secundarios de hongos; no obstante, la regulación por parte de la fuente de carbono sobre el metabolismo secundario es compleja y no se aplica por igual a los distintos tipos de compuestos (Mihlan *et al.*, 2003; Hou *et al.*, 2015; González-Hernández *et al.*, 2023). Ciertos cofactores como iones

divalentes, por ejemplo Ca^{2+} y Mg^{2+} , afectarían la actividad de las terpenos ciclasas, lo que ha derivado en el desarrollo de técnicas de síntesis dirigidas (Quin, Michel y Schmidt-Dannert, 2015; González-Hernández *et al.*, 2023).

En *G. lucidum*, los triterpenoides son compuestos bioactivos de bajo peso molecular y gran relevancia, derivados altamente oxidados del lanosterol diferenciados según el estado de oxidación, y conocidos como ácidos triterpénicos (ácidos ganodéricos), ganoderioles, ácidos ganolúcidos, lucidonas y ácidos lucidínicos (Hennicke *et al.*, 2016). En particular, se ha hallado que los ácidos ganodéricos (AG) poseen actividad antitumoral, antipalúdica, antibacteriana, antiinflamatoria y antiviral (Joseph *et al.*, 2009; Kao *et al.*, 2013; Chen, 2020). El perfil de diferentes triterpenos en *G. lucidum* puede utilizarse para distinguir este hongo medicinal de otras especies taxonómicamente similares y servir como base para la clasificación; además, su contenido permite estimar la calidad de diferentes muestras de *Ganoderma* (Chen *et al.*, 1999; Su *et al.*, 2001).

Debido al valor comercial y farmacológico de los AG, en los últimos años ha crecido el interés comercial en su biosíntesis. Sin embargo, la productividad y el rendimiento de los de estos métodos de síntesis son bajos (Tang y Zhong, 2003; Chen, 2020). Se ha reportado que el contenido de triterpenos varía en las diferentes partes del hongo y durante los estadios de crecimiento (Wachtel-Galor *et al.*, 2011). Si bien hay ácidos ganodéricos oscuros producidos por el micelio, su estructura sería diferente y serían producidos en pequeñas cantidades (Chilton, 2017), en ocasiones indetectables (Wachtel-Galor *et al.*, 2011). Incluso, se ha visto que durante el desarrollo del basidioma los patrones de triterpenos varían en sus diferentes secciones (Zhou *et al.*, 2018).

En los últimos años, el análisis de los triterpenoides de *Ganoderma* se ha llevado a cabo mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de ionización por electrospray (CL-IES-EM) (Yang *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2020). Por su parte, la USP establece a la cromatografía líquida con detección UV y empleo de estándares de ácidos ganodéricos de referencia como método de análisis de los triterpenos en basidiomas de *G. lucidum*, siendo un método poco específico y con limitaciones en cuando a la disponibilidad de dichos patrones. Las

principales vías de fragmentación características de los triterpenoides, producidas mediante espectroscopia de masas, se han establecido de acuerdo con las diferentes sustituciones en los C-7, 12, 15 y en el doble enlace en los C-20 y 22. Sin embargo, y en particular en *Ganoderma* spp., las estructuras de los triterpenoides son complejas y bastante similares, con gran semejanza en su polaridad, por lo que estos compuestos no son fácilmente separados mediante métodos cromatográficos simples. De hecho, debido a la cercanía de los pesos moleculares, los análisis de CL-EM son muy limitados (Huang *et al.*, 2020). Frente a estas dificultades, el análisis de espectros de RMN se propone como una técnica adecuada para la asignación precisa de los segmentos estructurales de los compuestos químicos (Bingol y Brüscheweiler, 2014). En particular, se ha propuesto un método de análisis de triterpenos de especies de *Ganoderma* en base al análisis de espectros 2D de RMN (Huang *et al.*, 2020).

4.2. Objetivo

El presente capítulo tuvo como objetivo llevar a cabo el análisis químico de los componentes bioactivos mayoritarios de *G. sessile* E47, cepa destacada por su crecimiento diferencial en sustrato sólido y líquido, y compararlos con aquellos presentes en las especies de *Ganoderma* con propiedades medicinales reportadas.

Con base en los numerosos estudios que reportan los posibles mecanismos de modulación de la respuesta inmune por parte de los PS de *Ganoderma*, se plantea como hipótesis que son estos los principales responsables de su actividad inmunomoduladora y se presenta principal interés en su elucidación estructural. Por otro lado, se hipotetiza que las diferencias en la potencia biológica de los productos se deben a diferencias en su composición química, por lo que se incluyeron en el análisis comparativo a los PS del cultivo líquido de *G. sessile* E47 y del basidioma de *G. lucidum*, especie medicinal de referencia, además de los PS de *P. ostreatus* P04 y *L. edodes* L15, y de otras cepas de *Ganoderma* spp.

4.3. Materiales y métodos

4.3.1. Análisis de polisacáridos

Extracción de polisacáridos. Los polisacáridos de *G. sessile* E47 provenientes del cultivo sumergido fueron extraídos a partir del sobrenadante de cultivo tal como fue descrito en el capítulo 1, aunque eliminando el paso de extracción con ultrasonido (Meng *et al.*, 2020). A fines comparativos, se extrajeron también los polisacáridos de los micelios de *G. sessile* E47, *G. oregonense* GO y *G. lingzhi* CS, y también de los basidiomas de *G. sessile* E47, *P. ostreatus* P04 y *L. edodes* L15, siguiendo el protocolo descrito en el Anexo 1, Protocolo N°2.

Purificación y fraccionamiento. Luego de su liofilización, los extractos crudos de los polisacáridos (PSC) de *G. sessile* E47 fueron sometidos a desengrasado en frío con acetona (1:100 p/v). Las proteínas se eliminaron del extracto por precipitación con ácido tricloroacético 24 % p/v (1:1). Posteriormente, el sobrenadante fue dializado contra agua corriente y destilada en membrana de diálisis (*cut-off* 14 kDa, Sigma) y liofilizado nuevamente, obteniéndose el extracto purificado de polisacáridos (PSP). El perfil de polisacáridos se obtuvo mediante separación del extracto en una columna cromatográfica de intercambio aniónico (DEAE-celulosa, fase móvil: agua destilada y NaCl 0,05 a 0,5 M). Las fracciones obtenidas se concentraron, dializaron y liofilizaron para obtener su peso seco, y finalmente se sometieron a purificación en cromatografía de exclusión por tamaños (Sephadex G-200®, fase móvil: NaCl 0,2 M). El monitoreo de la presencia de carbohidratos y proteínas en las alícuotas recolectadas se realizó en todos los casos mediante reacción con fenol- ácido sulfúrico y posterior medición de la absorbancia a 490 nm, y mediante medición de la absorbancia a 280 nm, respectivamente. Los protocolos correspondientes a la realización de cada cromatografía se detallan en el Anexo 3, Protocolos 1 y 2.

Análisis de distribución de peso molecular. La determinación del peso molecular de los polisacáridos se realizó por cromatografía de permeación en geles en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (GPC-HPLC). Se utilizó una bomba Shimadzu LC-20AT y un detector de índice de refracción Shimadzu RID-10A. El análisis se realizó utilizando las columnas Polysep-GFC-P5000 (300 × 7,8 mm, rango 50-2000 kDa) y Supelco TSK-GP4000PW (300 × 7,8 mm, rango 1-700 kDa) conectadas en serie. Como solvente de elución se utilizó una solución de

NaNO₃ 0,05M conteniendo 0,02 % de NaN₃ preparada con agua de calidad HPLC. Se trabajó a flujo constante de 0.6 mL min⁻¹ y a temperatura ambiente. El sistema se calibró usando dextrans como estándares cuyos toques de pico poseen los siguientes pesos moleculares: 745000, 410000, 134600, 53000, 18000 y 8000 Da. La curva de calibración, así como la determinación de los valores de Mp (peso molecular en el máximo del pico), Mn (peso molecular promedio numérico), Mw (peso molecular promedio pesado) y polidispersión (Mw/Mn) se realizó utilizando el programa LC Solution GPC *software* (Shimadzu) (Anexo 3, Figura 1; Anexo 3, Tabla 1). Las muestras se disolvieron en el solvente de corrida del GPC y fueron filtradas a través de una membrana de Nylon de tamaño de poro 0,40 µm. Se inyectaron 100 µL de soluciones de aproximadamente 5 mg ml⁻¹ del polisacárido (muestras y estándares). La determinación fue realizada como servicio por parte del Departamento de Química Orgánica-CIHIDECAR, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

Análisis de monosacáridos. La composición de monosacáridos fue determinada mediante CG-EM según lo reportado por Carbonero *et al.* (2006) y Chen *et al.* (2008), con algunas modificaciones (Anexo 3, Protocolo 3). Brevemente, 1 mg de polisacáridos se hidrolizó con 1 ml de ácido trifluoroacético 2 M durante 8 h a 100 °C. El residuo fue reducido con borohidruro de sodio en oscuridad durante 90 min a 40 °C. El exceso de NaBH₄ se eliminó agregando 12,5 µL de ácido acético glacial. Los alditos generados se acetilaron con una mezcla de anhídrido acético: piridina (1:1) v/v a temperatura ambiente durante 12 h. La piridina fue removida con CuSO₄ 5 % p/v y los acetatos de alditos se extrajeron con cloroformo (de Jesus *et al.*, 2018). Como estándares se emplearon D-glucosa, L-ramnosa, D-ribosa, L-arabinosa, D-manosa y D-galactosa para la cuantificación mediante curva de calibrado. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: columna capilar HP-5 30 m × 0,25 mm de diámetro interno, temperatura del inyector y del detector 240 °C, temperatura inicial 160 °C, mantenida durante 2 min. Rampa: 5 °C min⁻¹ hasta 240 °C y manteniendo la temperatura final por 10 min; flujo 1,2 mL min⁻¹.

Análisis de polisacáridos por RMN. Para el análisis mediante RMN del protón y carbono en una dimensión (¹H-RMN y ¹³C-RMN, respectivamente) y mediante RMN en dos dimensiones

(HSQC, *Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy*) 50 mg de polisacáridos se solubilizaron en D₂O con la adición de DMSO-d₆ 5 % v/v para la calibración de la señal. Los espectros 2D de ¹H-RMN y ¹³C-RMN fueron obtenidos en un espectrómetro Bruker AVANCE 300 a 300 K y 300 MHz para los experimentos de ¹H y a 75 MHz para los de ¹³C. Para la calibración de las señales nucleares de DMSO-d₆ se emplearon los valores 2,50 y 39,52 ppm para ¹H y ¹³C, respectivamente. Para el análisis de espectros se utilizó el *software* TopSpin 4.1.4. Se integraron las señales obtenidas de los espectros ¹H para establecer relaciones de proporción entre residuos de sacáridos. Se analizaron los espectros de los polisacáridos purificados del cultivo líquido de *G. sessile* E47 junto con sus fracciones, y, a fines comparativos, de los polisacáridos extraídos de los basidiomas de *G. sessile* E47, *P. ostreatus* P04 y *L. edodes* L15, y de los micelios de *G. sessile* E47, *G. lingzhi* CS y *G. oregonense* GO.

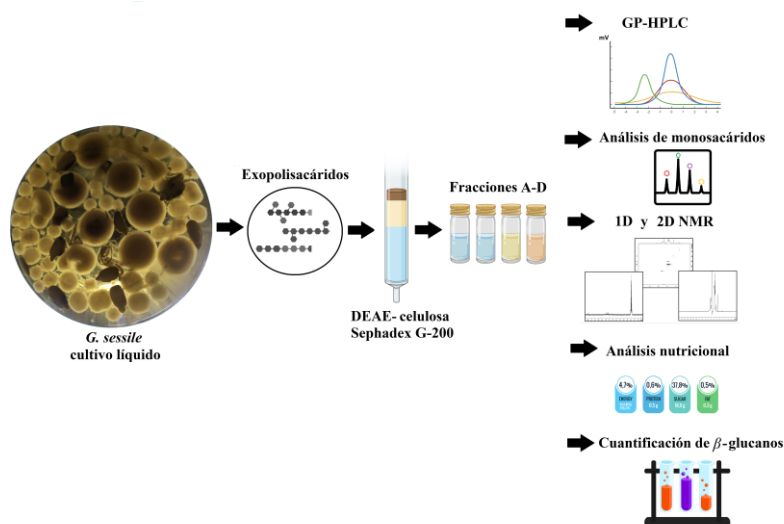
Análisis nutricional. Se analizó el contenido de humedad, proteínas, lípidos, cenizas y fibra de los polisacáridos crudos y purificados del CL de *G. sessile* E47 según los métodos descritos en el capítulo 2. Se monitoreó la presencia de proteínas remanentes en el polisacárido purificado mediante el método Bradford.

Cuantificación de β -glucanos. Para la cuantificación de la fracción de β -glucanos se emplearon los métodos enzimáticos β -Glucan Assay K-YBGL (Yeast & Mushroom, Megazyme) y Mixed-linkage β -Glucan Assay K-BGLU (McCleary Method, Megazyme). El método K-YBGL se emplea para la medición y análisis de 1,3;1,6- β -D-glucanos (y 1,3- β -glucanos, de estar presentes) en levaduras y setas, mientras que el método K-BGLU cuantifica 1;3;1;4- β -D-glucanos presentes en cereales.

Comparaciones con material de referencia. Los análisis de composición de monosacáridos, de RMN y de cuantificación de β -glucanos fueron también realizados sobre los polisacáridos de *G. lucidum* obtenidos de un producto comercial (PipinRock, cápsulas rígidas conteniendo extracto estandarizado de basidioma de Reishi), el cual declara en su rótulo contener un 35 % en peso de polisacáridos. El protocolo de extracción y purificación de los polisacáridos se detalla en el Anexo 3, Protocolo 4.

La Figura 29 resume los procedimientos analíticos realizados sobre los polisacáridos del cultivo líquido de *G. sessile* E47 para su elucidación estructural.

Figura 29. Resumen de los procedimientos analíticos sobre los polisacáridos del cultivo líquido de *G. sessile* E47.



4.3.2. Análisis de compuestos triterpenoides por RMN

Extracción de triterpenoides. Para la búsqueda de triterpenos y/o triterpenoides se siguió el método de extracción propuesto por Huang *et al.*, (2020). 3 g de muestra fueron sometidos a extracción con ultrasonido en 125 ml de una mezcla de acetato de etilo: metanol (2:1), previo desengrasado con 300 ml de acetona y agitación en baño de hielo durante diez minutos. El extracto resultante fue evaporado bajo presión reducida y el residuo se resuspendió en 3 ml de D₂O y se sometió a tres procesos de liofilización para eliminar el agua remanente.

Análisis por RMN. El sólido fue liofilizado en DMSO-d₆ 5 % v/v para su análisis por RMN con las condiciones de ensayo detalladas en el apartado correspondiente al análisis de polisacáridos por RMN del presente capítulo. Se obtuvieron los espectros de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, HSQC y HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Connectivity*).

4.4. Resultados y discusión

4.4.1. Análisis de polisacáridos

La FDA realiza un proceso de evaluación para cada producto que su panel de expertos propone incorporar a los alimentos, y decide si el aditivo es lo suficientemente seguro para su uso. Sin embargo, algunas sustancias que están excluidas de la definición de aditivos alimentarios o designadas como "generalmente reconocidas como seguras" o GRAS, por sus siglas en inglés (*Generally Recognized as Safe*) pueden quedar exentas de este requisito de revisión. Los betaglucanos son polisacáridos muy apreciados como ingredientes alimentarios, como lo demuestra su aparición en varias noticias GRAS de la FDA (GRASN 239, 309, 413).

En *Ganoderma* spp. han sido reportados tanto homo como heteropolisacáridos, compuestos principalmente por glucosa, aunque también por otros monosacáridos en sus cadenas laterales, con estructuras lineales y ramificadas, pudiendo incluso coexistir configuraciones alfa y beta en el mismo polímero (Ruthes *et al.*, 2016). Inicialmente, los β -D-glucanos han sido considerados los únicos polisacáridos con propiedades terapéuticas, aunque numerosos estudios han demostrado que los heteropolisacáridos también poseen actividad biológica (Lindequist, Niedermeyer and Jülich, 2005; Carbonero *et al.*, 2008; Komura *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2013; Smiderle *et al.*, 2014; Ruthes *et al.*, 2016). Estos polisacáridos son naturalmente más complejos que los D-glucanos debido a la variabilidad en la composición de los monosacáridos, la configuración anomérica, los patrones de unión y ramificación, e incluso, en ocasiones, a la presencia de monosacáridos metilados. Debido a la complejidad de estas macromoléculas, se utilizan métodos avanzados como RMN, GC-MS, HPSEC, FT-IR, y reacciones químicas como análisis de metilación, hidrólisis parcial y degradación de Smith controlada, todas ellas combinadas, para determinar la pureza y la estructura química, evitando la interpretación incorrecta de los datos y/o la identificación de moléculas quiméricas (Ruthes *et al.*, 2016).

El perfil de elución en DEAE-celulosa de los polisacáridos obtenidos del CL de *G. sessile* E47 mostró la presencia de cuatro tipos diferentes de polisacáridos, nombrados como fracciones A a D (Figuras 30 y 31). No se observó absorción a una longitud de onda de 280 nm en el volumen total eluido, lo que demuestra la efectiva remoción de las proteínas mediante el método empleado. El análisis de los cromatogramas obtenidos mediante cromatografía en columna Sephadex mostró

que sólo las fracciones A y C son homogéneas, mientras que las fracciones B y D presentan varios picos (Figura 32). En cuanto a los perfiles de GPC-HPLC, en los cromatogramas de las fracciones A y C se observaron picos relativamente simétricos y únicos, mientras que las fracciones B y D presentaron picos de ensanchamiento, sugiriendo una composición heterogénea (Figura 33, y Anexo 3, Tabla 1). El contenido de polisacáridos purificados respecto al de polisacáridos crudos, obtenido mediante gravimetría (reuniendo los pesos secos de las fracciones FA a FD), resultó ser del 53,3 %. La contribución de cada fracción al peso total fue del 53,1 % para FA, del 7,3 % para FB, del 29,8 % para FC y del 9,8 % para FD.

Figura 30. Aspecto de los polisacáridos de *G. sessile* E47 obtenidos en cultivo líquido luego de su precipitación y post-liofilización y molienda.

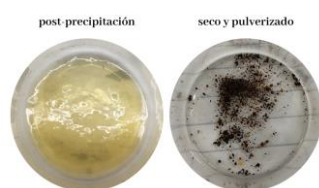


Figura 31. Perfil obtenido en DEAE-celulosa de los polisacáridos de *G. sessile* E47 obtenidos en cultivo líquido, eluidos con agua y con concentraciones crecientes de NaCl. Los picos se designan como fracciones A a D.¹⁴

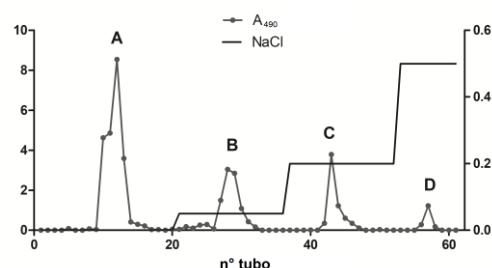
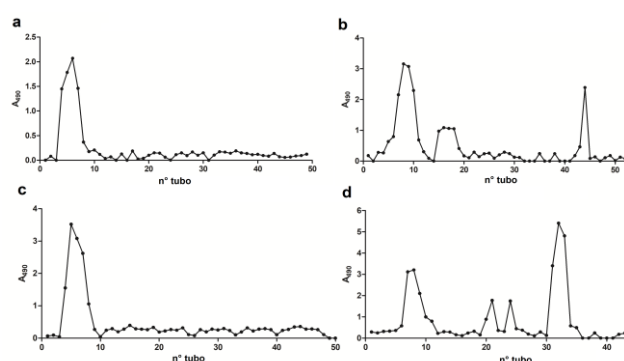


Figura 32. Cromatogramas obtenidos en columna Sephadex G-200 de cada una de las fracciones separadas mediante DEAE-celulosa (a-d para las fracciones A-D).



¹⁴ Las fracciones A y B, eluidas con agua y 0,05 M de NaCl, respectivamente, resultaron ser polvos incoloros y blancos cuando post liofilización, mientras que las fracciones C y D presentaron color amarillo a marrón y fueron eluidas con 0,2 y 0,5 M de NaCl, respectivamente.

El análisis de monosacáridos mostró que los polisacáridos de *G. sessile* E47 cultivado en medio líquido son heteropolisacáridos, compuestos mayoritariamente por glucosa, seguido por galactosa y manosa, respectivamente, y en menor proporción por arabinosa, ramnosa y ribosa, composición que varía entre sus distintas fracciones. Por su parte, los polisacáridos del producto comercial a base de *G. lucidum* resultaron estar compuestos solo por glucosa (Figura 34, Tabla 12).

Figura 33. Cromatogramas obtenidos mediante GP-HPLC de las fracciones purificadas A a D. Los parámetros obtenidos para cada fracción de este análisis están disponibles en Anexo 3, Tabla 1.

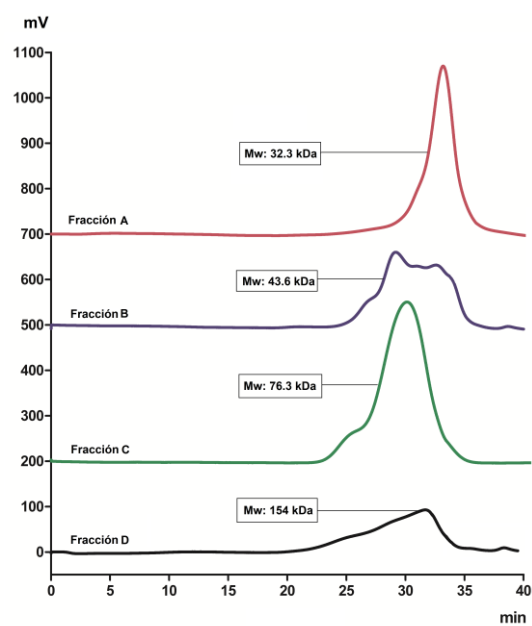


Figura 34. Cromatogramas obtenidos del análisis de monosacáridos mediante CG-EM de los polisacáridos purificados de *G. lucidum* (GL PSP), y del CL de *G. sessile* E47 (GS PSP) junto con sus fracciones FA-FD.

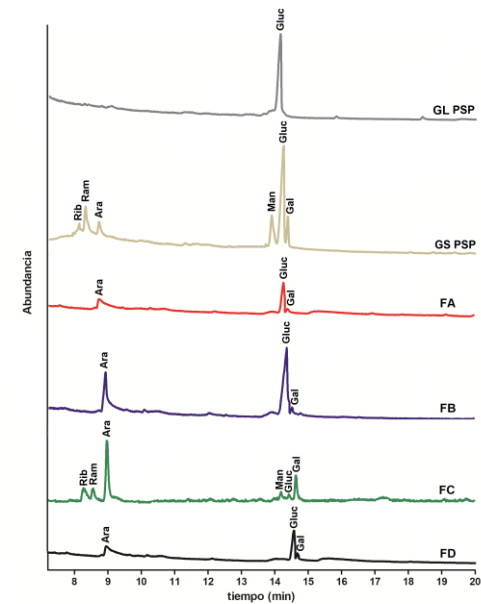


Tabla 12. Análisis de monosacáridos mediante CG-EM. Se presentan los tiempos de retención y la cuantificación en mg g⁻¹ en peso seco de los monosacáridos hallados en los polisacáridos purificados de *G. lucidum* (GL PSP), y del CL de *G. sessile* E47 (GS PSP) junto con sus fracciones FA-FD. Entre paréntesis se presenta el contenido porcentual de cada monosacárido.

	tr (min)	GL PSP	GS PSP	FA	FB	FC	FD
ribosa	8.12	0	8.52 (0.6)	0	0	69.5 (12.8)	0
ramnosa	8.33	0	88.15 (6.7)	0	0	76.2 (14.1)	0
arabinosa	8.73	0	140.7 (10.8)	128.95 (31.7)	136.55 (26.1)	260.5 (48.2)	153.25 (28.4)
manosa	13.91	0	176.38 (13.5)	0	0	17.2 (3.2)	0
glucosa	14.26	596.44 (100.0)	685.64 (52.5)	222.05 (54.6)	313.7 (60.0)	9.7 (1.8)	312.8 (57.9)
galactosa	14.4	0	207.5 (15.9)	55.6 (13.7)	72.25 (13.9)	107.55 (19.9)	74.1 (13.7)

Figura 35. Espectros HSQC de los polisacáridos purificados de *G. lucidum* (GL PSP), y del CL de *G. sessile* E47 (GS PSP) junto con sus fracciones FA-FD en la región de carbonos anoméricos en tres regiones del espectro (1-3).

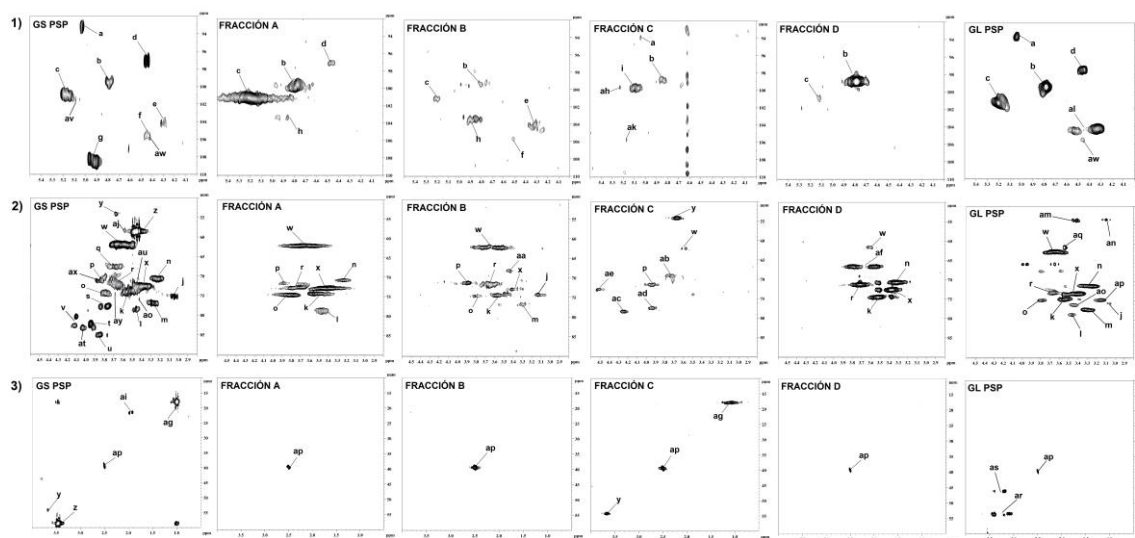


Tabla 13. Correlaciones H/C obtenidas de los espectros HSQC de los polisacáridos purificados del CL de *G. sessile* E47, y extraídos de *G. lucidum*. Las letras denominan a las correlaciones señaladas en la Figura 35.

Letra	δ (ppm)	Letra	δ (ppm)	Letra	δ (ppm)
a	5,03/93,1	R	3,64-3,67/72,8	ai*	1,91-1,98/21,5
b	4,82/98,8	s*	3,78-3,84/77,6	aj*	3,55/58,5
c	5,22/100,8	t*	3,95/82,5	ak*	5,18/105,7
d	4,45-4,47/97,1	u*	3,86/85,2	al**	4,35/103,9
e*	4,29/104,3	v*	4,12/80,2-82,6	am**	3,39-3,46/53,5
f*	4,44/105,6	W	3,61-3,67/61,7	an**	3,05-3,13/53,9

g*	4,91-4,97/108,4	X	3,35-3,42/72,5	ao	3,44/75,8
h*	4,86/103,3	y*	3,67/54,3	ap	2,50/39,52 (sv)
i*	5,10/99,4	z*	3,46/59,1	aq**	3,55/61,0
j*	3,01-3,08/75,8	aa*	3,45/68,3	ar**	3,09;3,45/54,0
k	3,38;3,52/73,8	ab*	4,01;3,71/69,1	as**	3,20;3,40/46,21
l	3,45/78,8	ac*	4,24/78,8	at*	4,03/82,98
m	3,29/76,8	ad*	3,92/77,5	au*	3,45/70,9
n	3,22/70,7	ae*	4,52/72,7	av*	5,09/101,6
o	3,76/74,4	af*	3,55;3,79/66,5	aw	4,47/105,7
p*	3,89/71,3	ag*	1,06/18,1	ax*	3,81;3,9/71,2
q*	3,64-3,68/67,7	ah*	5,23/99,6	ay*	3,68/74,5

*Correlaciones observadas solo en polisacáridos de *G. sessile*; **correlaciones observadas solo en polisacáridos de *G. lucidum*; sv: solvente.

Tabla 14. Asignaciones de las correlaciones H/C (ppm) obtenidas de los espectros HSQC de los polisacáridos purificados del CL de *G. sessile* E47 de acuerdo a los átomos de la molécula.

H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6a,b/C6	Tipo de enlace asignado	Referencias
5,10/99,4	n.d.	3,92/77,5	4,24/ 78,8	4,52/72,7	n.d.	1,4- α -D-Galp	Zhang <i>et al.</i> 2012, Zhang <i>et al.</i> , 2016
4,86/103,3	3,64-3,67/72,8	3,86/ 85,2	n.d.	3,76/74,4	3,61-3,67/61,7	1,3- β -D- Glcp	Zhang <i>et al.</i> 2012
4,82/98,8	3,52/73,8	n.d.	n,d	3,89/71,3	3,55;3,79/ 66,5	1,6- α -D- Glcp	Li <i>et al.</i> , 2016c
4,44/105,6	3,35-3,42/72,5	3,45/78,8	3,45/68,3	n.d.	n.d.	1,6- β -D- Glcp	Zhang <i>et al.</i> 2012; Wang <i>et al.</i> 2017
4,47/105,7	n.d.	n.d.	n.d.	3,68/74,5	3,81;3,9/ 71,2	1,3,6- β -D- Glcp	Zhang <i>et al.</i> 2012; Li <i>et al.</i> , 2020
4,29/104,3	n.d.	n.d.	3,78-3,84/ 77,6	n.d.	3,67/54,3	1,4- β -D-Galp	Xu <i>et al.</i> 2016
4,91-4,97/108,4				3,55/58,5		t-1- α -L-Araf	Guo <i>et al.</i> , 2015;
5,18/105,7	4,12/80,2-82,6	n.d.	3,95/82,5	3,64,3,68/ 67,7	-	1,5- α -L-Araf	Yuan <i>et al.</i> , 2016; Shi <i>et al.</i> , 2017
5,23/99,6	n.d.	n.d.	3,45/70,9	n.d.	1,06/18,1	1,2- α -L-Ramp	Guo <i>et al.</i> , 2015; Shi <i>et al.</i> , 2017
5,22/100,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1- α -D-Glcp	Li <i>et al.</i> , 2016c
n.d.	3,22/70,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1- β -D-Glcp	Li <i>et al.</i> , 2020
5,03/93,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	α -D-Glcp	Pomin <i>et al.</i> , 2012
5,09/101,6	4,03/82,98	n.d.	n.d.	n.d.	3,71;4,01/ 69,1	1,6- α -D-Manp	Galinari <i>et al.</i> , 2017

n.d.: no detectado; Los valores en negrita indican los desplazamientos químicos de los carbonos que se han desplazado a campos bajos debido a la posición de enlace de los residuos.

El análisis de los espectros 1D y 2D de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de los polisacáridos de *G. lucidum*, junto con la comparación con referencias bibliográficas, fue empleado para la asignación enlaces glucosídicos (Figura 35, Tablas 13 y 14). Los enlaces β -glucosídicos fueron observados en mayor proporción en relación a los α en FB y FD (3:1 y 2:1, respectivamente), mientras que en FA esta proporción fue de 1:1. Respecto a los β -glucanos presentes, se hallaron señales y correlaciones

correspondientes con enlaces β -1,3, β -1,6 y β -1,3,6, siendo el tipo de β -glucanos más reportado en macromicetes (Synytsya and Novak, 2014). Los enlaces correspondientes a α -glucanos resultaron ser del tipo α -1,6 y α -1. Si bien los reportes de glucanos de este tipo en el reino *Fungi* son menos abundantes, se han reportado glucanos α -1,6 lineales y ramificados en especies de Basidiomicetos (Luo *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2011). La correlación a 5,03/93,1 ppm observada tanto en *G. sessile* E47 como *G. lucidum* podría deberse a los desplazamientos de H1/C1 de α -D-glucosa libre (Pomin, 2012). Las señales de ^{13}C entre 106,0 y 108,5 ppm han sido reportadas como características de arabinofuranosa (Yuan *et al.*, 2016; Wen *et al.*, 2022).

A pesar del bajo contenido de ramnosa observado en GS PSP y en FC, este monosacárido fue fácilmente identificado mediante 2D RMN por la señal en campos altos del protón a 1,06 ppm correlacionada con una señal de ^{13}C a 18,1 ppm (Guo *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2017). La presencia de galactosa se corroboró en el polisacárido purificado y en las fracciones FB y FC. Este monosacárido se encontraría formando cadenas tanto en configuración α (confirmado por el desplazamiento a 5,10 ppm de ^1H) como β (confirmado por la correlación a 4,29/104,3 ppm en la región anomérica). El tipo de enlace 1,4-D-Galp se asignó por los desplazamientos a campos altos del C4 a 78,8 y 77.6 ppm para α y β -D-Galp, respectivamente (Zhang *et al.*, 2012, 2016; Xu *et al.*, 2016). Con respecto a los residuos de manosa, se identificaron correlaciones poco intensas en los espectros HSQC de GS PSP y FC, posiblemente atribuidos a 1,6- α -D-Manp por el desplazamiento a 69,1 ppm del C6 (Galinari *et al.*, 2017). Si bien el análisis de monosacáridos indicó que las cuatro fracciones de los PS de *G. sessile* E47 contienen arabinosa, sólo se hallaron señales asignadas a este monosacárido en FC, posiblemente por su mayor abundancia. Este último análisis indicó además que FC contiene ribosa, aunque no pudo ser identificada mediante RMN. Este monosacárido ha sido reportado en estructuras de heteropolisacáridos de setas, sin embargo los datos de espectros de ^1H y ^{13}C son escasos (Zhao *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2020, Han *et al.*, 2013). En particular, un polisacárido de *G. lucidum*, conteniendo ribosa entre sus monosacáridos, mostró mejorar la sensibilidad a la insulina y modular la microbiota intestinal en ratones diabéticos (Shao *et al.*, 2022). La correlación 4,45-4,47/97,1 no pudo asignarse a enlaces

del tipo glucosídicos. Al analizar la integración de los picos correspondientes a esta correlación en los espectros de ^1H donde fue observada (GS PSP, FA y GL PSP), se determinó que se trata de señales con escasa abundancia (Han *et al.*, 2013).

Los resultados demuestran que los polisacáridos purificados de *G. sessile* E47 presentan una estructura compleja, siendo del tipo β -glucanos, formados por una cadena principal de 1,3- β -D-Glcp y 1,6- β -D-Glcp en una proporción 2:1, respectivamente. FA estaría compuesta por una cadena principal de 1,3- β -D-Glcp y 1,6- α -D-Glcp intercalada con residuos 1,6- β -D-Glcp, y con residuos de arabinosa y galactosa. FB, por su parte, se trataría de un 1,3,6- β -D glucano. En menor proporción en FB se hallaron 1,6- α -D glucanos, tal vez correspondientes a una cadena independiente que le daría su carácter polidisperso. Esta fracción, además, contendría residuos de 1,4- β -D-Galp y de arabinosa. La fracción FC se trataría de un galactoarabinano con uniones 1,5- α -L-Araf, 1,4- α -D-Galp y 1,4- β -D-Galp (con proporción de residuos de arabinosa y galactosa de 2:1, respectivamente), con residuos de glucosa, manosa, ramnosa y ribosa. Tal proporción se corresponde con lo observado en el análisis cuantitativo de monosacáridos (Figura 34, Tabla 12). Por último, FD tendría una estructura similar a FB, solo que el tipo de unión de Galp no pudo determinarse.

Li *et al.* (2016) reportaron un perfil cromatográfico similar al observado en este estudio para los polisacáridos de *G. lucidum* del caldo de cultivo, aunque para *G. sessile* E47 de este trabajo se observó un pico adicional (D) (Figura 31). No obstante, la composición de monosacáridos de *G. lucidum* fue diferente a la de *G. sessile* E47. Los autores no informaron datos de RMN para realizar comparaciones adicionales. Por otro lado, Liu *et al.* (2010) informaron dos fracciones principales obtenidas mediante cromatografía en DEAE-celulosa de polisacáridos del basidioma de *G. lucidum*, que eluyen con agua y NaCl, respectivamente. La distribución del peso molecular de ese estudio mostró un polisacárido soluble en agua con bajo Mw (GLPL1, 5,2 kDa), inferior al Mw de las fracciones A y B (Figura 33). Los autores hallaron cuatro señales anoméricas de ^{13}C en *G. lucidum* entre δ 104,9 y 105,4 ppm, mientras que en la fracción A se observaron correlaciones de ^{13}C a menores ppm (δ 97,1-103,3 ppm) (Anexo 3, Figura 5). Además, GLPL1

demonstró ser un β -glucano, a diferencia del α y β -glucano heterocompuesto de la fracción A (Figura 32). Según su perfil de elución en DEAE-celulosa, GLSWA-I, reportado por Wang *et al.* (2017), sería comparable a la fracción A de este estudio. No obstante, GLSWA-I mostró cuatro señales anoméricas principales de ^1H y tres de ^{13}C , todas ellas asignadas a la configuración β , mientras que las señales de ^1H relacionadas con la configuración α en los espectros de la fracción A fueron igualmente abundantes que las β (Figura 35, Tablas 13 y 14).

Según reportes, un mayor peso molecular, la presencia de ramificaciones, una buena solubilidad en agua y la heterogeneidad en la composición química de los polisacáridos se han asociado con una mayor potencia biológica. Li *et al.* (2016) reportaron que GLP-1, un α y β -galactoglucano ramificado con un Mw de 100 kDa mostró una mayor actividad inmunomoduladora *in vivo* que un β -D-glucano homogéneo con un Mw menor (19,5 kDa) denominado GLP-2, ambos PS aislados de extractos del basidioma de *G. lucidum*. Además, un β -D-glucano de alto Mw en la misma especie demostró actividad para estimular los macrófagos (Liu *et al.*, 2014). En *Hericium erinaceus* se reportaron resultados similares, donde un heteropolisacárido ramificado (50 kDa) formado por glucosa y galactosa presentó propiedades preventivas y curativas sobre la gastritis crónica superiores a un heteropolisacárido de menor peso molecular aislado de la misma especie (Wang *et al.*, 2004). Estos resultados demuestran una dependencia entre el Mw, la estructura y la actividad biológica de los glucanos fúngicos.

En particular, la actividad inmunomoduladora de los polisacáridos de *Ganoderma* podría correlacionarse con la composición química, la conformación y las propiedades físicas, como la solubilidad, el tamaño molecular y la forma de ramificación. Por ejemplo, las uniones β -1-3 glucosídicas serían necesarias para la síntesis de óxido de nitrógeno de los macrófagos. Cuando esta estructura se combina con cantidades variables de ramificaciones β -1-6 se observa una alta actividad antitumoral e inmunomoduladora (Carrieri *et al.*, 2017; Ren *et al.*, 2021; Tsoni y Brown, 2008; Wasser, 2002). Resulta relevante el hecho de que los β -glucanos no son expresados en células de mamíferos y, por lo tanto, son reconocidos como patrones moleculares asociados a patógenos por los receptores de reconocimiento de patrones. Respecto a la composición de

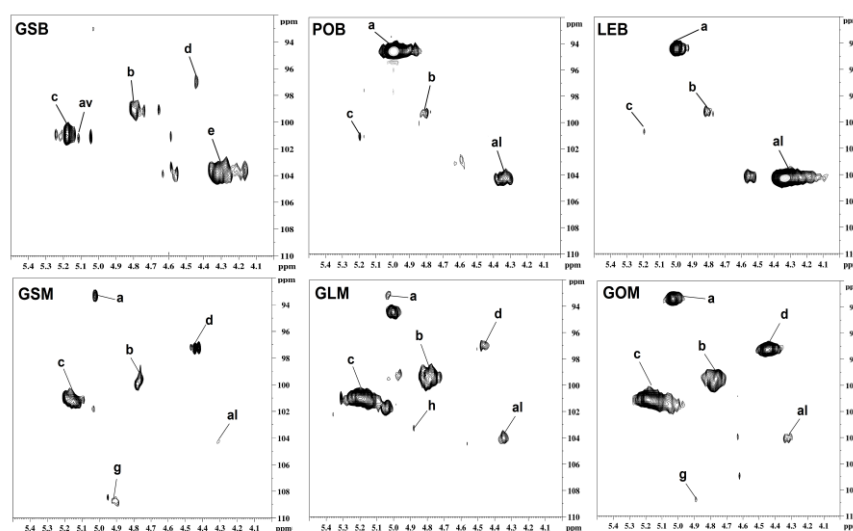
monosacáridos, los polisacáridos de *Ganoderma* reducirán el riesgo progresivo de cáncer debido a que contienen glucosa y manosa, que pueden ser reconocidas por receptores específicos en la superficie de las células efectoras, como la dectina-1, receptores de manosa (MR), TLR4 y TLR2, y receptores del complemento tipo 3 (CR3) (Hsu *et al.*, 2009; Ren *et al.*, 2021; Tsoni y Brown, 2008).

Rubin-Bejerano *et al.* (2007) demostraron que los neutrófilos reconocen las uniones β -1,6 de los glucanos a través de los factores del complemento C3b/C3d, seguido de la fagocitosis y la liberación de especies reactivas de oxígeno, mientras que ignoran las uniones β -1,3. Tomando como ejemplos al escleroglucano y el esquizofilano, a pesar de presentar la misma estructura química, muestran diferentes actividades biológicas al variar la conformación o el peso molecular. En línea con lo último mencionado, ciertos tratamientos pueden generar la transición entre diferentes conformaciones o incluso la destrucción completa de la estructura del β -glucano, como el calentamiento, la sonicación, la presencia de solventes fuertemente polares o de álcalis (Meng *et al.*, 2020). Aún más, se ha planteado que la estructura terciaria de los polisacáridos afecta el reconocimiento por parte de los TLR (Barreto-Bergter y Figueiredo, 2014) y condiciona su actividad biológica. Ciertos tipos de polisacáridos adoptan, en su forma natural o en solución acuosa a temperatura ambiente, una estructura secundaria única de triple hélice. Esta conformación le confiere buena hidrosolubilidad, ya que los grupos hidroxilo de las cadenas laterales interactúan con las moléculas de agua mediante puentes de hidrógeno (Meng *et al.*, 2020). La triple hélice de los glucanos, formada por los enlaces β -1,3 y la minoría de β -1,6, también estaría relacionada con la actividad anticancerígena. Por otro lado, se ha demostrado que los mananos poseen una mayor afinidad por TLR2 y TLR4 (glicoproteínas transmembrana tipo I, que funcionan como un componente del sistema de defensa de la inmunidad innata en humanos) que la manosa, debido a la cantidad de epítopos en su estructura terciaria (L. Ren *et al.*, 2021).

Los espectros HSQC en la región de carbonos anoméricos de los polisacáridos extraídos de los basidiomas de *G. sessile* E47 (GSB), *P. ostreatus* P04 (POB) y *L. edodes* L15 (LEB), y de los micelios de *G. sessile* E47 (GSM), *G. lingzhi* CS (GLM) y *G. oregonense* GO (GOM), mostraron,

en su mayoría, correlaciones asignadas a glucanos (Figura 36). En GSB, estos glucanos serían mayoritariamente del tipo α -glucanos, hallándose además correlaciones que pueden asignarse a carbonos anoméricos de galactosa (e) y manosa (av). En POB y LEB, por el contrario, los polisacáridos estarían compuestos, al menos mayoritariamente, solo por unidades de α y β -glucosa. Esto último también fue observado en los polisacáridos del micelio de *G. lingzhi* CS, mientras que en GSM y GOM también se observaron correlaciones asignadas a H1/C1 de unidades de arabinosa. Si bien son necesarios análisis complementarios en todas las muestras analizadas, como el de composición de monosacáridos, distribución de peso molecular y cuantificación de betaglucanos, los polisacáridos de *G. sessile* E47 presentarían una estructura más heterogénea que el resto de los hongos de este estudio.

Figura 36. Espectros HSQC en la región de carbonos anoméricos de los polisacáridos extraídos de los basidiomas de *G. sessile* E47 (GSB), *P. ostreatus* P04 (POB) y *L. edodes* L15 (LEB), y de los micelios de *G. sessile* E47 (GSM), *G. lingzhi* CS (GLM) y *G. oregonense* GO (GOM), obtenidos a 300K en D₂O con la adición de 5 % DMSO-d₆ para su calibración. Las letras denominan a las correlaciones señaladas en la Figura 35 e indicadas en la Tabla 13.



El análisis nutricional de los polisacáridos crudos se presenta en las Tablas 15 y 16. Como puede observarse, el contenido de carbohidratos representa cerca de un 71 % del peso seco (Tabla 15), con un porcentaje de impurezas del 29 % correspondiente a lípidos, proteínas y cenizas. Si bien

existe cierta disimilitud entre el contenido de carbohidratos y el de fibra total, tal vez debido a la inexactitud del método de cálculo de los primeros, puede decirse que los polisacáridos crudos del cultivo líquido de *G. sessile* E47 serían en su totalidad fibra dietaria (Tabla 16). Por otro lado, y debido a la presencia de proteínas, se procedió a realizar una desproteinización de los polisacáridos siguiendo el protocolo detallado en el Anexo 3, Protocolo 4, ítem 7, y luego a analizar el perfil cromatográfico mediante DEAE-celulosa, a fin de evaluar si dichos polisacáridos se hallaban asociados a proteínas. Como resultado, se obtuvo un cromatograma similar al observado en la Figura 31, lo que descartó la posibilidad de una asociación proteína-carbohidrato.

Tabla 15. Análisis nutricional de los polisacáridos obtenidos por precipitación del sobrenadante del cultivo líquido de *Ganoderma sessile* E47 (g 100 g⁻¹ SBS*).

Humedad ^a	13,86±3,12
Cenizas	10,50±1,25
Lípidos totales	6,76±0,1
Proteínas	12,14±0,61
Carbohidratos ^b	70,60±2,77

*sobre base seca; ^acalculado sobre el producto liofilizado; ^bcalculados mediante diferencia [100 – (g proteínas + g lípidos + g cenizas)].

Tabla 16. Análisis de fibra de los polisacáridos no purificados del cultivo

líquido de *G. sessile* E47 (g 100 g⁻¹ SBS*).

Fibra dietaria total	79,82±3,19
Fibra dietaria insoluble	70,67±1,17
Fibra dietaria soluble	6,64±0,87

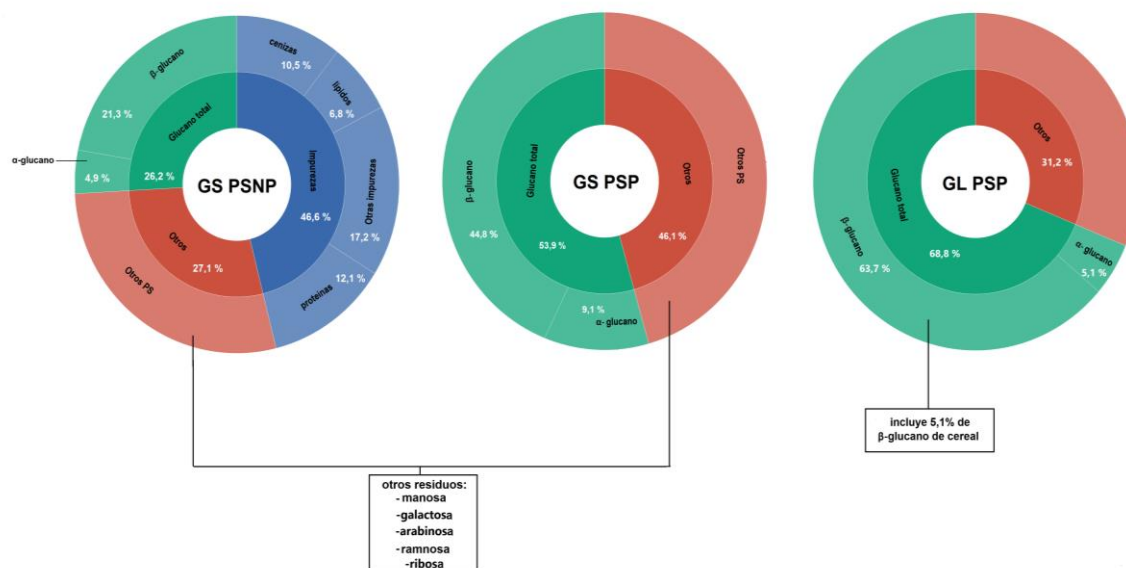
*sobre base seca

Tabla 17. Cuantificación de glucanos por los métodos K-YBGL y K-BGLU, en mg 100 g⁻¹ secos.

		GS PSNP	GS PSP	GL PSP
K-YBGL	Glucanos totales	26,19±0,57	53,93±1,23	72,50±1,61
	Alfa-Glucanos	4,88±0,61	9,11±0,04	5,08±0,10
	Beta-Glucanos	21,31±0,04	44,81±1,27	67,42±1,26
K-BGLU	Beta-Glucanos	n.d.	n.d.	4,79±0,54

n.d.: no detectado

Figura 37. Representación gráfica de la composición porcentual de los polisacáridos crudos y purificados del cultivo líquido de *G. sessile* E47 en base a los resultados de los métodos K-YBGL y K-BGLU, y del análisis de monosacáridos. Se incluyó a los polisacáridos purificados de *G. lucidum* para su comparación.



Nota: post purificación del producto comercial a base de *G. lucidum*, el peso seco del extracto resultó ser del 70,2 % p/p respecto al polvo seco; considerando que el análisis de monosacáridos indicó que estaría compuesto solo por glucosa y que su rótulo indica un contenido de polisacáridos del 35 % p/p por cápsula, esto indicaría que un 35,2 % de GL PSP corresponde a impurezas no glucosídicas, cercano al valor restante 31,2 % indicado como "otros" en el gráfico de esta figura.

Si bien el método K-YBGL es el indicado para la determinación de glucanos de origen fúngico, también cuantifica, de estar presentes, a los glucanos β -1,3:1,4 provenientes de cereales (posiblemente provenientes de excipientes empleados en las formulaciones comerciales), ya que durante la hidrólisis ácida se solubilizan todos los tipos de β -glucanos (Megazyme, 2020). Por lo mencionado, su realización en simultáneo junto con el método K-BGLU permite evaluar la posible sobreestimación de glucanos β -1,3 y β -1,3:1,6 ante la presencia de glucanos β -1,3:1,4. El resultado del análisis de glucanos por el método enzimático-colorimétrico arrojó un contenido de 26,2 % p/p de glucanos totales para los polisacáridos no purificados de *G. sessile* E47. En relación con el porcentaje de polisacáridos determinado por gravimetría en GS PSNP (53,3 %), un 27,1 % correspondería entonces a polisacáridos compuestos por otros monosacáridos. Al remover impurezas y dializar, el porcentaje de glucanos asciende a 53,9 % p/p en GS PSP; este valor se encuentra cercano al porcentaje de glucosa determinado mediante GC-MS (52,5 %), lo cual valida el resultado obtenido. Respecto al análisis cuantitativo de β -glucanos, GS PSP arrojó un resultado de 44,8 % p/p en el ensayo K-YBGL, mientras que en el ensayo K-BGLU se obtuvo un resultado nulo, indicando que los β -glucanos de *G. sessile* E47 son del tipo de β -1,3 y β -1,3:1,6 (Tabla 17,

Figura 37). Si se considera la proporción de α : β glucanos según el método K-YBGL en GS PSP, y, por otro lado, la proporción de enlaces α : β glucosídicos estimada mediante RMN (considerando α -1,3, β -1,3 y β -1,6 glucanos), en ambos casos fue de 1:5, nuevamente validando los resultados obtenidos (Tablas 14 y 17).

4.4.2. Análisis de triterpenoides

Respecto al análisis de triterpenos, Huang *et al.* (2020) realizaron la clasificación químico-estructural de los triterpenoides de *Ganoderma* mediante la validación conjunta de las correlaciones HSQC y HMBC en la región sin *overlapping*. Así, analizando los triterpenoides de *G. lucidum*, *G. resinaceum* y *G. leucocontextum*, establecieron que en base a las correlaciones de los protones a campos bajos (mayores ppm) en HSQC y HMBC, estos compuestos pueden clasificarse en los grupos A-F (Tabla 18), contribuyendo con la diferenciación entre especies de *Ganoderma*.

Tabla 18. Correlaciones de los espectros de HSQC y HMBC que permiten clasificar a los triterpenoides de *Ganoderma* según Huang *et al.* (2020). En rojo se destacan aquellas que también fueron halladas en *G. sessile* E47 del presente estudio.

Grupo de triterpenoides	HSQC		HMBC	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
A	5,40-5,50	77,0-79,0	5,40-5,50	155,0-156,0
	5,20-5,30	125,0-126,0		
B	5,60-5,80	123,0-124,0	5,60-5,80	180,0-190,0
			5,60-5,80	203,0-212,0
C	6,70-6,80	143,0-144,0		
	1,80-1,83	12,0-13,0	1,80-1,83	129,0-130,0
			1,80-1,83	143,0-144,0
			1,80-1,83	171,0-173,0
D	6,20-6,50	120,0-130,0	6,20-6,50	200,0-203,0
E	2,00-2,30	-	2,00-2,30	170,0-173,0
	5,60-5,80	123,0-124,0	5,60-5,80	170,0-173,0

			5,60-5,80	193,0-197,0
F	4,30-4,50	77,0-80,0	4,30-4,50	200,0-203,0

Como característica notable, los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del extracto de triterpenoides del basidioma de *G. sessile* E47 no mostraron carbonilos de cetona a 200,0 ppm, por lo que las correlaciones de los grupos presentados por los autores no pudieron corroborarse. Solo se observaron carbonilos de grupo carboxílico o grupo éster, alrededor de 170,0 ppm. En relación a estos grupos se registró una señal de ^1H a 2,03 (s) unido a un carbono a 20,6 ppm, que correlaciona con un carbonilo a 169,9 o 170,1 ppm en el espectro HSQC (región de *overlapping*), indicando que se trata de un grupo éster, tal como se observa en los triterpenoides del grupo E. La presencia de una señal de protón ancha a 11,06 ppm podría corresponder al OH del grupo carboxílico (Figura 38 y Anexo 3, Figura 6). En el Anexo 3, Figura 7 se presenta la posible estructura de la cadena principal y los fragmentos identificados de GSPS a partir de los resultados obtenidos.

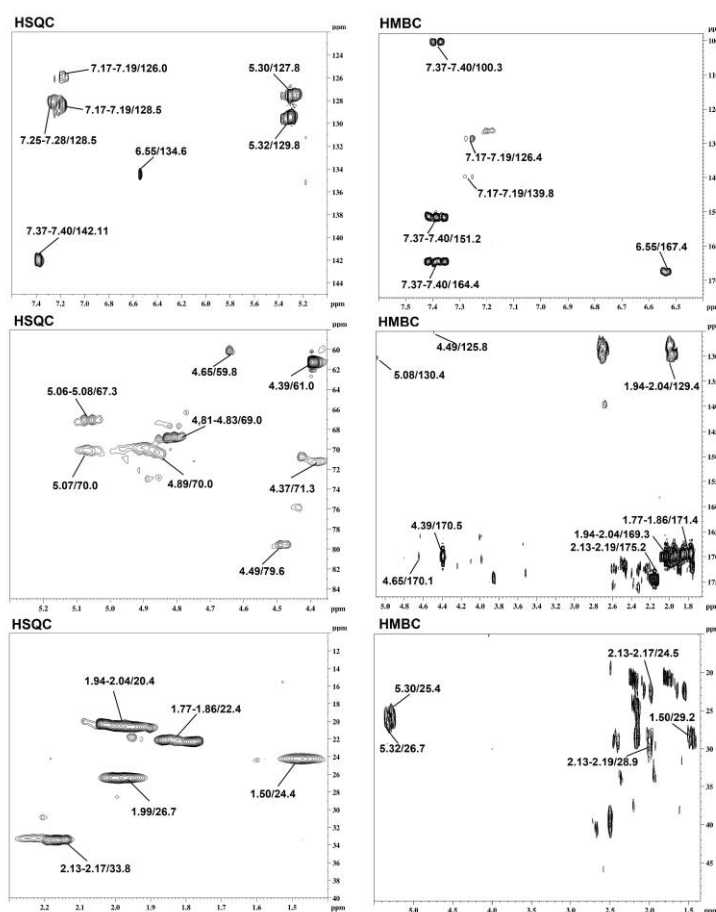
También se observaron carbonos olefínicos, aunque solo a dos de ellos pudo asignárseles una señal de protón: 5,30 y 5,32 ppm. Por la cercanía en desplazamiento químico de estas señales podría sospecharse de dos compuestos de similar estructura. Estos protones, no obstante, correlacionaron con carbonos a 25,4 y 26,7 ppm, respectivamente, en el espectro HMBC, no observándose las correlaciones con carbonos entre 50 y 80 ppm presentes en los triterpenoides del grupo A (Huang *et al.* 2020), de modo que no puede asegurarse la presencia de grupos vecinos como el hidroxilo en posición 15. Resultó notable la existencia de carbonos entre 90-100 ppm. Típicamente, podría esperarse en esta región la presencia de carbonos anoméricos de azúcares, aunque también se han observado ácidos ganodéricos altamente oxidados con grupos acetónidos como el Ganodermacetal (Yang *et al.*, 2012). Sin embargo, estos carbonos son cuaternarios, a diferencia de los observados en *G. sessile* E47, que se encuentran unidos a protones a 4,27, 4,89 y 5,45 ppm (Anexo 3, Figura 8).

También se observaron señales en la región de protones aromáticos, alrededor de 7,00 ppm. Estas señales podrían corresponderse con protones olefínicos en la cadena lateral, aunque en esta región

puede haber solapamiento con señales de protones aromáticos de compuestos fenólicos, que podrían estar presentes en la muestra (Öztürk *et al.*, 2015). La ausencia de grupos cetona e hidroxilos, como la presencia de grupos éster podrían indicar la presencia de ciertos triterpenoides como el ácido lanosta-7,9(11),24-trien3b,15a,22-triacetoxi-26-oico, presente en *G. amboinense* y *G. lucidum* (Shiao *et al.*, 1988; Yang *et al.*, 2012). Sin embargo, los autores no presentaron la identificación de las especies estudiadas.

Los resultados permitieron establecer que los ácidos ganodéricos hallados más frecuentes en especies reconocidas de *Ganoderma* no se encontrarían en la muestra analizada, o al menos no serían mayoritarios. La RMN y, en particular, el análisis de espectros 2D, resultó ser un método apropiado para establecer comparaciones entre grupos de triterpenoides. La validación de la técnica químico-analítica debería incluir una identificación molecular de la especie, así como la elucidación estructural completa incluyendo la asignación de la configuración absoluta (R-S, alfa-beta), la cual puede estimarse mediante NOESY-ROESY y cristalografía de Rayos X.

Figura 38. Espectros HSQC y HMBC en tres regiones, con sus correlaciones asignadas, del extracto de triterpenoides obtenido de basidiomas de *G. sessile* E47. Los espectros completos se presentan en el Anexo 3, Figura 9.



4.5. Conclusión

G. sessile E47 produjo en cultivo líquido, con medio de cultivo MYG suplementado con caldo de semilla de girasol, un heteropolisacárido complejo, con un contenido de carbohidratos del 71 % sobre peso seco, formado por cuatro fracciones, con una composición del 26,2 % p/p de glucano total, del cual 21,3 % p/p corresponde a β -glucano y 4,9 % p/p a α -glucano. La distribución de pesos moleculares de sus fracciones resultó ser de entre 32 y 154 kDa, y la composición de monosacáridos fue la siguiente: glucosa (52,5 %), galactosa (15,9 %), manosa (13,5 %), arabinosa (10,8 %), ramnosa (6,7 %) y ribosa (0,6 %). El patrón de enlace más probable, definido a partir del análisis del polisacárido completo y de sus fracciones, fue definido de la siguiente manera: 1,3-1,6- β -D-glucopiranososa, con una frecuencia de enlaces β -1,6-Glup de 1 cada 2 enlaces β -1,3-Glcp, con unidades de 1,6- α -D-glucopiranososa, α/β -D-galactopiranososa unida mediante enlaces 1,4, unidades de 1,2- α -L-ramnopiranososa y de 1,6- α -D-manopiranososa. La arabinosa y la galactosa se unirían formando un 1,4- α/β -D-1,5- α -L-galactarabinano. Estos polisacáridos son diferentes a los reportados para *G. lucidum*, analizado en este estudio y en comparación con bibliografía. Más aún, el análisis químico de las especies de macromicetes debería siempre complementarse con una correcta identificación de la especie, además de definir el método de extracción y la estructura fúngica de origen. La confirmación de la estructura propuesta debería realizarse mediante ensayos como el análisis de metilación. Este estudio demostró, además, la utilidad de la espectroscopia de RMN, especialmente el análisis de espectros 2D, en la comparación de grupos de triterpenoides. Sin embargo, para una identificación precisa, se sugiere la complementación con técnicas como NOESY-ROESY y cristalografía de rayos X.



5. Capítulo 4

Evaluación de la potencia biológica

*“I consider food as a kind of fuel or as preventive medicine...
And food is fuel for the largest chemical plant in the world.
And it is inside of each of us.”*

**Professor Oluf Borbye Pedersen
ReD Dialogue, ReD Associates**

5.1. Introducción

Los basidiomicetos contienen una variedad de compuestos biológicamente activos, tanto de alto como de bajo peso molecular, que participan en diversas vías de señalización relacionadas con la proliferación tumoral, la regulación de la apoptosis, el metabolismo del cáncer, la angiogénesis, la metástasis y funciones inmunológicas clave (Blagodatski *et al.*, 2018); estos compuestos se hallan presentes tanto en esporocarpo como en esporas, micelio y caldo de cultivo (Wasser, 2017, Jeitler *et al.*, 2020). Ciertos autores han observado que el espectro completo de ingredientes activos, conocido como sinergia, es lo que hace que un basidiomiceto sea medicinal (Liu *et al.*, 2002; Veljović *et al.*, 2017; Plácido *et al.*, 2022). Otros plantean que la combinación de especies de basidiomicetos puede crear una actividad única que no se obtendría con una sola (Mallard *et al.*, 2019); es así que han aparecido en el mercado diversos *blends* de hongos con diferentes propósitos (Chilton, 2017). Al mismo tiempo, el mercado de nutraceuticos ha incorporado en el último tiempo una amplia variedad de productos a base de hongos medicinales, muchos de los cuales contienen compuestos bioactivos y nutrientes aislados (Rathee *et al.*, 2012).

5.1.1. *Ganoderma* en el estado de salud y de enfermedad

El uso de *G. lucidum*, entre varias especies de hongos de la Medicina Tradicional China (MTC), se ha validado por el desarrollo de diversos productos probados en modelos *in vivo*, incluyendo ratones, ratas, conejos y perros (Meneses *et al.*, 2023). Sus propiedades antioxidantes y ergogénicas (Chang y Miles, 2004; Chang y Wasser, 2012) han sido evaluadas en ensayos clínicos. Uno de ellos estudió el efecto del extracto acuoso encapsulado del basidioma de *G. lucidum* sobre el subconjunto de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en jugadores de fútbol masculino que practican ejercicio en altura, teniendo en cuenta que estas células pueden verse afectadas significativamente ante el estímulo simultáneo de actividad física y exposición a la hipoxia. Durante un periodo de estudio de 6 semanas, los autores hallaron que la ingestión de *G. lucidum* podría ayudar a mejorar la variación de la relación CD4⁺/CD8⁺ en el entrenamiento en altitud, sugiriendo que serían los polisacáridos los principales componentes activos responsables de la

función inmune mediada por células (Zhang *et al.*, 2008). Además, un ensayo clínico aleatorizado y doble ciego demostró que el consumo durante 6 semanas de polvo de *G. lucidum* (MundoReishi) mejora significativamente la condición física en mujeres con fibromialgia al aumentar la resistencia aeróbica (Mateo *et al.*, 2015). Si bien los autores concluyen que *G. lucidum* podría ser un suplemento útil para mejorar la condición física en estas poblaciones, las dosis requeridas (entre 5 y 6 g diarios en varias tomas) son elevadas. Otro estudio reportó la mejora de la resistencia al ejercicio en siete ciclistas varones sanos después de la suplementación con extracto de *G. lucidum* (1.2 g por día) (Rossi *et al.*, 2014). Además, se halló que la capacidad de eliminación de radicales libres en el suero de los atletas se incrementa luego de tres meses de suplementación, indicador de protección ante el estrés oxidativo. Sin embargo, al haberse combinado el tratamiento con *Cordyceps sinensis* no puede asegurarse que el efecto se deba únicamente a *G. lucidum*.

En un estudio de intervención cruzado en 10 voluntarios sanos, se estudiaron los efectos de la suplementación a corto plazo (10 días) con una preparación comercial de cápsulas de Lingzhi sobre los biomarcadores del estado antioxidante, el riesgo de enfermedad coronaria y el daño al ADN. Se administró una dosis única (1,1 g), seguida del consumo de 0,72 g día⁻¹. También se evaluó la respuesta aguda (3 horas) ante una dosis mayor (3,3 g). Los resultados mostraron que la ingesta de Lingzhi provoca un aumento significativo en la capacidad antioxidante del plasma, con una respuesta máxima a los 90 minutos (Wachtel-Galor *et al.*, 2004a). Un *spin-off* de este estudio investigó los efectos de esa misma preparación, adicionando el análisis del estado inmunológico y de la inflamación (n=18). Si bien en esa ocasión la capacidad antioxidante aumentó, no se encontraron cambios significativos (Wachtel-Galor *et al.*, 2004b).

Otras propiedades medicinales atribuidas a *G. lucidum* son la inmunomoduladora, anticancerígena, antihipertensiva, antiinflamatoria, antiviral y cardio y nefroprotectora (Sheena *et al.*, 2005). En un estudio en 14 pacientes nefróticos con glomeruloesclerosis focal y segmentaria, proteinuria persistente y en tratamiento con prednisolona y/o ciclofosfamida o vasodilatadores, el tratamiento con extracto de *G. lucidum* disminuyó el daño renal suprimiendo la citotoxicidad de las células endoteliales y la proteinuria, y restableciendo el equilibrio inmunocirculatorio en todos

los casos (Futrakul *et al.*, 2004). Chu *et al.* (2012) monitorizaron el peso corporal, la presión arterial, parámetros metabólicos, catecolaminas, cortisol en orina, el estado antioxidante y los subconjuntos de linfocitos en 26 pacientes con hipertensión y/o dislipidemia dentro de un ensayo cruzado, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, luego de consumir 1,44 g de Lingzhi en cápsulas al día durante 12 semanas. Los autores reportaron que el hongo fue bien tolerado y, si bien no se observaron cambios significativos en varias de las variables, este tratamiento disminuyó la resistencia a la insulina; así, podría tener efectos antidiabéticos leves y mejoradores de la dislipidemia, como se demostró anteriormente en algunos estudios con animales.¹⁵

Una revisión sistemática que evaluó mediante búsquedas en un amplio conjunto de bases de datos los beneficios reales de *G. lucidum* en el tratamiento del cáncer no encontró evidencia suficiente para justificar el uso de *G. lucidum* como tratamiento de primera línea para esta enfermedad. Sin embargo, concluyó que podría administrarse como complemento del tratamiento convencional, dada su capacidad para potenciar la respuesta antitumoral y estimular la inmunidad, principalmente mediante el aumento de las proporciones de CD3, CD4 y CD8 (Jin *et al.*, 2016). Otro meta-análisis, realizado mediante una búsqueda sistemática en siete bases de datos de ensayos controlados aleatorizados hasta mayo de 2019, concluyó que los productos a base de *G. lucidum* podrían aumentar la sobrevida y la calidad de vida en pacientes con cáncer, con efectos secundarios mínimos. Los autores destacan la necesidad de realizar nuevos ensayos controlados aleatorios de alta calidad, que incluyan muestras de mayor tamaño, de diferentes continentes, sobre diversos tipos y estadios de cáncer a fin de evaluar a fondo los efectos de estos productos (Zhong *et al.*, 2019). En particular, un estudio piloto en 48 pacientes con cáncer de mama y fatiga

¹⁵ El efecto antiviral de *G. lucidum* también ha sido evaluado clínicamente. No obstante, estos ensayos utilizaron un *blend* de extractos de hongos, por lo que, nuevamente, los efectos podrían no deberse solo a *G. lucidum*. Uno de estos estudios reporta que la combinación de *T. versicolor* y *G. lucidum* (400 mg de polvo de basidioma por día durante 2 meses) aumenta la eficacia de la eliminación del VPH oral (serotipos 16 o 18), siendo una terapia eficaz para prevenir las recurrencias de infecciones por herpes simple y reducir el riesgo de desarrollar carcinoma oral (Donatini, 2014). Otro, halló que la administración diaria de 2,2 g de un extracto acuoso de *G. lucidum* y 5 hierbas a pacientes que padecían herpes genital y labial reducía el tiempo necesario para obtener alivio de los síntomas (Hijikata *et al.*, 2007).

relacionada con la enfermedad que recibieron terapia endocrina, incluido en este último meta-análisis, sugiere que el polvo de las esporas de *G. lucidum* puede tener efectos beneficiosos sobre la fatiga y la calidad de vida, sin provocar efectos adversos significativos (Zhao *et al.*, 2012). Por otro lado, Deng *et al.* (2021) hallaron en un estudio prospectivo en 120 pacientes con cáncer de mama y pulmón que la combinación de una proporción alta de albúmina/globulina y una proporción baja de neutrófilos/linfocitos podría predecir el beneficio inmunológico del tratamiento con polvo de esporas *G. lucidum* en pacientes posoperatorios con estos tipos de cánceres, relacionado con la supervivencia libre de progresión y la supervivencia general.

5.1.2. Polisacáridos de *Ganoderma* en el mantenimiento de la salud

Los polisacáridos activos de *G. lucidum* se encuentran mayoritariamente en la forma de β -glucanos, capaces de inducir la respuesta inmune innata y adaptativa. Mientras que los triterpenos, también conocidos como ácidos ganodéricos, han sido asociados a la actividad citotóxica directa de *G. lucidum* contra una amplia variedad de líneas celulares cancerígenas (Jin *et al.*, 2016), los polisacáridos estarían implicados en esta actividad mediante mecanismos indirectos; así, tendrían un efecto inmunomodulador vía inhibición de la ADN-polimerasa, inhibición de la modificación postranslacional de la oncoproteína Ras, o mediante la inducción de anticuerpos hacia epítopos tumorales (Li *et al.*, 2018). Según reportes, los polisacáridos de *Ganoderma* ejercen funciones inmunomoduladoras únicas relacionadas a la activación de la respuesta inmune. Además de unirse a receptores de dectina-1, a TLR o MR en fagocitos mononucleares y células presentadoras de antígenos, también median sus efectos a través de CR3 de granulocitos, neutrófilos y células NK. Más aún, pueden activar directamente células inmunes como los linfocitos (LT, LB y NK) y los neutrófilos, a la vez que suprimen la exacerbación de la respuesta inmune causada por los ciertos estímulos (Ren *et al.*, 2021). Se cree que los polisacáridos de *G. lucidum* desencadenan un mecanismo antitumoral indirecto, en el que se altera el sistema inmunológico del hospedador para atacar a las células tumorales (Hong *et al.*, 2004). En particular, las ramificaciones de las cadenas de los betaglucanos actúan sobre el receptor del complemento tipo 3 (CR-3), interviniendo sobre

una serie de mediadores de señalización molecular¹⁶ (Hong *et al.*, 2004). El reconocimiento de los betaglucanos sobre el receptor de dectina-1 y el TLR-2 desencadena una mayor maduración de las células dendríticas (CD) y un aumento de la fagocitosis (Brown, 2006; Gantner *et al.*, 2003). Posteriormente, su acción incrementa la producción de citoquinas y la citotoxicidad de las células NK esplénicas (Chan *et al.*, 2007). Todos estos refuerzos inmunológicos contribuirían a las propiedades antitumorales de *G. lucidum* (Jin *et al.*, 2016; Sliva, 2003).

Se ha demostrado que la administración oral de polisacáridos de *G. lucidum* puede promover la inmunomodulación y la actividad antitumoral. Dado alto peso molecular, y al tratarse de macromoléculas no absorbibles en su estado “nativo”, es de esperarse que estos estén implicados en la regulación de la respuesta inmune a nivel local en la mucosa entérica (H. Zhao *et al.*, 2010). La mucosa del intestino delgado humano constituye la primera barrera contra las infecciones, juega un papel importante en la regulación de la homeostasis de los ambientes interno y externo (Kagnoff, 1996), y se encuentra densamente poblada por linfocitos y otras células que forman el “sistema inmune mucoso”. Este sistema presenta cierta autonomía y difiere en varios aspectos del sistema inmune periférico. De hecho, en estudios en *in vivo* en ratones se ha reportado que el efecto inmunomodulador de los PS de *G. lucidum* se debe principalmente a la regulación de la respuesta inmune de la mucosa intestinal, actuando sobre las linfocitos intraepiteliales y placas de Peyer (H. Zhao *et al.*, 2010). Además, estos actuarían regulando la composición de la microbiota y manteniendo la integridad de la barrera intestinal (Chang *et al.*, 2015). Según ensayos de fermentación *in vitro* los PS del basidioma de *G. lucidum* tendrían efecto prebiótico, al ser utilizados por la microbiota fecal humana como fuente de energía y promover significativamente el crecimiento de *Bacteroidetes* (en particular de las bacterias comensales *Bacteroides ovatus* y *B. uniformis*) y *Firmicutes*, y la producción de metabolitos antiinflamatorios (Yang *et al.*, 2022). Del mismo modo, Jin *et al.* (2017) reportaron que los PS extraídos del micelio de *G. lucidum* pueden mejorar la función de barrera mecánica intestinal al regular positivamente

¹⁶ como el NF-κB, la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y la proteína quinasa C (PKC) que, a su vez, activan la respuesta del sistema inmunológico para la proliferación de células inmunes

la expresión de ocludina y la disminuir la permeabilidad intestinal, además de regular las funciones de la barrera inmunológica¹⁷; aún más, podrían modular las funciones de la barrera biológica intestinal aumentando la abundancia de microbiota, disminuyendo la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* e induciendo cambios en bacterias intestinales específicas.

Respecto a la evaluación en humanos, se llevó a cabo un ensayo clínico multicéntrico, aleatorizado, doble ciego y con placebo para evaluar la eficacia y seguridad del producto comercial Ganopoly®, con 25 % de PS crudos del basidioma de *G. lucidum*, en pacientes con cáncer de pulmón avanzado. El tratamiento consistió el consumo durante 12 semanas de 1,8 g al día de Ganopoly o de placebo. Los investigadores concluyeron que el producto comercial podría ser utilizado como coadyuvante en el tratamiento de ese tipo de cáncer (Gao *et al.*, 2003)¹⁸, en línea con lo propuesto por Jin *et al.* (2016) para *G. lucidum* en la terapia anticancerígena. Por otro lado, al comparar el efecto sobre la proliferación y el metabolismo de los microorganismos intestinales entre el extracto acuoso y alcohólico de esporas de *G. lucidum*, ricos en PS y triterpenoides, respectivamente, se demostró que el primero posee efectos promotores del metabolismo más fuertes y mejores propiedades antiinflamatorias (Cai *et al.*, 2021).

Otras aplicaciones terapéuticas fueron también evaluadas clínicamente. Así, el tratamiento con Ganopoly durante 8 semanas resultó significativamente superior al placebo en la mejoría clínica de los síntomas de la neurastenia, patología caracterizada por un síndrome de fatiga crónica. Por otro lado, Sargowo *et al.* (2018) hallaron que el consumo durante 90 días de un péptido polisacárido de *G. lucidum* (750 mg día⁻¹, equivalente a 180 mg de β-D-glucano) es un potente antioxidante contra la patogénesis de la aterosclerosis en pacientes de alto riesgo y con angina estable. Si bien los efectos benéficos de los PS de *Ganoderma* a través de la modulación de la microbiota y de la integridad intestinal han sido evaluados en numerosos modelos animales de

¹⁷ Mediante el aumento de la expresión de NF-κB e Inmunoglobulina A (IgA) secretoria en el íleon, y los niveles de séricos de IFN-γ, IL-2 e IL-4.

¹⁸ La administración de Ganopoly resultó en un aumento significativo ($p < 0,05$) de la reactividad mitogénica de los linfocitos a la concanavalina A, el porcentaje de CD3 y la actividad de células NK, parámetros permanecieron sin cambios o incluso disminuyeron en el grupo de control.

salud y enfermedad (Chang *et al.*, 2015; Ding *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2021; Jin *et al.*, 2019; Luo *et al.*, 2018; Meneses *et al.*, 2023; F. Ren *et al.*, 2021; Sang *et al.*, 2021; Yao *et al.*, 2021), esta propiedad medicinal no ha sido aún estudiada en ensayos clínicos.

5.1.3. Seguridad del consumo de productos a base de *Ganoderma*

G. lucidum y varias especies relacionadas son, sin dudas, fuentes prometedoras de nuevos alimentos funcionales, nutraceuticos e incluso fármacos. Los estudios de toxicidad aguda, toxicidad subcrónica y tests genéticos realizados sobre diversos compuestos (β -glucanos, polisacáridos, péptidos polisacáridos, triterpenos) y productos (extractos de micelio, basidiomas o esporas) de *G. lucidum* no han demostrado toxicidad ni efectos adversos (Chen *et al.*, 2011; Chiu *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 1986; Smina *et al.*, 2011; Wihastuti *et al.*, 2016, 2015, 2014), han provocado efectos secundarios insignificantes o baja toxicidad en dosis experimentales extremadamente altas¹⁹ (Gill y Rieder, 2008; Meneses *et al.*, 2023). En los ensayos antes mencionados de Wachtel-Galor *et al.* (2004a, 2004b) no se observó evidencia de toxicidad hepática, renal o sobre el ADN en pacientes sanos hasta por 4 semanas de consumo de Lingzhi. Otro ensayo clínico controlado evaluó la seguridad y tolerancia de la administración oral de cápsulas de extracto de *G. lucidum* en 16 voluntarios sanos, que recibieron 2 g del extracto o placebo dos veces al día durante 10 días consecutivos; como resultado, no se observaron efectos adversos después de la ingesta del extracto en comparación con el grupo placebo (Wicks *et al.*, 2007). Asimismo, en el meta-análisis realizado por Jin *et al.* (2016) se señala la buena tolerancia de *G. lucidum* en pacientes con cáncer de pulmón, con eventos adversos menores que ocurren solo esporádicamente; además, no se observó toxicidad significativa en todos los estudios analizados. No obstante, si bien se han determinado y recomendado dosis y formas de dosificación eficaces para el consumo humano, no se han llevado a cabo aún estudios exhaustivos de vigilancia postcomercialización (Meneses *et al.*, 2023).

¹⁹ Como DL₅₀ 38,3 g kg⁻¹.

Choi y Sa (2000) reportaron el aislamiento de una metaloproteasa del micelio de *G. lucidum* con actividad anticoagulante y capaz de hidrolizar la fibrina y el fibrinógeno humanos, que podría aplicarse clínicamente en la fibrinólisis. Estudios posteriores *in vivo* e *in vitro* sugirieron que la actividad antitrombótica de esta proteasa se debería a la inhibición de la agregación plaquetaria más que al efecto anticoagulante (Kumaran *et al.*, 2011). Varias investigaciones han demostrado que *G. lucidum* puede comprometer la hemostasia. Se ha reportado una sospecha de interacción entre un extracto de *G. lucidum* consumido durante la terapia con warfarina en un paciente hemodializado (Manno y Montinaro, 2020). Asimismo, otras especies de *Ganoderma*, como *G. japonicum*, potencian los efectos de la warfarina por mecanismos heterogéneos, por lo que no deben utilizarse en pacientes en tratamiento con anticoagulantes orales y/o antiagregantes plaquetarios, alertando a la comunidad científica sobre los efectos adversos causados por la interacción entre la medicina herbaria y la terapia convencional (Argento *et al.*, 2000).

Por otro lado, se reportó un caso de hepatotoxicidad en una paciente que había comenzado a tomar una formulación en polvo de *G. lucidum* cuatro semanas antes de desarrollar síntomas. Se concluyó que la toxicidad hepática fue probablemente debido al efecto tóxico de la formulación en polvo, ya que los parámetros hepáticos mejoraron tras suspender el producto, y la biopsia hepática fue compatible con daño inducido por fármacos (Yuen *et al.*, 2004). En otro reporte de caso, un paciente de 19 años sin tratamiento medicamentoso previo, diagnosticado con lesión hepática colestásica, refiere la ingestión durante un año de café premezclado con extracto de *G. lucidum* como energizante y para perder peso. Ante la ausencia de hepatotoxinas concomitantes, junto con la mejora progresiva después de discontinuar la ingesta del agente causante, se atribuyó la causa de la hepatotoxicidad a la ingestión prolongada de Lingzhi (Tay *et al.*, 2022). También se informó un caso de hepatitis fulminante en una mujer de 47 años con esquizofrenia, bajo tratamiento crónico con litio, perfenazina y trihexifenidilo. Durante varios años había consumido una decocción de Lingzhi sin efectos adversos, pero dos meses antes del incidente comenzó a ingerir polvo de Lingzhi (una cápsula de 400 mg de extracto por día (Wanmuang *et al.*, 2007).

La hepatotoxicidad, tanto en las lesiones hepáticas inducidas por fármacos (LHIF) como en las inducidas por hierbas (LHIH), puede ocurrir de dos modos: de forma intrínseca (relacionada con el fármaco o hierba) e idiosincrásica (por interacción entre el fármaco o hierba y los factores del paciente). El mecanismo intrínseco es más predecible, con un efecto directo dependiente de la dosis en horas o días. Las reacciones idiosincrásicas son independientes de la dosis, impredecibles, con un inicio variable de días a meses (Roth y Ganey, 2010). Aunque los mecanismos de daño hepático son similares en ambos tipos de lesiones, en las LHIH el comportamiento es más variable debido a la falta de consistencia en dosis y a la posible contaminación durante la preparación del producto (Tay *et al.*, 2022). Es probable que, en algunos casos, la toxicidad hepática se deba a ingredientes adicionales en la formulación en polvo, común en hierbas medicinales (Yuen *et al.*, 2004). No puede descartarse una LHIH ya que al consumo prolongado puede dar lugar a una dosis acumulada elevada (Tay *et al.*, 2022). El consumo concomitante de sustancias que inducen a las enzimas del citocromo P450 puede aumentar sinérgicamente la producción de metabolitos tóxicos derivados del polvo de Lingzhi. En el caso de la hepatitis fulminante, la ingesta prolongada podría provocar lesiones repetitivas de las células hepáticas y, posteriormente, una necrosis zonal extensa (Wanmuang *et al.*, 2007).

La actividad hepatotóxica del polvo de Reishi debe ser monitoreada, ya que la preparación en polvo continúa ganando popularidad por su facilidad de consumo en comparación con las preparaciones mediante ebullición prolongada (Wanmuang *et al.*, 2007). Por otro lado, las creencias culturales y el conocimiento de lo que puede o no ser una hepatotoxina lleva, en muchos casos, a que los pacientes omitan mencionar el consumo de este tipo de productos ante la aparición de un evento adverso. Además, *G. lucidum* goza de buena reputación por su efecto hepatoprotector, aunque no existe evidencia científica concluyente en humanos. En términos generales, ante la ausencia de un biomarcador específico, es necesario realizar investigaciones que evalúen la exposición a diversos medicamentos y productos herbales (Tay *et al.*, 2022).

Seguridad del consumo de polisacáridos de *Ganoderma*. Ko y Lin (2004) evaluaron los niveles de β -1,3-glucanos en 17 productos de seis grupos de alimentos, como cereales, legumbres,

tubérculos, verduras, frutas y setas. Como resultado, se observó que este tipo de glucanos se hayan presentes en niveles significativos de forma natural en varios alimentos, incluyendo los hongos comestibles como el Shiitake, Maitake (*Grifola frondosa*), *Sparassis crispa* y variedades de *Tremella fuciformis*. Al estudiar la digestión y fermentación gastrointestinal *in vitro* de PS del basidioma de *Ganoderma atrum* se observó una disminución del peso molecular, sin que ocurra liberación de monosacáridos durante el período estudiado. Los autores concluyeron que el PS no es degradado completamente en el tracto digestivo superior, y puede así descomponerse y utilizarse en el intestino grueso (Ding *et al.*, 2017). Por otro lado, se ha señalado que la disminución del Mw luego de la digestión puede deberse a la destrucción de aglomerados más que a la alteración de los enlaces glicosídicos (Cai *et al.*, 2021). En conjunto, la evidencia indicaría que estos PS no ingresan (al menos en su forma nativa) a la circulación sistémica, y que, además, conservan mínimamente su estructura primaria al llegar al intestino grueso. La FDA, por su parte, ha señalado que existe suficiente evidencia científica cuali y cuantitativa, para determinar la seguridad del uso de los β -glucanos de hongos, basándose en toda la información disponible, como estudios de toxicidad en animales, en humanos e *in vitro* (Food and Drug Administration, 2009). Se ha sugerido que, en un sentido amplio, la seguridad de los PS de los macromicetes depende de su origen, del método de extracción y de su pureza (Zhao *et al.*, 2023).

En un estudio de toxicidad oral en ratas, luego de la administración por 30 días de PS del basidioma de *G. lucidum* no se reportaron síntomas clínicos anormales, muertes, ni diferencias significativas en el peso corporal y la tasa de ingesta de alimentos. Tampoco se encontraron diferencias significativas en valores clínicos ni se observó mutagenicidad (J. Zhang *et al.*, 2016). Por otro lado, en un estudio de toxicidad subcrónica en ratas del β -glucano de *G. lucidum* (Immulink MBG), la administración oral diaria (por sonda forzada) del PS en niveles de hasta 2000 mg Kg⁻¹ día⁻¹ durante 13 semanas no se asoció con signos de toxicidad (Chen *et al.*, 2011). Se ha sugerido un nivel sin efectos adversos observados (NOAEL) de 2000 mg de glucanos de hongos por Kg de peso corporal por día, y una ingesta diaria estimada, para los usos previstos, de 678,4 mg por persona por día (16,4 mg Kg de peso corporal⁻¹ día⁻¹). De este modo, la ingesta

estimada es más de 120 veces menor que el NOAEL, y, si se ingiere diariamente durante toda la vida, se considera segura (Food and Drug Administration, 2011).

Respecto a la evaluación en humanos, en un ensayo clínico realizado para evaluar la eficacia y seguridad del producto comercial Ganopoly® en 34 pacientes con cáncer de pulmón avanzado, se administraron 600 mg de Ganopoly (conteniendo un 25 % de polisacáridos crudos) tres veces al día durante 12 semanas; como resultado, se observaron tres episodios de toxicidad leve (dos casos de náuseas y uno de insomnio) en el grupo tratamiento, mientras que se observó un episodio de vómitos en el grupo control (Gao *et al.*, 2003). Por otro lado, Immulink MBG, un 1-3,1-6- β -D-glucano derivado del micelio de *G. lucidum*, fue patentado y reconocido como seguro (GRN 413) con la recomendación de una cantidad de 150 mg de β -glucanos por toma según lo dispuesto por la FDA (Food and Drug Administration, 2011).

5.1.4. Otros componentes bioactivos de Ganoderma

Los triterpenoides de *G. lucidum*, como los ácidos ganodéricos (GA), tienen similitud estructural con las hormonas esteroideas y exhiben un amplio espectro de propiedades anticancerígenas. Zhao *et al.* (2018) reportaron que estos compuestos podrían suprimir la proliferación celular, inducir el arresto de ciclo celular y la apoptosis, inhibir la angiogénesis y la invasión cancerígena, y estimular la inmunidad mediante vías de señalización trasduccional relacionadas. Se ha sugerido que muchos de estos triterpenoides contrarrestan la metástasis (Min *et al.*, 2000). Además de los triterpenos totales extraídos de *G. lucidum*, algunos triterpenos aislados y modificados exhiben importantes actividades citotóxicas, y estudios preclínicos recientes han identificado los mecanismos moleculares por los cuales actúan sobre diferentes tipos de cáncer (Cheng y Sliva, 2015). Una investigación demostró que un extracto enriquecido con ganoderiol A, extraído de *G. lucidum*, inhibe la migración y la adhesión de células de cáncer de mama altamente metastásicas a dosis no tóxicas (Wu *et al.*, 2013). Smina *et al.* (2011), por su parte, reportaron que la fracción total de triterpenos aislada de *G. lucidum* posee un potente poder antioxidante *in vitro* e *in vivo*, efectivo para eliminar la mayoría de los radicales libres. Los autores destacan la capacidad de

estos compuestos de eliminar superóxidos, y así prevenir la formación adicional de radicales altamente reactivos y tóxicos para los orgánulos y las membranas celulares.

Los estudios de toxicidad oral aguda y subaguda sobre los triterpenos totales no hallaron síntomas de toxicidad, cambio de comportamiento ni mortalidad de los animales en todas las dosis probadas, ni cambios significativos en los parámetros hematológicos y bioquímicos en comparación con el grupo control, respectivamente (Smina *et al.*, 2011). En un estudio farmacocinético de los triterpenos presentes en un extracto de *G. lucidum*, dos GA fueron detectados en el plasma luego de varios minutos después de la administración oral en voluntarios varones. Estos mostraron una rápida absorción en el tracto gastrointestinal ($T_{\max} \approx 30$ min), y una vida media de eliminación corta (<40 min). Se determinó, además, una baja biodisponibilidad oral, posiblemente debido a su extenso metabolismo de primer paso hepático y a la conversión parcial en metabolitos por parte de las bacterias intestinales (Teekachunhatean *et al.*, 2012).

Por otro lado, se han purificado varios péptidos bioactivos de *Ganoderma*, incluyendo Ling Zhi-8 (LZ-8)²⁰ y la lectina de *Ganoderma capense* (GCL)²¹ (Wong *et al.*, 2014). Ling Zhi-8 (LZ-8), derivado de *G. lucidum*, demostró actividad inmunosupresora *in vitro* en un cultivo mixto de linfocitos humanos. Además, se observó que posee un efecto significativo sobre la inmunidad celular, al retrasar el proceso de rechazo de aloinjertos. Esta proteína ha mostrado menor nefrotoxicidad que otras sustancias inmunosupresoras como la ciclosporina A (van der Hem *et al.*, 1995). GCL, por su parte, posee una secuencia N-terminal con una ligera similitud con una lectina de *G. lucidum* y con proteínas inmunomoduladoras fúngicas de *Flammulina velutipes* y *Volvariella volvacea* (Huang *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 1989). Se ha sugerido que los péptidos de *G. lucidum* son sus principales componentes antioxidantes, siendo más eficaces en la eliminación de radicales hidroxilos que las fracciones de PS y de proteínas con un Mw más alto (Sułkowska-Ziaja *et al.*, 2023). Estos péptidos podrían desempeñar un papel importante en la

²⁰ Polipéptido de 12 kDa, compuesto por 110 residuos de aminoácidos, con un extremo amino acetilado y capacidades inmunomoduladoras.

²¹ 18 kDa.

inhibición de la peroxidación lipídica por a sus efectos antioxidantes, quelantes de metales y eliminadores de radicales libres (Sun *et al.*, 2004). Varias proteínas y péptidos aislados de productos naturales han sido aislados y caracterizados, pero sólo unos pocos están disponibles como productos farmacéuticos, y son de administración parenteral.

5.1.5. La microbiota. Idea de holobiontes

La idea de simbiosis, en la que distintas especies conviven íntima y colaborativamente, se remonta al siglo XIX. Inicialmente, existía una lista finita de simbioses, que ha crecido hasta tal punto que, actualmente, se sabe que casi todos los organismos multicelulares, e incluso algunos unicelulares, poseen simbioses. El término holobionte, que originalmente refería a una entidad biológica simple que involucraba un hospedador y un único simbionte heredado, fue luego ampliado para definir a un hospedador y sus comunidades de microorganismos asociadas, también llamada microbiota; esta última incluye desde interacciones mutualistas hasta parasitarias. Un hospedador y su microbiota constituyen así un holobionte (Simon *et al.*, 2019). A partir de este concepto, y de su implicancia en diferentes disciplinas, la biología está atravesando un cambio de paradigma, donde los fenotipos individuales se consideran el resultado de la expresión conjunta del genoma del hospedador y de los genomas microbianos asociados (Bordenstein y Theis, 2015; Simon *et al.*, 2019), es decir, del hologenoma (Lloyd-Price *et al.*, 2016; Zilber-Rosenberg y Rosenberg, 2008; The Human Microbiome Project Consortium, 2012). El concepto de holobiontes ha generado debate. Para algunos, deben considerarse como unidades de selección estables, superorganismos dentro de los cuales existen interacciones entre los miembros que lo componen, como la cooperación y el mutualismo (Bordenstein y Theis, 2015). Una teoría opuesta establece que los holobiontes son entidades bastante inestables, donde las interacciones son determinadas por el antagonismo, el mutualismo y el azar (Douglas y Werren, 2016; Foster *et al.*, 2017; Moran y Sloan, 2015). Una postura consensuada establece que los

rápidos cambios genómicos en la microbiota facilitan la adaptación de los holobiontes a condiciones ambientales cambiantes (Rosenberg and Zilber-Rosenberg, 2018).²²

En el ser humano, los microorganismos (incluyendo bacterias, virus, hongos, arqueas y protozoos) representan aproximadamente el 57 % de las células del cuerpo. La mayoría de ellos viven en el intestino y representan solo entre el 1 % y el 3 % de nuestra masa corporal, a pesar de hallarse en una cantidad cernada a 37 billones (Lloyd-Price *et al.*, 2016). En particular, el genoma humano contiene alrededor de 20000 genes, aunque si se considera su hologenoma, el número asciende a 33 millones (Simon *et al.*, 2019). La microbiota ha ganado reconocimiento por su relevante papel en la salud del hospedador, y una aplicación importante se relaciona con la prevención y el tratamiento de enfermedades mediante la restauración de sus alteraciones. Además, se ha abordado la importancia del mantenimiento del equilibrio hospedador-microbiota, y de cómo su perturbación puede llevar a estados de enfermedad (van de Guchte *et al.*, 2018).

Microbiota y salud. La microbiota intestinal constituye un ecosistema complejo en constante interacción recíproca con los sistemas inmunológico, neuroendocrino y neuronal del hospedador. En un sentido más amplio, múltiples factores afectan la composición del microbioma intestinal (esto es, el conjunto formado por los microorganismos, sus genes y sus metabolitos en un nicho ecológico dado) y las modificaciones sobre esos factores pueden conducir a cambios funcionales significativos en los sistemas implicados y provocar enfermedades (Ochoa-Repáraz *et al.*, 2020). La disbiosis de una comunidad microbiana puede considerarse como una perturbación que provoca una desviación del equilibrio ecosistémico (Petersen y Round, 2014), de modo que se prolonga, exacerba o induce un efecto perjudicial para la salud (Lloyd-Price *et al.*, 2016). Se han propuesto mecanismos desencadenantes de la disbiosis intestinal en relación con el desbalance inmunitario. Ante la presencia de patógenos en la luz intestinal las CD capturan los antígenos a través de células epiteliales, que luego son procesados y presentados a las células T,

²² De hecho, interacciones estrechas y persistentes posibilitan el intercambio de material genético (Sitaraman, 2018).

desencadenando su activación. Los LT activados estimulan la secreción de citocinas por las células epiteliales, lo que a su vez aumenta la producción de péptidos antimicrobianos. Junto con las CD, las células T también pueden activar a los LB, transformándolas en células plasmáticas productoras de IgA, lo que proporciona mayor resistencia contra la invasión de patógenos. Sin embargo, si las células inmunes continúan activándose o los patógenos estimulando el sistema inmunológico el funcionamiento de las células reguladoras puede verse suprimido, lo que lleva a una inflamación crónica y al desarrollo de enfermedades metabólicas, de enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y tumores (Zhao *et al.*, 2023).

Entre los factores que afectan la estructura de la comunidad microbiana se encuentran la genética del hospedador, la dieta, la ocurrencia de infecciones y las intervenciones médicas (como el consumo de antibióticos). En un sentido más amplio, se ha sugerido que la disbiosis ocurre, en primer lugar, ante la alteración de la estructura de la microbiota y, posteriormente, de la relación coevolutiva entre el sistema inmunológico y los simbiontes albergados (Petersen y Round, 2014)²³. En el microbioma intestinal, la disbiosis puede provocar un aumento de la permeabilidad intestinal (un "intestino permeable"), de los lipopolisacáridos (LPS) y de moléculas proinflamatorias. Se han documentado alteraciones en la función de la barrera intestinal en trastornos inflamatorios o ulcerosos como el síndrome del intestino irritable, la enfermedad celíaca o alergias alimentarias. Además, la disbiosis se ha observado en condiciones patológicas que van desde la obesidad hasta el autismo, donde no necesariamente hay cambios metabólicos en las funciones de la mucosa intestinal (Camilleri, 2019; Maruvada *et al.*, 2017). Si bien se ha visto que ciertos nutrientes, prebióticos e incluso extractos de plantas mejoran la función de barrera de esta mucosa, no existen aún tratamientos farmacológicos validados, ni se ha demostrado el impacto de restaurar esa función en la mejora de enfermedades gastrointestinales locales o sistémicas (Camilleri, 2019).

²³ La disbiosis ha categorizado en tres tipos: la pérdida de organismos microbianos beneficiosos, la expansión de patobiontes o de microorganismos potencialmente dañinos, y la pérdida de la diversidad microbiana.

La dieta juega un papel fundamental en la composición de la microbiota colónica, ya que la mayoría de los microorganismos comensales obtienen energía degradando compuestos dietéticos complejos, especialmente fibra dietaria. Esta ha sido la base o durante mucho tiempo de intervenciones nutricionales por sus numerosos beneficios para la salud, especialmente en la disbiosis. El término "fibra" abarca una amplia gama de compuestos químicamente variables, desde oligosacáridos relativamente simples hasta moléculas complejas con alto peso molecular y enlaces químicos específicos. Las propiedades fisicoquímicas y químicas de las diferentes fibras dietéticas varían considerablemente según su origen y su procesamiento, lo que influye en sus características funcionales y su utilidad clínica (Hamaker y Tuncil, 2014; Kok *et al.*, 2023).

En los últimos años, se han realizado numerosos ensayos controlados aleatorizados que utilizan cultivos y/o técnicas microbiológicas moleculares para evaluar el efecto de las intervenciones con fibra dietética en la microbiota intestinal de adultos sanos (So *et al.*, 2018)²⁴. En conjunto, las observaciones sugieren que los beneficios de su consumo probablemente estén mediados por grupos microbianos específicos (Kok *et al.*, 2023). Sin embargo, a menudo los resultados suelen ser inconsistentes debido a errores de procedimiento o en la toma inicial de los datos del individuo (So *et al.*, 2018), o a la falta de estandarización sobre la naturaleza química de las fibras empleadas, por lo que las recomendaciones actuales de fibra dietética son frecuentemente limitadas y en ocasiones contradictorias, a la vez que no indican tipos específicos y dosis de estos nutrientes en el tratamiento de trastornos gastrointestinales. Además, varios estudios han demostrado que estas intervenciones son efectivas solo en un subconjunto de personas (Kovatcheva-Datchary *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2020), posiblemente por la complejidad e individualidad del microbioma intestinal, así como a la ausencia de taxones clave o genes funcionales en los individuos no respondedores (Maldonado-Gómez *et al.*, 2016; Ze *et al.*, 2012). Todo esto sugiere la necesidad de intervenciones dietarias personalizadas, ya sea a nivel individual o para poblaciones definidas (Kok *et al.*, 2023).

²⁴ Las dosis evaluadas varían entre 1,2 g día⁻¹ y 50 g día⁻¹, y los períodos de tratamiento van desde varios días hasta meses.

Clasificación de la microbiota intestinal. La composición de la microbiota intestinal varía significativamente entre individuos en tiempo y espacio. Con el auge de las investigaciones sobre la microbiota comenzó a debatirse si la variación interindividual se manifiesta como un continuo de diferentes composiciones comunitarias, o si la microbiota intestinal individual se congrega preferentemente alrededor de ciertas composiciones comunitarias, equilibradas y estables que permiten su clasificación en todo el mundo. Frente a este interrogante, Arumugam *et al.* (2011) propusieron el concepto de enterotipo, luego de analizar muestras de diferentes poblaciones, secuenciadas utilizando tres tecnologías diferentes a partir del gen ARNr 16S, y descubrir que esas muestras podían dividirse en tres grupos claramente independientemente de la edad, género, origen cultural y geografía. Esa clasificación estableció tres enterotipos; el Enterotipo 1, con predominancia de *Bacteroides* y representantes de géneros microbianos con amplio poder sacarolítico, que obtienen energía principalmente de los carbohidratos y proteínas a través de la fermentación; el Enterotipo 2, enriquecido en *Prevotella*, con representantes capaces de degradar mucinas; y el Enterotipo 3, el más frecuente y enriquecido en *Ruminococcus*, con especies capaces de degradar mucinas y con abundancia de transportadores de membrana, principalmente de azúcares. De esta manera, se propuso que la variación de la microbiota intestinal generalmente es estratificada y no continua, lo que indica además la existencia de un número limitado y equilibrado de estados simbióticos entre microorganismos y hospedador, que podrían responder de manera diferente a la dieta y a la ingesta de medicamentos.²⁵

²⁵ En línea con esta investigación, se estudió el efecto durante 10 días de un cambio dietario basado en una dieta baja en grasas y proteínas animales y rica en fibras vegetales en individuos caracterizados por el enterotipo 1. Como resultado, se observó que, si bien se generaron cambios en la taxonomía y en la riqueza de la microbiota intestinal, no hubo modificación de enterotipo de 1 a 2 en ningún individuo durante el periodo del estudio, lo que demuestra indirectamente el fuerte impacto del tipo de alimentos y la resiliencia de la estructura de los enterotipos en el tiempo (Di Pierro, 2021). También se analizó la microbiota de seis regiones corporales en muestras de hombres y mujeres sanos de Rosario, Argentina, siendo el primer proyecto de estudio de la microbiota humana de poblaciones urbanas de ingresos medios en América del Sur (Carbonetto *et al.*, 2016). Si bien se hallaron diferencias entre las abundancias de los grupos microbianos más abundantes, se concluyó que la población de esa región pertenecería al enterotipo 1, al igual que el set de muestras estadounidenses con la que fue comparada (Carbonetto *et al.*, 2016; Peterson *et al.*, 2009).

Sin embargo, la clasificación de la microbiota en modelos con dos o tres enterotipos no es el único modelo posible, y en estudios posteriores algunos autores han optado por agruparla según un modelo con cuatro enterotipos, mientras que otros han afirmado la existencia de un gradiente de composición, sin la segregación de *clusters* evidentes (Costea *et al.*, 2017). Por otro lado, investigaciones adicionales demostraron que en el enterotipo 3 la dominancia no se centra en *Ruminococcus* sino que se extiende hacia todo el filo *Firmicutes* (Di Pierro, 2021). Frente a estas discrepancias se propone que la estabilidad es uno de los aspectos más relevantes cuando se habla del agrupamiento de la microbiota y/o de enterotipos. Una limitación importante observada en la mayoría de los estudios de enterotipos humanos es la falta de datos longitudinales, que impide describir aspectos de estabilidad intrínsecos. En línea con lo mencionado, las evaluaciones longitudinales realizadas durante al menos 6 meses han demostrado claramente que alrededor del 85 % de las muestras fecales no cambian en estructura ni enterotipo, y el aspecto de la fluidez parece afectar sólo al 15 % restante (Costea *et al.*, 2017; Di Pierro, 2021). A pesar del continuo debate sobre el concepto de enterotipos, éstos podrían convertirse en una herramienta para comprender mejor la predisposición de los individuos hacia determinadas patologías (Di Pierro, 2021).

Metabolismo bacteriano. Los humanos solo son capaces de digerir un pequeño grupo de carbohidratos de la dieta relativamente simples, como almidón, lactosa y sacarosa, mientras que la degradación de los carbohidratos complejos es llevada a cabo en gran medida por la microbiota intestinal (Grondin *et al.*, 2017; Kaoutari *et al.*, 2013), proceso que puede considerarse como de “cosecha energética”. Las condiciones en el colon son particularmente favorables para la fermentación de carbohidratos complejos debido al ambiente anaeróbico, a los largos tiempos de tránsito y el bajo pH, junto con el bajo potencial redox (Bedu-Ferrari *et al.*, 2022). La microbiota intestinal humana produce miles de enzimas complementarias con diversas especificidades, que les permite despolimerizar y fermentar carbohidratos, con una especialización orientada al metabolismo de los PS de la dieta (Desai *et al.*, 2016). La fermentación de los componentes de la fibra dietaria genera la producción de ácidos grasos de cadena corta o SCFA (*short chain fatty*

acids), aminos, amonio, gases y fenoles, e induce la liberación de energía y agua (Grondin *et al.*, 2017; Saura-Calixto, 2011). Los SCFA son el principal producto de la fermentación de los PS, que involucran diversas vías en el metagenoma intestinal (Figura 39).

En la degradación de carbohidratos complejos se encuentran implicadas un conjunto de proteínas y enzimas llamadas CAZimas o CAZymes (*carbohydrate-active enzymes*)²⁶ (Grondin *et al.*, 2017). Dos grupos de enzimas de este conjunto, clasificadas según la especificidad de sustrato, escinden los enlaces glicosídicos entre carbohidratos o entre un carbohidrato y un resto no-carbohidrato; están son las GH, mediante la inserción de una molécula de agua (hidrólisis), y las PL, mediante un mecanismo de eliminación. Así, un estudio sobre un microbioma intestinal humano recreado reveló que existen diferencias significativas en la capacidad de las bacterias intestinales para descomponer los PS vegetales en comparación con los glucanos de origen animal, ya que las familias de GH más representadas corresponden a enzimas que participan en la descomposición del almidón y otros glucanos de la pared celular vegetal. Cabe mencionar que para la degradación de glucanos de origen fúngico a la fecha solo se halló una familia de GH dentro del microbioma, y con baja representación (Kaoutari *et al.*, 2013).

El mecanismo de degradación de los glucanos que alcanzan la microbiota colónica comienza con la unión del PS a las proteínas de superficie de unión a glucanos y continúa con la degradación parcial de las moléculas unidas. Los oligosacáridos resultantes son luego incorporados al periplasma celular mediante transportadores de la membrana externa, donde se produce la despolimerización enzimática hasta monosacáridos. Posteriormente, los monómeros se importan al citoplasma celular a través de transportadores de la membrana interna para luego continuar el metabolismo *downstream* (Ndeh y Gilbert, 2018). Adicionalmente, la microbiota puede degradar otras fuentes de carbohidratos que no provengan de la dieta. La mucosa intestinal contiene dos capas, una poco adherente que sirve como hábitat para la microbiota, y otra interna estéril, estructura que en conjunto constituye la primera línea de defensa contra microbios comensales y

²⁶ Que incluye familias de glucósidos hidrolasas (GHs), glicosiltransferasas, polisacárido liasas (PLs), esterasas de carbohidratos (CEs), auxiliares redox y módulos no catalíticos de unión a carbohidratos.

patógenos invasores. Los principales filos de la microbiota colónica (principalmente reportado en especies del género *Bifidobacterium*) degradan las proteínas altamente glicosiladas presentes en la mucosa intestinal (mucinas), las cuales proporcionan una fuente de energía adicional o alternativa para la microbiota intestinal distal, en especial durante condiciones de ayuno prolongado (Kaoutari *et al.*, 2013; Ndeh y Gilbert, 2018). Este ha sido señalado como un proceso dinámico en individuos sanos, en el cual la hidrólisis de la capa más luminal es acompañada por la renovación de otra capa externa. No obstante, ciertas condiciones del entorno pueden favorecer que las bacterias buscadoras de mucina degraden la capa mucosa y desencadenen la infección de las células epiteliales subyacentes del tracto gastrointestinal. Existe evidencia de que un bajo contenido de fibra dietaria conduce a una presión selectiva que favorece a los microorganismos intestinales que no dependen de los carbohidratos ingeridos por el hospedador para obtener energía. Así, en modelos animales sometidos a una dieta baja en fibra se ha observado un cambio de la degradación de las fibras dietéticas hacia la degradación de las mucinas intestinales, lo que aumenta la probabilidad de colonización por parte de microorganismos patógenos u oportunistas. Por el contrario, los animales sometidos a una dieta alta en fibra presentaron una mayor actividad funcional de múltiples proteínas degradadoras de carbohidratos (Killinger *et al.*, 2022).

Como se mencionó anteriormente, los monómeros obtenidos de la fermentación anaeróbica de los polisacáridos de la dieta son luego convertidos principalmente en SCFA, ácidos carboxílicos con colas alifáticas de uno a seis carbonos, siendo el acetato (C2), propionato (C3) y butirato (C4) los más abundantes (Venegas *et al.*, 2019). Los SCFA ejercen múltiples efectos beneficiosos para la salud; entre ellos, representan una fuente importante de energía, particularmente en el colon (Bedu-Ferrari *et al.*, 2022) proporcionando aproximadamente el 10 % de las calorías diarias requeridas del humano. El butirato es el suministro energético preferido por los colonocitos en el ciclo de Krebs y en la vía de producción de cuerpos cetónicos (Roediger, 1980), y también mantiene la integridad de la barrera intestinal al promover la proliferación celular, la apoptosis, las uniones estrechas y la producción de moco (Morrison y Preston, 2016) (Figura 39). Una vez producidos en la luz intestinal, el acetato y el propionato son fácilmente absorbidos por la pared

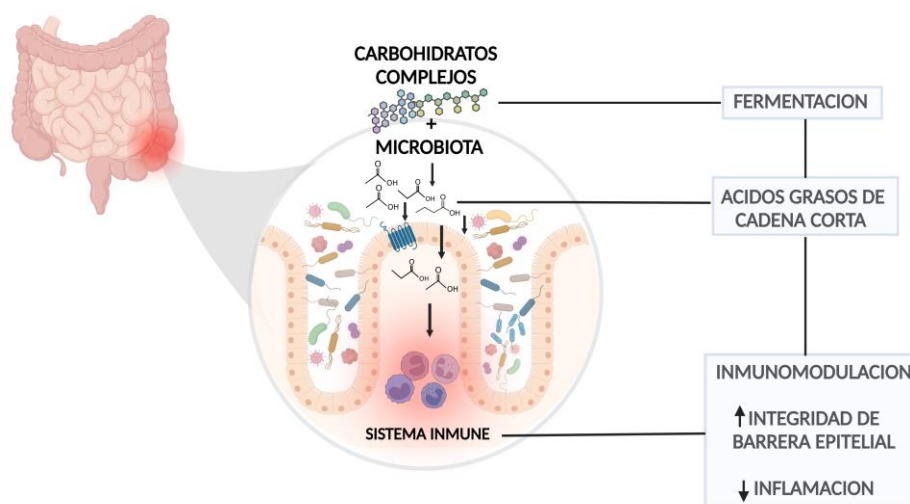
del colon y metabolizados preferentemente en el hígado, donde pueden incorporarse a vías de biosíntesis, como la del colesterol, la gluconeogénesis y la síntesis de ácidos grasos de cadena larga (Den Besten *et al.*, 2013). Estos metabolitos pueden trasladarse a otros órganos como el sistema nervioso central, donde pueden regular las respuestas inmunitarias. Así, la existencia de un "eje intestino-cerebro" sugiere que el microbioma posee un efecto sobre el comportamiento del hospedador, incluida la interacción mutua con los sistemas inmunológico y endocrino (Niccolai *et al.*, 2019b).

Los SCFA también actúan como moléculas de señalización, al ser reconocidos por receptores específicos del hospedador como los receptores acoplados a proteína G (GPRs)²⁷ (Brooks *et al.*, 2017). También, podrían desempeñar papeles cruciales en cada fase del proceso inflamatorio, regulando la función de casi todos los tipos de células inmunes (Russo *et al.*, 2019). Así, inhiben la expresión inducida por estímulos de moléculas de adhesión, la producción de quimiocinas y, en consecuencia, suprimen el reclutamiento de monocitos/macrófagos y neutrófilos. En particular, se ha demostrado que el butirato tiene un efecto antiinflamatorio tanto en las células inmunitarias como en las células epiteliales intestinales (CEI) (Martin-Gallausiaux *et al.*, 2018). Las funciones inmunomoduladoras más beneficiosas de los SCFA sobre el tracto gastrointestinal están mediadas por la activación directa de sus receptores GPRs (Brown *et al.*, 2003)²⁸. Los SCFA han mostrado además de efecto inhibidor de la neuroinflamación. Se ha observado que participan en la maduración de la microglía y que tendrían un efecto en la mantención de la integridad de la barrera hematoencefálica (Ochoa-Repáraz *et al.*, 2020).

Figura 39. Mecanismos directos e indirectos de los metabolitos bacterianos y su rol en el mantenimiento de la integridad intestinal. Creado con <https://www.biorender.com>.

²⁷ Algunos de esos receptores son expresados en células enteroendocrinas donde los SCFA activan una serie de efectos metabólicos, como la producción del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) y el péptido hormonal regulador del apetito.

²⁸ Tal como se ha visto en modelos animales, el receptor GPR109A, presente en macrófagos, CEI y células dendríticas, puede promover la diferenciación de linfocitos T reguladores a partir de la unión del butirato y la consecuente producción de IL-18 y de IL-10 (Singh *et al.*, 2014).



Síntesis de SCFA a partir de la degradación de los carbohidratos. La proporción molar de los SCFA (60:20:20, acetato:propionato:butirato) es relativamente constante tanto en el colon como en las heces (Den Besten *et al.*, 2013), aunque se ha señalado que el tipo y la suma de SCFA producidos dependen de la cantidad de sustrato disponible para la microbiota y de la composición de la microbiota misma (Nicholson *et al.*, 2012). Si bien la formación de butirato y propionato en el intestino deriva principalmente del metabolismo de los carbohidratos en la glucólisis también pueden originarse a partir del metabolismo de los ácidos orgánicos y de los aminoácidos (Den Besten *et al.*, 2013). El acetato es el SCFA más abundante tanto en la luz intestinal como en la circulación periférica; es producido a partir del acetil-CoA derivado de la glucólisis, y puede, además, transformarse en butirato mediante la enzima butiril-CoA: acetil-CoA transferasa (Venegas *et al.*, 2019) (Figura 40).

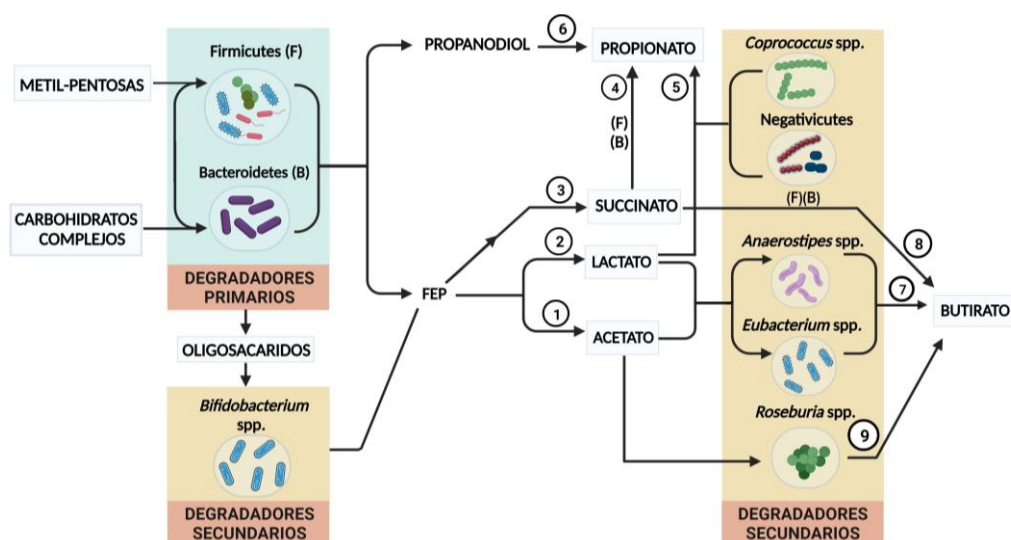
El término *loci* de utilización de polisacáridos (PULs) refiere a grupos de genes colocalizados y coregulados cuyos transcritos orquestan la detección, captura, digestión enzimática y transporte de carbohidratos complejos (Bjursell *et al.*, 2006; Martens *et al.*, 2011; White *et al.*, 2014). Los PULs codifican un conjunto de proteínas de unión a glicanos de la superficie celular, transportadores, CAZimas y sensores de carbohidratos/reguladores de la transcripción, cuya complejidad aumenta con la de sus sustratos afines, y que pueden incluir enzimas auxiliares como proteasas, sulfatasas y fosfatasas. La presencia de estos *loci* ha sido descrita en miembros del

filo *Bacteroidetes*, filo dominante de la microbiota intestinal humana junto a *Firmicutes*. Los PULs constituyen en los *Bacteroidetes* la principal estrategia de adquisición de nutrientes y, por lo tanto, están intrínsecamente vinculados a la colonización de nichos nutricionales y al establecimiento de ecosistemas microbianos (Grondin *et al.*, 2017).

Un degradador primario es una bacteria capaz de sensar y degradar un carbohidrato complejo gracias a una batería enzimática de la que carecen otras especies. Esta capacidad diferencial da como resultado interacciones de *cross-feeding*, donde los degradadores primarios generan poli u oligosacáridos que luego pueden ser fermentados por degradadores secundarios. Debido al alto grado de diversidad estructural entre los carbohidratos no digeribles, cada PS complejo puede tener varios degradadores primarios diferentes (Fernandez-Julia *et al.*, 2022; Kaoutari *et al.*, 2013). Varios autores han establecido a los *Bacteroidetes* como los principales degradadores primarios de numerosos PS complejos como el almidón resistente (Bedu-Ferrari *et al.*, 2022; Fernandez-Julia *et al.*, 2022; Kaoutari *et al.*, 2013), aunque otros estudios sobre salvado de trigo, almidón y mucina gástrica porcina sugieren que miembros del filo *Firmicutes* (como *Clostridium* spp., *Eubacterium rectale* y *Roseburia* spp.) serían los principales implicados en la digestión primaria de este tipo de carbohidratos (Leitch *et al.*, 2007; Ze *et al.*, 2012) . Por su parte, las especies de *Bifidobacterium* actúan generalmente en el metabolismo de oligosacáridos en lugar de PS complejos intactos (Fernandez-Julia *et al.*, 2022) (Figura 40).

Figura 40. Mecanismos de síntesis de SCFA a partir del metabolismo de los carbohidratos.

La descripción detallada de las rutas metabólicas representadas se halla en el Anexo 4, Detalle de Figura 40. **B:** *Bacteroidetes*; **F:** *Firmicutes*; **FEP:** fosfoenolpiruvato. Creado con <https://www.biorender.com>.



Modelos de estudio de la microbiota intestinal. La evaluación de la composición y de la diversidad microbiana intestinal, y su impacto en la digestión de los alimentos, se ha centrado en sus inicios en el análisis de muestras fecales, ya que estas se consideran representativas del intestino grueso distal. Sin embargo, estos estudios no han proporcionado información sobre el dinamismo o la funcionalidad de los procesos microbianos que ocurren *in situ*. Frente a esta limitante, los modelos de fermentación *in vitro* se consideran herramientas útiles para evaluar las interacciones entre sustancias, tales como los ingredientes de la dieta y las poblaciones microbianas en el entorno gastrointestinal (Verhoeckx *et al.*, 2015). Los modelos de fermentación *in vitro* varían desde incubaciones por lotes de microbiota fecal bajo condiciones anaeróbicas hasta modelos continuos más complejos que involucran uno o múltiples quimiostatos conectados e inoculados con microbiota fecal con control de pH, en representación de las diferentes secciones del colon humano (Venema y Van Den Abbeele, 2013; Verhoeckx *et al.*, 2015).

Los modelos de fermentación por lote resultan apropiados para evaluar la variabilidad interindividual en la respuesta, proporcionan una evaluación preliminar de los tipos de metabolitos microbianos producidos y ayudan a dilucidar las vías metabólicas implicadas. Entre sus limitaciones se encuentran las alteraciones en el lote por el agotamiento del sustrato y la acumulación de productos finales del metabolismo microbiano, siendo de poca relevancia en simulaciones que requieran largos tiempos de incubación. Por su parte, los modelos de

fermentación dinámica (SHIME[®], SIMGI) se han desarrollado con el propósito de establecer *in vitro* un ecosistema microbiano relativamente estable emulando las condiciones fisiológicas. Estos modelos son útiles para experimentos a largo plazo donde se busca evaluar la adaptación espacial y temporal como también el metabolismo de componentes de la dieta por parte de la microbiota colónica. Frente a los modelos por lote, presentan altos costos y requieren tiempos prolongados de estandarización del proceso (Verhoeckx *et al.*, 2015).

Recientemente, se ha desarrollado la simulación *ex vivo* de la fisiología y microbiología del colon Colon-on-a-plate[®] a fin de optimizar las simulaciones colónicas a corto plazo (hasta 48 h) utilizando volúmenes pequeños, al mismo tiempo que permite un amplio conjunto de lecturas, incluidos cambios relativos y absolutos en la composición de la comunidad microbiana hasta el nivel de subespecie, el impacto en las interacciones microbioma-célula del hospedador mediante ensayos secundarios en células humanas y las alteraciones en la producción de metabolitos. Los pequeños volúmenes de ensayo facilitan el mantenimiento de la anaerobiosis y la prueba de un gran número de individuos y/o condiciones de prueba, lo que permite tener en cuenta las diferencias interpersonales en términos de respuesta a un tratamiento (Perreau *et al.*, 2023).

La selección del modelo apropiado dependerá de los objetivos del estudio, considerando las ventajas y limitaciones de cada tipo de sistema. Sea cual fuere el modelo a emplear, la inoculación de los sistemas de fermentación *in vitro* representa un paso crucial que influye en la reproducibilidad de los estudios y constituye un desafío para los modelos (Payne *et al.*, 2012). La inoculación suele realizarse con una suspensión fecal líquida proveniente de un individuo o con un *pool* generado a partir de heces de varios sujetos. En el último caso, se requiere producir un inóculo estandarizado que sea representativo de la población a estudiar (Verhoeckx *et al.*, 2015).

Terapias basadas en el microbioma. Las terapias basadas en el microbioma están diseñadas para remodelar la composición de las comunidades microbianas residentes y las redes metabólicas implicadas, y así recuperar el estado de salud. No se limitan al uso de los propios microorganismos intestinales, sino que se extienden a identificar compuestos biológicos o moléculas pequeñas

derivados de microorganismos que puedan convertirse en tratamientos mediante métodos de desarrollo de fármacos convencionales. En términos generales, pueden clasificarse en probióticos, prebióticos, simbióticos, posbióticos, trasplante de microbiota fecal (TMF) y bioterapéuticos vivos (Alam *et al.*, 2023; OMG, 2023).

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas aportan beneficios para la salud del hospedador. Los lactobacilos, junto con especies de *Bifidobacterium*, han sido considerados históricamente como probióticos (Organización Mundial de Gastroenterología, 2023).²⁹ Con el desarrollo de métodos de cultivo de microorganismos y de secuenciación de genes se ha identificado un número cada vez mayor de microorganismos potencialmente beneficiosos para los humanos, conocidos como probióticos de próxima generación (NGP), entre los cuales se encuentran algunas especies de *Akkermansia*, *Bacteroides* y *Faecalibacterium* (Zhang *et al.*, 2023). Sin embargo, el término "probiótico" debería reservarse para los microorganismos vivos que han demostrado aportar un beneficio para la salud en estudios controlados realizados en humanos (OMG, 2023).

Los prebióticos, un concepto más reciente, son ingredientes alimentarios no digeribles ni absorbibles en el tracto gastrointestinal superior del hospedador que al ser fermentados selectivamente, producen cambios beneficiosos en la composición y/o actividad de la microbiota intestinal (Alam *et al.*, 2023; OMG, 2023). Los prebióticos actuales se basan predominantemente en carbohidratos, aunque otras sustancias ejercen también efectos prebióticos, como los ácidos grasos poliinsaturados y los polifenoles, (Sanders *et al.*, 2019). Los oligosacáridos no digeribles, como la inulina y sus productos de hidrólisis, la oligofructosa y los (trans)galactooligosacáridos son, tal vez, los más conocidos. Los prebióticos previenen el crecimiento de patógenos al aumentar los ácidos orgánicos intestinales, reduciendo así el pH luminal y favoreciendo la generación de una población estable de bacterias comensales que compiten por los nutrientes. Sin

²⁹ En 2020, el género *Lactobacillus* sufrió una importante reestructuración, definiéndose 23 nuevos géneros e incluyendo algunas especies probióticas bien estudiadas

embargo, la eficacia de la terapia prebiótica depende de la presencia de microbiota comensal beneficiosa, condición que puede no cumplirse durante estados de disbiosis (Alam *et al.*, 2023).

El concepto de simbiótico refiere a una mezcla de microorganismos vivos y uno o más sustratos utilizados selectivamente por los microbios comensales, y que confiere un beneficio para la salud del hospedador (OMG, 2023)³⁰. Los posbióticos, por su parte, son componentes solubles de las células microbianas o sus metabolitos derivados con potencial beneficio terapéuticos (Homayouni Rad *et al.*, 2021)³¹. Los SCFA y los ácidos biliares secundarios son dos ejemplos de posbióticos que están siendo probados activamente. A pesar de los efectos antiinflamatorios observados en ratones, los ensayos del efecto de los SCFA en la EII en humanos muestran resultados inconsistentes (Russo *et al.*, 2019). Por otro lado, las altas concentraciones fisiológicas de ácidos biliares secundarios impulsan la tumorigénesis colorrectal a través del estrés oxidativo y el daño del ADN en el epitelio (Alam *et al.*, 2023).

En la industria actual, los proyectos más avanzados son aquellos dirigidos a contrarrestar el crecimiento de *Clostridium difficile*, bacteria que puede infectar el intestino de manera oportunista tras el uso intensivo de antibióticos. Se ha demostrado que el TMF, en el que toda la microbiota intestinal de un donante sano se administra a un receptor enfermo, puede prevenir la recurrencia de la infección causada por este microorganismo.³² No obstante, el TMF es potencialmente difícil de escalar, por lo que muchas empresas están centrándose en el diseño de subconjuntos específicos de microorganismos intestinales representados de manera diferencial en la salud y la enfermedad (Eisenstein, 2022). Tanto los ensayos en animales como en humanos con TMF han demostrado tanto la viabilidad como también los potenciales peligros de utilizar un consorcio

³⁰ Existen dos tipos de simbióticos; los complementarios, son mezclas de probióticos y prebióticos en las que ambos cumplen los criterios definidos para cada uno, incluida su caracterización adecuada, y se utilizan a una dosis que proporciona un beneficio para la salud; los simbióticos sinérgicos son mezclas de microorganismos vivos seleccionados para utilizar un sustrato coadministrado y lograr un beneficio para la salud, sin que sea necesario que sus componentes cumplan de forma independiente los criterios de un probiótico o un prebiótico

³¹ Siguiendo la reciente definición de postbióticos de la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP), la investigación actual ha sugerido que las vesículas extracelulares derivadas de bacterias (bEV) pueden ser los posbióticos del futuro (Salminen *et al.*, 2021).

³² En septiembre de 2022 un comité asesor de la FDA votó a favor de aprobar Rebyota, un tratamiento basado en TMF para la infección recurrente por el patógeno gastrointestinal *C. difficile*.

bacteriano indefinido como terapia (DeFilipp *et al.*, 2019). Esta preocupación ha llevado a una lenta adopción del TMF “crudo” como práctica clínica estándar y a la búsqueda de formas más refinadas de aplicar estos trasplantes (Alam *et al.*, 2023).

A diferencia de los probióticos, los bioterapéuticos vivos (*live biotherapeutics*) consisten en una sola especie bacteriana o una combinación seleccionada de bacterias que pueden colonizar el intestino y que están diseñadas para proporcionar un beneficio clínico para una enfermedad particular (O’Toole *et al.*, 2017). A menudo, se identifican y aíslan de muestras fecales, y son considerados productos de las terapias basadas en el microbioma de “próxima generación” para el tratamiento de enfermedades causadas por *C. difficile* y la EII de forma más refinada que una mezcla heterogénea de trasplante fecal. Debido a la complejidad de las interacciones microbianas con el hospedador, identificar una combinación única o pequeña de especies bacterianas que transmitan efectos terapéuticos comparables al TMF resulta desafiante, aunque varios estudios demuestran que los bioterapéuticos vivos en desarrollo poseen la capacidad de tratar una amplia gama de enfermedades asociadas a la disbiosis y podrían usarse como una opción más segura que el TMF (Alam *et al.*, 2023)³³.

5.2. Objetivo e hipótesis

La comunidad científica ha señalado que el microbioma afecta los tratamientos farmacológicos³⁴; esta relación también podría ser bidireccional. Comprender la interacción entre los microorganismos y la medicina podría conducir a nuevas terapias o a cambios en la forma en que se prescriben los medicamentos existentes. Por ejemplo, podría ser posible predecir cómo responderá una persona a un medicamento en particular en función de sus bacterias intestinales,

³³ Como alternativa, algunas empresas están explorando enfoques basados en biología sintética para introducir nuevas cepas con propiedades funcionales, como cepas modificadas de *Escherichia coli* que expresan enzimas para tratar trastornos metabólicos como la fenilcetonuria. Sin embargo, este enfoque tiene limitaciones, ya que *E. coli*, aunque fácil de diseñar, puede inducir inflamación debido a marcadores en su superficie celular, además de que no se establece permanentemente en el intestino, sino que se dosifica como probióticos y luego es eliminada. Así, han surgido terapias basadas en bacterias intestinales nativas “de diseño”, incluyendo especies de *Bacteroides* (Eisenstein, 2022).

³⁴ Se ha postulado la hipótesis de que un fármaco puede desequilibrar los microorganismos de manera tal que se altere la ruta metabólica diana, o que ciertas cepas de bacterias vuelven a ciertos medicamentos menos efectivos.

recomendar cambios en la dieta o en el uso de antibióticos para hacer que el microbioma intestinal de una persona sea más receptivo a un fármaco (Winter, 2020). Esta interacción también se ha observado con la inmunoterapia, y conocer el microbioma intestinal podría ayudar a predecir la respuesta a este tipo de tratamiento (Zhang *et al.*, 2023).

Al ser las infusiones y suplementos dietarios a base de *Ganoderma* las formas más consumidas de este hongo, resulta de interés conocer los efectos de los polisacáridos de cepas *Ganoderma* spp. a nivel del tracto gastrointestinal y su implicancia en el efecto inmunomodulador local, como también su aprovechamiento diferencial por parte de la microbiota comensal. Con base en la evidencia presentada, se planteó como hipótesis que el conocimiento sobre la utilización de los polisacáridos de *Ganoderma* spp. por parte de la microbiota intestinal resulta útil para comprender sus efectos benéficos sobre la salud humana.

Dado que la especie más estudiada es *G. lucidum*, es necesario proporcionar datos biológicos para otras especies de *Ganoderma*. En este capítulo se evaluará el efecto de los polisacáridos de *G. sessile* E47, cepa destacada por su crecimiento diferencial en sustrato sólido y líquido, sobre la microbiota fecal de voluntarios sanos mediante fermentación *in vitro*. Los aportes en este campo contribuirán al desarrollo de alimentos funcionales destinados a modular la microbiota intestinal.

5.3. Materiales y métodos

5.3.1. Preparación de polisacáridos

Los exopolisacáridos de *G. sessile* E47 se extrajeron del cultivo líquido mediante la adición de 4 volúmenes de etanol al medio líquido y luego fueron liofilizados, tal como se describió anteriormente en el Capítulo 3 (Viceconte *et al.*, 2021). Los polisacáridos crudos fueron desengrasados en frío con acetona y luego se eliminaron las proteínas con igual volumen de ácido tricloroacético. El sobrenadante se concentró, dializó y luego liofilizó como fue también descrito anteriormente. Los polisacáridos de *G. lucidum*, utilizados como producto de referencia, se

extrajeron de cápsulas comerciales (PinpinRock) tal como fue indicado en el Anexo 3, Protocolo N°4.

5.3.2. Fermentación *in vitro*.

Los siguientes ensayos pudieron realizarse gracias a la colaboración de la Dra. María Gabriela Sica del Laboratorio de Bacteriología y Micología, UNS.

Recolección de muestras fecales. Los voluntarios fueron reclutados siguiendo los criterios de inclusión y exclusión establecidos en el protocolo aprobado por el Comité de Ética en Investigación con Seres Humanos del Hospital General Interzonal Dr. José Penna, acreditado bajo el N° 009/201, folio 45, Acta libro N° 1, con fecha 13/09/2019 (caducidad de matrícula y acreditación 30/08/2022). Los criterios de inclusión fueron los siguientes: edad ≥ 18 y < 65 , peso normal y sobrepeso ($18,5 \leq \text{IMC} < 30$), y los criterios de exclusión: obesidad ($\text{IMC} \geq 30$), bajo peso ($\text{IMC} < 18,5$), historia de enfermedad crónica o autoinmune, historia de desórdenes gastrointestinales, enfermedad aguda en la última semana, terapia con antibióticos en los últimos tres meses, hospitalización en los últimos tres meses, veganos, vegetarianos, personas bajo dietas especiales o consumo de fibra dietética, prebióticos, probióticos como suplementos, embarazo y lactancia. Cada voluntario recibió previamente una copia del consentimiento informado y una copia de las instrucciones para recolectar la muestra, junto con el recipiente de recolección. Entre las 7 y las 9:30 a.m. del mismo día, se recolectaron muestras fecales en un recipiente limpio. Los voluntarios entregaron al investigador el consentimiento informado firmado y el formulario del cuestionario completo. Las muestras fueron procesadas inmediatamente. Los individuos fueron nombrados por los acrónimos P02-P12. La muestra correspondiente al individuo P03 fue descartada por fallas en su procesamiento. La información asociada a cada individuo (edad, sexo, IMC) se resume en el Anexo 4, Tabla 1.

Fermentación. Los ensayos de fermentación *in vitro* de las muestras de materia fecal se realizaron en condiciones anaeróbicas tal como fue reportado por Zhou *et al.* (2018). Se trabajó en jarra de

anaerobiosis empleando sobres de anaerobiosis Anaerobic cultivation (AnaeroPack™) y azul de metileno como indicador de anaerobiosis. Como medio basal de crecimiento se utilizó el medio BMC descrito por Long *et al.* (2015) y preparado a partir de sus componentes: peptona 2 g L⁻¹, extracto de levadura 2 g L⁻¹, NaCl 0,1 g L⁻¹, K₂HPO₄ 40 mg L⁻¹, KH₂PO₄ 40 mg L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 10 mg L⁻¹, CaCl₂·6H₂O 10 mg L⁻¹, NaHCO₃ at 2 g L⁻¹, L-cisteína 0,5 g L⁻¹, sales biliares 0,5 g L⁻¹, vitamina K 10 mL L⁻¹, Tween 80 2 mL L⁻¹ y hemina 5 mg L⁻¹, pH 7,4, preparado a partir de sus componentes. La concentración final de polisacáridos en el medio fue de 10 mg mL⁻¹ (1 %) (Li *et al.*, 2015). Antes y después de 8 horas de fermentación con dichos polisacáridos, se tomaron muestras para la posterior extracción de ADN y análisis de metabolitos.

Análisis de SCFA. Diferentes estudios han documentado que en patologías humanas como la EII, el síndrome del intestino irritable, la diarrea y el cáncer colorrectal, existe una alteración en la composición de los SCFA, por lo que estos se han propuesto como biomarcadores de diagnóstico y de evaluación de la salud intestinal (Farup *et al.*, 2016; Niccolai *et al.*, 2019a). Además, la evaluación de los SCFA en muestras de materia fecal representa un método más rápido, fiable y económico que el análisis de la composición microbiana para evidenciar la presencia de una disbiosis intestinal, aportando además datos de los cambios funcionales de la microbiota (Niccolai *et al.*, 2019a). No obstante, la comparación bibliografía debe considerar la alta variabilidad en los protocolos y los métodos analíticos empleados (Primec *et al.*, 2017). Más aún, los ensayos que evalúen las proporciones de los SCFA en la salud y la enfermedad deberían considerar el tamaño muestral, ya que muestras pequeñas pueden llevar a resultados no concluyentes (Niccolai *et al.*, 2019a).

Los SCFA no ramificados (acetato, propionato, butirato, valerato) y ramificados (isobutirato, isovalerato) se determinaron en los sobrenadantes de las muestras mediante CG-EM previa derivatización con BSTFA (N,O-bis(trifluoroacetamida) para formar derivados trimetilsililados (TMS) (Zhang *et al.*, 2018). El procedimiento extractivo se presenta en el Anexo 4, Protocolo N°3. Como blanco se empleó el medio BMC. Las condiciones cromatográficas fueron las

siguientes: columna capilar HB-5ms (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm de espesor de película): temperatura del inyector: 260 °C, fuente de iones: 230 °C, cuadrupolo: 150 °C, interfaz: 280 °C; flujo de helio: 1 ml min⁻¹; volumen de inyección: 1 µL; *delay* del solvente: 2 minutos; relación *split* 10:1. El seteo de las condiciones de corrida fue el siguiente: temperatura inicial de la columna: 40 °C, manteniendo 2 minutos y luego aumentando hasta 150 °C a 15 °C min⁻¹; mantener 1 min, aumentar hasta 300 °C a 30 °C min⁻¹ y dejar 5 min. Para la cuantificación de los SCFA se aplicó el método del estándar externo empleando el reactivo Volatile Free Acid Mix (CRM46975, Supelco).

Extracción de ADN y secuenciación. El material genético fue extraído siguiendo el protocolo detallado en el Anexo 4, Protocolo N°2. Las muestras fueron sembradas en gel de agarosa al 1,5 % empleando marcador de peso molecular (*qL 100 pb precision*, PB-L[®]) y colorante fluorescente (GelRed[®])- El ADN fue cuantificado en NanoDrop (Thermo Scientific). Posteriormente, el material genético fue secuenciado en las instalaciones de ZIEL - Institute for Food & Health of the Technical University of Munich, Alemania. Se amplificaron las regiones V3/V4 de los genes ARNr 16S (25 ciclos en total) mediante una PCR de dos pasos utilizando los cebadores 341F y 785R (Klindworth *et al.*, 2013). Las bibliotecas de amplicones se secuenciaron en modo *paired-end* en secuenciador MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis del amplicón del gen ARNr 16S. Las lecturas de secuencia crudas se procesaron utilizando la plataforma IMNGS (*Integrated Microbial Next Generation Sequencing*), la cual se basa en el *pipeline* UPARSE (Lagkouvardos *et al.*, 2016). Se aplicaron las siguientes restricciones: número de *missmatches* permitidos en el *barcode* 1, mínimo puntaje de calidad de *fastq* para lecturas no apareadas 20, mínima longitud de lecturas simples o amplicones de secuencias apareadas superpuestas 300, máxima longitud de lecturas simples o amplicones de secuencias apareadas superpuestas 600, máxima tasa de errores esperados en secuencias apareadas 0,02, número máximo de *mismatches* permitidos durante la unión de lecturas 10, mínimo porcentaje de identidad del alineamiento durante la unión 80, longitud de corte en la

secuencia del lado *forward* 17, longitud de corte en la secuencia del lado *reverse* 21, mínima abundancia relativa de OTU (unidad taxonómica operativa) 0,0025. Se realizó el emparejamiento, el filtrado de calidad y la agrupación de OTUs (97 % de identidad) con USEARCH 8.0 (PMID:20709691) y el filtrado de secuencias quimera con UCHIME (PMID:21700674) (con *Ribosomal Database Project* set 15 como base de datos de referencia). Se removieron las secuencias no-16S con SortMeRNA v4.2 y SILVA 128 como referencia (PMID:23071270). El alineamiento de las secuencias y la clasificación taxonómica se realizó con SINA 1.6.1, usando la taxonomía de SILVA 128 (PMID: 22556368). Los posteriores análisis fueron realizados sobre los porcentajes normalizados de las lecturas (suma total de normalización a 10000 lecturas).

5.3.3. Análisis de datos y estadística. Cada control o tratamiento se realizó por triplicado, generando un total de 120 muestras para análisis de secuenciación y 120 para análisis de SCFA. Se llevó a cabo el análisis de correlación calculando el índice de Spearman y la prueba de Wilcoxon empleando Infostat 2020L. Los datos fueron posteriormente procesados con Namco (<https://exbio.wzw.tum.de/namco>) y GutMeta (<https://gutmeta.deepomics.org>) para la determinación de las medidas de diversidad. Los controles a tiempo cero fueron analizados para determinar los enterotipos según lo publicado por Yang *et al.* (2019) de la siguiente manera: se trabajó con la tabla de OTUs considerando la asignación taxonómica a nivel de género y se sumaron las OTUs pertenecientes al mismo género, calculándose luego la abundancia relativa de cada nivel. A partir de las tabas de OTUs, se obtuvieron las matrices de proximidad (disimilitud de Pearson) y se realizó el análisis de coordenadas principales empleando XLSTAT 2022.3.1.1324. El incremento de las OTUs (entre los tratamientos y los controles) se calculó de la siguiente manera: se obtuvo el cociente entre el promedio de las lecturas normalizadas de cada tratamiento y de cada control. Los incrementos entre tratamientos y controles se analizaron estadísticamente mediante la prueba de Wilcoxon. Sólo se consideró un aumento igual o mayor a 3 veces con un valor *p* de 0,1 o inferior. Como condición, se consideraron los casos en que el

incremento mínimo (3 x) fue observado respecto a ambos controles (0 y 8 h). El valor considerado fue el más bajo entre los incrementos respecto a los dos controles para una misma muestra.

5.3.4. Análisis del potencial metabólico

Para la predicción de funciones a partir de secuencias del marcador 16S se utilizó el *software* PICRUST2 (<https://github.com/picrust/picrust2>) (Douglas *et al.*, 2020), analizando las contribuciones bacterianas a los genes ortólogos (KO) de la Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto19 (KEGG) y a los Números de clasificación de enzimas (EC).

5.4. Resultados y discusión

5.4.1. Análisis de los perfiles taxonómicos basales

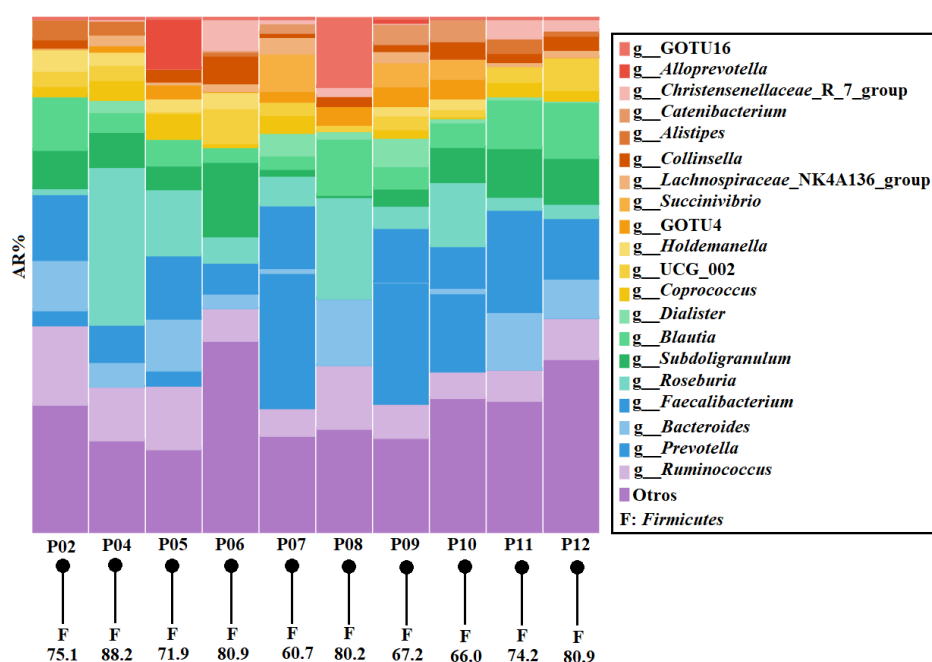
La Figura 41 muestra los perfiles taxonómicos basales de cada individuo correspondientes a las abundancias relativas de los géneros bacterianos hallados a tiempo cero. En base a lo establecido por Arumugam *et al.* (2011) y lo propuesto por Yang *et al.*, (2019), donde el enterotipo se define con base en la abundancia relativa de *Bacteroides* y *Prevotella*, 8 de los 10 individuos analizados pertenecerían claramente al Enterotipo 3. Por otra parte, los individuos P07 y P09 presentaron abundancias de *Prevotella* superiores al 20 %, lo que las posiciona en el Enterotipo 2 (Anexo 4, Tabla 2). Cabe destacar que, en todos los casos, más del 60 % de los géneros identificados correspondieron al filo *Firmicutes* (Figura 41). El término “otros” agrupa representantes hallados en baja proporción, incluyendo varios miembros de las familias *Eggerthellaceae*, *Muribaculaceae*, *Erysipelatoclostridiaceae*, *Lachnospiraceae* y *Oscillospiraceae*, de los órdenes *Lactobacillales* y *Clostridia*, y de los géneros *Bifidobacterium* y *Odoribacter*, entre otros.

Tal como ha sido estudiado, una alimentación rica en proteínas y grasas animales, característica de la dieta occidental, se ha asociado con el enterotipo 1 dominado por *Bacteroides*, mientras que una dieta rica en carbohidratos se ha relacionado con el enterotipo 2 dominado por *Prevotella* (Di Pierro, 2021). El enterotipo *Prevotella* está dominado por bacterias que utilizan fibra y que la

fermentan en SCFA. Se ha informado que los individuos con el enterotipo *Prevotella* tienen un nivel sérico más bajo de lipoproteínas de baja densidad, lo que se asocia con un menor riesgo cardiometabólico (Yang *et al.*, 2019). Según reportes, existe una propensión considerable en el enterotipo 3, en comparación con los enterotipos 1 y 2, a la proteólisis. Esta característica permite explicar, al menos en parte, la existencia de una fuerte correlación entre el *cluster Firmicutes* (dentro del cual se encuentran taxones atribuibles al enterotipo 3) y las enfermedades cardiovasculares de base ateromatosa (Vieira-Silva *et al.*, 2016); así, el enterotipo 3 es el que presenta, entre todos, mayor capacidad de generar catabolitos tóxicos a partir de la proteólisis, como los derivados del cresol y del indol. En este enterotipo se ha observado, además, una tasa baja de proliferación, lo que sugiere una menor sensibilidad a los antimicrobianos. (Di Pierro, 2021).

Como se ha mencionado en el apartado introductorio de este capítulo, los enterotipos descritos a partir del modelo original (*Bacteroides*, *Prevotella* y *Ruminococcus*) poseen ciertos parámetros característicos como la estabilidad y la resiliencia. No obstante, se ha propuesto que ciertos factores de selección pueden ocasionar transiciones fenotípicas en los modelos propuestos. Por ejemplo, el uso masivo de antibióticos, por la capacidad de seleccionar patrones bacterianos con una proliferación más lenta, sumado a un estilo de vida con condiciones estresantes y a una falta cada vez más evidente de fibras en la dieta, podría haber generado una transición del enterotipo 1 al enterotipo 3 (Di Pierro, 2021).

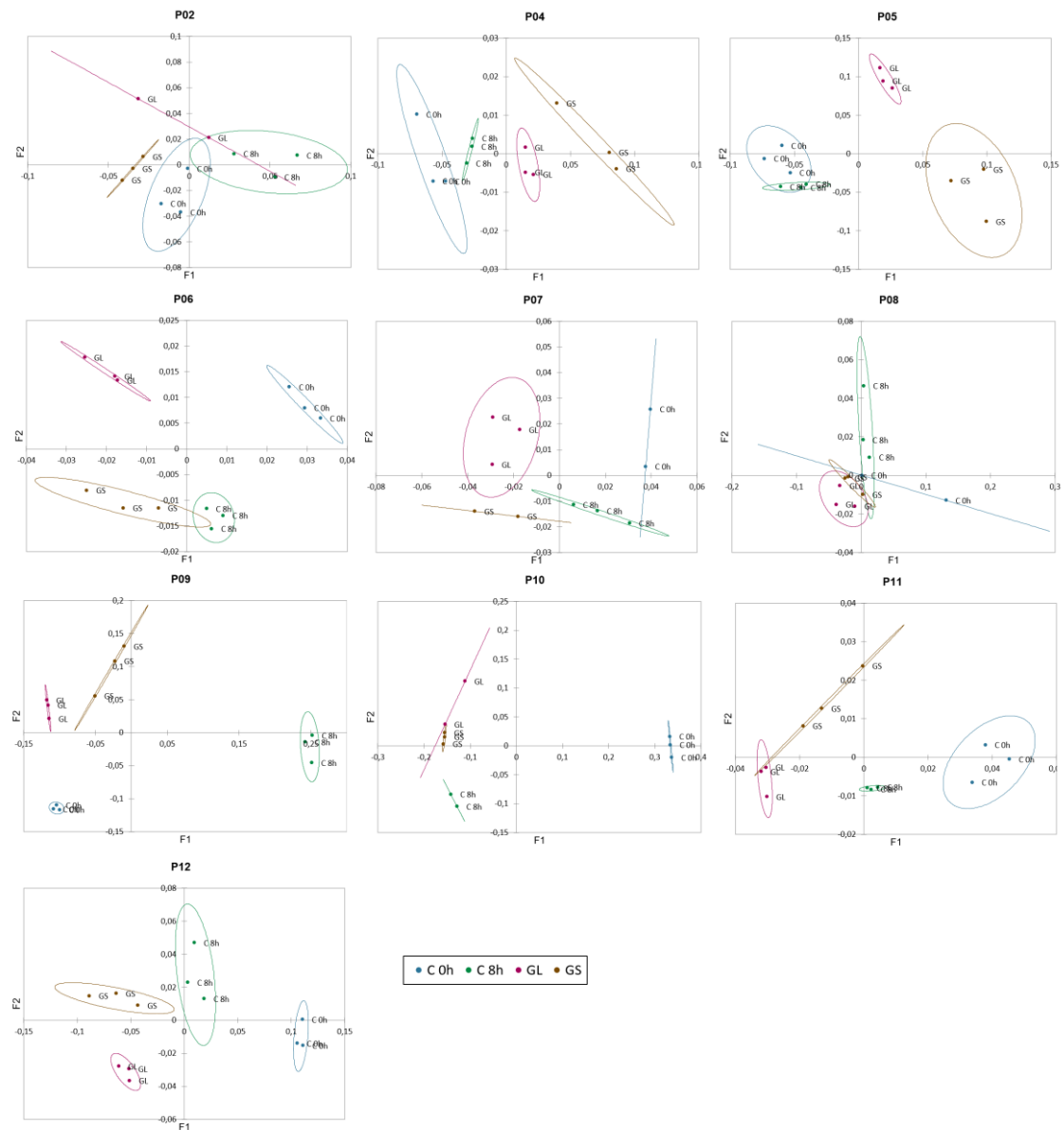
Figura 41. Perfiles taxonómicos basales. Abundancia relativa (%) de los géneros bacterianos hallados en cada individuo correspondientes a los controles a tiempo cero.



5.4.2. Efecto de los polisacáridos en el consorcio bacteriano

Los geles de las 120 muestras secuenciadas se presentan en el Anexo 4, Figura 1. 115 muestras cumplieron los criterios de calidad para continuar con los análisis, conservándose al menos un duplicado de cada control o tratamiento. Debido a la gran variabilidad interindividual, se analizó cada set de muestras correspondiente a cada individuo por separado. De esta manera, el análisis de coordenadas principales (ACoP) mostró la clara separación de cuatro grupos (ambos controles y tratamientos) en nueve de los diez individuos. En P08, la separación entre ambos controles y entre ambos tratamientos, respectivamente, fue menos evidente, aunque sí se evidenció en controles versus tratamientos (Figura 42).

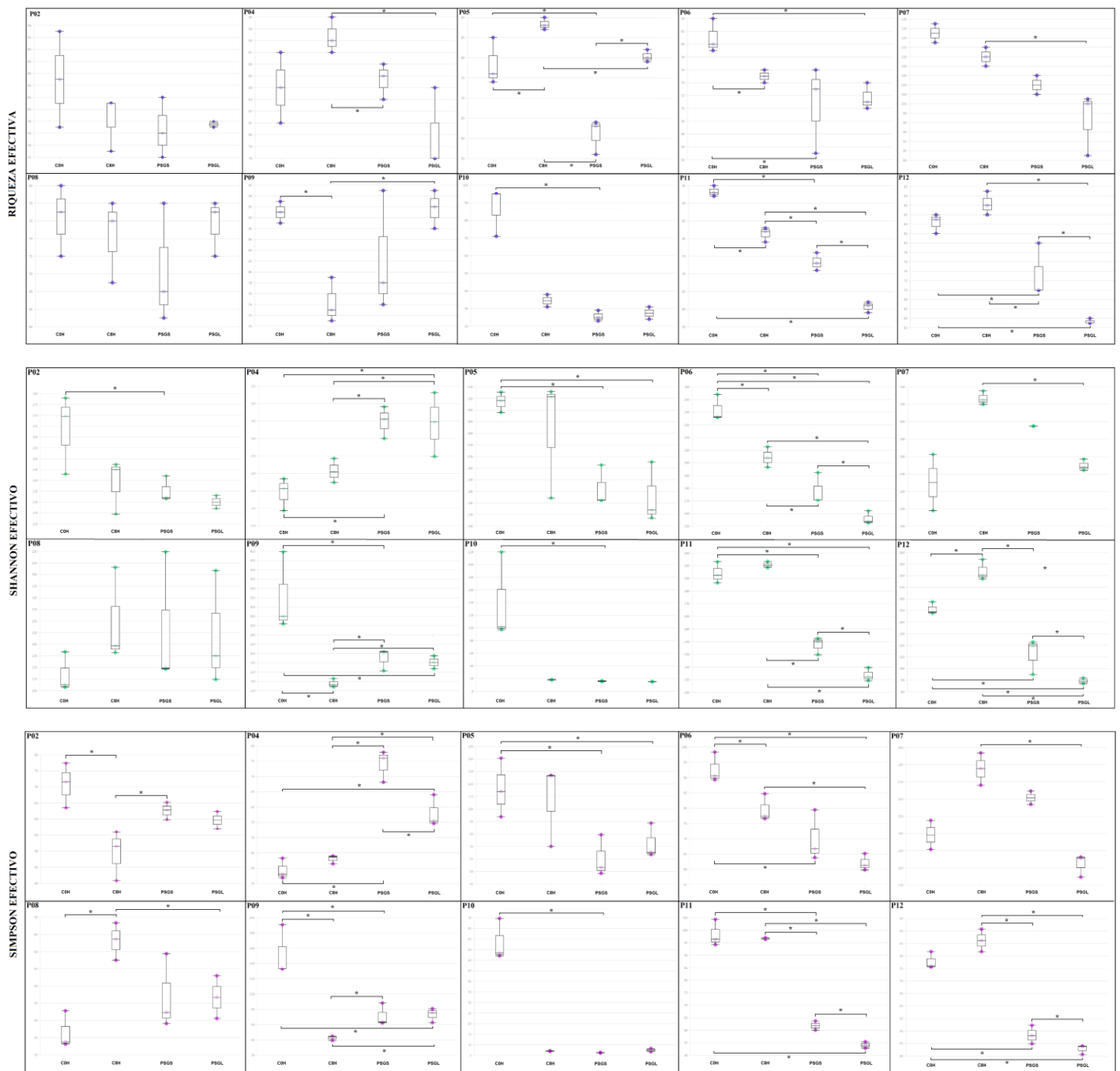
Figura 42. ACoP por individuo. Se graficaron las coordenadas F1 versus F2 y se obtuvieron las Elipses de confianza (Chi-cuadrado / Intervalo de confianza 95 %).



Para el análisis de la diversidad alfa, se calcularon los índices de riqueza, Shannon y Simpson y se realizó su transformación numérica a "efectivos". El efecto de un tratamiento se consideró significativo ($p \leq 0,1$, considerando el pequeño tamaño muestral) siempre que el cambio se observase respecto a ambos controles. De esta manera, los PS de *G. sessile* E47 disminuyeron la riqueza solo en los individuos P05, P11 y P12. Por su parte, los PS de *G. lucidum* lo hicieron en P11 y P12, siendo este efecto mayor que el observado en *G. sessile* E47. Respecto a los índices de diversidad, ambos PS disminuyeron la diversidad de Shannon en igual medida en P04. También se observó una disminución significativa en este índice para ambos tratamientos en P06, P11 y P12, aunque el efecto fue mayor para los PS de *G. lucidum*. No se observaron cambios

significativos en el resto de las muestras. Los cambios en la diversidad de Simpson fueron menos evidentes, observándose tanto incrementos como disminuciones respecto a los controles en ciertos casos (Figura 43).

Figura 43. Diversidad alfa por individuo. Se muestran las gráficas de riqueza efectiva, índice de Shannon efectivo y de Simpson efectivo. Se señalaron con corchetes las poblaciones con medias significativamente diferentes (*, $p=0,1$).



las condiciones relativamente normales podrían tener consecuencias negativas. Una mayor diversidad durante la enfermedad podría reflejar que un mayor número de especies perjudiciales están desplazando a las beneficiosas. Es posible que una cepa patógena solo pueda crecer ante niveles bajos de otra especie o, incluso, que una especie normalmente benigna pueda volverse peligrosa al sobrepasar cierto umbral de crecimiento. Aún se continúan investigando cuestiones sobre qué constituye un rango "normal" de diversidad del microbioma intestinal, si hay especies más importantes y en qué medida son necesarias, cuán variables son los requerimientos entre individuos y qué tan susceptibles son a una intervención que busque modificar su microbiota.

Se procedió luego al análisis de la composición microbiana y a la búsqueda de las especies bacterianas causantes de la diferenciación entre los grupos. Los géneros incrementados entre individuos luego de la fermentación de los polisacáridos de *Ganoderma* spp. fue variado. Ciertas OTUs fueron solo incrementadas por los polisacáridos de *G. sessile* E47, tales como *Ruminococcus* SOTU271 y *Ruminococcus torques* group SOTU149 (en P02 y P05, respectivamente), *Megasphaera* SOTU4 (en P02 y P09), *Monoglobus* SOTU98 y *Monoglobus* SOTU99 (en P02 y P05, respectivamente), *Lachnoclostridium* SOTU66 y SOTU260, y *Lachnoclostridium* SOTU64 en P04 y P06, respectivamente. Por otra parte, representantes de los géneros *Ligilactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Anaerostipes*, *Allisonella*, *Alistipes*, *Turicibacter* y *Collinsella* fueron incrementados significativamente por ambos polisacáridos en algunos de los individuos, aunque en diferentes proporciones (Figura 44). Cabe mencionar que P02, P07 y P10 solo mostraron algún cambio en la composición microbiana con el tratamiento con los PS de *G. sessile* E47, mientras que P08 y P11, con los PS de *G. lucidum*. En el caso de P11, el único cambio observado y debido a los PS de *G. lucidum* corresponde a *Erysipelotrichaceae* UCG-003 SOTU230, género que incluye especies inmunogénicas que han sido asociadas a colonización en individuos con dieta alta en grasas y que contribuiría al desarrollo de la inflamación intestinal (Atzeni *et al.*, 2022; Kaakoush, 2015).

Desde los inicios del estudio de la microbiota intestinal, se ha intentado identificar el conjunto normal de microorganismos que colonizan el intestino de personas sanas. Los primeros estudios

(que aplicaban técnicas dependientes de cultivo) arrojaban la presencia simultánea de unas 400 especies microbianas en un colon sano (Brown y Lamanna, 1977; Moore y Holdeman, 1974); como limitante, con este método se dificultaba la detección de microorganismos con requerimientos especiales de cultivo, incluyendo aquellos no bacterianos como virus y hongos (Lloyd-Price *et al.*, 2016). Décadas más tarde, con la llegada de las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento comenzaron a evaluarse microbiomas intestinales sanos, descubriendo que estaban dominados por bacterias de dos filos, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (Faith *et al.*, 2013; Huttenhower *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2010); a la vez, las proteobacterias y actinobacterias representaban un pequeño grupo, aunque con presencia constante en la mayoría de las personas (Petersen y Round, 2014). Por otra parte, incluso cuando es considerado este amplio nivel de clasificación microbiana, la proporción de *Firmicutes/Bacteroidetes* pueden variar en más de un orden de magnitud entre individuos (Faith *et al.*, 2013; Qin *et al.*, 2010; The Human Microbiome Project Consortium, 2012). Aunque se han observado grandes diferencias interindividuales en la composición taxonómica del microbioma en las áreas geográficas estudiadas, la abundancia de vías metabólicas es significativamente más uniforme entre las personas que viven en un lugar determinado. Además, si bien la composición del microbioma intestinal cambia drásticamente durante los primeros años de vida, el perfil funcional se establece tempranamente y permanece estable posteriormente, al menos en el intestino (Lloyd-Price *et al.*, 2016).

Figura 44. Efecto de los polisacáridos en la composición microbiana. Se presentan, por individuo, los géneros bacterianos que presentaron incrementos significativos respecto a los controles a 0 y 8 h ($\geq 3x$, p Wilcoxon $\leq 0,2$) en las fermentaciones con los polisacáridos de *G. sessile* E47 (PSGS) y con los de *G. lucidum* (PSGL).



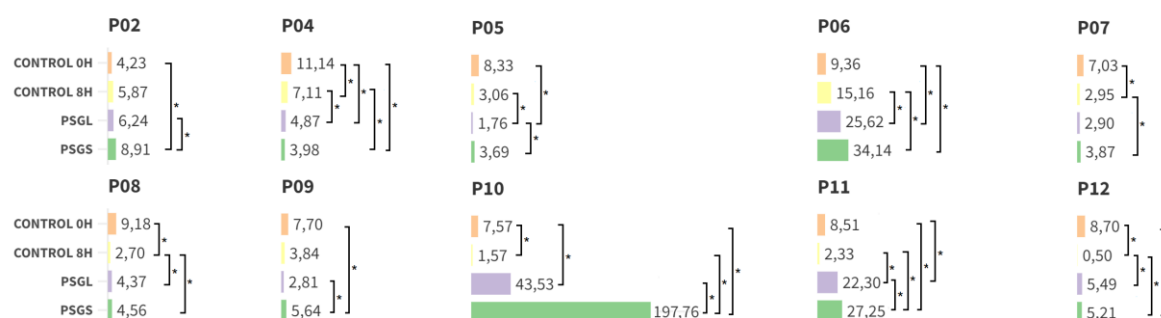
Los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes* son los más abundantes tanto de la microbiota humana como de ratón, y un cambio en su proporción ha sido asociado a varias enfermedades (Brown *et al.*, 2012). Chang *et al.* (2015), por su parte, reportaron que la microbiota intestinal en trastornos metabólicos como la obesidad se caracteriza por una mayor proporción de *Firmicutes* respecto a *Bacteroidetes*, además de encontrarse elevadas las proteobacterias productoras de endotoxinas y reducidas ciertas especies bacterianas que participan en la homeostasis del sistema inmune. No obstante, los *Bacteroidetes* han mostrado fuerte correlación con la susceptibilidad y promoción de tumores, mientras que los *Firmicutes* son importantes para la producción de SCFA, y podrían ser eficaces en el tratamiento de la inflamación relacionada con el cáncer de colon (Konstantinov *et al.*, 2013). En el presente estudio, al igual que lo observado en el análisis de la diversidad bacteriana, los efectos sobre la relación *Bacteroidetes/Firmicutes* mostraron gran variabilidad interindividual. Los PS de *G. sessile* E47 produjeron un incremento diferencial de la relación F/B respecto a los controles y superior *G. lucidum* en los individuos P10 y P11. El cociente también fue incrementado en P02 y P06, aunque sin diferencias significativas respecto a los controles ni a *G. lucidum*, respectivamente. En el resto de los individuos, el cociente tendió a disminuir, aunque no significativamente. Por su parte, los PS de *G. lucidum* no mostraron un efecto diferencial dual (sobre controles y PSGS simultáneamente) en ninguno de los individuos (Figura 45).

Los resultados publicados sobre el efecto de los polisacáridos de *Ganoderma* en la proporción de *Firmicutes* y *Bacteroidetes* muestran discrepancias. Wu *et al.* (2017) hallaron que luego de la administración diaria del líquido del cultivo de micelio de *Ganoderma lucidum* (conteniendo un polisacárido complejo) durante un mes a voluntarios sanos la relación F/B aumentó 1,35 veces. En concordancia, también se halló en un modelo de ratones con pancreatitis crónica inducida que los polisacáridos del cultivo líquido de *G. lucidum* alteran la composición y diversidad de la microbiota intestinal, en especial disminuyendo la abundancia relativa del filo *Bacteroidetes* y aumentando la del filo *Firmicutes* (Li *et al.*, 2016b). La relación F/B también mostró un aumento después del tratamiento con polisacáridos de *G. lucidum* en un modelo de inflamación inducida en ratones, aunque sin diferencias significativas (Guo *et al.*, 2021). Contrariamente, Chang *et al.* (2015) reportaron que los polisacáridos de alto peso molecular aislados del extracto acuoso del micelio de *G. lucidum* revierten la disbiosis intestinal inducida por la dieta alta en grasa en ratones mediante la disminución de la proporción *Firmicutes/Bacteroidetes*. Del mismo modo, el estudio de Jin *et al.* (2017) también mostró que la administración de polisacáridos del micelio de *G. lucidum* por vía oral a ratas disminuye el cociente entre estos filos. La discrepancias en los reportes del efecto de los polisacáridos de *Ganoderma* sobre la microbiota intestinal pueden explicarse por la variabilidad en los compuestos presentes en los productos testeados y por la diferencia de modelo de estudio (animales o humanos, modelo de enfermedad o individuos sanos) (Wu *et al.*, 2017), sumado a la variabilidad entre individuos, entre otras variables.

Un grupo de investigadores observó que la microbiota intestinal de humanos obesos y ratones obesos tenía una proporción significativamente mayor de F/B que sus contrapartes con normopeso (Ley *et al.*, 2006, 2005; Turnbaugh *et al.*, 2009, 2006; Turnbaugh y Gordon, 2009; Zhang *et al.*, 2009). Además, se halló que en las personas obesas que pierden peso durante una dieta baja en grasas o baja en carbohidratos y restringida en calorías la relación F/B disminuye en asociación con la reducción porcentual del peso corporal (Ley *et al.*, 2006). Sin embargo, otros estudios en humanos y roedores no han informado diferencias en la relación F/B en individuos obesos versus delgados, efectos de la pérdida de peso en esta proporción ni una relación F/B inversa en

individuos obesos (Balamurugan *et al.*, 2010; Collado *et al.*, 2008; Jumpertz *et al.*, 2011; Schwartz *et al.*, 2010; C. Zhang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2010; Zupancic *et al.*, 2012). El motivo de la discrepancia entre estos hallazgos sobre la relación F/B y la obesidad no está claro actualmente, aunque se ha sugerido que serían ciertas especies dentro del filo *Firmicutes* (*Erysipelotrichia*) las que aumentan sustancialmente en la obesidad y en la dieta occidental; además, en esta condición habría una reducción de otros grupos bacterianos, incluidos organismos del filo *Bacteroidetes* (Turnbaugh *et al.*, 2008; Zhao, 2013).

Figura 45. Relación *Firmicutes*/*Bacteroidetes* en cada uno de los controles y tratamientos. Se señalaron con corchetes las poblaciones con medias significativamente diferentes (*, $p \leq 0,1$).



5.4.3. Efecto de los polisacáridos en la producción de metabolitos bioactivos

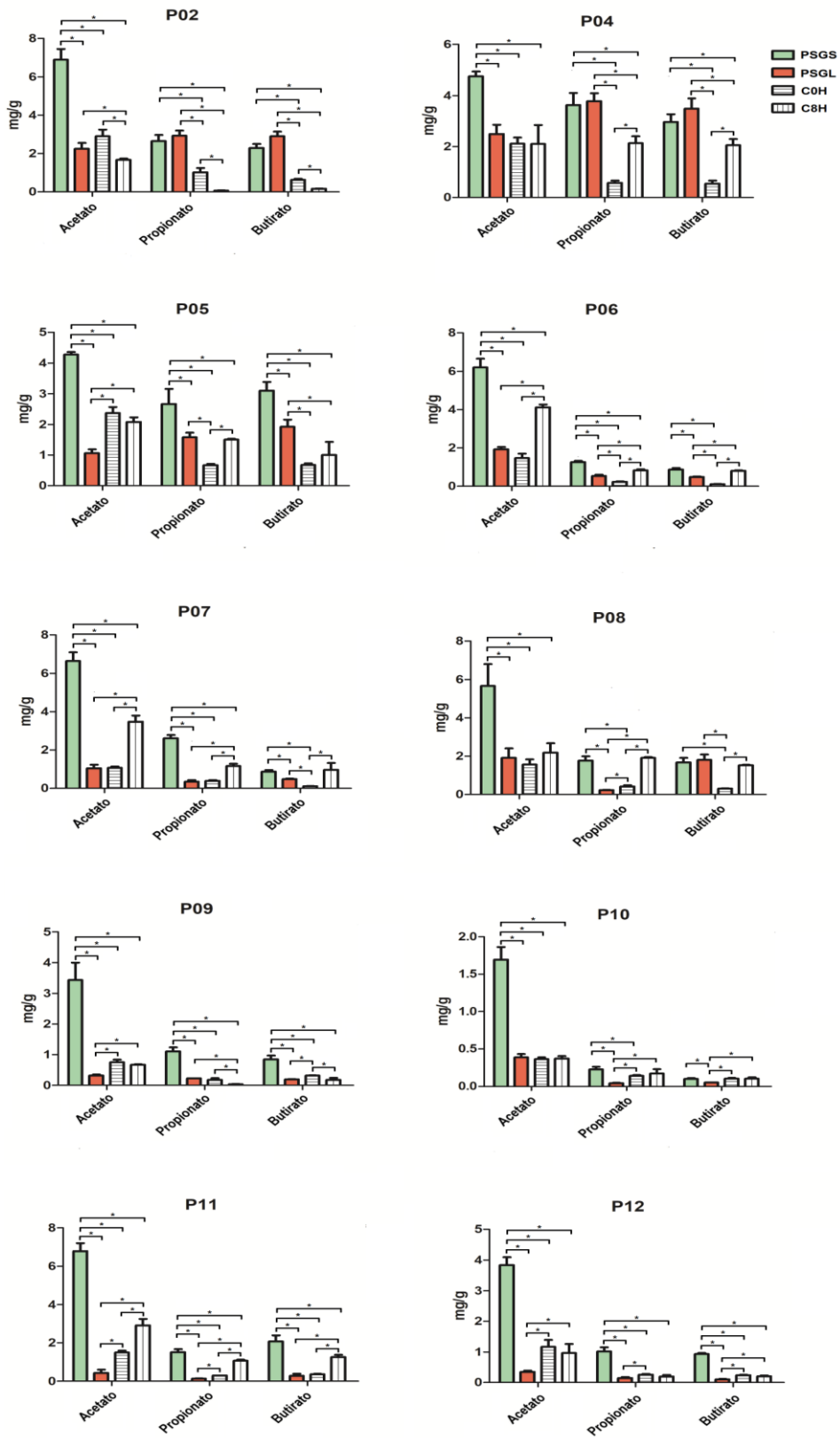
Los cromatogramas correspondientes al estándar de los ácidos volátiles derivatizados y a las muestras post-fermentación con lo PS de *G. sessile* E47 y *G. lucidum* se presentan en el Anexo 4, Figura 2. Según la prueba de Wilcoxon aplicada de a pares los polisacáridos de *G. sessile* E47 incrementaron significativamente las concentraciones de acetato en todos los donantes respecto a los controles y a los PS de *G. lucidum* ($p \leq 0,1$). Además, en siete y en tres de los diez individuos los valores de propionato y butirato, respectivamente, superaron en el grupo GSPS a sus correspondientes en el grupo GLPS (Figura 46). Cabe mencionar que el 100 % de los individuos fue “respondedor” a los polisacáridos de *G. sessile* E47 (esto es, se observó una respuesta superior a ambos controles), mientras que solo el 30 % lo fue para los polisacáridos de *G. lucidum* (es

decir, los PS de *G. lucidum* generaron un 70 % de “no respondedores”). Las cuantificaciones de los SCFA ramificados (isobutirato, valerato e isovalerato) se muestran en el Anexo 4, Tabla 6.

Se ha propuesto que fibras dietarias con diferente composición podrían dar lugar a diferentes proporciones de SCFA. Así, se ha informado que la fermentación de mananos genera una producción relativamente alta de ácido propiónico (Jonathan *et al.*, 2012). La microbiota intestinal podría utilizar la goma guar, compuesta de galactosa y manosa, para producir más ácido butírico (Yang *et al.*, 2013). Por su parte, el β -glucano puede ser altamente fermentado y promover el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos que producen SCFA, especialmente ácido acético (Chaikiang *et al.*, 2015).

Los SCFA presentes en las muestras fecales representan la fracción no absorbida de estos metabolitos producida en el tracto gastrointestinal. En base al contenido fecal de ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido valérico y ácido isovalérico, Tjellström *et al.* (2012) propusieron dos índices que reflejan la fermentación de los carbohidratos (Índice A) y de las proteínas (Índice B). El índice A se calcula como la concentración de ácido acético menos propiónico y butírico, dividida por la cantidad total de SCFA, y es también un indicador del efecto proinflamatorio de los SCFA, al considerarse el equilibrio entre los efectos proinflamatorios del ácido acético y los efectos antiinflamatorios de los ácidos butírico y propiónico. El índice B es la suma de los ácidos isobutírico e isovalérico, y su valor indica además los efectos antiinflamatorios de los SCFA. En el presente estudio, en los individuos P02 y P12 los polisacáridos de *G. sessile* presentaron un efecto antiinflamatorio diferencial, al disminuir y aumentar significativamente los índices A y B, respectivamente. En P05 y P06, ambos índices mostraron esta misma tendencia en el grupo PSGS, aunque no significativamente. Contrariamente, en P10 los polisacáridos de *G. sessile* E47 produjeron un incremento en el índice A debido al incremento en la producción de acetato (Anexo 4, Tabla 7). En el resto de los individuos, este tratamiento no generó tendencias claras en los índices. Por su parte, ambos índices tendieron a disminuir en todos los individuos con los polisacáridos de *G. lucidum* debido a la menor producción de SCFA (Anexo 4, Figura 3).

Figura 46. Niveles de SCFA acetato, propionato y butirato, en mg g⁻¹ de materia fecal. Los asteriscos indican diferencias significativas entre pares ($p \leq 0,1$).



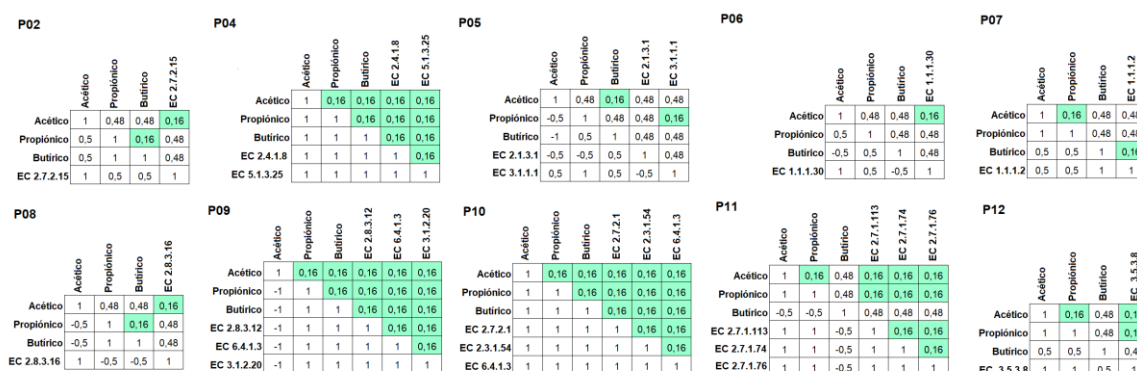
Las concentraciones *in vivo* de los SCFA son dinámicas y dependen de las tasas de producción, de la difusión intraluminal y de su metabolismo. Su producción está influenciada por las especies y la abundancia de los microorganismos presentes en el colon, por las fuentes dietarias de sustrato, el tiempo de tránsito de los alimentos a través del sistema digestivo y por los mecanismos de *cross-feeding*, también mencionados en el apartado 4.1.6, entre los que se destaca la conversión de acetato en butirato (Figura 40). De esta manera, el ensayo de fermentación *in vitro* puede no reflejar las verdaderas proporciones de los SCFA *in vivo*.

5.4.4. Análisis de correlación entre variables

Considerando los resultados anteriormente presentados, los efectos superiores de los PS de *G. sessile* E47 en la función de la microbiota intestinal (esto es, en el incremento de los SCFA) no podrían explicarse mediante los cambios observados en la composición microbiana, por lo que se buscaron a partir de los datos de la secuenciación posibles contribuciones bacterianas a genes metabólicos implicados en la síntesis de SCFA y/o en el metabolismo de los carbohidratos. El *software* PICRUSt predice la abundancia de categorías funcionales basándose en un gen marcador de entrada. Dado el conjunto de organismos identificados a partir de la secuenciación del gen 16S en una muestra propone que sus funciones asociadas también estarían presentes en el microbioma muestreado, relacionadas por su abundancia (Douglas *et al.*, 2018). Por lo mencionado, se examinaron las contribuciones a las enzimas predichas, se buscaron aquellas con incrementos significativos, y luego las que estuvieran relacionadas con las rutas metabólicas mencionadas. De esta manera, se hallaron once contribuciones a enzimas relacionadas con la síntesis y el metabolismo de los SCFA, y seis relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos incrementadas en el grupo PSGS. Exceptuando EC 6.4.1.3, incrementada tanto en P09 como en P10, el resto de las contribuciones fue única para cada individuo, lo que muestra nuevamente la variación interindividual. En todos los casos las contribuciones en PSGS superaron a las de PSGL (Anexo 4, Tablas 4-6). Al realizar la prueba de correlación de Spearman entre los SCFA y las contribuciones enzimáticas en cada donante, en todos los casos se observó al menos una correlación positiva y significativa ($p < 0,05$) entre uno o más SCFA y una o más predicciones

enzimáticas. Un claro ejemplo es el caso de P10, individuo que mostró el mayor incremento de acetato y donde este aumento correlacionó positivamente con la contribución a la enzima acetato quinasa, enzima principal de la ruta de síntesis del acetato a partir de acetyl-CoA (Frolova *et al.*, 2022). Otro ejemplo es P09, donde se observó el mayor incremento en propionato, y donde esta variable correlacionó positivamente con la contribución de la enzima propionil-CoA carboxilasa, involucrada en la síntesis de intermediarios en la vía de producción de propionato (Reichardt *et al.*, 2014) (Figura 47).

Figura 47. Resultados del análisis de correlación, por individuo, entre cada SCFA y las contribuciones enzimáticas incrementadas significativamente en el tratamiento con PSGS. Para el análisis se emplearon los valores de *fold increase* de cada variable. Se colorearon las correlaciones significativas ($p < 0,2$).



Si bien varios estudios han demostrado la gran variación interindividual en la composición de la microbiota intestinal, se ha observado que existe un conjunto conservado de funciones codificadas que se comparten entre individuos, entre las que encuentran la protección contra patógenos potenciales, la digestión de polisacáridos, la producción de vitaminas esenciales, la estimulación de la angiogénesis, la regulación del almacenamiento de grasa y la inmunomodulación; este es denominado “núcleo del microbioma intestinal” (*core gut microbiome*) y muestra la relevancia de la funcionalidad microbiana por sobre su composición (Turnbaugh y Gordon, 2009; Walsh *et al.*, 2014). En concordancia con este hallazgo, si bien los resultados del presente estudio revelaron una gran variabilidad interindividual en cuanto a la composición microbiana, con cada individuo

mostrando cambios únicos en su microbiota, todos los participantes respondieron ante la presencia de los polisacáridos de *G. sessile* E47 en términos de la funcionalidad microbiana.

Por otra parte, cabe recordar que, si bien las bacterias son el componente principal del microbioma intestinal, no debe ignorarse la presencia de otros microorganismos relevantes. El componente fúngico intestinal, acuñado con el nombre o "micobioma", desempeña papeles cruciales en la homeostasis intestinal humana y en la patogénesis de las enfermedades pese a su baja representación (constituyen entre el 0,01 % y el 0,1 % del microbioma intestinal) (Ghannoum *et al.*, 2010; Lai *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2022). Los primeros colonizadores fúngicos del intestino son introducidos e influenciados principalmente por la dieta y el medio ambiente, por lo que el micobioma intestinal muestra una mayor variabilidad entre individuos e inestabilidad a lo largo del tiempo en comparación con el componente bacteriano. *Penicillium*, *Candida*, *Saccharomyces* y *Aspergillus* son los géneros más comunes en el micobioma intestinal (Zhang *et al.*, 2022). Junto a las bacterias fermentadoras, las levaduras y los hongos microfilamentosos contribuyen a la producción de SCFA y sus intermediarios de reacción (Schwab, 2022). De hecho, se ha reportado una sobrerrepresentación de las vías relacionadas con la degradación de carbohidratos en los genes de miembros de la división Ascomycota identificados en muestras fecales humanas, lo que demuestra su contribución a la capacidad sacarolítica microbiana (Lai *et al.*, 2023). No obstante, los estudios sistemáticos de la micobiota están aún limitados por la escasez de tecnologías y plataformas bioinformáticas para la caracterización de las comunidades fúngicas asociadas al hospedador (Li *et al.*, 2019). En el presente trabajo se analizaron los cambios en la composición bacteriana intestinal a partir de la secuenciación del gen 16S, luego de la fermentación de carbohidratos complejos. Si bien se evidenció un efecto potenciador de la función microbiana, visto como el aumento en la producción *in vitro* de metabolitos bioactivos, el cambio no correlacionó con las modificaciones en las abundancias bacterianas. Por lo antes mencionado, no debería despreciarse la posible contribución de la microbiota fúngica, no analizada en este estudio, en el metabolismo fermentativo.

La extracción de ácidos nucleicos de muestras de heces es el primer paso para analizar la diversidad microbiana utilizando métodos independientes del cultivo. Las variaciones metodológicas o técnicas durante la extracción, como las debidas al uso de diferentes plataformas de secuenciación y/o procesos de manipulación de secuencias, pueden afectar los resultados observados. Los métodos de extracción de ADN utilizan diferentes procedimientos de lisis, como la lisis mecánica, química, enzimática y térmica; si bien se sabe que existen diferencias entre ellos, no se ha generado consenso sobre cuál es el más eficiente (Mackenzie *et al.*, 2015). En particular, las muestras fecales pueden presentar una distribución heterogénea de los microorganismos, e incluso estos pueden hallarse adheridos a la matriz. Esto puede conducir a una lisis preferencial de ciertos tipos de células y, por tanto, distorsionar la diversidad microbiana si el método de lisis utilizado no es el adecuado (Ariefdjohan *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2003; Maukonen *et al.*, 2012). En el presente estudio se utilizó un método de lisis que combina la acción mecánica y enzimática para la extracción de ADN. Si bien este método se considera económico en comparación con el uso de kits comerciales, no posee la ventaja de reducir el riesgo de error sistemático en el proceso de extracción. Esto podría resultar en una limitación en la recuperación y detección de ciertas especies microbianas presentes en las muestras capaces de generar metabolitos bioactivos. Sin embargo, también se ha reportado que la gran variación en los resultados atribuida a las diferencias entre sujetos podría superar a la variación asociada con el método de extracción de ADN (Mackenzie *et al.*, 2015).

La descomposición de los polisacáridos altamente complejos y variables requiere de la acción de una gran cantidad de enzimas diferentes que deben actuar de manera concertada para escindir cada subestructura del polímero en monosacáridos fermentables. Este requerimiento, que además debe darse en una ubicación física precisa, presenta un desafío para ciertas bacterias que deben cooperar activamente (Kaoutari *et al.*, 2013). La complejidad de los polisacáridos se incrementa a medida que la cantidad de tipos de enlace lo hace, que varía desde menos de cinco para almidón, fructanos, mananos de levadura y glucanos de cebada, hasta más de 20 para ciertos ramnagalacturonanos (Ndeh y Gilbert, 2018). De hecho, se ha comprobado que el aumento del

grado de complejidad química de las fibras dietarias limita el crecimiento microbiano y la cantidad de especies que pueden utilizar estos nutrientes, al mismo tiempo que mejora la resistencia a la invasión de patógenos al promover un equilibrio entre las interacciones positivas y negativas entre especies microbianas; por el contrario, no ocurre lo mismo en presencia de los monosacáridos constituyentes de esas fibras ni con polisacáridos estructuralmente más simples. Se ha postulado que las interacciones positivas entre especies son más abundantes ante la presencia de factores ambientales estresantes. Dado que la utilización de carbohidratos complejos es una función microbiana especializada presente sólo en un subconjunto de especies, la presencia de carbohidratos complejos como fuente primaria de carbono puede activar respuestas de estrés, similar a lo que ocurre frente a una escasez de nutrientes. Las comunidades que contienen especies altamente competitivas para la utilización de carbohidratos excluyen a las especies invasoras al maximizar el grado de superposición de nichos metabólicos con esas especies (Ostrem Loss *et al.*, 2023). En el presente trabajo, *G. sessile* E47 mostró contener al menos ocho tipos diferentes de enlaces en sus polisacáridos obtenidos del cultivo líquido (Capítulo 3), indicando su mayor complejidad respecto a varios de los carbohidratos antes mencionados, y su potencial beneficio como reductor de la sensibilidad ante las perturbaciones de las comunidades microbianas que pueblan el intestino humano.

Como fue explicado anteriormente en la introducción del presente capítulo, se ha demostrado que unos pocos genes codifican CAZimas de degradación de carbohidratos de origen fúngico en el microbioma humano (Kaoutari *et al.*, 2013). La capacidad sacarolítica sobre carbohidratos de hongos estaría limitada a unas pocas especies y, aun así, esas especies tendrían una alta selectividad por el sustrato; por ejemplo, *Bacteroides xylanisolvens*, comensal del intestino humano, es capaz de metabolizar el α -1,6-manano de *Saccharomyces cerevisiae*, pero no así el manano complejo intacto (Cuskin *et al.*, 2015; McKee *et al.*, 2021). Esta representación aumenta en otros microbiomas como el del suelo, donde la biomasa fúngica representa una importante fuente de nutrientes. Sin embargo, se ha reportado que las modificaciones en la composición del sustrato que da soporte al microbioma impulsan tanto cambios temporales en la composición de

la comunidad como los perfiles de expresión de las CAZimas (Brabcová *et al.*, 2016). De este modo, la presencia en el intestino de polisacáridos derivados de hongos de la dieta, como la levadura de panadería, y de miembros fúngicos del microbioma intestinal, son también importantes impulsores del metabolismo de *Bacteroidetes* y promueven su especialización degradativa (McKee *et al.*, 2021).

5.5. Conclusión

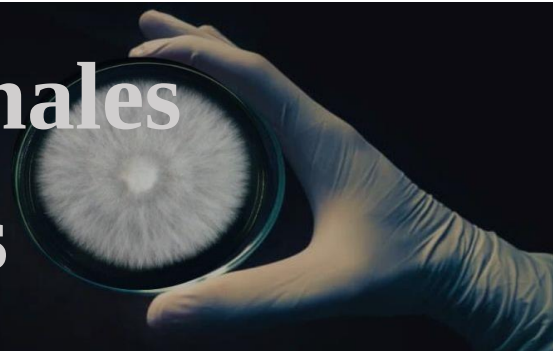
Los resultados demostraron un efecto diferencial de los polisacáridos del cultivo líquido de *G. sessile* E47 respecto de los polisacáridos de *G. lucidum*. Si bien se generaron cambios en ciertos grupos bacterianos, el efecto observado en la totalidad de los individuos fue el incremento en la producción de SCFA, mayormente acetato, durante la fermentación con PSGS. Al analizar el conjunto de datos, se dedujo que no sería la composición bacteriana la variable explicativa del efecto superior de estos polisacáridos, por lo que se recurrió a realizar una predicción funcional del microbioma. Así, ciertos incrementos en las contribuciones bacterianas a enzimas de degradación de carbohidratos y de síntesis de SCFA permitieron explicar los resultados obtenidos. A estos hallazgos se suma lo observado en el Capítulo 3 de esta tesis, donde se presentaron las diferencias en la composición química de ambos polisacáridos. No obstante, se deben realizar estudios transcriptómicos para confirmar que estas enzimas efectivamente aumentan su expresión durante la fermentación con polisacáridos complejos, y que el efecto final es un aumento en la producción de metabolitos fisiológicamente activos. Los futuros estudios podrían centrarse en determinar si los efectos diferenciales son específicos de la especie, o incluso, de la cepa en cuestión, así como en investigar las variaciones en la composición química de los polisacáridos producidos al modificar los medios de cultivo, en conjunto con pruebas de actividad biológica.

La evidencia generada en el área del microbioma soporta el desarrollo de terapias dietéticas personalizadas basadas en la predicción de las capacidades metabólicas de la microbiota intestinal individual mediante el uso de herramientas como la metagenómica, el modelado a escala genómica y el aprendizaje automatizado. Más aún, las fibras dietarias podrían seleccionarse en

función de su capacidad para limitar el crecimiento de ciertas especies y equilibrar las interacciones positivas y negativas en el microbioma intestinal, basándose en enfoques guiados por modelos. Estos hallazgos subrayan la complejidad de la microbiota humana y la importancia de comprender cómo los diferentes individuos pueden responder de manera única a las intervenciones dietéticas o ambientales.

Los continuos intentos de comprender el comportamiento de la microbiota intestinal y cuál sería el “microbioma ideal” que garantice el mantenimiento del estado de salud son, hasta la fecha, poco concluyentes, y existen discrepancias en las conclusiones generadas por diferentes autores. Ciertas preguntas, como de qué factores depende tener un microbioma “apto”, y si es posible, a través de intervenciones nutricionales, “entrenar” a la microbiota para lograr la funcionalidad deseada, no han sido aún resueltas, aunque cada vez se esté más cerca de elucidar las respuestas gracias a los avances tecnológicos en el campo de la biología molecular. Actualmente, se ha señalado que la distinción entre un microbioma sano de uno no saludable tiene utilidad limitada. Parte del problema son las grandes diferencias entre los microbiomas de personas aparentemente sanas, que surgen de una combinación compleja de factores ambientales, genéticos y de estilo de vida, y comprender las implicancias clínicas de esas diferencias presenta un desafío. Así, el microbioma sano de una persona puede no serlo en un contexto diferente.

6. Conclusiones finales y perspectivas



Ganoderma lucidum es uno de los hongos medicinales con funciones inmunomoduladoras más utilizados en la medicina tradicional china. En las últimas décadas se han visto nuevos descubrimientos en torno a la microbiota intestinal, y se ha desarrollado un concepto moderno que propone equilibrar la microbiota en todo el cuerpo, en consonancia con la filosofía china de "armonización", un concepto central directriz de la MTC en términos de prevención o lucha contra las enfermedades. En este campo de estudio, la participación de la microbiota intestinal en la aparición y el desarrollo de enfermedades se relaciona con la plasticidad de la composición microbiana; aquí, la MTC interviene modulando la microbiota intestinal y esta última metaboliza sus componentes en sustancias potencialmente bioactivas. No obstante, debe continuarse con la elucidación de los mecanismos subyacentes de la eficacia. La medicina de precisión tiene como núcleo el diagnóstico y la terapia personalizados. Al integrar la metagenómica, la metaproteómica, la metatranscriptómica y la metabolómica, puede generarse una imagen holística de la plasticidad y variabilidad interindividual de la respuesta de la microbiota intestinal a las terapias, facilitando así una medicación precisa y personalizada.

Como se vio en el Capítulo 1, *G. sessile* E47 resultó ser una cepa con buenos rendimientos en medio sólido, y con una mejor *performance* en cultivo sumergido respecto al resto de las cepas de *Ganoderma* estudiadas, representando una buena alternativa para la producción de polisacáridos a mayor escala. Además, la batería de ensayos moleculares, inmunoquímicos y de análisis morfológico realizados resultaron ser una herramienta útil para la caracterización de cepas. Respecto a los resultados del Capítulo 2, tanto el basidioma como el micelio de esta y las

demás cepas de *Ganoderma* estudiadas poseen propiedades nutricionales comparables a las de otros hongos comestibles en el mercado, como también adecuado perfil de inocuidad alimentaria. No obstante, a la hora de caracterizar los productos de consumo deben considerarse las diferencias existentes entre cepas y respecto a la estructura del hongo analizada. En particular, la presencia de pesticidas provenientes del sustrato sólido en el producto de consumo es una variable a ser controlada si se desea cumplir con estándares internacionales de calidad e inocuidad.

El conjunto de ensayos presentados en el Capítulo 3 reveló que la química de los polisacáridos de *G. sessile* E47, y de los de *G. lucidum* disponible en el mercado, son diferentes. La RMN, en particular, mostró ser una técnica analítica de ayuda en el análisis estructural de compuestos complejos como lo son los PS y triterpenoides de setas. Más aún, los resultados del Capítulo 4 demostraron un efecto diferencial de los polisacáridos de *G. sessile* E47 en cuanto al incremento en la producción de metabolitos antiinflamatorios al ser fermentados por la microbiota fecal, sugiriendo que una mayor heterogeneidad química en este tipo de fibra dietaria estaría asociada a un aumento en la actividad biológica y confirmando las hipótesis planteadas. Junto con la revisión bibliográfica realizada previamente, los PS de *Ganoderma* poseen un potencial uso como ingredientes funcionales en el área de los prebióticos. Las aplicaciones podrían ser la preparación de suplementos dietéticos en forma de cápsulas, comprimidos y polvos liofilizados. En particular, las cápsulas son una forma farmacéutica de fácil preparación en la que el polvo liofilizado de los PS puede ser dosificado; por ejemplo, dos cápsulas de 350 mg de PS crudos del cultivo líquido de *G. sessile* E47 aportarían la cantidad de betaglucanos sugerida por la FDA por porción como suplemento dietario (150 mg).

Esta tesis aporta al desarrollo de metodologías de análisis, identificación y control de calidad de los hongos comestibles y medicinales, escasamente estudiados desde el punto de vista medicinal en nuestro país, y contribuyendo al diseño de productos farmacéuticos o suplementos dietarios, sea que se busque incorporarlos en terapias contra enfermedades o como ingredientes alimentarios para promover el estado de salud. En este punto, a la hora de establecer recomendaciones sobre tipos específicos y dosis en el tratamiento de trastornos gastrointestinales, debe tenerse en cuenta

que las propiedades fisicoquímicas y químicas de las diferentes fibras dietéticas varían considerablemente según su origen y procesamiento, y estas propiedades son determinantes importantes de sus características funcionales y su utilidad clínica.

REFERENCIAS

- Adaskaveg, J.E., Gilbertson, R.L., 1986. Cultural studies and genetics of sexuality of *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae* in relation to the taxonomy of the *G. lucidum* complex. *Mycologia* 78, 694–705. <https://doi.org/10.1080/00275514.1986.12025312>
- Adaskaveg, J.E., Ogawa, J.M., 1990. Wood decay pathology of fruit and nut trees in California. *Plant Dis.* 74, 341–352.
- Agger, S., Lopez-Gallego, F., Schmidt-Dannert, C., 2009. Diversity of sesquiterpene synthases in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Mol. Microbiol.* 72, 1181–1195. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06717.x>
- Agudelo-Escobar, L.M., Gutiérrez-López, Y., Urrego-Restrepo, S., 2017. Efecto de la aireación, la agitación y el pH sobre la producción de biomasa micelial y exopolisacáridos del hongo filamentoso *Ganoderma lucidum*. *DYNA* 84, 73–79. <https://doi.org/10.15446/dyna.v84n200.57126>
- Aken, V., Godefroid, L.M., Peres, C.M., Naveau, H., Agathos, S.N., 1999. Mineralization of 14 C U-ring labeled 68, 159–169.
- Alam, M.Z., Maslanka, J.R., Abt, M.C., 2023. Immunological consequences of microbiome-based therapeutics. *Front. Immunol.* 13, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1046472>
- Alsaheb, R.A., Zjeh, K.Z., Malek, R.A., Abdullah, J.K., El Baz, A., El Deeb, N., Dailin, D., Hanapi, S.Z., Sukmawati, D., El Enshasy, H., 2020. Bioprocess optimization for exopolysaccharides production by *Ganoderma lucidum* in semi-industrial scale. *Recent Pat. Food. Nutr. Agric.* 11, 211–218. <https://doi.org/10.2174/2212798411666200316153148>
- Ariefdjohan, M.W., Savaiano, D.A., Nakatsu, C.H., 2010. Comparison of DNA extraction kits for PCR-DGGE analysis of human intestinal microbial communities from fecal specimens. *Nutr. J.* 9, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-9-23>
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Paslier, D. Le, Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H.B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E.G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W.M., Brunak, S., Doré, J., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Bork, P., Antolín, M., Artiguenave, F., Blottiere, H.M., Almeida, M., Brechot, C., Cara, C., Chervaux, C., Cultrone, A., Delorme, C., Denariáz, G., Dervyn, R., Foerstner, K.U., Friss, C., Guchte, M. van de, Guedon, E., Haimet, F., Huber, W., Hylckama-Vlieg, J. van, Jamet, A., Juste, C., Kaci, G., Knol, J., Kristiansen, K., Lakhdari, O., Layec, S., Roux, K. Le, Maguin, E., Mérieux, A., Minardi, R.M., M'rini, C., Muller, J., Oozeer, R., Parkhill, J., Renault, P., Rescigno, M., Sanchez, N., Sunagawa, S., Torrejon, A., Turner, K., Vandemeulebrouck, G., Varela, E., Winogradsky, Y., Zeller, G., 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473, 174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
- AS, B., Murray, M., Aztiria, M., Montes, B., Calfu, M., Prat, M., 2014. Morphological and immunochemical characterization of the pollen grains of *Chenopodium album* L. (*Chenopodiaceae*) in a temperate urban area in Argentina. *Phyton (B. Aires)*. 83, 9–15. <https://doi.org/10.32604/phyton.2014.83.009>

- Attias, N., Danai, O., Abitbol, T., Tarazi, E., Ezov, N., Pereman, I., Grobman, Y.J., 2020. Mycelium bio-composites in industrial design and architecture: Comparative review and experimental analysis. *J. Clean. Prod.* 246, 119037. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119037>
- Attias, N., Reid, M., Mijowska, S.C., Dobryden, I., Isaksson, M., Pokroy, B., Grobman, Y.J., Abitbol, T., 2021. Biofabrication of nanocellulose–mycelium hybrid materials. *Adv. Sustain. Syst.* 5, 1–12. <https://doi.org/10.1002/adsu.202000196>
- Atzeni, A., Bastiaanssen, T.F.S., Cryan, J.F., Tinahones, F.J., Vioque, J., Corella, D., Fitó, M., Vidal, J., Moreno-Indias, I., Gómez-Pérez, A.M., Torres-Collado, L., Coltell, O., Castañer, O., Bulló, M., Salas-Salvadó, J., 2022. Taxonomic and functional fecal microbiota signatures associated with insulin resistance in non-diabetic subjects with overweight/obesity within the frame of the PREDIMED-Plus study. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 13, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.804455>
- Avalos, J., Limón, M.C., 2021. Fungal Secondary Metabolism. *Encyclopedia* 2, 1–13. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2010001>
- Baby, S., Johnson, A.J., Govindan, B., 2015. Secondary metabolites from *Ganoderma*. *Phytochemistry* 114, 66–101. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.03.010>
- Badalyan, S.M., Gharibyan, N.G., Iotti, M., Zambonelli, A., 2019. Morphological and ecological screening of different collections of medicinal white-rot bracket fungus *Ganoderma adspersum* (Schulzer) Donk (*Agaricomycetes*, *Polyporales*). *Ital. J. Mycol.* 48, 1–15. <https://doi.org/10.6092/issn.2531-7342/9092>
- Balamurugan, R., George, G., Kabeerdoss, J., Hepsiba, J., Chandragunasekaran, A.M.S., Ramakrishna, B.S., 2010. Quantitative differences in intestinal *Faecalibacterium prausnitzii* in obese Indian children. *Br. J. Nutr.* 103, 335–338. <https://doi.org/10.1017/S0007114509992182>
- Bano, Z., Rajarathnam, S., 1988. Pleurotus mushrooms. Part II. Chemical composition, nutritional value, post-harvest physiology, preservation, and role as human food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 27, 87–158. <https://doi.org/10.1080/10408398809527480>
- Barbosa, J.R., de Carvalho Junior, R.N., 2020. Occurrence and possible roles of polysaccharides in fungi and their influence on the development of new technologies. *Carbohydr. Polym.* 246, 116613. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116613>
- Barh, A., Kumari, B., Sharma, S., Annepu, S.K., Kumar, A., Kamal, S., Sharma, V.P., 2019. Mushroom mycoremediation: kinetics and mechanism, smart bioremediation technologies: Microbial Enzymes. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818307-6.00001-9>
- Baroni, M. V., Chiabrando, G.A., Costa, C., Wunderlin, D.A., 2002. Assessment of the floral origin of honey by SDS-page immunoblot techniques. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1362–1367. <https://doi.org/10.1021/jf011214i>
- Barreto-Bergter, E., Figueiredo, R.T., 2014. Fungal glycans and the innate immune recognition. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00145>
- Barros, L., Baptista, P., Estevinho, L.M., Ferreira, I.C.F.R., 2007. Effect of fruiting body maturity stage on chemical composition and antimicrobial activity of *Lactarius* sp. mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8766–8771. <https://doi.org/10.1021/jf071435+>
- Bartnicki-Garcia, S., 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 22, 87–108. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.22.100168.000511>

- Beck, T., Gaper, J., Sebesta, M., Gaperova, S., 2018. Host preferences of wood-decaying fungi of the genus *Ganoderma* in the urban areas of Slovakia. *Ann. Univ. Paedag. Cracoviens. Stud. Nat* 3, 22–37. <https://doi.org/https://doi.org/10.24917/25438832.3.2>
- Bedu-Ferrari, C., Biscarrat, P., Langella, P., Cherbuy, C., 2022. Prebiotics and the human gut microbiota: from breakdown mechanisms to the impact on metabolic health. *Nutrients* 14, 1–23. <https://doi.org/10.3390/nu14102096>
- Berger, R.G., Bordewick, S., Krahe, N.K., Ersoy, F., 2022. Mycelium vs. fruiting bodies of edible fungi—a comparison of metabolites. *Microorganisms* 10. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071379>
- Bernardes, C.T., Moreira, P.F., Sopelete, M.C., Vieira, F.A., Sung, S.S., Silva, D.A., Taketomi, E.A., 2010. IgE cross-reactivity between *Lolium multiflorum* and commercial grass pollen allergen extracts in Brazilian patients with pollinosis. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 43, 166–175. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2010005000004>
- Bidegain, M., 2017. Optimización del cultivo de *Ganoderma lucidum*.
- Bikle, D.D., 2014. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem. Biol.* 21, 319–329. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.12.016>
- Bills, G.F., Gloer, J.B., 2017. Biologically active secondary metabolites from the fungi. *The Fungal Kingdom* 1087–1119. <https://doi.org/10.1128/9781555819583.ch54>
- Bingol, K., Brüscheiler, R., 2014. Multidimensional APPROACHES to NMR-based metabolomics. *Anal. Chem.* 86, 47–57. <https://doi.org/10.1021/ac403520j>
- Bishop, K.S., Kao, C.H.J., Xu, Y., Glucina, M.P., Paterson, R.R.M., Ferguson, L.R., 2015. From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. *Phytochemistry* 114, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.02.015>
- Bjursell, M.K., Martens, E.C., Gordon, J.I., 2006. Functional genomic and metabolic studies of the adaptations of a prominent adult human gut symbiont, *Bacteroides thetaiotaomicron*, to the suckling period. *J. Biol. Chem.* 281, 36269–36279. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606509200>
- Blagodatski, A., Yatsunskaya, M., Mikhailova, V., Tiasto, V., Kagansky, A., Katanaev, V.L., 2018. Medicinal mushrooms as an attractive new source of natural compounds for future cancer therapy. *Oncotarget* 9, 29259–29274. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25660>
- Boddy, L., 2000. Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, 185–194. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(99\)00093-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(99)00093-8)
- Bonfante-Fasolo, P., Faccio, A., Perotto, S., Schubert, A., 1990. Correlation between chitin distribution and cell wall morphology in the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Mycol. Res.* 94, 157–165. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80607-2](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80607-2)
- Boonsong, S., Klaypradit, W., Wilaipun, P., 2016. Antioxidant activities of extracts from five edible mushrooms using different extractants. *Agric. Nat. Resour.* 50, 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2015.07.002>
- Bordenstein, S.R., Theis, K.R., 2015. Host biology in light of the microbiome: Ten principles of holobionts and hologenomes. *PLoS Biol.* 13, 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002226>
- Boskou, D., Tsimidou, M., Blekas, G., 2006. Polar phenolic compounds, Second Edi. AOCS Press.

- Boyce, C.K., Hotton, C.L., Fogel, M.L., Cody, G.D., Hazen, R.M., Knoll, A.H., Hueber, F.M., 2007. Devonian landscape heterogeneity recorded by a giant fungus. *Geology* 35, 399–402. <https://doi.org/10.1130/G23384A.1>
- Brabcová, V., Nováková, M., Davidová, A., Baldrian, P., 2016. Dead fungal mycelium in forest soil represents a decomposition hotspot and a habitat for a specific microbial community. *New Phytol.* 210, 1369–1381. <https://doi.org/10.1111/nph.13849>
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003>
- Brandon Matheny, P., Wang, Z., Binder, M., Curtis, J.M., Lim, Y.W., Henrik Nilsson, R., Hughes, K.W., Hofstetter, V., Ammirati, J.F., Schoch, C.L., Langer, E., Langer, G., McLaughlin, D.J., Wilson, A.W., Frøslev, T., Ge, Z.W., Kerrigan, R.W., Slot, J.C., Yang, Z.L., Baroni, T.J., Fischer, M., Hosaka, K., Matsuura, K., Seidl, M.T., Vauras, J., Hibbett, D.S., 2007. Contributions of *rpb2* and *tef1* to the phylogeny of mushrooms and allies (*Basidiomycota*, Fungi). *Mol. Phylogenet. Evol.* 43, 430–451. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.08.024>
- Breene, W.M., 1990. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *J. Food Prot.* 53, 883–894. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-53.10.883>
- Brooks, L., Viardot, A., Tsakmaki, A., Stolarczyk, E., Howard, J.K., Cani, P.D., Everard, A., Sleeth, M.L., Psichas, A., Anastasovskaj, J., Bell, J.D., Bell-Anderson, K., Mackay, C.R., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., Frost, G., Bewick, G.A., 2017. Fermentable carbohydrate stimulates FFAR2-dependent colonic PYY cell expansion to increase satiety. *Mol. Metab.* 6, 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.10.011>
- Brown, A.J., Goldsworthy, S.M., Barnes, A.A., Eilert, M.M., Tcheang, L., Daniels, D., Muir, A.I., Wigglesworth, M.J., Kinghorn, I., Fraser, N.J., Pike, N.B., Strum, J.C., Steplewski, K.M., Murdock, P.R., Holder, J.C., Marshall, F.H., Szekeres, P.G., Wilson, S., Ignar, D.M., Foord, S.M., Wise, A., Dowell, S.J., 2003. The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J. Biol. Chem.* 278, 11312–11319. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211609200>
- Brown, G.D., 2006. Dectin-1: A signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 33–43. <https://doi.org/10.1038/nri1745>
- Brown, J.P., Lamanna, C., 1977. Role of gut bacterial flora in nutrition and health: A review of recent advances in bacteriological techniques, metabolism, and factors affecting flora composition, *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/10408397709527224>
- Brown, K., DeCoffe, D., Molcan, E., Gibson, D.L., 2012. Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. *Nutrients* 4, 1095–1119. <https://doi.org/10.3390/nu4081095>
- Burford, E.P., Kierans, M., Gadd, G.M., 2003. Geomycology: Fungi in mineral substrata. *Mycologist* 17, 98–107. <https://doi.org/10.1017/S0269915X03003112>
- Burnette, W.N., 1981. “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195–203. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5)

- Çağlarirmak, N., 2007. The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula edodes* and *Pleurotus* species) and an estimated approach to the volatile compounds. *Food Chem.* 105, 1188–1194. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.021>
- Cai, M., Mu, H., Xing, H., Li, Z., Xu, J., Liu, W., Yang, K., Sun, P., 2021. In vitro gastrointestinal digestion and fermentation properties of *Ganoderma lucidum* spore powders and their extracts. *Lwt* 135, 110235. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110235>
- California Department of Food and Agriculture, C., 2017. California Pest Rating Proposal for *Ganoderma adspersum* (Schulzer) Donk. Accedido desde: <https://blogs.cdffa.ca.gov/Section3162/?p=3501>
- California Department of Food and Agriculture, C., 2021. California Pest Rating Proposal for *Ganoderma brownii* (Murrill) Gilb. 1961. Accedido desde: https://blogs.cdffa.ca.gov/Section3162/wp-content/uploads/2021/03/Ganoderma-brownii_ADA_PRP-3-22.pdf
- Camassola, M., da Rosa, L.O., Calloni, R., Gaio, T.A., Dillon, A.J.P., 2013. Secretion of laccase and manganese peroxidase by *Pleurotus* strains cultivate in solid-state using *Pinus* spp. sawdust. *Brazilian J. Microbiol.* 44, 207–213. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000006>
- Cameán, A.M., Repetto, M., 2006. Toxicología alimentaria. Díaz de Santos, Madrid.
- Camilleri, M., 2019. Leaky gut: mechanisms, measurement and clinical implications in humans. *Gut* 68, 1516–1526. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318427>
- Campi, M., Mancuello, C., Ferreira, F., Maubet, Y., Cristaldo, E., Gayoso, E., Robledo, G., 2023. Does the source matter? Phenolic compounds and antioxidant activity from mycelium in liquid medium, wild and cultivated fruiting bodies of the neotropical species *Ganoderma tuberculosum*. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 13, 1–7. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.6148>
- Cao, Y., Wu, S.H., Dai, Y.C., 2012. Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma* mushroom Lingzhi. *Fungal Divers.* 56, 49–62. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0178-5>
- Cao, Y., Xu, X., Liu, S., Huang, L., Gu, J., 2018. *Ganoderma*: A cancer immunotherapy review. *Front. Pharmacol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01217>
- Carbonero, E.R., Gracher, A.H.P., Komura, D.L., Marcon, R., Freitas, C.S., Baggio, C.H., Santos, A.R.S., Torri, G., Gorin, P.A.J., Iacomini, M., 2008. *Lentinus edodes* heterogalactan: Antinociceptive and anti-inflammatory effects. *Food Chem.* 111, 531–537. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.015>
- Carbonero, E.R., Gracher, A.H.P., Smiderle, F.R., Rosado, F.R., Sasaki, G.L., Gorin, P.A.J., Iacomini, M., 2006. A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. *Carbohydr. Polym.* 66, 252–257. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.03.009>
- Carbonetto, B., Fabbro, M.C., Sciara, M., Seravalle, A., Méjico, G., Revale, S., Romero, M.S., Brun, B., Fay, M., Fay, F., Vazquez, M.P., 2016. Human microbiota of the argentine population- A pilot study. *Front. Microbiol.* 7, 1–5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00051>
- Cardoso, R.V.C., Fernandes, Â., Oliveira, M.B.P.P., Calhelha, R.C., Barros, L., Martins, A., Ferreira, I.C.F.R., 2017. Development of nutraceutical formulations based on the mycelium of: *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus*. *Food Funct.* 8, 2155–2164. <https://doi.org/10.1039/c7fo00515f>

- Cardwell, G., Bornman, J.F., James, A.P., Black, L.J., 2018. A review of mushrooms as a potential source of dietary vitamin D. *Nutrients* 10, 1–11. <https://doi.org/10.3390/nu10101498>
- Carrieri, R., Manco, R., Sapio, D., Iannaccone, M., Fulgione, A., Papaiani, M., de Falco, B., Grauso, L., Tarantino, P., Ianniello, F., Lanzotti, V., Lahoz, E., Capparelli, R., 2017. Structural data and immunomodulatory properties of a water-soluble heteroglycan extracted from the mycelium of an Italian isolate of *Ganoderma lucidum*. *Nat. Prod. Res.* 31, 2119–2125. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1278593>
- Castaño, F.D., 2018. The sunflower crop in Argentina: Past, present and potential Future. *OCL - Oilseeds fats, Crop. Lipids* 25, 1–10. <https://doi.org/10.1051/ocl/2017043>
- Castro-Delgado, A.L., Elizondo-Mesén, S., Valladares-Cruz, Y., Rivera-Méndez, W., 2020. Wood Wide Web: communication through the mycorrhizal network. *Rev. Tecnol. en Marcha* 33, 114–124. <https://doi.org/10.18845/tm.v33i4.4601>
- Cerniglia, C.E., 1997. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: Past, present and future applications in bioremediation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19, 324–333. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900459>
- Casp, A., Abril, J., 2003. *Procesos de conservación de alimentos*. AMV Ediciones. Madrid. España.
- Chaikiang, C., Wichienchot, S., Youravoug, W., Graidist, P., 2015. Evaluation on prebiotic properties of β -glucan and oligo- β -glucan from mushrooms by human fecal microbiota in fecal batch culture. *Funct. Foods Heal. Dis.* 5, 395–405. <https://doi.org/10.31989/ffhd.v5i11.209>
- Chan, J.S.L., Asatiani, M.D., Sharvit, L., Trabelcy, B., Barseghyan, G.S., Wasser, S.P., 2015. Chemical composition and medicinal value of the new *Ganoderma tsugae* var. *jannieae* CBS-120304 medicinal higher basidiomycete mushroom. *Int. J. Med. Mushrooms* 17, 735–747. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v17.i8.40>
- Chan, W.K., Law, H.K.W., Lin, Z. Bin, Lau, Y.L., Chan, G.C.F., 2007. Response of human dendritic cells to different immunomodulatory polysaccharides derived from mushroom and barley. *Int. Immunol.* 19, 891–899. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxm061>
- Chang, C.J., Lin, C.S., Lu, C.C., Martel, J., Ko, Y.F., Ojcius, D.M., Tseng, S.F., Wu, T.R., Chen, Y.Y.M., Young, J.D., Lai, H.C., 2015. *Ganoderma lucidum* reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota. *Nat. Commun.* 6, 1–17. <https://doi.org/10.1038/ncomms8489>
- Chang, C.W., Lur, H.S., Lu, M.K., Cheng, J.J., 2013. Sulfated polysaccharides of *Armillariella mellea* and their anti-inflammatory activities via NF- κ B suppression. *Food Res. Int.* 54, 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.005>
- Chang, M.Y., Tsai, G.J., Houg, J.Y., 2006. Optimization of the medium composition for the submerged culture of *Ganoderma lucidum* by Taguchi array design and steepest ascent method. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 407–414. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.06.011>
- Chang, S.T., Miles, P., 2004. *Mushrooms cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*. CRC Press/Taylor & Francis.
- Chang, S.T., Wasser, S.P., 2012. The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health, *Int. J. Med. Mushrooms* 14(2), 95–134.

- Chen, D.H., Shiou, W.Y., Wang, K.C., Huang, S.Y., Shie, Y.T., Tsai, C.M., Shie, J.F., Chen, K.D., 1999. Chemotaxonomy of triterpenoid pattern of HPLC of *Ganoderma jucidum* and *Ganoderma tsugae*. J. Chinese Chem. Soc. 46, 47–51.
- Chen, H., 2013. Modern solid state fermentation, modern solid state fermentation: Theory and practice. Springer, Nueva York. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6043-1>
- Chen, L., Cheung, P.C.K., 2014. Mushroom dietary fiber from the fruiting body of *Pleurotus tuber-regium*: Fractionation and structural elucidation of nondigestible cell wall components. J. Agric. Food Chem. 62, 2891–2899. <https://doi.org/10.1021/jf500112j>
- Chen, L., Ge, M.D., Zhu, Y.J., Song, Y., Cheung, P.C.K., Zhang, B.B., Liu, L.M., 2019. Structure, bioactivity and applications of natural hyperbranched polysaccharides. Carbohydr. Polym. 223, 115076. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115076>
- Chen, S., Xu, J., Liu, C., Zhu, Y., Nelson, D.R., Zhou, S., Li, C., Wang, L., Guo, X., Sun, Y., Luo, H., Li, Y., Song, J., Henrissat, B., Levasseur, A., Qian, J., Li, J., Luo, X., Shi, L., He, L., Xiang, L., Xu, X., Niu, Y., Li, Q., Han, M. V., Yan, H., Zhang, J., Chen, H., Lv, A., Wang, Z., Liu, M., Schwartz, D.C., Sun, C., 2012. Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. Nat. Commun. 3, 913–919. <https://doi.org/10.1038/ncomms1923>
- Chen, S., 2020. The Pharmacological effects of triterpenoids from *Ganoderma lucidum* and the regulation of its biosynthesis. Adv. Biol. Chem. 10, 55–65. <https://doi.org/10.4236/abc.2020.102005>
- Chen, S.N., Nan, F.H., Chen, S., Wu, J.F., Lu, C.L., Soni, M.G., 2011. Safety assessment of mushroom β -glucan: Subchronic toxicity in rodents and mutagenicity studies. Food Chem. Toxicol. 49, 2890–2898. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.08.007>
- Chen, Y., Xie, M.Y., Nie, S.P., Li, C., Wang, Y.X., 2008. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*. Food Chem. 107, 231–241. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.021>
- Cheng, S., Sliva, D., 2015. *Ganoderma lucidum* for cancer treatment: We are close but still not there. Integr. Cancer Ther. 14, 249–257. <https://doi.org/10.1177/1534735414568721>
- Chimyaem, W., Kluabwang, V., Santiwong, V., Intakhan, N., Mano, C., Junkum, A., Jariyapan, N., 2019. Evaluation of the Leishmanicidal potential of ethanolic extracts derived from *Cymbopogon citratus* leaves and *Ganoderma lucidum* fruiting bodies on *Leishmania martiniquensis* promastigotes. Chiang Mai Med. J. 58, 181–9.
- Chiu, S.W., Moore, D., 2009. Threats to biodiversity caused by traditional mushroom cultivation technology in China. Fungal Conserv. 111–119. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511565168.010>
- Chiu, S.W., Wang, Z.M., Leung, T.M., Moore, D., 2000. Nutritional value of *Ganoderma* extract and assessment of its genotoxicity and antigenotoxicity using comet assays of mouse lymphocytes. Food Chem. Toxicol. 38, 173–178. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00146-5](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00146-5)
- Choi, H.S., Sa, Y.S., 2000. Fibrinolytic and antithrombotic protease from *Ganoderma lucidum*. Mycologia 92, 545–552. <https://doi.org/10.2307/3761514>
- Chou, W.T., Sheih, I.C., Fang, T.J., 2013. The applications of polysaccharides from various mushroom wastes as prebiotics in different systems. J. Food Sci. 78. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12160>

- Chu, T.T.W., Benzie, I.F.F., Lam, C.W.K., Fok, B.S.P., Lee, K.K.C., Tomlinson, B., 2012. Study of potential cardioprotective effects of *Ganoderma lucidum* (Lingzhi): results of a controlled human intervention trial. *Br. J. Nutr.* 107, 1017–1027. <https://doi.org/10.1017/S0007114511003795>
- Clemente, J.C., Ursell, L.K., Parfrey, L.W., Knight, R., 2012. The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. *Cell* 148, 1258–1270. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035>
- Código Alimentario Argentino, 2023 (actualizado). Capítulo XVII, Alimentos de regimen o dietéticos. Accedido desde: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo_xvii_dieteticosactualiz_2023-12.pdf
- Cohen, N., Cohen, J., Asatiani, M.D., Varshney, V.K., Yu, H.T., Yang, Y.C., Li, Y.H., Mau, J.L., Wasser, S.P., 2014. Chemical composition and nutritional and medicinal value of fruit bodies and submerged cultured mycelia of culinary-medicinal higher basidiomycetes mushrooms. *Int. J. Med. Mushrooms* 16, 273–291. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v16.i3.80>
- Collado, M.C., Isolauri, E., Laitinen, K., Salminen, S., 2008. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *Am. J. Clin. Nutr.* 88, 894–899. <https://doi.org/10.1093/ajcn/88.4.894>
- Conceição, A.A., Cunha, J.R.B., Vieira, V.O., Pelaéz, R.D.R., Mendonça, S., Almeida, J.R.M., Dias, E.S., de Almeida, E.G., de Siqueira, F.G., 2018. Bioconversion and biotransformation efficiencies of wild macrofungi, in: *Biology of Macrofungi, Fungal Biology*. Springer Nature, Cham, Switzerland, pp. 361–377. https://doi.org/10.1007/978-3-030-02622-6_18
- Correia de Lima Júnior, N., Baptista Gibertoni, T., Malosso, E., 2014. Delimitation of some neotropical laccate *Ganoderma* (*Ganodermataceae*): molecular phylogeny and morphology. *Int. J. Trop. Biol.* 62, 1197–1208.
- COSAVE, 2021. Lista de las principales plagas cuarentenarias para la region del COSAVE. Accedido desde: <http://www.cosave.org/sites/default/files/paginas/adjuntos/Anx%20Res%20294-101-21D%20Lista%20PC.pdf>
- Costa-Rezende, D.H., Robledo, G.L., Góes-Neto, A., Reck, M.A., Crespo, E., Drechsler-Santos, E.R., 2017. Morphological reassessment and molecular phylogenetic analyses of *Amauroderma* s. lat. Raised new perspectives in the generic classification of the *Ganodermataceae* family. *Persoonia Mol. Phylogeny Evol. Fungi* 39, 254–269. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2017.39.10>
- Costea, P.I., Hildebrand, F., Manimozhiyan, A., Bäckhed, F., Blaser, M.J., Bushman, F.D., De Vos, W.M., Ehrlich, S.D., Fraser, C.M., Hattori, M., Huttenhower, C., Jeffery, I.B., Knights, D., Lewis, J.D., Ley, R.E., Ochman, H., O'Toole, P.W., Quince, C., Relman, D.A., Shanahan, F., Sunagawa, S., Wang, J., Weinstock, G.M., Wu, G.D., Zeller, G., Zhao, L., Raes, J., Knight, R., Bork, P., 2017. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat. Microbiol.* 3, 8–16. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0072-8>
- Cui, M. lin, Yang, H. yi, He, G. qing, 2015. Submerged fermentation production and characterization of intracellular triterpenoids from *Ganoderma lucidum* using HPLC-ESI-MS. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 16, 998–1010. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1500147>

Curvetto N.R., 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, N.R, Gonzalez-Matute, R., Figlas, D., Delmastro, S., 2002. Sunflower seed-based medium for growth of *Ganoderma* spp, in: *Mushroom biology and mushroom products proceedings of the fourth international conference*. <https://doi.org/10.2307/3760555>

Curvetto, N.R.; Figlas, D.; Gonzalez-Matute, R.; Delmastro, S., 2005. Shiitake cultivation part I Shiitake, in: *Mushroom Growers Handbook 2*. pp. 100–104.

Cuskin, F., Lowe, E.C., Temple, M.J., Zhu, Y., Cameron, E.A., Pudlo, N.A., Porter, N.T., Urs, K., Thompson, A.J., Cartmell, A., Rogowski, A., Hamilton, B.S., Chen, R., Tolbert, T.J., Piens, K., Bracke, D., Vervecken, W., Hakki, Z., Speciale, G., Munoz-Munoz, J.L., Day, A., Peña, M.J., McLean, R., Suits, M.D., Boraston, A.B., Atherly, T., Ziemer, C.J., Williams, S.J., Davies, G.J., Abbott, W.D., Martens, E.C., Gilbert, H.J., 2015. Human gut *Bacteroidetes* can utilize yeast mannan through a selfish mechanism. *Nature* 517, 165–169. <https://doi.org/10.1038/nature13995>

Dallegrave, A., Pizzolato, T.M., Barreto, F., Eljarrat, E., Barceló, D., 2016. Methodology for trace analysis of 17 pyrethroids and chlorpyrifos in foodstuff by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 7689–7697. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9865-5>

de Borhegyi, C., 2010. Breaking the mushroom code. Accedido desde: www.mushroomstone.com

de Jesus, L.I., Smiderle, F.R., Cordeiro, L.M.C., de Freitas, R.A., Van Griensven, L.J.L.D., Iacomini, M., 2018. Simple and effective purification approach to dissociate mixed water-insoluble α - and β -D-glucans and its application on the medicinal mushroom *Fomitopsis betulina*. *Carbohydr. Polym.* 200, 353–360. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.004>

DeFilipp, Z., Bloom, P.P., Torres Soto, M., Mansour, M.K., Sater, M.R.A., Huntley, M.H., Turbett, S., Chung, R.T., Chen, Y.-B., Hohmann, E.L., 2019. Drug-resistant *E. coli* bacteremia transmitted by fecal microbiota transplant. *N. Engl. J. Med.* 381, 2043–2050. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1910437>

Den Besten, G., Van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.J., Bakker, B.M., 2013. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.* 54, 2325–2340. <https://doi.org/10.1194/jlr.R036012>

Deng, Y., Ma, J., Tang, D., Zhang, Q., 2021. Dynamic biomarkers indicate the immunological benefits provided by *Ganoderma* spore powder in post-operative breast and lung cancer patients. *Clin. Transl. Oncol.* 23, 1481–1490. <https://doi.org/10.1007/s12094-020-02547-9>

Derbyshire, E.J., Delange, J., 2021. Fungal Protein – What is it and what is the health evidence? A systematic review focusing on mycoprotein. *Front. Sustain. Food Syst.* 5. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.581682>

Desai, M.S., Seekatz, A.M., Koropatkin, N.M., Kamada, N., Hickey, C.A., Wolter, M., Pudlo, N.A., Kitamoto, S., Terrapon, N., Muller, A., Young, V.B., Henrissat, B., Wilmes, P., Stappenbeck, T.S., Núñez, G., Martens, E.C., 2016. A dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus barrier and enhances pathogen susceptibility. *Cell* 167, 1339–1353.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.043>

De Simone, D., Annesi, T., 2012. Occurrence of *Ganoderma adpersum* on *Pinus pinea*. *Phytopathol. Mediterr.* 51, 374–382.

- Di Mario, F., Rapanà, P., Tomati, U., Galli, E., 2008. Chitin and chitosan from *Basidiomycetes*. *Int. J. Biol. Macromol.* 43, 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.10.005>
- Di Pierro, F., 2021. A possible perspective about the compositional models, evolution, and clinical meaning of human enterotypes. *Microorganisms* 9, 1–17. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112341>
- Ding, Q., Nie, S., Hu, J., Zong, X., Li, Q., Xie, M., 2017. In vitro and in vivo gastrointestinal digestion and fermentation of the polysaccharide from *Ganoderma atrum*. *Food Hydrocoll.* 63, 646–655. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.018>
- Ding, Z., Wang, Q., Peng, L., Zhang, L., Gu, Z., Shi, G., Zhang, K., 2012. Relationship between mycelium morphology and extracellular polysaccharide production of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* in submerged culture. *J. Med. Plants Res.* 6, 2868–2874. <https://doi.org/10.5897/jmpr11.1523>
- Donatini, B., 2014. Control of oral human papillomavirus (HPV) by medicinal mushrooms, *Trametes versicolor* and *Ganoderma lucidum*: A preliminary clinical trial. *Int. J. Med. Mushrooms* 16, 497–498. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v16.i5.80>
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J.C., Schorr-Galindo, S., 2012. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydr. Polym.* 87, 951–962. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.083>
- Dörfelt, H., Schmidt, A.R., 2005. A fossil *Aspergillus* from Baltic amber. *Mycol. Res.* 109, 956–960. <https://doi.org/10.1017/S0953756205003497>
- Doriya, K., Jose, N., Gowda, M., Kumar, D.S., 2016. Solid-State fermentation vs submerged fermentation for the production of L-asparaginase, 1st ed, *Advances in Food and Nutrition Research*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.05.003>
- Douglas, A.E., Werren, J.H., 2016. Holes in the hologenome: Why host-microbe symbioses are not holobionts. *MBio* 7. <https://doi.org/10.1128/mBio.02099-15>
- Douglas, G.M., Beiko, R.G., Langille, M.G.I., 2018. Predicting the functional potential of the microbiome from marker genes using PICRUSt. *Methods Mol. Biol.* 1849, 169–177. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8728-3_11
- Douglas, G.M., Maffei, V.J., Zaneveld, J.R., Yurgel, S.N., Brown, J.R., Taylor, C.M., Huttenhower, C., Langille, M.G.I., 2020. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nat. Biotechnol.* 38, 685–688.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28, 3, 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Economou, C.N., Diamantopoulou, P.A., Philippoussis, A.N., 2017. Valorization of spent oyster mushroom substrate and laccase recovery through successive solid state cultivation of *Pleurotus*, *Ganoderma*, and *Lentinula* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 5213–5222. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8251-3>
- Edwards, D., Kenrick, P., Dolan, L., 2018. History and contemporary significance of the rhynie cherts—our earliest preserved terrestrial ecosystem. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 373. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0489>
- EFSA, 2009. EFSA sets lower tolerable intake level for cadmium in food. Accedido desde: <https://www.efsa.europa.eu/en/news/efsa-sets-lower-tolerable-intake-level-cadmium-food>

- Eisenstein, M., 2022. Seeking therapeutic opportunities amid the complexity of the microbiome. Biopharma Deal. <https://doi.org/10.1038/d43747-022-00234-y>
- Elisashvili, V., 2012. Submerged cultivation of medicinal mushrooms: Bioprocesses and products (review). Int. J. Med. Mushrooms 14, 211–239. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v14.i3.10>
- El Sheikha, A.F., 2022. Nutritional profile and health benefits of *Ganoderma lucidum* “Lingzhi, Reishi, or Mannentake” as Functional Foods: Current Scenario and Future Perspectives. Foods 11, 1030. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/foods11071030>
- El-Jurdi, N., Ghannoum, M., 2017. The mycobiome: Impact on health and disease states. The Fungal Kingdom 845–854. <https://doi.org/10.1128/9781555819583.ch40>
- Elkhateeb, W.A., Ghoson, M.D., 2022. Medicinal mushroom: What should we know? Int. J. Pharm. Chem. Anal. 9, 1–9. <https://doi.org/10.18231/j.ijpca.2022.001>
- Ellefsen, C.F., Wold, C.W., Wilkins, A.L., Rise, F., Samuelsen, A.B.C., 2021. Water-soluble polysaccharides from *Pleurotus eryngii* fruiting bodies, their activity and affinity for Toll-like receptor 2 and dectin-1. Carbohydr. Polym. 264, 117991. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117991>
- Faith, J.J., Guruge, J.L., Charbonneau, M., Subramanian, S., Seedorf, H., Goodman, A.L., Clemente, J.C., Knight, R., Heath, A.C., Leibel, R.L., Rosenbaum, M., Gordon, J.I., 2013. The long-term stability of the human gut microbiota. Science 341, 6141. <https://doi.org/10.1126/science.1237439>
- Falandysz, J., Borovička, J., 2013. Macro and trace mineral constituents and radionuclides in mushrooms: Health benefits and risks. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 477–501. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4552-8>
- Fang, Y., Sun, X., Yang, W., Ma, N., Xin, Z., Fu, J., Liu, X., Liu, M., Mariga, A.M., Zhu, X., Hu, Q., 2014. Erratum: Concentrations and health risks of lead, cadmium, arsenic, and mercury in rice and edible mushrooms in China (Food Chemistry (2013) 147 (147-151)). Food Chem. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.078>
- Farup, P.G., Rudi, K., Hestad, K., 2016. Faecal short-chain fatty acids - a diagnostic biomarker for irritable bowel syndrome? BMC Gastroenterol. 16, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12876-016-0446-z>
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution (N. Y). 39, 783–791.
- Fernandez-Julia, P., Commane, D.M., van Sinderen, D., Munoz-Munoz, J., 2022. Cross-feeding interactions between human gut commensals belonging to the *Bacteroides* and *Bifidobacterium* genera when grown on dietary glycans. Microbiome Res. Reports 1–12. <https://doi.org/10.20517/mrr.2021.05>
- Finlay, R., Wallander, H., Smits, M., Holmstrom, S., Hees, P.V.A.N., Lian, B., Rosling, A., 2009. The role of fungi in biogenic weathering in boreal forest soils. Fungal Biol. Rev. 23, 101–106. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2010.03.002>
- Finnigan, T.J.A., Wall, B.T., Wilde, P.J., Stephens, F.B., Taylor, S.L., Freedman, M.R., 2019. Mycoprotein: The future of nutritious nonmeat protein, a symposium review. Curr. Dev. Nutr. 3, nzz021. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzz021>
- Fleißner, A., Herzog, S., 2016. Signal exchange and integration during self-fusion in filamentous fungi. Semin. Cell Dev. Biol. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.03.016>

- Fomina, M., Skorochod, I., 2020. Microbial interaction with clay minerals and its environmental and biotechnological implications. *Minerals* 10, 1–54. <https://doi.org/10.3390/min10100861>
- Food and Drug Administration (FDA), 2009. GRAS Notice No. 309 for black yeast beta-glucan(Polycan@).
- Food and Drug Administration (FDA), 2011. Notification of GRAS Determination for β -glucans derived from mushroom.
- Food and Drug Administration (FDA), 2012. GRAS Notice No. 413 Beta glucans derived from *Ganoderma lucidum* mycelium.
- Foster, K.R., Schluter, J., Coyte, K.Z., Rakoff-Nahoum, S., 2017. The evolution of the host microbiome as an ecosystem on a leash. *Nature* 548, 43–51. <https://doi.org/10.1038/nature23292>
- Francia, D., Chiltz, A., Lo, F., Pugin, A., Bonfante, P., Cardinale, F., 2011. AM fungal exudates activate MAP kinases in plant cells in dependence from cytosolic Ca^{2+} increase. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 963–969. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.04.008>
- Frolova, M.S., Suvorova, I.A., Iablokov, S.N., Petrov, S.N., Rodionov, D.A., 2022. Genomic reconstruction of short-chain fatty acid production by the human gut microbiota. *Front. Mol. Biosci.* 9, 1–25. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.949563>
- Furlani, R.P.Z., Godoy, H.T., 2008. Vitamins B1 and B2 contents in cultivated mushrooms. *Food Chem.* 106, 816–819. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.007>
- Futrakul, N., Panichakul, T., Butthep, P., Futrakul, P., Jetanalin, P., Patumraj, S., Siriviriyakul, P., 2004. *Ganoderma lucidum* suppresses endothelial cell cytotoxicity and proteinuria in persistent proteinuric focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) nephrosis. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 31(4), 267–72.
- Galinari, É., Sabry, D.A., Sasaki, G.L., Macedo, G.R., Passos, F.M.L., Mantovani, H.C., Rocha, H.A.O., 2017. Chemical structure, antiproliferative and antioxidant activities of a cell wall α -D-mannan from yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Carbohydr. Polym.* 157, 1298–1305. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.015>
- Gantner, B.N., Simmons, R.M., Canavera, S.J., Akira, S., Underhill, D.M., 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and toll-like receptor 2. *J. Exp. Med.* 197, 1107–1117. <https://doi.org/10.1084/jem.20021787>
- García Rollán, M., 1985. Nuevas tecnicas de cultivo del *Pleurotus ostreatus*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Publicaciones de Extensión Agraria, Madrid. Accedido desde https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1985_08.pdf
- Gardes, M., Bruns, T.D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2, 113–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
- Gasaly, N., de Vos, P., Hermoso, M.A., 2021. Impact of Bacterial Metabolites on Gut Barrier Function and Host Immunity: A focus on bacterial metabolism and its relevance for intestinal inflammation. *Front. Immunol.* 12, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.658354>
- Ghahremani-Majd, H., Dashti, F., 2015. Chemical composition and antioxidant properties of cultivated button mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Hortic. Environ. Biotechnol.* 56, 376–382. <https://doi.org/10.1007/s13580-015-0124-z>

- Ghannoum, M.A., Jurevic, R.J., Mukherjee, P.K., Cui, F., Sikaroodi, M., Naqvi, A., Gillevet, P.M., 2010. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog.* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000713>
- Gill, S.K., Rieder, M.J., 2008. Toxicity of a traditional Chinese medicine, *Ganoderma lucidum*, in children with cancer. *Can. J. Clin. Pharmacol.* 15.
- González-Hernández, R.A., Valdez-Cruz, N.A., Macías-Rubalcava, M.L., Trujillo-Roldán, M.A., 2023. Overview of fungal terpene synthases and their regulation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 39, 194. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03635-y>
- Gottlieb, A.M., Ferrer, E., Wright, J.E., 2000. rDNA analyses as an aid to the taxonomy of species of *Ganoderma*. *Mycol. Res.* 104, 1033–1045. <https://doi.org/10.1017/S095375620000304X>
- Gowthaman, M.K., Krishna, C., Moo-Young, M., 2001. Fungal solid state fermentation - an overview. *Appl. Mycol. Biotechnol.* 1, 305–352. [https://doi.org/10.1016/S1874-5334\(01\)80014-9](https://doi.org/10.1016/S1874-5334(01)80014-9)
- Graham, L.E., Cook, M.E., Hanson, D.T., Pigg, K.B., Graham, J.M., 2010. Structural, physiological, and stable carbon isotopic evidence that the enigmatic Paleozoic fossil *Prototaxites* formed from rolled liverwort mats. *Am. J. Bot.* 97, 268–275. <https://doi.org/10.3732/ajb.0900322>
- Grangeia, C., Heleno, S.A., Barros, L., Martins, A., Ferreira, I.C.F.R., 2011. Effects of trophism on nutritional and nutraceutical potential of wild edible mushrooms. *Food Res. Int.* 44, 1029–1035. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.006>
- Grondin, J.M., Tamura, K., Déjean, G., Abbott, D.W., Brumer, H., 2017. Polysaccharide utilization loci: Fueling microbial communities. *J. Bacteriol.* 199, 1–15. <https://doi.org/10.1128/JB.00860-16>
- Guo, Cuiling, Guo, D., Fang, L., Sang, T., Wu, J., Guo, Chengjie, Wang, Yujie, Wang, Ying, Chen, C., Chen, J., Chen, R., Wang, X., 2021. *Ganoderma lucidum* polysaccharide modulates gut microbiota and immune cell function to inhibit inflammation and tumorigenesis in colon. *Carbohydr. Polym.* 267, 118231. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118231>
- Guo, Cuiling, Guo, D., Fang, L., Sang, T., Wu, J., Guo, Chengjie, Wang, Yujie, Wang, Ying, Chen, C., Chen, J., Chen, R., Wang, X., 2021. *Ganoderma lucidum* polysaccharide modulates gut microbiota and immune cell function to inhibit inflammation and tumorigenesis in colon. *Carbohydr. Polym.* 267, 118231. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118231>
- Guo, Q., Cui, S.W., Kang, J., Ding, H., Wang, Q., Wang, C., 2015. Non-starch polysaccharides from American ginseng: Physicochemical investigation and structural characterization. *Food Hydrocoll.* 44, 320–327. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.031>
- Guo, X.Y., Han, J., Ye, M., Ma, X.C., Shen, X., Xue, B. Bin, Che, Q.M., 2012. Identification of major compounds in rat bile after oral administration of total triterpenoids of *Ganoderma lucidum* by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 63, 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.01.030>
- Halbwachs, H., Bässler, C., 2015. Gone with the wind - A review on basidiospores of lamellate agarics. *Mycosphere* 6, 78–112. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/6/1/10>
- Hamaker, B.R., Tuncil, Y.E., 2014. A perspective on the complexity of dietary fiber structures and their potential effect on the gut microbiota. *J. Mol. Biol.* 426, 3838–3850. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.07.028>

- Hammann, S., Kröpfl, A., Vetter, W., 2016. More than 170 polyunsaturated tocopherol-related compounds in a vitamin E capsule: Countercurrent chromatographic enrichment, gas chromatography/mass spectrometry analysis and preliminary identification of the potential artefacts. *J. Chromatogr. A* 1476, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.11.018>
- Hammann, S., Lehnert, K., Vetter, W., 2016. Esterified sterols and their contribution to the total sterols in edible mushrooms. *J. Food Compos. Anal.* 54, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.10.002>
- Han, X.Q., Wu, X.M., Chai, X.Y., Chen, D., Dai, H., Dong, H.L., Ma, Z.Z., Gao, X.M., Tu, P.F., 2011. Isolation, characterization and immunological activity of a polysaccharide from the fruit bodies of an edible mushroom, *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito. *Food Res. Int.* 44, 489–493. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.06.009>
- Han, Z.H., Ye, J.M., Wang, G.F., 2013. Evaluation of in vivo antioxidant activity of *Hericium erinaceus* polysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol.* 52, 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.09.009>
- Hapuarachchi, K., 2019. *Ganodermataceae* (Polyporales): Diversity in Greater Mekong Subregion countries (China, Laos, Myanmar, Thailand and Vietnam). *Mycosphere* 10, 221–309. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/10/1/6>
- Hapuarachchi, K.K., Elkhateeb, W.A., Karunarathna, S.C., Cheng, C.R., Bandara, A.R., Kakumyan, P., Hyde, K.D., Daba, G.M., Wen, T.C., 2018. Current status of global *Ganoderma* cultivation, products, industry and market. *Mycosphere* 9, 1025–1052. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/9/5/6>
- Haritash, A.K., Kaushik, C.P., 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *J. Hazard. Mater.* 169, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>
- Hatakka, A., 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 125–135. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00039.x>
- He, X., Chen, Y., Li, Z., Fang, L., Chen, H., Liang, Z., Abozeid, A., Yang, Z., Yang, D., 2023. Germplasm resources and secondary metabolism regulation in Reishi mushroom (*Ganoderma lucidum*). *Chinese Herb. Med.* 15, 376–382. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2023.01.005>
- Heckman, D.S., Geiser, D.M., Eidell, B.R., Stauffer, R.L., Kardos, N.L., Hedges, S.B., 2001. Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* 293, 1129–1133. <https://doi.org/10.1126/science.1061457>
- Heiman, M.L., Greenway, F.L., 2016. A healthy gastrointestinal microbiome is dependent on dietary diversity. *Mol. Metab.* 5, 317–320. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.02.005>
- Hennicke, F., Cheikh-Ali, Z., Liebisch, T., MacIá-Vicente, J.G., Bode, H.B., Piepenbring, M., 2016. Distinguishing commercially grown *Ganoderma lucidum* from *Ganoderma lingzhi* from Europe and East Asia on the basis of morphology, molecular phylogeny, and triterpenic acid profiles. *Phytochemistry* 127, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.03.012>
- Hijikata, Y., Yamada, S., Yasuhara, A., 2007. Herbal mixtures containing the mushroom *Ganoderma lucidum* improve recovery time in patients with herpes genitalis and labialis. *J. Altern. Complement. Med.* 13, 985–987. <https://doi.org/10.1089/acm.2006.6297>

- Ho, L.H., Asyikeen Zulkifli, N., Tan, T.-C., 2020. Edible Mushroom: Nutritional properties, potential nutraceutical values, and its utilisation in food product development. An Introd. to Mushroom. <https://doi.org/10.5772/intechopen.91827>
- Hobbs, C., 1986. Medicinal Mushrooms: An exploration of tradition, healing & culture. Botanica Press, Tennessee, 251 pp.
- Hoek-Van Den Hil, E.F., Van Asselt, E.D., 2019. Chemical hazards in the mushroom supply chain.
- Homayouni Rad, A., Aghebati Maleki, L., Samadi Kafil, H., Abbasi, A., 2021. Postbiotics: A novel strategy in food allergy treatment. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 61, 492–499. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1738333>
- Hong, F., Yan, J., Baran, J.T., Allendorf, D.J., Hansen, R.D., Ostroff, G.R., Xing, P.X., Cheung, N.V., Ross, G.D., 2004. Mechanism by which orally administered β -1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. J. Immunol. 173, 797–806. <https://doi.org/https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.797>
- Hou, R., Jiang, C., Zheng, Q., Wang, C., Xu, J.R., 2015. The AreA transcription factor mediates the regulation of deoxynivalenol (DON) synthesis by ammonium and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signalling in *Fusarium graminearum*. Mol. Plant Pathol. 16, 987–999. <https://doi.org/10.1111/mpp.12254>
- Hsu, K. Di, Cheng, K.C., 2018. From nutraceutical to clinical trial: frontiers in *Ganoderma* development. Appl. Microbiol. Biotechnol. 102, 9037–9051. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9326-5>
- Hsu, T.L., Cheng, S.C., Yang, W. Bin, Chin, S.W., Chen, B.H., Huang, M.T., Hsieh, S.L., Wong, C.H., 2009. Profiling carbohydrate-receptor interaction with recombinant innate immunity receptor-Fc fusion proteins. J. Biol. Chem. 284, 34479–34489. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.065961>
- Hu, M., Zhang, P., Wang, R., Zhou, M., Pang, N., Cui, X., Ge, X., Liu, X., Huang, X.F., Yu, Y., 2022. Three different types of β -glucans enhance cognition: The Role of the Gut-Brain Axis. Front. Nutr. 9, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.848930>
- Huang, L., Sun, F., Liang, C., He, Y.X., Bao, R., Liu, L., Zhou, C.Z., 2009. Crystal structure of LZ-8 from the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*. Proteins Struct. Funct. Bioinforma. 75, 524–527. <https://doi.org/10.1002/prot.22346>
- Huang, Y., Li, X., Peng, X., Adegoke, A.T., Chen, J., Su, H., Hu, G., Wei, G., Qiu, M., 2020. NMR-based structural classification, identification, and quantification of triterpenoids from edible mushroom *Ganoderma resinaceum*. J. Agric. Food Chem. 68, 2816–2825. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07791>
- Hueber, F.M., 2001. Rotted wood-alga-fungus: The history and life of *Prototaxites* Dawson 1859. Rev. Palaeobot. Palynol. 116, 123–158. [https://doi.org/10.1016/S0034-6667\(01\)00058-6](https://doi.org/10.1016/S0034-6667(01)00058-6)
- Huie, C.W., Di, X., 2004. Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 812, 241–257. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.08.038>
- Hyde, K.D., 2022. The numbers of fungi. Fungal Divers. 114, 1. <https://doi.org/10.1007/s13225-022-00507-y>

- Hynes, J., Müller, C.T., Jones, T.H., Boddy, L., 2007. Changes in volatile production during the course of fungal mycelial interactions between *Hypholoma fasciculare* and *Resinicium bicolor*. *J. Chem. Ecol.* 33, 43–57. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9209-6>
- Jargalmaa, S., Eimes, J.A., Park, M.S., Park, J.Y., Oh, S.Y., Lim, Y.W., 2017. Taxonomic evaluation of selected *Ganoderma* species and database sequence validation. *PeerJ* 2017, 1–16. <https://doi.org/10.7717/peerj.3596>
- Jasinghe, V.J., Perera, C.O., Sablani, S.S., 2007. Kinetics of the conversion of ergosterol in edible mushrooms. *J. Food Eng.* 79, 864–869. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.01.085>
- Jaworska, G., Pogoń, K., Bernaś, E., Duda-Chodak, A., 2015. Nutraceuticals and antioxidant activity of prepared for consumption commercial mushrooms *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*. *J. Food Qual.* 38, 111–122. <https://doi.org/10.1111/jfq.12132>
- Jeitler, M., Michalsen, A., Frings, D., Hübner, M., Fischer, M., Koppold-Liebscher, D.A., Murthy, V., Kessler, C.S., 2020. Significance of Medicinal Mushrooms in Integrative Oncology: A Narrative Review. *Front. Pharmacol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.580656>
- Jeurink, P. V., Noguera, C.L., Savelkoul, H.F.J., Wichers, H.J., 2008. Immunomodulatory capacity of fungal proteins on the cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. *Int. Immunopharmacol.* 8, 1124–1133. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.04.004>
- Jin, M., Zhang, H., Wang, J., Shao, D., Yang, H., Huang, Q., Shi, J., Xu, C., Zhao, K., 2019. Response of intestinal metabolome to polysaccharides from mycelia of *Ganoderma lucidum*. *Int. J. Biol. Macromol.* 122, 723–731. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.224>
- Jin, M., Zhu, Y., Shao, D., Zhao, K., Xu, C., Li, Q., Yang, H., Huang, Q., Shi, J., 2017. Effects of polysaccharide from mycelia of *Ganoderma lucidum* on intestinal barrier functions of rats. *Int. J. Biol. Macromol.* 94, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.099>
- Jin, X., Ruiz Beguerie, J., Sze, D.M.Y., Chan, G.C.F., 2016. *Ganoderma lucidum* (Reishi mushroom) for cancer treatment. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2016. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007731.pub3>
- Jonathan, M.C., Van Den Borne, J.J.G.C., Van Wiechen, P., Souza Da Silva, C., Schols, H.A., Gruppen, H., 2012. In vitro fermentation of 12 dietary fibres by faecal inoculum from pigs and humans. *Food Chem.* 133, 889–897. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.110>
- Joseph, S., Sabulal, B., George, V., Smina, T.P., Janardhanan, K.K., 2009. Antioxidative and antiinflammatory activities of the chloroform extract of *Ganoderma lucidum* found in South India. *Sci. Pharm.* 77, 111–121. <https://doi.org/10.3797/scipharm.0808-17>
- Jumpertz, R., Le, D.S., Turnbaugh, P.J., Trinidad, C., Bogardus, C., Gordon, J.I., Krakoff, J., 2011. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 94, 58–65. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.010132>
- Junior Letti, L.A., Destéfani Vítola, F.M., Vinícius de Melo Pereira, G., Karp, S.G., Pedroni Medeiros, A.B., Ferreira da Costa, E.S., Bissoqui, L., Soccol, C.R., 2017. Solid-state fermentation for the production of mushrooms, in: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Current Advances in Solid-State Fermentation*. Elsevier B.V, pp. 285–318. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00014-1>
- Kaakoush, N.O., 2015. Insights into the role of *Erysipelotrichaceae* in the human host. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5, 1–4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00084>

- Kagnoff, M., 1996. Oral tolerance: Mechanisms and possible role in inflammatory joint diseases. *Baillieres. Clin. Rheumatol.* 10, 41–54. [https://doi.org/10.1016/S0950-3579\(96\)80005-7](https://doi.org/10.1016/S0950-3579(96)80005-7)
- Kalač, P., 2013. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *J. Sci. Food Agric.* 93, 209–218. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5960>
- Kalač, P., Svoboda, L., 2000. A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chem.* 69, 273–281.
- Kaliyaperumal, M., Kezo, K., Gunaseelan, S., 2018. A global overview of edible mushrooms. https://doi.org/10.1007/978-3-030-02622-6_2
- Kall, M.A., 2003. Determination of total vitamin B6 in foods by isocratic HPLC: A comparison with microbiological analysis. *Food Chem.* 82, 315–327. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00568-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00568-X)
- Kanagasabapathy, G., Malek, S.N.A., Kuppusamy, U.R., Vikineswary, S., 2011. Chemical composition and antioxidant properties of extracts of fresh fruiting bodies of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) singer. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2618–2626. <https://doi.org/10.1021/jf104133g>
- Kang, X., Kirui, A., Muszyński, A., Widanage, M.C.D., Chen, A., Azadi, P., Wang, P., Mentink-Vigier, F., Wang, T., 2018. Molecular architecture of fungal cell walls revealed by solid-state NMR. *Nat. Commun.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05199-0>
- Kao, C.H.J., Jesuthasan, A.C., Bishop, K.S., Glucina, M.P., Ferguson, L.R., 2013. Anti-cancer activities of *Ganoderma lucidum*: Active ingredients and pathways. *Funct. Foods Heal. Dis.* 3, 48–65. <https://doi.org/10.31989/ffhd.v3i2.65>
- Kaoutari, A. El, Armougom, F., Gordon, J.I., Raoult, D., Henrissat, B., 2013. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 497–504. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3050>
- Karmani, M., Subramaniam, G., Sivasamugham, L.A., Cheng, W.H., Wong, L.S., 2022. Effects of different substrates on the growth and nutritional composition of *Pleurotus ostreatus*: A Review. *J. Exp. Biol. Agric. Sci.* 10, 481–486. [https://doi.org/10.18006/2022.10\(3\).481.486](https://doi.org/10.18006/2022.10(3).481.486)
- Kavishree, S., Hemavathy, J., Lokesh, B.R., Shashirekha, M.N., Rajarathnam, S., 2008. Fat and fatty acids of Indian edible mushrooms. *Food Chem.* 106, 597–602. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.018>
- Kawagishi, H., Mitsunaga, S.I., Yamawaki, M., Ido, M., Shimada, A., Kinoshita, T., Murata, T., Usui, T., Kimura, A., Chiba, S., 1997. Aleletin from mycelia of the fungus *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* 44, 7–10. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00492-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00492-X)
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A., 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Keegan, R.J.H., Lu, Z., Bogusz, J.M., Williams, J.E., Holick, M.F., 2013. Photobiology of vitamin D in mushrooms and its bioavailability in humans. *Dermatoendocrinol.* 5, 165–176. <https://doi.org/10.4161/derm.23321>
- Keller, N.P., 2019. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 167–180. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0121-1>

- Khani, R., Moudi, M., Khojeh, V., 2017. Contamination level, distribution and health risk assessment of heavy and toxic metallic and metalloid elements in a cultivated mushroom *Pleurotus florida* (Mont.) singer. Environ. Sci. Pollut. Res. 24, 4699–4708. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8222-8>
- Killinger, B.J., Whidbey, C., Sadler, N.C., DeLeon, A.J., Munoz, N., Kim, Y.M., Wright, A.T., 2022. Activity-based protein profiling identifies alternating activation of enzymes involved in the bifidobacterium shunt pathway or mucin degradation in the gut microbiome response to soluble dietary fiber. npj Biofilms Microbiomes 8, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41522-022-00313-z>
- Kim, C., Nartea, T.J., Pao, S., Li, H., Jordan, K.L., Xu, Y., Stein, R.A., Sismour, E.N., 2016. Evaluation of microbial loads on dried and fresh Shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) as Obtained from Internet and Local Retail Markets, Respectively. Food Saf. 4, 45–51. <https://doi.org/10.14252/foodsafetyfscj.2016005>
- Kim, H.H., Na, J.G., Chang, Y.K., Chun, G.T., Lee, S.J., Jeong, Y.H., 2004. Optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exopolysaccharides production by *Agaricus blazei*. J. Microbiol. Biotechnol. 14 (5), 944–951.
- Kim, M.J., Kim, H.W., Lee, Y., Shim, M.J., 1986. Studies on Safety of *Ganoderma lucidum*.pdf. Korean J. Mycol. 14, 49–59.
- Kimura, M., Kushi, T., Shibuya, M., Ebizuka, Y., Abe, I., 2010. Protostadienol synthase from *Aspergillus fumigatus*: Functional conversion into lanosterol synthase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 391, 899–902. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.160>
- Kinge, T.R., Adi, E.M., Mih, A.M., Ache, N.A., Nji, T.M., 2016. Effect of substrate on the growth, nutritional and bioactive components of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida*. African J. Biotechnol. 15, 1476–1486. <https://doi.org/10.5897/ajb2015.15130>
- Kino, K., Yamashita, A., Yamaoka, K., Watanabe, J., Tanaka, S., Ko, K., Shimizu, K., Tsunoo, H., 1989. Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, Ling Zhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidum*. J. Biol. Chem. 264, 472–478. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)31282-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)31282-6)
- Kirtzel, J., Siegel, D., Krause, K., Kothe, E., 2017. Stone-Eating Fungi: Mechanisms in bioweathering and the potential role of laccases in black slate degradation with the *Basidiomycete Schizophyllum commune*, Advances in Applied Microbiology. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2017.01.002>
- Kivrak, I., 2015. Chemical constituents: Water-soluble vitamins, free amino acids and sugar profile from *Ganoderma adspersum*. Nat. Prod. Res. 29, 518–523. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.952234>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Res. 41, 1–11. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Köhler, J.R., Casadevall, A., Perfect, J., 2015. The spectrum of fungi that infects humans. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019273>
- Kok, C.R., Rose, D., Hutkins, R., 2023. Predicting Personalized Responses to Dietary Fiber Interventions: Opportunities for modulation of the gut microbiome to improve health. Annu. Rev. Food Sci. Technol. 14, 157–182. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-060721-015516>

- Komura, D.L., Carbonero, E.R., Gracher, A.H.P., Baggio, C.H., Freitas, C.S., Marcon, R., Santos, A.R.S., Gorin, P.A.J., Iacomini, M., 2010. Structure of *Agaricus* spp. fucogalactans and their anti-inflammatory and antinociceptive properties. *Bioresour. Technol.* 101, 6192–6199. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.142>
- Konstantinov, S.R., Kuipers, E.J., Peppelenbosch, M.P., 2013. Functional genomic analyses of the gut microbiota for crc screening. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 741–745. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.178>
- Kovatcheva-Datchary, P., Nilsson, A., Akrami, R., Lee, Y.S., De Vadder, F., Arora, T., Hallen, A., Martens, E., Björck, I., Bäckhed, F., 2015. Dietary fiber-induced improvement in glucose metabolism is associated with increased abundance of *Prevotella*. *Cell Metab.* 22, 971–982. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.10.001>
- Kozarski, M., Klaus, A., Jakovljevic, D., Todorovic, N., Vunduk, J., Petrović, P., Niksic, M., Vrvic, M.M., Van Griensven, L., 2015. Antioxidants of edible mushrooms. *Molecules* 20, 19489–19525. <https://doi.org/10.3390/molecules201019489>
- Krause, K., Jung, E.M., Lindner, J., Hardiman, I., Poetschner, J., Madhavan, S., Matthäus, C., Kai, M., Menezes, R.C., Popp, J., Svatoš, A., Kothe, E., 2020. Response of the wood-decay fungus *Schizophyllum commune* to co-occurring microorganisms. *PLoS One* 15, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232145>
- Krings, M., Harper, C.J., Taylor, E.L., 2018. Fungi and fungal interactions in the Rhynie chert: A review of the evidence, with the description of *Perexiflasca tayloriana* gen. et sp. nov. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 373. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0500>
- Kubota, T., Asaka, Y., Miura, I., Mori, H., 1982. Structures of Ganoderic Acid A and B, two new lanostane type bitter triterpenes from *Ganoderma lucidum* (FR.) KARST. *Helvetica Chimica Acta* 65, 611–619.
- Kumakura, K., Hori, C., Matsuoka, H., Igarashi, K., Samejima, M., 2019. Protein components of water extracts from fruiting bodies of the reishi mushroom *Ganoderma lucidum* contribute to the production of functional molecules. *J. Sci. Food Agric.* 99, 529–535. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9211>
- Kumaran, S., Palani, P., Nishanthi, R., Kaviyarasan, V., 2011. Studies on screening, isolation and purification of a fibrinolytic protease from an Isolate(VK12) of *Ganoderma lucidum* and evaluation of its antithrombotic activity. *Med. Mycol. J.* 52, 153–162. <https://doi.org/10.3314/jjmm.52.153>
- Lagkouvardos, I., Joseph, D., Kapfhammer, M., Giritli, S., Horn, M., Haller, D., Clavel, T., 2016. IMNGS: A comprehensive open resource of processed 16S rRNA microbial profiles for ecology and diversity studies. *Sci. Rep.* 6, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep33721>
- Lai, S., Yan, Y., Pu, Y., Lin, S., Qiu, J.G., Jiang, B.H., Keller, M.I., Wang, M., Bork, P., Chen, W.H., Zheng, Y., Zhao, X.M., 2023. Enterotypes of the human gut mycobiome. *Microbiome* 11, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01586-y>
- Lai, T., Gao, Y., Zhou, S., 2004. Global marketing of medicinal ling zhi mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) Lloyd (Aphyllphoromycetidae) Products and Safety Concerns. *Int. J. Med. Mushrooms* 6, 189–194. 10.1615/IntJMedMushr.v6.i2.100
- Lee, K.M., Lee, S.Y., Lee, H.Y., 1999. Bistage control of pH for improving exopolysaccharide production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermentor. *J. Biosci. Bioeng.* 88, 646–650. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)87094-2](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)87094-2)

- Leitch, E.C.M.W., Walker, A.W., Duncan, S.H., Holtrop, G., Flint, H.J., 2007. Selective colonization of insoluble substrates by human faecal bacteria. *Environ. Microbiol.* 9, 667–679. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01186.x>
- Ley, R.E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., Gordon, J.I., 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *PNAS* 102, 1070–1075. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.0504978102>
- Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., Gordon, J.I., 2006. Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022–1023. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/4441022a>
- Li, J., Gu, F., Cai, C., Hu, M., Fan, L., Hao, J., Yu, G., 2020. Purification, structural characterization, and immunomodulatory activity of the polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Int. J. Biol. Macromol.* 143, 806–813. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.141>
- Li, K., Yu, M., Hu, Y., Ren, G., Zang, T., Xu, X., Qu, J., 2016a. Three kinds of *Ganoderma lucidum* polysaccharides attenuate DDC-induced chronic pancreatitis in mice. *Chem. Biol. Interact.* 247, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.01.013>
- Li, K., Zhuo, C., Teng, C., Yu, S., Wang, X., Hu, Y., Ren, G., Yu, M., Qu, J., 2016b. Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on chronic pancreatitis and intestinal microbiota in mice. *Int. J. Biol. Macromol.* 93, 904–912. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.029>
- Li, L.F., Liu, H.B., Zhang, Q.W., Li, Z.P., Wong, T.L., Fung, H.Y., Zhang, J.X., Bai, S.P., Lu, A.P., Han, Q. Bin, 2018. Comprehensive comparison of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and *G. sinense*: Chemical, antitumor, immunomodulating and gut-microbiota modulatory properties. *Sci. Rep.* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22885-7>
- Li, M., Gong, J., Cottrill, M., Yu, H., De Lange, C., Burton, J., Topp, E., 2003. Evaluation of QIAamp® DNA Stool Mini Kit for ecological studies of gut microbiota. *J. Microbiol. Methods* 54, 13–20. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00260-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00260-9)
- Li, T., Cui, L., Song, X., Cui, X., Wei, Y., Tang, L., Mu, Y., Xu, Z., 2022. Wood decay fungi: an analysis of worldwide research. *J. Soils Sediments* 22, 1688–1702. <https://doi.org/10.1007/s11368-022-03225-9>
- Li, W., Wang, K., Sun, Y., Ye, H., Hu, B., Zeng, X., 2015. Influences of structures of galactooligosaccharides and fructooligosaccharides on the fermentation *in vitro* by human intestinal microbiota. *J. Funct. Foods* 13, 158–168. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.044>
- Li, X.J., Bao, W.R., Leung, C.H., Ma, D.L., Zhang, G., Lu, A.P., Wang, S.C., Han, Q. Bin, 2016c. Chemical structure and immunomodulating activities of an α -glucan purified from *Lobelia chinensis* Lour. *Molecules* 21. <https://doi.org/10.3390/molecules21060779>
- Li, X. V., Leonardi, I., Iliev, I.D., 2019. Gut Mycobiota in Immunity and Inflammatory Disease. *Immunity* 50, 1365–1379. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.05.023>
- Li, Y.B., Liu, R.M., Zhong, J.J., 2013. A new ganoderic acid from *Ganoderma lucidum* mycelia and its stability. *Fitoterapia* 84, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.11.008>
- Liers, C., Arnstadt, T., Ullrich, R., Hofrichter, M., 2011. Patterns of lignin degradation and oxidative enzyme secretion by different wood- and litter-colonizing basidiomycetes and ascomycetes grown on beech-wood. *FEMS Microbiol. Ecol.* 78, 91–102. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01144.x>
- Lin, Z.B. (Ed.), 2009. *Lingzhi from mystery to science*, 1st ed. Peking University Medical Press, Beijing, pp 162.

- Lindequist, U., Niedermeyer, T.H.J., Jülich, W.D., 2005. The pharmacological potential of mushrooms. Evidence-based Complement. Altern. Med. 2, 285–299. <https://doi.org/10.1093/ecam/neh107>
- Ling, Z., Yang, B. (Eds.), 2019. *Ganoderma* and Health, Advances in experimental medicine and biology. Springer Nature, Singapore, 204 pp. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-9867-4>
- Liu, W., Li, X., Zhao, Z., Pi, X., Meng, Y., Fei, D., Liu, D., Wang, X., 2020. Effect of chitooligosaccharides on human gut microbiota and antiglycation. Carbohydr. Polym. 242. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116413>
- Liu, W., Wang, H., Pang, X., Yao, W., Gao, X., 2010. Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. Int. J. Biol. Macromol. 46, 451–457. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.02.006>
- Liu, X., Yuan, J.P., Chung, C.K., Chen, X.J., 2002. Antitumor activity of the sporoderm-broken germinating spores of *Ganoderma lucidum*. Cancer Lett. 182, 155–161. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00080-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00080-0)
- Liu, Y., Zhang, J., Tang, Q., Yang, Y., Guo, Q., Wang, Q., Wu, D., Cui, S.W., 2014. Physicochemical characterization of a high molecular weight bioactive β -d-glucan from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. Carbohydr. Polym. 101, 968–974. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.024>
- Liu, Y.J., Whelen, S., Hall, B.D., 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: Evidence from an RNA polymerase II subunit. Mol. Biol. Evol. 16, 1799–1808. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026092>
- Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., Huttenhower, C., 2016. The healthy human microbiome. Genome Med. 8, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0307-y>
- Long, W., Xue, Z., Zhang, Q., Feng, Z., Bridgewater, L., Wang, L., Zhao, L., Pang, X., 2015. Differential responses of gut microbiota to the same prebiotic formula in oligotrophic and eutrophic batch fermentation systems. Sci. Rep. 5, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep13469>
- Longvah, T., Deosthale, Y.G., 1998. Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India. Food Chem. 63, 331–334. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00026-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00026-0)
- Lloyd, A.L., Barnes, C.W., Held, B.W., Schink, M.J., Smith, M.E., Smith, J.A., Blanchette, R.A., 2018. Elucidating “*lucidum*”: Distinguishing the diverse laccate *Ganoderma* species of the United States, PLoS ONE. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199738>
- Lloyd, A.L., Linder, E.R., Smith, M.E., Blanchette, R.A., Smith, J.A., 2019. Cultural characterization and chlamydospore function of the *Ganodermataceae* present in the eastern United States. Mycologia 111, 1–12. <https://doi.org/10.1080/00275514.2018.1543509>
- Lu, X., Brennan, M.A., Serventi, L., Brennan, C.S., 2018. Incorporation of mushroom powder into bread dough—effects on dough rheology and bread properties. Cereal Chem. 95, 418–427. <https://doi.org/10.1002/cche.10043>
- Lu, Y.P., Liao, J.H., Guo, Z.J., Cai, Z.X., Chen, M.Y., 2020. Genome survey and transcriptome analysis on mycelia and primordia of *Agaricus blazei*. Biomed Res. Int. 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1824183>
- Luley, C., Lloyd, A., 2017. Root decay in urban trees- Part 2. *Ganoderma sessile* (aka *Ganoderma lucidum*)- An important root disease and butt decay by any name. TCI Mag. 36–41.

- Lumley, I.D., 1993. Vitamin analysis in foods. *Technol. Vitam. Food* 172–232. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2131-0_8
- Lung, M.Y., Chang, Y.C., 2011. Antioxidant properties of the edible basidiomycete *Armillaria mellea* in submerged cultures. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 6367–6384. <https://doi.org/10.3390/ijms12106367>
- Luo, J., Zhang, C., Liu, R., Gao, L., Ou, S., Liu, L., Peng, X., 2018. *Ganoderma lucidum* polysaccharide alleviating colorectal cancer by alteration of special gut bacteria and regulation of gene expression of colonic epithelial cells. *J. Funct. Foods* 47, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.05.041>
- Luo, X., Xu, X., Yu, M., Yang, Z., Zheng, L., 2008. Characterisation and immunostimulatory activity of an α -(1→6)-d-glucan from the cultured *Armillariella tabescens* mycelia. *Food Chem.* 111, 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.076>
- Lv, G.P., Zhao, J., Duan, J.A., Tang, Y.P., Li, S.P., 2012. Comparison of sterols and fatty acids in two species of *Ganoderma*. *Chem. Cent. J.* 6, 10. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-6-10>
- Łysakowska, P., Sobota, A., Wirkijowska, A., 2023. Medicinal mushrooms: Their bioactive components, nutritional value and application in functional food production—A review. *Molecules* 28. <https://doi.org/10.3390/molecules28145393>
- Ma, Z., Ye, C., Deng, W., Xu, M., Wang, Q., Liu, G., Wang, F., Liu, L., Xu, Z., Shi, G., Ding, Z., 2018. Reconstruction and analysis of a genome-scale metabolic model of *Ganoderma lucidum* for improved extracellular polysaccharide production. *Front. Microbiol.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03076>
- Mackenzie, B.W., Waite, D.W., Taylor, M.W., 2015. Evaluating variation in human gut microbiota profiles due to DNA extraction method and inter-subject differences. *Front. Microbiol.* 6, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00130>
- Mahapatra, S., Banerjee, D., 2013. Fungal exopolysaccharide: production, composition and applications. *Microbiol. Insights* 6, MBI.S10957. <https://doi.org/10.4137/mbi.s10957>
- Maldonado-Gómez, M.X., Martínez, I., Bottacini, F., O’Callaghan, A., Ventura, M., van Sinderen, D., Hillmann, B., Vangay, P., Knights, D., Hutkins, R.W., Walter, J., 2016. Stable engraftment of *Bifidobacterium longum* AH1206 in the human gut depends on individualized features of the resident microbiome. *Cell Host Microbe* 20, 515–526. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.09.001>
- Mallard, B., Leach, D.N., Wohlmuth, H., Tiralongo, J., 2019. Synergistic immuno-modulatory activity in human macrophages of a medicinal mushroom formulation consisting of Reishi, Shiitake and Maitake. *PLoS One* 14, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224740>
- Mantzoukas, S., Kitsiou, F., Natsiopoulos, D., Eliopoulos, P.A., 2022. Entomopathogenic Fungi: Interactions and applications. *Encyclopedia* 2, 646–656. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2020044>
- Margret, A.A., Beulah, G.H., Nelson, J., 2013. Marvelous Medicinal Mushrooms. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* 3, 611–615.
- Martens, E.C., Lowe, E.C., Chiang, H., Pudlo, N.A., Wu, M., McNulty, N.P., Abbott, D.W., Henrissat, B., Gilbert, H.J., Bolam, D.N., Gordon, J.I., 2011. Recognition and degradation of plant cell wall polysaccharides by two human gut symbionts. *PLoS Biol.* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001221>

- Martínez, A.T., Barrasa, J.M., Prieto, A., Blanco, M.N., 1991. Fatty acid composition and taxonomic status of *Ganoderma australe* from southern chile. *Mycol. Res.* 95, 782–784. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80038-5](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80038-5)
- Martínez-Carrera, D., Aguilar, A., Martínez, W., Bonilla, M., Morales, P., Sobal, M., 2000. Commercial production and marketing of edible mushrooms cultivated on coffee pulp in Mexico. *Coffee Biotechnol. Qual.* 471–488. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1068-8_45
- Martinez-Medina, G.A., Chávez-González, M.L., Verma, D.K., Prado-Barragán, L.A., Martínez-Hernández, J.L., Flores-Gallegos, A.C., Thakur, M., Srivastav, P.P., Aguilar, C.N., 2021. Bio-funcional components in mushrooms, a health opportunity: Ergothionine and huitlacoche as recent trends. *J. Funct. Foods* 77. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104326>
- Martin-Gallausiaux, C., Béguet-Crespel, F., Marinelli, L., Jamet, A., Ledue, F., Blottière, H.M., Lapaque, N., 2018. Butyrate produced by gut commensal bacteria activates TGF-beta1 expression through the transcription factor SP1 in human intestinal epithelial cells. *Sci. Rep.* 8, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28048-y>
- Maruvada, P., Leone, V., Kaplan, L.M., Chang, E.B., 2017. The human microbiome and obesity: moving beyond associations. *Cell Host Microbe* 22, 589–599. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.10.005>
- Mateo, D.C., Pazzi, F., Muñoz, F.J.D., Martínez, J.P.M., Olivares, P.R., Gusi, N., Adsuar, J.C., 2015. *Ganoderma lucidum* improves physical fitness in women with fibromyalgia. *Nutr. Hosp.* 32, 2126–2135. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.5.9601>
- Mattila, P., Könkö, K., Euro, M., Pihlava, J.M., Astola, J., Vahteristo, L., Hietaniemi, V., Kumpulainen, J., Valtonen, M., Piironen, V., 2001. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2343–2348. <https://doi.org/10.1021/jf001525d>
- Maukonen, J., Simões, C., Saarela, M., 2012. The currently used commercial DNA-extraction methods give different results of clostridial and actinobacterial populations derived from human fecal samples. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79, 697–708. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01257.x>
- McKee, L.S., La Rosa, S.L., Westereng, B., Eijssink, V.G., Pope, P.B., Larsbrink, J., 2021. Polysaccharide degradation by the *Bacteroidetes*: mechanisms and nomenclature. *Environ. Microbiol. Rep.* 13, 559–581. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12980>
- Megazyme, 2020. Validation Report: β -Glucan Assay Kit (Yeast & Mushroom, cat. no. K-YBGL) 1–5.
- Meneses, M.E., Martínez-Carrera, D., González-Ibáñez, L., Torres, N., Sánchez-Tapia, M., Márquez-Mota, C.C., Rendón, G., Mitzi, V., Morales, A., Tello-Salgad, I., Tovar, A.R., 2023. Effects of Mexican *Ganoderma lucidum* extracts on liver, kidney, and the gut microbiota of Wistar rats: A repeated dose oral toxicity study, *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0283605>
- Meng, Y., Lyu, F., Xu, X., Zhang, L., 2020. Recent advances in chain conformation and bioactivities of triple-helix polysaccharides. *Biomacromolecules* 21, 1653–1677. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01644>
- Menni, C., Jackson, M.A., Pallister, T., Steves, C.J., Spector, T.D., Valdes, A.M., 2017. Gut microbiome diversity and high-fibre intake are related to lower long-term weight gain. *Int. J. Obes.* 41, 1099–1105. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.66>

- Mi Kim, H., Ki Park, M., Won Yun, J., 2006. Culture pH affects exopolysaccharide production in submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum*. Appl. Biochem. Biotechnol. 134, 249–262.
- Mihlan, M., Homann, V., Liu, T.W.D., Tudzynski, B., 2003. AREA directly mediates nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but its activity is not affected by NMR. Mol. Microbiol. 47, 975–991. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03326.x>
- Milovanovic, I., Zengin, G., Maksimovic, S., Tadic, V., 2021. Supercritical and ultrasound-assisted extracts from *Pleurotus pulmonarius* mushroom: chemical profiles, antioxidative, and enzyme-inhibitory properties. J. Sci. Food Agric. 101, 2284–2293. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10849>
- Min, B.S., Gao, J.J., Nakamura, N., Hattori, M., 2000. Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against meth-A and LLC tumor cells. Chem. Pharm. Bull. 48, 1026–1033. <https://doi.org/10.1248/cpb.48.1026>
- Mleczek, M., Siwulski, M., Rzymiski, P., Niedzielski, P., Gąsecka, M., Jasińska, A., Budzyńska, S., Budka, A., 2017. Multi-elemental analysis of *Lentinula edodes* mushrooms available in trade. J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes 52, 196–205. <https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1261551>
- Moncalvo, J.M., 2000. Systematics of *Ganoderma*, in: Flood, J., Bridge, P.D., Holderness, M. (Eds.), *Ganoderma diseases of perennial crops*. CABI Bioscience, Egham, pp. 23–45.
- Moncalvo, J.-M., 2005. Molecular systematics of *Ganoderma*: What is Reishi? Int. J. Med. Mushrooms 7, 353–354. <https://doi.org/10.1615/intjmedmushrooms.v7.i3.160>
- Moncalvo, J.-M., Wang, H.-H., Hseu, R.-S., 1995. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. Mycologia 87, 223–238. <https://doi.org/10.1080/00275514.1995.12026524>
- Moncalvo, J.M.; Ryvarden, L., 1997. A Nomenclatural Study of the *Ganodermataceae* Donk. Fungiflora 10, 1–114.
- Moore, D., Robson, G.D., Trinci, A.P.J., 2020. 21st Century Guidebook to Fungi. 21st Century Guideb. to Fungi. <https://doi.org/10.1017/9781108776387>
- Moore, W.E.C., Holdeman, L. V., 1974. Human Fecal Flora: The Normal Flora of 20 Japanese-Hawaiians. Appl. Microbiol. 27, 961–979. <https://doi.org/10.1128/am.27.5.961-979.1974>
- Moran, N.A., Sloan, D.B., 2015. The hologenome concept: helpful or hollow? PLoS Biol. 13, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002311>
- Morrison, D.J., Preston, T., 2016. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. Gut Microbes 7, 189–200. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082>
- Morton, J.B., 1986. Effects of mountants and fixatives on wall structure and Melzer's reaction in spores of two *Acaulospora* species (*Endogonaceae*). Mycologia 78, 787–794. <https://doi.org/10.1080/00275514.1986.12025323>
- Murphy, E.J., Rezoagli, E., Major, I., Rowan, N.J., Laffey, J.G., 2020. β -Glucan metabolic and immunomodulatory properties and potential for clinical application. J. Fungi 6, 1–33. <https://doi.org/10.3390/jof6040356>

- Ndeh, D., Gilbert, H.J., 2018. Biochemistry of complex glycan depolymerisation by the human gut microbiota. *FEMS Microbiol. Rev.* 42, 146–164. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy002>
- Ng, S.H., Robert, S.D., Wan Ahmad, W.A.N., Wan Ishak, W.R., 2017. Incorporation of dietary fibre-rich oyster mushroom (*Pleurotus sajor-caju*) powder improves postprandial glycaemic response by interfering with starch granule structure and starch digestibility of biscuit. *Food Chem.* 227, 358–368. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.108>
- Nguyen, N.K., Deehan, E.C., Zhang, Z., Jin, M., Baskota, N., Perez-Muñoz, M.E., Cole, J., Tuncil, Y.E., Seethaler, B., Wang, T., Laville, M., Delzenne, N.M., Bischoff, S.C., Hamaker, B.R., Martínez, I., Knights, D., Bakal, J.A., Prado, C.M., Walter, J., 2020. Gut microbiota modulation with long-chain corn bran arabinoxylan in adults with overweight and obesity is linked to an individualized temporal increase in fecal propionate. *Microbiome* 8, 1–21. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00887-w>
- Niccolai, E., Baldi, S., Ricci, F., Russo, E., Nannini, G., Menicatti, M., Poli, G., Taddei, A., Bartolucci, G., Calabrò, A.S., Stingo, F.C., Amedei, A., 2019a. Evaluation and comparison of short chain fatty acids composition in gut diseases. *World J. Gastroenterol.* 25, 5543–5558. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i36.5543>
- Niccolai, E., Boem, F., Russo, E., Amedei, A., 2019b. The gut–brain axis in the neuropsychological disease model of obesity: A classical movie revised by the emerging director “microbiome.” *Nutrients* 11. <https://doi.org/10.3390/nu11010156>
- Nicholson, J.K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., Pettersson, S., 2012. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 336, 1262–1267. <https://doi.org/10.1126/science.1223813>
- Niego, A.G.T., Rapior, S., Thongklang, N., Raspé, O., Hyde, K.D., Mortimer, P., 2023. Reviewing the contributions of macrofungi to forest ecosystem processes and services. *Fungal Biol. Rev.* 44, 100294. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2022.11.002>
- Nile, S.H., Park, S.W., 2014. Total, soluble, and insoluble dietary fibre contents of wild growing edible mushrooms. *Czech J. Food Sci.* 32, 302–307. <https://doi.org/10.17221/226/2013-cjfs>
- Nishitoba, T., Sato, H., Sakamura, S., 1985. New terpenoids from *Ganoderma lucidum* and their bitterness. *Agric. Biol. Chem.* 49, 1547–1549. <https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10866944>
- Nussbaum, N., Wyl, T. Von, Gandia, A., Romanens, E., Rühs, P.A., Fischer, P., 2023. Impact of malt concentration in solid substrate on mycelial growth and network connectivity in *Ganoderma* species. *Sci. Rep.* 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48203-4>
- Nyanhongo, G.S., Gübitz, G., Sukyai, P., Leitner, C., Haltrich, D., Ludwig, R., 2007. Oxidoreductases from *Trametes* spp. in biotechnology: A wealth of catalytic activity. *Food Technol. Biotechnol.* 45, 250–268.
- O’Toole, P.W., Marchesi, J.R., Hill, C., 2017. Next-generation probiotics: The spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat. Microbiol.* 2, 1–6. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.57>
- Obodai, M., Mensah, D.L.N., Fernandes, Â., Kortei, N.K., Dzomeku, M., Teegarden, M., Schwartz, S.J., Barros, L., Prempeh, J., Takli, R.K., Ferreira, I.C.F.R., 2017. Chemical characterization and antioxidant potential of wild *Ganoderma* species from Ghana. *Molecules* 22, 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules22020196>

- Ochoa-Repáraz, J., Ramelow, C.C., Kasper, L.H., 2020. A Gut Feeling: The importance of the intestinal microbiota in psychiatric disorders. *Front. Immunol.* 11, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.510113>
- Olawuyi, I.F., Lee, W.Y., 2019. Quality and antioxidant properties of functional rice muffins enriched with shiitake mushroom and carrot pomace. *Int. J. Food Sci. Technol.* 54, 2321–2328. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14155>
- Organización Mundial de Gastroenterología (OMG), 2023. Directrices mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología. Probióticos y prebióticos.
- Osemwegie, O.O., Adetunji, C.O., Ayeni, E.A., Adejobi, O.I., Arise, R.O., Nwonuma, C.O.O.A., 2020. Exopolysaccharides from bacteria and fungi: current status and perspectives in Africa. *Heliyon* 6, e04205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04205>
- Osińska-Jaroszuk, M., Jarosz-Wilkolazka, A., Jaroszuk-Ściseł, J., Szałapata, K., Nowak, A., Jaszek, M., Ozimek, E., Majewska, M., 2015. Extracellular polysaccharides from *Ascomycota* and *Basidiomycota*: production conditions, biochemical characteristics, and biological properties. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 1823–1844. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1937-8>
- Ostrem Loss, E., Thompson, J., Cheung, P.L.K., Qian, Y., Venturelli, O.S., 2023. Carbohydrate complexity limits microbial growth and reduces the sensitivity of human gut communities to perturbations. *Nat. Ecol. Evol.* 7, 127–142. <https://doi.org/10.1038/s41559-022-01930-9>
- Öztürk, M., Tel-Çayan, G., Muhammad, A., Terzioğlu, P., Duru, M.E., 2015. Mushrooms: A source of exciting bioactive compounds, in: Atta-ur-Rahman, F.R.S. (Ed.), *Studies in natural products chemistry*. Elsevier, pp. 363–456 <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63473-3.00010-1>
- Palenzuela, M., Sánchez-Roa, D., Damián, J., Sessini, V., Mosquera, M.E.G., 2021. Polymerization of terpenes and terpenoids using metal catalysts, in: Perez, P.J. (Ed.), *Advances in Organometallic Chemistry* 1st ed. Elsevier Inc., pp. 55–93. <https://doi.org/10.1016/bs.adomc.2021.01.004>
- Papaspýridi, L., Katapodis, P., Gonou-Zagou, Z., Kapsanaki-Gotsi, E., Christakopoulos, P., 2009. Optimization of the medicinal mushroom *Ganoderma australe* biomass production using Response Surface Methodology. *Planta Med.* 75. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1234487>
- Park, C.S., Marx, G.D., Moon, Y.S., Wiesenborn, D., Chang, K.C., Hofman, V., 1997. Alternative uses of sunflower, in: A.A. Scheiner (Ed.), *Sunflower Technology and Production*, Agronomy Monograph 35. Soil Science Society of America Inc., Madison, Wisconsin, pp. 765–807.
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00099-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00099-6)
- Park, Y.J., Kwon, O.C., Son, E.S., Yoon, D.E., Han, W., Yoo, Y.B., Lee, C.S., 2012. Taxonomy of *Ganoderma lucidum* from Korea based on rDNA and partial β -Tubulin gene sequence analysis. *Mycobiology* 40, 71–75. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.1.071>
- Patel, B.K., Campanella, O.H., Janaswamy, S., 2013. Impact of urea on the three-dimensional structure, viscoelastic and thermal behavior of iota-carrageenan. *Carbohydr. Polym.* 92, 1873–1879. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.026>
- Paterson, R.R.M., 2006. *Ganoderma* - A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry* 67, 1985–2001. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.07.004>

- Paterson, R.R.M., 2007. *Ganoderma* disease of oil palm-A white rot perspective necessary for integrated control. *Crop Prot.* 26, 1369–1376. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.11.009>
- Payne, A.N., Zihler, A., Chassard, C., Lacroix, C., 2012. Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling. *Trends Biotechnol.* 30, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.011>
- Pei, D., Xie, H., Song, H., Xu, H., Wu, Y., 2015. Bioconcentration factors and potential human health risks of heavy metals in cultivated *Lentinus edodes* in chengdu, people's republic of China. *J. Food Prot.* 78, 390–395. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-336>
- Peintner, U., Schwarz, S., Mešić, A., Moreau, P.A., Moreno, G., Saviuc, P., 2013. Mycophilic or mycophobic? Legislation and guidelines on wild mushroom commerce reveal different consumption behaviour in european countries. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063926>
- Perreau, C., Thabuis, C., Verstrepen, L., Ghyselinck, J., Marzorati, M., 2023. *Ex vivo* Colonic Fermentation of NUTRIOSE® exerts immuno-modulatory properties and strong anti-inflammatory effects. *Nutrients* 15, 4229.
- Petersen, C., Round, J.L., 2014. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell. Microbiol.* 16, 1024–1033. <https://doi.org/10.1111/cmi.12308>
- Peterson, J., Garges, S., Giovanni, M., McInnes, P., Wang, L., Schloss, J.A., Bonazzi, V., McEwen, J.E., Wetterstrand, K.A., Deal, C., Baker, C.C., Di Francesco, V., Howcroft, T.K., Karp, R.W., Lunsford, R.D., Wellington, C.R., Belachew, T., Wright, M., Giblin, C., David, H., Mills, M., Salomon, R., Mullins, C., Akolkar, B., Begg, L., Davis, C., Grandison, L., Humble, M., Khalsa, J., Roger Little, A., Peavy, H., Pontzer, C., Portnoy, M., Sayre, M.H., Starke-Reed, P., Zakhari, S., Read, J., Watson, B., Guyer, M., 2009. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* 19, 2317–2323. <https://doi.org/10.1101/gr.096651.109>
- Philippoussis A., Diamantopoulou, P., 2012. Exploitation of the biotechnological potential of agro-industrial by-products through mushroom cultivation, in: Petre, M., Berovic, M. (Eds.), *Mushroom Biotechnology and Bioengineering*. CD Publishing House, Bucharest, Romania, pp. 161–184.
- Pilotti, C.A., 2005. Stem rots of oil palm caused by *Ganoderma boninense*: Pathogen biology and epidemiology. *Mycopathologia* 159, 129–137. <https://doi.org/10.1007/s11046-004-4435-3>
- Plácido, A.I., Roque, F., Morgado, M., 2022. The promising role of mushrooms as a therapeutic adjuvant of conventional cancer therapies. *Biologics* 2, 58–68. <https://doi.org/10.3390/biologics2010005>
- Plazas, D.C.S., Soccol, C.R., Nosedá, M.D., de Andrade Tanobe, V.O., Marin, O., Karp, S.G., de Melo Pereira, G.V., de Carvalho, J.C., Soccol, V.T., 2020. A comparative study of extraction techniques for maximum recovery of bioactive compounds from *Ganoderma lucidum* spores. *Rev. Colomb. Ciencias Quím.* 49, 70–88. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v49n1.84456>
- Pomin, V.H., 2012. Unravelling glycobiology by NMR spectroscopy. *Glycosylation*. <https://doi.org/10.5772/48136>
- Postemsky, P.D., Delmastro, S.E., Curvetto, N.R., 2014. Effect of edible oils and Cu (II) on the biodegradation of rice by-products by *Ganoderma lucidum* mushroom. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 93, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.05.006>

- Postemsky, P.D., Bidegain, M.A., González-Matute, R., Figlas, N.D., Cubitto, M.A., 2017. Pilot-scale bioconversion of rice and sunflower agro-residues into medicinal mushrooms and laccase enzymes through solid-state fermentation with *Ganoderma lucidum*. *Bioresour. Technol.* 231, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.064>
- Postemsky, P.D., Bidegain, M.A., Lluberas, G., Lopretti, M.Y., Bonifacino, S., Landache, M.I., Zygodlo, J.A., Fernández Lahore, M., Omarini, A.B., 2019. Biorefining via solid-state fermentation of rice and sunflower by-products employing novel monosporic strains from *Pleurotus sapidus*. *Bioresour. Technol.* 289, 121692.
- Powers-Fletcher, M.V, Kendall, B.A., Griffin, A.T., Hanson, K.E., 2016. Filamentous Fungi. *Microbiol. Spectr.* 4. <https://doi.org/10.1002/9783527620999.ch15>
- Prasad, S., Rathore, H., Sharma, S., Yadav, A.S., Naik, S.N., 2017. Studies on effects of supercritical CO₂ extraction on yield and antioxidant activity of *L. edodes* extract. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 8, 1144–1154.
- Primec, M., Mičetić-Turk, D., Langerholc, T., 2017. Analysis of short-chain fatty acids in human feces: A scoping review. *Anal. Biochem.* 526, 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.03.007>
- Puchades Reig, M., 2016. *Cryptococcus* y medio ambiente. Universidad Miguel Hernández.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, Shaochuan, Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J., Hansen, T., Paslier, D. Le, Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, Songgang, Qin, N., Yang, H., 2010. A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821.A>
- Quin, M.B., Michel, S.N., Schmidt-Dannert, C., 2015. Moonlighting metals: insights into regulation of cyclization pathways in fungal δ^6 -protoilludene sesquiterpene synthases. *ChemBioChem* 16, 2191–2199. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500308>
- Sethy, N.K., Bhardwaj, A., Singh, V.J. Sharma, R.K., Deswal, R., Bhargava, K., Mishra, K., 2017. Characterization of *Ganoderma lucidum*: Phytochemical and Proteomic Approach. *J. Proteins Proteomics* 8, 25–33.
- Ramberg, J.E., Nelson, E.D., Sinnott, R.A., 2010. Immunomodulatory dietary polysaccharides: A systematic review of the literature. *Nutr. J.* 9, 1–22. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-9-54>
- Rashid, M.H., Rahman, M.M., Correll, R., Naidu, R., 2018. Arsenic and other elemental concentrations in mushrooms from bangladesh: Health risks. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 15. <https://doi.org/10.3390/ijerph15050919>
- Rathee, S., Rathee, Dharmender, Rathee, Deepti, Kumar, V., Rathee, P., 2012. Mushrooms as therapeutic agents. *Rev. Bras. Farmacogn.* 22, 459–474. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000195>
- Rathore, H., Prasad, S., Sharma, S., 2017. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. *PharmaNutrition* 5, 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2017.02.001>
- Redecker, D., 2002. New views on fungal evolution based on DNA markers and the fossil record. *Res. Microbiol.* 153, 125–130. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(02\)01297-4](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(02)01297-4)

- Reichardt, N., Duncan, S.H., Young, P., Belenguer, A., McWilliam Leitch, C., Scott, K.P., Flint, H.J., Louis, P., 2014. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *ISME J.* 8, 1323–1335. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.14>
- Reis, F.S., Barros, L., Martins, A., Ferreira, I.C.F.R., 2012. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study. *Food Chem. Toxicol.* 50, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.10.056>
- Ren, A., Ishida, T., Akiyama, Y., 2013. Assessing statistical reliability of phylogenetic trees via a speedy double bootstrap method. *Mol. Phylogenet. Evol.* 67, 429–435. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.02.011>
- Ren, Y., Bai, Y., Zhang, Z., Cai, W., Del Rio Flores, A., 2019. The preparation and structure analysis methods of natural polysaccharides of plants and fungi: A review of recent development. *Molecules* 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24173122>
- Ren, F., Meng, C., Chen, Weijun, Chen, H., Chen, Wenxue, 2021. *Ganoderma amboinense* polysaccharide prevents obesity by regulating gut microbiota in high-fat-diet mice, *Food Bioscience*. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101107>
- Ren, L., Zhang, J., Zhang, T., 2021. Immunomodulatory activities of polysaccharides from *Ganoderma* on immune effector cells. *Food Chem.* 340, 127933. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127933>
- Rees, R.W., Flood, J., Hasan, Y., Wills, M.A., Cooper, R.M., 2012. *Ganoderma boninense* basidiospores in oil palm plantations: Evaluation of their possible role in stem rots of *Elaeis guineensis*. *Plant Pathol.* 61, 567–578. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02533.x>
- Richter, C., Wittstein, K., Kirk, P.M., Stadler, M., 2015. An assessment of the taxonomy and chemotaxonomy of *Ganoderma*. *Fungal Divers.* 71. <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0313-6>
- Riley, R., Salamov, A.A., Brown, D.W., Nagy, L.G., Floudas, D., Held, B.W., Levasseur, A., Lombard, V., Morin, E., Otillar, R., Lindquist, E.A., Sun, H., LaButti, K.M., Schmutz, J., Jabbour, D., Luo, H., Baker, S.E., Pisabarro, A.G., Walton, J.D., Blanchette, R.A., Henrissat, B., Martin, F., Cullen, D., Hibbett, D.S., Grigoriev, I. V., 2014. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 9923–9928. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400592111>
- Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., De los Reyes-Gavilán, C.G., Salazar, N., 2016. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Front. Microbiol.* 7, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>
- Robson, G.D., 2017. Fungi: geoactive agents of metal and mineral transformations. *Environ. Microbiol.* 19, 2533–2536. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1462-2920.13807>
- Roediger, W.E.W., 1980. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut* 21, 793–798. <https://doi.org/10.1136/gut.21.9.793>
- Rogers, R., 2012. *The Fungal Pharmacy. The complete guide to medicinal mushrooms and lichens of North America.* North Atlantic Books, California, USA, 698 pp.
- Rogers, S.O., Bendich, A.J., 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 5, 69–76. <https://doi.org/10.1007/BF00020088>
- Rosenberg, E., Zilber-Rosenberg, I., 2018. The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome* 6. <https://doi.org/10.1007/s12346-014-0128-6>

- Rosling, A., Roose, T., Herrmann, A.M., Davidson, F.A., Finlay, R.D., Gadd, G.M., 2009. Approaches to modelling mineral weathering by fungi. *Fungal Biol. Rev.* 23, 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2009.09.003>
- Rossi, P., Buonocore, D., Altobelli, E., Brandalise, F., Cesaroni, V., Iozzi, D., Savino, E., Marzatico, F., 2014. Improving training condition assessment in endurance cyclists: Effects of *Ganoderma lucidum* and *Ophiocordyceps sinensis* dietary supplementation. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/979613>
- Rossouw, W., Korsten, L., 2017. Cultivable microbiome of fresh white button mushrooms. *Lett. Appl. Microbiol.* 64, 164–170. <https://doi.org/10.1111/lam.12698>
- Roth, R.A., Ganey, P.E., 2010. Intrinsic versus idiosyncratic drug-induced hepatotoxicity - Two villains or one? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 332, 692–697. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.162651>
- Roy, D.N., Azad, A.K., Sultana, F., Anisuzzaman, A.S.M., Khondkar, P., 2015. Nutritional profile and mineral composition of two edible mushroom varieties consumed and cultivated in Bangladesh. *J. Phytopharm.* 4, 217–220. <https://doi.org/10.31254/phyto.2015.4405>
- Royse, D.J., Baars, J., Tan, Q., 2017. Current Overview of Mushroom Production in the World, in: Cunha Zied, D., Pardo-Giménez, A. (Eds.), *Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications*. John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119149446.ch2>
- Rubin-Bejerano, I., Abeijon, C., Magnelli, P., Grisafi, P., Fink, G.R., 2007. Phagocytosis by Human Neutrophils Is Stimulated by a Unique Fungal Cell Wall Component. *Cell Host Microbe* 2, 55–67. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.06.002>
- Russo, E., Giudici, F., Fiorindi, C., Ficari, F., Scaringi, S., Amedei, A., 2019. Immunomodulating activity and therapeutic effects of short chain fatty acids and tryptophan post-biotics in inflammatory bowel disease. *Front. Immunol.* 10, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02754>
- Ruthes, A.C., Smiderle, F.R., Iacomini, M., 2016. Mushroom heteropolysaccharides: A review on their sources, structure and biological effects. *Carbohydr. Polym.* 136, 358–375. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.061>
- Sadler, M., 2003. Nutritional properties of edible fungi. *Nutr. Bull.* 28, 305–308.
- Samarkos, M., Mastrogianni, E., Kampouroupoulou, O., 2018. The role of gut microbiota in *Clostridium difficile* infection. *Eur. J. Intern. Med.* 50, 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2018.02.006>
- Samorini, G., 1992. The oldest representations of hallucinogenic mushrooms in the world (Sahara Desert, 9000-7000 BP). *Integration* 2:69-78.
- Sanders, M.E., Merenstein, D.J., Reid, G., Gibson, G.R., Rastall, R.A., 2019. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 605–616. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>
- Sang, T., Guo, Chengjie, Guo, D., Wu, J., Wang, Yujie, Wang, Ying, Chen, J., Chen, C., Wu, K., Na, K., Li, K., Fang, L., Guo, Cuiling, Wang, X., 2021. Suppression of obesity and inflammation by polysaccharide from sporoderm-broken spore of *Ganoderma lucidum* via gut microbiota regulation. *Carbohydr. Polym.* 256, 117594. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117594>
- Sargowo, D., Ovianti, N., Susilowati, E., Ubaidillah, N., Widya Nugraha, A., Vitriyaturrida, Siwi Proboretno, K., Failasufi, M., Ramadhan, F., Wulandari, H., Waranugraha, Y., Hayuning Putri, D., 2018. The role of polysaccharide peptide of *Ganoderma lucidum* as a potent antioxidant

- against atherosclerosis in high risk and stable angina patients. *Indian Heart J.* 70, 608–614. <https://doi.org/10.1016/j.ihj.2017.12.007>
- Sarris, D., Philippoussis, A., Mallouchos, A., Diamantopoulou, P., 2020. Valorization of low-cost, carbon-rich substrates by edible ascomycetes and basidiomycetes grown on liquid cultures. *FEMS Microbiol. Lett.* 367, 1–13. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa168>
- Saura-Calixto, F., 2011. Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: An essential physiological function. *J. Agric. Food Chem.* 59, 43–49. <https://doi.org/10.1021/jf1036596>
- Savelkoul, H.F.J., Chanput, W., Wichers, H.J., 2013. Immunomodulatory effects of mushroom β -glucans, Diet, Immunity and Inflammation. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857095749.3.416>
- Sayari, M., van der Nest, M.A., Steenkamp, E.T., Rahimlou, S., Hammerbacher, A., Wingfield, B.D., 2021. Characterization of the ergosterol biosynthesis pathway in ceratocystidaceae. *J. Fungi* 7. <https://doi.org/10.3390/jof7030237>
- Schägger, H., von Jagow, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368–379. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)
- Scher, J.U., 2018. The microbiome in psoriasis and psoriatic arthritis: Joints. *J. Rheumatol.* 94, 32–35. <https://doi.org/10.3899/JRHEUM.180134>
- Schill, S., Stessl, B., Meier, N., Tichy, A., Wagner, M., Ludewig, M., 2021. Microbiological safety and sensory quality of cultivated mushrooms (*Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*) at retail level and post-retail storage. *Foods* 10. <https://doi.org/10.3390/foods10040816>
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium, 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Schwab, C., 2022. The development of human gut microbiota fermentation capacity during the first year of life. *Microb. Biotechnol.* 15, 2865–2874. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14165>
- Schwarze, F.W.M.R., Engels, J., Mattheck, C., 2001. Fungal Strategies of wood decay in trees. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 185 pp.
- Schwartz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N.A., Donus, C., Hardt, P.D., 2010. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity* 18, 190–195. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.167>
- Shankar, A., Sharma, K.K., 2022. Fungal secondary metabolites in food and pharmaceuticals in the era of multi-omics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 106, 3465–3488. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11945-8>
- Shao, W., Xiao, C., Yong, T., Zhang, Y., Hu, H., Xie, T., Liu, R., Huang, L., Li, X., Xie, Y., Zhang, J., Chen, S., Cai, M., Chen, D., Liu, Y., Gao, X., Wu, Q., 2022. A polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* ameliorates hyperglycemia through modulating gut microbiota in type 2 diabetic mice. *Int J Biol Macromol.* 197, 23–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.034>
- Sharif, S., Mustafa, G., Munir, H., Jamil, Y., 2016. Proximate composition and micronutrient mineral profile of wild *Ganoderma lucidum* and four commercial exotic mushrooms by ICP-OES and LIBS. *J. Food Nutr. Res.* <https://doi.org/10.12691/jfnr-4-11-1>

- Sheena, N., Lakshmi, B., Janardhanan, K.K., 2005. Therapeutic potential of *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst. *Natural Product Radiation* 4(5), 382–386.
- Shi, H., Yu, L., Shi, Y., Lu, J., Teng, H., Zhou, Y., Sun, L., 2017. Structural characterization of a rhamnogalacturonan I domain from ginseng and its inhibitory effect on galectin-3. *Molecules* 22, 11–14. <https://doi.org/10.3390/molecules22061016>
- Shiao, M.S., Lin, L.J., Yeh, S.F., 1988. Triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* 27, 2911–2914.
- Shu, C.H., Lung, M.Y., 2004. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorata* in batch cultures. *Process Biochem.* 39, 931–937. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00220-6](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00220-6)
- Sietsma, J.H.; Eveleigh, D.E.; Haskins, R.H., 1969. Cell wall composition and protoplast formation of some oomycete species 184, 306–317.
- Sigoillot, J.C., Berrin, J.G., Bey, M., Lesage-Meessen, L., Levasseur, A., Lomascolo, A., Record, E., Uzan-Boukhris, E., 2012. Fungal strategies for lignin degradation, 1st ed, *Advances in Botanical Research*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416023-1.00008-2>
- Simon, J.C., Marchesi, J.R., Mougel, C., Selosse, M.A., 2019. Host-microbiota interactions: From holobiont theory to analysis. *Microbiome* 7, 1–5. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0619-4>
- Simonić, J., Stajić, M., Glamočlija, J., Vukojević, J., Duletić-Laušević, S. and Brčeski, I., 2008. Optimization of submerged cultivation conditions for extra- and intracellular polysaccharide production by medicinal Ling Zhi or Reishi Mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (*Aphyllphoromycetidae*). *Int. J. Med. Mushrooms*, 10, 351–360.
- Simonić, J., Stajić, M., Glamočlija, J., Vukojević, J., Sonja Duletić-Laušević, Brčeski, & I., 2008. Th Au Th. *Int. J. Med. Mushrooms* 10, 351–360.
- Sinclair, W.A., Lyon, H.H., 2005. *Diseases of trees and shrubs* second edition. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Londres. 660 p.
- Singh, N., Gurav, A., Sivaprakasam, S., Brady, E., Padia, R., Shi, H., Thangaraju, M., Prasad, P.D., Manicassamy, S., Munn, D.H., Lee, J.R., Offermanns, S., Ganapathy, V., 2014. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity* 40, 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.12.007>
- Sitaraman, R., 2018. Prokaryotic horizontal gene transfer within the human holobiont: Ecological-evolutionary inferences, implications and possibilities 06 *Biological Sciences* 0604 *Genetics*. *Microbiome* 6, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0551-z>
- Siyoun, N.A., Surridge, K., van der Linde, E.J., Korsten, L., 2016. Microbial succession in white button mushroom production systems from compost and casing to a marketable packed product. *Ann. Microbiol.* 66, 151–164. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1091-4>
- Slavin, J., 2013. Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits. *Nutrients* 5, 1417–1435. <https://doi.org/10.3390/nu5041417>
- Slavin, J.L., Savarino, V., Paredes-Diaz, A., Fotopoulos, G., 2009. A review of the role of soluble fiber in health with specific reference to wheat dextrin. *J. Int. Med. Res.* 37, 1–17. <https://doi.org/10.1177/147323000903700101>

- Sliva, D., 2003. *Ganoderma lucidum* (Reishi) in Cancer Treatment. Integr. Cancer Ther. 2, 358–364. <https://doi.org/10.1177/1534735403259066>
- Smiderle, F.R., Baggio, C.H., Borato, D.G., Santana-Filho, A.P., Sasaki, G.L., Iacomini, M., Van Griensven, L.J.L.D., 2014. Anti-inflammatory properties of the medicinal mushroom *Cordyceps militaris* might be related to its linear (1→3)-β-D-glucan. PLoS One 9, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110266>
- Smina, T.P., Mathew, J., Janardhanan, K.K., Devasagayam, T.P.A., 2011. Antioxidant activity and toxicity profile of total triterpenes isolated from *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst occurring in South India. Environ. Toxicol. Pharmacol. 32, 438–446. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.08.011>
- Smith, B.J., Sivasithamparam, K., 2000a. Isozymes of *Ganoderma* species from Australia. Mycol. Res. 104, 952–961.
- Smith, J., Farmer, J., Smith, P., Nayak, D., 2021. The role of soils in provision of energy. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 376. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0180>
- Smith, J.E., Rowan, N.J., Sullivan, R., 2002. Medicinal mushrooms: A rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. Biotechnol. Lett. 24, 1839–1845. <https://doi.org/10.1023/A:1020994628109>
- So, D., Whelan, K., Rossi, M., Morrison, M., Holtmann, G., Kelly, J.T., Shanahan, E.R., Staudacher, H.M., Campbell, K.L., 2018. Dietary fiber intervention on gut microbiota composition in healthy adults: A systematic review and meta-analysis. Am. J. Clin. Nutr. 107, 965–983. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy041>
- Soccol, C.R., Bissoqui, L.Y., Rodrigues, C., Rubel, R., Sella, S.R.B.R., Leifa, F., De Souza Vandenberghe, L.P., Soccol, V.T., 2016. Pharmacological properties of biocompounds from spores of the lingzhi or reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes): A review. Int. J. Med. Mushrooms 18, 757–767. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v18.i9.10>
- Srivastava, S., Kumar, R., Singh, V.P., 2013. Wood Decaying Fungi. LAP LAMBERT Academic Publishing, Saarbrücken, Germany.
- Stamets, P., 1994. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms, 2nd revise. ed, Growing gourmet and medicinal mushrooms. Ten Speed Press, Olympia, WA, 554 p.
- Stamets, P., 2000. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms, 3rd ed. Ten Speed Press, Olympia, WA, 614 p.
- Stamets, P., 2005. Mycelium Running. How mushrooms can help save the world. Ten Speed Press, New York, 344 p. <https://doi.org/10.3368/er.27.2.228>
- Stephany, M.P., Chung, S., Handler, M.Z., Handler, N.S., Handler, G.A., Schwartz, R.A., 2016. Shiitake Mushroom Dermatitis: A Review. Am. J. Clin. Dermatol. 17, 485–489. <https://doi.org/10.1007/s40257-016-0212-6>
- Stojković, D.S., Barros, L., Calhella, R.C., Glamočlija, J., Ćirić, A., Van Griensven, L.J.L.D., Soković, M., Ferreira, I.C.F.R., 2014. A detailed comparative study between chemical and bioactive properties of *Ganoderma lucidum* from different origins. Int. J. Food Sci. Nutr. 65, 42–47. <https://doi.org/10.3109/09637486.2013.832173>

- Su, C.H., Yang, Y.Z., Ho, H.O., Hu, C.H., Sheu, M.T., 2001. High-performance liquid chromatographic analysis for the characterization of triterpenoids from *Ganoderma*. J. Chromatogr. Sci. 39, 93–100. <https://doi.org/10.1093/chromsci/39.3.93>
- Sułkowska-Ziaja, K., Balik, M., Szczepkowski, A., Trepka, M., Zengin, G., Kała, K., Muszynska, B., 2023. A review of chemical composition and bioactivity studies of the most promising species of *Ganoderma* spp. Katarzyna. Diversity 15, 882. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/d15080882>
- Sun, J., He, H., Bi, J.X., 2004. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. J. Agric. Food Chem. 52, 6646–6652. <https://doi.org/10.1021/jf0495136>
- Sun, X., Bonfante, P., Tang, M., 2015. Plant Physiology and Biochemistry Effect of volatiles versus exudates released by germinating spores of *Gigaspora margarita* on lateral root formation. Plant Physiol. Biochem. 97, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.09.010>
- Sukariawan, A., Febrianto, E.B., Sakiah, Ridho, M., Karnando, D., 2021. *Ganoderma boninense* control in palm oil plantations using *Trichoderma harzianum* in various Media. IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci. 819. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/819/1/012001>
- Synytysya, A., Novak, M., 2014. Structural analysis of glucans. Ann. Transl. Med. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.02.07>
- Szedlay, G., 2002. Is the Widely Used Medicinal Fungus the. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 49, 235–243.
- Talbott, S.M., Talbott, J.A., Talbott, T.L., Dingler, E., 2013. β -Glucan supplementation, allergy symptoms, and quality of life in self-described ragweed allergy sufferers. Food Sci. Nutr. 1, 90–101. <https://doi.org/10.1002/fsn3.11>
- Tanaka, S., Ko, K., Kino, K., Tsuchiya, K., Yamashita, A., Murasugi, A., Sakuma, S., Tsunoo, H., 1989. Complete amino acid sequence of an immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8). J. Biol. Chem. 264, 16372–16377. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)84715-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)84715-4)
- Tang, Y., Zhong, J., 2003. Scale-up of a liquid static culture process for hyperproduction of ganoderic acid by the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. Biotechnol. Prog. 19, 1842–1846.
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00338-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00338-1)
- Tao, Y., Zhang, R., Yang, W., Liu, H., Yang, H., 2015. Carboxymethylated hyperbranched polysaccharide: Synthesis, solution properties, and fabrication of hydrogel. Carbohydr. Polym. 128, 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.012>
- Taofiq, O., Heleno, S.A., Calhelha, R.C., Alves, M.J., Barros, L., González-Paramás, A.M., Barreiro, M.F., Ferreira, I.C.F.R., 2017. The potential of *Ganoderma lucidum* extracts as bioactive ingredients in topical formulations, beyond its nutritional benefits. Food Chem. Toxicol. 108, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.07.051>
- Tarlo, S.M., Bell, B., Srinivasan, J., Dolovich, J., Hargreave, F.E., 1979. Human sensitization to *Ganoderma* antigen. J. Allergy Clin. Immunol. 64, 43–49. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(79\)90082-4](https://doi.org/10.1016/0091-6749(79)90082-4)
- Tay, Y.Z., Pan, A.F., Chiam, K.H., 2022. Cholestatic liver injury from *Ganoderma lucidum* coffee extract—a case report. AME Med. J. 7, 0–2. <https://doi.org/10.21037/amj-22-27>

- Taylor, T.N., Krings, M., Taylor, E.L., 2015. Fossil Fungi. Academic Press, San Diego. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-387731-4.00014-1>
- Teekachunhatean, S., Sadjja, S., Ampasavate, C., Chiranthanut, N., Rojanasthien, N., Sangdee, C., 2012. Pharmacokinetics of ganoderic acids A and F after oral administration of Ling Zhi preparation in healthy male volunteers. Evidence-based Complement. Altern. Med. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/780892>
- Tengerdy, R.P., Szakacs, G., 2003. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. Biochem. Eng. J. 13, 169–179. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00129-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00129-8)
- The Business Research Company, 2025. Reishi Mushroom global market report 2025. Accedido desde: <https://www.thebusinessresearchcompany.com/report/reishi-mushroom-global-market-report>
- The Human Microbiome Project Consortium, 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature 486, 207–214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>
- Thon, M.R., Royse, D.J., 1999. Partial β -tubulin gene sequences for evolutionary studies in the Basidiomycotina. Mycologia 91, 468–474. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061040>
- Thuy, N.H.L., Tu, V.L., Thu, L.N.A., Giang, T.T., Huyen, D.T.K., Loc, D.H., Tam, D.N.H., Phat, N.T., Huynh, H.-H., Truyen, T.T.T.T., Nguyen, Q.-H., Do, U., Nguyen, D., Dat, T. Van, Minh, L.H.N., 2023. Pharmacological activities and safety of *Ganoderma lucidum* spores: A systematic review. Cureus 15. <https://doi.org/10.7759/cureus.44574>
- Tjellström, B., Högberg, L., Stenhammar, L., Magnusson, K.E., Midtvedt, T., Norin, E., Sundqvist, T., 2012. Effect of exclusive enteral nutrition on gut microflora function in children with Crohn's disease. Scand. J. Gastroenterol. 47, 1454–1459. <https://doi.org/10.3109/00365521.2012.703234>
- Trinci, A.P.J., Wiebe, M.G., Robson, G.D., 2001. Hyphal Growth. Encycl. Life Sci. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000367.pub2>
- Tshinyangu, K.K., Hennebert, G.L., 1996. Protein and chitin nitrogen contents and protein content in *Pleurotus ostreatus* var. columbinus. Food Chem. 57, 223–227. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00202-2](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00202-2)
- Tsoni, S.V., Brown, G.D., 2008. β -Glucans and dectin-1. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1143, 45–60. <https://doi.org/10.1196/annals.1443.019>
- Turnbaugh, P.J., Bäckhed, F., Fulton, L., Gordon, J.I., 2008. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. Cell Host Microbe 3, 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.02.015>
- Turnbaugh, P.J., Gordon, J.I., 2009. The core gut microbiome, energy balance and obesity. J. Physiol. 587, 4153–4158. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.174136>
- Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E., Sogin, M.L., Jones, W.J., Roe, B.A., Affourtit, J.P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A.C., Knight, R., Gordon, J.I., 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. Nature 457, 480–484. <https://doi.org/10.1038/nature07540>
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., Gordon, J.I., 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature 444, 1027–1031. <https://doi.org/10.1038/nature05414>

- Trutmann, P., 2012. The Forgotten Mushrooms of Ancient Peru. Global Mountain Action, Fungi and Mountains Publication Series, Switzerland. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7626547>
- Ulziijargal, E., Mau, J.L., 2011. Nutrient compositions of culinary-medicinal mushroom fruiting bodies and mycelia. *Int. J. Med. Mushrooms* 13, 343–349. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v13.i4.40>
- Ünak, P., Yurt Lambrecht, F., Biber, F.Z., Darcan, S., 2007. Iodine measurements by isotope dilution analysis in drinking water in Western Turkey. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 273, 649–651. <https://doi.org/10.1007/s10967-007-0925-3>
- Upadhyaya, S., Banerjee, G., 2015. Type 2 diabetes and gut microbiome: At the intersection of known and unknown. *Gut Microbes* 6, 85–92. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1024918>
- Urbain, P., Jakobsen, J., 2015. Dose-response effect of sunlight on vitamin d2 production in *Agaricus bisporus* mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* 63, 8156–8161. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02945>
- van de Guchte, M., Blottière, H.M., Doré, J., 2018. Humans as holobionts: implications for prevention and therapy. *Microbiome* 6, 81. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0466-8>
- Van Der Heijden, M.G.A., Horton, T.R., 2009. Socialism in soil? the importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *J. Ecol.* 97, 1139–1150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2009.01570.x>
- van der Hem, L.G., van der Vliet, J., Bocken, C.F.M., Kino, K., Hoitsma, A.J., Tax, W.J.M., 1995. Ling zhi-8: Studies of a new immunomodulating agent. *Transplantation* 60, 438–443. <https://doi.org/10.1097/00007890-199509000-00006>
- Vela Gurovic, M.S., Viceconte, F.R., Pereyra, M.T., Bidegain, M.A., Cubitto, M.A., 2018. DNA damaging potential of *Ganoderma lucidum* extracts. *J. Ethnopharmacol.* 217, 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.02.005>
- Veljović, S., Veljović, M., Nikićević, N., Despotović, S., Radulović, S., Nikšić, M., Filipović, L., 2017. Chemical composition, antiproliferative and antioxidant activity of differently processed *Ganoderma lucidum* ethanol extracts. *J. Food Sci. Technol.* 54, 1312–1320. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2559-y>
- Venegas, D.P., De La Fuente, M.K., Landskron, G., González, M.J., Quera, R., Dijkstra, G., Harmsen, H.J.M., Faber, K.N., Hermoso, M.A., 2019. Short chain fatty acids (SCFAs) mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. *Front. Immunol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00277>
- Venema, K., Van Den Abbeele, P., 2013. Experimental models of the gut microbiome. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 27, 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2013.03.002>
- Verhoeckx, K., Cotter, P., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., 2015. In vitro fermentation models: General introduction, The impact of food bioactives on health: *in vitro* and *ex vivo* models. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4>
- Vieira-Silva, S., Falony, G., Darzi, Y., Lima-Mendez, G., Garcia Yunta, R., Okuda, S., Vandeputte, D., Valles-Colomer, M., Hildebrand, F., Chaffron, S., Raes, J., 2016. Species-function relationships shape ecological properties of the human gut microbiome. *Nat. Microbiol.* 1, 1–8. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.88>
- Vilá-Héreter, F., Rivera-Mariani, F.E., Bolaños-Rosero, B., 2017. Serological reactivity and identification of immunoglobulin E-binding polypeptides of *Ganoderma applanatum* crude spore

- cytoplasmic extract in Puerto Rican subjects. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 172, 139–149. <https://doi.org/10.1159/000455254>
- Voller, A., Bartlett, A., Bidwell, D.E., 1978. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J. Clin. Pathol.* 31, 507–520. <https://doi.org/10.1136/jcp.31.6.507>
- Wachtel-Galor, S., Szeto, Y.T., Tomlinson, B., Benzie, I.F.F., 2004a. *Ganoderma lucidum* ('Lingzhi'); acute and short-term biomarker response to supplementation. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 55, 75–83. <https://doi.org/10.1080/09637480310001642510>
- Wachtel-Galor, S., Tomlinson, B., Benzie, I.F.F., 2004b. *Ganoderma lucidum* ('Lingzhi'), a Chinese medicinal mushroom: biomarker responses in a controlled human supplementation study. *Br. J. Nutr.* 91, 263–269. <https://doi.org/10.1079/bjn20041039>
- Wachtel-Galor, S., Yuen, J., Buswell, J.A., Benzie, I.F.F., 2011. *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi) A Medicinal Mushroom, in: Benzie, I.F.F., Wachtel-Galor, S. (Eds.), *Herbal medicine: Biomolecular and clinical aspects: Second Edition*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL), pp. 173–198.
- Wachtel-Galor, S., Yuen, J., Buswell, J.A., Benzie, I.F.F., 2011. *Ganoderma lucidum* (lingzhi or reishi): A medicinal mushroom. *Herb. Med. Biomol. Clin. Asp. Second Ed.* 175–199.
- Wagner, R., Mitchell, D.A., Sassaki, G.L., Amazonas, M.A.L.D.A., 2004. Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharide. *J. Biotechnol.* 114, 153–164. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.06.013>
- Wagner, R., Mitchell, D.A., Sassaki, G.L., De Almeida Amazonas, M.A.L., Berovič, M., 2003. Current techniques for the cultivation of *Ganoderma lucidum* for the production of biomass, ganoderic acid and polysaccharides. *Food Technol. Biotechnol.* 41, 371–382.
- Walsh, C.J., Guinane, C.M., O'Toole, P.W., Cotter, P.D., 2014. Beneficial modulation of the gut microbiota. *FEBS Lett.* 588, 4120–4130. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.03.035>
- Wang, Q., Wang, F., Xu, Z., Ding, Z., 2017. Bioactive mushroom polysaccharides: A review on monosaccharide composition, biosynthesis and regulation. *Molecules* 22. <https://doi.org/10.3390/molecules22060955>
- Wang, S., Wang, Z., Zhang, Y., Wang, J., Guo, R., 2013. Pesticide residues in market foods in Shaanxi Province of China in 2010. *Food Chem.* 138, 2016–2025. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.116>
- Wang, X.C., Xi, R.J., Li, Y., Wang, D.M., Yao, Y.J., 2012. The species identity of the widely cultivated *Ganoderma*, “*G. lucidum*” (ling-zhi), in China. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040857>
- Wang, Y., Liu, Y., Yu, H., Zhou, S., Zhang, Z., Wu, D., Yan, M., Tang, Q., Zhang, J., 2017. Structural characterization and immuno-enhancing activity of a highly branched water-soluble β -glucan from the spores of *Ganoderma lucidum*. *Carbohydr. Polym.* 167, 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.016>
- Wang, Z., Luo, D., Liang, Z., 2004. Structure of polysaccharides from the fruiting body of *Hericium erinaceus* Pers. *Carbohydr. Polym.* 57, 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.04.018>
- Wanmuang, H., Leopairut, J., Kositchaiwat, C., Wananukul, W., Bunyaratvej, S., 2007. Fatal fulminant hepatitis associated with *Ganoderma lucidum* (Lingzhi) mushroom powder. *J. Med. Assoc. Thail.* 90, 179–181.

- Wasser, S.P., 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Appl. Microbiol. Biotechnol. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1076-7>
- Wasser, S.P., 2005. Reishi or Ling Zhi (*Ganoderma lucidum*). Encycl. Diet. Suppl. 603–622. <https://doi.org/10.1081/E-EDS-120022119>
- Wasser, S.P., 2010. Medicinal Mushroom Science: History, Current Status, Future Trends, and Unsolved Problems. Int. J. Med. Mushrooms, 12, 1–16.
- Wei, Y. han, Ma, X., Zhao, J.C., Wang, X.Q., Gao, C.Q., 2023. Succinate metabolism and its regulation of host-microbe interactions. Gut Microbes 15, 1–20. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2190300>
- Welti, S., Moreau, P.A., Decock, C., Danel, C., Duhal, N., Favel, A., Courtecuisse, R., 2015. Oxygenated lanostane-type triterpenes profiling in laccate *Ganoderma* chemotaxonomy. Mycol. Prog. 14. <https://doi.org/10.1007/s11557-015-1066-7>
- Wen, L., Gao, Q., Ma, C. wah, Ge, Y., You, L., Liu, R.H., Fu, X., Liu, D., 2016. Effect of polysaccharides from *Tremella fuciformis* on UV-induced photoaging. J. Funct. Foods 20, 400–410. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.014>
- Wen, L., Sheng, Z., Wang, J., Jiang, Y., Yang, B., 2022. Structure of water-soluble polysaccharides in spore of *Ganoderma lucidum* and their anti-inflammatory activity. Food Chem. 373, 131374. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131374>
- White, B.A., Lamed, R., Bayer, E.A., Flint, H.J., 2014. Biomass utilization by gut microbiomes. Annu. Rev. Microbiol. 68, 279–296. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155618>
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. PCR Protoc. 315–322. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wicks, S.M., Tong, R., Wang, C.Z., O'Connor, M., Karrison, T., Li, S., Moss, J., Yuan, C.S., 2007. Safety and tolerability of *Ganoderma lucidum* in healthy subjects: A double-blind randomized placebo-controlled trial. Am. J. Chin. Med. 35, 407–414. <https://doi.org/10.1142/S0192415X07004928>
- Wihastuti, T.A., Sargowo, D., Widodo, M.A., Heriansyah, T., Soeharto, S., Anita, K.W., A'ini, N.Q., 2015. Effects of subchronic exposure of PSP *Ganoderma lucidum* on renal function and histopathology feature in *Rattus norvegicus* Wistar strain. Natl. J. Physiol. Pharm. Pharmacol. 5, 296–302. <https://doi.org/10.5455/njppp.2015.5.0603201539>
- Wihastuti, T.A., Sargowo, D., Widodo, M.A., Heriansyah, T., Soeharto, S., Ardi, A.I., 2014. Subchronic toxicity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide peptide (PsP) to liver physiology and histopathologyimaging of liver on rattus norvegicus strain wistar rats. Biomed. Pharmacol. J. 7, 417–424. <https://doi.org/10.13005/bpj/506>
- Wihastuti, T.A., Sargowo, D., Widodo, M.A., Soeharto, S., Iskandar, A., Heriansyah, T., Sahudi, D.P., Octariny K7, J.J., SH, H., 2016. Evaluation subchronic toxic effect of polysaccharide peptide on lipid and hematologic profile in *Rattus norvegicus* strain Wistar. Bangladesh J. Med. Sci. 15, 409–415.
- Winter, G., 2020. The complex relationship between drugs and the microbiome. Nature 577, S10–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/d41586-020-00196-0>
- Woldegiorgis, A.Z., 2014. Fatty acid profile of wild and cultivated edible mushrooms collected from Ethiopia. J. Nutr. Food Sci. 05. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000360>

- Wong, K.L., Wong, R.N.S., Zhang, L., Liu, W.K., NG, T.B., Shaw, P.C., Kwok, P.C.L., Lai, Y.M., Zhang, Z.J., Zhang, Y., Tong, Y., Cheung, H.P., Lu, J., Sze, S.C.W., 2014. Bioactive proteins and peptides isolated from Chinese medicines with pharmaceutical potential. *Chinese Med. (United Kingdom)* 9, 19. <https://doi.org/10.1186/1749-8546-9-19>
- Worrall, J.J., 1997. Somatic incompatibility in basidiomycetes. *Mycologia* 89, 24–36. <https://doi.org/10.2307/3761169>
- Wu, D.T., Deng, Y., Chen, L.X., Zhao, J., Bzhelyansky, A., Li, S.P., 2017. Evaluation on quality consistency of *Ganoderma lucidum* dietary supplements collected in the United States. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06336-3>
- Wu, G.S., Song, Y.L., Yin, Z.Q., Guo, J.J., Wang, S.P., Zhao, W.W., Chen, X.P., Zhang, Q.W., Lu, J.J., Wang, Y.T., 2013. Ganoderiol A-enriched extract suppresses migration and adhesion of MDA-MB-231 cells by inhibiting FAK-SRC-paxillin cascade pathway. *PLoS One* 8, 2–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076620>
- Wu, Q., Zhang, H., Wang, P.G., Chen, M., 2017. Evaluation of the efficacy and safety of: *Ganoderma lucidum* mycelium-fermented liquid on gut microbiota and its impact on cardiovascular risk factors in human. *RSC Adv.* 7, 45093–45100. <https://doi.org/10.1039/c7ra08087e>
- Xie, J., Shen, M., Nie, S., Liu, X., Zhang, H., Xie, M., 2013. Analysis of monosaccharide composition of *Cyclocarya paliurus* polysaccharide with anion exchange chromatography. *Carbohydr. Polym.* 98, 976–981. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.07.011>
- Xie, J., Li, Q., Nie, S., 2024. Bacterial extracellular vesicles: An emerging postbiotic. *Trends in Trends Food Sci. Technol.* 143, 104275. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.104275>
- Xu, F., Liao, K., Wu, Y., Pan, Q., Wu, L., Jiao, H., Guo, D., Li, B., Liu, B., 2016. Optimization, characterization, sulfation and antitumor activity of neutral polysaccharides from the fruit of *Borjoa sorbilis* cuter. *Carbohydr. Polym.* 151, 364–372. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.091>
- XuJie, H., Na, Z., SuYing, X., ShuGang, L., BaoQiu, Y., 2008. Extraction of BaChu mushroom polysaccharides and preparation of a compound beverage. *Carbohydr. Polym.* 73, 289–294. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.11.033>
- Yamin-Pasternak, S., 2007. How the devils went deaf: ethnomycology, cuisine, and perception of landscape in the Russian North. *J. Allergy Clin. Immunol. Faculty of the University of Alaska Fairbanks*.
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00023-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00023-5)
- Yang, J., Martínez, I., Walter, J., Keshavarzian, A., Rose, D.J., 2013. Invitro characterization of the impact of selected dietary fibers on fecal microbiota composition and short chain fatty acid production. *Anaerobe* 23, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.06.012>
- Yang, L., Kang, X., Dong, W., Wang, L., Liu, S., Zhong, X., Liu, D., 2022. Prebiotic properties of *Ganoderma lucidum* polysaccharides with special enrichment of *Bacteroides ovatus* and *B. uniformis* in vitro. *J. Funct. Foods* 92, 105069. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105069>
- Yang, M., Wang, X., Guan, S., Xia, J., Sun, J., Guo, H., Guo, D. an, 2007. Analysis of triterpenoids in *Ganoderma lucidum* using liquid chromatography coupled with electrospray

- ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18, 927–939. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.01.012>
- Yang, S.X., Yu, Z.C., Lu, Q.Q., Shi, W.Q., Laatsch, H., Gao, J.M., 2012. Toxic lanostane triterpenes from the basidiomycete *Ganoderma amboinense*. *Phytochem. Lett.* 5, 576–580. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2012.05.017>
- Yang, T.W., Lee, W.H., Tu, S.J., Huang, W.C., Chen, H.M., Sun, T.H., Tsai, M.C., Wang, C.C., Chen, H.Y., Huang, C.C., Shiu, B.H., Yang, T.L., Huang, H.T., Chou, Y.P., Chou, C.H., Huang, Y.R., Sun, Y.R., Liang, C., Lin, F.M., Ho, S.Y., Chen, W.L., Yang, S.F., Ueng, K.C., Huang, H. Da, Huang, C.N., Jong, Y.J., Lin, C.C., 2019. Enterotype-based analysis of gut microbiota along the conventional adenoma-carcinoma colorectal cancer pathway. *Sci. Rep.* 9, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45588-z>
- Yao, C., Wang, Z., Jiang, H., Yan, R., Huang, Q., Wang, Y., Xie, H., Zou, Y., Yu, Y., Lv, L., 2021. *Ganoderma lucidum* promotes sleep through a gut microbiota-dependent and serotonin-involved pathway in mice. *Sci. Rep.* 11, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92913-6>
- Yuan, Y., Wang, Y.B., Jiang, Y., Prasad, K.N., Yang, J., Qu, H., Wang, Y., Jia, Y., Mo, H., Yang, B., 2016. Structure identification of a polysaccharide purified from *Lycium barbarum* fruit. *Int. J. Biol. Macromol.* 82, 696–701. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.069>
- Yuen, M.F., Ip, P., Ng, W.K., Lai, C.L., 2004. Hepatotoxicity due to a formulation of *Ganoderma lucidum* (lingzhi). *J. Hepatol.* 41, 685–686. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.06.016>
- Zavadskaya, E.V., 1077. Philosophical and aesthetic meaning of the so-called “divine mushroom” (“lingzhi”) in the art of China. *Scientific reports of the State Museum of Oriental Art, M.: Nauka*, 9, 40–46.
- Ze, X., Duncan, S.H., Louis, P., Flint, H.J., 2012. *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *ISME J.* 6, 1535–1543. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.4>
- Zhang, C., Zhang, M., Pang, X., Zhao, Y., Wang, L., Zhao, L., 2012. Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations. *ISME J.* 6, 1848–1857. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.27>
- Zhang, C., Zhang, M., Wang, S., Han, R., Cao, Y., Hua, W., Mao, Y., Zhang, X., Pang, X., Wei, C., Zhao, G., Chen, Y., Zhao, L., 2010. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *ISME J.* 4, 232–241. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.112>
- Zhang, F., Aschenbrenner, D., Yoo, J.Y., Zuo, T., 2022. The gut mycobiome in health, disease, and clinical applications in association with the gut bacterial microbiome assembly. *The Lancet Microbe* 3, e969–e983. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(22\)00203-8](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00203-8)
- Zhang, H., DiBaise, J.K., Zuccolo, A., Kudrna, D., Braidotti, M., Yu, Y., Parameswaran, P., Crowell, M.D., Wing, R., Rittmann, B.E., Krajmalnik-Brown, R., 2009. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *PNAS* 106, 2365–2370. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.081260010>
- Zhang, H., Li, W.J., Nie, S.P., Chen, Y., Wang, Y.X., Xie, M.Y., 2012. Structural characterisation of a novel bioactive polysaccharide from *Ganoderma atrum*. *Carbohydr. Polym.* 88, 1047–1054. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.061>

- Zhang, H., Zhao, H., Zhou, X., Yang, X., Shen, S., Wang, J., Wang, Z., Geng, L., 2016. Isolation and characterization of antioxidant polysaccharides (PKCP-D70-2-a and PKCP-D70-2-b) from the: *Pinus koraiensis* pinecone. RSC Adv. 6, 110706–110721. <https://doi.org/10.1039/c6ra23205a>
- Zhang, H., Chen, J., Li, J., Yan, L., Li, S., Ye, X., Liu, D., Ding, T., Linhardt, J., Orfila, C., Chen, S., 2018. Extraction and characterization of RG-I enriched pectic polysaccharides from mandarin citrus peel. Food Hydrocoll. 79, 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.12.002>
- Zhang, J., Gao, X., Pan, Y., Xu, N., Jia, L., 2016. Toxicology and immunology of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in Kunming mice and Wistar rats. Int. J. Biol. Macromol. 85, 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.12.090>
- Zhang, K., Pu, Y.Y., Sun, D.W., 2018. Recent advances in quality preservation of postharvest mushrooms (*Agaricus bisporus*): A review. Trends Food Sci. Technol. 78, 72–82. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.012>
- Zhang, L., Gadd, G.M., Li, Z., 2021. Microbial biomodification of clay minerals, 1st ed, Advances in Applied Microbiology. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2020.07.002>
- Zhang, M., Cui, S.W., Cheung, P.C.K., Wang, Q., 2007. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. Trends Food Sci. Technol. 18, 4–19. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.07.013>
- Zhang, M., Liu, J., Xia, Q., 2023. Role of gut microbiome in cancer immunotherapy: from predictive biomarker to therapeutic target. Exp. Hematol. Oncol. 12. <https://doi.org/10.1186/s40164-023-00442-x>
- Zhang, S., Wang, H., Zhu, M., 2019. A Sensitive GC/MS detection method for analyzing microbial metabolites short chain fatty acids in fecal and serum samples. Talanta 196, 249–254. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.12.049>
- Zhang, X., Xu, Z., Pei, H., Chen, Z., Tan, X., Hu, J., Yang, B., Sun, J., 2017. Intraspecific variation and phylogenetic relationships are revealed by ITS1 secondary structure analysis and single-nucleotide polymorphism in *Ganoderma lucidum*. PLoS One 12, 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169042>
- Zhang, Y., Lin, Z., Hu, Y., Wang, F., 2008. Effect of *Ganoderma lucidum* capsules on T lymphocyte subsets in football players on “living high-training low.” Br. J. Sports Med. 42, 519–522. <https://doi.org/10.1136/bjsm.2007.038620>
- Zhao, H., Luo, Y., Lu, C., Lin, N., Xiao, C., Guan, S., Guo, D.A., Liu, Z., Ju, D., He, X., Lu, A., 2010. Enteric mucosal immune response might trigger the immunomodulation activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide in mice. Planta Med. 76, 223–227. <https://doi.org/10.1055/s-00029-1186055>
- Zhao, H., Zhang, Q., Zhao, L., Huang, X., Wang, J., Kang, X., 2012. Spore powder of *Ganoderma lucidum* improves cancer-related fatigue in breast cancer patients undergoing endocrine therapy: A pilot clinical trial. Evidence-based Complement. Altern. Med. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/809614>
- Zhao, L., 2013. The gut microbiota and obesity: From correlation to causality. Nat. Rev. Microbiol. 11, 639–647. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3089>

- Zhao, L., Dong, Y., Chen, G., Hu, Q., 2010. Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. Carbohydr. Polym. 80, 783–789. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.029>
- Zhao, Qilong, Jiang, Y., Zhao, Qian, Patrick Manzi, H., Su, L., Liu, D., Huang, X., Long, D., Tang, Z., Zhang, Y., 2023. The benefits of edible mushroom polysaccharides for health and their influence on gut microbiota: a review. Front. Nutr. 10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1213010>
- Zheng, P., Li, Z., Zhou, Z., 2018. Gut microbiome in type 1 diabetes: A comprehensive review. Diabetes. Metab. Res. Rev. 34, 1–9. <https://doi.org/10.1002/dmrr.3043>
- Zhibin Lin, B.Y., 2019. *Ganoderma* and Health: Biology, Chemistry and Industry.
- Zhong, L., Yan, P., Lam, W.C., Yao, L., Bian, Z., 2019. *Coriolus versicolor* and *Ganoderma lucidum* related natural products as an adjunct therapy for cancers: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Front. Pharmacol. 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00703>
- Zhou, L.W., Cao, Y., Wu, S.H., Vlasák, J., Li, D.W., Li, M.J., Dai, Y.C., 2015. Global diversity of the *Ganoderma lucidum* complex (*Ganodermataceae*, *Polyporales*) inferred from morphology and multilocus phylogeny. Phytochemistry 114, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.09.023>
- Zhou, S., Tang, Q., Tang, C., Liu, Y., Ma, F., Zhang, X., Zhang, J., 2018. Triterpenes and soluble polysaccharide changes in lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (*Agaricomycetes*), during fruiting growth. Int. J. Med. Mushrooms 20, 859–871. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2018027357>
- Zhou, W., Yan, Y., Mi, J., Zhang, H., Lu, L., Luo, Q., Li, X., Zeng, X., Cao, Y., 2018. Simulated digestion and fermentation *in vitro* by human gut microbiota of polysaccharides from bee collected pollen of Chinese wolfberry. J. Agric. Food Chem. 66, 898–907. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05546>
- Zhu, F., Qu, L., Fan, W., Qiao, W., Hao, H., Wang, X., 2011. Assessment of heavy metals in some wild edible mushrooms collected from Yunnan Province, China. Env. Monit Assess 179, 191–199. <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1728-5>
- Zhu, K., Yao, S., Zhang, Y., Liu, Q., Xu, F., Wu, G., Dong, W., Tan, L., 2019. Effects of *in vitro* saliva, gastric and intestinal digestion on the chemical properties, antioxidant activity of polysaccharide from *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Jackfruit) Pulp. Food Hydrocoll. 87, 952–959. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.09.014>
- Zhu, Z., Liu, X., Fang, X., Sun, H., Yang, X., 2016. Structural characterization and anti-tumor activity of polysaccharide produced by *Hirsutella sinensis*. Int. J. Biol. Macromol. 82, 959–966. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.075>
- Ziaja-Sołtys, M., Radzki, W., Nowak, J., Topolska, J., Jabłońska-Ryś, E., Sławińska, A., Skrzypczak, K., Kuczumow, A., Bogucka-Kocka, A., 2020. Processed fruiting bodies of *Lentinus edodes* as a source of biologically active polysaccharides. Appl. Sci. 10. <https://doi.org/10.3390/app10020470>
- Zilber-Rosenberg, I., Rosenberg, E., 2008. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: The hologenome theory of evolution. FEMS Microbiol. Rev. 32, 723–735. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x>

Zupancic, M.L., Cantarel, B.L., Liu, Z., Drabek, E.F., Ryan, K.A., Cirimotich, S., Jones, C., Knight, R., Walters, W.A., Knights, D., Mongodin, E.F., Horenstein, R.B., Mitchell, B.D., Steinle, N., Snitker, S., Shuldiner, A.R., Fraser, C.M., 2012. Analysis of the gut microbiota in the old order amish and its relation to the metabolic syndrome. *PLoS One* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043052>

ANEXO INTRODUCCIÓN

Anexo Introducción, Tabla 1. Dataset de las especies de HCyM de mayor consumo y más investigadas en el mundo. Criterios: Especie de hongo: nominal, seleccionadas con el criterio de corresponder a los asco/basidiomicetos y ser consumidos como alimento o medicina; Locación: nominal, geográfica; país de origen de los especímenes depositados en bases de datos (<https://www.boldsystems.org/>). En caso de no estar publicado se asigna como “no especificado”; Cantidad de ingresos en Mycobank: <https://www.mycobank.org/> reúne una vasta cantidad de especies del reino Fungi, muchas de las cuales a su vez contienen categorías de subespecie o “variedad; var.”). El número de ingresos o registros de una especie en este sitio es un indicador de la variabilidad interespecie; Artículos de investigación: recuento de la cantidad de *papers* (excluyendo *reviews*) que trabajen con cierta especie de HCyM. Motores de búsqueda: ScienDirect y PubMed; Estudios clínicos: Dentro de esos artículos de investigación, aquellos que son estudios clínicos, a fin de poner en evidencia los usos medicinales que cuentan con aval científico por probarse en humanos (empleando el filtro “*clinical trial*” en PubMed; Actualizado julio 2021).

Especie	Locación	Ingresos en Mycobank	Artículos de investigación	Estudios clínicos
<i>Agaricus bisporus</i>	Noruega, EE.UU., India	12	801	11
<i>Agaricus campestris</i>	Noruega, EE.UU., India	58	33	0
<i>Agrocybe cylindracea</i>	Francia, Noruega	1	28	0
<i>Agrocybe dura</i>	Canadá, Noruega	3	7	0
<i>Agrocybe pediades</i>	Canadá, Noruega, EE.UU., India	10	5	0
<i>Amanita fulva</i>	Canadá, Noruega, EE.UU.	6	7	0
<i>Amanita vaginata</i>	Francia, Noruega, EE.UU., Dinamarca, Canadá	65	12	0
<i>Amanita muscaria</i>	Canadá, EE.UU., Noruega, Colombia, México	47	113	0
<i>Amanita rubescens</i>	Canadá, EE.UU., Noruega, Dinamarca, Francia, México	26	29	0
<i>Amanita caesarea</i>	México	12	10	0
<i>Amanita jacksonii</i>	México, EE.UU.	1	1	0
<i>Auricularia auricula-judae</i>	Francia, Noruega, India, Argentina, México	9	79	0
<i>Auricularia polytricha</i>	Taiwán, India, Brasil, México, Argentina, Ecuador	6	72	0
<i>Boletus aereus</i>	Noruega	11	15	0
<i>Boletus edulis</i>	Canadá, Noruega, Francia, EE.UU., México	54	203	0
<i>Boletus erythropus</i>	México	14	4	0
<i>Cantharellus cibarius</i>	Canadá, Noruega, EE.UU., México	44	105	0
<i>Coprinus comatus</i>	EE.UU., Noruega, India, Canadá	17	71	0
<i>Coprinus silvaticus</i>	India	2	1	0
<i>Cordyceps sinensis</i>	China	1	188	21
<i>Cordyceps militaris</i>	Noruega, EE.UU.	6	563	2
<i>Cyathus olla</i>	India, Canadá, Argentina	9	9	0
<i>Cyathus stercoreus</i>	India, Canadá, Argentina	9	4	0
<i>Cyathus striatus</i>	Noruega, Canadá	3	6	0
<i>Flammulina velutipes</i>	Noruega, Canadá, EE.UU.	15	123	0

<i>Fomes fomentarius</i>	Noruega, Canadá, EE.UU.	5	16	0
<i>Grifola frondosa</i>	Noruega	5	148	3
<i>Ganoderma applanatum</i>	India, Canadá, Argentina, EE.UU., Noruega, Francia, China	14	71	0
<i>Ganoderma australe</i>	India, Canadá	3	22	0
<i>Ganoderma lucidum</i>	India, Colombia, Francia, Argentina, EE.UU., Noruega	21	1586	32
<i>Ganoderma resinaceum</i>	EE.UU.	6	22	0
<i>Ganoderma sessile</i>	Canadá	1	9	0
<i>Ganoderma oregonense</i>	Canadá, EE.UU.	1	8	0
<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	-	5	20	0
<i>Hericium coralloides</i>	Noruega, EE.UU.	4	16	0
<i>Hericium erinaceus</i>	EE.UU., Costa Rica	9	106	5
<i>Laccaria amethystina</i>	Noruega, EE.UU., México, Dinamarca, Canadá	1	9	0
<i>Laccaria bicolor</i>	Noruega, EE.UU., México, Canadá	4	59	0
<i>Laccaria laccata</i>	Noruega, EE.UU., México, Canadá	34	54	0
<i>Lentinus edodes</i>	-	1	946	14
<i>Lentinus lepideus</i>	-	3	6	0
<i>Lentinus tigrinus</i>	EE.UU., Francia	7	34	0
<i>Lycoperdon perlatum</i>	Canadá, Noruega, Argentina, EE.UU., México	11	30	0
<i>Lycoperdon pyriforme</i>	Canadá, Noruega	21	6	0
<i>Pleurotus djamor</i>	India	10	50	0
<i>Pleurotus eryngii</i>	No especificado	13	442	1
<i>Pleurotus ostreatus</i>	EE.UU., Canadá, India, Noruega	33	1257	9
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	EE.UU., Canadá, India, Noruega	6	136	0
<i>Psilocybe cubensis</i>	No especificado	4	49	0
<i>Psilocybe semilanceata</i>	Noruega	7	13	0
<i>Schizophyllum commune</i>	India, México, Brasil, Argentina, EE.UU., Canadá, Noruega}	7	673	8
<i>Scleroderma areolatum</i>	Noruega, México, Canadá	1	7	0

<i>Scleroderma bovista</i>	Noruega, India	1	4	1
<i>Scleroderma citrinum</i>	Noruega, Canadá, EE.UU.	4	27	0
<i>Suillus collinitus</i>	Francia	4	10	0
<i>Suillus grevillei</i>	Noruega, Canadá	8	15	0
<i>Suillus luteus</i>	Noruega, Canadá, Colombia, México		73	0
<i>Suillus variegatus</i>	Noruega	6	24	0
<i>Trametes gibbosa</i>	EE.UU., Noruega, Canadá	6	18	0
<i>Trametes hirsuta</i>	EE.UU., Noruega, Canadá, India	8	135	0
<i>Trametes trogii</i>	India	3	52	0
<i>Trametes versicolor</i>	Canadá, EE.UU., Noruega, Argentina	17	947	3
<i>Tricholoma equestre</i>	Canadá, Noruega, México	5	18	0
<i>Tricholoma pardinum</i>	No especificado	6	4	0

ANEXO 1

Anexo 1, Data 1. Ecuaciones ajustadas y parámetros del ajuste de los modelos de la producción de: **A.** Polisacáridos (PS) y biomasa en cultivo líquido como función del día de cultivo para: **I)** *Ganoderma* sp. E47; **II)** *Ganoderma* sp. CS y **III)** *Ganoderma* sp. GO; **B.** Polisacáridos (PS) y biomasa en cultivo sólido como función de la oleada de cultivo para *Ganoderma* sp. E47. N: número de réplicas. AIC: *Alike Information Criterion*; BIC: *Bayesian Information Criterion*.

A.

I. PS:

$$y = 0,83 + 1,32*x + 0,62*x^2 - 0,08*x^3 - 0,06*x^4 - 0,002*x^5$$

<u>N</u>	<u>AIC</u>	<u>BIC</u>
12	17,58	20,97

BIOMASA:

$$\text{Ln}(y) = 3,63 + 0,70*x + 0,11*x^2 - 0,18*x^3 - 0,11*x^4 + 0,01*x^5$$

<u>N</u>	<u>AIC</u>	<u>BIC</u>
12	-1,82	1,57

II. PS:

$$y = 2,78 + 1,46*x - 0,83*x^2 - 0,51*x^3 + 0,07*x^4 + 0,04*x^5$$

<u>N</u>	<u>AIC</u>	<u>BIC</u>
12	5,81	9,21

BIOMASA:

$$\text{Ln}(y) = 3,49 + 0,30*x - 0,20*x^2 - 0,19*x^3 + 0,01*x^4 + 0,02*x^5$$

<u>N</u>	<u>AIC</u>	<u>BIC</u>
12	-5,45	-2,06

III. PS:

$$y = 0,82 - 0,31*x + 0,09*x^2 - 0,04*x^3 - 0,01*x^4 + 0,01*x^5$$

<u>N</u>	<u>AIC</u>	<u>BIC</u>
12	9,13	12,52

BIOMASA:

$$\text{Ln}(y) = 3,46 - 0,10*x - 0,27*x^2 + 0,05*x^3 + 0,02*x^4 - 0,0047*x^5$$

<u>N</u>	<u>AIC</u>	<u>BIC</u>
12	8,88	12,27

B.

PS:

$$y = 1,50 - 0,36*x$$

<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>AIC</u>	<u>BIC</u>
6	0,94	-8,29	-8,92

BIOMASA:

$$y = -1,02 + 20,86 * x - 6,26 * x^2$$

<u>N</u>	<u>AIC</u>	<u>BIC</u>
9	39,11	39,89

Anexo 1, Tabla 1. Lista de los números de acceso y referencias de las secuencias empleadas en el análisis filogenético derivado del *internal transcribed spacer* (ITS) para *Phellinus* spp.

Identificación de la colección	N° de acceso	Referencias
<i>Phellinus conchatus</i> MJ 66/07	GQ383703.1	1
<i>Phellinus lundellii</i> BRNU 604719	GQ383704.1	1
<i>Phellinus populicola</i> MJ 92/96	GQ383705.1	1
<i>Phellinus populicola</i> BRNM 714885	GQ383706.1	1
<i>Phellinus populicola</i> BRNM 714890	GQ383707.1	1
<i>Phellinus igniarius</i> BRNM 714874	GQ383708.1	1
<i>Phellinus igniarius</i> BRNM 714889	GQ383709.1	1
<i>Phellinus igniarius</i> BRNM 714866	GQ383710.1	1
<i>Phellinus igniarius</i> MJ 39/07	GQ383711.1	1
<i>Phellinus igniarius</i> MJ 40/07	GQ383712.1	1
<i>Phellinus igniarius</i> BRNM 714871	GQ383713.1	1
<i>Phellinus igniarius</i> MJ 620/93	GQ383714.1	1
<i>Phellinus igniarius</i> BRNM 714884	GQ383715.1	1
<i>Phellinus igniarius</i> MJ 42/07	GQ383717.1	1
<i>Phellinus igniarius</i> MJ 19/94	GQ383718.1	1
<i>Phellinus nigricans</i> BRNM 714883	GQ383719.1	1
<i>Phellinus nigricans</i>	GQ383727.1	1
<i>Phellinus alni</i> MJ 383/96	GQ383728.1	1
<i>Phellinus alni</i> MJ 92/94	GQ383729.1	1
<i>Phellinus alni</i> MJ 283/94	GQ383731.1	1
<i>Phellinus alni</i> BRNM 714881	GQ383732.1	1
<i>Phellinus alni</i> BRNM 714870	GQ383733.1	1
<i>Phellinus alni</i> MJ 559/94	GQ383736.1	1
<i>Phellinus alni</i> BRNM 714892	GQ383737.	1
<i>Phellinus alni</i> PRM 893878	GQ383744.1	1
<i>Phellinus alni</i> PRM 893882	GQ383746.1	1
<i>Phellinus alni</i> MJ 53/96	GQ383750.1	1
<i>Phellinus alni</i> MJ 74/96	GQ383752.1	1
<i>Phellinus alni</i> MJ 178/94	GQ383753.1	1
<i>Phellinus alni</i> MJ 181/94	GQ383754.1	1
<i>Phellinus alni</i> MJ 205/94	GQ383755.1	1
<i>Phellinus alni</i> MJ 51/96	GQ383756.1	1
<i>Phellinus laevigatus</i> BRNM 714867	GQ383778.1	1
<i>Phellinus laevigatus</i> BRNM 714875	GQ383779.1	1
<i>Phellinus tremulae</i> BRNM 714886	GQ383780.1	1

<i>Phellinus tremulae</i> MJ 32/07	GQ383781.1	1
<i>Phellinus tremulae</i> MJ 45/07	GQ383782.1	1
<i>Phellinus tuberculosus</i> MJ 44/07	GQ383783.2	1
<i>Phellinus tuberculosus</i> MJ 47/07	GQ383784.1	1
<i>Phellinus piceicola</i> Cui 10289	JQ828907.1	2
<i>Phellinus piceicola</i> Cui 10440	JQ828908.1	2
<i>Phellinus piceicola</i> Cui 10453	JQ828909.1	2
<i>Phellinus piceicola</i> Cui 10455	JQ828910.1	2

REFERENCIAS DE TABLA 1

1. Tomšovský, M., Vampola, P., Sedlák, P., Byrtusová, Z., Jankovský, L., 2010. Delimitation of central and northern European species of the *Phellinus igniarius* group (*Basidiomycota*, *Hymenochaetales*) based on analysis of ITS and translation elongation factor 1 alpha DNA sequences. *Mycol. Prog.* 9, 431–445. <https://doi.org/10.1007/s11557-009-0653-x>
2. Zhou, L.W., Vlasák, J., Qin, W.M., Dai, Y.C., 2016. Global diversity and phylogeny of the *Phellinus igniarius* complex (*Hymenochaetales*, *Basidiomycota*) with the description of five new species. *Mycologia* 108, 192–204. <https://doi.org/10.3852/15-099>

Anexo 1, Tabla 2. Lista de los números de acceso y referencias de las secuencias empleadas en los análisis filogenéticos derivados de ITS, TEF1- α , LSU y β -tubulina para *Ganoderma* spp.

ITS

Identificación de la colección	Origen	Nº de acceso	Enviado por	Citado por	Referencias
<i>G. lucidum</i> GICN04	ITALIA	AM906058	Guglielmo 2007	Guglielmo <i>et al.</i> 2008; Zhang <i>et al.</i> 2017	1; 2
<i>G. lucidum</i> (Curtis)P. Karst HMAS86597	R.U.	AY884176	Wang y Yao 2005	Wang <i>et al.</i> 2012	3
<i>G. lucidum</i> TFM-F15131	JAPON	EU021455	Wang y Wu 2007	Cao <i>et al.</i> 2012; Correia de Lima Junior <i>et al.</i> 2014	4; 5
<i>G. lucidum</i> TFM-F18922	JAPON	EU021456	Wang y Wu 2007	Cao <i>et al.</i> 2012	4
<i>G. lucidum</i> Glu5108	ITALIA	EU498090	Iotti <i>et al.</i> 2008	Zhang <i>et al.</i> 2017	2
<i>G. sichuanense</i> HMAS240175	CHINA	JF915393	Wang y Yao 2011	Wang <i>et al.</i> 2012	3
<i>G. sichuanense</i> HMAS240177	CHINA	JF915395	Wang y Yao 2011	Wang <i>et al.</i> 2012	3
<i>G. sichuanense</i> HMAS250677	CHINA	JF915399	Wang y Yao 2011	Wang <i>et al.</i> 2012	3
<i>G. sichuanense</i> HMAS251147	CHINA	JF915402	Wang y Yao 2011	Wang <i>et al.</i> 2012	3
<i>G. sichuanense</i> HMAS76566	CHINA	JF915406	Wang y Yao 2011	Wang <i>et al.</i> 2012	3
<i>G. sichuanense</i> CGMCC5.75	CHINA	JN197282	Wang y Yao 2011	Wang <i>et al.</i> 2012	3
<i>G. sichuanense</i> CGMCC5.425	JAPON	JN197283	Wang y Yao 2011	Wang <i>et al.</i> 2012	3
<i>G. lucidum</i> Glu1	ITALIA	JN588575	Iotti <i>et al.</i> 2011	Zhang <i>et al.</i> 2017	2
<i>G. lucidum</i> Glu15	ITALIA	JN588577	Iotti <i>et al.</i> 2011	Zhang <i>et al.</i> 2017	2
<i>G. resinaceum</i> F-1	FRANCIA	JN588588	Iotti <i>et al.</i> 2011	Jargalmaa <i>et al.</i> 2017	6

<i>G. resinaceum</i> CBS152.27	R.U.	JQ520200	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b	7a,b
<i>G. resinaceum</i> IUM3651	REP. CHECA	JQ520204	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b	7a,b
<i>G. tsugae</i> ATCC64795	CANADA	JQ520215	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b	7a,b
<i>G. tsugae</i> ASI7064	EE.UU.	JQ520216	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b	7a,b
<i>G. lucidum</i> Dai2272	SUECIA	JQ781851	Cao <i>et al.</i> 2012	Cao <i>et al.</i> 2012; Zhang <i>et al.</i> 2017	4; 2
<i>G. lucidum</i> Dai11593	FINLANDIA	JQ781852	Cao <i>et al.</i> 2012	Cao <i>et al.</i> 2012	4
<i>G. lingzhi</i> Dai12573	CHINA	JQ781855	Cao <i>et al.</i> 2012	Cao <i>et al.</i> 2012; Jargalmaa <i>et al.</i> 2017	4; 6
<i>G. lingzhi</i> Cui4018	CHINA	JQ781856	Cao <i>et al.</i> 2012	Cao <i>et al.</i> , 2012	4
<i>G. lingzhi</i> Wu1006-38	CHINA	JQ781858	Cao <i>et al.</i> 2012	Cao <i>et al.</i> 2012; Jargalmaa <i>et al.</i> 2017	4; 6
<i>G. lingzhi</i> Li245	CHINA	JQ781863	Cao <i>et al.</i> 2012	Cao <i>et al.</i> , 2012	4
<i>G. lingzhi</i> Dai12479	CHINA	JQ781864	Cao <i>et al.</i> 2012	Cao <i>et al.</i> 2012; Zhou <i>et al.</i> 2015	4; 8
<i>G. sichuanense</i> CGMCC5.2175	CHINA	KC662402	Yao <i>et al.</i> 2013	Yao <i>et al.</i> 2013; Jargalmaa <i>et al.</i> 2017	9; 6
<i>G. sessile</i> JV1209/9	EE.UU.	KF605629	Vlasak 2013	Zhou <i>et al.</i> 2015	8
<i>G. tsugae</i> CFMR:DLL2011-264	EE.UU.	KJ140748	Brazee <i>et al.</i> 2014	Jargalmaa <i>et al.</i> 2017	6
<i>G. lucidum</i> BR4195	FRANCIA	KJ143909	Dai <i>et al.</i> 2014	Zhou <i>et al.</i> 2015	8
<i>G. lucidum</i> K175217	R.U.	KJ143911	Dai <i>et al.</i> 2014	Zhou <i>et al.</i> 2015	8
<i>G. lucidum</i> MT2610	REP. CHECA	KJ143912	Dai <i>et al.</i> 2014	Zhou <i>et al.</i> 2015	8
<i>G. resinaceum</i> BR4150	FRANCIA	KJ143915	Dai <i>et al.</i> 2014	Zhou <i>et al.</i> 2015	8
<i>G. sessile</i> LDW20121017	EE.UU.	KJ143917	Dai <i>et al.</i> 2014	Zhou <i>et al.</i> 2015	8
<i>G. sessile</i> NY00985711	EE.UU.	KJ143918	Dai <i>et al.</i> 2014	Zhou <i>et al.</i> 2015	8
<i>G. tsugae</i> Dai12751b	EE.UU.	KJ143919	Dai <i>et al.</i> 2014	Zhou <i>et al.</i> 2015	8
<i>G. lucidum</i> M9720	FRANCIA	KU310900	Hennike <i>et al.</i> 2015	Hennike <i>et al.</i> 2016	10
<i>G. lingzhi</i> SFC20150630-14	COREA	KY364246	Jargalmaa <i>et al.</i> 2016	Jargalmaa <i>et al.</i> 2017	6
<i>G. oregonense</i> UMNAK1	EE.UU.	MG654190	Loyd <i>et al.</i> 2017	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. oregonense</i> UMNOR1	EE.UU.	MG654194	Loyd <i>et al.</i> 2017	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. sessile</i> UMNFL19	EE.UU.	MG654230	Loyd <i>et al.</i> 2017	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. sessile</i> UMNKY1	EE.UU.	MG654257	Loyd <i>et al.</i> 2017	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. sessile</i> UMNMI24	EE.UU.	MG654271	Loyd <i>et al.</i> 2017	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. sessile</i> UMNNY14	EE.UU.	MG654294	Loyd <i>et al.</i> 2017	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. sessile</i> UMNOH4	EE.UU.	MG654298	Loyd <i>et al.</i> 2017	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. sessile</i> 103SC	EE.UU.	MG654304	Loyd <i>et al.</i> 2017	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. sessile</i> 165MO	EE.UU.	MG654312	Loyd <i>et al.</i> 2017	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. sessile</i> 171FL	EE.UU.	MG654316	Loyd <i>et al.</i> 2017	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. tsugae</i> UMNMI20	EE.UU.	MG654324	Loyd <i>et al.</i> 2017	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. tsugae</i> UMNMI30	EE.UU.	MG654326	Loyd <i>et al.</i> 2017	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. tsugae</i> UMNNC4	EE.UU.	MG654329	Loyd <i>et al.</i> 2017	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. sessile</i> MS183CA	EE.UU.	MG910998	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. tsugae</i> MS182AZ	EE.UU.	MG910999	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>Tomophagus colossus</i> UMNFL110		KY646210	Loyd <i>et al.</i> 2017	Loyd <i>et al.</i> 2018	11

TEF1-a

Identificación de la colección	Origen	Nº de acceso	Enviado por	Citado por	Referencias
<i>G. lingzhi</i> Cui9166	CHINA	JX029974	Cao <i>et al.</i> 2012	Cao <i>et al.</i> 2012; Zhou <i>et al.</i> 2015; Loyd <i>et al.</i> 2018	4; 8; 11
<i>G. lingzhi</i> Dai12479	CHINA	JX029975	Cao <i>et al.</i> 2012	Cao <i>et al.</i> 2012; Zhou <i>et al.</i> 2015; Loyd <i>et al.</i> 2018	4; 8; 11
<i>G. lingzhi</i> Wu 1006-38	CHINA	JX029976	Cao <i>et al.</i> 2012	Cao <i>et al.</i> 2012; Zhou <i>et al.</i> 2015	4; 11
<i>G. lingzhi</i> Dai12574	CHINA	JX029977	Cao <i>et al.</i> 2012	Cao <i>et al.</i> 2012; Zhou <i>et al.</i> 2015	4; 11
<i>G. boninense</i> WD 2028	JAPON	KJ143924	Dai <i>et al.</i> 2014	Zhou <i>et al.</i> 2015; Loyd <i>et al.</i> 2018	8; 11
<i>G. boninense</i> WD 2085	JAPON	KJ143925	Dai <i>et al.</i> 2014	Zhou <i>et al.</i> 2015; Loyd <i>et al.</i> 2018	8; 11
<i>G. curtisii</i> CBS 100131	EE.UU.	KJ143926	Dai <i>et al.</i> 2014	Zhou <i>et al.</i> 2015; Loyd <i>et al.</i> 2018	8; 11
<i>G. curtisii</i> CBS 100132	EE.UU	KJ143927	Dai <i>et al.</i> 2014	Zhou <i>et al.</i> 2015; Loyd <i>et al.</i> 2018	8; 11
<i>G. lucidum</i> Cui 9207	CHINA	KJ143928	Dai <i>et al.</i> 2014	Zhou <i>et al.</i> 2015; Loyd <i>et al.</i> 2018	8; 11
<i>G. lucidum</i> K 175217	R.U.	KJ143929	Dai <i>et al.</i> 2014	Zhou <i>et al.</i> 2015; Loyd <i>et al.</i> 2018	8; 11
<i>G. lucidum</i> MT 26/10	REP. CHECA	KJ143930	Dai <i>et al.</i> 2014	Zhou <i>et al.</i> 2015; Loyd <i>et al.</i> 2018	8; 11
<i>G. multipileum</i> CWN 04670	CHINA	KJ143931	Dai <i>et al.</i> 2014	Zhou <i>et al.</i> 2015; Loyd <i>et al.</i> 2018	8; 11
<i>G. multipileum</i> Dai 9447	CHINA	KJ143932	Dai <i>et al.</i> 2014	Zhou <i>et al.</i> 2015; Loyd <i>et al.</i> 2018	8; 11
<i>G. oregonense</i> CBS 265.88	EE.UU	KJ143933	Dai <i>et al.</i> 2014	Zhou <i>et al.</i> 2015; Loyd <i>et al.</i> 2018	8; 11
<i>G. resinaceum</i> CBS 194.76	PAISES BAJOS	KJ143934	Dai <i>et al.</i> 2014	Zhou <i>et al.</i> 2015; Loyd <i>et al.</i> 2018	8; 11
<i>G. sessile</i> LDW 20121017	EE.UU	KJ143935	Dai <i>et al.</i> 2014	Zhou <i>et al.</i> 2015; Loyd <i>et al.</i> 2018	8; 11
<i>G. sessile</i> JV 1209/9	EE.UU	KJ143936	Dai <i>et al.</i> 2014	Zhou <i>et al.</i> 2015; Loyd <i>et al.</i> 2018	8; 11
<i>G. sessile</i> JV 1209/27	EE.UU	KJ143937	Dai <i>et al.</i> 2014	Zhou <i>et al.</i> 2015; Loyd <i>et al.</i> 2018	8; 11
<i>G. tropicum</i> Yuan 3490	CHINA	KJ143938	Dai <i>et al.</i> 2014	Zhou <i>et al.</i> 2015; Loyd <i>et al.</i> 2018	8; 11
<i>G. tsugae</i> Dai 12751b	EE.UU	KJ143939	Dai <i>et al.</i> 2014	Zhou <i>et al.</i> 2015; Loyd <i>et al.</i> 2018	8; 11
<i>G. tsugae</i> Dai 12760	EE.UU	KJ143940	Dai <i>et al.</i> 2014	Zhou <i>et al.</i> 2015; Loyd <i>et al.</i> 2018	8; 11
<i>G. lingzhi</i> SFC20150624-06	COREA DEL SUR	KY393279	Jargalmaa <i>et al.</i> 2016	Jargalmaa <i>et al.</i> 2017	6
<i>G. lingzhi</i> SFC20150630-14	COREA DEL SUR	KY393280	Jargalmaa <i>et al.</i> 2016	Jargalmaa <i>et al.</i> 2017	6
<i>G. lingzhi</i> SFC20150812-48	COREA DEL SUR	KY393281	Jargalmaa <i>et al.</i> 2016	Jargalmaa <i>et al.</i> 2017	6
<i>G. lingzhi</i> SFC20150918-07	COREA DEL SUR	KY393282	Jargalmaa <i>et al.</i> 2016	Jargalmaa <i>et al.</i> 2017	6
<i>G. lingzhi</i> SFC20160315-03	COREA DEL SUR	KY393283	Jargalmaa <i>et al.</i> 2016	Jargalmaa <i>et al.</i> 2017	6
<i>G. lucidum</i> MS183CA	EE.UU	MG754723	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. lucidum</i> UMNUT1	EE.UU	MG754725	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. lucidum</i> UMNUT7	EE.UU	MG754726	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. curtisii</i> 102NC	EE.UU	MG754727	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. curtisii</i> UMNFL28	EE.UU	MG754728	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11

<i>G. curtisii</i> UMNFL60	EE.UU	MG754729	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. curtisii</i> UMNGA1	EE.UU	MG754731	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. curtisii</i> UMNNC3	EE.UU	MG754732	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. meredithae</i> 124FL	EE.UU	MG754734	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. meredithae</i> UMNFL50	EE.UU	MG754735	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. martinicense</i> 231NC	EE.UU	MG754736	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. martinicense</i> 246TX	EE.UU	MG754737	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. martinicense</i> UMNTN1	EE.UU	MG754738	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. oregonense</i> UMNK1	EE.UU	MG754740	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. oregonense</i> UMNOR1	EE.UU	MG754741	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. polychromum</i> 330OR	EE.UU	MG754742	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. polychromum</i> MS343OR	EE.UU	MG754743	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. polychromum</i> UMNOR3	EE.UU	MG754744	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. ravenelii</i> MS187FL	EE.UU	MG754745	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. ravenelii</i> UMNFL188	EE.UU	MG754746	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. sessile</i> 111TX	EE.UU	MG754747	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. sessile</i> 113FL	EE.UU	MG754748	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. sessile</i> 117TX	EE.UU	MG754749	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. sessile</i> 228DC	EE.UU	MG754750	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. sessile</i> UMNFL10	EE.UU	MG754753	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. sessile</i> UMNFL19	EE.UU	MG754754	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. sessile</i> UMNFL125	EE.UU	MG754755	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. sessile</i> UMNKY1	EE.UU	MG754756	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. sessile</i> UMNMI22	EE.UU	MG754757	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. sessile</i> UMNMI24	EE.UU	MG754758	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. sessile</i> UMNHO4	EE.UU	MG754759	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. tsugae</i> UMNMI20	EE.UU	MG754764	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. tsugae</i> UMNNC4	EE.UU	MG754765	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>G. tsugae</i> UMNMI30	EE.UU	MH025362	Loyd <i>et al.</i> 2018	Loyd <i>et al.</i> 2018	11
<i>Tomophagus colossus</i> TC-02		KJ143943	Dai <i>et al.</i> 2014	Zhou <i>et al.</i> 2015; Loyd <i>et al.</i> 2018	8; 11

LSU

Colección ID	Origen	Nº de acceso	Enviado por	Citado por	Referencias
<i>G. resinaceum</i> CBS152.27	R.U.	MH866403	Vu <i>et al.</i> 2017	Vu <i>et al.</i> 2019	12
<i>G. weberianum</i> CBS128581	TAIWAN	MH876427	Vu <i>et al.</i> 2017	Vu <i>et al.</i> 2019	12
<i>G. resinaceum</i> CBS220.36	EE.UU	MH867290	Vu <i>et al.</i> 2017	Vu <i>et al.</i> 2019	12
<i>G. weberianum</i> CBS219.36	FILIPINAS	MH867289	Vu <i>et al.</i> 2017	Vu <i>et al.</i> 2019	12
<i>G. parvulum</i> URM80765	BRASIL	JX310836	Correia de Lima Junior <i>et al.</i> 2012	Correia de Lima Junior <i>et al.</i> 2014	5
<i>G. parvulum</i> URM83345	BRASIL	JX310834	Correia de Lima Junior <i>et al.</i> 2012	Correia de Lima Junior <i>et al.</i> 2014	5

<i>G. parvulum</i> URM83344	BRASIL	JX310833	Correia de Lima Junior <i>et al.</i> 2012	Correia de Lima Junior <i>et al.</i> 2014	5
<i>G. parvulum</i> URM83340	BRASIL	JX310832	Correia de Lima Junior <i>et al.</i> 2012	Correia de Lima Junior <i>et al.</i> 2014	5
<i>G. parvulum</i> URM2948	BRASIL	JX310835	Correia de Lima Junior <i>et al.</i> 2012	Correia de Lima Junior <i>et al.</i> 2014	5
<i>G. parvulum</i> URM83339	BRASIL	JX310831	Correia de Lima Junior <i>et al.</i> 2012	Correia de Lima Junior <i>et al.</i> 2014	5
<i>G. orbiforme</i> URM83336	BRASIL	JX310830	Correia de Lima Junior <i>et al.</i> 2012	Correia de Lima Junior <i>et al.</i> 2014	5
<i>G. orbiforme</i> URM83335	BRASIL	JX310829	Correia de Lima Junior <i>et al.</i> 2012	Correia de Lima Junior <i>et al.</i> 2014	5
<i>G. orbiforme</i> URM83334	BRASIL	JX310828	Correia de Lima Junior <i>et al.</i> 2012	Correia de Lima Junior <i>et al.</i> 2014	5
<i>G. orbiforme</i> URM83332	BRASIL	JX310827	Correia de Lima Junior <i>et al.</i> 2012	Correia de Lima Junior <i>et al.</i> 2014	5
<i>G. parvulum</i> URM83343	BRASIL	JX310810	Correia de Lima Junior <i>et al.</i> 2012	Correia de Lima Junior <i>et al.</i> 2014	5
<i>G. lucidum</i> C-2	COREA	DQ208413	Nam <i>et al.</i> 2005	Lee <i>et al.</i> 2006	13
<i>G. lucidum</i> C-1	COREA	DQ208412	Nam <i>et al.</i> 2005	Lee <i>et al.</i> 2006	13
<i>G. lucidum</i> IUM01122	COREA	DQ208411	Nam <i>et al.</i> 2005	Lee <i>et al.</i> 2006	13
<i>G. lucidum</i> IUM00298	COREA	DQ208410	Nam <i>et al.</i> 2005	Lee <i>et al.</i> 2006	13
<i>G. sinense</i> Wei5327	CHINA	KF495008	Zhao y Cui 2013	Costa Rezende <i>et al.</i> 2017	14
<i>G. lucidum</i> CBS270.81	FRANCIA	MH873099	Vu <i>et al.</i> 2017	Vu <i>et al.</i> 2019	12
<i>Tomophagus colossus</i> URM83330	BRASIL	JX310811	Lima <i>et al.</i> 2012	Correia de Lima Junior <i>et al.</i> 2014	5

β-TUBULINA

Identificación de la colección	Origen	Nº de acceso	Enviado por	Citado por	Referencias
<i>G. cf. resinaceum</i> CMW50326	SUDAFRICA	MH567320	Tchoumi <i>et al.</i> 2018	Tchoumi <i>et al.</i> 2019	15
<i>G. cf. resinaceum</i> CMW49711	SUDAFRICA	MH567319	Tchoumi <i>et al.</i> 2018	Tchoumi <i>et al.</i> 2019	15
<i>G. destructans</i> CMW50317	SUDAFRICA	MH567315	Tchoumi <i>et al.</i> 2018	Tchoumi <i>et al.</i> 2019	15
<i>G. destructans</i> CMW49708	SUDAFRICA	MH567314	Tchoumi <i>et al.</i> 2018	Tchoumi <i>et al.</i> 2019	15
<i>G. australe</i> CMW49694	SUDAFRICA	MH567312	Tchoumi <i>et al.</i> 2018	Tchoumi <i>et al.</i> 2019	15
<i>G. australe</i> CMW49697	SUDAFRICA	MH567311	Tchoumi <i>et al.</i> 2018	Tchoumi <i>et al.</i> 2019	15
<i>G. australe</i> CMW47785	SUDAFRICA	MH567310	Tchoumi <i>et al.</i> 2018	Tchoumi <i>et al.</i> 2019	15

<i>G. australe</i> CMW48146	SUDAFRICA	MH567309	Tchoumi <i>et al.</i> 2018	Tchoumi <i>et al.</i> 2019	15
<i>G. knysnamense</i> CMW49688	SUDAFRICA	MH567308	Tchoumi <i>et al.</i> 2018	Tchoumi <i>et al.</i> 2019	15
<i>G. knysnamense</i> CMW49691	SUDAFRICA	MH567307	Tchoumi <i>et al.</i> 2018	Tchoumi <i>et al.</i> 2019	15
<i>G. knysnamense</i> CMW47756	SUDAFRICA	MH567306	Tchoumi <i>et al.</i> 2018	Tchoumi <i>et al.</i> 2019	15
<i>G. knysnamense</i> CMW47755	SUDAFRICA	MH567305	Tchoumi <i>et al.</i> 2018	Tchoumi <i>et al.</i> 2019	15
<i>G. destructans</i> CMW43671	SUDAFRICA	MG020156	Tchoumi <i>et al.</i> 2017	Tchoumi <i>et al.</i> 2018, 2019	16;15
<i>G. dunense</i> CMW42149	SUDAFRICA	MG020153	Tchoumi <i>et al.</i> 2017	Tchoumi <i>et al.</i> 2018, 2019	16;15
<i>G. destructans</i> CMW43670	SUDAFRICA	MG020151	Tchoumi <i>et al.</i> 2017	Tchoumi <i>et al.</i> 2018, 2019	16;15
<i>G. dunense</i> CMW42157	SUDAFRICA	MG020150	Tchoumi <i>et al.</i> 2017	Tchoumi <i>et al.</i> 2018, 2019	16;15
<i>G. oregonense</i> ASI7062	EE.UU	JQ675648	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b; Hennike <i>et al.</i> 2016	7a,b;10
<i>G. tornatum</i> CBS109679	PAISES BAJOS	JQ675670	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b	7a,b
<i>G. tsugae</i> ASI7064	EE.UU	JQ675669	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b	7a,b
<i>G. tsugae</i> ATCC64795	CANADA	JQ675668	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b	7a,b
<i>G. resinaceum</i> IUM3651	REP. CHECA	JQ675657	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b; Hennike <i>et al.</i> 2016	7a,b;10
<i>G. resinaceum</i> ASI7143	COREA	JQ675656	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b; Hennike <i>et al.</i> 2016	7a,b;10
<i>G. resinaceum</i> ASI7142	COREA	JQ675655	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b	7a,b
<i>G. resinaceum</i> CBS152.27	R.U.	JQ675653	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b; Hennike <i>et al.</i> 2016	7a,b;10
<i>G. resinaceum</i> ATCC52416	ARGENTINA	JQ675652	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b; Hennike <i>et al.</i> 2016	7a,b;10
<i>G. lucidum</i> KCTC16802	TAILANDIA	JQ675641	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b; Hennike <i>et al.</i> 2016	7a,b;10
<i>G. lucidum</i> IUM4310	BANGLADESH	JQ675637	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b; Hennike <i>et al.</i> 2016	7a,b;10
<i>G. lucidum</i> IUM4304	BANGLADESH	JQ675636	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b; Hennike <i>et al.</i> 2016	7a,b;10
<i>G. lucidum</i> IUM4303	BANGLADESH	JQ675635	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b; Hennike <i>et al.</i> 2016	7a,b;10

<i>G. lucidum</i> ASI7037	COREA	JQ675634	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b; Hennike <i>et al.</i> 2016	7a,b;10
<i>G. lucidum</i> ASI7117	COREA	JQ675633	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b; Hennike <i>et al.</i> 2016	7a,b;10
<i>G. lucidum</i> IUM0938	COREA	JQ675629	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b	7a,b
<i>G. lucidum</i> IUM0047	COREA	JQ675627	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b	7a,b
<i>G. lucidum</i> ASI7135	COREA	JQ675626	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b; Hennike <i>et al.</i> 2016	7a,b;10
<i>G. lucidum</i> ASI7094	COREA	JQ675625	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b; Hennike <i>et al.</i> 2016	7a,b;10
<i>G. lucidum</i> ASI7091	COREA	JQ675624	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b; Hennike <i>et al.</i> 2016	7a,b;10
<i>G. lucidum</i> cultivar Yeongji 2	COREA	JQ675622	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b; Hennike <i>et al.</i> 2016	7a,b;10
<i>G. lucidum</i> ASI7013	COREA	JQ675621	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b	7a,b
<i>G. lucidum</i> cultivar Yeongji 1	COREA	JQ675620	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b	7a,b
<i>G. lucidum</i> M9720	FRANCIA	KU310902	Hennike <i>et al.</i> 2015	Hennike <i>et al.</i> 2016	10
<i>G. annulare</i> KCTC16803	BRASIL	JQ675613	Kwon <i>et al.</i> 2012	Park <i>et al.</i> 2012a, 2012b	7a,b
<i>Trametes suaveolens</i> CBS446.61	AUSTRIA	FJ410378	Lesage Meessen <i>et al.</i> 2008	Lesage Meessen <i>et al.</i> 2011; Tchoumi <i>et al.</i> 2019	17;15

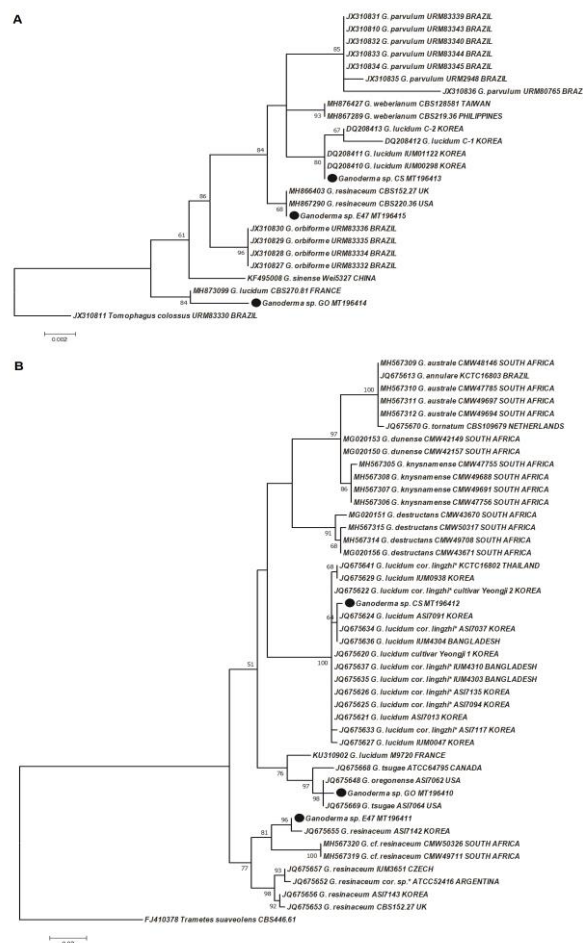
REFERENCIAS DE TABLA 2

- 1 Guglielmo F, Gonthier P, Garbelotto M, Nicolotti G. 2008. A PCR-based method for the identification of important wood rotting fungal taxa within *Ganoderma*, *Inonotus* and *Phellinus*. FEMS Microbiology Letters 282:228-237.
- 2 Zhang X, Xu Z, Pei H, Chen Z, Tan X, Hu J. 2017. Intraspecific variation and phylogenetic relationships are revealed by ITS1 secondary structure analysis and single-nucleotide polymorphism in *Ganoderma lucidum*. PLoS ONE 12:e0169042.
- 3 Wang XC, Xi RJ, Li Y, Wang DM, Yao YJ. 2012. The species identity of the widely cultivated *Ganoderma*, '*G. lucidum*' (Ling-zhi), in China. Plos ONE 7:e40857.
- 4 Cao Y, Wu SH, Dai YC. 2012. Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma* mushroom "Lingzhi". Fungal Diversity 56:49-62.

- 5 Correia de Lima Júnior N, Baptista Gibertoni T, Malosso E. 2014. Delimitation of some neotropical laccate *Ganoderma* (*Ganodermataceae*): molecular phylogeny and morphology. *Revista de Biología Tropical* 62:1197-1208.
- 6 Jargalmaa S, Eimes JA, Park MS, Park JY, Oh SY, Lim YW. 2017. Taxonomic evaluation of selected *Ganoderma* species and database sequence validation. *PeerJ* 5:e3596.
- 7 a. Park YJ, Kwon OC, Son ES, Yoon DE, Han W, Yoo YB, Lee CS. 2012. Taxonomy of *Ganoderma lucidum* from COREA Based on rDNA and partial β -Tubulin gene sequence analysis. *Mycobiology* 40:71-75.
b. Park YJ, Kwon OC, Son ES, Yoon DE, Han W, Nam JY, Yoo YB, Lee CS. 2012. Genetic diversity analysis of *Ganoderma* species and development of a specific marker for identification of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *African Journal of Microbiology Research* 6:5417-5425.
- 8 Zhou LW, Cao Y, Wu SH, Vlasák J, Li DW, Li MJ, Dai YC. 2015. Global diversity of the *Ganoderma lucidum* complex (*Ganodermataceae*, Polyporales) inferred from morphology and multilocus phylogeny. *Phytochemistry* 114:7-15.
- 9 Yao YJ, Wang XC, Wang B. 2013. Epitypification of *Ganoderma sichuanense* J.D. Zhao & X.Q. Zhang (*Ganodermataceae*). *Taxon* 62:1025-1031.
- 10 Hennicke F, Cheikh Ali Z, Liebisch T, Maciá Vicente JG, Bode HB, Piepenbring M. 2016. Distinguishing commercially grown *Ganoderma lucidum* from *Ganoderma lingzhi* from Europe and East Asia on the basis of morphology, molecular phylogeny, and triterpenic acid profiles. *Phytochemistry* 127:29-37.
- 11 Loyd AL, Held BW, Linder ER, Smith JA, Blanchette RA. 2018. Elucidating "*lucidum*": Distinguishing the diverse laccate *Ganoderma* species of the United States. *PLoS ONE* 13:e0199738.
- 12 Vu D, Groenewald M, de Vries M, Gehrman T, Stielow B, Eberhardt U, Al Hatmi A, Groenewald JZ, Cardinali G, Houbraken J, Boekhout T, Crous PW, Robert V, Verkley G. 2019. Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Studies in Mycology* 92:135-154.
- 13 Lee JS, Lim MO, Cho KY, Cho JH, Chang SY, Nam DH. 2006. Identification of medicinal mushroom species based on nuclear large subunit rDNA sequences. *Journal of Microbiology* 44:29-34.

- 14 Costa-Rezende DH, Robledo GL, Góes Neto A, Reck MA, Crespo E, Drechsler Santos ER. 2017. Morphological reassessment and molecular phylogenetic analyses of *Amauroderma* s.lat. raised new perspectives in the generic classification of the *Ganodermataceae* family. *Persoonia* 39:254–269.
- 15 Tchoumi JMT, Coetzee MPA, Rajchenberg M, Roux J. 2019. Taxonomy and species diversity of *Ganoderma* species in the Garden Route National Park of South Africa inferred from morphology and multilocus phylogenies. *Mycologia* 111:730-747.
- 16 Tchoumi JMT, Coetzee MPA, Rajchenberg M, Wingfield MJ, Roux J. 2018. Three *Ganoderma* species, including *Ganoderma* *dunense* sp. nov., associated with dying *Acacia* cyclops trees in South Africa. *Australasian Plant Pathology* 47:431-447.
- 17 Lesage Meessen L, Haon M, Uzan E, Levasseur A, Piumi F, Navarro D, Taussac S, Favel A, Lomascolo A. 2011. Phylogeographic relationships in the polypore fungus *Pycnoporus* inferred from molecular data. *FEMS Microbiology Letters* 325:37-48.

Anexo 1, Figura 1. Árboles obtenidos de los análisis filogenéticos derivados de LSU (arriba) y β -tubulina (abajo) para *Ganoderma* spp.



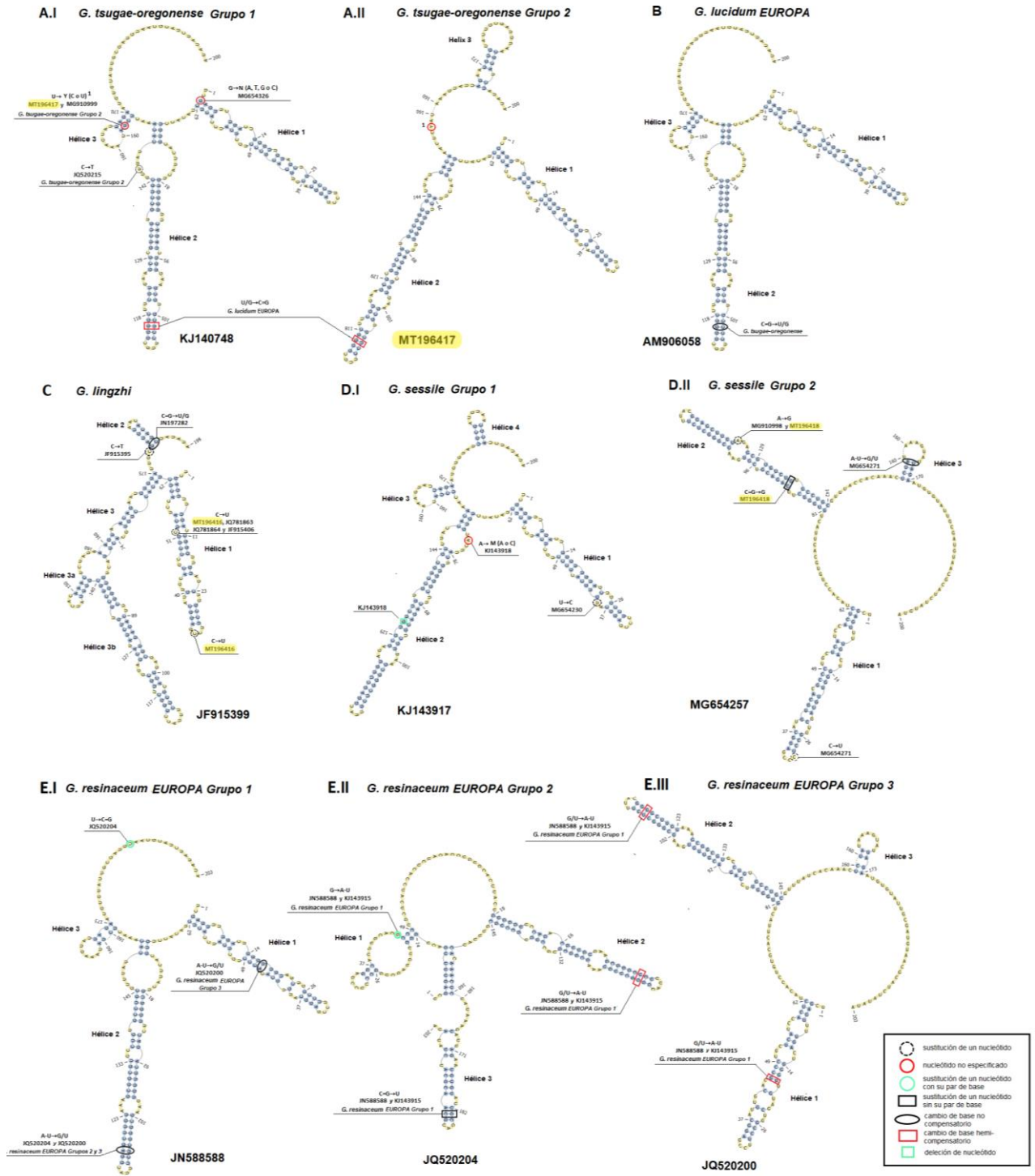
Anexo 1, Figura 2. Estructuras secundarias predichas de las moléculas de ARNr, región ITS1. Estructura general 2D de: **A.I-II.** *G. lucidum* de América, Grupo 1 (**A.I**) el cual representa la mayoría de las secuencias, excluyendo a MT196417, MG910999 y JQ520215 que pertenecen al Grupo 2 (**A.II**); **B.** *G. lucidum* de Europa. **C.** *G. lingzhi*; **D.I-II.** *G. resinaceum* de América, Grupo 1 (**D.I**), que incluye a KF605629, KJ143917, KJ143918, MG654230, MG654230, MG654294, MG654312 y MG654316, y el Grupo 2 (**D.II**), que incluye a MG654257, MG654298, MT196418, MG910998 y MG654304; **E.I-III.** *G. resinaceum* de Europa, JN588588 (**E.I**) que comparte la estructura básica con KJ143915, mientras que JQ520204 (**E.II**) y JQ520200 (**E.III**) muestran estructuras únicas. Las diferencias en las posiciones de los nucleótidos entre estructuras del mismo grupo o entre grupos se indican como óvalos, rectángulos o círculos. La numeración de las hélices no está necesariamente correlacionada en todos los clados. Las secuencias generadas en el presente estudio (*Ganoderma* sp. CS MT196416, *Ganoderma* sp. GO MT196417, *Ganoderma* sp. E47 MT196418) se encuentran resaltadas en amarillo. La nomenclatura para nucleótidos incompletamente especificados sigue las recomendaciones del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica (NC-IUB).

La presencia de un cambio de base no compensatorio en la posición 107 separa el clado *G. lucidum* de Europa del originario de América (**A,B**). Entre *G. lucidum* de América (**A**), se podrían diferenciar dos grupos (**A.I,II**) en función de la presencia de un nucleótido no definido en la posición 158 que produjo un cambio en la estructura, pero conservó la hélice 1 inalterada. Los miembros de *G. lucidum* de Europa comparten una estructura común representada por la secuencia AM906058 (**B**).

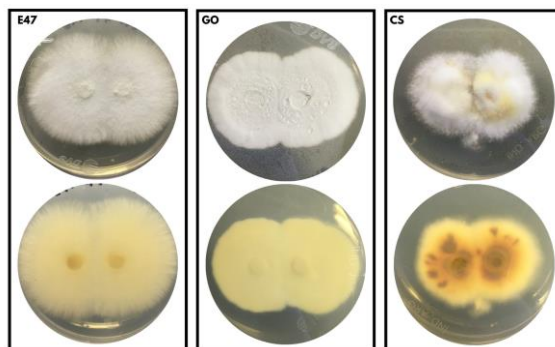
El clado *G. lingzhi* podría distinguirse por una estructura básica única representada por JF915399 (**C**). *Ganoderma* sp. CS MT196416 difiere de la secuencia básica de este clado por una mutación única de un solo nucleótido en la posición 32, y otra mutación puntual en la posición 52 compartida con *G. lingzhi* JQ781863, *G. lingzhi* JQ781864 y *G. sichuanense* JF915406, que fueron las secuencias más cercanas en el árbol ITS1 (Figura 11A).

G. resinaceum de América se dividió en 2 grupos (**D.I, II**). *G. resinaceum* de Europa mostró tres estructuras diferentes, una correspondiente a JN588588 y compartida con KJ143915 (**E.I**), y otras dos correspondientes a JQ520204 (**E.II**) y JQ520200 (**E.III**). *Ganoderma* sp. E47 MT196418 mostró una mutación única en la posición 89 con respecto a la estructura básica del *G. resinaceum* del Grupo 2 de América, y una única mutación en la posición 124 compartida con *G. sessile* MG910998, su vecino más cercano en el árbol ITS1 (Figura 11A).

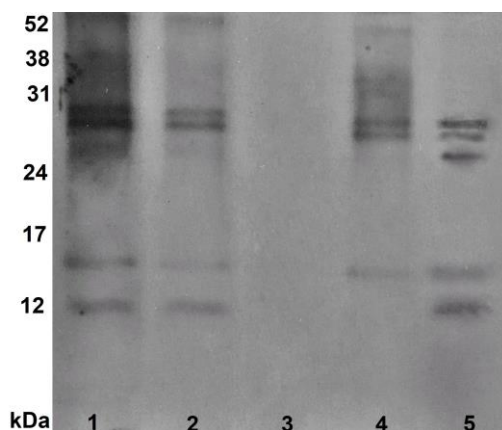
Ganoderma sp. GO MT196417 y *G. tsugae* MG910999 mostraron un nucleótido en la posición 158 que produjo el mismo desplazamiento en la estructura generando la estructura **A.II** y conservando la hélice 1 de la estructura básica del grupo americano *G. lucidum* 2 (**A**).



Anexo 1, Figura 3. Confirmación de la compatibilidad somática para cada una de las cepas de *Ganoderma* en estudio. Se muestran las placas con medio de aceleración inoculadas con discos de agar enfrentados de una misma cepa, en vista superior (arriba) e inferior (abajo) de la placa. E47: *Ganoderma* sp. E47, CS: *Ganoderma* sp. CS, GO: *Ganoderma* sp. GO.



Anexo 1, Figura 4. Western Blot de inhibición. 1. Proteínas del basidioma de *Ganoderma* sp. E47 sin inhibir; 2. Proteínas del basidioma de *Ganoderma* sp. E47 inhibidas con BSA (inhibición inespecífica); 3. Proteínas del basidioma de *Ganoderma* sp. E47 inhibidas con sus mismas proteínas (inhibición específica); 4. Proteínas del basidioma de *Ganoderma* sp. E47 inhibidas con proteínas del basidioma de P04; 5. Proteínas del basidioma de *Ganoderma* sp. E47 inhibidas con proteínas del basidioma de E27.



Anexo 1, Protocolo N°1. Preparación de Agar MYG

Composición por litro de agua destilada: Extracto de levadura (calidad microbiológica) 2 g, Extracto desecado de malta (calidad microbiológica) 20 g, Glucosa (Dextrosa) 10 g, agar bacteriológico 20 g, pH= 6,0.

1. Mezclar todos los componentes menos el agar. Calentar hasta disolución total.
2. Medir pH y ajustar si es necesario.
3. Agregar el agar y agitar.

4. Esterilizar a 121 °C y 1 atm durante 15 min. Dejar enfriar y refrigerar en heladera.

Anexo 1, Protocolo N°2. Extracción de los polisacáridos de los basidiomas (basado en USP 41-NF 36, *Ganoderma lucidum* Fruiting Body. Content of water-soluble polysaccharides).

1. Agregar a 1 g exactamente pesado de polvo 30 mL de agua destilada. Dejar reposar 1 h.
1. Extraer a reflujo durante 4 h. Filtrar inmediatamente con filtro de papel.
2. Transferir el residuo y el filtro de papel al mismo recipiente de extracción.
3. Agregar 30 ml de agua destilada y extraer a reflujo por 3 h. Filtrar inmediatamente.
4. Enjuagar el recipiente con 5 mL de agua y filtrar. Repetir otras dos veces.
5. Combinar los filtrados y enjuagues, y evaporar a sequedad en baño María.
6. Disolver el residuo en 5 mL de agua destilada. Agregar 75 mL de etanol absoluto y dejar en heladera durante 12 h.
7. Centrifugar a 4000 rpm durante 3 min.
8. Eliminar el líquido y secar a 60 °C.

Anexo 1, Protocolo N°3. Método del fenol-sulfúrico para la determinación de carbohidratos

80 % fenol: se prepara por peso, agregando 80 g de fenol a 20 g de agua destilada. Es estable luego de 3-4 meses. Puede tornarse amarillento (considerarlo en el blanco).

1. Preparar la curva de calibrado de glucosa.
2. Agregar a cada tubo 2 mL de solución de carbohidrato (muestra o estándar de glucosa).
Blanco de reactivos: 2 mL de agua destilada.
3. Agregar 0,05 mL de solución de fenol.
4. Agregar tardando entre 10 y 20 segundos 5 mL de ácido sulfúrico directamente al centro del tubo para favorecer el mezclado. Dejar reposar 10 minutos. Agitar y dejar en baño de agua a 25-30°C durante 10-20 minutos.
5. Leer la absorbancia a 490 nm en cubetas de vidrio. El color es estable por horas

Anexo 1, Protocolo N°4. Determinación de biomasa y polisacáridos en cultivo líquido.

1. Finalizado el período de cultivo, colocar los Erlenmeyer en equipo de ultrasonido y sonicar durante 30 minutos (en 3 ciclos de 10 min) para favorecer la liberación de endopolisacáridos mediante lisis celular.

2. Colar el micelio, separando las semillas. Lavar con agua destilada. Colocar el micelio en cajas de Petri, secar a 80 °C y pesar hasta peso constante para determinar biomasa. El medio de cultivo se reparte en tubos Falcon de 50 mL.
3. Agregar al medio de cultivo 4 volúmenes de etanol 95 % y centrifugar a 650 x *g* durante 10 minutos. Descartar el sobrenadante y secar el precipitado a 60 °C (polisacáridos crudos). Registrar el peso.
4. El precipitado de polisacáridos se resuspende en la mínima cantidad de agua destilada para su posterior cuantificación mediante el método del fenol-sulfúrico.

ANEXO 2

Anexo 2, Protocolo N°1: Determinación de contenido de humedad

Método de referencia: AOAC Official Method 934.01. Loss on Drying (Moisture)

Procedimiento

Una muestra que contenga alrededor de 2 g en peso seco se somete a secado en estufa a 70 °C durante 5 horas a presión inferior o igual a 100 mm Hg.

Cálculo

El resultado se expresa como pérdida por secado (PPS) o humedad (H) en % (p/p) siguiendo la siguiente formula:

$$\text{PPS/H \% (p/p)} = 100 \times \frac{\text{peso perdido luego del secado (g)}}{\text{peso inicial de la muestra (g)}}$$

$$\text{PESO SECO \% (p/p)} = 100 - \text{PPS \% (p/p)}$$

Notas:

1. En el caso de setas donde el contenido de humedad ronda entre un 85 y un 95 % debe pesarse entre 15 a 25 g de material fresco.
2. Tal como lo recomienda el método oficial, se opta por un secado a 70 °C para evitar la afección de los compuestos sacáridos de la muestra.

Anexo 2, Protocolo N°2: Determinación de cenizas

Método de referencia: AOAC Official Method 942.05

Procedimiento

Se toma el peso de un crisol de porcelana vacío. Se pesan exactamente alrededor de 2 g de muestra en el crisol, ambos perfectamente secos, y se someten a incineración a 600 °C dentro de una mufla durante 2-4 h. Pasado ese tiempo, los crisoles se enfrían en desecador. El contenido en cenizas se determina por diferencia de peso con la siguiente fórmula:

$$\text{Cenizas \% (p/p)} = 100 \times \frac{\text{peso inicial de la muestra (g)} - \text{peso perdido en la incineración (g)}}{\text{peso inicial de la muestra (g)}}$$

Protocolo N°3: Determinación de lípidos crudos

Método de referencia: AOAC Official Method 960.39.

Materiales

1. Una muestra de 1.5 g de polvo seco exactamente pesada se coloca en un cartucho de papel de filtro o dedal (CT2280, 22 mm diámetro interno y 80 mm de largo externo, AquaLab®) y luego este se coloca dentro del extractor.
2. Dentro de un balón Soxhlet previamente pesado se vierte un volumen de hexano completamente anhidro tal que cubra 2/3 del recipiente.
3. Se adosa el sistema de refrigeración al equipo Soxhlet. Se conecta el matraz al extractor y se lleva a ebullición (68° o 40°) de modo que se produzcan 10 ciclos de reflujo por hora (entre 2 a 3 horas).
4. Luego se evapora el solvente a presión reducida en evaporador rotatorio y se deja el extracto bajo campana de extracción durante 1 hora.
5. Se pesa el balón con el residuo y se determina el contenido de lípidos con la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido en lípidos crudos \% (p/p)} = \frac{100 \times \text{peso del matraz con residuo} - \text{peso del matraz (g)}}{\text{peso de la muestra (g)}}$$

Notas:

1. Asegurarse de que el sistema de refrigeración funcione correctamente para evitar la acumulación de exceso de vapor de hexano (altamente inflamable) dentro del balón.
2. Debe establecerse inicialmente el volumen mínimo de solvente requerido. El mismo puede determinarse teniendo en cuenta los mililitros necesarios para que dentro del extractor el tubo capilar ubicado en paralelo a la columna central equipare y luego supere en volumen a la columna central, de modo que el líquido contenido escurra hacia el balón.

Anexo 2, Figura 1. Equipo de extracción Soxhlet empleado en este estudio.



Anexo 2, Protocolo N°4: Determinación del contenido de proteínas

Método de referencia: Método semimicro Kjeldahl (Fawcett *et al.*, 1954)

Preparación de soluciones reactivas

- Sales catalizadoras: pesar 62,5 g de sulfato de potasio (KSO_4) y 6,25 g de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Homogeneizar la mezcla.
- Hidroxilo de sodio (40 %): Pesar 400 g de hidróxido de sodio (NaOH), disolver en agua destilada y aforar a 1 L. El agua para preparar la solución debe ser hervida previamente para eliminar el CO_2 . En un agitador-calentador ir agregando de a poco el hidróxido de sodio en escamas hasta que se disuelva por completo. Dejar enfriar y aforar.
- Ácido bórico: pesar 20 g de ácido bórico y disolver en 750 mL de agua destilada. Calentar para la completa disolución del ácido. Dejar enfriar y agregar 20 mL de la mezcla de indicadores mixtos. Completar el volumen a 1 L con agua destilada y mezclar.
- Indicadores mixtos: 0,099 g de verde de bromocresol y 0,066 g de rojo de metilo disueltos en 100 mL de alcohol etílico 96 %.
- Ácido sulfúrico 0,1 N: 2,7 mL de ácido puro llevado a 1 L con agua destilada.

Procedimiento

1. En tubos de ensayo se coloca 0,2 g de muestra exactamente pesada junto con las sales catalizadoras (1 $\frac{1}{2}$ cuchara) y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se deja bajo campana de extracción hasta el día siguiente.
2. Se colocan los tubos con las muestras en el bloque de digestión tapando la abertura de cada uno con papel aluminio con un pequeño orificio para permitir la evacuación de los vapores.
3. Se comienza la digestión a fuego medio, una vez que el material se haya disuelto se puede aumentar el calor. La digestión finaliza cuando las muestras se vuelven color verde claro (Anexo 2, Figura 2).
4. Las muestras se dejan enfriar y se pasa el contenido a los tubos de destilación del Kjeldahl, enjuagándolos con agua destilada (aprox. 10 mL) para arrastrar el material del fondo del tubo de digestión.
5. Se procede luego a la destilación, donde se utilizan 15 mL de agua destilada, 30 mL de hidróxido de sodio y 30 mL de ácido bórico. Una vez finalizada la destilación se titula con ácido sulfúrico al 0,1 N.
6. El contenido de proteínas (N %) se calcula de la siguiente manera:

$$N \% = \frac{(\text{mL M} - \text{mL B}) \times 1,4 \times F}{\text{Peso de la muestra (g)}}$$

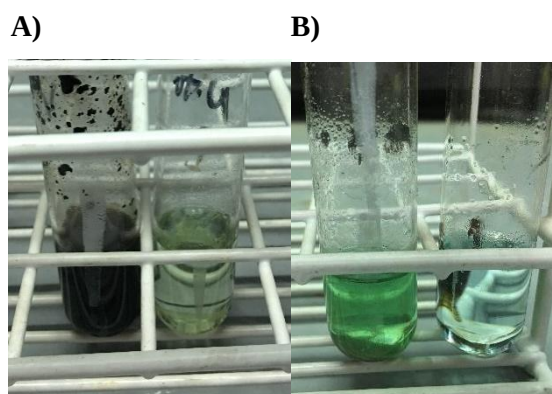
Donde:

mL M: mililitros consumidos por la muestra en la destilación

mL B: mililitros consumidos por el blanco en la destilación

F: factor de conversión nitrógeno-proteínas (4,38 en hongos, Bano *et al.*, 1988)

Anexo 2, Figura 2. Determinación de proteínas. A. Tubos correspondientes a una muestra (color oscuro) y el blanco de reactivos (contenido transparente) al comienzo de la digestión. **B.** Tubos al finalizar la digestión; nótese el color verde que adquiere la muestra cuyo material orgánico ha sido consumido.



Anexo 2, Protocolo N°5: Determinación de contenido de fibra dietaria

Métodos de referencia: Megazyme method 1 (basado en AOAC Method 991.43)

Materiales

- Filtros: Duran® Filter crucible 3X, porosidad 16-40 μm , d= 46 mm capacidad 50 mL
- Horno mufla
- Desecador
- Baño de agua con agitación
- Solución de lavado (Tween 20 al 2 % en agua tridestilada)
- Acetona
- Agua tridestilada
- buffer fosfato o MES-TRIS (pH= 6,0)
- Celite®
- Amiloglucosidasa, solución de *A. niger* (A9913, para su uso en FDT-100A, SIGMA, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)
- Proteasa de *B. licheniformis* (P4860, $\geq 2,4$ U/g, SIGMA, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)
- α -amilasa (FAA, ANKOM Technology, Macedonia, NY).

Procedimiento

1. Preparación del material

- a) Incinerar toda la noche a 525 °C los filtros. Nota: el proveedor indica que la máxima temperatura a la que puede ser sometido el material es 500 °C, por lo que se realiza el procedimiento a esta temperatura como límite.
- b) Remover el contenido remanente de Celite y cenizas en el filtro usando vacío.
- c) Sumergir los filtros en solución de lavado (Tween 20 al 2 % en agua tridestilada) a TA durante 1 h.
- d) Enjuagarlos con agua y agua destilada-tridestilada.
- e) Enjuagarlos finalmente con 15 mL de acetona y dejar secar bajo campana.
- f) Agregar aproximadamente 0,5 g de Celite a los filtros secos y colocar en estufa a 130 °C.
- g) Enfriar en desecador por aprox. 1 h y registrar el peso (filtro+Celite)

2. Blanco: correr en cada ensayo uno o dos blancos junto a las muestras para medir alguna contribución de los reactivos al residuo.

3. Preparación de las muestras

- a) Pesar por duplicado con exactitud $0,500 \pm 0,0025$ g de muestra en un vaso de precipitado alto de 200 mL.
- b) Agregar 25 mL de buffer fosfato (pH= 6,0) y chequear pH. Agregar agitador magnético y agitar hasta que la muestra esté completamente disuelta (previene la formación de grumos y la inaccesibilidad de las enzimas).

4. Incubación con α -amilasa termoestable

- a) Agregar 25 μ L de enzima agitando a baja velocidad.
- b) Cubrir el vaso con papel aluminio.
- c) Colocar el vaso en el baño con agitación a 95 °C e incubar por 30 minutos con agitación constante.
- d) Remover las muestras del baño y enfriar a 60 °C.
- e) Remover el papel aluminio.
- f) De formarse anillos alrededor del vaso, remover con una espátula.
- g) Enjuagar con pipeta el vaso y la espátula con 5 mL de agua destilada.

- h) Ajustar la temperatura del baño en 60 °C.
- 5. Incubación con proteasa.
 - a) Agregar 50 µL de proteasa a cada muestra.
 - b) Volver a cubrir con papel aluminio.
 - c) Incubar en baño a 60 ± 1 °C con agitación constante durante 30 minutos. Empezar a contar el tiempo cuando la temperatura alcance los 60 °C.
 - d) Chequear pH.
 - e) Remover las muestras del baño.
 - f) Quitar los papeles aluminio.
 - g) Agregar 25 mL de HCl 0,561 N con agitación.
 - h) Chequear el pH, que debería rondar en 4,1-4,8. De ser necesario ajustar con NaOH 5 % o HCl 5 %.
- 6. Incubación con amiloglucosidasa
 - a) Agregar 50 µL de enzima agitando en agitador magnético.
 - b) Volver a colocar el papel aluminio.
 - c) Incubar a 60 °C durante 30 minutos con agitación constante.

Fibra dietaria insoluble (FDI)

- 7. Filtración
 - a) Tarar el filtro conteniendo Celite a cerca de 0,1 mg.
 - b) Humedecer y redistribuir el Celite con aprox. 1,5 mL de agua destilada.
 - c) Aplicar succión al filtro para que el Celite se distribuya como una capa homogénea.
- 10. Precalentar agua a 70 °C y usar dos porciones de 5 mL para enjuagar el vaso de precipitados y luego lavar el residuo. Guardar el filtrado y enjuagues para determinar fibra dietaria soluble (FDS). Transferir la solución a un vaso de precipitados similar pre-tarado (ir a determinación de FDS).
- 8. Lavar el residuo con:
 - a) 5 mL x2 de etanol 95 %.

- b) 5 mL x2 de acetona.
- 9. Secar el filtro toda la noche a 103 °C.
- 10. Enfriarlo en desecador durante aprox. 1 h. Pesar (filtro + Celite + residuo de fibra)
- 11. Determinar el contenido de proteínas y cenizas para la corrección del contenido resultante.
 - a) Analizar uno de los residuos por Kjeldahl ($N \times 4,38$).
 - b) Para el análisis de cenizas, incinerar el segundo residuo por 5 h a 525 °C. Enfriar en desecador y pesar (filtro + Celite + cenizas).

Fibra dietaria soluble

- a) Pesar la solución combinada de filtrados y enjuagues en el vaso pre-tarado en FDI. Alternativamente, ajustar a 80 g y agregar 160 mL de etanol 95 % pre-calentado a 60 °C.
- b) Dejar precipitar a TA durante 1 h.
- 12. Filtración-preparado
 - a) Tarar el filtro conteniendo Celite a 0,1 mg.
 - b) Humedecer y redistribuir el Celite con 7,5 mL de etanol 78 %.
 - c) Aplicar succión al filtro para que el Celite se distribuya como una capa homogénea.
- 13. Filtración
 - a) Filtrar el digesto enzimático precipitado de FDS.
 - b) Colocar etanol 78 % en una piseta y transferir cuantitativamente con ayuda de una espátula todas las partículas remanentes al filtro.
- 14. Lavar el residuo aplicando vacío con:
 - a) 7,5 mL x 2 de etanol 78 %,
 - b) 7,5 mL x 2 de etanol 95 %,
 - c) 7,5 mL x 2 de acetona.
- 15. Secar el filtro a 103 °C toda la noche 103 °C.
- 16. Determinación de proteínas y cenizas.
 - c) Analizar uno de los residuos por Kjeldahl ($N \times 6,25$).

d) Para el análisis de cenizas, incinerar el segundo residuo por 5 h a 525 °C. Enfriar en desecador y pesar (filtro + Celite + cenizas).

Fibra dietaria total

17. Repetir pasos 1-6.

18. Precipitación de la fibra dietaria con etanol

a) A cada muestra agregar 112,5 mL de etanol 95 % pre-calentado a 60 °C. Medir el volumen luego de calentar. La relación de volumen de etanol y volumen de muestra debe ser 4:1. En caso de sobrecalentar el etanol a 65 °C, agregar 114 mL (expansión de volumen).

b) Cubrir las muestras con papel aluminio.

c) Dejar precipitar a temperatura ambiente durante 1 h.

19. El cálculo de cada fracción de fibra se calcula empleando la hoja de cálculo MegaCalc™ (www.magazyme.com).

Anexo 2, Protocolo N°6: Determinación de polisacáridos hidrosolubles

Método de referencia: United States Pharmacopoeia (USP 41-NF 36, *Ganoderma lucidum* fruiting body powder. USP, Rockville, MD, 2: 4632-4635) para la extracción y Dubois *et al.* (1956) para su cuantificación.

Procedimiento

1 g de muestra exactamente pesada y seca se coloca en un balón y se deja reposar 1 h a temperatura ambiente con 30 mL de agua destilada. Se extrae a reflujo durante 4 h y luego se filtra inmediatamente. Se transfiere el residuo y el filtro al mismo balón, agregándose nuevamente 30 mL de agua destilada. Se extrae a reflujo durante 3 h y se filtra inmediatamente. El balón es lavado con 3 porciones de 5 mL de agua destilada. Se combinan luego los lavados y el filtrado y se evapora en baño María hasta sequedad. Se disuelve finalmente el residuo en 5 mL de agua destilada y se agregan 75 mL de etanol. Se deja reposar 12 h a 4 °C y se centrifuga a 4000 rpm durante 30 minutos. El precipitado se seca en estufa a 60 °C hasta peso constante.

Cuantificación: Método del fenol-sulfúrico para la determinación de carbohidratos

Preparación de soluciones de reactivos

- Solución 80 % fenol: se prepara por peso, agregar a 20 g de agua destilada 80 g de fenol. Estable luego de 3-4 meses. Puede tornarse amarillento, considerarlo en el blanco.

Procedimiento

- Preparar la curva de calibrado de glucosa.
- Agregar a cada tubo 2 mL de solución de carbohidrato. Blanco de reactivos: 2mL de agua destilada.
- Agregar 0,05 mL de solución de fenol.
- Agregar tardando entre 10 y 20 segundos 5 mL de ácido sulfúrico directamente al centro del tubo para favorecer el mezclado. Dejar reposar 10 minutos. Agitar y dejar en baño de agua a 25-30 °C durante 10-20 minutos.
- Leer la absorbancia a 490 nm (amarillo-naranja). El color es estable por horas.

Anexo 2, Protocolo N°7: Determinación de vitaminas C y del complejo B

Método de referencia: Kall 2003.

Reactivos

- Ácido fólico
- Vitamina B1 (Tiamina HCl):
- Vitamina B2 (Rivoflavina fosfato):
- Vitamina B3 (Nicotinamida):
- Vitamina B6 (Piridoxina HCl):
- Vitamina B12 (Cianocobalamina)
- Vitamina C (ácido ascórbico)
- HCl 1, 0,1 y 0,01 M
- Acetato de sodio 2 M
- Fosfatasa alcalina
- Filtros hidrofílicos de 0,2 mm

Preparación de las muestras

1. Se pesa exactamente alrededor de 1 g de muestra seca y pulverizada y se coloca en un tubo de ensayo.
2. Se adicionan 10 mL de HCl 0,1 M y se lleva a autoclave durante 5 minutos a 121 °C.
3. Luego de enfriar a temperatura ambiente se ajusta el pH a 4,5 con acetato de sodio 2 M.
4. Se agita y se lleva a volumen de 20 mL con agua destilada y se enfría a 5 °C.
5. Se centrifuga 10 minutos, luego se filtra y se transfieren 3 mL a un tubo de ensayo.
6. Se adiciona el equivalente a 5 UI de fosfatasa ácida.
7. Se incuba toda la noche a 45 °C. La reacción es frenada agregando 1 mL de HCl 1 M en frío. Luego se adicionan 1,7 mL de HCl 0,01 M.
8. Filtrar con filtro de agua de 0,2 µm para su análisis mediante HPLC.

9. Las longitudes de onda para la cuantificación de cada vitamina y sus tiempos de retención son los siguientes (Anexo 2, Tabla 1):

Anexo 2, Tabla 1. Longitudes de onda de los máximos de absorción y tiempos de retención correspondientes a las vitaminas hidrosolubles analizadas.

Vitamina	Máximo de absorción (nm)	Tiempo de retención (min)
B1	246-247	9,16
B2	267	17,68
B3	260	14,94
B6	290	11,75
B9	246	9,85
B12	230	15,18
C	252-253	13,09

Anexo 2, Protocolo N°8. Determinación de vitamina D.

Método de referencia: Lumley (1993)

Procedimiento

1. 1 g de muestra exactamente pesada, pulverizada y seca se mezcla con 0,1 g de ácido ascórbico y 15 mL de metanol; asegurándose de quitar el oxígeno del interior del balón, luego se adicionan 5 mL de KOH 50 %.
2. La muestra se extrae a reflujo durante 25 minutos a 82°C, se filtra con papel de filtro y se enjuaga con 20 mL de agua.
3. Se transfiere el líquido a una ampolla de decantación y se extrae 3 veces con 20 mL de hexano (separando la fase inferior que será reutilizada y luego quedándose con las tres fases superiores de hexano).
4. Se juntan las tres fracciones hexánicas y se lavan en ampolla con 20 mL de agua 3 veces (descartando en cada paso la fase inferior acuosa).
5. Se colocan los aprox. 60 mL de hexano en balón de fondo redondo, se agrega aproximadamente 1 (1-3) mg de BHT y se evaporar el solvente a presión reducida a 45 °C.
6. Se resuspende el residuo en 1,5 mL de metanol HPLC y se filtra con filtro de jeringa para su análisis mediante HPLC.
7. Las longitudes de onda para la cuantificación de cada vitamina y sus tiempos de retención son los siguientes (Anexo 2, Tabla 2):

Anexo 2, Tabla 2. Longitudes de onda de los máximos de absorción y tiempos de retención correspondientes a las vitaminas D2 y D3.

Vitamina	Máximo de absorción (nm)	Tiempo de retención (min)
D2	265	21,51
D3	265	22,67

Anexo 2, Protocolo N°9: Determinación de vitamina E.

Procedimiento

Extracción

- Transferir 1,0 g de basidioma, finamente pulverizado y exactamente pesado, a un matraz de fondo redondo de 200 mL, agregar 37,5 mL de etanol. Añadirlo a un condensador y dejar a reflujo durante 45 minutos. Enfriar y filtrar.
- Enjuagar el matraz con 2 alícuotas de 5 mL de etanol. Filtrar y combinar los lavados con el filtrado.
- Evaporar a sequedad a presión reducida, luego disolver el residuo en aprox. 20 mL de alcohol.

Acetilación de las muestras

- Secar las muestras con SO_4Na_2 antes de evaporar el solvente (agregar un poco del sólido al vial y agitar, aprox. 0,01 g) a fin de eliminar agua residual que podría hidrolizar el anhídrido acético (reactivo acetilante).
- Transferir el líquido a un eppendorf de 2 mL y centrifugar 2 min a 8000 rpm.
- Transferir el sobrenadante a otro eppendorf de 2 mL y evaporar el solvente bajo campana de extracción.
- Agregar anhídrido acético y piridina en proporción según Hamman *et al.* (2016): una cantidad de muestra que contenga entre 0,1 a 0,5 mg de lípidos se coloca en un vial color caramelo, por cada 0.1 mg de lípidos se agrega 100 μL de piridina y 50 μL de anhídrido acético.
- El eppendorf cerrado y sellado con *parafilm* se lleva a la estufa y se deja incubar a 60°C durante 2 horas.
- Luego se lleva a 1 mL con hexano y se lava con 1 volumen de HCl 5 %, se centrifuga y se transfiere la fase orgánica superior a nuevo eppendorf (de esta manera se elimina la piridina).

9. La fase hexánica se lava con 1 volumen de NaHCO_3 5 %, y nuevamente la fase orgánica se transfiere a otro eppendorf conteniendo Na_2SO_4 (de esta manera se eliminan los restos de anhídrido acético).

10. Se centrifuga y se transfiere a vial para su análisis mediante CG-EM.

Anexo 2, Protocolo N°10: Determinación de ácidos grasos y esteroides

Ácidos grasos. Método de referencia: AOAC 996.06

Procedimiento

A. Hidrólisis ácida

1. Pesar exactamente una cantidad de muestra pulverizada y seca que contenga 100-200 mg de lípidos.
2. Colocar en un vial la muestra y agregar aproximadamente 100 mg de ácido pirogálico/pirogallol (previene degradación oxidativa de los ácidos grasos), agregar perlas de ebullición y 2 mL de etanol. Agitar hasta disolver toda la muestra.
3. Agregar 10 mL de HCl 8,3 M y mezclar.
4. Llevar a baño termostático a 70-80 °C con agitación moderada durante 40 minutos. Mezclar en *vortex* cada 10 minutos para incorporar partículas pegadas a las paredes.
5. Luego de la digestión enfriar a temperatura ambiente.

B. Extracción

6. Agregar igual volumen de solución CHCl_3 : MeOH (2:1). El metanol se agrega para aumentar la afinidad por ácidos grasos más polares.
7. Agitar durante 5 minutos. Dejar reposar 1 h o hasta que la fase sea clara. Separar la fase inferior (CHCl_3) y adicionar al tubo unos mg de Na_2SO_4 para eliminar el agua remanente. Repetir tres veces.
8. Separar del sólido y evaporar el solvente bajo campana.

C. Metilación

9. Agregar 1,8 mL de HCl 10 % p/v en MeOH, incubar a 50°C durante 20 minutos.
10. Extraer con 1,8 mL de hexano dos veces, transferir la fase superior orgánica a un frasco con Na_2SO_4 , agitar y separar el sólido.
11. Los tiempos de retención y los ácidos grasos identificados en las muestras analizadas se presentan en el Anexo 2, Tabla 3.

Anexo 2, Tabla 3. Tiempos de retención y pesos moleculares de los ácidos grasos identificados.

Tiempo de retención (min)	Identidad asociada	Peso molecular
19,33	Ácido pentadecanoico, metil éster	256
20,68	Ácido hexadecanoico, metil éster	270
23,08	Ácido octadecadienoico, metil éster	296
23,46	Ácido esteárico, metil éster	298

Anexo 2, Protocolo N°11. Perfil de esteroides. Método USP 2018, *Ganoderma lucidum* fruiting body powder - COMPOSITION, Content of triterpenoid acids.

1. Transferir aproximadamente 2,0 g de muestra pulverizada a un balón de fondo redondo de 200 mL.
2. Agregar 75 mL de etanol y calentar a reflujo durante 45 minutos. Enfriar.
3. Enjuagar el balón dos veces con 10 mL de etanol, filtrar y combinar los lavados con el filtrado.
4. Evaporar a sequedad bajo presión reducida (45 °C).
5. Proceder a la acetilación tal como se indica en el Protocolo N°9 de este anexo.
6. Los tiempos de retención y los esteroides identificados en las muestras analizadas se presentan en el Anexo 2, Tabla 4.

Anexo 2, Tabla 4. Tiempos de retención y pesos moleculares de los esteroides identificados.

Tiempo de retención (min)	Identidad asociada	Peso molecular
17,08	Ergosterol	396
17,42	Ergostadienol	398
17,60	Neoergosterol	380
23,08	Neoergosterona	378

Anexo 2, Tabla 5. Comparación entre la composición porcentual de los basidiomas de los hongos analizados en este estudio y lo reportado en bibliografía. En caso de no hallarse datos publicados para la misma especie, se tomaron los valores reportados para el género. Para cada hongo, las letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas ($p<0,05$).

	<i>G. sessile</i>	Referencia		<i>P. ostreatus</i>	Referencia		<i>L. edodes</i>	Referencia	
Humedad¹	86,9±0,6a	84±2,7a [1]		82,8±0,8a	85±1,8a [1]		83,7±0,4a	83±1,9a [1]	
Cenizas	4,58±0,38a	2,80±0,01a [2]		9,23±0,06a	7,02±0,04b [3]		6,92±0,14a	5,99±0,02a [3]	
Lípidos	3,90±0,14a	3,72±0,01a [2]		2,62±0,24a	2,02±0,02a [3]		1,84±0,16a	0,78±0,01a [3]	
Proteínas	15,78±1,71a	15,04±0,01a [3]		22,53±2,30a	21,14±0,04a [3]		21,87±0,95a	22,61±0,02a [3]	
Carbohidratos	77,09±1,24a	78,16±0,21a [2]		65,62±3,68a	69,86±,02a [3]		68,63±0,45a	70,62±,03a [3]	

¹ % p/p base húmeda. [1] Nile y Park (2014); [2] Stojkovi *et al.* (2014); [3] Sharif *et al.* (2016).

Anexo 2, Tabla 6. Comparación entre la composición porcentual de los micelios de los hongos analizados en este estudio y lo reportado en bibliografía para el micelio de *G. lucidum*. De no hallarse datos publicados para la misma especie, se tomaron los valores reportados para el género. Para cada nutriente, las letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas ($p<0,05$).

	Este estudio		Referencia ¹
Humedad²	<i>G. sessile</i>	5,09±0,47a	7,43±0,01b
	<i>G. lingzhi</i>	12,53±0,2a	
	<i>G. oregonense</i>	7,00±0,41b	
Cenizas	<i>G. sessile</i>	4,59±0,66a	2,48±0,01b
	<i>G. lingzhi</i>	4,15±0,01a	
	<i>G. oregonense</i>	2,15±0,74b	
Lípidos	<i>G. sessile</i>	4,21±0,25a	2,62±0,24b
	<i>G. lingzhi</i>	2,90±0,30b	
	<i>G. oregonense</i>	3,74±0,34a	
Proteínas	<i>G. sessile</i>	29,31±1,89a	11,88±0,01b
	<i>G. lingzhi</i>	14,81±0,42a	
	<i>G. oregonense</i>	9,40±0,44a	
Carbohidratos	<i>G. sessile</i>	61,89±3,96a	
	<i>G. lingzhi</i>	78,11±0,98b	

<i>G. oregonense</i>	84,70±2,13b	70,51±0,24a
----------------------	-------------	-------------

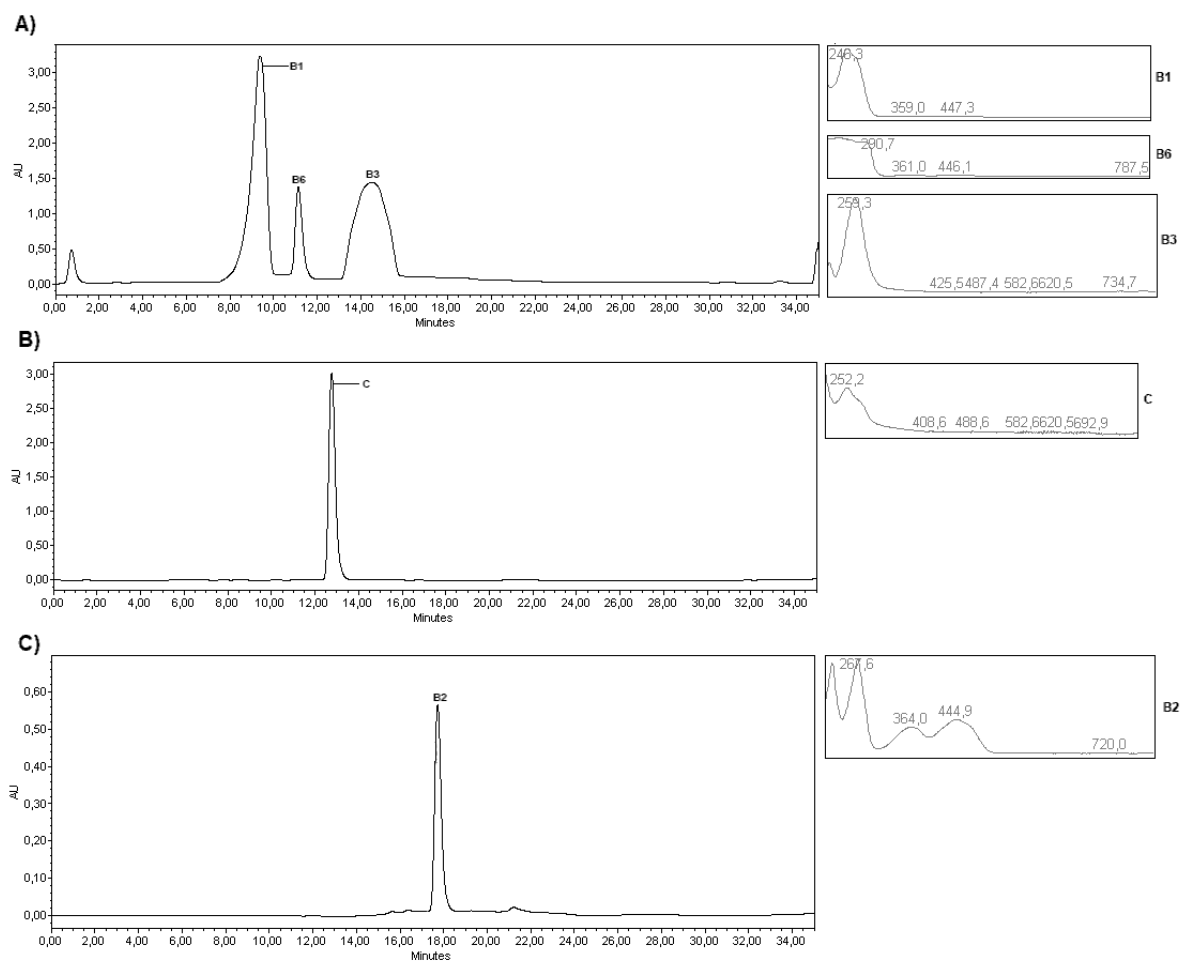
¹ Sethy *et al.* (2017); ² % p/p base húmeda

Anexo 2, Tabla 8. Comparación entre los métodos de análisis de fibra más empleados.

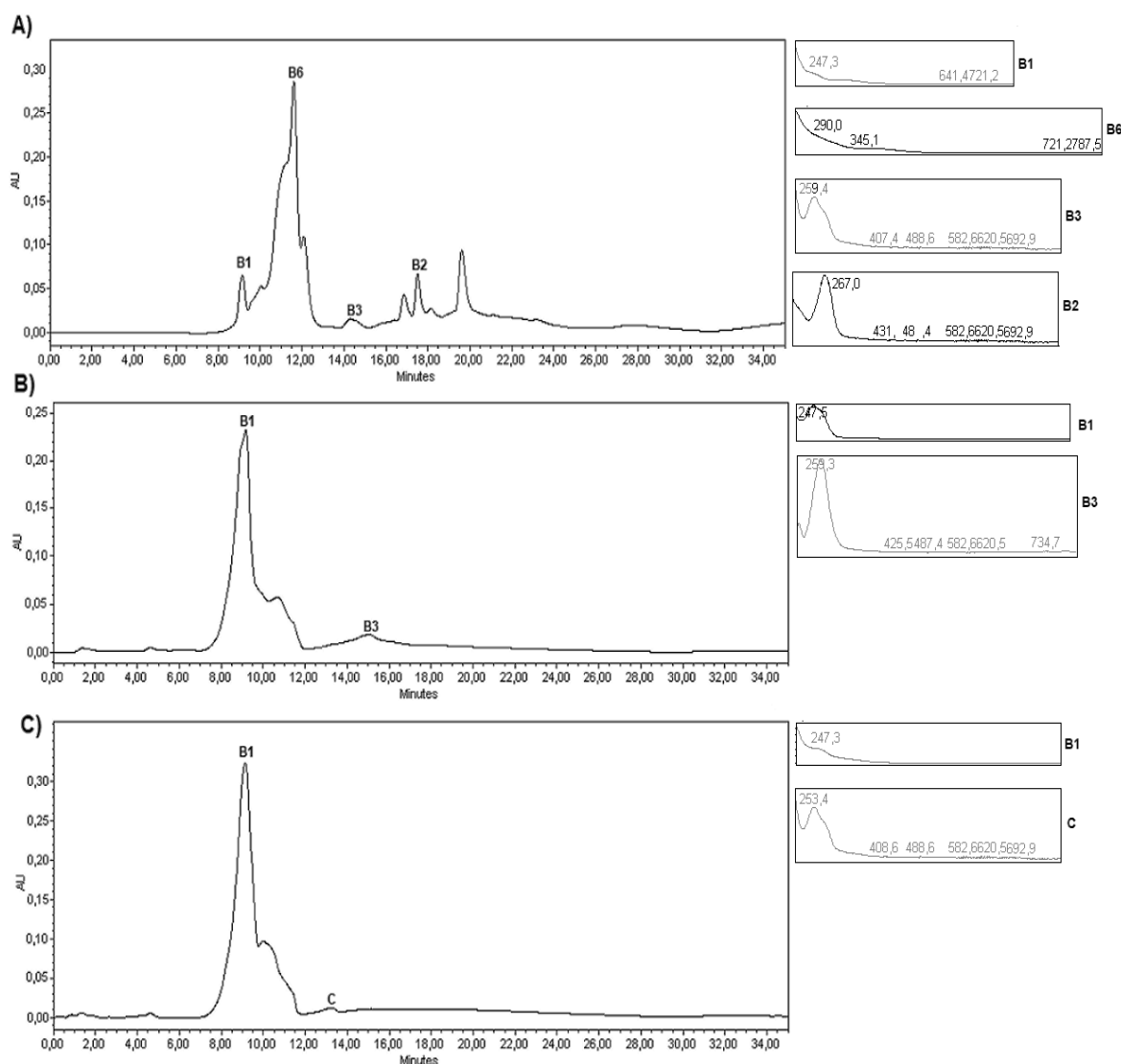
	USP ^a	AOAC ^b	ANKOM	
			Método 5	Método 13
Método	<561> Artículos de origen botánico-Fibra Cruda	991.43 Determinación de Fibra Total, soluble insoluble	Fibra ácido detergente en piensos	Fibra detergente neutro en piensos
Desengrasado	Agotamiento con éter	No especifica	Acetona durante 10 minutos con agitación leve	Acetona durante 10 minutos con agitación leve
Recipiente contenedor de muestra	-	Crisol filtrante	Bolsas filtrantes (F ₅₇)	Bolsas filtrantes (F ₅₇)
Tratamiento de la muestra	Doble Reflujo con H ₂ SO ₄ 78 %, 30 min, enjuague intermedio con NaOH. Filtrado e incinerado y secado a 110 °C	Digestión con alfa-amilasa, proteasa y amiloglucosidas. El digesto es tratado con alcohol para precipitar FDT ^c ; independientemente se determina FDI ^d y subsecuentemente FDS ^e .	Ebullición con cetrimida en medio ácido y posterior filtración y lavado del residuo	Pre-digestión con α-amilasa. Extracción con una solución caliente de laurilsulfato de sodio y la posterior determinación gravimétrica del residuo
Componentes determinados	Cantidades subestimadas de hemicelulosa y lignina y celulosa	FDT, FDS y FDI. Puede sobreestimar la FDT	Celulosa y lignina	Celulosa, hemicelulosa y lignina

^aUnited States Pharmacopoeia; ^bAssociation of Official Analytical Chemists; ^cfibra dietaria total; ^dfibra dietaria insoluble; ^efibra dietaria soluble.

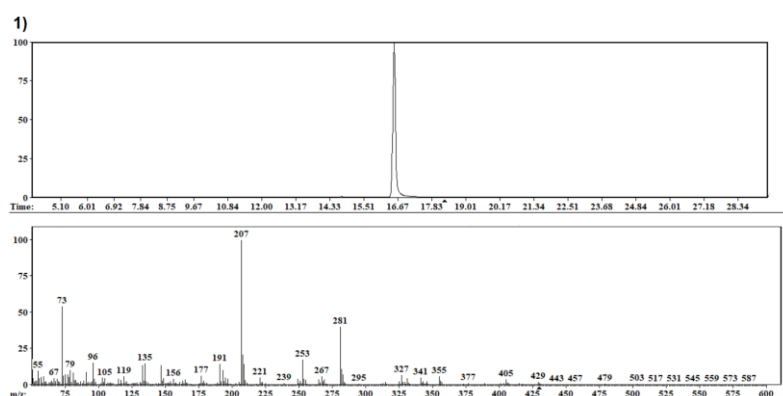
Anexo 2, Figura 3. Cromatogramas correspondientes a los estándares de las vitaminas detectadas, junto con los espectros de absorción extraídos en los tiempos de retención correspondientes a cada vitamina.

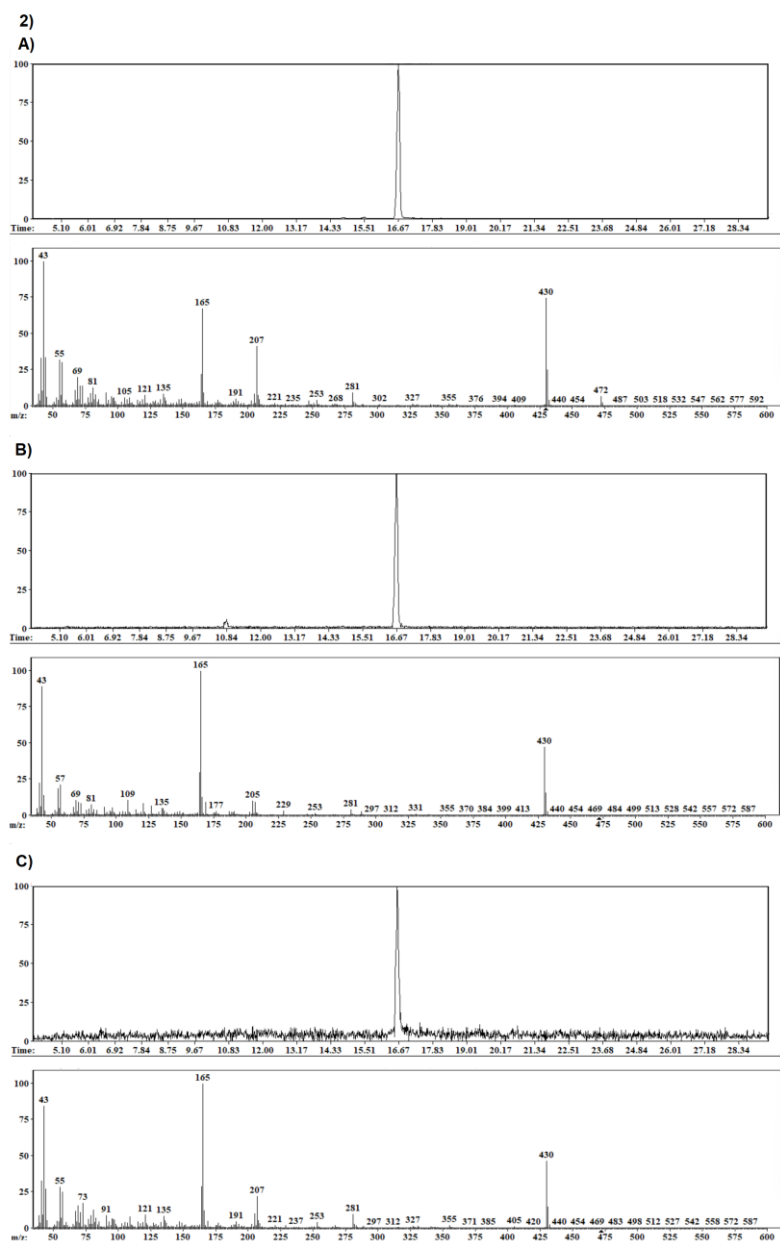


Anexo 2, Figura 4. Cromatogramas correspondientes al análisis de vitaminas hidrosolubles en basidiomas de: A) *Ganoderma sessile* E47, B) *Pleurotus ostreatus* P04 y C) *Lentinula edodes* L15, con los espectros de absorción extraídos en los tiempos de retención correspondientes a cada vitamina.

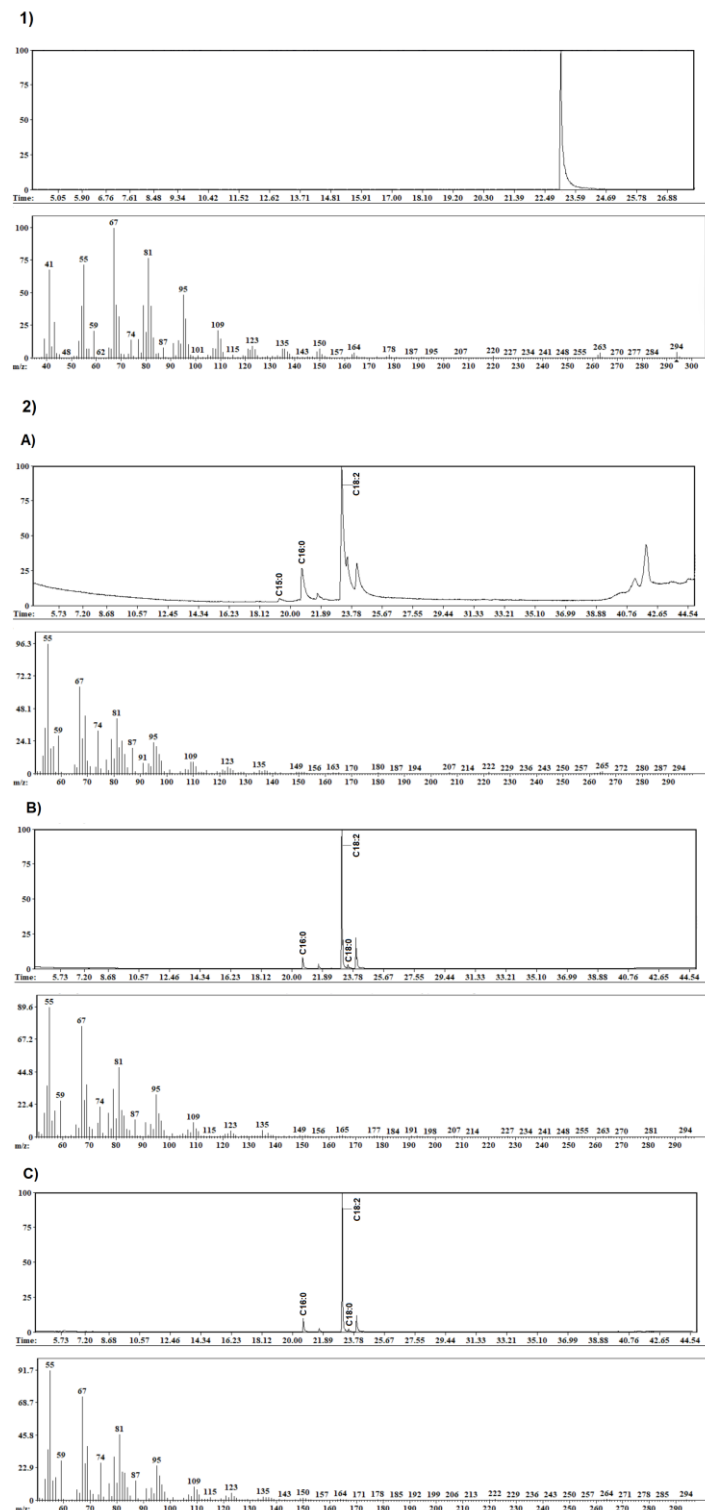


Anexo 2, Figura 5. Análisis de vitamina E mediante CG-EM. 1) Cromatograma del estándar de α -tocoferol en su forma acetilada y su correspondiente espectro de masas. **2)** Cromatogramas correspondientes al análisis de vitamina E en basidiomas de: **A)** *Ganoderma sessile* E47, **B)** *Pleurotus ostreatus* P04 y **C)** *Lentinula edodes* L15, con los espectros de masas correspondientes al tiempo de retención de α -tocoferol acetato. En todos los casos, se muestran los cromatogramas extraídos correspondientes al ion $m/z=430$.

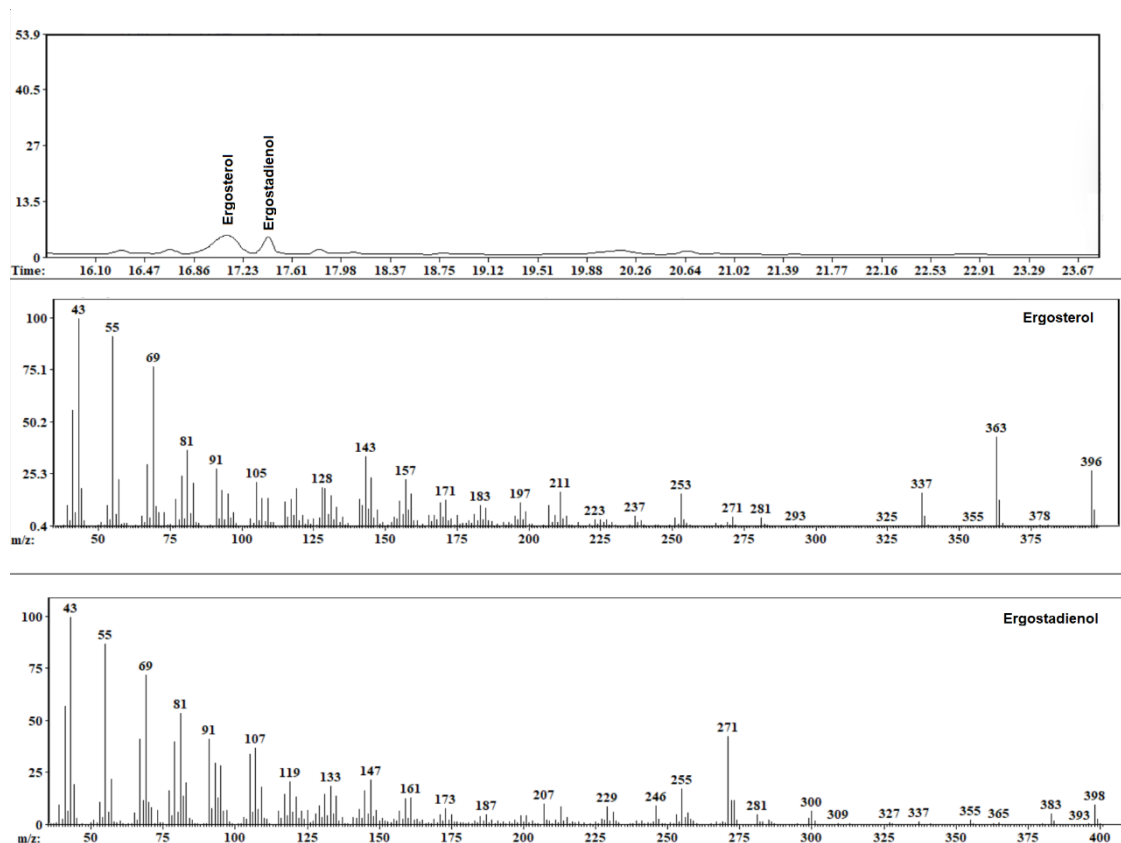




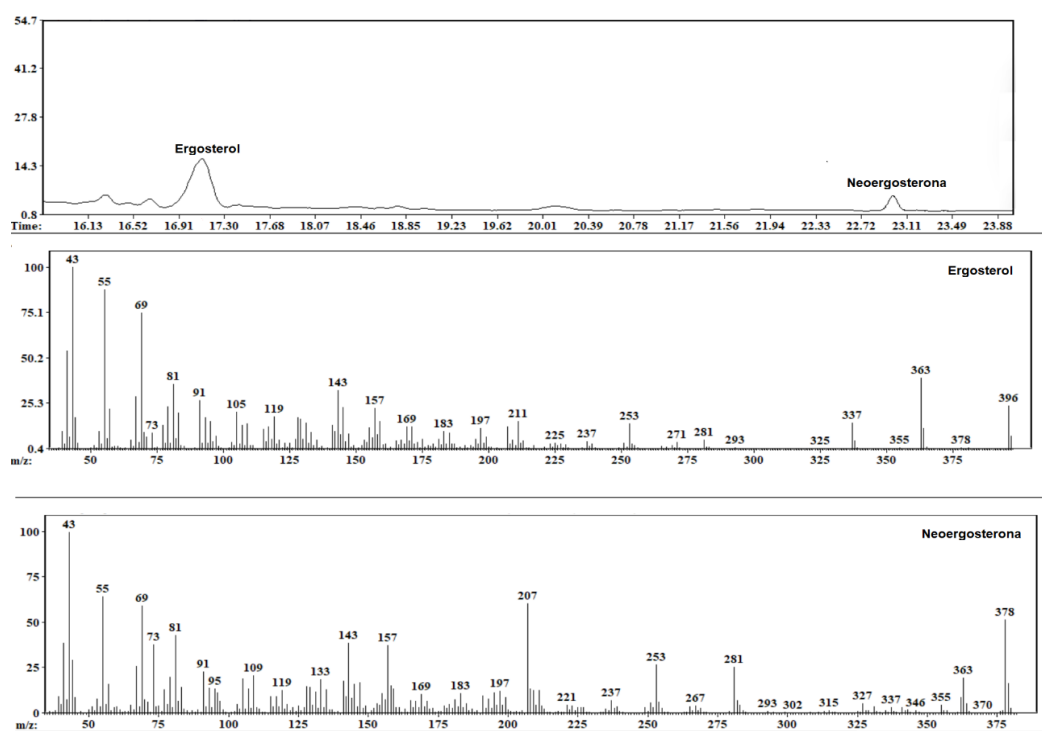
Anexo 2, Figura 6. Cromatogramas obtenidos por CG-EM de: 1) estándar de metil éster de ácido linoleico, y 2) de muestras de ácidos grasos correspondientes a basidiomas de: A) *Ganoderma sessile* E47, B) *Pleurotus ostreatus* P04, y C) *Lentinula edodes* L15.



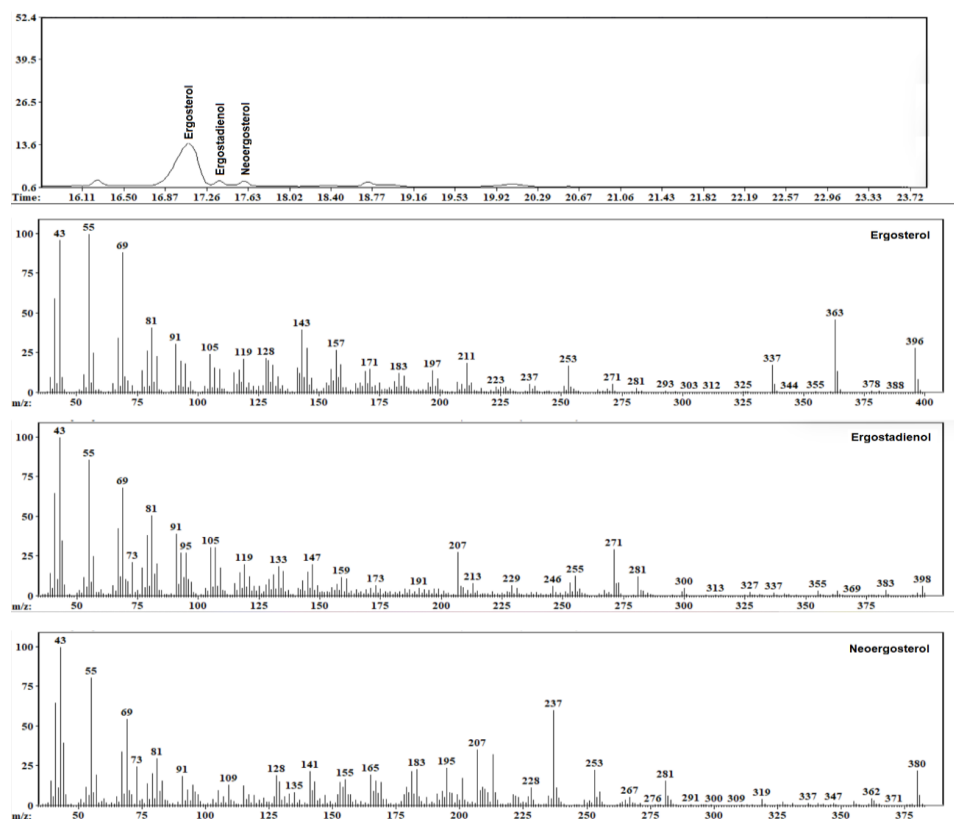
Anexo 2, Figura 7. Cromatogramas obtenidos por CG-EM de los perfiles de esteroides y espectros de masas extraídos a los tiempos de retención correspondientes al basidioma de *Ganoderma sessile* E47.



Anexo 2, Figura 8. Cromatogramas obtenidos por CG-EM de los perfiles de esteroides y los espectros de masas extraídos a los tiempos de retención correspondiente al basidioma de *Pleurotus ostreatus*.



Anexo 2, Figura 9. Cromatogramas obtenidos por CG-EM de los perfiles de esteroides y los espectros de masas extraídos a los tiempos de retención correspondiente al basidioma de *Lentinula edodes*.



Anexo 2, Protocolo 12. Cuantificación de pesticidas provenientes del sustrato en basidiomas.

Preparación y extracción de las muestras

1. Mortear y homogeneizar una cantidad suficiente de setas orgánicas pulverizadas (control) o de muestra de basidioma para pesar 0,3 g.
2. Extraer con ultrasonido 2 veces con 20 mL de una mezcla de hexano: diclorometano 2:1 durante 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Centrifugar los extractos a 2600 x g por 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Colectar los sobrenadantes y evaporar el solvente bajo campana de extracción.

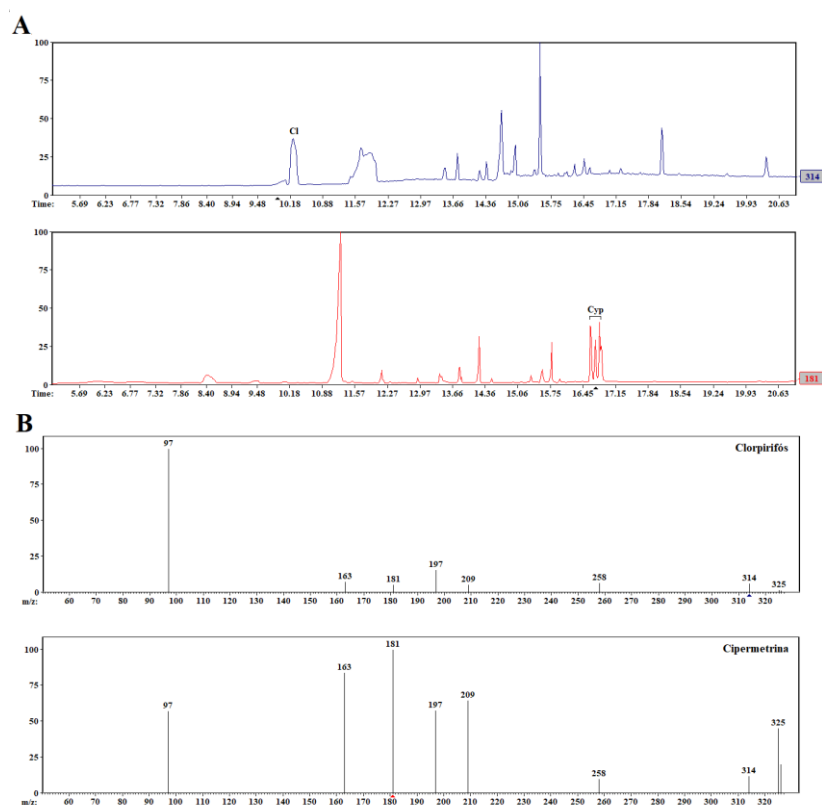
Clean-up

1. Para el acondicionamiento de las columnas (STRATA C18-E 1g/6ml), cada cartucho es cargado con 25 mL de acetonitrilo. Luego del pasaje del solvente, debe asegurarse quitar el excedente de manera que cese el goteo.
2. Carga de la muestra: Los extractos son resuspendidos en el mínimo volumen de acetonitrilo (hasta 500 μ L) y cargados en la columna con pipeta Pasteur.
3. La muestra es eluída con 30 mL de acetonitrilo. Luego se evapora el solvente bajo campana y se resuspende en 100 μ L de acetato de etilo.
4. Analizar mediante CG-EM.

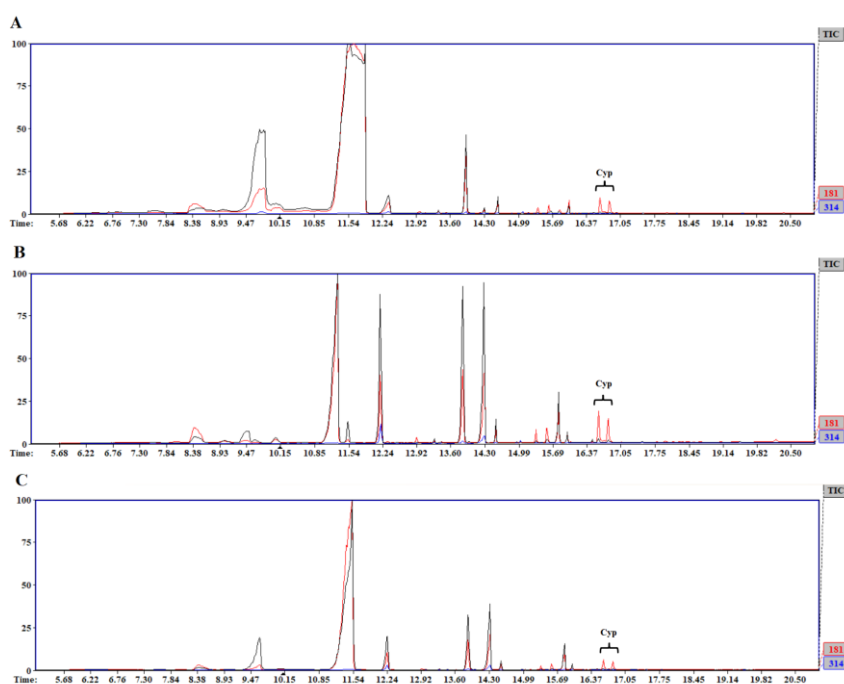
Test de recuperación

1. Morterear y homogeneizar una cantidad suficiente de setas orgánicas pulverizadas (control), pesar 0,3 g.
2. Adicional a la matriz 0,02 μ g de cada pesticida a analizar. Dejar equilibrar durante 24 h.
3. Realizar los pasos 2-4 del procedimiento de extracción.

Anexo 2, Figura 10. Cromatogramas obtenidos por CG-EM de los estándares de pesticidas determinados sobre la matriz de trabajo (A), y los correspondientes espectros de masas extraídos a los tiempos de retención de cada compuesto (B). En rojo se extrajo el correspondiente al ion 181 (m/z) de cipermetrina (Cyp) y en azul, al del ion 314 (m/z) de clorpirifós (Cl).



Anexo 2, Figura 11. Cromatogramas obtenidos por CG-EM de los basidiomas de: A. *G. sessile* E47, B. *P. ostreatus* P04 y C. *L. edodes* L15 luego del análisis de pesticidas. En rojo se extrajo el correspondiente al ion 181 (m/z) de cipermetrina (Cyp) y en azul, al del ion 314 (m/z) de clorpirifós.



Anexo 2, Tabla 9. Comparación entre los requerimientos microbiológicos establecidos en la Farmacopea Estadounidense (USP) en su monografía para el polvo del basidioma de *G. lucidum* y en su apartado para suplementos dietarios no estériles, y por la Farmacopea Argentina (FNA) en su sección para productos no estrictamente estériles.

Atributo microbiológico	Requerimientos (UFC g ⁻¹)		
	USP-NF <i>G. lucidum</i> ^a	USP-NF NE-N&DS ^b	FNA-PNE ^c
Recuento de heterótrofos aerobios totales	≤10 ⁵	≤10 ³	≤10 ³
Recuento de Mohos y levadura	No exigido	≤10 ²	≤10 ²
Enterobacterias	≤10 ³	Ausencia de <i>E. coli</i> en 10 g	≤10 ²

^aUSP-NF 2018, 41-NF 36, *G. lucidum* fruiting body powder; ^b USP-NF 2006 (USP 29-NF 24). Microbiological attributes of non-sterile Nutritional and Dietary Supplements, other raw materials and dietary supplements ingredients <2023>. Rockville, MD, 3087; ^c FNA-7ma Edición 2018, Control higiénico de productos no obligatoriamente estériles, vía oral <90>.

Anexo 2, Tabla 10. Microorganismos analizados y medios de cultivo comerciales empleados en el análisis de calidad microbiológica, según indicado en USP- USP-NF 2006 (USP 29-NF 24), Microbial enumeration tests, nutritional and dietary supplements <2021>.

Microorganismos	Medio de cultivo	Incubación	Método
Heterótrofos aerobios mesófilos totales	Caldo digerido de caseína de soja-polisorbato 20 (Britania)	Preparación-dilución de la muestra	-
	Medio fluido de digerido de soja-caseína (Britania)	37 °C, 48-72 h	Tubos múltiples-NMP ^a
Enterobacterias	Medio fluido de digerido de soja-caseína (Britania)	Pre-incubación: 25 °C, 2-5 h	-
	Caldo para enriquecimiento de Enterobacterias según Mossel (Britania)	Enriquecimiento: 37 °C, 24-48 h	Tubos múltiples-NMP ^a
			Recuento en placa

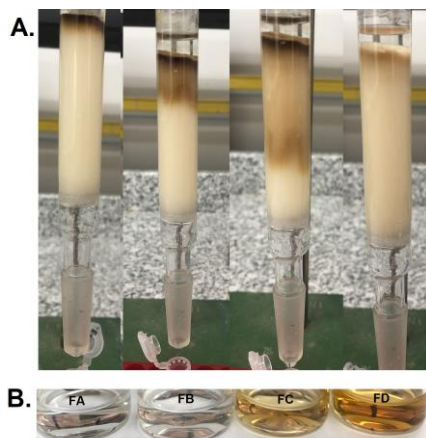
	Agar Cristal Violeta-Rojo-Neutro-Bilis-Glucosa (Britania)	En placa: 37 °C, 18-24 h.	
Mohos y levadura (no exigido en la monografía de <i>Ganoderma lucidum</i>)	Agar Dextrosa-Sabouraud (Britania)	25 °C, 5-7 días	Recuento en placa

ANEXO 3

Anexo 3, Protocolo N°1. Cromatografía de intercambio aniónico

- Columna: DEAE-celulosa (Sigma)
- Preparación de la resina: Suspender la resina en 80 mL (2 volúmenes de columna, VC) de una solución NaOH 0,1 M y NaCl 0,5 M durante 10 min. Verter en un embudo Buchner (capacidad 3 VC). Continuar lavando con 2 VC de la solución anterior. Repetir el lavado usando 0,5 M NaCl y luego una solución 0.1 M HCl que contiene 0.5 M NaCl. Finalmente, lavar con agua destilada o desionizada. Continuar lavando con 5 a 10 CV de agua destilada o desionizada o hasta que el pH del efluente sea 5 o mayor. Suspender la resina en 2 CV de NaCl 1 M y ajustar el pH de la suspensión a 7-8 con NaOH. Almacenar en heladera.
- Preparación de la columna cromatográfica: Suspender 1,5 g de resina en 40 mL de agua destilada. Colocar en una columna de vidrio de 2 cm diámetro por 21 cm de largo. La altura final de la resina en la columna es de 11 cm.
- Equilibrado: equilibrar agregando 30 mL de agua destilada.
- Adición de muestra: 1 mL (aproximadamente 54 mg).
- Elución: la muestra eluye con el siguiente gradiente, colectando fracciones de 2 mL:
 1. 60 mL de agua destilada.
 2. 40 mL de NaCl 0,05 M.
 3. 20 mL de NaCl 0,2 M.
 4. 20 mL de NaCl 0,5 M.

Anexo 3, Figura 1. A. Secuencia de la separación de las fracciones A-D en columna de DEAE-celulosa. B. Aspecto de las fracciones A-D.



Anexo 3, Protocolo N°2. Cromatografía de filtración en gel

- Resina: Sephadex G-200 40 (Sigma), 40-120 μm tamaño de poro.

- Preparación de la columna cromatográfica:

Suspender 0,5 g de resina en 15 mL de buffer TRIS 30 mM pH 8,0, dejar reposando *overnight*.

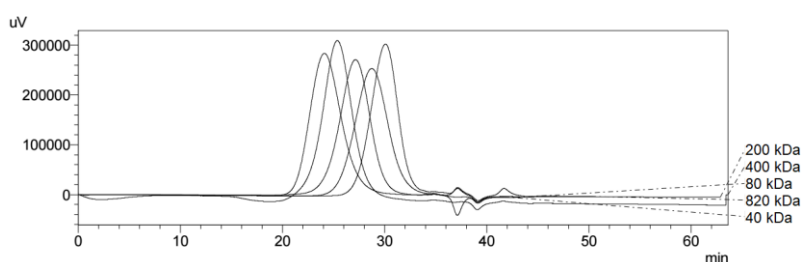
Colocar en una jeringa de 5 mL, 1,6 cm largo x 1,3 cm de diámetro.

- Equilibrado: agregar 12 mL de NaCl 0,2 M (4 VC).

- Adición de muestra: suspender las fracciones en 200-250 μL de NaCl 0,2 M y proceder a su carga en la columna.

- Elución: eluir con 40 mL (20 VC) NaCl 0,2 M. Se colectan alícuotas de 0.6 mL.

Anexo 3, Figura 2. Cromatograma de los estándares de dextrano empleados para la calibración en la determinación de peso molecular por GPC.



Anexo 3, Tabla 1. Valores de Mp, Mn, Mw y Mz de las fracciones A-D obtenidas mediante cromatografía en DEAE-celulosa de los polisacáridos de *G. sessile* E47 en cultivo líquido.

Fracción	Tiempo (min)	Mp	Mn	Mw	Mz	Mw/Mn	Mz/Mw
A	33,180	3808	3573	32186	2175842	9,01	67,6
B	29,206	39508	10872	435	130118	4,00	2,98
C	30,117	23104	16382	763	379809	4,65	4,97
D	31,645	9399	18224	154	1122824	8,46	7,27

Anexo 3, Protocolo N°3. Análisis de monosacáridos.

1. Agregar 1 mg de polisacáridos o de estándar de monosacárido a un frasco de vidrio con tapa a rosca.

2. Agregar 1 mL de ácido trifluoroacético 2 M. Sellar bien con Parafilm y teflón. Incubar 8 h a 100 °C en estufa.

3. Evaporar a sequedad a presión reducida a <40 °C para eliminar el ácido.

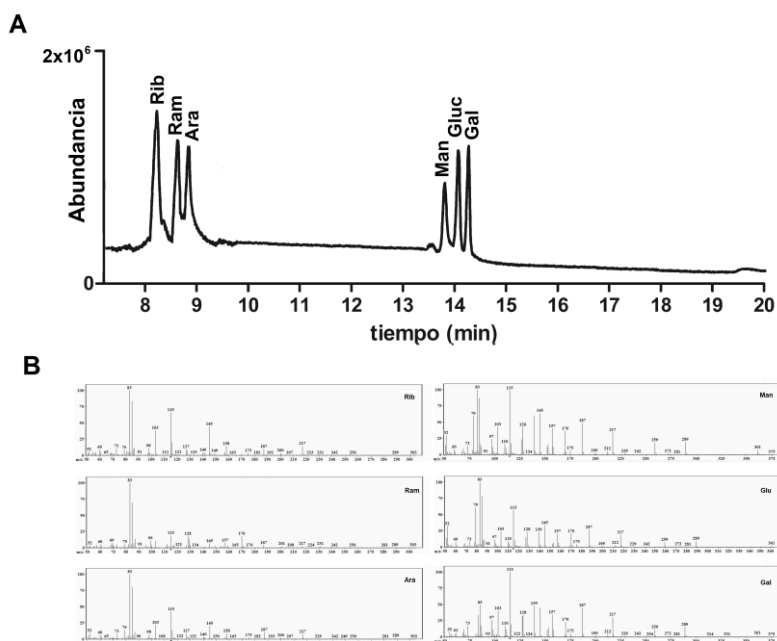
4. Reducir el residuo con 125 μL de NaBH_4 (2.5:1; preparar 10 mL de solución 0,02 g mL^{-1} NaBH_4 en agua destilada al momento de uso) en oscuridad durante 90 min a 40 °C.
5. Secar el residuo en evaporador rotatorio.
6. Eliminar el exceso de NaBH_4 agregando 12,5 μL de ácido acético glacial.
7. Evaporar a sequedad a presión reducida a <40 °C.
8. Acetilar con 2 mL anhídrido acético-piridina (1:1) v/v a temperatura ambiente durante 12 h.
9. Remover la piridina con igual volumen (1 mL) de solución acuosa de 5 % CuSO_4 .
10. Eliminar el sulfato con 4 mL EDTA (186 mg L^{-1}).
11. Pasar a un tubo de vidrio de 20 mL con buen cierre. Los acetatos de alditos se extraen con igual volumen de cloroformo dos veces, o hasta obtener una solución de color transparente (de Jesus 2018). Pasar la fase clorofórmica a un vial con NaSO_4 . Mezclar, pasar el líquido a un nuevo vial y secar bajo campana.
8. Al momento de analizar cromatográficamente, agregar 1 mL de cloroformo.

Anexo 3, Protocolo N°4. Extracción de los polisacáridos a partir de cápsulas de *G. lucidum* comercial.

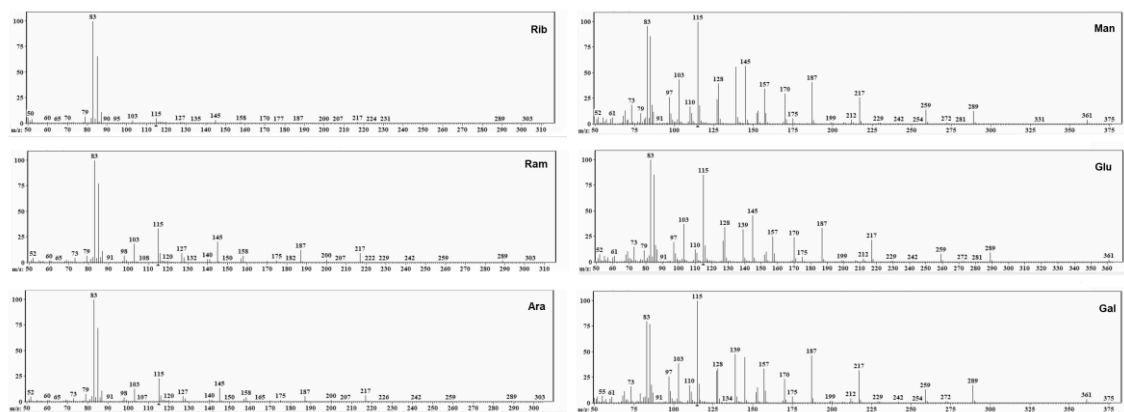
Producto: cada capsula contiene 500 mg de polvo, 175 mg (35 %) de PS, estearato de magnesio, polvo de arroz, óxido de silicio.

1. Vaciar el contenido de una capsula y tomar el peso.
2. Desengrasar con acetona en frio para eliminar estearato. Dejar secar en campana.
3. Agregar 15 mL de agua destilada por cápsula y extraer a reflujo según método USP.
4. Secar el filtrado a baño María. Resuspender y precipitar con 15 volúmenes de etanol; centrifugar.
5. Secar el precipitado y tomar el peso.
6. Incubación con amilasa: a fin de eliminar el almidón presente en la preparación, cada 0,2 g, agregar 8 mL de buffer MES-TRIS (pH 8,2) y 10 μL de amilasa. Incubar 30 min a 90 °C.
7. Desproteinización: incubación con igual volumen de TCA 24 % durante 1 h a 4 °C. Centrifugar y quedarse con el sobrenadante. Concentrar volumen.
8. Dializar con agua corriente y luego destilada. Finalmente liofilizar y registrar el peso.

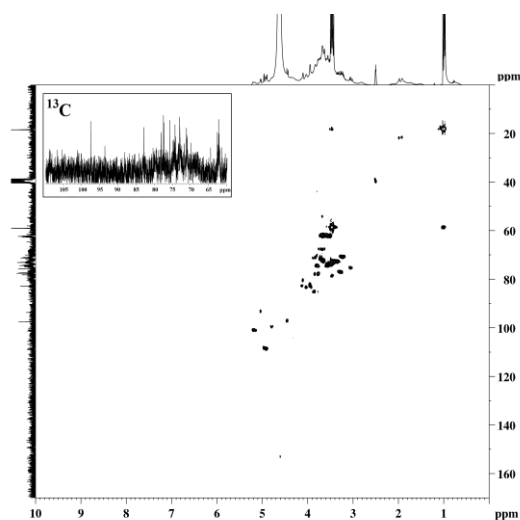
Anexo 3, Figura 3. Análisis de monosacáridos. A) Cromatograma de los estándares de monosacáridos obtenido mediante GC-EM de los derivados acetilados, y B) sus espectros de masas correspondientes.



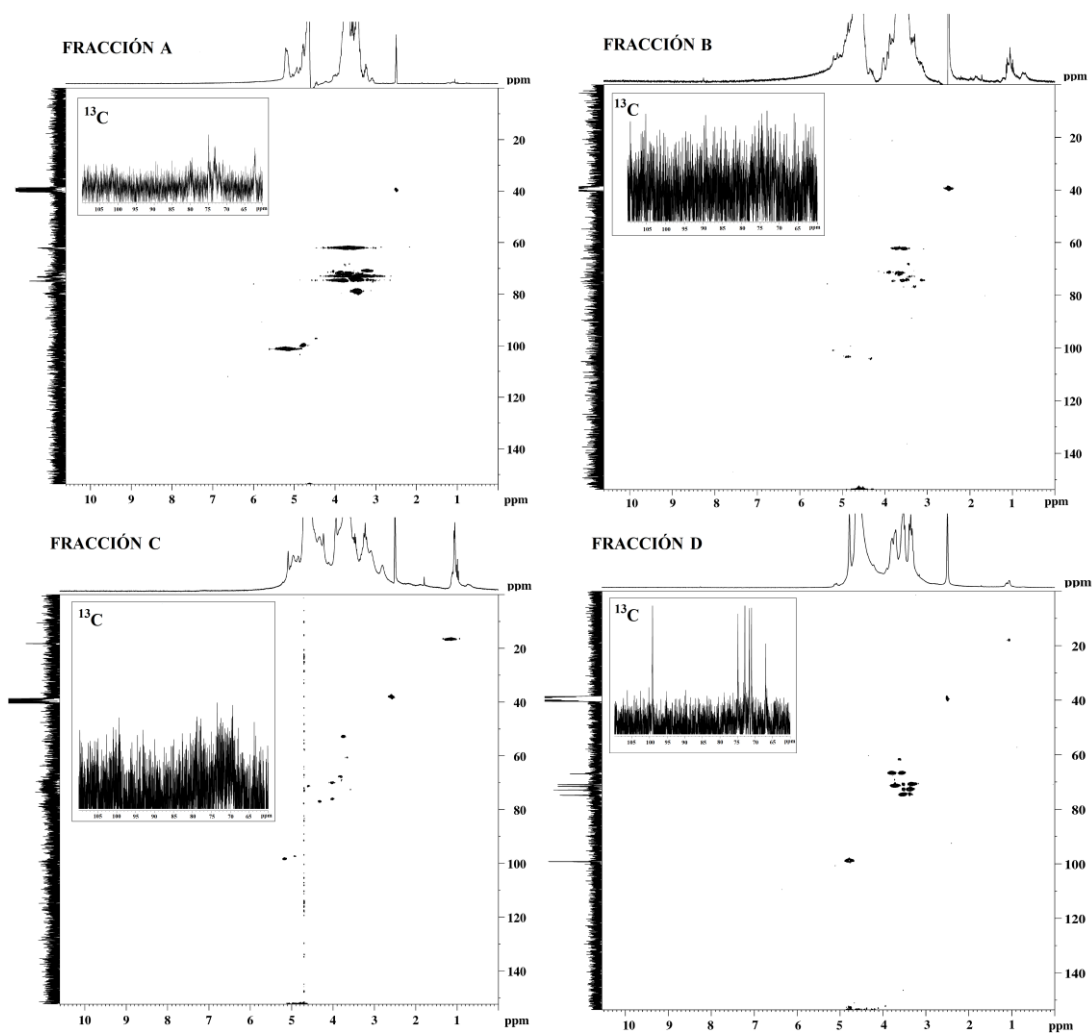
Anexo 3, Figura 4. Análisis de monosacáridos. Espectros de masas correspondientes a los monosacáridos identificados en los polisacáridos purificados del cultivo líquido de *G. sessile* E47.



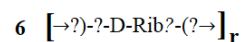
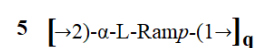
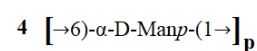
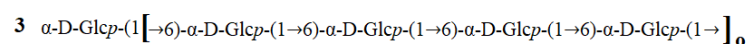
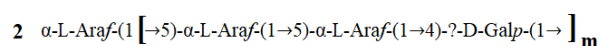
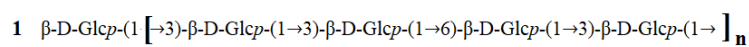
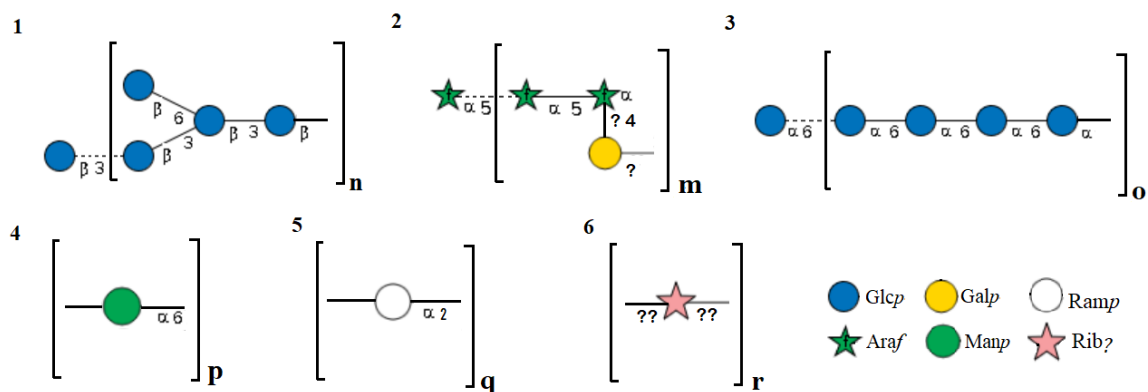
Anexo 3, Figura 5. Espectro HSQC completo de polisacáridos purificados de *G. sessile* E47. Se presenta en un recuadro una región del espectro ^{13}C -NMR para más detalle.



Anexo 3, Figura 6. Espectro HSQC completo de las fracciones A-D de los polisacáridos purificados de *G. sessile* E47. Se presenta en recuadros regiones de los espectros ^{13}C -NMR para más detalle.

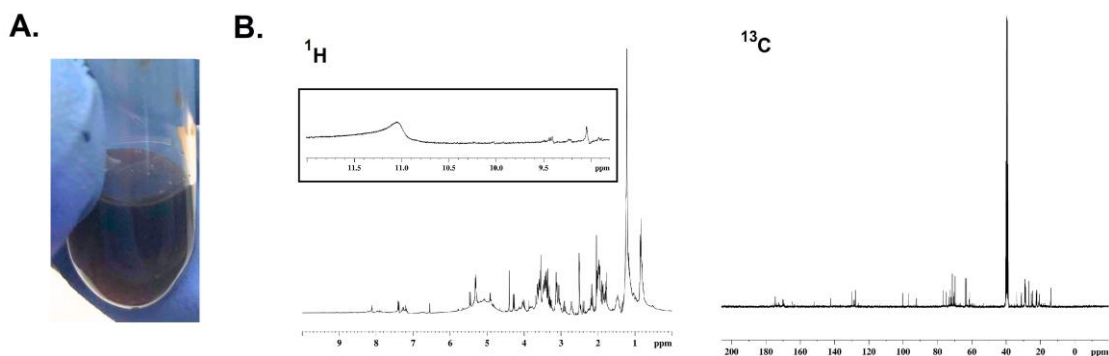


Anexo 3, Figura 7. Posible estructura de los PS extraídos del cultivo líquido de GS. Se presenta la posible cadena principal (1) y los fragmentos propuestos (2-6). Las conectividades entre los fragmentos deben confirmarse mediante RMN HMBC y análisis de metilación.

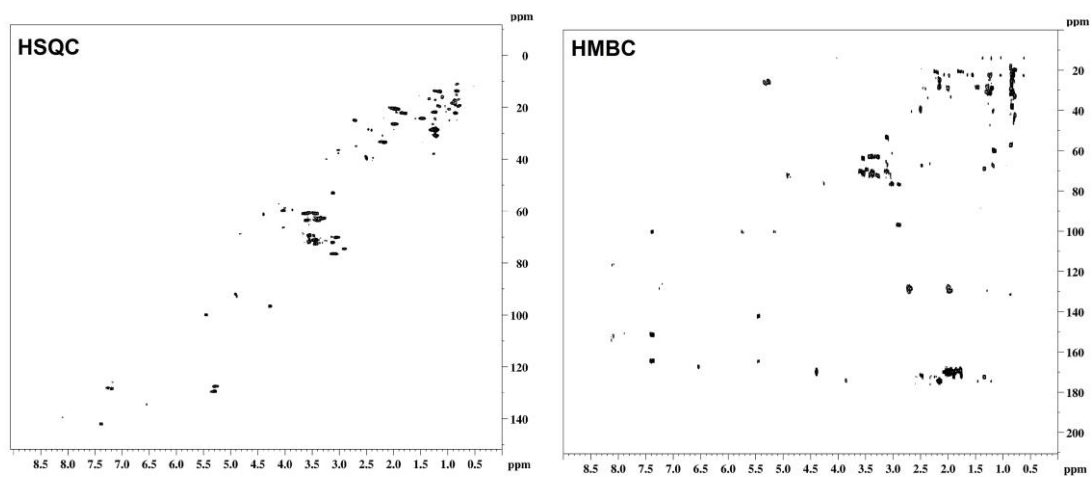


creado con <https://glycosmos.org/> y <https://glyconavi.org/Draw/>

Anexo 3, Figura 8. A. Aspecto del extracto de triterpenos aislados de los basidiomas de *G. sessile* E47 disueltos en el solvente deuterado. **B.** Sus correspondientes espectros de ^1H -NMR y ^{13}C -NMR.



Anexo 3, Figura 9. Espectros HSQC y HMBC completos de los triterpenos aislados de los basidiomas de *G. sessile* E47.



ANEXO 4

Anexo 4, Tabla 1. Datos asociados a los individuos donantes de materia fecal. IMC: índice de masa corporal, M: masculino, F: femenino.

Identificación	Sexo	Edad	IMC
P02	M	64	31,8*
P04	M	45	23,3
P05	M	24	24,7
P06	F	26	26,1
P07	M	32	21,3
P08	F	31	29,3
P09	M	33	21,6
P10	F	48	27,7
P11	F	39	21,3
P12	F	55	24,6

*La muestra, pese a presentar criterios de exclusión, fue igualmente incluida en el análisis, previa consulta con el comité de ética pertinente.

Anexo 4, Detalle de Figura 40. Miembros de los filos *Bacteroidetes* **(B)** y *Firmicutes* **(F)** metabolizan polisacáridos complejos generando oligosacáridos extracelulares que pueden ser luego metabolizados por especies de *Bifidobacterium*. Este consorcio microbiano genera acetato y lactato a partir de la oxidación de hexosas y pentosas vía glicólisis, previa oxidación a fosfoenolpiruvato **(FEP)** y posterior desfosforilación a piruvato. El acetato se produce principalmente a partir del piruvato a través de la acetilcoenzima A **(1)** (Kaoutari *et al.*, 2013). Otro producto intermediario de fermentación, el succinato, se origina a partir del oxalacetato convertido a partir del piruvato **(3)**. Junto al lactato **(2)** no se acumulan en niveles elevados en el colon, al incorporarse a vías de *cross-feeding* bacterianas y sirviendo como sustratos para los productores de butirato y propionato (Ríos-Covián *et al.*, 2016). El propionato es producido mediante tres vías metabólicas alternativas que comienzan con succinato **(4)**, lactato **(5)** o propanodiol **(6)**. Este último intermediario se forma en algunas bacterias como producto del catabolismo de los desoxiazúcares ramnosa y fucosa, y puede participar en el *cross-feeding* entre

los degradadores de desoxiazúcares (como especies de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*) y los productores de propionato que codifican la vía del propanodiol (como especies de *Roseburia* y *Blautia*) (6). La vía del succinato se encuentra principalmente en *Bacteroidetes* y en la clase Negativicutes de *Firmicutes* (4). Otras bacterias Negativicutes convierten el lactato en propionato mediante la vía del succinato (como *Veillonella* spp.) o mediante la vía del acrilato (*Megasphaera elsdenii*). También se ha demostrado que la vía del acrilato funciona en la especie *Coproccoccus catus* (*Lachnospiraceae*) (5) (Reichardt *et al.*, 2014). Especies como *Eubacterium hallii* y *Anaerostipes* spp. producen butirato a partir de lactato y acetato en un proceso de *cross-feeding* (7) (Gasaly *et al.*, 2021). *Roseburia* spp. constituye uno de los géneros más importantes en la producción de butirato a partir de acetato utilizando la vía del acetil-CoA (9) (Frolova *et al.*, 2022). El butirato también puede ser producido a partir de succinato vía succinil-CoA, ruta metabólica presente en varias especies de *Firmicutes* y de *Bacteroidetes* (*Prevotellaceae*) (Frolova *et al.*, 2022; Wei *et al.*, 2023) (8).

Anexo 4, Protocolo N°1. Procesamiento de muestras de materia fecal.

- A. Elaboración del inóculo: En condiciones asépticas, pesar en un recipiente colector estéril 10 g de materia fecal. Añadir al frasco 50 mL de medio estéril BCM (Long *et al.*, 2015) para obtener una suspensión inicial al 10 % p/v. Sonicar durante 7 minutos para lograr la homogeneización.
- B. Agregar 2,5 mL de suspensión fecal a cada grupo de tubos. Completar con volumen según corresponda:
 - 1. Control de medio de cultivo: añadir 5 mL de medio BCM
 - 2. Controles a 0 y 8 h: añadir 2,5 mL de medio BCM estéril a cada uno de los 3 tubos.
 - 3. PS-GS y PS-GL: agregar 2,5 mL de la solución de PS (160 mg en 8 mL de medio BCM).
- C. Fermentación: Colocar los tubos (exceptuando los controles a 0 h) en jarra de anaerobiosis, agregar el sobre de anaerobiosis, el papel con colorante indicador de anaerobiosis, cerrar e incubar en estufa a 37 °C durante 8 h. Luego, extraer alícuotas para los siguientes procedimientos.

Anexo 4, Protocolo N°2. Extracción de ADN de muestras de materia fecal.

- 1. Centrifugar los tubos a 12000 rpm durante 10 min o hasta obtener un sedimento bien formado y un sobrenadante claro.
- 2. Retirar el sobrenadante. Si no se procesa en el día, almacenar a -20 °C.

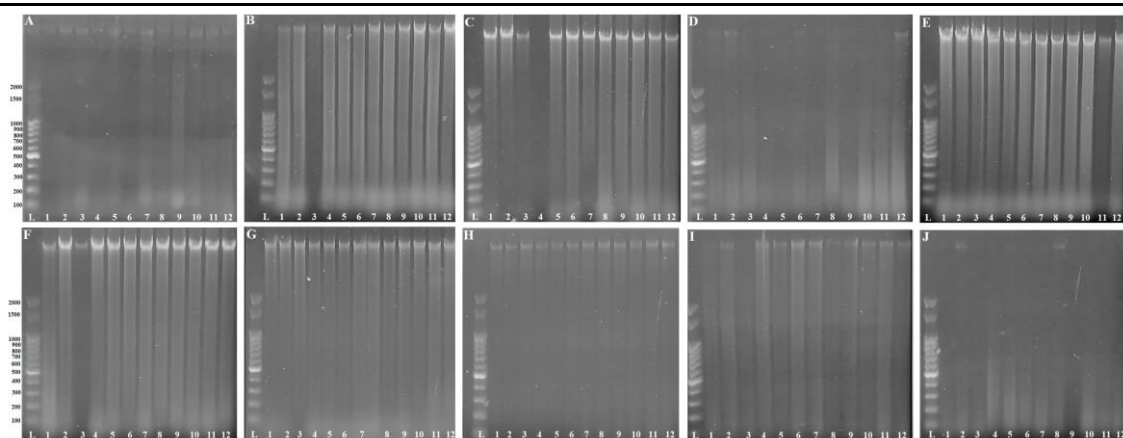
3. Triturar con 500 μL de nitrógeno líquido dentro del mismo tubo. Luego, disolver en 250 μL de tampón SET.
4. Añadir 25 μL de solución de lisozima de 10 mg mL^{-1} . Mezclar en vortex e incubar a 37 °C en un baño con agitación durante 30 min, invirtiendo los tubos cada 5 min.
5. Retirar los tubos del baño y setear la temperatura de incubación a 55 °C.
6. Agregar a cada tubo 25 μL de solución de proteinasa K (10 mg mL^{-1}) y 30 μL de SDS 10 %. Mezclar en vortex e incubar a 55 °C con agitación durante 1 hora.
7. Agregar 109 μL de NaCl 6 M y 878 μL de una solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Mezclar bien y centrifugar a 11000 rpm durante 5 min.
8. Transferir la fase superior a un tubo nuevo. Repetir la adición de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y centrifugar. Combinar las fases.
9. Añadir una parte (aprox. 800 μL) de isopropanol previamente enfriado en hielo y
10. mezclar cuidadosamente. En este paso deben observarse las hebras de ADN.
11. Centrifugar a 5000 rpm durante 5 min.
12. Lavar el sedimento dos veces con etanol al 70 %, centrifugando a 5000 rpm durante 10 min. Dejar secar.
13. Añadir 50 μL de agua de calidad HPLC estéril, dejar hidratar y almacenar a -20 °C.

Anexo 4, Protocolo N°3. Extracción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA)

1. Descongelar el contenido del tubo y agregar 2 perlas de vidrio, mezclar en vortex 3 veces durante 20 segundos.
2. Incubar en hielo con agitación durante 30 minutos (120 rpm). Centrifugar 5 min a 10000 rpm.
3. Pasar 100 μL de sobrenadante a un tubo nuevo de 1,5 mL que contenga 10 μL de HCl 5 M (pH final= 2).
4. Extraer con 100 μL de éter dietílico anhidro (1:1, v/v), mezclar en vortex e incubar en hielo durante 5 minutos.
5. Centrifugar 5 min a 10000 rpm.
6. Transferir la fase etérea superior (contiene los SCFA) a un nuevo tubo que contiene Na_2SO_4 anhidro (para eliminar el agua residual).
7. Repetir dos veces la extracción con éter dietílico anhidro.
8. Reunir las fases etéreas, mezclar y proceder a la derivatización.

B. Derivatización: Transferir 100 μL de la fase etérea a viales de vidrio. Agregar 5 μL del reactivo BSTFA y agitar durante 5 segundos. Dejar incubando a temperatura ambiente (22 °C) *overnight*.

Anexo 4, Figura 1. Geles de agarosa de las muestras extraídas de ADN. L: marcador de peso molecular. **A:** P02; **B:** P04; **C:** P05; **D:** P06; **E:** P07; **F:** P08; **G:** P09; **H:** P10; **I:** P11, y **J:** P12. **1-3:** controles a 0 h; **4-6:** controles a 8 h; **7-9:** post fermentación con los PS de *G. sessile* E47, y **10-12:** post fermentación con los PS de *G. lucidum*. Pueden observarse las bandas correspondientes al ADN genómico por encima de 2000 pb.



Anexo 4, Tabla 2. Resultados de la cuantificación y análisis de calidad del ADN, número de unidades taxonómicas y número de lecturas (reads) por muestra analizada post secuenciación de la región V3-V4 del gen 16S.

Individuo	Grupo	ADN ng μ L ⁻¹	A260/ A280	A260/ A230	Tamaño del inserto	N° ZOTUs	N° lecturas
P02	CONTROL 0H	19	1,1	3,0	250	783	56341
P02	CONTROL 0H	12	1,3	2,8	250	785	45463
P02	CONTROL 0H	67	1,8	1,8	250	789	54429
P02	CONTROL 8H	20	1,4	2,3	250	826	71169
P02	CONTROL 8H	18	1,4	3,5	250	680	39565
P02	CONTROL 8H	28	1,2	1,6	250	731	46371
P02	GS	88	1,9	1,9	250	696	71118
P02	GS	49	1,6	1,6	250	738	68220
P02	GS	167	1,8	1,7	250	726	75271
P02	GL	103	1,8	1,7	250	718	62621
P02	GL	109	1,5	1,0	250	446	17891
P04	CONTROL 0H	264	1,9	2,0	250	645	52101
P04	CONTROL 0H	313	2,0	2,0	250	690	65583
P04	CONTROL 0H	178	1,4	3,4	250	733	27775
P04	CONTROL 8H	222	1,9	2,1	250	661	36087
P04	CONTROL 8H	237	2,0	2,2	250	650	54603
P04	CONTROL 8H	295	2,0	2,1	250	561	30286
P04	GS	399	2,0	2,1	250	705	43531
P04	GS	447	2,0	2,0	250	614	45970
P04	GS	337	2,0	2,2	250	726	60465
P04	GL	467	2,0	2,1	250	891	37365
P04	GL	462	2,0	2,1	250	722	56240

P04	GL	477	2,0	2,3	250	712	25150
P05	CONTROL 0H	109	1,9	2,6	250	1158	14181
P05	CONTROL 0H	87	1,8	2,6	250	979	11350
P05	CONTROL 0H	39	1,8	3,0	250	1663	25128
P05	CONTROL 8H	162	1,3	1,3	250	710	64970
P05	CONTROL 8H	108	2,6	3,5	250	1181	15348
P05	CONTROL 8H	118	2,4	3,3	250	1047	12749
P05	GS	149	2,9	2,2	250	1663	19075
P05	GS	205	2,2	2,2	250	1147	33448
P05	GS	134	2,5	2,9	250	1238	26739
P05	GL	190	2,4	2,8	250	759	46186
P05	GL	143	2,4	3,6	250	913	14736
P05	GL	152	2,4	2,9	250	527	53912
P06	CONTROL 0H	59	1,5	1,4	250	1056	61473
P06	CONTROL 0H	57	1,6	1,5	250	1234	73506
P06	CONTROL 0H	41	1,6	1,7	250	1039	56557
P06	CONTROL 8H	53	1,7	1,6	250	1061	58220
P06	CONTROL 8H	43	1,6	1,5	250	1050	62603
P06	CONTROL 8H	49	1,7	1,8	250	1155	78426
P06	GS	42	1,5	1,3	250	858	44404
P06	GS	49	1,5	1,7	250	1032	72281
P06	GS	68	1,7	1,8	250	960	57533
P06	GL	136	1,8	1,7	250	937	70136
P06	GL	104	1,8	2,1	250	928	61787
P06	GL	146	1,8	1,9	250	934	73417
P07	CONTROL 0H	539	1,9	1,7	250	343	71470
P07	CONTROL 0H	526	1,9	1,7	250	931	54424
P07	CONTROL 8H	416	1,9	1,7	250	1065	57830
P07	CONTROL 8H	476	1,9	1,8	250	1043	60045
P07	CONTROL 8H	420	1,9	1,7	250	1082	66429
P07	GS	510	1,9	1,7	250	1044	81609
P07	GS	462	1,9	1,7	250	845	71082
P07	GS	534	1,9	1,8	250	1020	83374
P07	GL	403	1,8	1,7	250	872	63519
P07	GL	249	1,9	1,7	250	1013	68842
P08	CONTROL 0H	219	1,9	1,7	250	625	69839
P08	CONTROL 0H	147	1,9	1,9	250	1003	37787
P08	CONTROL 0H	24	1,9	3,1	250	717	47160
P08	CONTROL 8H	269	1,9	1,9	250	747	46662
P08	CONTROL 8H	199	1,9	1,9	250	1057	18957
P08	CONTROL 8H	220	1,9	1,8	250	612	44094
P08	GS	235	1,9	1,9	250	719	38635
P08	GS	166	1,9	2,0	250	1122	18300

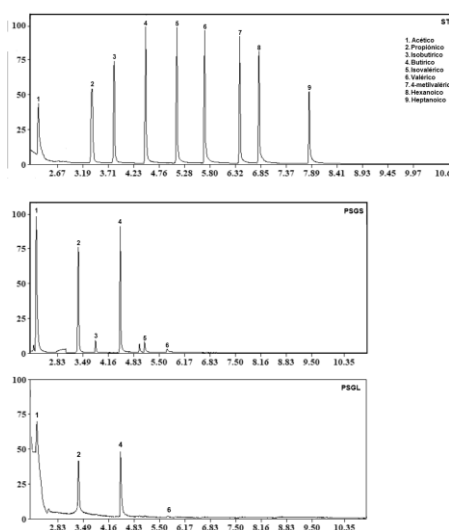
P08	GS	218	1,9	1,7	250	769	41209
P08	GL	227	1,9	1,7	250	749	27091
P08	GL	269	1,9	1,8	250	671	48473
P08	GL	171	1,9	1,9	250	1245	21306
P09	CONTROL 0H	80	1,9	2,7	250	1015	27660
P09	CONTROL 0H	62	2,1	2,8	250	1246	16178
P09	CONTROL 0H	29	1,7	1,9	250	676	8896
P09	CONTROL 8H	88	2,0	2,6	250	838	47173
P09	CONTROL 8H	98	2,0	2,3	250	949	46747
P09	CONTROL 8H	91	2,0	2,8	250	663	30231
P09	GS	173	2,0	2,2	250	825	45513
P09	GS	151	2,0	2,3	250	1245	33967
P09	GS	160	2,0	2,1	250	801	27129
P09	GL	152	1,8	1,9	250	748	44009
P09	GL	291	1,8	1,6	250	819	57459
P09	GL	249	1,8	1,7	250	889	42099
P10	CONTROL 0H	12	1,5	1,7	250	200	3874
P10	CONTROL 0H	12	1,5	1,7	250	182	2820
P10	CONTROL 0H	26	1,7	1,2	250	167	2288
P10	CONTROL 8H	15	1,6	2,3	250	280	17916
P10	CONTROL 8H	21	1,8	1,7	250	203	14303
P10	GS	46	2,0	2,0	250	395	37929
P10	GS	37	1,8	2,2	250	507	48097
P10	GS	42	1,9	1,9	250	366	61444
P10	GL	86	1,5	1,3	250	303	55637
P10	GL	87	1,3	1,0	250	261	27700
P11	CONTROL 0H	87	2,0	2,1	250	912	68923
P11	CONTROL 0H	73	2,0	2,3	250	888	76471
P11	CONTROL 0H	94	2,0	2,5	250	952	74154
P11	CONTROL 8H	90	1,9	2,1	250	798	38375
P11	CONTROL 8H	66	1,9	2,3	250	991	73745
P11	CONTROL 8H	86	1,9	2,4	250	1070	82941
P11	GS	91	2,0	1,9	250	781	77165
P11	GS	38	1,9	2,6	250	745	67895
P11	GS	40	1,8	2,6	250	861	79105
P11	GL	104	1,9	1,9	250	795	89642
P11	GL	122	1,9	1,8	250	631	70352
P11	GL	91	1,9	2,0	250	746	73539
P12	CONTROL 0H	22	1,8	4,9	250	728	79427
P12	CONTROL 0H	24	1,8	3,0	250	671	66754
P12	CONTROL 0H	15	1,7	3,2	250	709	64292
P12	CONTROL 8H	44	2,0	3,3	250	871	74315
P12	CONTROL 8H	35	2,0	4,9	250	864	76473

P12	CONTROL 8H	3	1,0	1,3	250	848	74696
P12	GS	2	1,5	1,3	250	669	61880
P12	GS	5	2,2	1,5	250	741	67118
P12	GS	11	1,8	0,8	250	263	61600
P12	GL	64	1,9	2,5	250	629	79732
P12	GL	48	1,8	2,7	250	522	53069
P12	GL	57	1,8	2,3	250	546	44615

Anexo 4, Tabla 3. Abundancias relativas de los géneros determinantes de los enterotipos en los individuos analizados según Arumugam *et al.* (2011) y Yang *et al.* (2019).

	AR % <i>Bacteroides</i>	AR % <i>Prevotella</i>	AR % <i>Ruminococcus</i>	Enterotipo asignado
P02	9,8	2,9	15,5	3
P04	4,8	0,0	10,5	3
P05	10,1	3,0	12,4	3
P06	2,8	0,0	6,4	3
P07	1,0	26,4	5,4	2
P08	13,0	0,0	12,4	3
P09	0,1	23,6	6,6	2
P10	1,1	15,3	5,2	3
P11	11,2	0,0	6,1	3
P12	7,6	0,0	8,0	3

Anexo 4, Figura 2. Cromatogramas correspondientes a la separación de SCFA mediante cromatografía gaseosa. STD: estándar de ácidos derivatizados. PSGS: muestra correspondiente a un extracto de SCFA post fermentación con los polisacáridos de *G. sessile* E47. PSGL: muestra correspondiente a un extracto de SCFA post fermentación con los polisacáridos de *G. lucidum*.



Anexo 4, Figura 3. Índices A y B, calculados para cada individuo en relación a los niveles de SCFA antes y después de la fermentación. Medias con una letra común, para cada índice, no difieren significativamente ($p>0.2$). GS: fermentación con polisacáridos de *G. sessile* E47; GL: fermentación con polisacáridos de *G. lucidum*.



Anexo 4, Tabla 4. Enzimas relacionadas con la síntesis y/o el metabolismo de los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) y con el metabolismo de los carbohidratos (CARB) cuyas contribuciones dentro del microbioma, predichas por PICRUSt, mostraron incrementos en la fermentación con los PS de *G. sessile* E47.

Código EC	Enzima	Ruta metabólica	Link
1.1.1.2	alcohol deshidrogenasa (NADP+)	SCFA	https://www.kegg.jp/pathway/ec00010+1.1.1.2
1.1.1.30	3-hidroxi butirato deshidrogenasa	SCFA	https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00650+1.1.1.30
2.1.3.1	metilmalonil-CoA carboxitransferasa	SCFA	https://www.kegg.jp/pathway/ec00640+2.1.3.1
2.8.3.16	formil-CoA transferasa	SCFA	https://www.kegg.jp/pathway/spun00660
2.7.2.15	propionato quinasa	SCFA	https://www.kegg.jp/pathway/ec00640+2.7.2.15
2.8.3.12	glutaconato-CoA transferasa	SCFA	https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00650+2.8.3.12
6.4.1.3	propionil-CoA carboxilasa	SCFA	https://www.kegg.jp/pathway/ec00640+6.4.1.3
3.1.2.20	acil-CoA hidrolasa/tioesterasa	SCFA	https://www.brenda-enzymes.org/pathway_index.php?pathway=acetate%20fermentation&ecno=3.1.2.20
2.7.2.1	acetato quinasa	SCFA	https://www.kegg.jp/pathway/ec00640+2.7.2.1
2.3.1.54	formato C- acetiltransferasa	SCFA	https://www.kegg.jp/pathway/ec00650+2.3.1.54
3.5.3.8	formimidoilglutamasa	SCFA	https://www.kegg.jp/pathway/ec00340+3.5.3.8
2.7.1.113	desoxiguanosina quinasa	CARB	https://www.kegg.jp/pathway/ec00230+2.7.1.113
2.7.1.74	desoxicitidina quinasa	CARB	https://www.kegg.jp/pathway/ec00240+2.7.1.74
2.7.1.76	2'-desoxiadenosina quinasa	CARB	https://www.kegg.jp/pathway/ec00230+2.7.1.76
2.4.1.8	maltosa fosforilasa	CARB	https://www.kegg.jp/pathway/ec00500+2.4.1.8
5.1.3.25	dTDP-L-ramnosa 4- epimerasa	CARB	https://www.kegg.jp/pathway/ec00523+5.1.3.25
3.1.1.1	Carboxilesterasa	CARB	https://metacyc.org/gene?orgid=META&id=G7853-MONOMER

Anexo 4, Tabla 5. Contribuciones microbianas a enzimas involucradas en la síntesis y/o metabolismo de los SCFA, y sus incrementos respecto a los controles en los individuos en las fermentaciones con los polisacáridos de *G. sessile* E47 (PSGS) y *G. lucidum* (PSGL).

		Enzimas										
Donor		2.7.2.1	2.7.2.15	2.3.1.54	2.8.3.12	2.1.3.1	6.4.1.3	3.1.2.20	1.1.1.2	1.1.1.30	2.8.3.16	3.5.3.8
P02	PSGS	-	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PSGL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

P05	PSGS	-	-	-	-	4,8	-	-	-	-	-	-
	PSGL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P06	PSGS	-	-	-	-	-	-	-	-	67,4	-	-
	PSGL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P07	PSGS	-	-	-	-	-	-	-	3,3	-	-	-
	PSGL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P07	PSGS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,3	-
	PSGL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P09	PSGS	-	-	-	4,6	-	3,2	38,7	-	-	-	-
	PSGL	-	-	-	3,6	-	-	22,7	-	-	-	-
P10	PSGS	3,4	-	3,2	-	-	8,7	-	-	-	-	-
	PSGL	-	-	-	-	-	8,3	-	-	-	-	-
P12	PSGS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,7
	PSGL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Anexo 4, Tabla 6. Contribuciones microbianas a enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, y sus incrementos respecto a los controles en los individuos en las fermentaciones con los polisacáridos de *G. sessile* E47 (PSGS) y *G. lucidum* (PSGL).

Donor		Enzimas					
		2.7.1.113	2.7.1.74	2.7.1.76	2.4.1.8	5.1.3.25	3.1.1.1
P04	PSGS	-	-	-	3,2	3,7	-
	PSGL	-	-	-	-	-	-
P05	PSGS	-	-	-	-	-	8,1
	PSGL	-	-	-	-	-	-
P11	PSGS	4,3	4,3	4,3	-	-	-
	PSGL	-	-	-	-	-	-

Anexo 4, Tabla 7. Incrementos promedio de SCFA acetato (Acet.), propionato (Prop.), butirato (But.), isobutirato (Isobut.), isovalerato (Isoval.) y valerato (Val.), por individuo, observados luego de la fermentación con los polisacáridos de *G. sessile* E47 (PSGS) y de *G. lucidum* (PSGL). Los valores se presentan en orden decreciente en cada columna.

PSGS											
Donor	Acet.	Donor	Prop.	Donor	But.	Donor	Isobut.	Donor	Isoval.	Donor	Val.
P10	4,61	P09	6,22	P12	3,97	P04	10,31	P04	5,49	P02	5,45
P09	3,85	P12	4,01	P02	3,62	P02	9,22	P02	3,96	P09	2,16
P12	3,28	P02	2,60	P05	3,10	P12	2,11	P09	1,76	P04	2,13
P08	3,19	P07	2,24	P09	2,64	P10	1,01	P12	1,45	P07	1,46
P02	2,38	P05	1,78	P11	1,65	P11	0,87	P05	1,34	P12	1,36
P11	2,32	P04	1,70	P04	1,45	P05	0,62	P06	1,15	P11	1,29

P04	2,26	P06	1,50	P08	0,99	P07	0,58	P08	1,10	P05	0,99
P05	2,05	P11	1,41	P06	1,09	P09	0,45	P10	1,01	P10	0,96
P07	1,91	P10	1,29	P10	0,99	P08	0,33	P07	0,89	P08	0,60
P06	1,50	P08	1,57	P07	0,90	P06	0,06	P11	0,78	P06	0,16

PSGL

Donor	Acet.	Donor	Prop.	Donor	But.	Donor	Isobut.	Donor	Isoval.	Donor	Val.
P04	1,19	P02	2,88	P02	4,59	P04	5,34	P04	1,83	P04	2,62
P10	1,05	P04	1,77	P05	1,92	P02	3,00	P09	0,35	P02	2,35
P08	0,88	P05	1,05	P04	1,70	P10	0,04	P02	1,83	P09	0,50
P02	0,78	P09	0,95	P06	0,61	P05	0,21	P05	0,95	P10	0,67
P05	0,51	P06	0,63	P08	0,57	P07	0,27	P10	1,61	P05	0,60
P06	0,46	P12	0,58	P09	0,60	P12	0,20	P06	0,42	P12	0,78
P09	0,43	P07	0,31	P07	0,50	P09	0,05	P07	0,37	P07	0,50
P07	0,30	P08	0,27	P10	0,49	P11	0,20	P12	0,21	P11	0,52
P12	0,30	P10	0,25	P12	0,46	P06	0,15	P08	1,61	P08	1,10
P11	0,15	P11	0,13	P11	0,23	P08	0,12	P11	0,21	P06	0,41

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA EN EL MARCO DE ESTA TESIS

Artículos publicados en revistas internacionales

- Gurovic, M.S.V., **Viceconte, F.R.**, Bidegain, M.A., Dietrich, J., 2023. Regulation of lignocellulose degradation in microorganisms. *J. Appl. Microbiol.* 134, 1–12. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxac002>
- Viceconte, F.R.**, Diaz, M.L., Soresi, D.S., Lencinas, I.B., Carrera, A., Prat, M.I., Gurovic, M.S.V., 2021. *Ganoderma sessile* is a fast polysaccharide producer among *Ganoderma* species. *Mycologia* 113, 513–524. <https://doi.org/10.1080/00275514.2020.1870255>
- Vela Gurovic, M.S., **Viceconte, F.R.**, Pereyra, M.T., Bidegain, M.A., Cubitto, M.A., 2018. DNA damaging potential of *Ganoderma lucidum* extracts. *J. Ethnopharmacol.* 217, 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.02.005>

Trabajos presentados en eventos de CyT

- Viceconte, F.R.**, Lagkouvardos, I., Neuhaus, K., Vela Gurovic, M.S., 2022. Effects on human fecal microbiome after *in vitro* fermentation of fungal polysaccharides from closely related *Ganoderma* spp. 14th Seeon Conference, Microbiota, Probiotics and Host. Munich, Alemania.
- Viceconte, F.R.**, Vela Gurovic, M.S., 2021. Aislamiento y purificación de polisacáridos del cultivo líquido de *Ganoderma sessile*. 6° Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos SAPROBIO 2021.
- Viceconte, F.R.**, Cuestas, J.M., Vela Gurovic, M.S., 2020. Valoración nutricional de *Ganoderma sessile*. Simposio virtual iberoamericano COIFFA 2020.
- Viceconte, F.R.**, Diaz, M.L., Soresi, D.S., Carrera, A., M.S.V., 2020. Identificación taxonómica de tres cepas de *Ganoderma* spp. mediante análisis *multilocus*. XLVIII Congreso Argentino de Genética.
- Viceconte, F.R.**, Lencinas, I.B.; Prat, M.I., Vela Gurovic, M.S., 2019. Caracterización de hongos comestibles y medicinales empleando técnicas inmunoquímicas. I Encuentro Iberoamericano de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y XIV Jornadas Día del Farmacéutico 2019. Revista Naturalia Patagónica 14 (ISSN/ISBN 2591-6653). Comodoro Rivadavia, Argentina.
- Viceconte, F.R.**, Costantino, A.R., Pereyra, M.T., Vela Gurovic, M.S., 2019. Determinación de residuos de pesticidas provenientes del sustrato en hongos de cultivo. 10° Congreso Argentino de Química Analítica, Santa Rosa, La Pampa, Argentina.
- Viceconte F.R.**, Vela Gurovic, M.S., Brugnoli, L.I., 2018. Efectos de moléculas *quorum sensing* en *biofilms* mono y multiespecie de levaduras aisladas de la industria juguera. IV CAMAYA I MigroGen, Mar del Plata, Argentina.
- Viceconte, F.R.**, Vela Gurovic, M.S., Cubitto, M.A., 2018. Rendimiento en polisacáridos de cepas de *Ganoderma* spp. en FES y cultivo líquido". I Convención Internacional para la Producción de Hongos Comestibles y Medicinales, Buenos Aires, Argentina.
- Gutiérrez, A., Soresi, D.S., Carrera, A., **Viceconte, F.R.**, Díaz, M.L., 2018. Caracterización molecular y taxonómica de los géneros *Ganoderma* y *Pleurotus*. I Convención Internacional para la Producción de Hongos Comestibles y Medicinales, Buenos Aires, Argentina.

Depósitos en bases de datos moleculares

Nucleotide [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – . Accession No. MT196416.1, *Ganoderma lingzhi* strain CS internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; [2021 Mar 25]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT196416>

Nucleotide [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – . Accession No. MT196417.1, *Ganoderma oregonense* strain GO internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; [2021 Mar 25]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT196417>

Nucleotide [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – . Accession No. MT196418.1, *Ganoderma sessile* strain E47 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; [2021 Mar 25]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT196418>

Nucleotide [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – . Accession No. MW281494.1, *Ganoderma lingzhi* isolate CS translation elongation factor 1-alpha (tef1a) gene, partial cds; [2021 Mar 25]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW281494>

Nucleotide [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – . Accession No. MW281496.1, *Ganoderma sessile* isolate GO translation elongation factor 1-alpha (tef1a) gene, partial cds; [2021 Mar 25]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW281496>

FINANCIAMIENTO

Este trabajo contó con el apoyo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina (P-UE 2017), la Universidad Nacional del Sur (UNS), Argentina (PGI 24/B294), la Secretaría de Políticas Universitarias, Argentina (VT38-UNS-10201) y del Programa de Cooperación Bilateral CONICET - BAYLAT Convocatoria 2020, Ejecución 2021-2022.