



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**CULTIVO *in vitro* DE HONGOS COMESTIBLES
SILVESTRES DE ALTA MONTAÑA Y SU
PRODUCCIÓN DE METABOLITOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

PRESENTA:

CÉSAR DÍAZ TALAMANTES

COMITÉ DE TUTORES

**Dra. CRISTINA BURROLA AGUILAR
Dra. MARÍA ELENA ESTRADA ZUÑIGA
Dra. CARMEN ZEPEDA GÓMEZ**

Toluca, Estado de México, diciembre de 2021

RESUMEN

Los hongos comestibles silvestres (HCS) de alta montaña son un recurso de gran importancia biotecnológica debido a la presencia de sustancias biológicamente activas dentro de su estructura, a las cuales se les atribuyen propiedades medicinales y nutraceuticas. El objetivo de este trabajo fue evaluar el cultivo *in vitro*, y la producción de β -glucano de algunas especies de HCS del Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca (APFFNT). Para ello se utilizaron cepas de HCS (IE987 *Lycoperdon perlatum* e IE988 *Gymnopus dryophilus*) aisladas de APFFNT, también se utilizaron esporomas de HCS (*L. perlatum*, *Lactarius indigo* y *Boletus edulis*) recolectados en el APFFNT, los cuales se identificaron y caracterizaron. Se evaluó el crecimiento micelial de las cepas en cultivo *in vitro* mediante fermentación en estado sólido (FES) y líquido (FEL). Posteriormente, se extrajeron y purificaron β -glucanos de la biomasa del micelio *in vitro* y esporomas silvestres. Los β -glucanos se caracterizaron mediante espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier. Finalmente se evaluó la actividad antiproliferativa de los β -glucanos sobre dos líneas celulares de leucemia (Jurkat y K562) mediante la inhibición de la proliferación celular y el análisis de ciclo celular. Asimismo, se evaluó la actividad antibacteriana mediante microdilución sobre cuatro bacterias patógenas comunes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans*).

Para ambas cepas en tanto en FES como en FEL se obtuvo una producción de biomasa mayor en un medio no convencional elaborado a base de Harina de Maíz (AM). También se obtuvieron dos fracciones de β -glucanos (solubles en solución acuosa y alcalina), siendo mayor la fracción soluble en solución alcalina, cabe mencionar que no hubo diferencias significativas entre los β -glucanos presentes en biomasa *in vitro* y esporomas silvestres. Por otro lado, los β -glucanos obtenidos mostraron una baja actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares cancerígenas, no obstante, también inhibieron la proliferación celular de las líneas de fibroblastos. Así mismo, los β -glucanos obtenidos mostraron una fuerte actividad antibacteriana con valores de hasta el 97,6% de inhibición sobre las cepas bacterianas utilizadas. Pudiendo concluir que los β -glucanos presentes en algunas especies de HCS presentan gran potencial como agentes bioactivos.

ABSTRACT

Wild edible mushrooms (WEM) from high mountains are a resource of great biotechnological importance due to the presence of biologically active substances within their structure, to which medicinal and nutraceutical properties are attributed. The aim of this research was to evaluate the *in vitro* culture and the production of β -glucan of some WEM species from the Nevado de Toluca Flora and Fauna Protection Area (APFFNT). For this, WEM strains (IE987 *Lycoperdon perlatum* and IE988 *Gymnopus dryophilus*) isolated from APFFNT were used, WEM sporomas (*L. perlatum*, *Lactarius indigo* and *Boletus edulis*) collected in the APFFNT were also used, which were identified and characterized. The mycelial growth of the strains *in vitro* culture was evaluated by solid state (FES) and liquid (FEL) fermentation. Subsequently, β -glucans were extracted and purified from the biomass of the mycelium *in vitro* and wild sporomes. The β -glucans were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy. Finally, the antiproliferative activity of β -glucans was evaluated on two leukemia cell lines (Jurkat and K562) by inhibiting cell proliferation and cell cycle analysis. Likewise, the antibacterial activity was evaluated by microdilution on four common pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans*).

For both strains, in both FES and FEL, a higher biomass production was obtained in an unconventional medium made from Corn Flour (CF). Two fractions of β -glucans (soluble in aqueous and alkaline solution) were also obtained, the fraction soluble in alkaline solution being higher, it is worth mentioning that there were no significant differences between the β -glucans present *in vitro* biomass and wild sporomas. On the other hand, the β -glucans obtained showed a low antiproliferative activity on cancer cell lines, however, they also inhibited the cell proliferation of fibroblast lines. Likewise, the β -glucans obtained showed strong antibacterial activity with values around to 97.6% inhibition on the bacterial strains used. Being able to conclude that the β -glucans present in some species of WEM present great potential as bioactive agents.

ÍNDICE

Índice

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
AGRADECIMIENTOS	5
INTRODUCCIÓN	11
I.- ANTECEDENTES.....	13
Importancia de los hongos comestibles silvestres.....	13
<i>La importancia de los hongos en los bosques de alta montaña</i>	<i>13</i>
<i>Los hongos comestibles silvestres como patrimonio cultural de los pueblos.....</i>	<i>13</i>
<i>La importancia de la diversidad de hongos comestibles silvestres y su potencial biotecnológico</i>	<i>14</i>
<i>Importancia de la domesticación de hongos comestibles silvestres.....</i>	<i>15</i>
Cultivo <i>in vitro</i> de hongos comestibles	16
<i>Biotecnología y el cultivo in vitro de hongos comestibles.....</i>	<i>16</i>
<i>Parámetros y factores para el cultivo in vitro de biomasa</i>	<i>17</i>
Producción de metabolitos de hongos comestibles.....	18
<i>Metabolitos presentes en los hongos comestibles</i>	<i>18</i>
<i>β-glucanos bioactivos</i>	<i>19</i>
<i>Técnicas para la extracción, purificación e identificación de los β-glucanos</i>	<i>20</i>
Actividad biológica de los β-glucanos.....	21
II.- JUSTIFICACIÓN	23
III.- OBJETIVOS	24
Objetivo general.....	24
Objetivos específicos	24

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS	25
Área de estudio.....	26
Material biológico	27
<i>Cepas de hongos comestibles silvestres</i>	<i>27</i>
<i>Reaislamiento de las cepas.....</i>	<i>27</i>
<i>Caracterización microscópica y macroscópica de las cepas</i>	<i>27</i>
<i>Esporomas</i>	<i>27</i>
<i>Caracterización microscópica y macroscópica de los esporomas.....</i>	<i>28</i>
Cultivo <i>in vitro</i> de biomasa.....	28
<i>Cultivo in vitro de micelio por FES.....</i>	<i>28</i>
<i>Cultivo in vitro de micelio por FEL.....</i>	<i>29</i>
Extracción y purificación de β-glucanos.....	30
<i>Macerado de biomasa</i>	<i>30</i>
<i>Extracción acuosa</i>	<i>30</i>
<i>Extracción alcalina</i>	<i>30</i>
<i>Precipitación con etanol de los extractos y su congelación-descongelación.....</i>	<i>31</i>
Identificación de los β-glucanos.....	31
Bioactividad de los β-glucanos.....	31
<i>Actividad anti bacterial</i>	<i>31</i>
<i>Actividad anti proliferativa</i>	<i>32</i>
<i>Inhibición de la proliferación celular</i>	<i>33</i>
<i>Ensayo de ciclo celular</i>	<i>34</i>
V.- RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	36
Identificación y caracterización del material biológico	36
<i>Lycoperdon perlatum.....</i>	<i>36</i>
<i>Gymnopus dryophilus</i>	<i>37</i>

<i>Boletus edulis</i>	39
<i>Lactarius índigo</i>	40
Cultivo <i>in vitro</i> de biomasa	41
<i>Cultivo de micelio en FES</i>	41
<i>Cultivo de micelio en FEL</i>	43
<i>Esporomas silvestres</i>	45
Extracción y purificación de β-glucanos	46
Identificación de los β-glucanos	48
Bioactividad de los β-glucanos	51
<i>Actividad antibacterial</i>	51
<i>Inhibición de la proliferación celular</i>	55
<i>Análisis del ciclo celular</i>	58
VI.- CONCLUSIONES	64
VII.- ARTÍCULOS ENVIADOS	66
VIII.- REFERENCIAS	113

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.- Estructura de β-glucanos(Rathore et al., 2017).....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 2.- Mapa del APFFNT(CONANP, 2016)</i>	<i>26</i>
<i>Figura 3.- Esporoma de L. perlatum.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 4.- Espororas de L. perlatum en rojo Congo a 100x.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 5 Esporoma de G. dryophilus.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 6.- A) Basidios, B) Espororas de G. dryophilus en rojo Congo a 100x.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 7.- Esporoma de B. edulis</i>	<i>39</i>
<i>Figura 8 .- A) Basidios, B) Espororas de B. edulis en rojo Congo a 100x.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 9.- Esporoma de L. índigo.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 10.- A) Basidios, B) Espororas de L. índigo en rojo Congo a 100x.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 11.- A) Micelio; B) Hifas de la cepa IE988 de G. dryophilus en medio PDA.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 12.- A) Micelio; B) Hifas de la cepa MGd de G. dryophilus en medio Agar Maíz..</i>	<i>42</i>
<i>Figura 13.- TCMFES de IE988 en AM y PDA.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 14.- Pellets de IE988 en A) AM y B) PDA; C) Pellets de IE987 en AM</i>	<i>44</i>
<i>Figura 15.- β –glucanos presentes en el micelio y esporomas de los hongos comestibles silvestres</i>	<i>46</i>
<i>Figura 16.- β –glucanos presentes en la FAq y FAk.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 17.- Espectro FTIR de β –glucanos de A) micelio de IE987 en AM, B) esporomas de L. perlatum, C) micelio de IE988 en AM, D) micelio de IE988 en PDA, E) esporomas de L. índigo, F) esporomas de B. edulis.</i>	<i>50</i>
<i>Figura 18. - Inhibición bacteriana por: A) Fracción acuosa de Boletus edulis (FAqEBe); B) Fracción alcalina de B. edulis (FAkEBe); C) Fracción acuosa de Lactarius indigo (FAqELi); y D) Fracción alcalina de L. indigo (FAkELi).....</i>	<i>54</i>

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1.- Producción de biomasa en micelio en FEL y esporomas</i>	<i>45</i>
<i>Tabla 2.- Producción de β-glucanos en micelio en FEL y esporomas</i>	<i>47</i>
<i>Tabla 3.- Inhibición bacteriana de las fracciones de Boletus edulis y Lactarius indigo</i>	<i>53</i>
<i>Tabla 4.- Inhibición de la proliferación celular de los β-glucanos en las líneas celulares</i>	<i>56</i>
<i>Tabla 5.- Análisis de ciclo celular de los controles</i>	<i>59</i>
<i>Tabla 6.- Análisis de ciclo celular de las líneas celulares K562 y Jurkat</i>	<i>60</i>

INTRODUCCIÓN

La importancia de los hongos comestibles silvestres de alta montaña reside en diferentes ámbitos. Tienen una gran importancia en los sistemas ecológicos debido a que son un recurso forestal no maderable indispensable en la estructura y funcionamiento de los bosques al facilitar y recircular los nutrientes y brindar humedad al suelo (Martínez de Aragón *et al.*, 2007). Los hongos comestibles también forman parte del patrimonio cultural de las comunidades rurales, de acuerdo a Benites y Badillo (2013) son parte importante del acervo cultural al presentar un alto sentido familiar y comunitario para su recolección, los hongos comestibles también son valorados en las comunidades debido a las propiedades medicinales, de acuerdo a Guzmán (2008) en México existen alrededor de 70 especies reportadas para tratar alrededor de 40 enfermedades y padecimientos. Por lo que este conocimiento se ha transmitido de generación en generación y funciona como sustento para la gestión de su conservación y aprovechamiento (Burrola- Aguilar *et al.*, 2012).

Asimismo, los hongos comestibles son un recurso económico importante en las comunidades rurales que cuentan con él, ya que los hongos comestibles silvestres recolectados son utilizados para satisfacer las necesidades alimentarias y vendidos en los mercados locales para obtener ingresos extra (Boa, 2005). Por otra parte, los hongos comestibles representan una nueva tendencia alimenticia (Martínez-Carrera *et al.*, 2007) debido a que son considerados un alimento sano e inocuo (Stamets, 2000). Aunado a esto, tienen un alto valor nutrimental y energético (Jiménez *et al.*, 2013), y brindan propiedades benéficas para la salud humana, considerándose como alimentos funcionales (Reis *et al.*, 2017). De acuerdo a Wasser (2002) estas propiedades benéficas están relacionadas a los compuestos presentes en su estructura, por lo que los hongos comestibles son una fuente aún si explorar de metabolitos de interés medicinal.

Los metabolitos más abundantes presentes en los hongos comestibles son los β -glucanos, debido a que aproximadamente la mitad de la biomasa en peso seco de la pared celular está constituida de glucanos (Arango y Nieto, 2013). Los β -glucanos también son considerados metabolitos con gran potencial biotecnológico por sus propiedades farmacológicas y efectos

terapéuticos (Chen *et al.*, 2012) como anticancerígenos, inmunomoduladores, antioxidantes, antibacterianos, entre otras (Khan *et al.*, 2018). Los β -glucanos son polímeros no celulósicos constituidos con unidades de glucosa (homopolisacáridos) unidas por enlaces glicosídicos de tipo β (1 \rightarrow 3) y ramificaciones laterales unidas por enlaces β (1 \rightarrow 6). Cabe resaltar que este enlace glicosídico, aunado a sus propiedades fisicoquímicas como grado de ramificación, solubilidad, masa molecular, conformación helicoidal entre otras, determinan su bioactividad (Pizarro *et al.*, 2014), sin embargo, son pocas las especies de hongos comestibles silvestres en las que ha sido estudiada la producción y bioactividad de β -glucanos.

El Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca (APFFNT), Estado de México, es de gran importancia ecológica en México debido a que alberga alrededor de 77 especies comestibles en sus bosques (Franco-Maass *et al.*, 2012) de las 371 especies comestibles reportadas en México por Garibay- Orijel y Ruan Soto (2014). De las especies presentes en el APFFNT algunas consideradas con alto potencial de cultivo como *Gymnopus dryophilus* (clavitos de llano) y *Lycoperdon perlatum* (terneritas) (Díaz- Talamantes *et al.*, 2017).

En los últimos años se han realizado diversas investigaciones enfocadas al cultivo *in vitro* de algunas especies de hongos comestibles silvestres con importancia cultural, principalmente en la importancia de la selección de cepas y optimización de las condiciones de cultivo *in vitro* Song *et al.* (1998), al igual que la utilización de fuentes de carbono no convencionales para aumentar la producción de biomasa Chegwin-Angarita y Nieto- Ramírez (2014). También existen varios trabajos relacionados a la producción de algunos metabolitos con propiedades medicinales, abarcando técnicas de extracción, purificación, identificación y caracterización de estructuras Dong *et al.* (2012), y la relación entre la producción de biomasa y glucanos Rathore *et al.* (2017).

En relación a la biactividad de los β -glucanos de hongos comestibles, se cuentan con trabajos enfocados a la actividad antiproliferativa sobre líneas celulares cancerígenas (Lemieszek *et al.*, 2013), actividad antioxidante (Novakovic *et al.*, 2015) y actividad antibacteriana (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2007). No obstante, aun existe mucho que explorar en relación al cultivo *in vitro* y la producción de metabolitos bioactivos de hongos comestibles silvestres. Es por ello que el objetivo de este trabajo es evaluar los parámetros de cultivo *in vitro* y la producción de β -glucanos bioactivos de algunas especies de hongos comestibles silvestres del APFFNT.

I.- ANTECEDENTES

Importancia de los hongos comestibles silvestres

La importancia de los hongos en los bosques de alta montaña

Los hongos junto con otros productos forestales no maderables son una parte fundamental del funcionamiento de los bosques (Martínez de Aragón *et al.*, 2007). Los hongos en específico, ayudan al funcionamiento de los bosques mediante interacciones que desarrollan directa o indirectamente con otros organismos, de acuerdo a Garibay-Orijel *et al.* (2009) los hongos cumplen con funciones esenciales al proveer nutrientes y agua a los árboles cuando éstos son micorrízicos, y al descomponer la materia orgánica recirculando los nutrientes cuando éstos son saprobios.

Los bosques de alta montaña como el APFFNT, México, albergan la mayor riqueza de especies fúngicas con importancia cultural (Franco-Maass *et al.*, 2012). No obstante, Jasso Arriaga *et al.* (2016) menciona que estos ecosistemas se encuentran bajo altos niveles de presión por factores antrópicos como: cosecha, tala de árboles, actividad extractiva de recursos forestales no maderables, disminución de la materia orgánica, pastoreo, presencia de turistas y falta de orientación técnica y científica sobre el uso de los recursos naturales. En este sentido, es imprescindible hacer hincapié en la importancia de la conservación de los bosques de alta montaña y de los hongos, debido a que existe la probabilidad de sobreexplotación o extinción de este recurso por la presión generada por la actividad antropogénica.

Los hongos comestibles silvestres como patrimonio cultural de los pueblos

A través de los años se ha generado un conocimiento tradicional de los hongos comestibles silvestres dentro de las comunidades rurales debido a su importancia cultural. Este conocimiento generado y acumulado a lo largo del tiempo, se ha transmitido de generación en generación, y está conformado por el saber sobre la clasificación, ambiente local, el manejo de los recursos naturales, el conocimiento sobre la biología de las especies y los procesos ecológicos locales (Burrola- Aguilar *et al.*, 2012). De manera que este conocimiento

puede ser una herramienta fundamental en el desarrollo, conservación y aprovechamiento sustentable de la diversidad biológica y cultural (Franco-Maass *et al.*, 2012).

La recolección de hongos comestibles silvestres es parte de este patrimonio cultural, de acuerdo a Benites y Badillo (2013) es una actividad que es parte importante del acervo cultural de la población rural y tiene un alto sentido familiar y comunitario. Los principales usos que tradicionalmente se les da a los hongos comestibles silvestres es para satisfacer diferentes necesidades como la autosuficiencia alimentaria y la obtención de ingresos extras mediante su comercialización (Alvarado y Castillo, 2015). Del mismo modo, en nuestro país los hongos comestibles silvestres han sido utilizados desde épocas prehispánicas para curar enfermedades y para rituales ceremoniales y espirituales (Guzmán, 2008b). Aunado a esto, Guzmán (2008a) menciona que en México se han utilizado 73 especies de hongos en prácticas de medicina tradicional para el tratamiento de 40 tipos de enfermedades en humanos.

La importancia de la diversidad de hongos comestibles silvestres y su potencial biotecnológico

A nivel mundial existen alrededor de 10,000 especies de hongos que pueden producir cuerpos fructíferos, de los cuales aproximadamente sólo 2,000 son consideradas comestibles (Alvarado y Castillo, 2015). El APFFNT es una región representativa de los ecosistemas de bosques de alta montaña en el centro de México, en ella se han reportado 77 especies (Franco-Maass *et al.*, 2012) de las 371 especies de hongos comestibles silvestres en México reportadas por Garibay-Orijel y Ruan-Soto (2014). De acuerdo a Wasser (2002) cada una de estas especies cuenta con propiedades específicas, por lo que los hongos comestibles son una fuente potencial de nutraceuticos aún sin explotar. Además, podemos hacer uso del conocimiento tradicional para identificar los hongos silvestres más valorados culturalmente por sus propiedades medicinales (Burrola- Aguilar *et al.*, 2012) y con mayor potencial biotecnológico.

Por otra parte, los hongos comestibles son considerados alimentos funcionales inherentes (alimentos de la dieta diaria de origen natural que más allá de su valor nutritivo, ejercen efectos positivos sobre la salud humana, mejorando el bienestar y la calidad de vida, y reduciendo el riesgo de padecer enfermedades) recomendados como un componente valioso de la dieta diaria (Reis *et al.*, 2017). Debido a que contienen un alto valor nutricional, poseen proteínas que incluyen todos los aminoácidos esenciales en sus estructuras, presentan una gran cantidad de carbohidratos, vitaminas, fibra y minerales, así mismo, posee un bajo contenido de grasas insaturadas (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006) y dichos nutrientes están relacionados con los compuestos biológicamente activos presentes en la estructura de los hongos, que exhiben efectos terapéuticos favorables a la salud (Muszyńska *et al.*, 2018). Con base a la importancia de los hongos comestibles silvestres mencionada anteriormente, resulta imprescindible optar por estrategias de aprovechamiento, conservación y valorización (Díaz-Talamantes *et al.*, 2017).

Importancia de la domesticación de hongos comestibles silvestres

La necesidad de domesticación de los hongos comestibles silvestres se encuentra enmarcada en tres aspectos primordiales: 1) La creciente demanda de este recurso, debido a que en los últimos años aumento el interés de los consumidores por adquirir productos libres de fertilizantes, conservadores y otros productos químicos, además de una alta proporción de proteínas y otros nutrientes, representando una nueva tendencia alimenticia (Martínez-Carrera *et al.*, 2007). Por otro lado, la confirmación científica de las propiedades funcionales y medicinales de un gran número de hongos silvestres comestibles, así como el descubrimiento de compuestos bioactivos han incrementado significativamente la demanda de este recurso (Alvarado-Castillo *et al.*, 2016). 2) El desconocimiento de la recolección de hongos como una actividad formal, tiene como consecuencia que se excluya de los esquemas de apoyos, servicios y acciones estratégicas del gobierno y del sector privado. Por otra parte, la información existente es poca y variada, no existe una organización formal en las comunidades, no se cuenta con acceso a servicios profesionales, recursos para inversión y su articulación con otros sectores (Alvarado-Castillo *et al.*, 2016). 3) Los altos niveles de presión por factores antrópicos provoca un alto riesgo de agotar este recurso por la

sobreexplotación, además de afectar el hábitat natural donde se encuentran (Jasso Arriaga *et al.*, 2016).

Cultivo *in vitro* de hongos comestibles

Debido a la facilidad de adaptarse a diversos sustratos, a la capacidad de crecer en un amplio rango de temperaturas y la facilidad de controlar otras variables el cultivo de hongos comestibles se ha convertido en una práctica emergente alrededor del mundo para satisfacer esta creciente demanda (Stamets, 2000), utilizando técnicas simples y reproducibles (Thawthong *et al.*, 2014). No obstante, a pesar de la importancia social, económica, ecológica y cultural, las actividades relacionadas a la recolección y cultivo de hongos comestibles silvestres en México es todavía una de las actividades más aisladas y poco conocidas del sector primario nacional. Alvarado-Castillo *et al.* (2016) menciona que a nivel mundial se cultivan experimentalmente alrededor de 100 especies, de las cuales 50 poseen valor económico, sólo 30 son comercialmente cultivadas, y solo seis especies se cultivan a nivel industrial. No obstante, en México únicamente se cultivan 10 especies a gran escala, pertenecientes a los géneros *Pleurotus* (seta), *Agaricus* (champiñón), *Lentinula* (shiitake), *Ganoderma* (reishi), *Ustilago* (cuitlachoche) y *Flammulina* (enoki). De ahí la importancia de realizar más estudios en especies silvestres e impulsar el desarrollo de técnicas y procedimientos biotecnológicos para su cultivo.

Biotecnología y el cultivo in vitro de hongos comestibles

El cultivo *in vitro* es una herramienta que nos permite conocer los requerimientos nutricionales y ambientales de las especies de hongos comestibles para ser manipulados, identificando factores a los que las cepas son sensibles (Ciucanu y Kerek, 1984). El cultivo *in vitro* para la obtención de biomasa, esporomas y metabolitos de interés biotecnológico puede llevarse a cabo mediante diferentes técnicas, como el cultivo de esporomas y el cultivo de micelio mediante fermentación en estado sólido y líquido.

El cultivo de esporomas es inestable y demora largos periodos de tiempo (Arango y Nieto, 2013), especialmente cuando las especies no son capaces de fructificar a nivel *in vitro* (Reis *et al.*, 2017). Además, la calidad de sus productos y la eficiencia de los metabolitos de interés es difícil de controlar (Chegwin-Angarita y Nieto- Ramírez, 2014). Es por ello que el cultivo *in vitro* de micelio toma protagonismo, principalmente la fermentación es estado sólido (FES) y líquido (FEL), ya que requieren menor espacio, menor tiempo de cultivo y disminuyen las posibilidades de contaminación (Abdullah *et al.*, 2013), de igual manera, facilita la manipulación de las variables que afectan la producción y composición de biomasa y metabolitos de interés (Arango y Nieto, 2013).

Parámetros y factores para el cultivo in vitro de biomasa

Fuente de carbono y nitrógeno: El carbono y el nitrógeno afectan significativamente el crecimiento micelial y la producción de metabolitos (Ma *et al.*, 2016). Por lo que proporcionar una relación C/N adecuada puede incrementar la producción de biomasa y metabolitos (Chegwin-Angarita y Nieto- Ramírez, 2014). La relación óptima de C/N oscila entre 72/1 y 81/1 (Chegwin *et al.*, 2013), y en otros casos una relación C/N de 40:1 (Rop *et al.*, 2009), sin embargo puede variar dependiendo de la especie. Algunas investigaciones han demostrado que el uso de fuentes de carbono no convencionales, como harinas de cereales, puede aumentar la producción de biomasa y metabolitos (Chegwin-Angarita y Nieto- Ramírez, 2014). La producción de biomasa también es mayor cuando se utilizan fuentes de nitrógeno orgánico complejo, ya que brinda aminoácidos esenciales que no son sintetizados a partir de fuentes de nitrógeno inorgánico (Papaspyridi *et al.*, 2010).

Temperatura y pH: El pH óptimo para cada hongo es diferente, por ejemplo, *Agaricus bisporus* se desarrolla a pH 7.2-8.2, *Pleurotus ostreatus* a pH 7.5-8.5 y *Lentinus edodes* en pH 4-6. De igual manera la temperatura óptima varía para cada especie ya que diferentes temperaturas pueden afectar propiedades fisiológicas del hongo (Thawthong *et al.*, 2014; Rop *et al.*, 2009).

Transferencia de oxígeno: La concentración de ciertos compuestos gaseosos afecta la producción de biomasa y la síntesis de metabolitos, por lo que es necesario suministrar el oxígeno necesario para el metabolismo e incrementar la homogenización del medio para la desorción de metabolitos volátiles como el CO₂ y el etileno (Arias *et al.*, 2009).

Velocidad de agitación y agregación del micelio en FEL: permite mantener homogéneo el medio de cultivo, disminuyendo los gradientes de concentración de nutrientes y temperatura, controlando el tamaño de los pellets (Arias *et al.*, 2009), aun así, se desconocen la relación entre la producción de biomasa, el diámetro y la densidad de los pellets (Ma *et al.*, 2016).

Producción de metabolitos de hongos comestibles

Muchos beneficios para la salud otorgados por los hongos comestibles se deben a los compuestos bioactivos presentes en ellos (Sari *et al.*, 2017), siendo las especies poco comunes y poco estudiadas fuentes interesantes de compuestos bioactivos.

Se ha observado que la concentración de metabolitos asociados al crecimiento como β -glucanos (Arango y Nieto, 2013) puede ser proporcional a la producción de biomasa durante la fase exponencial (Arias *et al.*, 2009). Por lo que es indispensable optimizar estas técnicas para eficientizar el proceso para la obtención de biomasa y metabolitos de interés, contemplando que es indispensable conocer las condiciones nutricionales y ambientales de cada especie (Abdullah *et al.*, 2013).

Metabolitos presentes en los hongos comestibles

Los nutrientes básicos contenidos en los hongos comestibles y las sustancias biológicamente activas presentes en ellos muestran varios efectos favorables sobre la salud humana (Muszyńska *et al.*, 2018). Los principales grupos de metabolitos encargados de estos efectos presentes en los cuerpos fructíferos, micelio cultivado y el medio de cultivo agotado (Arango y Nieto, 2013) son polisacáridos, policetidos, lectinas, fenoles, terpenos, ácidos grasos y ergosteroles (Roncero-Ramos y Delgado-Andrade, 2017).

Los polisacáridos son las sustancias mejor conocidas y más potentes derivadas de los hongos (Wasser, 2002), son particularmente esenciales para la mejora de la inmunidad y la modulación de las respuestas defensivas de los humanos, cumplen la función de fibra dietética y contribuyen a la protección de las membranas mucosas intestinales. Los polisacáridos fúngicos se clasifican como prebióticos, estimulando el crecimiento de la flora intestinal bacteriana beneficiosa normal. Asimismo, reduce los niveles de colesterol, la absorción de grasa en el tracto digestivo y al regular la glucemia, previniendo el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, obesidad y diabetes (Muszyńska *et al.*, 2018). El polisacárido más conocido a nivel mundial es el β -glucano lentinan aislado de *L. edodes* (Shiitake) utilizado como una medicina anticancerígena (Arango y Nieto, 2013).

β -glucanos bioactivos

Los β -glucanos son polímeros no celulósicos constituidos con unidades de glucosa (homopolisacáridos) unidas por enlaces glicosídicos de tipo β (1 \rightarrow 3) y ramificaciones laterales unidas por enlaces β (1 \rightarrow 6) (figura 1), clasificados como fibra dietética soluble (Pizarro *et al.*, 2014). A pesar de la composición monosacáridica simple muestran una gran variabilidad estructural (Synytsya y Novak, 2014), debido a la diferencia en sus masas moleculares y longitud de sus cadenas, ya que se ha reportado que los glucanos de alto peso molecular presentan mayor actividad biológica que los de bajo peso molecular (Wasser, 2002); propiedades de solubilidad, que dependen del grado de polimerización, encontrándose la mayor concentración de β -glucanos como fracción insoluble en agua (Xiao *et al.*, 2004); frecuencia de ramificación donde la mayor bioactividad se encuentra entre 0.2 y 0.3 ppm (Miyazaki *et al.*, 1979); sus estructuras y conformación en solución (hélice triple o simple, o espiral aleatoria), ya que la estructura de triple hélice determina su papel en el reconocimiento biológico dentro de las células, aumentando el potencial para el tratamiento de ciertos cánceres (Zhang *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2018). Asimismo, la eficacia de las propiedades de los β -glucanos podrían estar relacionadas a dichas características fisicoquímicas (Pizarro *et al.*, 2014).

Debido a que los β -glucanos son metabolitos estructurales presentes en la pared celular de hongos (Khan *et al.*, 2018), y a que aproximadamente la mitad de la biomasa en peso seco de la pared celular está constituida de glucanos (Arango y Nieto, 2013; Rathore *et al.*, 2017), son probablemente el metabolito más abundante presente en los hongos comestibles y con mayor potencial biotecnológico por sus propiedades farmacológicas y efectos terapéuticos (Chen *et al.*, 2012).

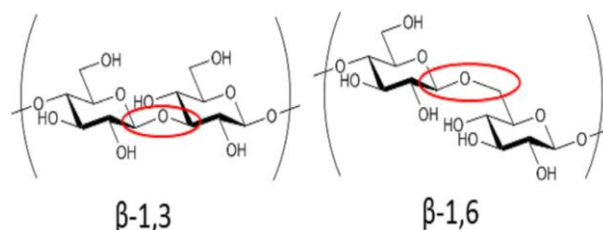


Figura 1.- Estructura de β -glucanos(Rathore *et al.*, 2017)

Técnicas para la extracción, purificación e identificación de los β -glucanos

La purificación de β -glucanos consta de una serie de pasos, comenzando por la separación de los glucanos de otros compuestos apolares y de bajo peso molecular en etanol, posteriormente se obtienen dos fracciones de β -glucanos acuerdo a su solubilidad (solubles e insolubles en agua) (Mizuno *et al.*, 1992; Ruthes *et al.*, 2015). Después se eliminan otras clases de moléculas de las fracciones solubles e insolubles en agua obtenidas previamente mediante la deshidratación de los polisacáridos con solventes (Mizuno *et al.*, 1992; Khan *et al.*, 2018) y mediante la congelación-descongelación de las fracciones mencionadas debido a las diferencias entre los grados de ramificación y estructura (Carbonero *et al.*, 2006).

El método más utilizado para identificar la presencia de β -glucanos es la espectroscopia de Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) ya que es una técnica rápida, versátil, confiable y sensible para elucidar el modo vibracional de los polisacáridos (Černá *et al.*, 2003). La FTIR permite identificar β -glucanos de acuerdo a la presencia de grupos

funcionales y a la posición y configuración del enlace glicosídico en el anillo piranoide presentes en el espectro (Synytsya y Novak, 2014).

Actividad biológica de los β -glucanos

Se han demostrado algunas propiedades biológicas de los β -glucanos como: inmunomoduladores, anticancerígenos, antitumorales, antioxidante, antibacteriales, agente en el tratamiento de hipercolesterolemia, cicatrizante y cardioprotector (Khan *et al.*, 2018). A continuación, se especifica el mecanismo de acción de los β -glucanos.

Actividad inmunomoduladora: los β -glucanos se conocen como modificadores de la respuesta biológica (Muszyńska *et al.*, 2018), debido a su capacidad para activar receptores del sistema inmune innato presentes en la membrana de leucocitos, enterocitos, monocitos, macrófagos, eosinófilos, células asesinas naturales (NK), células endoteliales, células epiteliales y fibroblastos (Chen *et al.*, 2012; Nie *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2018), mejorando la actividad fagocítica de los macrófagos y la actividad antimicrobiana de las células mononucleares y de los neutrófilos (Pizarro *et al.*, 2014).

Efecto anticancerígeno y antitumoral: los β -glucanos requieren un componente de células T intacto para desencadenar macrófagos citotóxicos, monocitos, neutrófilos, células NK, células dendríticas y mensajeros químicos que inicializan la muerte celular programada directa de las células tumorales previniendo la oncogénesis (Chen *et al.*, 2012; Nie *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2018), también disminuyen la expresión de la proteína E-selectina, que a su vez impide la adherencia de células tumorales alogénicas y singénicas (Wasser, 2002).

Actividad antioxidante: se ha reportado que previenen el daño al ADN (Nie *et al.*, 2013; Reis *et al.*, 2017; Muszyńska *et al.*, 2018), asimismo, eliminan radicales libres, inhibiendo la peroxidación de lípidos y mejorado la actividad de las enzimas antioxidantes (Khan *et al.*, 2018).

Efecto curativo de heridas: agilizan la cicatrización al reunir macrófagos en el sitio de la herida y al aumentar la disponibilidad de colágeno (Khan *et al.*, 2018), además de regular las plaquetas sanguíneas, por lo que también desempeñan un papel clave en la inflamación (Muszyńska *et al.*, 2018).

Tratamiento de hipercolesterolemia: también presentan efectos antilipémicos, que reducen los niveles de colesterol total, lipoproteínas de baja densidad, la absorción de grasa en el tracto digestivo y regulan la glucemia (Muszyńska *et al.*, 2018), también, al ser considerados fibra soluble (Pizarro *et al.*, 2014), producen ácidos grasos de cadena corta, aumentando la excreción de ácidos biliares y la exclusión de grasa fecal, por lo que previene el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, obesidad y diabetes (Chen *et al.*, 2012; Nie *et al.*, 2013).

II.- JUSTIFICACIÓN

Los hongos comestibles silvestres son un recurso imprescindible para el funcionamiento de los bosques de alta montaña. Del mismo modo, son un recurso bastante importante a nivel cultural, alimenticio y económico dentro de las comunidades que cuentan con este recurso. Sin embargo, existe una problemática en relación al aprovechamiento y conservación de los hongos comestibles silvestres, por una parte los bosques de alta montaña junto con los hongos comestibles silvestres se encuentran bajo una excesiva presión antropogénica, aunado a esto, existe una creciente demanda de este recurso al ser considerado como un alimento de alto valor nutritivo con propiedades benéficas para la salud humana, además existe una falta de conocimiento científico sobre estrategias para el aprovechamiento de hongos comestibles silvestres mediante su cultivo *in vitro* y producción de metabolitos biológicamente activos.

Con la finalidad de mitigar la problemática entorno a este recurso, el presente trabajo está dirigido a evaluar los parámetros de cultivo *in vitro* y la producción de metabolitos de algunas especies de hongos comestibles silvestres del APFFNT. Como resultado de ello, se logrará identificar los parámetros óptimos de cultivo *in vitro* para el desarrollo micelial de especies silvestres, y la presencia de compuestos bioactivos así como su mecanismo de acción. El alcance de esta investigación permitirá una valorización de este recurso debido a sus propiedades nutrimentales y medicinales, el aprovechamiento y conservación de germoplasma asegurando su disponibilidad en el futuro, además se aprovecharán especies nativas y se obtendrá el recurso sin poner en riesgo los bosques debido a su sobreexplotación.

III.- OBJETIVOS

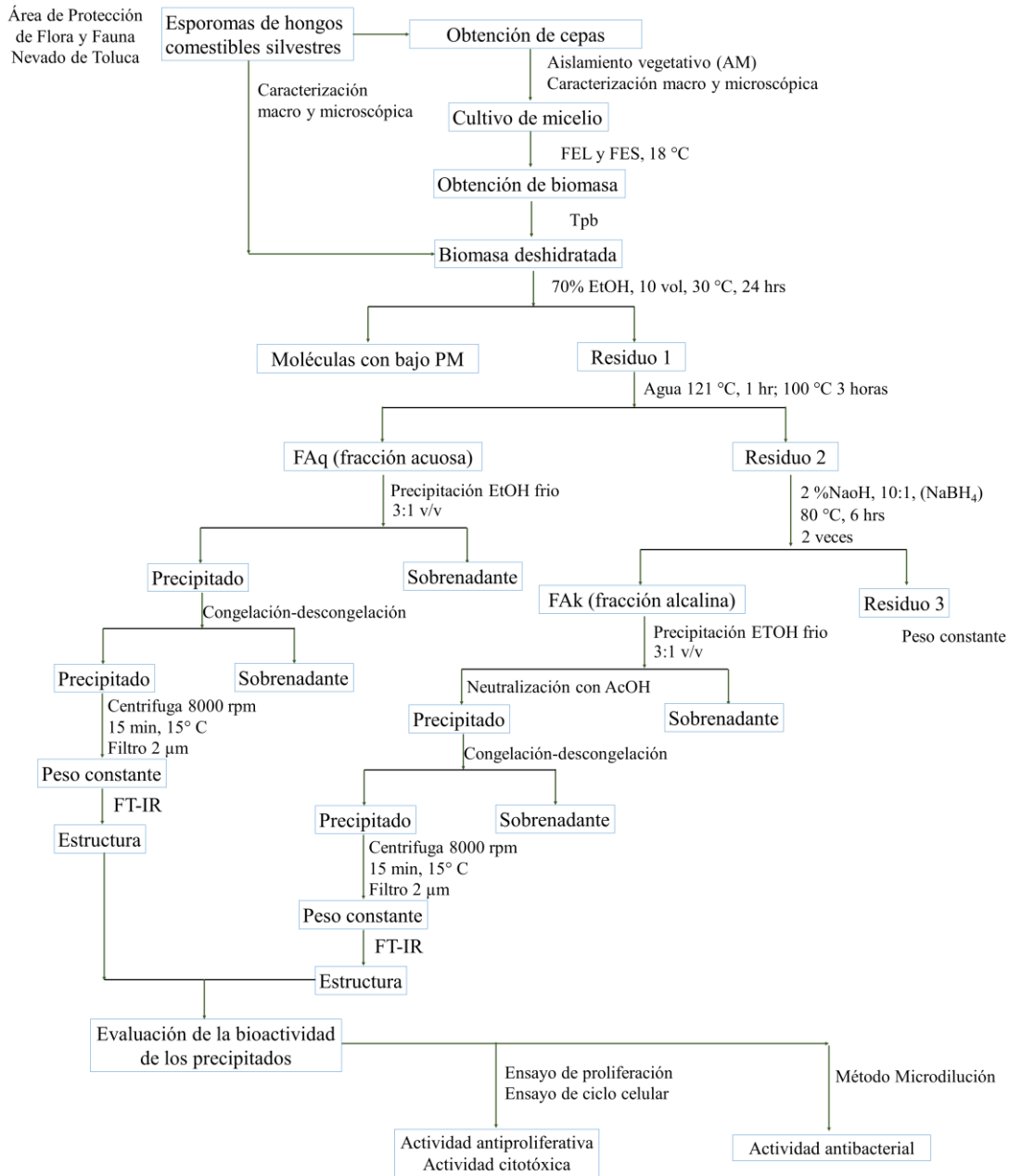
Objetivo general

Evaluar los parámetros de cultivo *in vitro* y la producción de polisacáridos bioactivos de algunas especies de hongos comestibles silvestres del Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca, México.

Objetivos específicos

- 1.- Determinar las condiciones óptimas de cultivo *in vitro* para la producción de biomasa y polisacáridos de algunas especies de hongos comestibles silvestres.
- 2.- Evaluar la bioactividad de los polisacáridos presentes en el micelio y en esporomas de hongos comestibles silvestres.

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS



Área de estudio

El Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca (APFFNT) se localiza en el sistema volcánico transversal, el gradiente altitudinal va de los 3000 a los 4600 msnm, predomina el clima templado con lluvias en verano, las precipitaciones ocurren en los meses de mayo a octubre, con un promedio anual de 800 mm y una temperatura promedio de 17.3 °C. Franco-Maass *et al.* (2012) delimita la superficie a 51,000 ha que abarca los municipios de Zinacantepec, Toluca, Calimaya, Tenango del Valle, Villa Guerrero, Coatepec de Harinas, Almoloaya de Juárez, Temascaltepec y Amanalco (figura 2)

La región está cubierta por bosques templados que consisten principalmente *Abies religiosa* y *Pinus* spp. También hay algunas pequeñas regiones cubiertas por *Alnus acuminata* y *Quercus* spp. (Endara-Agramont *et al.*, 2012).

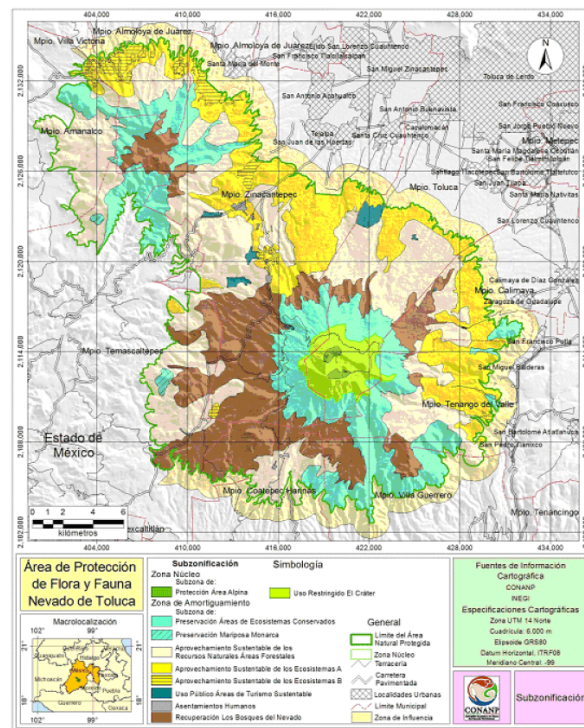


Figura 2.- Mapa del APFFNT(CONANP, 2016)

Material biológico

Cepas de hongos comestibles silvestres

Se utilizó micelio de las cepas IE987 de *Lycoperdon perlatum* e IE988 de *Gymnopus dryophilus* depositadas en el cepario de hongos del Instituto de Ecología A.C.

Reislamiento de las cepas

Se tomó un trozo de micelio de las cepas IE987 e IE988 y se colocó en un medio de cultivo comercial Papa Dextrosa Agar (PDA), pH 5.6, de marca Bioxon y un medio no convencional Agar Maíz (AM) elaborado con 15 g L⁻¹ de harina de maíz, 15 g L⁻¹ de agar agar, 2 g L⁻¹ de extracto de levadura y 1 g L⁻¹ de peptona de gelatina., pH 6.4. Los medios de cultivo fueron previamente elaborados y esterilizado a 120 °C y 12 psi durante 15 min. Posteriormente se incubaron las cepas reisladas a 18 °C para su activación.

Caracterización microscópica y macroscópica de las cepas

Para realizar la caracterización microscópica se tomó una muestra del micelio durante la fase exponencial de cada tratamiento y se tiñó con rojo Congo, se observó en el microscopio óptico a 100x, con ayuda del programa Motic Image plus 2.0 se midió el grosor de 20 hifas para obtener un promedio de acuerdo a Arana-Gabriel *et al.* (2014). Para la caracterización macroscópica, se observó el micelio en la caja Petri y se registró la textura de la cepa, margen de la cepa, forma de la cepa, tipo de crecimiento y superficie de cepa según Cruz-Ulloa (1995).

Esporomas

Se recolectaron esporomas silvestres frescos de *L. perlatum* (38.72 g), *Bolustus edulis* (2000 g) y *Lactarius índigo* (1600 g) en bosques de alta montaña de *Abies* y *Abies- Pinus* en el Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca, en los meses de junio- agosto de 2019.

Caracterización microscópica y macroscópica de los esporomas

Los ejemplares recolectados (*L. perlatum*, *B. edulis* y *L. indigo*) se caracterizaron en fresco y se identificaron taxonómicamente de acuerdo a Franco-Maass *et al.* (2012), Posteriormente se secaron en una estufa a 30 °C durante 48 horas, se calculó el contenido de agua (ecuación 1) se depositaron en el Laboratorio de micología del Centro de Investigación en Recursos Bióticos de la UAEMex. Finalmente se molieron para obtener un polvo, el cual fue utilizado para los experimentos.

$$\text{Contenido de agua} = \frac{\text{Biomasa inicial (g)} - \text{Biomasa final (g)}}{\text{Biomasa final (g)}} \times 100 \quad \text{Ec 1}$$

Cultivo *in vitro* de biomasa

Cultivo in vitro de micelio por FES

Con un horador de 0.5 cm de diámetro se tomó micelio de la cepa IE988 de *G. dryophilus*, se colocó en cajas Petri de 9 cm de diámetro, con medio Papa dextrosa Agar (PDA) y Agar Maíz (AM), se incubaron a 18 °C durante un periodo de 28 días.

Tasa de crecimiento micelial (TCM) y tasa de producción de biomasa en FES (TPB_{FES})

Con un Vernier se midió el crecimiento del micelio de la cepa IE988 sobre el medio de cultivo en una caja Petri de 9 cm durante un periodo de 18 días a 18 °C (Andrino *et al.*, 2011). Posteriormente, la tasa de crecimiento micelial se obtuvo graficando el crecimiento en función al tiempo de incubación, se linealizó su curva de crecimiento para obtener la pendiente, que representa la tasa de crecimiento (TCM) de la ecuación de una recta (ecuación 2) (Gaitán-Hernández y Báez-Rodríguez, 2008; Gaitán-Hernández y Dulce Salmones, 2015).

$$y = mx + b$$

Ec 2

Dónde: y: distancia en cm; x: tiempo en días; m: tasa de crecimiento micelial (TCM); b: factor constante.

La tasa de producción de biomasa (TPB_{FES}) se obtuvo eliminando el agar colocando los discos de agar con micelio de la cepa IE988 en agua caliente y enjuagándolo hasta eliminar por completo el agar, posteriormente se eliminó el exceso de agua y se colocó en un horno a 35 °C por 24 horas. Finalmente se pesó y se obtuvo el contenido de agua (ecuación 1) y la TPB_{FES} (ecuación 3) (Santiago-Martínez *et al.*, 2003).

$$TPB_{FES} = \frac{\text{Biomasa seca final (g)} - \text{Biomasa seca inicial (g)}}{\text{Tiempo de incubación (días)} \cdot \text{Volumen del medio (L)}} \quad \text{Ec. 3}$$

Cultivo in vitro de micelio por FEL

Se inocularon frascos de 500 mL con 300 mL de caldo de cultivo de maíz (MM) (15 g L⁻¹ harina de maíz, 2 g L⁻¹ extracto de levadura, 1 g L⁻¹ peptona de gelatina), pH 6.4, con discos impregnados de micelio de las cepas IE987 e IE988 de acuerdo (Díaz- Talamantes *et al.*, 2017). Posteriormente se incubaron durante 28 días bajo un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, agitación orbital a 150 rpm y temperatura de 18 °C. Una vez terminado el periodo de incubación, el micelio se filtró del caldo de cultivo, se lavó con agua destilada y se secó en una estufa a 30 °C durante 48 horas. Se calculó la tasa de producción de biomasa TPB_{FEL} , (ecuación 4) y el contenido de agua (ecuación 1). Finalmente, la biomasa seca se utilizó para la extracción de β-glucanos.

$$TPB_{FEL} = \frac{\text{Biomasa seca final (g)} - \text{Biomasa seca inicial (g)}}{\text{Volumen del medio (L)} \cdot \text{Tiempo de incubación (días)}} \quad \text{Ec. 4}$$

Extracción y purificación de β -glucanos

Macerado de biomasa

La biomasa seca del micelio en FEL de la cepa IE988 de *G. dryophilus* (1.282 g AM y 0.855 g PDA); la biomasa seca del micelio en FEL de la cepa IE987 de *L. perlatum* (1.70 g AM); esporomas de *L. perlatum* (5.82 g), *B. edulis* (EBe 103.87 g) y *L. índigo* (ELi 142.37 g), se colocaron independientemente en un recipiente con 10 volúmenes de etanol al 70% durante 24 horas; este procedimiento se realizó dos veces (Carbonero *et al.*, 2006). Posteriormente, se eliminó el etanol mediante un filtro de papel de poro grueso y se recuperó la biomasa.

Extracción acuosa

La biomasa recuperada (micelio y esporomas) de la maceración se colocó en 10 volúmenes de agua destilada y se realizó la extracción en un autoclave a 121 °C durante 60 min (Klaus *et al.*, 2011); el extracto resultante se colocó en una parrilla a 100 °C durante 6 horas para disminuir el volumen de agua (Smiderle *et al.*, 2013). Posteriormente se filtró la biomasa en un papel filtro con poro de 125 μ m, obteniendo en el filtrado un extracto acuoso, quedando en el residuo la biomasa restante.

Extracción alcalina

La biomasa recuperada (micelio y esporomas) de la extracción acuosa se colocó en un recipiente con 10 volúmenes de una solución acuosa de NaOH al 2% (w/v) con 0.1% de NaBH₄; la solución con la biomasa se calentó a 80 °C durante 4 horas. Posteriormente se neutralizó con ácido acético (Klaus *et al.*, 2011). Se filtró la biomasa en un papel filtro con poro de 125 μ m. Con esto se obtuvo en el filtrado un extracto alcalino (Mizuno *et al.*, 1992) y el residuo de la biomasa se desechó.

Precipitación con etanol de los extractos y su congelación-descongelación

Los extractos acuosos y alcalinos fueron colocados individualmente en un recipiente con 3 volúmenes de etanol frío (Smiderle *et al.*, 2013) para deshidratar los polisacáridos y generar un precipitado, el cual fue recuperado (Mizuno *et al.*, 1992; Carbonero *et al.*, 2006). El precipitado obtenido de cada fracción contenía una cantidad significativa de residuos del proceso de extracción (agua y NaOH), por lo que éste se congeló y descongeló lentamente a temperatura ambiente; este proceso se repitió varias veces hasta que no hubo formación de precipitado del sobrenadante. Se recuperó el precipitado y se centrifugó a 8000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 15 °C (Smiderle *et al.*, 2013). Finalmente, el precipitado de la centrifugación se filtró en una membrana de acetato de celulosa con poro de 0.2 µm. Por lo tanto, de este proceso se obtuvieron dos fracciones tanto del micelio como de los esporomas: una fracción acuosa (FAq) y una fracción alcalina (FAk). Con las cuales se realizaron los análisis correspondientes.

Identificación de los β-glucanos

Una muestra de cada fracción (1 g) se secó en una estufa a 30 °C durante 48 horas hasta obtener cristales, los cuales fueron llevados a FTIR bajo una absorbancia en el rango de 400-4000 cm⁻¹ utilizando la técnica de disco KBr (Mizuno *et al.*, 1992; Klaus *et al.*, 2011) para identificar la presencia de enlaces característicos de los β-glucanos correspondientes a O-H en los 3200 cm⁻¹, C-H en los 2922 cm⁻¹, C-O en los 1644 cm⁻¹ (Alzorqi *et al.*, 2017), además de las regiones asociadas a azúcares en un rango de 1200 cm⁻¹ a 950 cm⁻¹ y la región anomérica que va de los 950 cm⁻¹ a los 750 cm⁻¹ (Synytsya y Novak, 2014).

Bioactividad de los β-glucanos

Actividad anti bacterial

La prueba de actividad antibacteriana se realizó mediante dilución en caldo según el Clinical and Laboratory Standards Institute utilizando los β-glucanos de *B. edulis* y *L. indigo* debido

a que presentan un potencial antibacterial. Para ello, cuatro cepas de bacterias de la colección de cultivos del Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM): *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus mutans*. Se reactivaron mediante su inoculación en agar Muller-Hinton estéril (38 g L⁻¹) y se incubaron a 38 ° C durante 24 horas. Los cultivos bacterianos se diluyeron en solución salina para preparar una suspensión bacteriana de acuerdo con el estándar McFarland 0.5. En una placa de 96 pocillos, se añadieron 200 µL de caldo Muller-Hinton estéril por pocillo y se inoculó con 5 µL de la suspensión bacteriana (aproximadamente 5 x 10⁵ UFC mL⁻¹). Por otro lado, se preparó un stock de cada fracción y se agregó a cada pocillo, con una concentración final de: 500, 250, 125 y 62.5 µg mL⁻¹ de β-glucanos, como control positivo se utilizó caldo de cultivo estéril, como negativo, los controles se utilizaron caldo de cultivo inoculado con bacterias y como blanco se utilizó caldo de cultivo estéril con diferentes concentraciones de β-glucanos. La placa se incubó a 38 ° C y 24 horas en un agitador orbital operado a 200 rpm. Las dos fracciones de ambas especies se aplicaron en cuatro concentraciones sobre las cuatro bacterias, cada tratamiento se realizó por cuadruplicado en los pocillos. Después de la incubación, la placa se analizó en un lector de placas a 630 nm en modo de absorbancia para determinar el porcentaje de viabilidad del inóculo bacteriano en comparación con el inóculo no tratado (ecuación 5).

$$\% \text{ inhibición bacteriana} = \frac{\text{Tratamiento-Blanco}}{\text{Control negativo-Control positivo}} \quad \text{Ec 5}$$

Dónde: El tratamiento fue caldo de cultivo inoculado con bacterias y β-glucanos a diferentes concentraciones; el blanco fue caldo de cultivo y β-glucanos a diferentes concentraciones; el control negativo se inoculó en medio con bacterias; y el control positivo fue caldo de cultivo estéril.

Actividad anti proliferativa

La evaluación de la proliferación e inhibición celular se basa en la permeabilización de la pared celular y la tinción del DNA con sales, lo cual permite medir la cantidad de células

viables mediante la emisión de fluorescencia (Boncler *et al.*, 2014). Otra herramienta analítica es la citometría de flujo, que permite evaluar el ciclo celular para identificar la inducción de apoptosis, necrosis o cambios en las fases G1, S y G2 mediante la medición de parámetros como el tamaño, forma o complejidad marcados con un fluorocromo (Barrera Ramírez *et al.*, 2004).

La actividad antiproliferativa solo fue probada en β –glucanos presentes en el micelio cultivado de la cepa IE987, debido a que las demás cepas presentaron una TPB_{FEL} baja. Además, se probaron los β –glucanos presentes en esporomas silvestres de *L. perlatum*, *B. edulis* y *L. índigo*.

Inhibición de la proliferación celular

Se utilizaron dos líneas de células cancerígenas: Jurkat (células de leucemia linfoide) y K562 (células de eritroleucemia). El ensayo se realizó en una placa de 96 pozos (1000 células por pozo), a cada pozo (w) se agregaron 200 μ L de medio de cultivo RPMI suplementado con 10% suero bovino fetal (FCS), 1% glutamina y penicilina-estreptomicina. Posteriormente se agregaron individualmente los precipitados a diferentes concentraciones por pozo (500, 250, 125 y 62.5 μ g mL⁻¹). La placa se incubó a 37 °C y 8% de CO₂ durante 3 días. Después de este periodo se agregaron 10 μ L w⁻¹ (9.75 μ L medio RPMI y 0.25 μ L de PrestoBlue Cell Viability Reagent) y se dejó incubar durante 30 minutos. Posteriormente, la placa se leyó a 530 /590 nm en fluorescencia en el lector de placa de acuerdo a Boncler *et al.* (2014). A todos los valores de fluorescencia se le restó el valor correspondiente al medio, posteriormente se calculó el porcentaje de la inhibición de la proliferación celular (ecuación 6).

$$\% \text{ Inhibición celular} = \frac{\text{Fluorescencia de células tratadas con los precipitados} * 100}{\text{Fluorescencia de células sin tratar}} - 100 \quad \text{Ec.6}$$

En cada placa se utilizó como control positivo ácido Hialurónico a una concentración de 25 y 12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, como control negativo Etopósido a una concentración de 50 y 25 μM y como blanco medio solo. Además, para determinar el patrón de crecimiento de las líneas celulares se utilizó una curva de siete puntos con 8000, 4000, 2000, 1000, 500, 250 y 125 células w^{-1} .

Para verificar la posible citotoxicidad de los precipitados se realizó el mismo procedimiento en dos líneas de fibroblastos (HFFS WT y HFFS ATM). Sin embargo, en cada pozo se colocaron 750 células en 200 μL de medio de cultivo IMDM suplementado con 10% FCS, 1% glutamina y penicilina-estreptomicina. Se utilizaron los mismos controles y la curva se realizó con 6000, 3000, 1500, 750, 375, 185, 94 células w^{-1} , y se incubaron durante 5 días.

Ensayo de ciclo celular

En una placa de 24 pozos se colocó 1 mL de medio RPMI suplementado con 10% suero bovino fetal (FCS), 1% glutamina y penicilina-estreptomicina por pozo. Posteriormente se añadieron 1000 células w^{-1} de las líneas Jurkat y K562, y se añadieron los precipitados a diferentes concentraciones (500 y 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$), se dejaron incubar a 37 °C y 8% de CO_2 durante 48 horas. Después del tiempo de incubación se lavó cada pozo con 1 mL de solución buffer fosfato (PBS), el contenido (células y el medio) se vertió en tubos de citometría con 2 mL de PBS, se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min a 4 °C y se añadieron 100 μL de PBS frío. Se colocaron 100 μL de etanol al 70% y se dejó reposar durante 5 min en frío, se lavó con 2 mL de PBS frío, se centrifugó nuevamente a 3500 rpm durante 3 min a 4 °C, y se añadieron 250 μL de PBS con 250 μL de buffer de extracción de DNA a 4 °C. Posteriormente se incubaron durante 10 min a 37 °C en oscuridad, y se añadieron 200 μL de RNAsa y yoduro de propidio (IP). Se incubaron nuevamente 30 min a 37 °C en oscuridad. Finalmente, las muestras se analizaron en un citómetro de flujo para identificar las fases del ciclo celular (Pineda de las Infantas *et al.*, 2015). Como control positivo se utilizó ácido Hialurónico a 50 y 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, como control negativo Etopósido a una concentración final de 100 y 50 μM .

Análisis estadístico

Cultivo in vitro de micelio: Se realizó una T de student para muestras independientes al 95% de confianza ($p < 0.05$), para evaluar si existen diferencias significativas entre la TCM y TPB de la cepa IE988 en un medio convencional PDA y el no convencional AM en FES, y TPB para FEL.

Actividad antibacterial: Se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) al 95% de confianza ($p < 0.05$) para saber si existe efecto entre las diferentes concentraciones de la fracción acuosa y alcalina (*B. edulis* y *L. indigo*) sobre inhibición bacteriana (4 bacterias), total 8 ANOVAS, además, se realizó una prueba de rango múltiple de Tukey para cada tratamiento para encontrar diferencias estadísticamente significativas entre la inhibición de las diferentes concentraciones de las dos fracciones, utilizando el paquete estadístico SPSS.

V.- RESULTADOS Y DISCUSIONES

Identificación y caracterización del material biológico

Lycoperdon perlatum



Figura 3.- Esporoma de *L. perlatum*

Lycoperdon perlatum Pers (1976) también llamado nubes, pedo, pedo de burro, terneritas o bombones, es un hongo comestible valorado culturalmente como alimento en el APFFNT (figura 3) (Burrola- Aguilar *et al.*, 2012). Su habitad suele ser terrícola o húmica, crece en bosques de oyamel- pino a altitudes de 3100- 3400 metros. Macroscópicamente se caracteriza por ser redondo pseudoestipitado de 3.5-7.5cm de longitud, color blanco y crema al madurar; en estado juvenil presenta espinas de color blanco, al madurar cambian de color a crema-café, y en la punta del esporoma se desarrolla una depresión por donde se liberan las esporas (figura 3). Microscópicamente presenta basidiosporas de (3.0-4.0) 3.77 μm , redondas y ligeramente espinuladas (figura 4) (Franco-Maass *et al.*, 2012).



Figura 4.- Esporas de *L. perlatum* en rojo Congo a 100x

L. perlatum presenta potencial biotecnológico por ser susceptible a ser cultivado (Díaz-Talamantes *et al.*, 2017). También se le atribuyen de manera tradicional propiedades cicatrizantes (Vázquez, 2012) y se utiliza para tratar heridas, quemaduras, verrugas, bocio, picaduras de avispas o abejas (Guzmán, 2008). Estudios científicos han demostrado la actividad esterolítica de extractos crudos de esporomas silvestres de *L. perlatum* con aplicaciones en la síntesis de productos químicos para la industria farmacéutica (Colak *et al.*, 2009); también se ha demostrado la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos metanólicos (Ramesh y Pattar, 2010), y la actividad antiproliferativa sobre una línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 de extractos acuosos, etanólicos y hexanoicos (Novaković *et al.*, 2015).

Gymnopus dryophilus



Figura 5 Esporoma de *G. dryophilus*

Gymnopus dryophilus (Bull.) Murrill 1916 es un hongo silvestre del APFFNT con valor culinario también llamado clavito (figura 5) (Burrola- Aguilar *et al.*, 2012). Se desarrolla en bosque de oyamel a una altitud aproximada de 2150 metros. Microscópicamente presenta un píleo de 3.0-7.0 cm de diámetro, convexo, color café claro con el borde crema, centro pulviniforme y margen recto. Laminas poco separadas, libres al estípite uncinadas y borde liso. Lamélulas atenuadas adheridas al estípite de color blanco-crema. Estípite 3.0-7.0 cm de largo cilíndrico, hueco de color crema-rojizo (figura 5).

Microscópicamente los basidios miden (15.5-23.7) 20.6 x 3.2 (2.4-3.8) μm , tienen forma clavada-lisa, son hialinos y son tetraesterigmáticos (figura 6a). Las basidiosporas son elongadas, miden (2.4-3.1) 2.8 x 4.5 (3.9-5.5) μm . Q=1.6, son elípticas, hialinas y lisas (figura 6b) (Franco-Maass *et al.*, 2012).

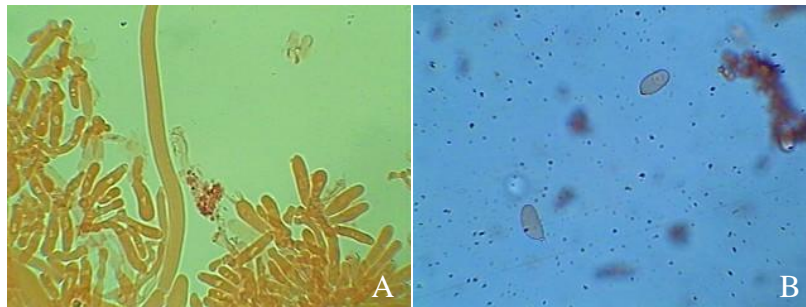


Figura 6.- A) Basidios, B) Espororas de *G. dryophilus* en rojo Congo a 100x

Gymnopus dryophilus presenta potencial para ser cultivado a nivel *in vitro* (Díaz- Talamantes *et al.*, 2017).. Asimismo, se ha demostrado la actividad antioxidante de extractos etanolicos y acuosos (Kalyoncu *et al.*, 2010). Cabe resaltar que son escasos los estudios realizados sobre esta especie, por lo que es importante identificar las condiciones óptimas de cultivo *in vitro*, así como la producción de metabolitos de interés.

Boletus edulis



Figura 7.- Esporoma de *B. edulis*

Boletus edulis Pers Bull. (1982) también llamado cremas, hongo de crema, hongo de panza o pancitas, es un hongo con alto valor culinario en el APFFNT (figura 7) (Burrola- Aguilar *et al.*, 2012). Suele crece en bosques de oyamel u oyamel- pino a altitudes de 3100- 3500 metros. Presenta un píleo de 8- 15 cm de diámetro longitud de color amarillo- café o café-rojizo, su estípite mide de 7 a 20 cm de longitud de color blanco a café claro (figura 7).

Microscópicamente presenta basidios de (24.8- 32.4) 29.3 x 11(9.3- 13) μm (figura 8a), las basidiosporas de (13.8- 18.1) 15.6- 4.6 (4- 5.4) μm , fusiformes y lisas (figura 8b) (Franco-Maass *et al.*, 2012).

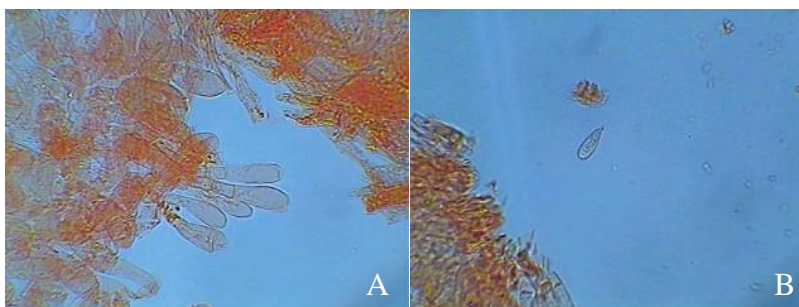


Figura 8 .- A) Basidios, B) Espororas de *B. edulis* en rojo Congo a 100x

Existen diversos estudios sobre las propiedades de *B. edulis*, de acuerdo Tsai *et al.* (2007) los extractos etanolicos y acuosos de *B. edulis* presentan una fuerte actividad antioxidante. Por otro lado, Lemieszek *et al.* (2013) demostró que los polisacáridos (glicoproteínas) aislados de *B. edulis* presentan un efecto antiproliferativo muy prominente en las células de

cáncer de colon. Asimismo, Lucas *et al.* (1957) menciona que un extracto acuoso de esporomas de *B. edulis* retrasó el crecimiento del sarcoma de ratón, no obstante, el micelio del hongo cultivado *in vitro* no presento biactividad.

Lactarius índigo



Figura 9.- Esporoma de *L. índigo*

Lactarius índigo (Schwein.) Fr. también llamado azulejos, enchilados azules, hongo azul, orejas azules o tecomate azul, es un hongo valorado como alimento en el APFFNT (figura 9) (Burrola- Aguilar *et al.*, 2012). Crece en bosques de pino a altitudes de 3100- 3500 metros. El píleo mide 7.5 (2.5-10) cm de diámetro, convexo y umbilicado al madurar, con una depresión central. color azul índigo matices grisáceos, presenta zonas concéntricas de un azul más intenso, las láminas ligeramente decurrentes de color azul índigo separadas. El estípite mide de 4 (2.5-6) cm de color azul y liso (figura 9). Los basidios miden (3.5 -6.8) 5.1 x 22 (20.7 -33.3) μm , tienen forma clavada-lisa, son hialinos y son tetraesterigmáticos (figura 10a). Las basidiosporas son ovaladas (4.5- 6.8) 5.6 x 7.3 (6.2-8.5) μm hialinas y lisas (figura 10b) (Franco-Maass *et al.*, 2012).

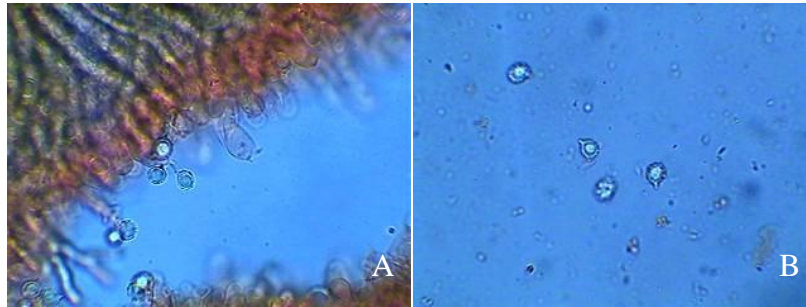


Figura 10.- A) Basidios, B) Espororas de *L. indigo* en rojo Congo a 100x

Lactarius indigo es un hongo con potencial biotecnológico, de acuerdo a Ochoa-Zarzosa *et al.* (2007) los extractos acuoso y orgánicos presentan una actividad antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella entérica*, además de presentar una actividad citotóxica contra células HeLa. Asimismo, *L. indigo* es considerado tradicionalmente como antitumoral (Cano-Estrada y Romero-Bautista, 2016) purgante y laxante (Bautista-González, 2013). Por otra parte, también es presenta potencial como colorante natural (Harmon *et al.*, 1980).

Cultivo *in vitro* de biomasa

Actualmente existe una demanda creciente de hongos comestibles silvestres que brindan beneficios a la salud humana (Wasser, 2002) como *L. perlatm* y *G. dryophilus*. Además, es importante destacar que existen pocos estudios relacionados con el cultivo *in vitro* de esta especie y en general de la familia Lycoperdaceae. Por tanto, es de gran importancia realizar más estudios biotecnológicos para la selección de cepas y optimización de las condiciones de cultivo *in vitro* (Song *et al.*, 1998).

Cultivo de micelio en FES

Cepa IE988 de G. dryophilus en PDA: La forma de la colonia es circular con margen fimbriado, el crecimiento del micelio es aéreo con textura algodonosa y superficie irregular, de color blanco y crema al envejecer (figura 11a), las hifas en medio Agar Maíz fueron de (3.9) 4.98 μm (5.7) (figura 11b). El peso fresco fue de 7.263 g, un peso seco de 0.335 g y 95.33 % de contenido de agua. La tasa de crecimiento micelial (TCM) en fermentación en

estado sólido fue de $0.3962 \text{ cm día}^{-1}$ y la tasa producción de biomasa (TPB_{FES}) fue de $0.2481 \text{ g día}^{-1} \text{ L de medio}^{-1}$ (tabla 1).



Figura 11.- A) Micelio; B) Hifas de la cepa IE988 de *G. dryophilus* en medio PDA

Cepa IE988 de G. dryophilus en AM: Macroscópicamente la cepa presentó una forma circular con margen fimbriado, crecimiento del micelio aéreo con textura algodonosa y superficie irregular, de color blanco y crema al envejecer (figura 12a), microscópicamente las hifas en medio Agar Maíz fueron de $(3.7) 5.21 \mu\text{m}$ (6.7) (figura 12b). El peso fresco fue de 6.055 g , peso seco de 0.506 g . La tasa de crecimiento micelial TCM en fermentación en estado sólido fue de $0.3798 \text{ cm día}^{-1}$ y la tasa de producción de biomasa TPB_{FES} fue de $0.3748 \text{ g día}^{-1} \text{ L de medio}^{-1}$ y 91.62% de contenido de agua (tabla 1).

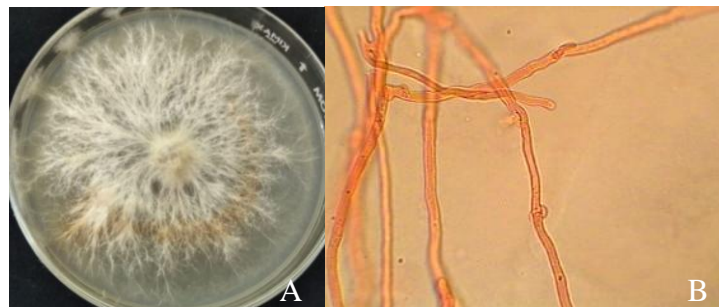


Figura 12.- A) Micelio; B) Hifas de la cepa MGd de *G. dryophilus* en medio Agar Maíz

Con la finalidad de comparar el crecimiento micelial de IE988 en dos medios de cultivos (convencional PDA y no convencional AM) se obtuvo su TCM en FES (figura 13). De acuerdo al análisis estadístico no existen diferencias significativas $p > 0.05$ ($p = 0.473$) entre los diferentes medios. Respecto a la TPB_{FES} de IE988 en los dos medios tampoco se encontró una diferencia estadísticamente significativa $p > 0.05$ ($p = 0.079$). No obstante, en el caso de la TPB_{FEL} si se encontró una diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$ ($p = 0.018$), por

lo que en la FEL si existe diferencia entre el medio utilizado, presentando mayor rendimiento el medio no convencional elaborado a base de harina de maíz.

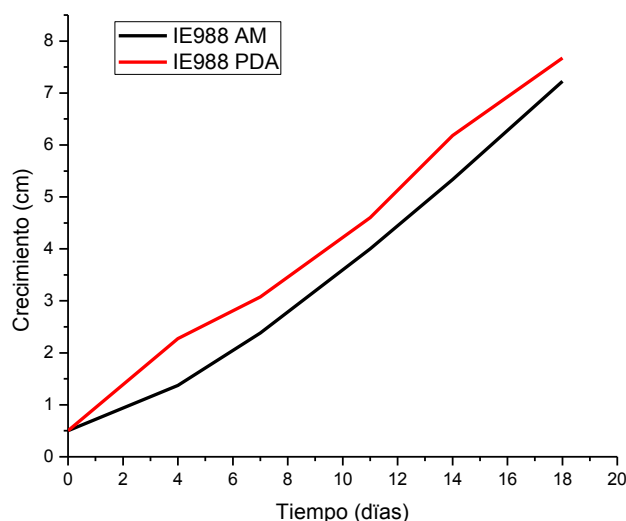


Figura 13.- TCM_{FES} de IE988 en AM y PDA

Cultivo de micelio en FEL

Cepa IE988 de G. dryophilus en AM: la cepa IE988 en AM mostró un peso fresco de la biomasa de 19.22 g con 93.25% de contenido de agua, peso seco de la biomasa de 1.283g y TPB_{FEL} de $0.0176 \text{ g día}^{-1} \text{ L de medio}^{-1}$ (tabla 1). Los pellets fueron redondos con tamaños de (0.3- 1.55) 0.695 cm (figura 14a).

Cepa IE988 de G. dryophilus en PDA: la cepa IE988 en PDA presentó una biomasa en fresco de 17.304, biomasa en seco de 0.855 g, con 95.10 % de contenido de agua y TPB_{FEL} de $0.0117 \text{ g día}^{-1} \text{ L de medio}^{-1}$ (Tabla 1). Los pellets fueron redondos con tamaño de (0.5- 1.85) 0.97 cm (figura 14b).

Cepa IE987 de L. perlatum en AM: El cultivo de micelio *in vitro* de la cepa IE987 presentó un peso fresco de 40.87 g con 96.5% de contenido de agua y TPB_{FEL} de $0.04 \text{ g día}^{-1} \text{ L de medio}^{-1}$ (Tabla 1). El tamaño de los pellets fue de (0.6- 3.74) 2.26 cm x 1.31 cm (0.5- 2.25) (figura 14c). Además, la variación en el pH en el medio fue mínima de 6.4 a 6.13.

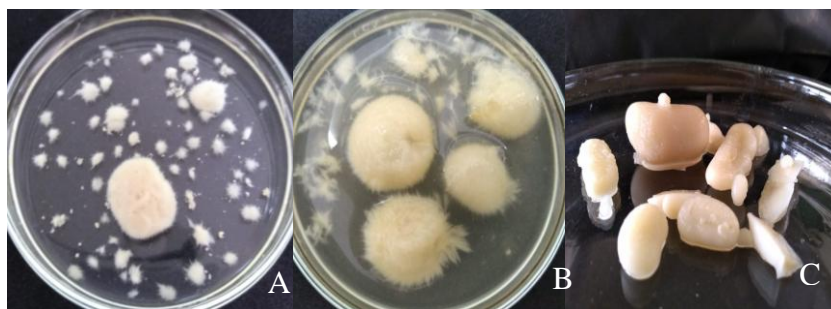


Figura 14.- Pellets de IE988 en A) AM y B) PDA; C) Pellets de IE987 en AM

La producción *in vitro* de micelio se vio afectada por diferentes factores como: el medio de cultivo utilizado a base de harina de maíz, según Chegwin-Angarita y Nieto-Ramírez (2014) las fuentes de carbono no convencionales como las harinas de cereales tienden a incrementar la biomasa producción. Además, Wang et al. (2005) menciona que la relación carbono-nitrógeno para mejorar la producción de biomasa de hongos oscila entre 40: 1; similar al de un medio a base de harina de maíz (Chegwin-Angarita y Nieto-Ramírez, 2014). Por lo anterior, la relación carbono-nitrógeno proporcionada por el medio de cultivo utilizado podría ayudar a maximizar la producción de biomasa. Otros factores de importancia para el cultivo *in vitro* de *L. perlatum* son la temperatura entre 18 y 25 ° C, y el pH mayor a 5.8 (Díaz-Talamantes et al., 2017). En este estudio, el crecimiento micelial mantuvo las condiciones óptimas para la producción de biomasa.

Lycoperdon perlatum es un hongo saprobio (Rinaldi et al., 2008) tradicionalmente valorado como hongo medicinal (Guzmán, 2008), y también se ha demostrado que es una especie viable para el cultivo *in vitro* (Díaz-Talamantes et al., 2017). Sin embargo, es importante desarrollar más estudios para conocer: variables que permitan maximizar la producción de biomasa y β -glucanos como medio de cultivo, fuente de carbono, pH, temperatura y disponibilidad de oxígeno; bioactividad de los β -glucanos y posibles aplicaciones medicinales, farmacéuticas y nutricionales; y conservación y manejo del recurso en su hábitat natural.

Esporomas silvestres

L. perlatum: los esporomas deshidratados y molidos presentaron un peso fresco de 38.72 g con 84.97% de contenido de agua y un peso seco de 5.82 g. Para el caso de los esporomas de *B. edulis* el peso fresco fue de 2000 g con 94.81% de contenido de agua y un peso seco de 103.83 g. Finalmente, *L. indigo* el peso fresco de los esporomas obtenidos fue 1600 g con una biomasa en seco de 142.37 g y un contenido de agua del 91.1% (tabla 1).

Tabla 1.- Producción de biomasa en micelio en FEL y esporomas

Fuente de biomasa	Especie	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Contenido de agua (%)	TPB (g de biomasa seca / L de medio día)
	<i>L. perlatum</i> IE987 en AM	40.87	1.70	95.83	0.040
Micelio en FEL	<i>G. dryophilus</i> IE988 en AM	19.22	1.283	93.23	0.0176
	<i>G. dryophilus</i> IE988 en PDA	17.30	0.855	95.10	0.0117
	<i>L. perlatum</i>	38.72	5.82	84.97	NA
Esporomas silvestres	<i>B. edulis</i>	2000	103.83	94.81	NA
	<i>L. indigo</i>	1600	142.37	91.10	NA

En relación a la obtención de biomasa en cultivo *in vitro* y de esporomas, la principal diferencia se presentó en el contenido de agua, en el micelio cultivado *in vitro* es mayor que el de los esporomas, viéndose reflejado en mayor biomasa en seco de los esporomas. De acuerdo a Arango y Nieto (2013) y Rathore *et al.* (2017) aproximadamente la mitad de la biomasa en peso seco de la pared celular de los basidiomicetos está constituida de metabolitos estructurales como los glucanos, por lo que existe una relación directa entre biomasa y concentración de β -glucanos.

Extracción y purificación de β -glucanos

Respecto a la extracción de β -glucanos presentes en el micelio y los esporomas se obtuvieron dos fracciones de β -glucanos en cada especie, una fracción acuosa (FAq), y una fracción alcalina (FAk) (figura 15) como se muestran en la tabla 2.

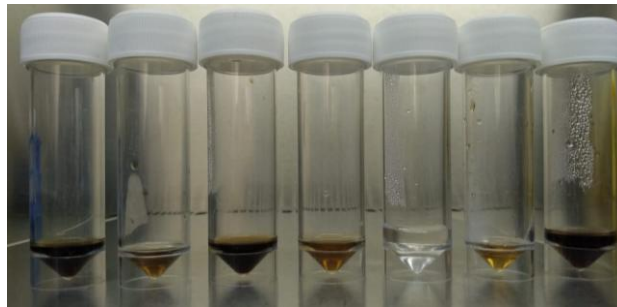


Figura 15.- β -glucanos presentes en el micelio y esporomas de los hongos comestibles silvestres

Tabla 2.- Producción de β -glucanos en micelio en FEL y esporomas

Fuente de biomasa	Especie	Fracción	Código	Gramos de β -glucanos por 100 g de biomasa seca	Gramos totales de β -glucanos por 100 g de biomasa seca
Micelio en FEL	<i>L. perlatum</i> IE987 en AM	FAc	FAqIE987AM	1.409	11.519
		FAk	FAkIE987AM	10.110	
	<i>G. dryophilus</i> IE988 AM	FAc	FAqIE988AM	1.584	12.731
		FAk	FAk IE988AM	11.147	
	<i>G. dryophilus</i> IE988 PDA	FAc	FAqIE988PDA	1.721	11.811
		FAk	FAkIE988PDA	10.090	
Esporomas silvestres	<i>L. perlatum</i>	FAc	FAqELp	2.360	13.940
		FAk	FAkELp	11.580	
	<i>B. edulis</i>	FAc	FAqEBe	3.680	16.040
		FAk	FAkEBe	12.360	
	<i>L. indigo</i>	FAc	FAqELi	3.560	16.420
		FAk	FAkELi	12.860	

La producción total de β -glucanos presentes en los precipitados del micelio (11.50 g de β -glucanos por 100 g de DW) y esporomas de *L. perlatum* (13.80 g de β -glucanos por 100 g de DW) no muestran diferencias significativas entre ellas. Por otra parte, el total de β -glucanos por 100 g de DW de los esporomas silvestres, son similares a lo obtenido en un estudio realizado por (Sari *et al.*, 2017), donde el contenido de β -glucanos en esporomas silvestres de *L. perlatum* fue de 15.48- 19.749 g de β -glucanos por 100 g de DW. Mientras

que *B. edulis* reporta valores de 19.99 g de β -glucanos por 100 g de DW en el estipite, hasta 63.38 g de β -glucanos por 100 g de DW en el pileo, notándose una diferencia sustancial con lo obtenido en este estudio (16.040 g de β -glucanos por 100 g de DW).

Además, la concentración de β -glucanos presentes en las fracciones alcalinas fueron mayores que las fracción acuosas, según Tseng et al. (2008) esto se debe a que en el proceso de extracción las paredes celulares se degradan y los compuestos insolubles en agua se transforman en componentes solubles. Sin embargo, es importante mencionar que la fracción acuosa de β -glucanos normalmente tiene mayor bioactividad que las insolubles (Xiao et al., 2004).

Existen otros factores que pueden afectar la producción de biomasa y β -glucanos presentes en cuerpos fructíferos y micelio in vitro. Según Papaspyridi et al. (2010) el micelio representa la fase vegetativa del hongo, mientras que los cuerpos fructíferos la fase reproductiva, y la función estructural de los β -glucanos en la pared celular varía en cada fase. De la misma manera, la producción de biomasa y la bioactividad de los β -glucanos también se ve afectada por la fuente de nutrientes, según Ooi y Liu (2000) el sustrato natural donde se desarrollan los cuerpos fructíferos silvestres puede contener compuestos polifenólicos que inducen la síntesis de β -1,3-glucano sintetasa, aumentando la producción de β -glucanos. Además, Reís (2012) menciona que los cuerpos fructíferos normalmente presentan mayor bioactividad que los sistemas in vitro, debido a que la composición química varía en relación a los nutrientes del sustrato.

Identificación de los β -glucanos

Los espectros de FTIR obtenidos de las fracciones secas (Figura 16) de todas las especies concuerdan con el espectro de un β -glucano (Movasaghi, Rehman, & ur Rehman, 2008), debido a que se observan las bandas características: una banda a los 3200 cm^{-1} correspondiente a la región de las vibraciones de enlaces O-H, una banda correspondiente a los 2922 cm^{-1} que se atribuye a la presencia de enlaces saturados de C-H (Figura 17) (Šandula, Kogan, Kačuráková, & Machová, 1999).

Las fracciones de los esporomas presentan una señal de absorción a 1644 cm^{-1} , la cual está relacionada con las vibraciones de estiramiento del enlace C-O (carbonilo) de un complejo polisacárido-proteína (Figura 17) (Alzorqi *et al.*, 2017), debido a ello los β -glucanos de las fracciones FAqELp, FAKELp, FAKMIE988, FAqIE988PDA, FAKIE988PDA y FAqEBE podrían estar acoplados a una proteína.



Figura 16.- β -glucanos presentes en la FAq y FAK

Asimismo todas las fracciones presentan las dos regiones fundamentales de los β -glucanos, la “región del azúcar” que va de los $1,200\text{ cm}^{-1}$ a los 950 cm^{-1} y “región anomérica” que va de los 950 cm^{-1} a los 750 cm^{-1} (Synytsya & Novak, 2014). En estas regiones se observan las bandas características en enlaces carbono-glucósido de β -glucano correspondientes a 1160 , 1080 , 1040 , 970 y 890 cm^{-1} (Alzorqi *et al.*, 2017). Por otra parte, en los espectros de todas las fracciones se observa una señal que va de los 1160 a los 1147 cm^{-1} , Münzberg, Rau, & Wagner, (1995) menciona que esta señal representa el estiramiento del enlace glicosídico C-O-C, donde la señal a 1040 cm^{-1} corresponde al estiramiento C-O. Asimismo menciona que la disminución de la señal de absorción a los 1080 cm^{-1} y la desaparición de la señal a 890 cm^{-1} en las fracciones (acuosa y alcalina) se debe a una degradación del polisacárido en la cadena básica.

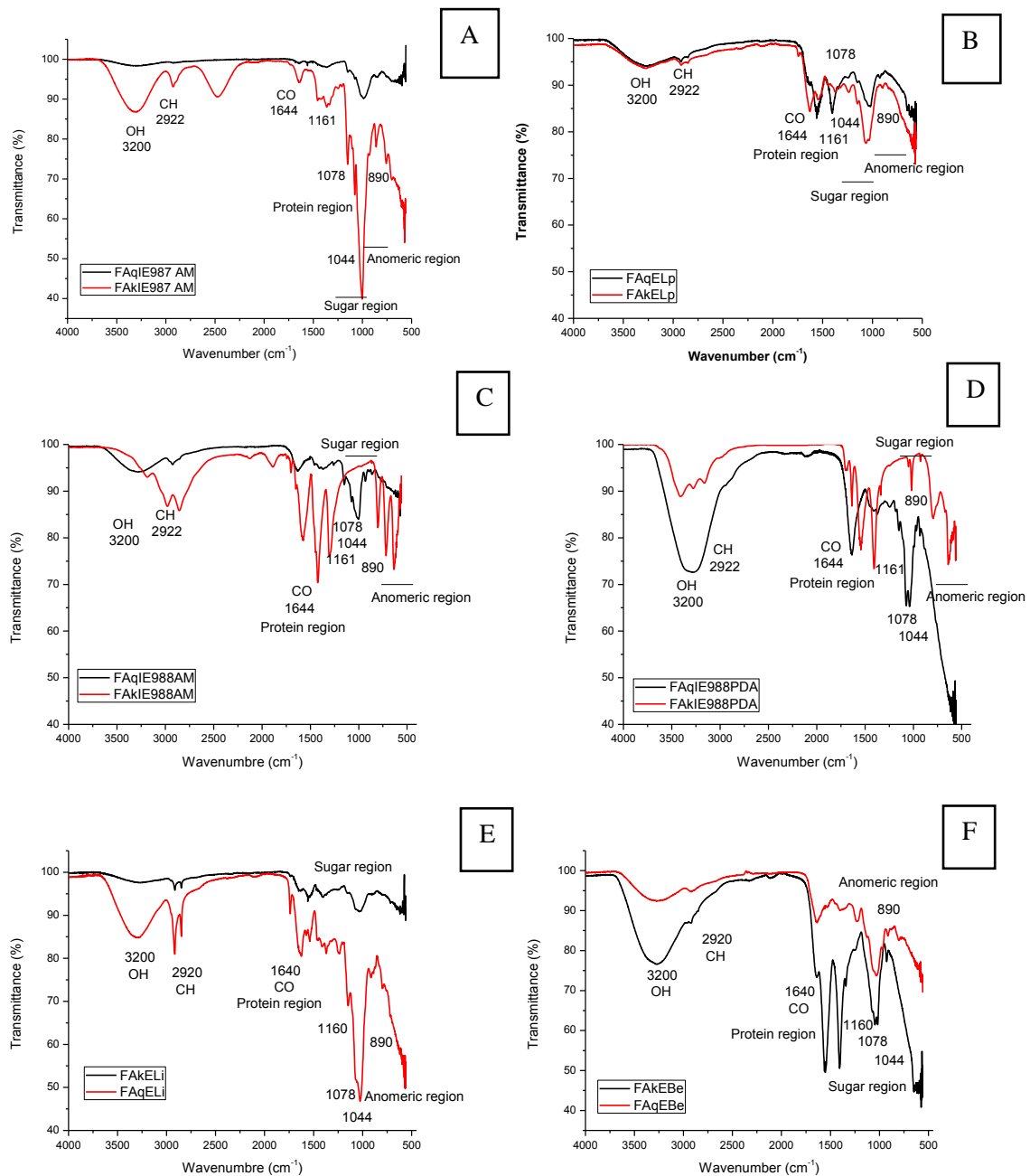


Figura 17.- Espectro FTIR de β -glucanos de A) micelio de IE987 en AM, B) esporomas de *L. perlatum*, C) micelio de IE988 en AM, D) micelio de IE988 en PDA, E) esporomas de *L. indigo*, F) esporomas de *B. edulis*.

La producción de β -glucanos en las fracciones obtenidos es similar entre el micelio y esporomas de *L. perlatum* (tabla 2). De igual manera, *G. dryophilus* mostró una producción de β -glucanos similar entre las dos cepas utilizadas. Por otra parte, en todas las especies se

observa una mayor producción de β -glucanos presentes en FAK correspondientes a la fracción alcalina (tabla 2).

Bioactividad de los β -glucanos

Actividad antibacterial

Las diferentes concentraciones (500, 250, 125 y 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de las fracciones acuosa y alcalina de ambas especies mostraron inhibición en las cuatro cepas bacterianas (*S. mutans*, *S. aureus*, *E. coli* y *E. faecalis*). Según el análisis estadístico, el FAqEBe y el FAKeBe presentaron $p < 0.05$ en los tratamientos de *S. mutans* ($p = 0.000$), *E. coli* ($p = 0.025$) y *E. faecalis* ($p = 0.000$), por lo que existe un efecto de diferentes concentraciones sobre la inhibición bacteriana (tabla 3), donde las concentraciones más altas mostraron mayor inhibición del crecimiento bacteriano (figura 18). Las concentraciones con mayor porcentaje de inhibición en *S. mutans* fueron de FAqEBe a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ con 71.2% de inhibición y 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ con 66.31% de inhibición. Para *E. coli*, FAKeBe a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ presentó 43,91% de inhibición y FAqEBe a 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 44,15% de inhibición. En el caso de *E. faecalis* tanto FAqEBe como FAKeBe a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mostraron el mayor porcentaje de inhibición con valores de 83,60% y 79,55% respectivamente. Por otro lado, *S. aureus* presentó una $p = 0.059$, por lo que no hay efecto de diferentes concentraciones sobre la inhibición, sin embargo, esta cepa alcanzó valores de hasta 97.64% de inhibición a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ del FAKeBe.

Por otro lado, según la prueba de rango múltiple de Tukey (tabla 3), existen diferencias estadísticamente significativas entre la inhibición bacteriana de *S. mutans* y las fracciones acuosa y alcalina de *B. edulis*, ya que las concentraciones de FAqEBe utilizadas presentan mayor antibacteriano actividad que las del FAKeBe. Además de esto, *E. coli* y *E. faecalis* muestran diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de FAqEBe y FAKeBe, pero no entre las fracciones acuosa y alcalina. En el caso de *S. aureus*, ningún tratamiento mostró diferencias estadísticas.

En el caso de FAqELi y FAKELi presentaron una $p < 0.05$ en *S. aureus* ($p = 0.047$), y *E. faecalis* ($p = 0.000$). Cabe mencionar que *S. aureus* existe efecto de diferentes concentraciones sobre la inhibición bacteriana, pero según la prueba de rango múltiple, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (tabla 3), aunque FAqELi a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ presentó 95% de inhibición bacteriana. Para *E. faecalis*, FAqELi a 500 y $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ mostró el mayor porcentaje de inhibición con 75.79 y 70.58% respectivamente, también FAKELi a 500 y $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ presentó 87.07 y 69.14% de inhibición respectivamente. Los tratamientos de *S. mutans* ($p = 0.727$), y *E. coli* ($p = 0.07$), presentaron una $p > 0.05$, por lo que no se encontró efecto de diferentes concentraciones sobre la inhibición bacteriana. Sin embargo, FAqELi a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ presentó 69% de inhibición sobre *S. mutans*, y FAqELi a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ mostró 70% de inhibición sobre *E. coli*.

Según la prueba de rango múltiple de Tukey (tabla 3), solo *E. faecalis* presentó diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de FAqELi y FAKELi, pero no entre las fracciones acuosa y alcalina. En el caso de *S. mutans*, *E. coli* y *S. aureus*, ningún tratamiento mostró diferencias estadísticas.

Asimismo, podemos observar que cada fracción presentó una fuerte actividad antibacteriana sobre las cuatro cepas (figura 18), en general el mayor porcentaje de inhibición de las cuatro fracciones se obtuvo en la concentración más alta ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$), acercándose a la positiva control (caldo de cultivo estéril), mientras que el menor porcentaje de inhibición fue a la concentración más baja ($62.5 \mu\text{g mL}^{-1}$), cercana al control negativo (inóculo bacteriano con caldo de cultivo). Sin embargo, FAqEBe y FAKELi mostraron mayor inhibición en *S. mutans* a partir de la menor concentración ($62.5 \mu\text{g mL}^{-1}$), así mismo, FAKEBe y FAqELi presentaron mayor inhibición sobre *S. aureus* en todas las concentraciones. Es importante resaltar que no existen diferencias entre la inhibición bacteriana provocada por las fracciones acuosa y alcalina de ambas especies de hongos, a excepción de FAqEBe y FAKEBe sobre *S. mutans*.

Tabla 3.- Inhibición bacteriana de las fracciones de *Boletus edulis* y *Lactarius indigo*

Fracción	Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% Inhibición			
		<i>S. mutans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>
FAqEBe	62.5	34.85 \pm 21.01 ba	22.69 \pm 21.90 a	2.25 \pm 10.92 b	18.8 \pm 62.28 bc
	125	43.44 \pm 15.09 ba	16.90 \pm 21.35 a	18.30 \pm 14.84 ab	31.53 \pm 13.19 abc
	250	66.31 \pm 10.48 a	84.81 \pm 74.4 a	44.15 \pm 35.18 a	63.06 \pm 16.32 ab
	500	71.2 \pm 7.78 a	83.63 \pm 73.48 a	27.05 \pm 6.01 ab	83.60 \pm 13.65 a
FAkEBe	62.5	26.66 \pm 22.37 b	90.68 \pm 30.78 a	13.84 \pm 10.75 ab	2.02 \pm 4.06 c
	125	16.97 \pm 17.86 b	89.05 \pm 24.94 a	23.89 \pm 11.24 ab	9.54 \pm 2.49 bc
	250	24.46 \pm 20.25 b	87.70 \pm 27.78 a	18.46 \pm 13.25 ab	61.33 \pm 10.74 abc
	500	27.66 \pm 10.41 b	97.64 \pm 13.54 a	43.91 \pm 16.76 a	79.55 \pm 26.46 a
FAqELi	62.5	42.34 \pm 46.63 a	68.98 \pm 56.03 a	16.76 \pm 31.76 a	30.95 \pm 29.66 ab
	125	52.23 \pm 49.80 a	83.63 \pm 64.75 a	36.94 \pm 52.49 a	67.11 \pm 21.80 a
	250	61.41 \pm 31.51 a	93.94 \pm 40.52 a	57.12 \pm 16.85 a	70.58 \pm 11.43 a
	500	69.00 \pm 17.29 a	95.84 \pm 28.45 a	70.66 \pm 52.16 a	75.79 \pm 43.28 a
FAkELi	62.5	31.25 \pm 31.29 a	14.10 \pm 2.05 a	2.66 \pm 11.80 a	3.47 \pm 6.57 b
	125	39.84 \pm 18.90 a	23.96 \pm 6.17 a	11.49 \pm 28.98 a	5.78 \pm 22.29 b
	250	60.21 \pm 20.02 a	88.33 \pm 63.55 a	14.08 \pm 14.14 a	69.14 \pm 13.38 a
	500	58.22 \pm 26.60 a	91.68 \pm 7.00 a	52.99 \pm 32.98 a	87.07 \pm 31.8 a

* Letras diferentes en cada columna muestran diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey).

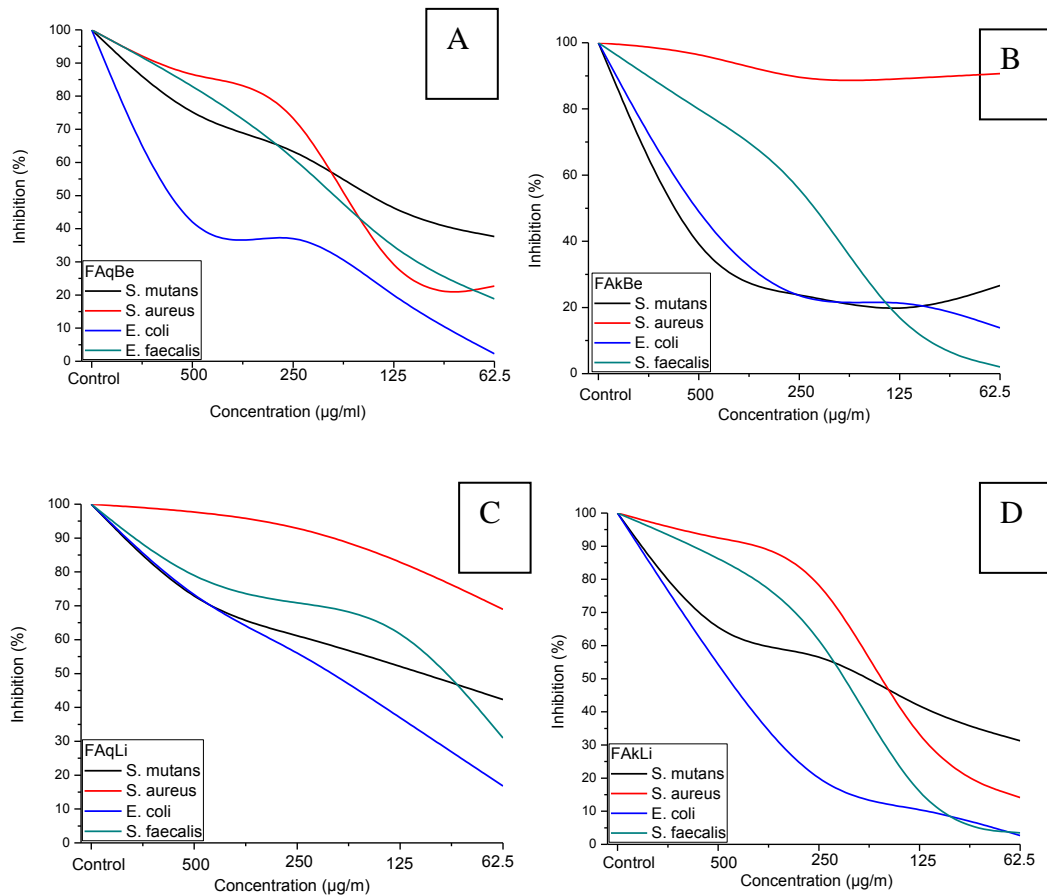


Figura 18. - Inhibición bacteriana por: A) Fracción acuosa de *Boletus edulis* (FAqEBe); B) Fracción alcalina de *B. edulis* (FAkEBe); C) Fracción acuosa de *Lactarius indigo* (FAqELi); y D) Fracción alcalina de *L. indigo* (FAkELi)

Es importante mencionar que en este estudio no hubo diferencias entre las fracciones acuosa y alcalina, excepto en las fracciones de *B. edulis* sobre *S. mutans*, a pesar de que existen varios estudios donde mencionan que la fracción acuosa normalmente presenta mayor bioactividad (Xiao et al., 2004), probablemente debido a una acción directa de los sobre la pared celular bacteriana. Sin embargo, se demostró un efecto de las concentraciones de β -glucanos (500, 250, 125 y 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de las fracciones acuosa y alcalina sobre la inhibición bacteriana.

Inhibición de la proliferación celular

La actividad antiproliferativa solo fue probada en β –glucanos presentes en el micelio cultivado de la cepa IE987, debido a que las demás cepas presentaron una baja TPB_{FEL} . Además, se probaron los en β –glucanos presentes en esporomas silvestres de *L. perlatum*, *B. edulis* y *L. índigo*.

Inhibición de la proliferación de micelio in vitro (Cepa IE987AM) de L. perlatum

Los β –glucanos de la fracción alcalina (FAkIE987AM) y la fracción acuosa (FAqIE987AM) presentaron un efecto contrario al esperado, debido a que estimularon la proliferación celular en las líneas Jurkat y K562 bajo todas las concentraciones, la FAqIE987AM alcanzó valores significativamente altos de 94.64 % de proliferación a $62.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ en K562 (tabla 3). Por otro lado, los fibroblastos HFFS WT fueron inhibidos bajo todas las concentraciones de FAkIE987 y FAqIE987, con valores de hasta el 27.70 % de inhibición a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FAqIE987. Asimismo, la línea HFFS ATM presentó inhibición únicamente en FAkIE987 a 125 y $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, en las demás concentraciones se observó proliferación con valores de hasta 88.29 % en FAqIE987 a $250 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Inhibición de la proliferación de esporomas silvestres de L. perlatum

En la línea celular K562, los β –glucanos insolubles en agua (FAkELp) y solubles en agua (FAqELp) presentaron inhibición de la proliferación a mayor concentración (500 y $250 \mu\text{g mL}^{-1}$) con valores de hasta 47.28 % (tabla 4), y proliferación a concentraciones más bajas (125 y $62.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) con valores de hasta 35.5 % de proliferación celular. En la línea celular Jurkat FAkELp mostró proliferación celular en todas las concentraciones con valores de hasta 56.10 % a $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, en cambio FAqELp inhibió la proliferación celular en todas las concentraciones. Respecto a los fibroblastos HFFS WT y HFFS ATM, la FAqELp y FAkELp presentaron inhibición de la proliferación de manera significativa únicamente en las concentraciones más altas (500 y $250 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Inhibición de la proliferación de esporomas silvestres de L. índigo

Los β –glucanos insolubles en agua FAKELi y solubles en agua FAqELi mostraron proliferación celular en K562 con valores de hasta 71.66% a 62.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a excepción de FAqELi a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (tabla 4). En Jurkat FAKELi inhibió la proliferación en todas las concentraciones hasta el 42.41 % a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que FAqELi inhibió la proliferación a 500 y 62.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, y estimuló la proliferación en 125 y 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Los fibroblastos HFFS WT no presentaron valores significativos de inhibición o proliferación celular, y HFFS ATM alcanzó valores de inhibición de 87.18 % en FAqELi a 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Inhibición de la proliferación de esporomas silvestres de B. edulis

Los β –glucanos de los precipitados insolubles en agua (FAKEBe) y solubles en agua (FAqEBe) inhibieron de manera significativa las líneas K562 y Jurkat bajo todas las concentraciones, especialmente FAqEBe con valores de hasta el 48 % de inhibición celular a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sobre Jurkat (tabla 3). Sin embargo, también mostraron una fuerte actividad inhibitoria en los fibroblastos, FAKEBe alcanzó valores de hasta el 70.35 % de inhibición a 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, y FAqEBe del 89.81 % de inhibición celular en HFFS ATM.

Tabla 4.- Inhibición de la proliferación celular de los β –glucanos en las líneas celulares

Concentración ($\mu\text{g/ mL}$)	Inhibición de la proliferación celular (%)			
	K562	Jurkat	HFFS WT	HFFS ATM
500	-1.16	63.70	-27.22	23.45
FAKIE987 250	10.42	54.95	-22.47	-4.09
125	27.72	58.60	-26.02	-1.36

	62.5	55.75	65.72	-8.48	9.74
	500	47.73	56.18	-27.70	26.18
FAqIE987	250	62.11	23.48	-6.27	88.20
	125	82.95	31.43	-25.50	72.60
	62.5	94.64	18.26	-10.83	36.47
	500	-47.28	31.90	-9.14	-39.34
FAkELp	250	-26.65	56.10	2.33	-49.10
	125	33.76	51.20	-5.32	-32.38
	62.5	35.55	40.47	-14.24	9.83
	500	-29.93	-28.10	-46.67	-64.68
FAqELp	250	-13.74	-19.35	-5.45	-58.77
	125	7.76	-17.62	5.02	1.40
	62.5	19.87	-5.01	3.17	-16.01
	500	13.80	-42.41	1.85	-63.33
FAkELi	250	3.69	-35.18	3.87	-39.10
	125	4.05	-39.86	-2.32	5.36
	62.5	17.28	-15.38	-6.09	30.86
	500	-51.21	-12.58	3.33	57.65
FAqELi	250	7.53	3.60	-5.74	-87.18
	125	35.74	15.45	-3.20	-29.24
	62.5	71.66	-31.95	-17.08	-19.51
	500				

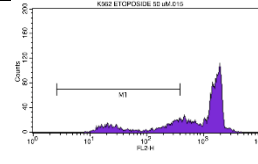
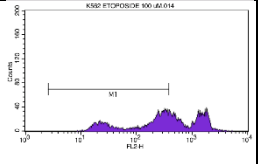
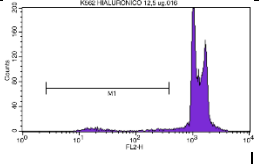
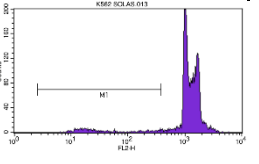
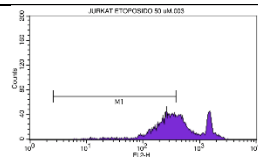
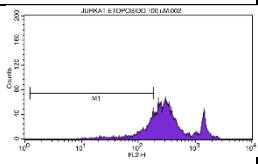
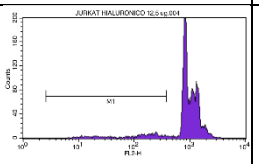
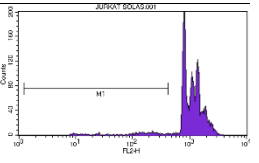
FAkEBe	500	-29.95	-47.59	-23.51	-12.09
	250	-12.43	-32.00	-30.52	-33.17
	125	-20.68	-36.36	-29.14	-70.35
	62.5	-14.21	-36.30	-33.12	4.94
FAqEBe	500	-45.01	-48.00	-70.46	-29.76
	250	-45.73	-30.52	-56.03	-54.08
	125	-43.83	-25.69	-44.73	-89.81
	62.5	-40.50	-54.71	-36.23	9.49

Valores negativos representan inhibición de la proliferación

Análisis del ciclo celular

Como se muestra en la tabla 4 el comportamiento de las células sin tratamiento no presenta modificaciones en la fase G1 del ciclo celular con una M1 (células en sub G1) entre el 3.57 y 5.38 %, el ácido hialurónico muestra una M1 similar a las células sin tratar, por lo que posiblemente no existe una proliferación celular. Por otro lado, el etopósido muestra cambios significativos en la fase G1 y aumenta la concentración de células en sub G1 (apoptosis) alcanzando el 35.22 % a 100 μ M.

Tabla 5.- Análisis de ciclo celular de los controles

	Etopósido		Ác Hialurónico	
	50 μ M	100 μ M	12.5 μ g/ mL	Solas
K562	 <p>M1: 21.14%</p>	 <p>M1: 35.22%</p>	 <p>M1: 3.83%</p>	 <p>M1: 5.38%</p>
Jurkat	 <p>M1: 35.96%</p>	 <p>M1: 16.71%</p>	 <p>M1: 6.30%</p>	 <p>M1: 3.57%</p>

Análisis de ciclo celular de K562 y Jurkat con β –glucanos del micelio in vitro (Cepa IE987AM) de L. perlatum

El análisis de ciclo celular muestra que no existe inducción a la apoptosis o necrosis de las células K562 o Jurkat en ninguna de las dos fracciones (FAkIE987 y FAqIE987) (tabla 6) debido a que las células en sub G1 se encuentran en el rango del control.

Análisis de ciclo celular de K562 y Jurkat con β –glucanos de esporomas silvestres de L. perlatum

A diferencia del comportamiento de los β –glucanos presentes en el micelio *in vitro* los β –glucanos presentes esporomas silvestres presentaron una M1 significativa de células en sub G1 (apoptosis o necrosis), FAkELp presentó el 8.95 % en sub G1 de K562 a 500 μ g mL⁻¹ (tabla 6), mientras que en Jurkat fue de 18.98 % a 125 μ g/ mL. Asimismo, FAqELp presentó valores incluso mayores que el etopósido, en Jurkat a 125 μ g/ mL alcanzó un valor del 86.56 % de células en sub G1, y en K562 a 125 μ g/ mL mostró una M1 de 4.47%, sin embargo, cambio por completo la fase G1.

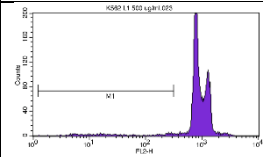
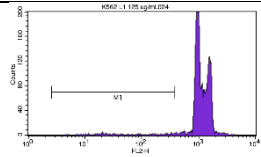
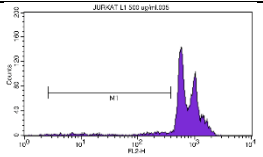
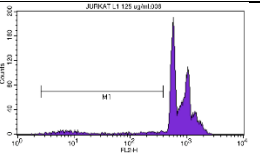
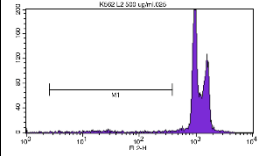
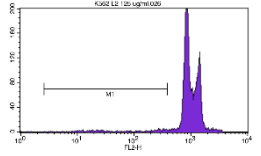
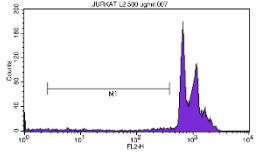
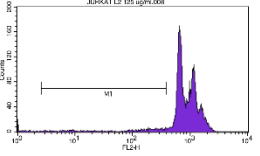
Análisis de ciclo celular de K562 y Jurkat con β –glucanos de esporomas silvestres de L. indigo

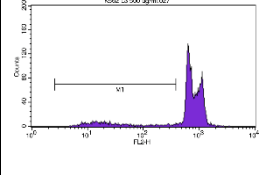
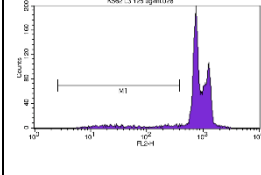
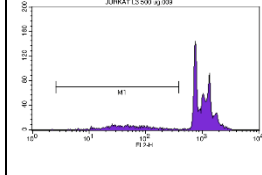
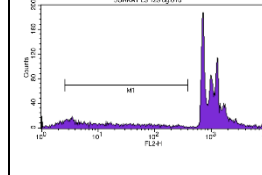
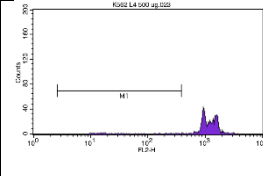
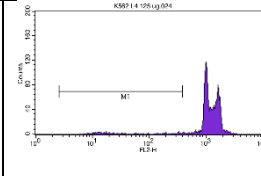
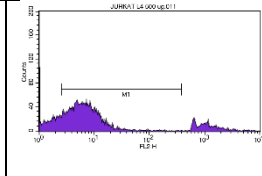
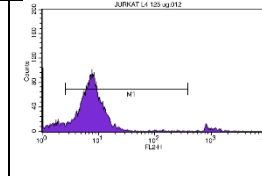
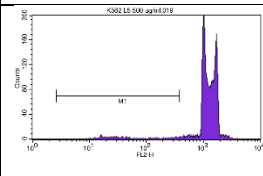
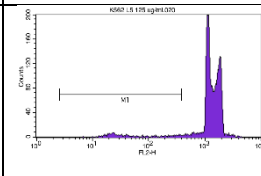
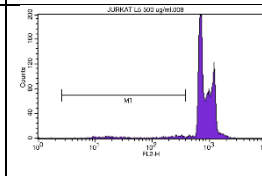
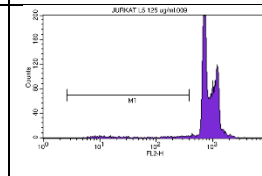
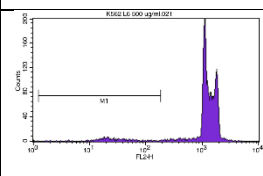
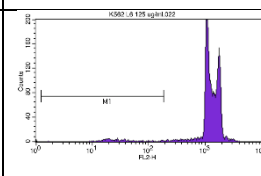
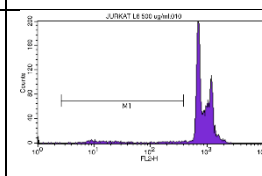
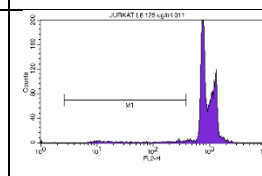
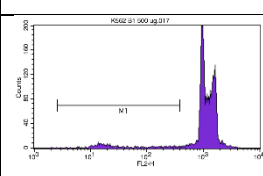
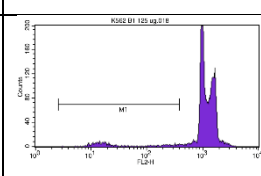
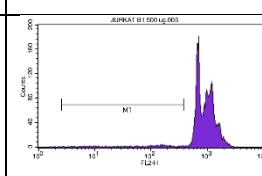
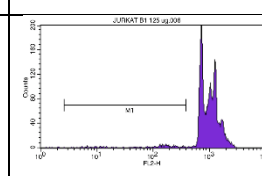
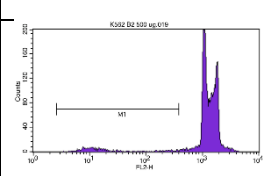
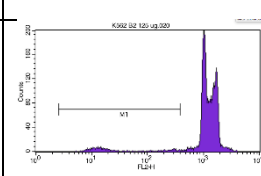
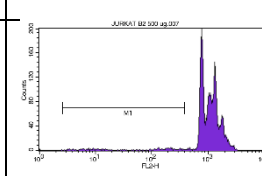
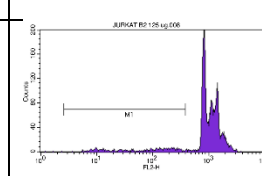
El ciclo celular de K562 y Jurkat tratadas con β –glucanos solubles e insolubles en agua FAqELi y FAKELi en ambas concentraciones (tabla 6) no mostraron modificaciones en el ciclo celular, además las células en sub G1 no pasaron del 3.66 %.

Análisis de ciclo celular de K562 y Jurkat con β –glucanos de esporomas silvestres de B. edulis

Los β –glucanos de la fraccion soluble en agua FAqEBe e insoluble en agua y FAKeBe no presentaron modificaciones del ciclo celular, las células en sub G1 fueron mínimas con valores inferiores al 6.75 % alcanzado por FAqBe a 125 μ g/ mL sobre Jurkat (tabla 6), por lo que los mecanismos de acción de los β –glucanos no son mediante la induccion a apoptosis o necrosis.

Tabla 6.- Análisis de ciclo celular de las líneas celulares K562 y Jurkat

	K562		Jurkat	
	500 μ g/ mL	125 μ g/ mL	500 μ g/ mL	125 μ g/ mL
FAkIE987	 <p>M1: 2.98%</p>	 <p>M1: 2.02%</p>	 <p>M1: 5.37%</p>	 <p>M1: 6.42%</p>
FAqIE987	 <p>M1: 3.86%</p>	 <p>M1: 2.76%</p>	 <p>M1: 4.80%</p>	 <p>M1: 4.33%</p>

FAkELp	 <p>M1: 8.95%</p>	 <p>M1: 5.82%</p>	 <p>M1: 7.81%</p>	 <p>M1: 18.98%</p>
FAqELp	 <p>M1: 4.47%</p>	 <p>M1: 4.19%</p>	 <p>M1: 65.74%</p>	 <p>M1: 86.56%</p>
FAkELi	 <p>M1: 3.53%</p>	 <p>M1: 3.66%</p>	 <p>M1: 3.13%</p>	 <p>M1: 2.53%</p>
FAqELi	 <p>M1: 3.39%</p>	 <p>M1: 2.51%</p>	 <p>M1: 3.55%</p>	 <p>M1: 2.50%</p>
FAkEBe	 <p>M1: 5.34%</p>	 <p>M1: 5.15%</p>	 <p>M1: 2.95%</p>	 <p>M1: 2.27%</p>
FAqEBe	 <p>M1: 4.83%</p>	 <p>M1: 4.81%</p>	 <p>M1: 2.56%</p>	 <p>M1: 6.75%</p>

La bioactividad de los β -glucanos se debe a su alta afinidad para unirse a los receptores de la superficie de células inmunes (Khan *et al.*, 2018), sirviendo de precursores para la potencialización de citoquinas producidas por los linfocitos para la maduración, diferenciación y proliferación de las células inmunocompetentes para los mecanismos de defensa (Hamuro, 1985). En este estudio la línea celular Jurkat (células de leucemia linfoide) tratada con β -glucanos presentes en los precipitados FAKIE987 y FAQIE987 aumento la proliferación celular en todas las concentraciones, dado que los β -glucanos podrían estimular la maduración de linfocitos. Debido a lo mencionado anteriormente *L. perlatum* podría presentar una potencial actividad como cicatrizante y en el tratamiento e heridas, actividad atribuida tradicionalmente a esta especie (Guzmán, 1994; Guzmán, 2008; y Novaković *et al.*, 2015).

Por otra parte, la inhibición de la proliferación celular de Jurkat y K562 solamente fue significativa en algunos precipitados de las fracciones. Sin embargo, de acuerdo a la evaluación del ciclo celular se demostró que la inhibición de la proliferación celular no se debe a la inducción de apoptosis o necrosis, a excepción de FAKELp y FAQELp que presento inducción a la apoptosis. En cambio, Endo *et al.* (2010) menciona que la bioactividad de los β -glucano puede deberse tambien a un efecto directo sobre las celulas. En el caso de los β -glucanos de los precipitados FAQELp, FAKELp, FAKMIE988, FAQMGd, FAKMGd y FAQEBe, podrían estar acoplados a una proteína, este complejo β -glucano – proteína podría inhibir la proliferación celular sin necesidad de inducir apoptosis. De acuerdo a Chen y Seviour (2007) los β -glucanos tienen la capacidad de formar estructuras supramoleculares capaces de aumentar la bioactividad mediante la formación de estructuras secundarias. Sirva de ejemplo las glicoproteínas aislados de *B. edulis* que presentan un efecto antiproliferativo muy prominente en las células de cáncer de colon (Lemieszek *et al.*, 2013); así como la calvacina, una glicoproteína presente en los esporomas y micelio cultivado *in vitro* de algunas especies del hongo *Calvatia* de la familia Lycoperdacea, a la cual se le atribuyen propiedades anticancerígenas (Beneke, 1963).

La inhibición de la proliferación celular podría verse afectada de manera directa por las propiedades fisicoquímicas de los β -glucanos como: La conformación helicoidal de los β -glucanos, de acuerdo a (Zhang *et al.*, 2005) está determina su papel en el reconocimiento

biológico dentro de las células, aumentando o disminuyendo su potencial actividad anticancerígena. Otras propiedad de los β -glucanos que podría influir en su bioactividad es el grado de ramificación, Nieto-Ramírez *et al.* (2012) y Bae *et al.* (2000) mencionan que el grado de ramificación estimula la formación de estructuras terciarias aumentando la actividad anticancerígena. Igualmente, el alto peso molecular de los β -glucanos podría potenciar o disminuir el efecto anticancerígeno (Rop *et al.*, 2009).

Respecto a proliferación de los fibroblastos (HFFS WT y HFFS ATM) utilizados como control para evaluar citotoxicidad, los β -glucanos presentes en precipitados solubles e insolubles en agua de esporomas, inhibieron su proliferación celular, mostrando un posible efecto citotóxico. A excepción de FAqIE987 y FAkIE987 que estimularon la proliferación de la línea HFFS ATM significativamente. Los cuales podrían ejercer un efecto directo al igual que en las células K562 y Jurkat.

VI.- CONCLUSIONES

El cultivo *in vitro* de hongos comestibles con potencial terapéutico como de *L. perlatum* y *G. dryophilus* es una alternativa viable para la obtención de metabolitos de interés biotecnológico como los β -glucanos, ya que la obtención de β -glucanos *in vitro* es similar a la de cuerpos fructíferos silvestres. Sin embargo, se pueden controlar variables de cultivo *in vitro* para minimizar el tiempo de producción y posibles contaminantes e impurezas, además, el material biológico sin depender de su presencia en los bosques, ayudando al manejo y conservación de este recurso en los bosques.

Por otro lado, la presencia de β -glucanos tanto en el micelio *in vitro* como en los cuerpos fructíferos obtenidos son mayores en fracción alcalina. Además de esto, los β -glucanos de esta fracción alcalina se pueden acoplar a una proteína, formando una glicoproteína bioactiva no descrita previamente.

Los β -glucanos presentes en los precipitados solubles e insolubles en agua de esporomas silvestres de *L. perlatum*, *L. indigo* y *B. edulis* mostraron una ligera actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares Jurkat y K562, no obstante, también inhibieron la proliferación celular de las líneas HFFS WT y HFFS ATM, mostrando un posible efecto citotóxico.

Por otra parte, los β -glucanos presentes en los precipitados del micelio *in vitro* solubles e insolubles en agua de la cepa IE987 FrAkM y FrAqM, estimularon significativamente la proliferación celular de las líneas Jurkat, K562 y HFFS ATM, mostrando un efecto contrario al reportado como anticancerígenos. Sin embargo, podría tener una posible actividad cicatrizante y para el tratamiento de heridas. La actividad demostrada por los β -glucanos presentes en esporomas y micelio *in vitro* (proliferación/ inhibición de la proliferación) sobre las células cancerígenas, se debe a un efecto directo de las propiedades fisicoquímicas de los β -glucanos sobre las células, dado que no presentan un mecanismo para inducir a la apoptosis o necrosis celular.

Los β -glucanos obtenidos de los cuerpos fructíferos silvestres de *B. edulis* y *L. indigo* mostraron una fuerte actividad antibacteriana sobre las principales bacterias del medio, *S. mutans*, *S. aureus*, *E. coli* y *E. faecalis*. En general, el mayor porcentaje de inhibición ocurrió bajo las concentraciones más altas (500 y 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de las fracciones acuosa y alcalina, encontrándose un efecto de las concentraciones de estas fracciones sobre la inhibición bacteriana.

VII.- ARTÍCULOS ENVIADOS



ISSN: 2594-1321

Editor in Chief: Gerardo Mata

Associated Editors: Dulce Salmones, Rosario Medel, Martín Esqueda,
Jesús Pérez Moreno, José Ernesto Sánchez

<http://www.scientiafungorum.org.mx>

Xalapa, Veracruz, México 8 de octubre de 2021.

Dra. Cristina Burrola Aguilar
Universidad Autónoma del Estado de México
Toluca, Estado de México
Presente

Estimada Dra. Burrola Aguilar:

Por este medio tengo el agrado de informarle que su trabajo registrado con el número SF 1409 y titulado "Obtención de β -glucanos de cuerpos fructíferos silvestres y micelio in vitro de *Lycoperdon perlatum*", cuyos autores son: César Díaz Talamantes, Cristina Burrola Aguilar, María Elena Estrada Zúñiga y Carmen Zepeda Gómez, ha sido aceptado para publicación en Scientia Fungorum. Su contribución aparecerá en el volumen 52, correspondiente a 2021.

Sin otro particular, agradezco a nombre del Comité Editorial de Scientia Fungorum el apoyo que nos brinda al enviarnos los resultados de sus investigaciones.

Con un atento saludo



Dr. Gerardo Mata
Editor en Jefe



Dr. Angel Rolando Cadena Agrasment
Representante de Área de Investigación
Conservación y Manejo de Recursos Naturales

Asociación Mexicana para el Estudio de los Hongos
(antes Sociedad Mexicana de Micología)
Xalapa, Veracruz, México
e-mail: gerardo.mata@inecol.mx

Obtención de β -glucanos de esporomas silvestres y micelio *in vitro* de *Lycoperdon perlatum*

Obtaining of β -glucans from wild sporomas and *in vitro* mycelium of *Lycoperdon perlatum*

Resumen

Antecedentes: *Lycoperdon perlatum* es un hongo silvestre comestible valorado tradicionalmente como alimento nutritivo, con propiedades terapéuticas y medicinales, además de presentar potencial biotecnológico.

Objetivo: El objetivo fue evaluar la producción de β -glucanos en *L. perlatum* a partir del micelio producido *in vitro* y de esporomas silvestres.

Métodos: Se utilizó micelio propagado en fermentación en estado líquido (LSF) y esporomas silvestres recolectados en un bosque de *Pinus-Abies*. La biomasa de ambos materiales fúngicos se secó y procesó para obtener los β -glucanos mediante extracciones sucesivas en solución acuosa y alcalina. Los extractos fueron purificados y caracterizados por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

Resultados y conclusiones: Se encontró que los esporomas presentaron la mayor concentración de β -glucanos con 13.80 g de β -glucanos totales por 100 g de biomasa seca, de los cuales, 2.36 g de β -glucanos por 100 g de biomasa seca corresponden a la fracción acuosa y 11.58 g a la fracción alcalina. El micelio presentó 11.50 g de β -glucanos por 100 g de biomasa seca, de los cuales 1.40 g corresponden a fracción acuosa y 10.11 g corresponden a fracción alcalina. El espectro FTIR de los precipitados muestra las bandas características de un β -glucano.

Palabras clave: compuesto bioactivo, cultivo *in vitro*, hongo comestible, medio de cultivo no convencional, producción de biomasa

Abstract

Background: *Lycoperdon perlatum* is a wild edible mushroom traditionally valued as a nutritious food with therapeutic and medicinal properties with biotechnological potential.

Objetivos: The aim of this study was to evaluate the production of β -glucans from mycelium grown *in vitro* and from sporomas of wild *Lycoperdon perlatum*.

Methods: Mycelium was cultured *in vitro* by liquid state fermentation (LSF), while wild sporomas were collected from a forest of *Pinus* and *Abies*. The biomass of both fungal materials was dried and processed to extract the β -glucans by successive extraction in aqueous and alkaline solution. The extracts were subsequently purified and characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).

Results and conclusions: The sporomas presented a higher concentration of β -glucans, with 13.80 g of total β -glucans per 100 g of dry biomass, of which, 2.36 g correspond to an aqueous fraction and 11.58 g correspond to an alkaline fraction. The mycelium presented 11.50 g of β -glucans per 100 g of dry biomass, of which, 1.40 g correspond to an aqueous fraction, and 10.11 g correspond to an alkaline fraction. The FTIR spectrum of the four precipitates show the characteristic bands of a β -glucan.

Keywords: bioactive compound, biomass production, *in vitro* culture, unconventional culture medium, edible mushroom

Introducción

Los hongos comestibles se consideran alimentos funcionales ya que en su estructura contienen sustancias bioactivas como los β -glucanos (Wasser 2002), los cuales son considerados responsables de actividades biológicas benéficas para la salud humana como inmunomoduladores, anticancerígenos, antitumorales, entre otros (Reis *et al.* 2017). Debido a estos compuestos bioactivos, los hongos comestibles y medicinales se consideran una alternativa para el tratamiento de diversas enfermedades (Wail 2019).

Los β -glucanos se encuentran en la pared celular de los hongos (Basidiomycetes) (Khan *et al.* 2018), ya sea de los esporomas o del micelio (Arango y Nieto 2013). Los β -glucanos son polímeros compuestos de unidades de glucosa unidas por enlaces glicosídicos de tipo β (1 \rightarrow 3) y ramificaciones laterales unidas por enlaces β (1 \rightarrow 6) (Pizarro *et al.* 2014). A pesar de presentar una composición simple de monosacáridos, los β -glucanos muestran una gran variabilidad estructural (Synytsya y Novak 2014). Esta variabilidad estructural les confiere diferentes propiedades fisicoquímicas como: masa molecular, longitud de sus cadenas (Wasser 2002), solubilidad (Xiao *et al.* 2004), frecuencia de ramificación (Miyazaki *et al.*

1979), estructuras y conformación en solución (Khan *et al.* 2018), que son los responsables de la actividad biológica y, por tanto, de su efecto sobre la salud humana.

EL cultivo *in vitro* para producir el micelio, es una alternativa versátil y confiable para la obtención de biomasa mediante la recolección de esporomas de su entorno natural, ya que estas técnicas requieren menos espacio y tiempo de crecimiento, se reducen las posibilidades de contaminación (Bae *et al.* 2000; Abdullah *et al.* 2013) y se facilita la manipulación de las variables que afectan la producción, composición, calidad y eficiencia de la biomasa (Arango y Nieto 2013; Chegwin-Angarita y Nieto-Ramírez 2014).

Lycoperdon perlatum (Pers) 1796 (Lycoperdaceae) es un hongo comestible, valorado culturalmente como alimento de importancia nutricional en México (Burrola-Aguilar *et al.* 2012). Asimismo, en la medicina tradicional se le atribuyen propiedades curativas (Guzmán 1994) y se utiliza para tratar heridas, quemaduras, verrugas, picaduras de avispas o abejas (Guzmán 2008). Estudios científicos han demostrado que la actividad enzimática esterolítica de los esporomas silvestres de *L. perlatum* tiene aplicaciones en la síntesis de productos químicos para la industria farmacéutica (Colak *et al.* 2009), así como la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos de metanol (Ramesh y Pattar 2010) y actividad antiproliferativa en una línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 de extractos acuosos, etanólicos y hexánicos (Novaković *et al.* 2015). Sin embargo, existen pocos estudios relacionados con el cultivo *in vitro* y la bioactividad de los β -glucanos de *L. perlatum*. Debido al potencial biotecnológico que presenta *L. perlatum* y a los escasos estudios sobre la bioactividad de los compuestos presentes en esta especie, este trabajo tiene el objetivo de evaluar la producción de fracciones acuosas y alcalinas de β -glucanos a partir de micelio cultivado *in vitro* y en esporomas silvestres de *L. perlatum*.

Materiales y métodos

Obtención de biomasa

Material biológico: El micelio de *L. perlatum* se obtuvo a partir de la cepa IE987 depositada en el Instituto de Ecología A. C. Asimismo, se utilizaron esporomas silvestres de *L. perlatum*, recolectados de bosques de *Abies-Pinus* a 3100-3400 msnm, en junio-agosto de 2019 en un bosque de alta montaña del Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca (APFFNT), México.

Cultivo *in vitro*

Se inocularon discos impregnados con micelio de la cepa IE987 de *L. perlatum* (Díaz-Talamantes *et al.* 2017) en matraces de 500 mL con 300 mL de caldo de cultivo de maíz (formulado con 15 g L⁻¹ de harina de maíz, 2 g L⁻¹ de extracto de levadura y 1 g L⁻¹ de peptona gelatina). Posteriormente, los matraces se incubaron durante 28 días bajo un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, pH 6.4, agitación orbital a 150 rpm y una temperatura de 20 °C. Una vez finalizado el periodo de incubación, se filtró el micelio del caldo de cultivo, se lavó con agua destilada y se secó en un horno a 30 °C durante 48 horas. Se calculó la tasa de producción de biomasa (TPB, ecuación 1) y el contenido de agua (% de agua, ecuación 2). Finalmente, se utilizó la biomasa seca (BS) para la extracción de β-glucanos.

$$TPB = \frac{\text{Peso seco de la biomasa final (g)} - \text{peso seco de la biomasa inicial (g)}}{\text{volumen del medio (L)} * \text{tiempo de incubación (días)}}. \quad \text{EC. 1}$$

$$\% \text{ de agua} = \frac{\text{Peso seco de la biomasa inicial (g)} - \text{peso seco de la biomasa final (g)}}{\text{peso seco de la biomasa inicial (g)}} 100 \text{EC. 2}$$

Esporomas

Los esporomas frescos (38.72 g) se caracterizaron e identificaron taxonómicamente de acuerdo a Franco-Maass *et al.* (2012). Posteriormente, se secaron en una estufa a 30 °C durante 48 horas, se calculó el contenido de agua (ecuación 2) y se molieron para obtener un polvo, que se utilizó para la extracción de β-glucanos.

Extracción y purificación de β-glucanos

Macerado de biomasa

La biomasa seca del micelio (1.70 g) y de los esporomas (5.82 g) se colocaron independientemente en un recipiente con 10 volúmenes de etanol al 70 % durante 24 horas; este procedimiento se realizó dos veces (Carbonero *et al.* 2006). Posteriormente, se eliminó el etanol mediante un filtro de papel de poro grueso y se recuperó la biomasa.

Extracción acuosa

La biomasa recuperada (micelio y esporomas) de la maceración se colocó en 10 volúmenes de agua destilada y la extracción se realizó en autoclave a 121 °C durante 60 min (Klaus *et al.* 2011). El extracto resultante se colocó en una parrilla a 100 °C durante una hora para disminuir el volumen de agua (Smiderle *et al.* 2013). Posteriormente, la biomasa se filtró sobre un papel de filtro con un poro de 125 μm, obteniendo una fracción acuosa en el filtrado y la biomasa sobrante en el residuo.

Extracción alcalina

La biomasa recuperada (micelio y esporomas) de la extracción acuosa se colocó en un recipiente con 10 volúmenes de una solución alcalina de NaOH al 2 % (p/v) con 0.1 % de NaBH₄; la solución con la biomasa se calentó a 80 °C durante 4 horas. Posteriormente se agregó ácido acético al 99.9 % gota a gota hasta obtener un pH neutro (Klaus *et al.* 2011). La biomasa se filtró sobre un papel de filtro de poros de 125 µm. Con esto se obtuvo una fracción alcalina en el filtrado (Mizuno *et al.* 1992) y se descartó el residuo de biomasa.

Precipitación de fracciones con etanol y congelación-descongelación

La fracción acuosa y la fracción alcalina se colocaron individualmente en un recipiente con 3 volúmenes de etanol frío (Smiderle *et al.* 2013) para deshidratar los polisacáridos y generar un precipitado, el cual fue recuperado (Mizuno *et al.* 1992; Carbonero *et al.* 2006). El precipitado obtenido de cada fracción contenía una cantidad significativa de residuos del proceso de extracción (agua y NaOH), por lo que se congeló y descongeló lentamente a temperatura ambiente; este proceso se repitió varias veces hasta que no hubo precipitado del sobrenadante. El precipitado se recuperó y se centrifugó a 8000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 15 °C (Smiderle *et al.* 2013). El precipitado de la centrifugación se filtró sobre una membrana de acetato de celulosa con un poro de 0.2 µm. Finalmente, se obtuvieron cuatro precipitados: fracción acuosa de micelio (FAqM), fracción alcalina de micelio (FAkM), fracción acuosa de esporomas (FAqBF) y fracción alcalina de esporomas (FAkBF). Estos precipitados se utilizaron para su identificación.

Identificación de fracciones

Una muestra de cada fracción (0.1 g) se secó en estufa a 30 °C durante 48 horas hasta obtener cristales, los cuales se caracterizaron por FTIR bajo una absorbancia en el rango de 400- 4000 cm⁻¹ mediante la técnica de disco KBr (Mizuno *et al.* 1992; Klaus *et al.* 2011) para identificar la presencia de enlaces característicos de los β-glucanos correspondientes a OH en 3200 cm⁻¹, CH en 2922 cm⁻¹, CO en 1644 cm⁻¹ (Alzorqi *et al.* 2017), además de las regiones asociadas a azúcares en un intervalo de 1200 cm⁻¹ a 950 cm⁻¹ y la región anomérica que va de 950 cm⁻¹ a 750 cm⁻¹ (Synytsya y Novak 2014).

Resultados

Obtención de biomasa

El cultivo de micelio *in vitro* presentó un peso fresco de 40.87 g con 96.5 % de contenido de agua y BPR de 0.04 g L⁻¹ día⁻¹.

Los esporomas de *L. perlatum* son pseudoestipitados redondos, de 3.5-7.5 μm de largo, de color blanco y crema, su hábitat suele ser terrícola o húmica, crece en bosques de *Abies-Pinus* a altitudes de 3100-3400 metros. Los esporomas presentaron un peso fresco de 38.72 g con 84.89 % de contenido de agua. Microscópicamente presentan basidiosporas de (3.0-) 3.77 (-4.0) μm , redondas y ligeramente espinuladas, correspondientes a las características de la especie (Franco-Maass *et al.* 2012).

Extracción y purificación de β -glucanos

El contenido total de β -glucanos presentes en el micelio fue de 11.50 g de β -glucanos por 100 g de biomasa seca, de los cuales 1.40 g de β -glucanos por 100 g de biomasa seca corresponden a FrAqM y 10.11 g de β -glucanos por 100 g de biomasa seca corresponden a FrAkM. En cuanto a los esporomas, se obtuvieron 13.80 g de β -glucanos totales por 100 g de biomasa seca, de los cuales, 2.36 g de β -glucanos por 100 g de biomasa seca corresponden a FrAqBF y 11.58 g de β -glucanos por 100 g de biomasa seca corresponde a FrAkBF.

Identificación de fracciones

Los espectros FTIR obtenidos de las fracciones correspondientes a FrAqM, FrAkM (Figura 1), FrAqBF y FrAkBF (Figura 2) concuerdan con el espectro de un β -glucano (Movasaghi *et al.* 2008), debido a que se observan las bandas características: una banda a 3200 cm^{-1} correspondiente a la región de las vibraciones de los enlaces OH, una banda correspondiente a 2922 cm^{-1} que se atribuye a la presencia de enlaces CH saturados (Figura 1 y 2) (Šandula *et al.* 1999). El espectro de FrAqBF, FrAkBF (Figura 2) y FrAkM (Figura 1) mostró una señal de absorción a 1644 cm^{-1} , que está relacionada con las vibraciones de estiramiento del enlace CO (carbonilo) de un complejo polisacárido-proteína (Alzorqi *et al.* 2017), debido a esto, los β -glucanos de estas fracciones podrían acoplarse a una proteína. Asimismo, las cuatro fracciones (Figura 1 y 2) presentan las dos regiones fundamentales de los β -glucanos, la "región de azúcar" que va desde 1.200 cm^{-1} a 950 cm^{-1} y la "región anomérica" que va desde 950 cm^{-1} a los 750 cm^{-1} (Synytsya y Novak 2014). En estas regiones, se observan las bandas características de los enlaces carbono-glucósido del β -glucano correspondientes a 1160, 1080, 1040, 970 y 890 cm^{-1} (Alzorqi *et al.* 2017). Por otro lado, en los espectros de las cuatro fracciones se observa una señal que va de 1160 a 1147 cm^{-1} . Münzberg *et al.* (1995) menciona que esta señal representa el estiramiento del enlace glucosídico COC, donde la señal en 1040 cm^{-1} corresponde al estiramiento de CO. También menciona que la

disminución de la señal de absorción a 1080 cm^{-1} y la desaparición de la señal a 890 cm^{-1} en las fracciones alcalinas FrAkM (Figura 1) y FrAkBF (Figura 2) debe ser una degradación del polisacárido en la base cadena.

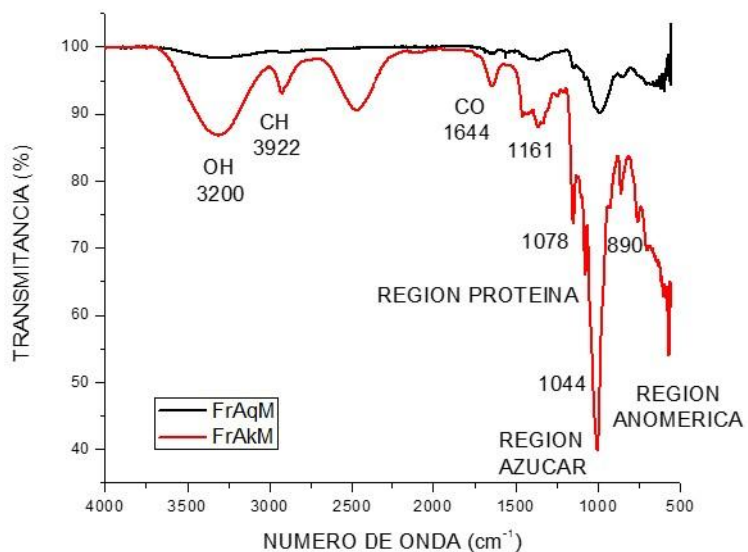


Figura 1.- Espectro FTIR de la fracción acuosa de micelio (FrAqM) y fracción alcalina del micelio (FrAkM) de *L. perlatum*.

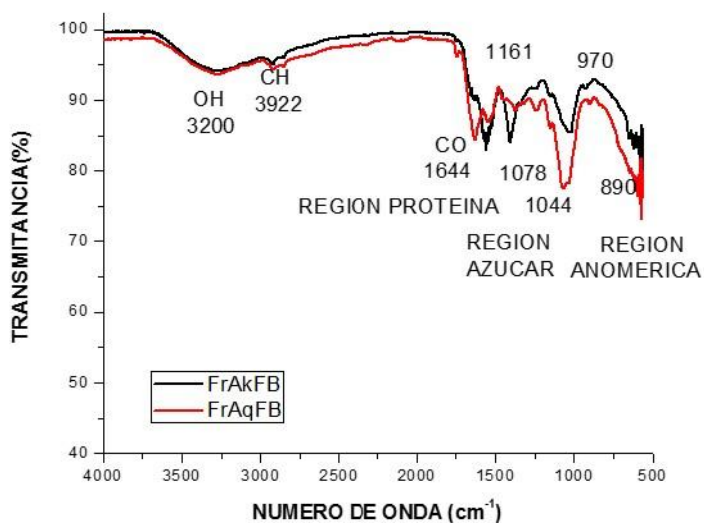


Figura 2.- Espectro FTIR de la fracción acuosa de esporomas (FrAqFB) y fracción alcalina de esporomas (FrAkFB) de *L. perlatum*.

La producción de β -glucanos en las fracciones obtenidas es similar entre el micelio y los esporomas. Sin embargo, se observa una mayor producción de β -glucanos en el FrAkM y FrAkBF correspondientes a la fracción alcalina.

Discusión

Actualmente existe una demanda creciente de hongos comestibles silvestres que brindan beneficios a la salud humana (Wasser 2002) como es el caso de *L. perlatum*. Además, es relevante destacar que existen pocos estudios relacionados con el cultivo *in vitro* de esta especie y en general de la familia Lycoperdaceae. Por tanto, es de gran importancia realizar más estudios biotecnológicos para la selección de cepas y optimización de las condiciones de cultivo *in vitro* (Song *et al.* 1998).

La producción *in vitro* de micelio de *L. perlatum* se vio afectada por diferentes factores como: el medio de cultivo utilizado a base de harina de maíz. Según Chegwin-Angarita y Nieto-Ramírez (2014) las fuentes de carbono no convencionales como las harinas de cereales tienden a incrementar la producción de biomasa. Wang *et al.* (2005) menciona que la relación carbono-nitrógeno para mejorar la producción de biomasa de hongos oscila entre 40:1; similar al que presenta un medio a base de harina de maíz (Chegwin-Angarita y Nieto-Ramírez 2014). Por ello, la relación carbono-nitrógeno proporcionada por el medio de cultivo utilizado podría ayudar a maximizar la producción de biomasa. Otros factores de importancia para el cultivo *in vitro* de *L. perlatum* son la temperatura entre 18 y 25 °C, y el pH mayor a 5.8 (Díaz-Talamantes *et al.* 2017). En este estudio, el crecimiento micelial mantuvo las condiciones óptimas para la producción de biomasa, la temperatura fue de 20 °C y el pH disminuyó de 6.4 a 6.1.

El contenido de agua es una variable primordial en la producción de metabolitos estructurales, ya que está directamente relacionado con el contenido de biomasa seca (Arango y Nieto 2013). Según Rathore *et al.* (2017) aproximadamente la mitad de la biomasa en peso seco de la pared celular de los basidiomicetos está constituida por metabolitos estructurales entre ellos β -glucanos. En este estudio, el micelio presentó 96.5 % de contenido de agua y los esporomas un 84.89 %, por lo que, los esporomas presentaron una mayor concentración de β -glucanos en la biomasa seca.

La producción de β -glucanos totales presentes en las fracciones de micelio (11.50 g de β -glucanos por 100 g de BS) y esporomas (13.80 g de β -glucanos por 100 g de BS) se

encuentran en el rango reportado, como lo sugiere Sari *et al.* (2017), donde el contenido de β -glucanos en esporomas silvestres de *L. perlatum* fue de 15.48-19.749 g de β -glucanos por 100 g de BS.

Además, la concentración de β -glucanos presentes en las fracciones alcalinas FrAkM y FrAkBF fue mayor que la fracción acuosa FrAqM y FrAqBF. Según Tseng *et al.* (2008) esto se debe a que en el proceso de extracción las paredes celulares se degradan y los compuestos insolubles en agua se transforman en componentes solubles. Sin embargo, es importante mencionar que la fracción acuosa de β -glucanos normalmente tiene mayor bioactividad que las insolubles (Xiao *et al.* 2004).

Existen otros factores que pueden afectar la producción de biomasa y β -glucanos presentes en esporomas y micelio *in vitro*. De acuerdo a Papaspyridi *et al.* (2010) el micelio representa la fase vegetativa del hongo, mientras que los esporomas la fase reproductiva, y la función estructural de los β -glucanos en la pared celular varía en cada fase. De la misma manera, la producción de biomasa y la bioactividad de los β -glucanos también se ven afectada por la fuente de nutrientes. Según Ooi y Liu (2000) el sustrato natural donde se desarrollan los esporomas silvestres puede contener compuestos polifenólicos que inducen la síntesis de β -1,3-glucano sintasa, aumentando la producción de β -glucanos.

Reís (2012) menciona que los esporomas normalmente presentan mayor bioactividad que los sistemas *in vitro*, debido a que la composición química varía en relación a los nutrientes del sustrato.

Lycoperdon perlatum es un hongo saprobio (Rinaldi *et al.* 2008) tradicionalmente valorado como hongo medicinal (Guzmán 2008), se ha demostrado que es una especie viable para el cultivo *in vitro* (Díaz-Talamantes *et al.* 2017). Es importante desarrollar más estudios para conocer las variables que permitan maximizar la producción de biomasa y β -glucanos, como por ejemplo el medio de cultivo, fuente de carbono, pH, temperatura y disponibilidad de oxígeno; además de la bioactividad de los β -glucanos y posibles aplicaciones medicinales, farmacéuticas y nutricionales; y conservación y manejo del recurso en su hábitat natural. Así mismo, es importante resaltar que existe una gran variabilidad en la estructura de β -glucanos presentes en hongos (Synytsya y Novak 2014), debido a esto, los β -glucanos de algunas especies presentan mayor bioactividad, especialmente aquellas especies con propiedades medicinales como *L. perlatum*.

Conclusiones

El cultivo *in vitro* de *Lycoperdon perlatum* es una alternativa viable para para la producción de metabolitos de interés biotecnológico como los β -glucanos, debido a que la producción de biomasa en fermentación en estado líquido presenta una concentración de β -glucanos similar a la de los esporomas. Además, en el cultivo *in vitro* es posible controlar factores y variables que afectan la producción y calidad de biomasa y de β -glucanos, así como contar con el material biológico sin depender de su recolección, ayudando al manejo y conservación de este recurso en los bosques.

Por otro lado, la presencia de β -glucanos obtenidos tanto en el micelio *in vitro* como en los esporomas, son mayores en la fracción alcalina, esto debido a que el proceso de extracción se realiza con una solución salina que es más agresiva con la pared celular facilitando así su extracción.

Estos compuestos bioactivos son de gran importancia para futuras investigaciones médicas como inmunomoduladores, tratamiento contra diferentes tipos de cáncer y tumores, además de su aplicación como nutraceuticos en la industria alimentaria.

Referencias

- Abdullah N, Ismail R, Johari NMK, Annuar M. 2013. Production of liquid spawn of an edible grey oyster mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél by submerged fermentation and sporophore yield on rubber wood sawdust. *Scientia horticulturae* 161, 65-69. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.06.026>
- Alzorqi I, Sudheer S, Lu TJ, Manickam S. 2017. Ultrasonically extracted β -d-glucan from artificially cultivated mushroom, characteristic properties and antioxidant activity. *Ultrasonics sonochemistry* 35, 531-540. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.04.017>
- Arango CS, Nieto IJ. 2013. Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Revista Iberoamericana de Micología* 30, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2012.03.011>
- Bae JT, Sinha J, Park JP, Song CH, Yun JW. 2000. Optimization of submerged culture conditions for exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 10, 482-487. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-5841-x>
- Burrola-Aguilar C, Montiel O, Garibay-Orijel R, Zizumbo-Villarreal L. 2012. Conocimiento tradicional y aprovechamiento de los hongos comestibles silvestres en la región de Amanalco, Estado de México. *Revista Mexicana de Micología* 35, 01-16.
- Carbonero ER, Gracher AHP, Smiderle FR, Rosado FR, Sasaki GL, Gorin PA, Iacomini M. 2006. A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus*

ostreatoroseus. Carbohydrate Polymers 66, 252-257.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.03.009>

Černá M, Barros AS, Nunes A, Rocha SM, Delgadillo I, Čopíková J, Coimbra MA. 2003. Use of FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives. Carbohydrate Polymers 51, 383-389. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00259-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00259-X)

Colak A, Camedan Y, Faiz O, Sesli E, Kolcuoğlu Y. 2009. An esterolytic activity from a wild edible mushroom, *Lycoperdon perlatum*. Journal of Food Biochemistry 33, 482-499. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2009.00232.x>

Chegwin-Angarita C, Nieto-Ramírez JJ. 2014. Effect of non-conventional carbon sources on the production of triterpenoids in submerged cultures of *Pleurotus* macrofungi. Journal of the Chilean Chemical Society 59, 2287-2293. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072014000100010>

Díaz-Talamantes C, Burrola-Aguilar C, Aguilar-Miguel X, Mata G. 2017. Crecimiento miceliar *in vitro* de hongos comestibles silvestres de alta montaña en el centro de México. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 23, 369-383. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2016.12.067>

Franco Maass S, Burrola Aguilar C, Arana Gabriel Y. 2012. Hongos silvestres comestibles: un recurso forestal no maderable del Nevado de Toluca. EON, México

Guzmán G. 1994. Los hongos en la medicina tradicional de Mesoamérica y de México. Revista Iberoamericana de Micología 11, 81-85.

Guzmán G. 2008. Diversity and use of traditional Mexican medicinal fungi. A review. International Journal of Medicinal Mushrooms 10(3), 209-217
<https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v10.i3.20>

Khan AA, Gani A, Khanday FA, Masoodi F. 2018. Biological and pharmaceutical activities of mushroom β -glucan discussed as a potential functional food ingredient. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre 16, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2017.12.002>

Klaus A, Kozarski M, Niksic M, Jakovljevic D, Todorovic N, Van Griensven LJ. 2011. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharides extracted from the basidiomycete *Schizophyllum commune*. LWT-Food Science and Technology 44, 2005-2011. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.05.010>

Miyazaki T, Oikawa N, Yadomae T, Yamada H, Yamada Y, Hsu HY, Ito H. 1979. Relationship between the chemical structure and anti-tumour activity of glucans prepared from *Grifora umbellata*. Carbohydrate Research 69, 165-170. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(00\)85761-4](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(00)85761-4)

Mizuno T, Ando M, Sugie R, Ito H, Shimura K, Sumiya T, Matsuura A. 1992. Antitumor activity of some polysaccharides isolated from an edible mushroom, Ningyotake, the fruiting body and the cultured mycelium of *Polyporous confluens*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 56, 34-41. <https://doi.org/10.1271/bbb.56.34>

Movasaghi Z, Rehman S, Rehman DI. 2008. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews* 43, 134-179. <https://doi.org/10.1080/05704920701829043>

Münzberg J, Rau U, Wagner F. 1995. Investigations on the regioselective hydrolysis of a branched β -1, 3-glucan. *Carbohydrate Polymers* 27, 271-276. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(95\)00069-0](https://doi.org/10.1016/0144-8617(95)00069-0)

Novaković AR, Karaman MA, Matavulj MN, Pejin BM, Belović MM, Radusin TI, Ilić NM. 2015. An insight into *in vitro* bioactivity of wild-growing puffball species *Lycoperdon perlatum* (Pers) 1796. *Food and Feed Research* 42, 51-58. <https://doi.org/10.5937/FFR1501051N>

Ooi VE, Liu F. 2000. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Current Medicinal Chemistry* 7, 715-729. <https://doi.org/10.2174/0929867003374705>

Papaspyridi LM, Katapodis P, Gonou-Zagou Z, Kapsanaki-Gotsi E, Christakopoulos P. 2010. Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibres content by *Pleurotus ostreatus* ATHUM 4438 under submerged culture. *Biochemical Engineering Journal* 50, 131-138. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.04.008>

Pizarro S, Ronco AM, Gotteland M. 2014. β -glucanos: ¿Qué tipos existen y cuáles son sus beneficios en la salud? *Revista Chilena de Nutrición* 41, 439-446. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182014000400014>

Ramesh C, Pattar M.G. 2010. Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of western ghats of Karnataka, India. *Pharmacognosy Research* 2, 107. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.62953>

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>

Reis FS, Martins A, Vasconcelos MH, Morales P, Ferreira IC. 2017. Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. *Trends in Food Science & Technology* 66, 48-62. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.010>

Rinaldi A, Comandini O, Kuyper TW. 2008. Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity* 33, 1-45.

Ruthes AC, Smiderle FR, Iacomini M. 2015. D-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. *Carbohydrate Polymers* 117, 753-761. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.051>

Šandula J, Kogan G, Kačuráková M, Machová E. 1999. Microbial (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. *Carbohydrate Polymers* 38, 247-253. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00099-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00099-X)

Sari M, Prange A, Lelley JI, Hambitzer R. 2017. Screening of Beta-glucan contents in commercially cultivated and wild growing mushrooms. *Food Chemistry* 216, 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.010>

Smiderle FR, Alquini G, Tadra-Sfeir MZ, Iacomini M, Wichers HJ, Van Griensven LJ. 2013. *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1→6)-β-d-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. *Carbohydrate Polymers* 94, 91-99. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.12.073>

Song C, Jeon Y, Yang B, Ra K, Kim H. 1998. Anti-complementary activity of endopolymers produced from submerged mycelial culture of higher fungi with particular reference to *Lentinus edodes*. *Biotechnology Letters* 20, 741-744. <https://doi.org/10.1023/A:1005334719522>

Synytsya A, Novak M. 2014. Structural analysis of glucans. *Annals of Translational Medicine* 2(2), 17. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.02.07>

Tseng YH, Yang JH, Mau JL. 2008. Antioxidant properties of polysaccharides from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry* 107, 732-738. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.073>

Wang JC, Hu SH, Liang ZC, Yeh CJ. 2005. Optimization for the production of water-soluble polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* in submerged culture and its antitumor effect. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67, 759-766. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1833-x>

Wasser S. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60(3), 258-274. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1076-7>

Xiao Z, Trincado CA, Murtaugh MP. 2004. β-Glucan enhancement of T cell IFN γ response in swine. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102(3), 315-320. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.09.013>

La Serena, 3 de noviembre de 2021

Estimado(a) autor(a):

Gracias por su permanente interés en nuestra revista internacional a la que Ud. envió un trabajo para publicación y que ha sido procesado siguiendo nuestros procedimientos normales de evaluación y edición.

Artículo: "Obtención de *B-glucanos* del Micelio del Hongo Comestible *Gymnopus dryophilus* en dos Medios de Cultivo" (6889IT-21)

Autores: César Díaz-Talamantes, Cristina Burrola-Aguilar, María E. Estrada-Zuñiga y Carmen Zepeda-Gómez

Informo a Ud. que, de acuerdo al informe de los árbitros, el artículo cumple los requisitos necesarios para publicación, pero se deben hacer modificaciones obligatorias. Se adjuntan a esta nota los respectivos comentarios.

Junto a esta carta se adjuntan dos documentos importantes: 1) una Tabla de Revisión de Versiones Finales que debe usar para revisar el ajuste a normas de su versión corregida; y 2) un ejemplo de la carta que debe adjuntar con la versión final donde debe indicar con el máximo detalle los cambios introducidos en su versión final. Se incluye también los Informes de los Árbitros y el trabajo editado para correcciones.

La cita de trabajos de Inf. Tecnol. en su nueva versión del trabajo aceptado y en otros que Ud. envíe a otras revistas mejora el impacto de nuestra revista y favorece por cierto a todos los autores y autoras que publican en ella. Por lo tanto incluya alguna(s) referencia(s) específica o general de Inf. Tecnol. en su nueva versión. Puede entrar directamente a la revista en Scielo y usar el sistema de búsqueda que tiene la plataforma Scielo y que funciona muy bien:

http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_serial&pid=0718-0764&lng=es&nrm=iso

Luego tiene los textos a nivel de abstract y a texto completo en forma gratuita (open access).

Si no le es posible llegar al enlace, le adjuntamos listado de artículos publicados en la revista en los últimos diez años, listado que le permitirá buscar trabajos similares para documentar su manuscrito.

Sabiendo que todo el trámite de revisión y edición toma tiempo, es intención del CIT publicar los trabajos con la mayor prontitud una vez que son aceptados. Por lo tanto solicitamos a Ud. dar a esta etapa del proceso de publicación la debida atención.

Si no recibimos el artículo corregido de acuerdo a lo solicitado en un plazo de dos meses a contar de esta fecha consideraremos que Ud. no tiene interés en la publicación final de su artículo y que lo retira del proceso de edición y publicación, según lo indicado en las Normas de la revista y que Ud. conoce.

Saludos y gracias.


Yo Do
Dr. Angel Rolando Vidana Agrament
Representante de Área de Investigación
Conservación y Manejo de Recursos Naturales



Jose O. Valderrama M.
Editor

No olvide enviar junto a su versión final (en WORD y en PDF), la Tabla de Revisión debidamente procesada y la carta donde se explica los cambios realizados.

Obtención de β -glucanos del Micelio del Hongo Comestible *Gymnopus dryophilus* en dos Medios de Cultivo

César Díaz-Talamantes¹, Cristina Burrola-Aguilar^{1*}, María E. Estrada-Zuñiga¹ y Carmen Zepeda-Gómez²

(1) Centro de Investigación en Recursos Bióticos, Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km 14.5. Toluca-México (correo-e: c35ardt@hotmail.com; *cba@uaemex.mx; meestrada@uaemex.mx)

(2) Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km 15.5. Toluca-México (correo-e: zapedac@uaemex.mx).

* Autor a quien debe ser dirigida la correspondencia

Resumen

El objetivo de esta investigación fue evaluar el crecimiento micelial del hongo comestible *Gymnopus dryophilus* y su producción de β -glucanos en un medio de cultivo convencional y uno no convencional. Para ello, se evaluó el crecimiento micelial en fermentación en estado sólido y líquido, se calculó la producción de β -glucanos en una fracción acuosa y en una alcalina, posteriormente fueron identificados mediante Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier. El medio de cultivo no convencional presentó mayor crecimiento micelial en fermentación en estado sólido y líquido. Además, la presencia de β -glucanos fue mayor en el medio no convencional debido a que este medio contiene mayor cantidad de nutrientes y un pH que favorecen el crecimiento micelial y producción de biomasa. Finalmente, el espectro de los β -glucanos obtenidos, concuerda con lo reportado mediante Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier. Se concluye que los medios de cultivo no convencionales aumentan la producción de biomasa y compuestos bioactivos como β -glucanos.

Palabras clave: cultivo in vitro; Gymnopus dryophilus; compuesto bioactivo; medio de cultivo no convencional; hongo comestible

Obtaining of β -glucans from Mycelium of Edible Mushroom *Gymnopus dryophilus* in two Culture Media

Abstract

The aim of this research was to evaluate the mycelial growth of the edible mushroom *Gymnopus dryophilus* and its production of β -glucans in a conventional and unconventional culture medium. For this, was evaluated the mycelial growth in solid state fermentation and liquid state fermentation, the production of β -glucans was calculated in aqueous fraction and in alkaline fraction, later they were identified by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. The unconventional culture medium presented higher mycelial growth in solid state fermentation and liquid state. In addition, the presence of β -glucans was higher in the unconventional medium because this medium contains a greater amount of nutrients and a pH that favors mycelial growth and biomass production. Finally, the β -glucans obtained agree with a Fourier Transform Infrared Spectroscopy spectrum of this compound. It is concluded that unconventional culture media increase the production of biomass and bioactive compounds such as β -glucans.

Keywords: in vitro culture; Gymnopus dryophilus; bioactive compound; unconventional culture medium; edible mushroom

INTRODUCCIÓN

Los hongos comestibles forman parte del patrimonio biocultural de los pueblos en México, debido a que existe una arraigada tradición por su colecta, venta y autoconsumo (Burrola-Aguilar et al., 2012), al ser considerados alimentos de alto valor culinario y nutricional (Reis et al., 2017), además de ser utilizados para el tratamiento de diversos padecimientos (Guzmán, 2008). Este conocimiento tradicional micológico funge como base para identificar especies de valor cultural, alimenticio y medicinal que pueden ser aprovechadas mediante su cultivo *ex situ* (Burrola-Aguilar et al., 2012). México cuenta con una gran diversidad de hongos comestibles, con más de 371 especies reportadas (Arana-Gabriel et al., 2014), cada una con propiedades únicas, debido a la variedad de compuestos que contienen en su estructura (Muszyńska et al., 2017). Sin embargo, pese a la gran diversidad de los hongos comestibles silvestres, son pocos los estudios relacionados a la exploración de nuevo material genético con potencial para su aprovechamiento, y sobre la identificación de compuestos bioactivos que le brindan sus propiedades medicinales.

La biotecnología es una alternativa para la domesticación de hongos comestibles silvestres (Díaz-Talamantes et al., 2017), así como para la innovación tecnológica en la obtención de material genético nativo adaptado a las condiciones locales y con mayor resistencia a plagas y enfermedades de la región, la diversificación y mejoramiento genético de cepas, y obtención de compuestos bioactivos de interés (Salmones et al., 2018). La fermentación en estado sólido y líquido son las principales herramientas para el cultivo *in vitro*, debido a que son efectivas, de bajo costo, reducen el tiempo de cultivo y las posibilidades de contaminación, aumenta la producción de biomasa y la pureza de los productos obtenidos (Rubiano Flórez et al., 2019), además, se pueden controlar las condiciones que afecten el crecimiento micelial y producción de compuestos bioactivos, como los requerimientos nutricionales a través de los medios de cultivo (Muszyńska et al., 2017), la disponibilidad de oxígeno, el pH, las condiciones de iluminación y temperatura (Suárez y Holguín, 2011).

Los β -glucanos se encuentran dentro de los compuestos bioactivos con mayor importancia médica, debido a que se le atribuyen propiedades inmunomoduladoras, anticancerígenas, antitumorales (Wasser, 2002), antioxidantes (Klaus et al., 2011) entre otras. Los β -glucanos son metabolitos estructurales presentes en la pared celular de los basidiomicetos. Su estructura está constituida por unidades de glucosa (homopolisacáridos) unidas por enlaces glicosídicos de tipo β ($1 \rightarrow 3$) y ramificaciones laterales unidas por enlaces β ($1 \rightarrow 6$) (Wasser, 2002). La bioactividad de los β -glucanos se debe a la gran variabilidad estructural que presentan (Synytsya y Novak, 2014). Ya que le brindan propiedades fisicoquímicas

que interactúan de manera diferente con las células humanas (Khan et al., 2018). Es importante resaltar que los β -glucanos son un compuesto bioactivo con una amplia gama de aplicaciones médicas para el tratamiento, prevención de enfermedades y padecimientos, así como en la industria farmacéutica en la obtención de principios activos (Wasser, 2002), y en la industria alimenticia como potencializadores de sabor, conservadores y nutracéuticos (Rathore et al., 2017).

Los hongos comestibles silvestres son una fuente de compuestos bioactivos que no ha sido explotada en su totalidad (Sari et al., 2017). *Gymnopus dryophilus* (Bull.) Murrill 1916, también llamado clavito es un hongo silvestre de alta montaña con valor cultural y económico, debido a que suele aprovecharse mediante su venta y autoconsumo (Burrola-Aguilar et al., 2012). *Gymnopus dryophilus* presenta potencial para ser cultivado *in vitro* (Díaz-Talamantes et al., 2017). Cabe resaltar que son escasos los estudios realizados sobre esta especie. Debido a ello, el objetivo de esta investigación fue evaluar el crecimiento micelial de *G. dryophilus* y su producción de β -glucanos en un medio de cultivo convencional y uno no convencional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para los estudios se utilizó la cepa de *G. dryophilus* IE988 depositada en el cepario de Hongos del Instituto de Ecología A. C. la cual fue recolectada en el Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca, estado de México, México.

Caracterización microscópica y macroscópica del micelio

Se tomó una muestra viable del micelio en cada medio de cultivo, se tiñó con rojo Congo, y se observó en el microscopio óptico a 100x, con ayuda del programa Motic Image plus 2.0 se midió el grosor de 20 hifas para obtener un promedio. Para la caracterización macroscópica, se observó el micelio en la caja Petri y se registró la textura de la cepa, margen de la cepa, forma de la cepa, tipo de crecimiento y superficie de cepa según (Arana-Gabriel et al., 2014).

Fermentación en estado sólido

Se tomó un disco de agar de 0.5 cm de diámetro inoculado con micelio de la cepa IE988 de *G. dryophilus*, y se colocó en cajas Petri de 9 cm de diámetro con un medio convencional, Papa Dextrosa Agar (PDA), elaborado con 39 g L⁻¹, pH 5.6; y un medio no convencional, Agar Maíz (AM), elaborado con 15 g L⁻¹ de agar agar, 15 g L⁻¹ de harina de maíz, 2 g L⁻¹ de extracto de levadura y 1 g L⁻¹ de peptona de gelatina, pH 6.4. Previamente esterilizados a 121 °C y 15 lbs de presión. Posteriormente, se incubaron a 18 °C durante un periodo de 18 días en condiciones de oscuridad.

Tasa de crecimiento micelial en FES (TCM_{FES})

Después del tiempo de incubación del micelio, se tomaron las cajas Petri y se midió el crecimiento del micelio a lo largo de la caja. Posteriormente, para calcular la TCM_{FES} se graficó el crecimiento micelial en función al tiempo de incubación, y se obtuvo la ecuación de la recta (ecuación 1), donde la pendiente m representa la TCM_{FES} , y el crecimiento del micelio en mm, x el tiempo de incubación en días y b un factor constante (Díaz-Talamantes et al., 2017).

$$TCM_{FES}=mx+b \quad (1)$$

$$\text{Contenido de agua} = \frac{\text{Biomasa inicial (g)} - \text{Biomasa final (g)}}{\text{Biomasa final (g)}} \times 100 \quad (2)$$

$$TPB = \frac{\text{Biomasa seca final (g)} - \text{Biomasa seca inicial (g)}}{\text{Volumen del medio (L)} \times \text{Tiempo de incubación (días)}} \quad (3)$$

Tasa de producción de biomasa en FES (TPB_{FES})

Para obtener TPB_{FES} se tomaron las placas de agar inoculadas con el micelio y se sumergieron en agua caliente hasta eliminar el agar por completo, posteriormente se colocó la biomasa libre de agar en un horno a 35 °C por 24 horas. Se calculó el contenido de agua (ecuación 2) (Arana-Gabriel et al., 2014) y la TPB_{FES} (ecuación 3).

Fermentación en estado líquido

En frascos de cultivo de 500 mL se agregaron 300 mL de caldo de cultivo Papa Dextrosa (CPD) elaborado con 26 g L⁻¹, pH 5.6; y Caldo de Maíz (CM) elaborado con 15 g L⁻¹ harina de maíz, 2 g L⁻¹ extracto de levadura, 1 g L⁻¹ peptona de gelatina, pH 6.4, y se esterilizaron a 121 °C y 15 lbs de presión. Posteriormente, se inocularon los frascos con 3 discos de agar con micelio de 0.5 cm de diámetro, finalmente se llevaron a un agitador orbital con baño María para su incubación durante 28 días a 150 rpm, 18 °C, y un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad (Díaz-Talamantes et al., 2017).

Tasa de producción de biomasa en FEL (TPB_{FEL})

Después del tiempo de incubación se tomaron los frascos y se filtró la biomasa obtenida del medio de cultivo agotado, se eliminó el excedente del medio agotado con agua destilada y se secó en una estufa a 30 °C durante 48 horas. Se calculó el contenido de agua (ecuación 2) y la TPB_{FEL} (ecuación 3).

Obtención de β -glucanos

Se utilizó la biomasa deshidratada obtenida de los tratamientos en FEL (1.282 g CM y 0.855 g CPD), a la cual se le agregaron 10 volúmenes de etanol al 70% y se dejó reposar durante 24 horas a temperatura ambiente, después del tiempo de reposo se repitió el procedimiento (Carbonero et al., 2006). Posteriormente, se filtró la biomasa con papel filtro y se desechó el etanol.

Extracción de glucanos

Extracción acuosa: A la biomasa macerada se le agregaron 10 volúmenes de agua destilada, y se colocó en un autoclave a 121 °C durante 60 min para la extracción acuosa (Klaus et al., 2011). Posteriormente, la biomasa con el agua se filtró utilizando papel filtro con poro de 125 μ m, obteniendo un extracto acuoso.

Extracción alcalina: A la biomasa recuperada de la extracción acuosa se le agregaron 10 volúmenes de una solución de NaOH al 2% (w/v) con 0.1% de $NaBH_4$, se calentó a 80 °C durante 4 horas. Posteriormente se neutralizó con ácido acético (Klaus et al., 2011). Finalmente se realizó una filtración utilizando papel filtro con poro de 125 μ m para obtener un extracto alcalino (Mizuno et al., 1992) y la biomasa sobrante se desechó.

Purificación

A cada uno de los extractos obtenidos (acuoso y alcalino) se les agregó 3 volúmenes de etanol frío (Smiderle et al., 2013) para precipitar los polisacáridos (Carbonero et al., 2006). Posteriormente, los precipitados se recuperaron y se congelaron y descongelaron a temperatura ambiente para precipitar nuevamente

los polisacáridos y eliminar residuos de agua y solución de NaOH del sobrenadante. Finalmente, los precipitados fueron centrifugados a 8000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 15 °C (Smiderle et al., 2013), y filtrados por una membrana de acetato de celulosa con poro de 0.2 µm. Obteniendo dos fracciones para cada tratamiento (CPD y CM), una fracción acuosa (FAc) y una fracción alcalina (FAk).

Identificación de β-glucanos

Los β-glucanos se identificaron mediante FTIR en modo absorbancia, en un rango de 400- 4000 cm⁻¹, utilizando la técnica de disco KBr (Mizuno et al., 1992; Klaus et al., 2011), la cual permite identificar la presencia de enlaces característicos de los β-glucanos. Para ello, se tomó una muestra de cada fracción, se deshidrato en una estufa a 30 °C durante 48 horas, como resultado de este procedimiento las muestras se cristalizaron para su análisis.

Análisis estadístico

Se realizó una t de Student para muestras independientes al 95% de confianza (p <0.05), para conocer si existen diferencias significativas del crecimiento micelial en los dos medios de cultivo, se realizó análisis para cada tasa (TCM_{FES}, TPB_{FES} y TPB_{FEL}).

RESULTADOS

Las características macroscópicas de la cepa IE 988 de *G. dryophilus* fueron similares en ambos medios de cultivo, en AM (figura 1) la forma de la colonia fue circular con margen fimbriado, el crecimiento del micelio fue aéreo- postrado con textura algodonosa y superficie irregular, de color blanco, las hifas fueron fibuladas de (3.9) 4.98 (3.7) 5.21 µm (6.7) de grosor. Mientras que en PDA (figura 2) la forma de la colonia fue circular con margen fimbriado, el crecimiento del micelio fue aéreo con textura algodonosa y superficie irregular, de color blanco y crema al envejecer. Las hifas en PDA fueron fibuladas de (3.9) 4.98 µm (5.7) de grosor.



Figura 1.- Fermentación en estado sólido del micelio e hifas de IE988 en Agar de Maíz



Figura 2.- Fermentación en estado sólido del micelio e hifas de IE988 en Agar Papa Dextrosa

Fermentación en estado sólido

El micelio cultivado en PDA presentó un peso fresco de 7.263 g, un peso seco de 0.335 g y 95.33 % de contenido de agua. La TCM en FES fue de 3.962 mm día⁻¹ y la TPB_{FES} fue de 0.2481 g día⁻¹ L de medio⁻¹, además el pH cambió de 5.6 a 5.1. Mientras que, en AM el peso fresco fue de 6.055 g, peso seco de 0.506 g y 91.62 % de contenido de agua. La TCM fue de 3.798 mm día⁻¹ y la TPB_{FES} fue de 0.3748 g día⁻¹ L de medio⁻¹, además el pH se mantuvo en 6.4. De acuerdo al análisis estadístico, La TCM en FES no mostró diferencias significativas $p > 0.05$ ($p = 0.473$) entre los medios. Asimismo, la TPB_{FES} tampoco se encontró una diferencia estadísticamente significativa $p > 0.05$ ($p = 0.079$) entre los dos medios.

Fermentación en estado líquido

El micelio cultivado en CPD presentó una biomasa en fresco de 17.304 g, biomasa en seco de 0.855 g, con 95.10 % de contenido de agua y una TPB_{FEL} de $0.0117 \text{ g día}^{-1} \text{ L de medio}^{-1}$. Los pellets fueron redondos con tamaño de (0.5- 1.85) 0.97 cm (figura 3), y el pH disminuyó de 5.6 a 5.3. Por otra parte, el micelio en CM mostró un peso fresco de 19.22 g, peso seco de 1.283g con 93.25% de contenido de agua. La TPB_{FEL} fue de $0.0176 \text{ g día}^{-1} \text{ L de medio}$. Los pellets fueron redondos con tamaños de (0.3- 1.55) 0.695 cm (figura 3), además el pH cambió de 6.4 a 6.2. La TPB_{FEL} si presentó diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$ ($p = 0.018$), por lo que en la FEL el mayor rendimiento lo mostró el medio no convencional (CM) elaborado a base de harina de maíz.

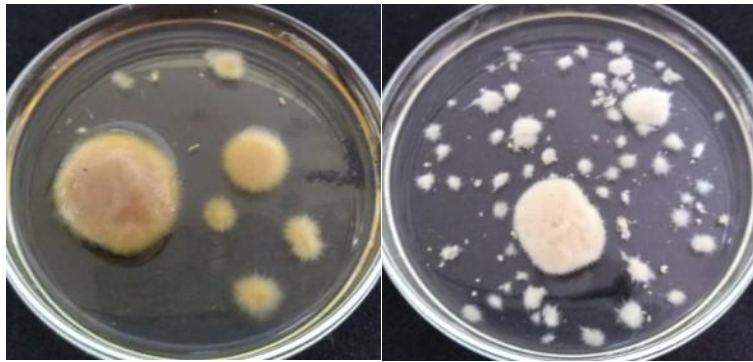


Figura 3.- Fermentación en estado líquido de IE988 en Caldo Papa Dextrosa (izquierda) y en Caldo de Maíz (derecha)

Obtención de β -glucanos

En total se obtuvieron cuatro fracciones de β -glucanos, dos fracciones acuosas (FAc) y dos alcalinas (FAk). En CPD se obtuvieron 11.811 g de β -glucanos por 100 g de biomasa seca, de los cuales, 1.721 g corresponden a la FAc (FAcCPD), y 10.090 g corresponden a la FAk (FAkCPD). En CM se obtuvieron 12.731 g de β -glucanos por 100 g de biomasa seca, de los cuales, 1.584 g corresponden a la FAc (FAcCM), y 11.147 g corresponden a la FAk (FAkCM).

Identificación de β -glucanos

En los espectros de FTIR (figura 4 y 5) que se observan las bandas de vibración de los enlaces característicos un β -glucano: correspondientes a O-H en los 3200 cm^{-1} , C-H en los 2922 cm^{-1} , C-O en los 1644 cm^{-1} , además de las regiones asociadas a azúcares en un rango de 1200 cm^{-1} a 950 cm^{-1} , y la región anomérica que va de los 950 cm^{-1} a los 750 cm^{-1} .

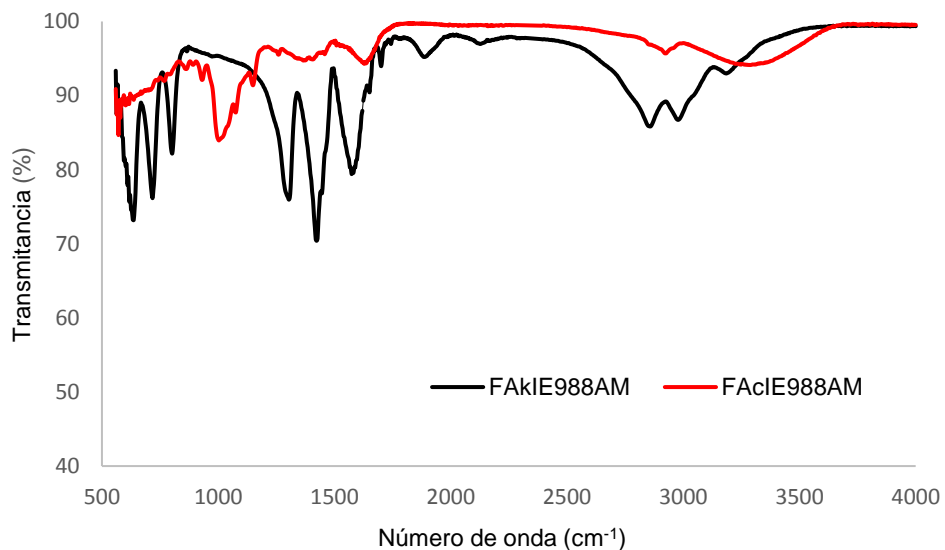


Figura 4.- Espectro FTIR de β -glucanos de FAc y FAK de IE988 en AM

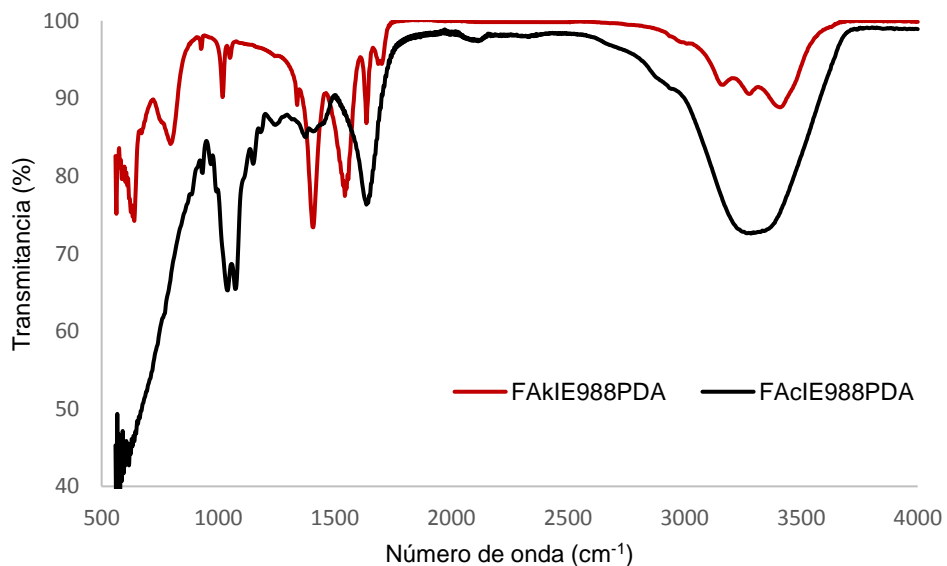


Figura 5.- Espectro FTIR de β -glucanos de FAc y FAK de IE988 en PDA

DISCUSIÓN

Es importante caracterizar el crecimiento micelial *in vitro* de la cepa, para identificar si las condiciones nutricionales y ambientales brindan los requerimientos óptimos para la producción de biomasa (Arana-Gabriel et al., 2014).

Caracterización microscópica y macroscópica de la cepa

El micelio cultivado en ambos medios no presentó diferencias macroscópicas notables, asimismo, las características de las colonias en ambos medios muestran características microscópicas correspondientes a un micelio viable. No obstante, el micelio en PDA presentó un margen fimbriado con mayor cantidad de ramificaciones que el micelio en AM. Microscópicamente, las hifas en PDA son más delgadas que en AM. De acuerdo a Barroetaveña y Toledo (2017) las variantes en la morfología del crecimiento micelial se debe a que las condiciones ambientales y nutricionales no son favorables para la cepa, incrementando la ramificación de sus hifas para compensar el suministro de nutrientes al incrementarse su área superficial, lo cual sugiere una deficiencia de nutrientes en el medio PDA.

Fermentación en estado sólido y líquido

Los requerimientos nutricionales del micelio es uno de los factores más importantes para identificar cepas de interés biotecnológico, de acuerdo a Muszyńska et al. (2017) los nutrientes presentes en los medios de cultivo se pueden manipular para maximizar la producción de biomasa y ciertos metabolitos deseados. No obstante, *G. dryophilus* es una cepa silvestre y no se han determinado los requerimientos nutricionales óptimos. En este estudio, el medio no convencional en FEL presentó una TPB estadísticamente mayor al medio convencional. Asimismo, los pellets fueron de menor tamaño en el medio no convencional, pero con mayor abundancia. Por lo que el micelio de *G. dryophilus* presentó una afinidad al medio elaborado a base de harina de maíz. Esto podría atribuirse a los nutrientes y suplementos que contiene el medio. Por una parte, la harina de maíz contiene ácido fólico, hierro, zinc, vitamina b1, b2 y b3, además, el medio está suplementado con extracto de levadura y peptona de gelatina como fuente de nitrógeno. De acuerdo con Salmones et al. (2018) la suplementación con extracto de levadura aumenta el crecimiento micelial al aumentar la relación C/N. Aunado a esto, dichos autores argumentan que las vitaminas y minerales presentes en los medios de cultivo son nutrientes vitales para el crecimiento de hongos.

Cabe mencionar que el crecimiento micelial no solo depende de las fuentes de nutrientes, sino también en su tolerancia a otros compuestos químicos presentes en los medios de cultivo (Salmones et al., 2018), así como a factores como el pH, temperatura, disponibilidad de oxígeno, la etapa fisiológica del hongo, entre otros.

Cómo menciona Yamanaka (2003), los hongos generalmente se desarrollan en condiciones ácidas, pero algunas especies tienden a crecer en condiciones neutras o ligeramente alcalinas. En esta investigación, el medio no convencional con pH (6.4) cercano al neutro presentó mayor crecimiento micelial, e incluso en el medio convencional hubo una disminución del pH tanto en FES como en FEL, de acuerdo a Rathore et al. (2017), esto puede deberse a que el dióxido de carbono presente en el medio se vuelve soluble y aumenta el ion carbonato en solución, inhibiendo el crecimiento micelial.

Otro factor importante en el crecimiento del micelio en cultivo *in vitro* es la etapa fisiológica del hongo, según Papaspyridi et al. (2010) el micelio representa la fase vegetativa del hongo, por lo que las necesidades nutricionales y ambientales son diferentes a la fase reproductiva. De acuerdo a Salmones et al. (2018), en esta etapa se requiere que el hongo pueda producir enzimas extracelulares lignocelulíticas para degradar compuestos complejos como lignina, carbohidratos y fuentes orgánicas de nitrógeno, por lo que la disponibilidad de nutrientes del medio es indispensable para facilitar su asimilación. Además, es importante considerar que la fase de latencia del hongo requiere diferentes tiempos de adaptación al medio (Salmones et al., 2018), lo cual podría retrasar la fase exponencial del hongo.

Tomando como referencia otros estudios sobre la obtención de cepas de hongos comestibles silvestres, las TCM en FES obtenidas en esta investigación (PDA 3.962 mm día⁻¹ y AM 3.798 mm día⁻¹) son mayores a las encontradas en el estudio realizado por Arana-Gabriel et al. (2014), sobre el crecimiento micelial de algunas cepas de hongos silvestres comestibles de alta montaña de México, donde *Psathyrella spadicea* presentó una TCM de 0.35 mm día⁻¹ y *Floccularia luteovirens* y *Clitocybe squamulosa* de 0.38 mm día⁻¹. De igual manera las TCM obtenidas fueron mayores a las reportadas en un estudio realizado por Toledo y Barroetaveña (2017), donde los hongos silvestres *Aleurodiscus vitellinus* y *Lepista nuda* registraron una TCM en FES de 0.80 mm día⁻¹. Por otra parte, las TCM obtenidas se encuentran debajo de las obtenidas en estudio realizado por Carreno-Ruiz et al. (2014), en el cual los hongos tropicales *Oudemansiella canarii* y *Schizophyllum commune* presentaron una TCM de 9.14 y 12 mm día⁻¹ respectivamente. Sin embargo, las TCM obtenidas en FES son similares a las de cepas comerciales reportadas por Suárez y Holguín (2011), donde *Pleurotus ostreatus* presentó una TCM de 2.18 mm día⁻¹, *P. pulmonarius* de 4.5 mm día⁻¹ y *Lentinus edodes* de 5.55 mm día⁻¹.

Finalmente, Rubiano Flórez et al. (2019) mencionan que la FEL suele ser más eficiente debido a la influencia de los parámetros, la disponibilidad de nutrientes y oxígeno. Sin embargo, podemos observar en este estudio que la TPB fue mayor en FES que en la FEL, tanto en el medio convencional como en el medio no convencional, probablemente a que las condiciones de la FEL como la mayor disponibilidad de oxígeno, la agitación y las condiciones de luz no favorecieron el crecimiento del micelio. De acuerdo al crecimiento micelial en FES, el micelio tuvo un crecimiento aéreo- sumergido, por lo que los requerimientos de oxígeno para el crecimiento de la cepa podrían ser mínimos. Aunque es importante mencionar que de acuerdo a Rathore et al. (2017) la FES no es recomendable para la obtención de metabolitos, en este caso específico, se puede perder una gran cantidad de β -glucanos durante la obtención de biomasa, debido a que en el proceso de obtención de biomasa es necesario sumergir la biomasa en agua caliente, y los β -glucanos solubles en agua caliente se podría perder junto al medio de cultivo. Por otra parte, el medio no convencional a base de harina de maíz promovió la producción de biomasa, posiblemente por la mayor presencia de nitrógeno y micronutrientes, además de presentar un pH cercano al neutro adecuado para esta cepa.

Obtención de β -glucanos

El medio no convencional presentó mayor cantidad de β –glucanos, de acuerdo a Rathore et al. (2017) los β –glucanos son metabolitos primarios asociados directamente a la pared celular de los hongos, por lo que entre mayor sea la producción de biomasa, se asume que será mayor la producción de β –glucanos. También se puede observar que las fracciones alcalinas son significativamente mayores a las acuosas. Tseng et al. (2008) menciona que el proceso de extracción de la fracción alcalina es sumamente agresivo al degradar las paredes celulares y transformar compuestos insolubles en agua en componentes solubles. Por lo que la concentración de esta fracción aumenta considerablemente en comparación con la fracción acuosa.

No existen muchos estudios sobre la obtención de β –glucanos de especies silvestres, es especial sobre *G. dryophilus*. Sin embargo las concentraciones obtenidas en este estudio (CPD 11.811 g de β -glucanos por 100 g de biomasa seca, y CM 12.731 g de β -glucanos por 100 g de biomasa seca) son similares a los presentados en un estudio realizado por Sari et al. (2017) sobre β –glucanos presentes en hongos comestibles silvestres, debido a que existen especies con valores de hasta 40.596 g de β -glucanos por 100 g de biomasa seca en *Kuehneromyces mutabilis*, y especies con hasta 7.803 g de β -glucanos por 100 g de biomasa seca para *Xerocomellus chrysenteron*.

Identificación de β -glucanos

Los espectros de FTIR obtenidos de las fracciones corresponden al espectro de un β -glucano (Movasaghi et al., 2008), debido a que se observan las bandas características correspondientes a las vibraciones normales de estiramiento asimétrico y simétrico de grupos de los grupos O-H en los 4000-3000 cm^{-1} . También se pueden observar las bandas entre enlaces C-H en los 2920 cm^{-1} (Alzorqi et al., 2017), que suele ser característica del enlace de un β -glucano (Zhou et al., 2019). Se puede observar una ligera señal de la banda a 2890 cm^{-1} , la cual se asocia al enlace del grupo amida N-H (Hou et al., 2019). A los 1644 cm^{-1} se observa una banda correspondiente a los enlaces C-O asociados a la región de las proteínas (Šandula et al., 1999). Además de las regiones asociadas a azúcares en un rango de 1200 cm^{-1} a 950 cm^{-1} , con bandas a los 1058 y 1020 cm^{-1} , características de un anillo D-glucosa, que indican la presencia de enlaces glicosídicos y estructuras de monosacáridos cíclicos (Hou et al., 2019). Finalmente se observa la región anomérica que va de los 950 cm^{-1} a los 750 cm^{-1} (Synytsya y Novak, 2014) con bandas características a los 897 cm^{-1} correspondientes a los enlaces anoméricos específicos para β -glucanos (Zhou et al., 2019).

De acuerdo a los espectros de FTIR las fracciones obtenidas podrían estar acopladas a una proteína formando un complejo de glicoproteínas, de acuerdo a Barbosa et al. (2020) estas glicoproteínas desempeñan funciones importantes a lo largo de la pared celular de los hongos, como moléculas estructurales, modificadores de pH, ligandos y receptores moleculares, sitios diana de biosíntesis y transporte de nutrientes. Además, a las glicoproteínas se le atribuyen propiedades antitumorales, la actividad antioxidante, antiinflamatoria, hipocolesterolémica, y como inmunoestimulador (Barbosa et al., 2020).

CONCLUSIONES

El crecimiento micelial óptimo de *G. dryophilus* se presentó en el medio de cultivo no convencional a base de harina de maíz tanto FES como en FEL, debido a que este medio proporciona mayor disponibilidad de nutrientes, nitrógeno y vitaminas que facilitan su absorción. Además, este medio de cultivo presentó un pH (6.4) adecuado para esta cepa. Por otra parte, la producción de biomasa fue mayor en FES que en FEL, ya que las condiciones de la FES favorecen el crecimiento micelial. Existe una relación entre la producción de biomasa y la concentración de β -glucanos, por lo que concentración de estos fue ligeramente mayor en el medio no convencional. Además, las fracciones alcalinas presentaron una mayor concentración de β -glucanos debido a que el proceso de extracción es más agresivo en comparación con extracción acuosa.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero a la Secretaría de Educación Pública y a la Universidad Autónoma del Estado de México a través del proyecto PRODEP-SEP 2018 No. 4615/2018, así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada al primer autor para sus estudios en el Posgrado de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales de la Universidad Autónoma del Estado de México.

REFERENCIAS

Alzorqi, I., Sudheer, S., Lu, T.J., y Manickam, S., Ultrasonically extracted β -d-glucan from artificially cultivated mushroom, characteristic properties and antioxidant activity, <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.04.017>, *Ultrasonics sonochemistry*, 35, 531-540 (2017)

Arana-Gabriel, Y., Burrola-Aguilar, C., Garibay-Orijel, R., y Franco-Maass, S., Obtención de cepas y producción de inóculo de cinco especies de hongos silvestres comestibles de alta montaña en el centro de México, <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2014.04.017>, *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 20(3), 213-226 (2014)

Barbosa, J.R., dos Santos Freitas, M.M., da Silva Martins, L.H., y de Carvalho Junior, R.N., Polysaccharides of mushroom *Pleurotus* spp.: New extraction techniques, biological activities and development of new technologies, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115550>, *Carbohydrate polymers*, 229, 115550 (2020)

Barroetaveña, C. y Toledo, C.V., *The nutritional benefits of mushrooms. Wild plants, mushrooms and nuts, Functional food properties and applications*, Wiley-Blackwell, West Sussex, ISBN 9781118944639, 65-81, Chichester, UK (2017)

Burrola-Aguilar, C., Montiel, O., Garibay-Orijel, R., y Zizumbo-Villarreal, L., Conocimiento tradicional y aprovechamiento de los hongos comestibles silvestres en la región de Amanalco, Estado de México, *Revista Mexicana de Micología*, ISSN 0187-3180, 35, 01-16 (2012)

Carbonero, E.R., Gracher, A.H.P., y otros cinco autores, A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.03.009>, *Carbohydrate Polymers*, 66(2), 252-257 (2006)

Carreno-Ruiz, S., Cappello-García, S., y otros tres autores, Growth of three tropical edible fungi in culture mediums and agricultural waste, *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, ISSN 2007-0934, 5(8), 1447-1458 (2014)

Díaz-Talamantes, C., Burrola-Aguilar, C., Aguilar-Miguel, X., y Mata, G., *In vitro* mycelial growth of wild edible mushrooms from the central Mexican highlands, <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2016.12.067>, *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 23(3), 369-383 (2017)

Guzmán, G., Diversity and use of traditional Mexican medicinal fungi, DOI: 10.1615 / IntJMedMushr.v10.i3.20, *A review. International Journal of Medicinal Mushrooms*, 10(3), 209-217 (2008)

- Hou, G., Chen, X., y otros cuatro autores, Physicochemical properties, immunostimulatory activity of the Lachnum polysaccharide and polysaccharide-dipeptide conjugates, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.09.067>, Carbohydrate polymers, 206, 446-454 (2019)
- Khan, A.A., Gani, A., Khanday, F.A. y Masoodi, F., Biological and pharmaceutical activities of mushroom β -glucan discussed as a potential functional food ingredient, <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2017.12.002>, Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 16, 1-13 (2018)
- Klaus, A., Kozarski, M., y otros cuatro autores, Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharides extracted from the basidiomycete *Schizophyllum commune*, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.05.010>, LWT-Food Science and Technology, 44(10), 2005-2011 (2011)
- Mizuno, T., Ando, M., y otros cinco autores, Antitumor activity of some polysaccharides isolated from an edible mushroom, Ningyotake, the fruiting body and the cultured mycelium of *Polyporus confluentis*, <https://doi.org/10.1271/bbb.56.34>, Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 56(1), 34-41 (1992)
- Movasaghi, Z., Rehman, S. y Rehman, D.I., Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues, <https://doi.org/10.1080/05704920701829043>, Applied Spectroscopy Reviews, 43(2), 134-179 (2008)
- Muszyńska, B., Kała, K. y Sułkowska-Ziaja, K., Edible mushrooms and their *in vitro* culture as a source of anticancer compounds, https://doi.org/10.1007/978-3-319-53880-8_10, Biotechnology and production of anti-cancer compounds, 231-251 (2017)
- Papaspyridi, L.M., Katapodis, P., y otros tres autores, Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibres content by *Pleurotus ostreatus* ATHUM 4438 under submerged culture, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.04.008>, Biochemical engineering journal, 50(3), 131-138 (2010)
- Rathore, H., Prasad, S. y Sharma, S., Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review, <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2017.02.001>, PharmaNutrition, 5(2), 35-46 (2017)
- Reis, F.S., Martins, A., y otros tres autores, Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.010>, Trends in Food Science and Technology, 66, 48-62 (2017)
- Rubiano Flórez, D.F., Chegwin-Angarita, C., Melo, O.O., y Nieto-Ramírez, I.J., Comparative study of the production of biomass in surface fermentation and in the liquid state of macromycetes with different nutrient sources, <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n1.68869>, Revista Colombiana de Biotecnología, 21(1), 39-46 (2019)
- Salmones, D., Gaitan-Hernandez, R., y Mata, G., Cultivation of Mexican wild strains of *Agaricus bisporus*, the button mushroom, under different growth conditions *in vitro* and determination of their productivity, Doi: 10.25518/1780-4507.16281, Biotechnology, Agronomy, Society and Environment , 22(1), 45-53 (2018)
- Šandula, J., Kogan, G., Kačuráková, M., y Machová, E., Microbial (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity, [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00099-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00099-X), Carbohydrate polymers, 38(3), 247-253 (1999)
- Sari, M., Prange, A., Lelley, J.I., y Hambitzer, R., Screening of beta-glucan contents in commercially cultivated and wild growing mushrooms, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.010>, Food Chemistry, 216, 45-51 (2017)
- Smiderle, F.R., Alquini, G., y otros cuatro autores., *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1 \rightarrow 6)- β -d-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.12.073>, Carbohydrate polymers, 94(1), 91-99 (2013)
- Suárez, C. y Holguín, M.S., Evaluación de medios de cultivo sintéticos y cereales para la producción de semilla de setas comestibles. <https://doi.org/10.17584/rcch.2011v5i1.1259>, Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas, 5(1), 130-140 (2011)
- Synytysya, A., y Novak, M., Structural analysis of glucans, doi:10.3978 / j.issn.2305-5839.2014.02.07, Annals of translational medicine, 2(2), 1-14 (2014)

Toledo, C.V., y Barroetaveña, C., Crecimiento miceliar de especies silvestres de hongos comestibles de los bosques andino-patagónicos: primeros pasos para su domesticación, *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, ISSN 0373-580 X, 52(3): 435-446 (2017)

Tseng, Y.H., Yang, J.H., y Mau, J.L., Antioxidant properties of polysaccharides from *Ganoderma tsugae*, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.073>, *Food chemistry*, 107(2), 732-738 (2008)

Wasser, S., Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides, <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1076-7>, *Applied microbiology and biotechnology*, 60(3), 258-274 (2002)

Yamanaka, T., The effect of pH on the growth of saprotrophic and ectomycorrhizal ammonia fungi *in vitro*, <https://doi.org/10.1080/15572536.2004.11833062>, *Mycologia*, 95(4), 584-589 (2003)

Zhou, F.F., Zhang, Y.D., y otros cuatro autores., Structure characterization and immunological activity of a β -glucan from White *H. marmoreus* and its silver nanoparticle derivatives, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.057>, *Carbohydrate polymers*, 210, 1-8 (2019)

Antibacterial activity of β -glucans extracted from fruiting bodies of *Boletus edulis* and *Lactarius indigo*

César Díaz-Talamantes^a, Cristina Burrola-Aguilar^{a*}, María Elena Estrada-Zuñiga^a, Carmen Zepeda-Gómez^b.

Centro de Investigación en Recursos Bióticos, Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km 14.5, San Cayetano. C. P. 50295. Toluca, Estado de México, México^a. * author for correspondence: cba@uaemex.mx

Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km 15.5, Piedras Blancas, C. P. 50200. Toluca, Estado de México, México^b.

Highlights

- β -glucans from wild edible mushrooms present strong antibacterial activity.
- There are no statistically significant differences between the antibacterial activity of the β -glucans present in the aqueous and alkaline fraction.
- The antibacterial activity of β -glucans is higher at concentrations close to 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Abstract

Wild edible mushrooms such as *Boletus edulis* and *Lactarius indigo* are traditionally valued as foods rich in nutrients, and with therapeutic and medicinal (e.g., antibacterial, anticancer and immunomodulatory) properties, which are attributed to compounds present in the cellular structure. Among the compounds of highest bioactivity are the β -glucans, contained in the fruiting bodies of basidiomycetes, which have demonstrated properties as antibacterial agents. The aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of β -glucans extracted from wild fruiting bodies of *B. edulis* and *L. indigo*. Wild fruiting bodies of every species were collected, dehydrated and processed to isolate β -glucans as two fractions (aqueous and alkaline). These were subsequently identified by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and tested for antibacterial activity at different concentrations (500, 250, 125 and 62.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) by dilution in broth and application against the most common pathogenic bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans*.

Four fractions of β -glucans were obtained from the fruiting bodies, two from the aqueous fraction: FAqBe from fruiting bodies of *B. edulis* and FAqLi from *L. indigo*; and two from the alkaline fraction: FAkBe from fruiting bodies of *B. edulis* and FAkLi from *L. indigo*. These fruiting bodies produced 3.68, 3.56, 12.36 and 12.86 g of β -glucans per 100 g of dry biomass, respectively. These fractions agree with a β -glucan spectra because they present the characteristic bands at 3200, 2920, 1640, 1160, 1070, 1040, 970 and 890 cm^{-1} .

The β -glucans obtained from wild fruiting bodies of *B. edulis* and *L. indigo* showed strong antibacterial activity: *Streptococcus mutans* presented 71.2 % inhibition at 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of FAqBe, *S. aureus* had 97.6 % inhibition at 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of FAkBe, *E. coli* had 70.6% inhibition at 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of FAqLi, and *E. faecalis* had 87% inhibition at 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of FAkLi. There is a direct relationship between the fraction concentration and the percentage of inhibition, since the highest percentage of inhibition occurred under the highest concentrations. No differences were found between the aqueous and alkaline fractions used.

Keywords: Wild edible mushroom; Bioactive polysaccharides; Strong antibacterial activity; Functional foods; Aqueous and alkaline fractions.

Introduction

Edible mushrooms are valued as healthy foods with high nutritional content (Reis et al., 2017). They contain a high concentration of carbohydrates and proteins, in addition to a considerable concentration of vitamins, minerals and fiber, with low levels of sodium and unsaturated fats (Choi, 2004; Stamets, 2011). Edible mushrooms are also used in traditional medicine and are attributed with healing and therapeutic value (Guzmán, 2008), presenting immunomodulatory, anticancer and antibacterial properties (Cano-Estrada and Romero-Bautista, 2016).

Traditional knowledge has served as the basis for demonstrating the bioactivity of edible mushrooms against chronic degenerative diseases such as cancer, or cardiovascular, neurodegenerative and immunomodular diseases (Roncero-Ramos and Delgado-Andrade, 2017), as well as for the development of products for the food (Pizarro et al., 2014; Reis et al., 2017) pharmaceutical and cosmetic industries (Khan et al., 2018).

Various studies have shown that the bioactivity of fungi is related to compounds present in their structure (Muszyńska et al., 2018; Sari et al., 2017). Polysaccharides are the most abundant structural compounds found in the cell walls of fungi (Arango and Nieto, 2013; Khan et al., 2018; Rathore et al., 2017). At structural level, polysaccharides can be found in the form of homopolysaccharides, heteropolysaccharides and glycoproteins (Donot et al., 2012).

Within the group of homopolysaccharides, β -glucans are the most important polysaccharides, since they have shown great potential as anticancer, antioxidant and antibacterial agents (Chen et al., 2012; Wasser, 2002).

The β -glucans are present only in basidiomycetes and yeasts, and are composed of glucose units linked by β -type glycosidic bonds (1 \rightarrow 3) and side branches linked by β bonds (1 \rightarrow 6) (Pizarro et al., 2014). The bioactivity of β -glucans is due to their great variability in structure (Synytsya and Novak, 2014), molecular mass, chain length (Wasser, 2002),

solubility properties (Xiao et al., 2004), branching frequency (Miyazaki et al., 1979) and shaping in solution (Khan et al., 2018; Zhang et al., 2004).

It is important to note that, despite the great importance of edible mushrooms as functional foods (Reis et al., 2017; Wasser, 2002), few studies have addressed wild edible mushrooms as a source of nutraceuticals (Arango and Nieto, 2013), especially for the most traditionally valued and little-studied species such as *Boletus edulis* and *Lactarius indigo*. In addition to the nutritional, medicinal and economic value of *B. edulis* (Cano-Estrada and Romero-Bautista, 2016), studies have shown that some acetone and methanol extracts obtained from fruiting bodies of *B. edulis* exert a strong antimicrobial effect against bacteria such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* (Kosanić et al., 2012), as well as antioxidant activity (Tsai et al., 2007) and antiproliferative (Lemieszek et al., 2013) and antitumor (Lucas et al., 1957) effects. *Lactarius indigo* is a species of both nutritional and pharmaceutical importance (Cano-Estrada and Romero-Bautista, 2016), since aqueous and organic extracts of its fruiting bodies have shown antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica*, and antiproliferative activity against MCF7 cells (Ochoa-Zarzosa et al., 2011), in addition to antitumor and anti-inflammatory effects (Cano-Estrada and Romero-Bautista, 2016).

The aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of an aqueous and alkaline fraction of two β -glucans from the fruiting bodies of wild *B. edulis* and *L. indigo* of central Mexico.

Materials and methods

Biological material

The study utilized the fruiting bodies of wild *B. edulis* and *L. indigo* collected in the Area de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca (APFFNT), Mexico, in June-August 2019.

Obtaining biomass

The collected specimens (*Boletus edulis* 2000 g; *Lactarius indigo* 1600 g) were characterized and taxonomically identified according to Franco Maass et al. (2012). They were then oven-dried at 30 °C for 48 hours in order to calculate the water content (equation 1), then ground to obtain a powder, which was used for the extraction of polysaccharides. In addition, intact specimens of both species were deposited in the Mycology Laboratory of Centro de Investigación de Recursos Bióticos UAEMex

$$\% \text{ of water} = \frac{\text{fresh weight of biomass (g)} - \text{dry weight of biomass (g)}}{\text{fresh weight of biomass (g)}} 100 \quad \text{eq 1}$$

Extraction of β -glucans

Biomass macerate: The dry biomass of the fruiting bodies of *B. edulis* (BFBe 103.87 g) and *L. indigo* (BFLi 142.37 g) was placed individually in 10 volumes of 70% ethanol for 24 hours in order to eliminate apolar and low molecular weight compounds. This procedure was performed twice (Carbonero *et al.*, 2006). The biomass was subsequently recovered by filtering through filter paper of coarse porosity, discarding the ethanol.

Aqueous extraction: The biomass of the fruiting bodies recovered from the previous process was placed in 10 volumes of distilled water at 121 °C and 15 lbs for 60 min (Klaus *et al.*, 2011). The biomass was then filtered (cellulose filter of pore size 125 µm), obtaining an aqueous extract of crude polysaccharides in the filtrate and leaving the remaining biomass as a residue.

Alkaline extraction: The biomass from the aqueous extraction was recovered and placed in 10 volumes of an aqueous solution of NaOH at 2% (w/v) with 0.1% of NaBH₄, and heated at 80 °C for 4 hours, then neutralized with acetic acid (Klaus *et al.*, 2011). The resulting alkaline extract (Mizuno *et al.*, 1992) was then filtered through a cellulose filter of pore size 125 µm) and the biomass residue discarded.

Purification of β-glucans

Ethanol precipitation: The aqueous and alkaline extracts were placed individually in 3 volumes of cold ethanol (Smiderle *et al.*, 2013) in order to precipitate polysaccharides from the complexes of low molecular weight molecules (Carbonero *et al.*, 2006). Finally, the precipitates with β-glucans corresponding to each extract were recovered.

Freezing-thawing of the precipitates: the precipitates with β-glucans obtained were frozen and then slowly thawed at room temperature in order to eliminate linear compounds with a lower degree of branching. This process was carried out several times until there was no further formation of precipitate from the supernatant. The precipitates from this process containing β-glucans were recovered and centrifuged at 8000 rpm for 15 minutes at 15 °C (Smiderle *et al.*, 2013). The precipitates obtained from the centrifugation were then filtered through a cellulose acetate membrane of 0.2 µm in pore size. Two fractions of β-glucans of each species were thus obtained: an aqueous fraction (FAq) and an alkaline fraction (FAk).

Identification of β-glucans

A sample of each fraction (1 g) was oven-dried at 30 °C for 48 hours until obtaining crystals, which were analyzed by FTIR under an absorbance range of 4000- 400 cm⁻¹ using the KBr disk technique (Klaus *et al.*, 2011; Mizuno *et al.*, 1992) to identify the vibrational mode of the characteristic bonds of β-glucans (Alzorqi *et al.*, 2017). In addition, the regions associated with sugars, the anomeric region and the region associated with proteins were analyzed, corresponding to 3200, 2920, 1640, 1160, 1070, 1040, 970 and 890 cm⁻¹ (Synytsya and Novak, 2014).

Antibacterial activity

The antibacterial activity test was carried out by dilution in broth according to the Clinical and Laboratory Standards Institute. For this purpose, four strains of bacteria from the culture collection of the Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Odontología of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) were used: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans*. These were reactivated through inoculation onto sterile Muller-Hinton agar (38 g L⁻¹) and incubated at 38 °C for 24 hours. Bacterial cultures were diluted in saline solution to make a bacterial suspension according to the McFarland 0.5 standard. In a 96-well plate, a volume of 200 µL of sterile Muller-Hinton broth was added per well and inoculated with 5 µL of the bacterial suspension (approximately 5 x 10⁵ CFU mL⁻¹). Moreover, a stock of each fraction was prepared and added to each well, with final concentrations of: 500, 250, 125 and 62.5 µg mL⁻¹ of β-glucans. Sterile culture broth was used as a positive control, culture broth inoculated with bacteria as a negative control and sterile culture broth with different concentrations of β-glucans was used as a blank. The plate was incubated at 38 °C for 24 hours in an orbital shaker at 200 rpm. The two fractions of both species were applied in four concentrations to the four bacteria, with each treatment performed in quadruplicate in the wells (4 fractions x 4 concentrations x 4 bacteria x 4 repetitions in wells). Following incubation, the plate was analyzed in a plate reader in absorbance mode at 630 nm in order to determine the percentage viability of the bacterial inoculum compared to the untreated inoculum (equation 2).

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{Treatment} - \text{Blank})}{(\text{Negative control} - \text{Positive control})} 100 \quad \text{eq. 2}$$

where: the treatment was culture broth inoculated with bacteria and β-glucans at different concentrations, the blank was culture broth and β-glucans at different concentrations, the negative control was medium inoculated with bacteria and the positive control was sterile culture broth.

Statistical analysis

A one-way analysis of variance (ANOVA) was performed at 95% confidence (p <0.05) to determine whether there was a significant effect among the different concentrations of the aqueous and alkaline fraction (*B. edulis* and *L. indigo*) on bacterial inhibition (in the four bacteria), for a total of eight ANOVAS. A Tukey's multiple range test was also performed for each treatment in order to identify statistically significant differences between the inhibition of the different concentrations of the two fractions. This analysis used the SPSS statistical package.

Results

Obtaining biomass

The fruiting bodies of *B. edulis* Pers Bull collected in *Abies* and *Abies-Pinus* forests at 3100-3500 m asl agreed with that reported by Franco Maass et al. (2012). The fruiting bodies presented a water content of 94.8%. Macroscopically, they presented crowns of 8-15 cm in diameter, yellow-brown-reddish coloration, a midstipe of 7 to 20 cm in length and white to light brown in color. Microscopically, they presented basidia of 29.3 x 11 μm and spindle-shaped and smooth basidiospores of 15.6- 4.6 μm . Likewise, the fruiting bodies of *L. indigo* (Schwein.) Fr. collected from *Pinus* forests at 3100-3500 meters, agreed with that reported by Franco Maass et al. (2012). They presented a water content of 91.1%. Macroscopically, the crowns were 7.5 cm in diameter, convex and umbilicus when ripe, indigo blue in color with grayish concentric areas and with slightly decurrent separated blades of indigo blue color. The stipe measured 4 cm and was blue and smooth. The basidia measured 5.1 x 22 μm , with a smooth-nailed shape, are hyaline and tetraesterygmic, while the basidiospores were oval, measured 5.6 x 7.3 μm and were hyaline and smooth.

Extraction and purification of β -glucans

Total β -glucans extracted from *B. edulis* were equivalent to 16.04 g of β -glucans per 100 g of dry biomass, of which 12.36 g of β -glucans per 100 g of dry biomass corresponded to the alkaline fraction (FAkBe) and 3.68 g of β -glucans per 100 g of dry biomass to the aqueous fraction (FAqBe). Regarding *L. indigo*, 16.42 g of β -glucans were obtained per 100 g of dry biomass, and 12.86 g of β -glucans per 100 g of dry biomass corresponded to the alkaline fraction (FAkLi) and 3.56 g of β -glucans per 100 g of dry biomass to the aqueous fraction (FAqLi). Likewise, it could be seen that the alkaline fraction was greater concentration than the aqueous fraction.

Identification of β -glucans

The FTIR spectra of the four fractions (Figure 1) show the characteristic vibrational mode of the bonds of β -glucans (Movasaghi et al., 2008). In the spectra of the fractions of *B. edulis* (FAqBe and FAkBe) (Figure 1A) and of *L. indigo* (FAqLi and FAkLi) (Figure 1B), there is a band at 3200 cm^{-1} corresponding to the vibrational mode of the hydroxyl bond OH, a band at 2920 cm^{-1} corresponding to the saturated CH bond (Šandula et al., 1999) and a signal from 1160 to 1140 cm^{-1} related to the stretching of the C-O-C glycosidic bond, where the signal at 1040 cm^{-1} corresponds to the stretching C-O bond (Münzberg et al., 1995). The characteristic bands of the carbon-glucoside bonds of a β -glucan corresponding to 1160, 1080, 1040, 970 and 890 cm^{-1} (Alzorqi et al., 2017) were also presented, associated with the sugar region in the range of 1200 cm^{-1} to 950 cm^{-1} and the anomeric region in the range of 950 cm^{-1} to 750 cm^{-1} (Synytsya and Novak, 2014).

The four fractions (Figure 1A, B) present an absorption signal at 1640 cm^{-1} , which is associated with the stretching vibrations of the carbonyl C=O bond of a polysaccharide-protein complex (Alzorqi et al., 2017), The β -glucans of these fractions of *B. edulis* and *L.*

indigo could therefore be protein-coupled.

Antibacterial activity

The different concentrations (500, 250, 125 and 62.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of the aqueous and alkaline fractions of both species showed inhibition in the four bacterial strains (*S. mutans*, *S. aureus*, *E. coli* and *E. faecalis*).

According to the statistical analysis, the FAqBe and FAkBe presented a $p < 0.05$ in the treatments of *S. mutans* ($p = 0.000$), *E. coli* ($p = 0.025$) and *E. faecalis* ($p = 0.000$). There was thus an effect of different concentrations on bacterial inhibition (Table 1), where the highest concentrations showed greater inhibition of bacterial growth (Figure 2). The concentrations with the highest percentage of inhibition in *S. mutans* were of FAqBe at 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ with 71.2 % of inhibition and 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ with 66.31 % of inhibition. For *E. coli*, FAkBe at 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ presented 43.91% of inhibition, and FAqBe at 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ presented 44.15% of inhibition. In the case of *E. faecalis*, both FAqBe and FAkBe at 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ showed the highest percentages of inhibition, with values of 83.60% and 79.55 %, respectively. On the other hand, *S. aureus* presented a $p = 0.059$, signifying that there is no effect of different concentrations on inhibition. However, this strain reached values of up to 97.64% of inhibition at 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of FAkBe.

According to the Tukey multiple range test (table 1), statistically significant differences exist among the bacterial inhibition of *S. mutans* and the aqueous and alkaline fractions of *B. edulis*, since the concentrations of FAqBe used present greater antibacterial activity than those of the FAkBe. Moreover, *E. coli* and *E. faecalis* show statistically significant differences among the concentrations of both FAqBe and FAkBe, but not between the aqueous and alkaline fractions. In the case of *S. aureus*, no treatment showed statistical differences.

In the case of FAqLi and FAkLi a $p < 0.05$ was presented in both *S. aureus* ($p = 0.047$) and *E. faecalis* ($p = 0.000$). It should be noted that, in *S. aureus*, there is an effect of different concentrations on bacterial inhibition. However, according to the multiple range test, there are no statistically significant differences among the treatments (Table 1), although FAqLi at 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ presented 95 % of bacterial inhibition. For *E. faecalis*, FAqLi at 500 and 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ showed the highest percentage of inhibition with 75.79 and 70.58 %, respectively, while FAkLi at 500 and 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ presented 87.07 and 69.14 % of inhibition respectively. The treatments of *S. mutans* ($p = 0.727$) and *E. coli* ($p = 0.07$), presented a $p > 0.05$, and therefore no effect of different concentrations on bacterial inhibition was found. However, FAqLi at 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ presented 69 % of inhibition on *S. mutans*, and FAqLi at 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ showed 70 % of inhibition on *E. coli*.

According to the Tukey multiple range test (table 1), only *E. faecalis* presented statistically significant differences between the concentrations of FAqLi and FAkLi, but not between the

aqueous and alkaline fractions. In the case of *S. mutans*, *E. coli* and *S. aureus*, no treatment showed statistical differences.

We can also observe that each fraction presented strong antibacterial activity on the four strains (figure 2). In general, the highest percentage of inhibition of the four fractions was obtained at the highest concentration ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$), approaching the positive control (sterile culture broth), while the lowest percentage of inhibition was at the lowest concentration ($62.5 \mu\text{g mL}^{-1}$), close to the negative control (bacterial inoculum with culture broth). However, FAqBe and FAkLi showed greater inhibition in *S. mutans* from the lowest concentration ($62.5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Likewise, FAkBe and FAqLi presented greater inhibition on *S. aureus* at all concentrations. It is important to highlight that there were no differences between the bacterial inhibition caused by the aqueous and alkaline fractions of both species of fungi, with the exception of FAqBe and FAkBe on *S. mutans*.

Discussion

Polysaccharides, including β -glucans, are structural metabolites that make up approximately 50% of the dry weight of fruiting bodies (Arango and Nieto, 2013). In this study, *B. edulis* was composed of 16.04 g of β -glucans per 100 g of dry biomass, including the aqueous and alkaline fraction, while *L. indigo* comprised 16.42 g of β -glucans per 100 g of dry biomass, including both fractions. Rathore et al. (2017) stated that there is a direct relationship between biomass and concentration of β -glucans, so biomass production is essential for the generation of β -glucans in the fruiting bodies, especially when the organisms are in their natural state, since the substrate on which they develop usually contains compounds that induce the synthesis of enzymes responsible for the production of these metabolites (Ooi and Liu, 2000), which makes wild mushrooms a potential source of metabolites (Arango and Nieto, 2013).

As stated above, the concentration of β -glucans can vary due to various factors such as substrate and extraction and purification methods. This was reported by Sari et al. (2017), in which the content of β -glucans in wild fruiting bodies of *B. edulis* was 57.9 g of β -glucans per 100 g of dry biomass in the pileus and 16.88 g of β -glucans per 100 g of dry biomass in the stipe. On the other hand, López-Vázquez et al. (2017) reported concentrations of β -glucans present in fruiting bodies of *L. indigo* of 8.8 g of β -glucans per 100 g of dry biomass.

There are some *in vivo* cells studies in which β -glucans increase their resistance to bacteria by activating non-specific phagocytes of the immune system (Wang and Wang, 1997); however, the antibacterial activity of β -glucans at the *in vitro* level remains to be described in detail. The bioactivity of β -glucans could therefore be due to a direct effect on cells (Endo et al., 2010), In this sense, the strong antibacterial activity shown in this study could be influenced by a direct effect of β -glucans on bacteria, as a result of the physicochemical properties of the β -glucans. According to Karácsonyi and Kuniak (1994), the bioactivity of the β -glucans is related to the characteristics of the structure, its properties of solubility and

the differences between molecular masses. It should be noted that β -glucans can be coupled to a protein, so they have the ability to form supramolecular structures capable of increasing bioactivity through the formation of secondary structures (Chen and Seviour, 2007).

The concentration of β -glucans presented in the fruiting bodies of both species was higher in the alkaline fraction. This could be due to the fact that the extraction process using 2% NaOH is very aggressive and acts to degrade the cell wall (Tseng et al., 2008). It is important to mention that, in this study, there were no differences between the aqueous and alkaline fractions, except in the fractions of *B. edulis* on *S. mutans*. This despite the fact that there are several studies that report the aqueous fraction to normally present higher bioactivity (Xiao et al., 2004), probably due to the mechanisms mentioned above. However, an effect of the concentration of β -glucans of the aqueous and alkaline fractions on bacterial inhibition was evident.

Conclusions

The β -glucans obtained from the wild fruiting bodies of *B. edulis* and *L. indigo* showed strong antibacterial activity on the main bacteria in the environment; *S. mutans*, *S. aureus*, *E. coli* and *E. faecalis*. In general, the highest percentage of inhibition occurred under the highest concentrations (500 and 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of both aqueous and alkaline fractions, with an evident effect of the concentrations of these fractions on bacterial inhibition. Furthermore, no differences were shown between the aqueous and alkaline fractions used.

Finally, it is important to recognize that wild species such as *B. edulis* and *L. indigo* are of high nutritional value as well as presenting an alternative for obtaining metabolites of medicinal, nutraceutical and biotechnological importance.

References

- Alzorqi, I., Sudheer, S., Lu, T.-J., Manickam, S., 2017. Ultrasonically extracted β -d-glucan from artificially cultivated mushroom, characteristic properties and antioxidant activity. *Ultrasonics sonochemistry* 35, 531-540.
- Arango, C.S., Nieto, I.J., 2013. Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Revista Iberoamericana de Micología* 30, 1-8.
- Cano-Estrada, A., Romero-Bautista, L., 2016. Valor económico, nutricional y medicinal de hongos comestibles silvestres. *Revista chilena de nutrición* 43, 75-80.
- Carbonero, E.R., Gracher, A.H.P., Smiderle, F.R., Rosado, F.R., Sasaki, G.L., Gorin, P.A., Iacomini, M., 2006. A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. *Carbohydrate Polymers* 66, 252-257.

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

Chen, W., Wang, W.-P., Zhang, H.-S., Huang, Q., 2012. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from *Boletus edulis* mycelia using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers* 87, 614-619.

Choi, K., 2004. Mushroom grower's handbook 1: oyster mushroom cultivation. Seoul: Mushworld, 153-165.

Donot, F., Fontana, A., Baccou, J., Schorr-Galindo, S., 2012. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers* 87, 951-962.

Endo, M., Beppu, H., Akiyama, H., Wakamatsu, K., Ito, S., Kawamoto, Y., Shimpo, K., Sumiya, T., Koike, T., Matsui, T., 2010. Agaritine purified from *Agaricus blazei* Murrill exerts anti-tumor activity against leukemic cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1800, 669-673.

Franco Maass, S., Burrola Aguilar, C., Arana Gabriel, Y., 2012. Hongos silvestres comestibles: un recurso forestal no maderable del Nevado de Toluca.

Guzmán, G., 2008. Diversity and use of traditional Mexican medicinal fungi. A review. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 10.

Karácsonyi, Š., Kuniak, L., 1994. Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble β -D-glucan. *Carbohydrate Polymers* 24, 107-111.

Khan, A.A., Gani, A., Khanday, F.A., Masoodi, F., 2018. Biological and pharmaceutical activities of mushroom β -glucan discussed as a potential functional food ingredient. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 16, 1-13.

Klaus, A., Kozarski, M., Niksic, M., Jakovljevic, D., Todorovic, N., Van Griensven, L.J., 2011. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharides extracted from the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *LWT-Food Science and Technology* 44, 2005-2011.

Kosanić, M., Ranković, B., Dašić, M., 2012. Mushrooms as possible antioxidant and antimicrobial agents. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR* 11, 1095.

Lemieszek, M.K., Cardoso, C., Nunes, F.H.F.M., Marques, G., Pożarowski, P., Rzeski, W., 2013. *Boletus edulis* biologically active biopolymers induce cell cycle arrest in human colon adenocarcinoma cells. *Food & function* 4, 575-585.

López-Vázquez, E., Prieto-García, F., Gayosso-Canales, M., Sánchez, E.O., Ibarra, J.V., 2017. Phenolics acids, flavonoids, ascorbic acid, β -glucans and antioxidant activity in mexican wild edible mushrooms. *Italian Journal of Food Science* 29.

Lucas, E., Ringler, R., Byerrum, R., Stevens, J., Clarke, D.A., Stock, C.C., 1957. Tumor inhibitors in *Boletus edulis* and other *Holobasidiomycetes*. Reprint from *Antibiot. & Chemother.* 7.

Miyazaki, T., Oikawa, N., Yadomae, T., Yamada, H., Yamada, Y., Hsu, H.-Y., Ito, H., 1979. Relationship between the chemical structure and anti-tumour activity of glucans prepared from *Grifora umbellata*. *Carbohydrate Research* 69, 165-170.

Mizuno, T., Ando, M., Sugie, R., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T., Matsuura, A., 1992. Antitumor activity of some polysaccharides isolated from an edible mushroom, *Ningyotake*, the fruiting body and the cultured mycelium of *Polyporus confluens*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 56, 34-41.

Movasaghi, Z., Rehman, S., ur Rehman, D.I., 2008. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews* 43, 134-179.

Münzberg, J., Rau, U., Wagner, F., 1995. Investigations on the regioselective hydrolysis of a branched β -1, 3-glucan. *Carbohydrate Polymers* 27, 271-276.

Muszyńska, B., Grzywacz-Kisielewska, A., Kała, K., Gdula-Argasińska, J., 2018. Anti-inflammatory properties of edible mushrooms: A review. *Food chemistry* 243, 373-381.

Ochoa-Zarzosa, A., Vázquez-Garcidueñas, M.S., Robinson-Fuentes, V.A., Vázquez-Marrufo, G., 2011. Antibacterial and cytotoxic activity from basidiocarp extracts of the edible mushroom *Lactarius indigo* (Schw.) Fr.(Russulaceae). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 5, 281-288.

Ooi, V.E., Liu, F., 2000. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Current medicinal chemistry* 7, 715-729.

Pizarro, S., Ronco, A.M., Gotteland, M., 2014. β -glucanos: ¿ qué tipos existen y cuáles son sus beneficios en la salud? *Revista chilena de nutrición* 41, 439-446.

Rathore, H., Prasad, S., Sharma, S., 2017. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. *PharmaNutrition* 5, 35-46.

Reis, F.S., Martins, A., Vasconcelos, M.H., Morales, P., Ferreira, I.C., 2017. Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. *Trends in Food Science & Technology* 66, 48-62.

Roncero-Ramos, I., Delgado-Andrade, C., 2017. The beneficial role of edible mushrooms in human health. *Current Opinion in Food Science* 14, 122-128.

Šandula, J., Kogan, G., Kačuráková, M., Machová, E., 1999. Microbial (1→3)-β-D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. *Carbohydrate polymers* 38, 247-253.

Sari, M., Prange, A., Lelley, J.I., Hambitzer, R., 2017. Screening of beta-glucan contents in commercially cultivated and wild growing mushrooms. *Food Chemistry* 216, 45-51.

Smiderle, F.R., Alquini, G., Tadra-Sfeir, M.Z., Iacomini, M., Wichers, H.J., Van Griensven, L.J., 2013. *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1→6)-β-d-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. *Carbohydrate polymers* 94, 91-99.

Stamets, P., 2011. *Growing gourmet and medicinal mushrooms*. Ten speed press.

Synytsya, A., Novak, M., 2014. Structural analysis of glucans. *Annals of translational medicine* 2.

Tsai, S.-Y., Tsai, H.-L., Mau, J.-L., 2007. Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. *LWT-Food Science and Technology* 40, 1392-1402.

Tseng, Y.-H., Yang, J.-H., Mau, J.-L., 2008. Antioxidant properties of polysaccharides from *Ganoderma tsugae*. *Food chemistry* 107, 732-738.

Wang, W.-S., Wang, D.-H., 1997. Enhancement of the resistance of tilapia and grass carp to experimental *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* infections by several polysaccharides. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 20, 261-270.

Wasser, S., 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied microbiology and biotechnology* 60, 258-274.

Xiao, Z., Trincado, C.A., Murtaugh, M.P., 2004. β-Glucan enhancement of T cell IFN γ response in swine. *Veterinary immunology and immunopathology* 102, 315-320.

Zhang, X., Zhang, L., Xu, X., 2004. Morphologies and conformation transition of lentinan in aqueous NaOH solution. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules* 75, 187-195.

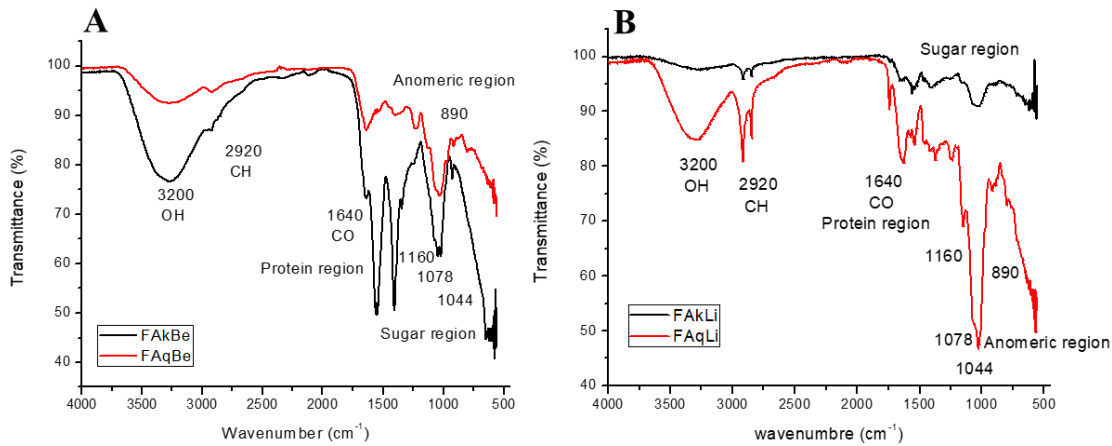


Figure 1. - FTIR spectrum of β -glucans of A) aqueous Fraction of *Boletus edulis* (FAqBe) and alkaline Fraction of *B. edulis* (FAkBe), and B) aqueous Fraction of *Lactarius indigo* (FAqLi) and alkaline Fraction of *L. indigo* (FAkLi).

Table 1.- Bacterial inhibition of fractions from *Boletus edulis* and *Lactarius indigo*

Fraction	Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% Inhibition			
		<i>S. mutans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>
FAqBe	62.5	34.85 \pm 21.01 ba	22.69 \pm 21.90 a	2.25 \pm 10.92 b	18.8 \pm 62.28 bc
	125	43.44 \pm 15.09 ba	16.90 \pm 21.35 a	18.30 \pm 14.84 ab	31.53 \pm 13.19 abc
	250	66.31 \pm 10.48 a	84.81 \pm 74.4 a	44.15 \pm 35.18 a	63.06 \pm 16.32 ab
	500	71.2 \pm 7.78 a	83.63 \pm 73.48 a	27.05 \pm 6.01 ab	83.60 \pm 13.65 a
FAkBe	62.5	26.66 \pm 22.37 b	90.68 \pm 30.78 a	13.84 \pm 10.75 ab	2.02 \pm 4.06 c
	125	16.97 \pm 17.86 b	89.05 \pm 24.94 a	23.89 \pm 11.24 ab	9.54 \pm 2.49 bc
	250	24.46 \pm 20.25 b	87.70 \pm 27.78 a	18.46 \pm 13.25 ab	61.33 \pm 10.74 abc
	500	27.66 \pm 10.41 b	97.64 \pm 13.54 a	43.91 \pm 16.76 a	79.55 \pm 26.46 a
FAqLi	62.5	42.34 \pm 46.63 a	68.98 \pm 56.03 a	16.76 \pm 31.76 a	30.95 \pm 29.66 ab
	125	52.23 \pm 49.80 a	83.63 \pm 64.75 a	36.94 \pm 52.49 a	67.11 \pm 21.80 a

FAkLi	250	61.41 ± 31.51 a	93.94 ± 40.52 a	57.12 ± 16.85 a	70.58 ± 11.43 a
	500	69.00 ± 17.29 a	95.84 ± 28.45 a	70.66 ± 52.16 a	75.79 ± 43.28 a
	62.5	31.25 ± 31.29 a	14.10 ± 2.05 a	2.66 ± 11.80 a	3.47 ± 6.57 b
	125	39.84 ± 18.90 a	23.96 ± 6.17 a	11.49 ± 28.98 a	5.78 ± 22.29 b
	250	60.21 ± 20.02 a	88.33 ± 63.55 a	14.08 ± 14.14 a	69.14 ± 13.38 a
	500	58.22 ± 26.60 a	91.68 ± 7.00 a	52.99 ± 32.98 a	87.07 ± 31.8 a

*Different letters in each column denote significant differences among treatments (Tukey).

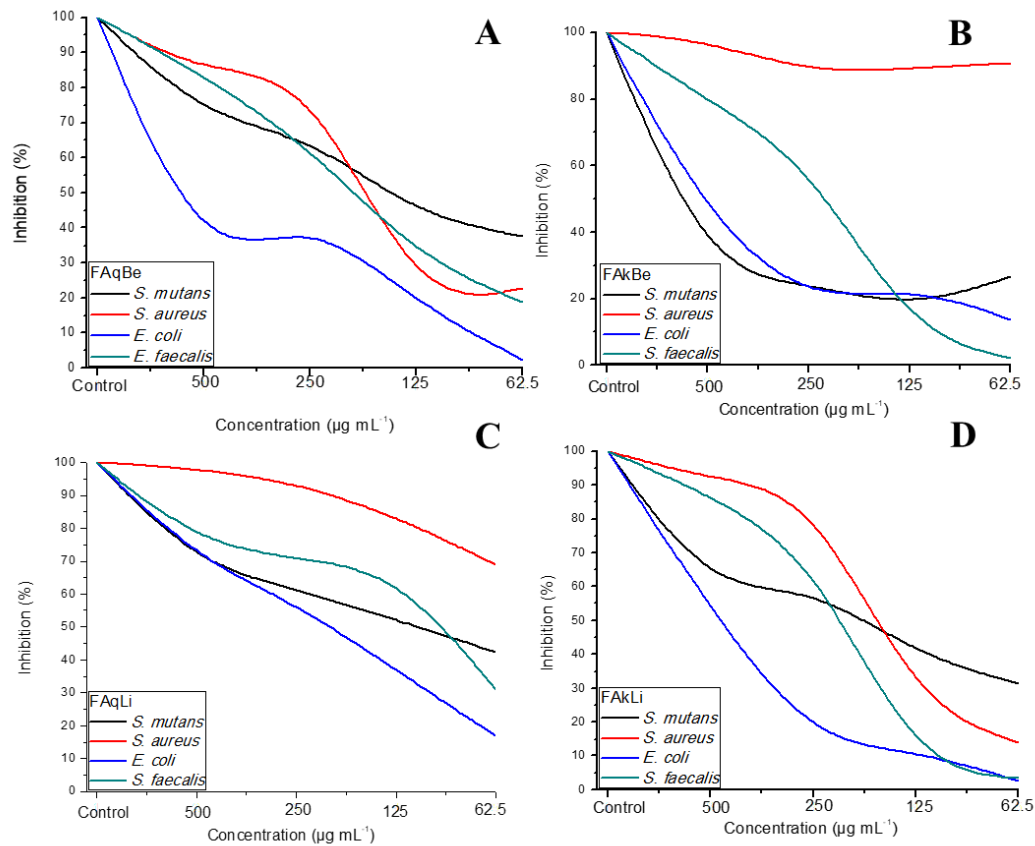


Figure 2. - Bacterial inhibition by: A) aqueous fraction of *Boletus edulis* (FAqBe), B) alkaline fraction of *B. edulis* (FAkBe), C) aqueous fraction of *Lactarius indigo* (FAqLi) and D) alkaline fraction of *L. indigo* (FAkLi).

VIII.- REFERENCIAS

Abdullah, N., Ismail, R. N. Johari M. K., y Annuar, M. (2013). Production of liquid spawn of an edible grey oyster mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél by submerged fermentation and sporophore yield on rubber wood sawdust. *Scientia Horticulturae*, 161: 65-69.

Alzorqi, I., Sudheer, S. Lu T.-J. y S. Manickam (2017). Ultrasonically extracted β -d-glucan from artificially cultivated mushroom, characteristic properties and antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 35: 531-540.

Alvarado-Castillo, G., Mata, G., & Benítez-Badillo, G. (2015). Importancia de la domesticación en la conservación de los hongos silvestres comestibles en México. *Bosque*, 36(2), 151–161. doi: 10.4067/S0717-92002015000200001

Alvarado-Castillo, G., y Benites, G. (2009). El enfoque de agroecosistemas como una forma de intervención científica en la recolección de hongos silvestres comestibles. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 10 (3), 531-539.

Arana-Gabriel, Y., Burrola-Aguilar, C., Garibay-Orijel, R. y Franco-Maass, S. (2014). Obtención de cepas y producción de inóculo de cinco especies de hongos silvestres comestibles de alta montaña en el centro de México. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Medio Ambiente*, 20(3), 213-226.

Arango, C. S. y Nieto I. J. (2013). Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(1): 1-8.

Arias, M., A. Aguirre, M. Angarita, C. Montoya y J. Restrepo (2009). Aspectos ingenieriles del cultivo *in vitro* de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios. *Dyna* 76(157): 109-121.

Cano-Estrada, A., & Romero-Bautista, L. (2016). Valor económico, nutricional y medicinal de hongos comestibles silvestres. *Revista chilena de nutrición*, 43(1), 75-80.

Bautista-González, J. A. (2013). *Conocimiento tradicional de hongos medicinales en seis localidades diferentes del país*. Tesis de licenciatura.

Boa, E. (2005). *Los hongos silvestres comestibles perspectiva global de su uso e importancia para la población*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO. Roma.

Brizuela, M. A., L. García, L. Pérez y M. Mansur (1998). Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana de Micología*, 15: 69-74.

Burrola-Aguilar, C., Montiel, O., Garibay-Orijel, R., y Zizumbo-Villarreal, L. (2012). Conocimiento tradicional y aprovechamiento de los hongos comestibles silvestres en la region de Amanalco, Estado de México. *Revista Mexicana de Micología*, 35, 1-16.

Burrola-Aguilar, C., Garibay-Orijel, R., Argüelles-Moyao, A., 2013. *Abies religiosa* forests harbor the highest species density and sporocarp productivity of wild edible mushrooms among five different vegetation types in a neotropical temperate forest region. *Agrofor. Syst.* 87 (5), 1101–1115. <http://dx.doi.org/10.1007/s10457-013-9623-z>

Černá, M., A. S. Barros, A. Nunes, S. M. Rocha, I. Delgadillo, J. Čopíková y M. A. Coimbra (2003). Use of FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives. *Carbohydrate Polymers*, 51(4): 383-389.

Chegwin-Angarita, C. y I. J. Nieto-Ramírez (2014). Effect of non-conventional carbon sources on the production of triterpenoids in submerged cultures of *Pleurotus macrofungi*. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 59(1): 2287-2293.

Chegwin, A., R. Nieto y J. Ivonne (2013). Influencia del medio de cultivo en la producción de metabolitos secundarios del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* cultivado por fermentación en estado líquido empleando harinas de cereales como fuente de carbono. *Revista mexicana de micología*, 37: 01-09.

Chen, W., W.-P. Wang, H.-S. Zhang y Q. Huang (2012). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from *Boletus edulis* mycelia using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 87(1): 614-619.

Cruz-Ulloa, B. S. (1995). *Micorrizas un caso de simbiosis entre plantas y hongos*. México: Colegio de Ciencias y Humanidades, UNAM.

Delgado, A., (2005). *Glosario ilustrado de los caracteres macroscopico en Basidiomycetes con himenio laminar*. Las prensas de la ciencia. México.

Deacon, J. W. (1988). *Introducción a la micología moderna*. Limusa. México, DF.

Díaz-Talamantes, C., C. Burrola-Aguilar, X. Aguilar-Miguel y G. Mata (2017). Crecimiento micelial *in vitro* de hongos comestibles silvestres de alta montaña en el centro de México. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 23(3): 369-383.

Endara-Agramont, A.R., Franco-Maass, S., Nava-Bernal, G., Valdez-Hernandez, J.I., Fredericksen, T.S., 2012. Effect of human disturbance on the structure and regeneration of forests in the Nevado de Toluca National Park, Mexico. *J. For. Res.* 23 (1), 39–44. <http://dx.doi.org/10.1007/s11676-012-0116-0>.

Franco-Maass, S., Burrola-Aguilar, C., y Arana-Gabriel, Y. (2012). *Hongos silvestres comestibles: un recurso forestal no maderable del Nevado de Toluca*. México. EON.

Franco-Maass, S., Burrola-Aguilar, C., Arana-Gabriel, Y. y García-Almaraz, L.A. (2016) A local knowledge-based approach to predict anthropic harvesting pressure zones of wild edible mushrooms as a tool for forest conservation in Central Mexico. *Forest Policy and Economics* 73 (2016) 239–250. doi.org/10.1016/j.forpol.2016.09.020

Fisher, D. W. y Bessette, A. E. (2004). *Edible wild mushrooms of North America, China*.

Gaitán-Hernández, R. y Salmones, D. (2015). Uso de residuos lignocelulósicos para optimizar la producción de inóculo y la formación de carpóforos del hongo comestibles *Lentinula boryana*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(7),1639- 1652.

Garibay-Orijel, R. y Ruan-Soto, F. (2014). Listado de los hongos silvestres consumidos como alimento tradicional en México. In A. Moreno-Fuentes, y R. Garibay-Orijel (Eds.), *La etnomicología en México, estado del arte*. México: CONACYT-UAEH-UNAM.

Garibay-Orijel, R., Cordova, J., Cifuentes, J., Valenzuela, R., Estarda-Torres, A., y Kong, A. (2009a). Integrating wild mushrooms use into a model of sustainable management for indigenous community forests. *Forest Ecology and Management*, 258, 122-131.

Index Fungorum, 2017. Recuperado de (<http://www.indexfungorum.org>)

Juma I, Tibuhwa D.D., Mshandete, A.M y Kivaisi A.K. (2015) Domestication of Seven Tanzanian Indigenous Saprophytic Edible Mushrooms. *Int. Res. J. Biological Sci.* 4(12), 1-8.

Harmon, A. D., Weisgraber, K. H., Y Weiss, U. (1980). Preformed azulene pigments of *Lactarius indigo* (Schw.) Fries (Russulaceae, Basidiomycetes). *Experientia*, 36(1), 54-56.

Kalyoncu, F., Oskay, M., & Kayalar, H. (2010). Antioxidant activity of the mycelium of 21 wild mushroom species. *Mycology*, 1(3), 195-199.

Khan, A. A., A. Gani, F. A. Khanday y F. Masoodi (2018). Biological and pharmaceutical activities of mushroom β -glucan discussed as a potential functional food ingredient. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 16: 1-13.

Khan, A. A., A. Gani, A. Shah, F. Masoodi, P. R. Hussain, I. A. Wani y F. A. Khanday (2015). Effect of γ -irradiation on structural, functional and antioxidant properties of β -glucan extracted from button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 31: 123-130.

Klaus, A., M. Kozarski, M. Niksic, D. Jakovljevic, N. Todorovic y L. J. Van Griensven (2011). Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharides extracted from the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *LWT-Food Science and Technology*, 44(10): 2005-2011.

Legarda, X. L., C. A. Echevarria y F. S. Sánchez (2015). Producción de polisacáridos a partir de *Ganoderma* sp., aislado en la región andina. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2): 44-54.

Lemieszek, M. K., Cardoso, C., Nunes, F. H. F. M., Marques, G., Pożarowski, P., y Rzeski, W. (2013). *Boletus edulis* biologically active biopolymers induce cell cycle arrest in human colon adenocarcinoma cells. *Food & function*, 4(4), 575-585

Lucas, E. H., Ringler, R. L., Byerrum, R. U., Stevens, J. A., Clarke, D. A., & Stock, C. C. (1957). Tumor inhibitors in *Boletus edulis* and other Holobasidiomycetes. *Reprint from Antibiot. & Chemother.*, 7(1).

Ma, L., Y. Q. Lin, C. Yang, Z. H. Ying y X. L. Jiang (2016). Production of liquid spawn of an edible mushroom, *Sparassis latifolia* by submerged fermentation and mycelial growth on pine wood sawdust. *Scientia horticultrae*, 209: 22-30.

Martínez-Carrera, D., P. Morales, M. Sobal, M. Bonilla y W. Martínez. (2007). México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos comestibles. Capítulo 6.1, 20 pp. En: *El Cultivo de Setas Pleurotus spp. en México*. J. E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata y H. Leal (Eds.). ECOSUR-CONACYT, México, D.F. ISBN 978-970-9712-40-7.

Martínez-Carrera, D., Larqué, A., Aliphath, M., Aguilar, A., Bonilla, M., y Martínez, W. (2000). *La biotecnología de hongos comestibles en la seguridad y soberanía alimentaria de México*. II Foro Nacional sobre Seguridad y Soberanía Alimentaria. Academia Mexicana de Ciencias-CONACYT, México, D. F. Pp. 193-207. ISBN 968- 7428-11-2.

Mata, G., Salmones, D., & Gaitán-Hernández (2010). Basic and applied research on mushroom cultivation at the Institute of Ecology, Xalapa, México. In D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales, and V. M. Mora (Eds.), *Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción- consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y perspectivas en el siglo XXI* (pp. 243–270). México: Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNSCONACYT-AMC-UAEM- UPAEP- IMINAP.

Mycobank, 2017. recuperado de (<http://www.mycobank.org>)

Morales, P., Sobal, M., Bonilla, M., Martínez, W., y Martínez-Carrera, D. (2007). El Centro de Vinculación con el Sistema de Producción- Consumo de los Hongos Comestibles (CVINHCO) del Colegio de Postgraduados. In J.E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata, H. Leal (eds.) *El Cultivo de Setas Pleurotus en México*. ECOSUR-CONACYT, México, D.F. ISBN 978-970-9712-40-7.

Mizuno, M., A. Yamakawa, K. Minato, S. Kawakami, S. Tatsuoka, H. Terai y H. Tsuchida (1999). Preparation of antibody against antitumor β -glucan in *Grifola frondosa* and its application. *Food Science and Technology Research*, 5(4): 398-401.

Mizuno, T., M. Ando, R. Sugie, H. Ito, K. Shimura, T. Sumiya y A. Matsuura (1992). Antitumor activity of some polysaccharides isolated from an edible mushroom, Ningyotake, the fruiting body and the cultured mycelium of *Polyporus confluens*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 56(1): 34-41.

Muszyńska, B., A. Grzywacz-Kisielewska, K. Kała y J. Gdula-Argasińska (2018). Anti-inflammatory properties of edible mushrooms: A review. *Food chemistry*, 243: 373-381.

Nie, S., H. Zhang, W. Li y M. Xie (2013). Current development of polysaccharides from *Ganoderma*: Isolation, structure and bioactivities. *Bioactive carbohydrates and dietary fibre*, 1(1): 10-20.

Oberle, J., J. Dighton y G. Arbuckle-Keil (2015). Comparison of methodologies for separation of fungal isolates using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and Fourier transform infrared-attenuated total reflectance (FTIR-ATR) microspectroscopy. *Fungal biology*, 119(11): 1100-1114.

Ochoa-Zarzosa, A., Vázquez-Garcidueñas, M. S., Robinson-Fuentes, V. A., y Vázquez-Marrufo, G. (2011). Antibacterial and cytotoxic activity from basidiocarp extracts of the edible mushroom *Lactarius indigo* (Schw.) Fr.(Russulaceae). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(2), 281-288.

Palacios, I., A. García-Lafuente, E. Guillamón y A. Villares (2012). Novel isolation of water-soluble polysaccharides from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *Carbohydrate research*, 358: 72-77.

Papaspyridi, L.-M., P. Katapodis, Z. Gonou-Zagou, E. Kapsanaki-Gotsi y P. Christakopoulos (2010). Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibres content by *Pleurotus ostreatus* ATHUM 4438 under submerged culture. *Biochemical engineering journal*, 50(3): 131-138.

Pilz, D., R. Molina, 1997. American matsutake mushroom harvesting in the United States: social aspects and opportunities for sustainable development. In: Palm, M. e I. Chapela (eds.), *Mycology in sustainable development: expanding concepts, vanishing borders*. Parkway Publisher, Inc. Boone, pp. 68-75.

Pizarro, S., A. M. Ronco y M. Gotteland (2014). β -glucanos: ¿Qué tipos existen y cuáles son sus beneficios en la salud? *Revista chilena de nutrición*, 41(4): 439-446.

Rathore, H., S. Prasad y S. Sharma (2017). Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: a review. *PharmaNutrition*, 5(2): 35-46.

Reis, F. S., A. Martins, M. H. Vasconcelos, P. Morales y I. C. Ferreira (2017). Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. *Trends in Food Science and Technology*, 66: 48-62.

Roncero-Ramos, I. and C. Delgado-Andrade (2017). The beneficial role of edible mushrooms in human health. *Current Opinion in Food Science*, 14: 122-128.

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

Ruthes, A. C., F. R. Smiderle y M. Iacomini (2015). D-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. *Carbohydrate polymers*, 117: 753-761.

Salmones, D., Ballesteros, H., Zulueta, R. y Mata, G., (2012). Determinación de las características productivas de cepas mexicanas silvestres de *Agaricus bisporus*, para su potencial uso comercial. *Revista Mexicana de Micología*, 36: 9-15.

Sánchez, J. E., & Royse, D. (2002). *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* México: Limusa.

Šandula, J., G. Kogan, M. Kačuráková y E. Machová (1999). Microbial (1→3)- β -D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. *Carbohydrate polymers*, 38(3): 247-253.

Stamets, P. (2000). *Growing gourmet and medicinal mushrooms* (3rd ed.), China: Ten Speed Press.

Sari, M., A. Prange, J. I. Lelley y R. Hambitzer (2017). Screening of beta-glucan contents in commercially cultivated and wild growing mushrooms. *Food chemistry* 216: 45-51.

Smiderle, F. R., G. Alquini, M. Z. Tadra-Sfeir, M. Iacomini, H. J. Wichers y L. J. Van Griensven (2013). *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1→6)- β -D-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. *Carbohydrate polymers*, 94(1): 91-99.

Smiderle, F. R., E. R. Carbonero, C. G. Mellinger, G. L. Sasaki, P. A. Gorin y M. Iacomini (2006). Structural characterization of a polysaccharide and a β -glucan isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes*. *Phytochemistry*, 67(19): 2189-2196.

Synytsya, A. y M. Novak (2014). Structural analysis of glucans. *Annals of translational medicine*, 2(2).

Synytsya, A. y M. Novák (2013). Structural diversity of fungal glucans. *Carbohydrate polymers*, 92(1): 792-809.

Tsai, S. Y., Tsai, H. L., & Mau, J. L. (2007). Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. *LWT-Food Science and Technology*, 40(8), 1392-1402.

Villegas, E.V. (2007). Evaluación del crecimiento de *Lentinula edodes* en medios de cultivo sólido para la producción de micelio como inóculo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(2), 56-63.

Villalobos, G., 2006. *El manejo de las plantas medicinales y alimenticias en los temazcales otomíes del Valle de Toluca*. Tesis de maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México Toluca, México.

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