UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

ESTUDIO BIOQUÍMICO DEL POTENCIAL FUNCIONAL DE DOS CEPAS DE *Ganoderma lucidum* (Reishi) CULTIVADAS EN COLOMBIA PARA SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS

German Dario Morera Bedoya

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de ciencias, Departamento de química Bogotá,
Colombia

2023

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

BIOCHEMICAL STUDY OF THE FUNCTIONAL POTENTIAL OF TWO STRAINS OF Ganoderma lucidum (Reishi) CULTIVATED IN COLOMBIA FOR THEIR APPLICATION IN THE FOOD INDUSTRY

German Dario Morera Bedoya

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de ciencias, Departamento de química Bogotá,
Colombia

2023

ESTUDIO BIOQUÍMICO DEL POTENCIAL FUNCIONAL DE DOS CEPAS DE *Ganoderma lucidum* (Reishi) CULTIVADAS EN COLOMBIA PARA SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS

German Darío Morera Bedoya

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

Director:
Doctor, Harold Duban Ardila Barrantes Codirectora:
Doctora, Carolina Chegwin Angarita

Grupos de Investigación:
Estudio de Actividades metabólicas vegetales
Química de hongos macromicetos colombianos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de química Bogotá, Colombia
2023

A mi familia, mis padres, mis amigos y todas las personas que contribuyeron a conseguir este logro.

La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste.

Marie Curie

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Nombre German Darío Morera Bedoya

Fecha 01/08/2023

Agradecimientos

A mis directores de tesis, profesores Harold Ardila y Carolina Chegwin por su orientación, asesoría y tiempo dedicado durante el desarrollo de la investigación y todas las correcciones a este documento, a los profesores Sandra Montoya, Leopoldo Rojas, Norma Valencia, Diana Marcela Aragón, y especialmente a la profesora Nohora Vega por su constante asesoría, orientación y acompañamiento en el desarrollo experimental.

A mis compañeros de laboratorio de Química de Hongos que me ayudaron tanto durante el desarrollo de esta tesis, con especial mención a Carolina Vega Oliveros, Jimmy Bernal, Nicolás Mancera, Jeimmy Peña.

A mis compañeros de laboratorio de Actividades Metabólicas Vegetales, que contribuyeron a mi formación y asesoraron cada uno de los pasos de esta investigación, especial mención a Fabiola Santos, Patricia Martínez, Leidy Vanegas, Santiago Monroy, Wanner Barreto, Fernanda Castiblanco, Eliana Bustos y José Miguel Esquivel.

A mis amigos, Katherine Suarez, Eliana Castiblanco, Diego Gutiérrez, Deisy Hidalgo, Edilene Ramírez, quienes siempre estuvieron para orientarme y guiarme en los momentos en que sentía que no contaba con lo necesario para culminar esta etapa.

Por último, pero no menos importante a mi familia, Mi madre y sus oraciones, Norma Bedoya. Mi padre y sus frases consistentes para forjar mi carácter y mi integridad, German Morera. Mi hermano, Daniel Morera, por ayudarme a tomar respiros y recargar energías. Mi abuela, tíos, primos, especialmente a Paula Natalia Bedoya Trujillo, quien desde la distancia siempre me ha dado a conocer su admiración por mi trabajo y por el conocimiento que he adquirido a lo largo de estos años. Y a mi mejor amigo, confidente y esa persona que día a día estuvo para decirme ¡Animo que tú puedes! Julián gracias por siempre confiar en mí y darme tu mano para culminar esta meta.

Resumen

El hongo macromiceto *Ganoderma lucidum*, es una fuente de compuestos bioactivos con actividades biológicas científicamente comprobadas. A pesar de esto, hay pocos estudios enfocados a estudiar el potencial bioquímico de las cepas de este hongo comercializadas en nuestro país. Es por ello por lo que en esta investigación se presentan los resultados del estudio de la capacidad antioxidante y la actividad inhibitoria de AGEs *in vitro,* así como la presencia de lectinas con actividad aglutinante, de dos cepas de este hongo cultivadas en Colombia de manera tradicional a escala industrial (EUA y BEL). Para ello se realizaron extractos empleando solventes de diferente polaridad y se evaluaron por métodos espectrofotométricos, la capacidad antioxidante y la inhibición de la formación de productos avanzados de glicosilación AGEs. Este análisis se complementó con un estudio dirigido a las potenciales moléculas bioactivas, usando determinación de metabolitos por métodos espectrofotométricos, perfilado cromatográfico (HPLC-DAD y CG-MS) y análisis estadísticos multivariados (PLS-DA). Finalmente, se evaluó en un modelo *in vitro* la presencia de lectinas midiendo la aglutinación de eritrocitos a partir de extractos proteicos de las dos cepas en estudio. Se encontró que los extractos etanólicos y en diclorometano de las dos cepas, presentan actividad antioxidante e inhibitoria de AGE. Sin embargo, la cepa BEL presentó los mayores niveles de dichas actividades; el análisis cromatográfico y estadístico permitió encontrar qué, diferentes metabolitos del tipo triterpenos, están relacionados con el potencial antioxidante e inhibitorio de AGEs. Por otro lado, se encontró que en esta misma cepa se presenta importante actividad antiaglutinante; la purificación y caracterización de las lectinas presentes permitió determinar que en la cepa BEL, se presentan lectinas con propiedades bioquímicas que le otorgan potencial para ser usadas en la industria de alimentos. El presente estudio contribuye al conocimiento de la composición bioquímica del hongo *G. lucidum* y confirma su actividad biológica *in vitro* en el micelio producido en Colombia.

Palabras clave: *Ganoderma*, compuestos bioactivos, triterpenos, AGEs, lectina, aglutinación.

Abstract

STUDY OF THE POTENTIAL FUNCTION OF TWO STRAINS OF *Ganoderma lucidum* (REISHI) CULTIVATED IN COLOMBIA FOR APPLICATION IN THE FOOD INDUSTRY

The mushroom fungus *Ganoderma lucidum* is a source of bioactive compounds with scientifically proven biological activities. Despite this, there are few studies focused on studying the biochemical potential of the strains of this fungus commercialized in our country. For this reason, this research presents the results of the study of the antioxidant capacity and the inhibitory activity of AGEs in vitro, as well as the presence of lectins with binding activity, of two strains of this fungus traditionally cultivated in Colombia on an industrial scale (EUA and BEL). For this purpose, extracts were made, using solvents of different polarity, and were evaluated by spectrophotometric methods, the antioxidant capacity and the inhibition of the formation of advanced AGEs glycosylation products. This analysis was complemented with a study aimed at potential bioactive molecules, using metabolite determination by spectrophotometric methods, chromatographic profiling (HPLC-DAD and GC-MS) and multivariate statistical analysis (PLS-DA). Finally, the presence of lectins was evaluated in an in vitro model by measuring the agglutination of erythrocytes from protein extracts of the two strains under study. It was found that the ethanolic and dichloromethane extracts of the two strains showed antioxidant and AGE inhibitory activity. However, the BEL strain presented the highest levels of these activities; the chromatographic and statistical analysis allowed finding that different metabolites of the triterpene type are related to the antioxidant and AGE inhibitory potential. On the other hand, it was found that this strain has an important antiagglutinating activity; the purification and characterization of the lectins present allowed determining that the BEL strain has lectins with biochemical properties that give it the potential to be used in the

food industry. The present study contributes to the knowledge of the biochemical composition of the fungus *G. lucidum* and confirms it is *in vitro* biological activity in the mycelium produced in Colombia.

Key words: *Ganoderma*, bioactive compounds, triterpenes, AGEs, lectin, agglutination.

Contenido

Lista de figuras 14

Lista de tablas 16

Lista de Símbolos y abreviaturas 17
Introducción. 19 1
Capítulo: Estado actual del tema 22
1.1 Hongos macromicetos 22
1.1.1 Generalidades de los hongos medicinales 22
1.2 Ganoderma lucidum: actividades biológicas y su composición química 23
1.2.1 Compuestos terpenoidales 25
1.2.2 Compuestos polifenólicos 26
1.2.3. Lectinas 28
1.3 Alimentos funcionales y nutraceúticos 29
1.4 Antioxidantes, AGES y lectinas en la industria de los alimentos 31
1.4.1 Importancia de la evaluación de la capacidad antioxidante en la industria de alimentos 31
1.4.2 Importancia de la evaluación de la inhibición de la formación de AGEs en la industria de alimentos 32
1.4.3 Importancia del estudio de las lectinas en la industria de alimentos 34
1.5 Uso del hongo *Ganoderma lucidum* en la industria de alimentos 35
1.6 Desarrollo de alimentos funcionales en la industria colombiana 36

2 Capítulo: Evaluación de las actividades antioxidantes, inhibitorias de la formación de AGEs y actividad aglutinante presentes en dos cepas de *G. lucidum* producidas en Colombia 38
2.1 Resumen 38
2.2 Abstract 38
2.3 Introducción 39
2.4 Materiales y Métodos 40
2.4.1 Cultivo de las cepas del hongo 40
2.4.2 Extracción de metabolitos 41

2.4.3 Determinación del contenido total de proteína en las cepas del hongo 41
2.4.4 Extracción de proteínas 41
2.4.5 Determinación de proteína total y extraída. 42
2.4.6 Evaluación de la actividad biológica 42
2.4.7 Evaluación de la actividad antioxidante 43
2.4.1.1 Capacidad captadora del radical DPPH* y del radical catión ABTS*+ 43
2.4.1.2 Capacidad antioxidante para inhibir la peroxidación lipídica del ácido linoleico (IPAL) 43
2.4.1.3 Capacidad antioxidante para reducir el ion Férrico (PFRAP)..... 44
2.4.8 Evaluación de la inhibición de productos avanzados de glicosilación AGEs .. 45
2.4.9 Evaluación de la actividad aglutinante de los extractos de proteína. 46
2.4.10 Análisis estadístico 46
2.5 Resultados y Discusión 46
XII ESTUDIO DEL POTENCIAL FUNCIONAL DE DOS CEPAS DE *Ganoderma lucidum* (Reishi) CULTIVADAS EN COLOMBIA PARA SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS

2.5.1 Extracción de metabolitos 47
2.5.2 Contenido total y rendimiento de extracción de proteínas 47
2.5.3 Actividad antioxidante e inhibitoria de AGEs 50
2.5.4 Actividad aglutinante de los extractos proteicos 56
2.5.4.1 Screening preliminar de la actividad aglutinante 56
2.6 Conclusiones 59

3 Análisis de metabolitos de las dos cepas de *Ganoderma lucidum* 60
3.1 Resumen 60
3.2 Abstract 60
3.3 Introducción 61
3.4 Materiales y Métodos 62
3.4.1 Preparación de extractos de metabolitos para el análisis por métodos espectrofotométricos y cromatográficos 62
3.4.2 Determinación de compuestos terpenoidales 62
3.4.3 Determinación de compuestos polifenólicos 62
3.4.4 Determinación de compuestos flavonoides 63
3.4.5 Determinación de azúcares totales 63
3.4.6 Determinación de azúcares reductores 63
3.4.7 Determinación de azúcares no reductores 63
3.4.8 Perfilado cromatográfico de los extractos con actividad antioxidante e inhibitoria de productos avanzados de glicosilación (anti-AGEs) 63
3.4.8.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a detector de arreglo de diodos (CLAE-DAD) 64
3.4.8.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) 64
3.4.9 Análisis estadístico 65
3.5 Resultados y Discusión 66

3.5.1 Cuantificación de algunas familias de metabolitos en las cepas de *G. lucidum* 66
3.5.2 Perfilado cromatográfico de los extractos más activos de *Ganoderma lucidum* 72
3.5.2.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a detector de arreglo de diodos (CLAE-DAD). 72
3.5.2.2 Cromatografía de gases acoplada a detector de espectrometría de masas (CG-EM) 81
3.6 Conclusiones 89

4 Purificación y caracterización parcial de una lectina presente en *Ganoderma lucidum.* 90
4.1 Resumen 90
4.2 Abstract 90
4.3 Introducción 91
4.4 Materiales y Métodos. 93
4.1.1 Selección de condiciones para la extracción de lectinas 93
4.4.2 Determinación de los títulos de aglutinación 93
4.4.3 Evaluación de la inhibición de la actividad aglutinante 93
4.4.4 Purificación parcial de la lectina 94
4.1.1.1 Precipitación son sulfato de amonio 94

4.1.1.2 Cromatografía de afinidad 94
4.4.5 Seguimiento de la purificación de la lectina 95
4.4.6 Separación electroforética 95
4.4.6.1 SDS-PAGE 95
4.4.6.2 Isoelectroenfoque 96
4.4.7 Evaluación del efecto la temperatura y el pH sobre la actividad aglutinante .. 96
4.5 Resultados y Discusión 97
4.5.1 Selección del buffer de extracción de proteínas, títulos e inhibición de la aglutinación 97
4.5.2 Purificación de lectinas usando cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-Lactosa. 101
4.5.3 Isoelectroenfoque de las fracciones retenidas y eluidas con PBS + Lactosa 103
4.5.4 Efecto la temperatura y el pH sobre la actividad aglutinante del extracto crudo de proteína 105
4.6 Conclusiones 106

5 Recomendaciones 108

Bibliografía 109

Lista de figuras

Figura 1-1. Relación entre la familia de metabolitos especializados de G. lucidum y su actividad biológica 26
Figura 1-2. Relación entre algunas proteínas de *G. lucidum* y su actividad biológica 26
Figura 1-3. Estructura de algunos compuestos triterpenoidales aislados de *G. lucidum* .. 28
Figura 1-4. Estructura química de diversos compuestos polifenólicos tomado de la referencia (30) 30
Figura 1-5. Importancia de la relación entre los diferentes actores involucrados en el estudio y desarrollo de alimentos funcionales y nutraceúticos Adaptado de Blades, 2000 y Yeung et al., 2018 (40) 33
Figura 1-6. Modelo integrativo del mecanismo de inducción de las complicaciones de la diabetes (41) 35
Figura 2-1. Rendimiento de extracción de las diferentes fracciones de metabolitos 50
Figura 2-2. Contenido total de proteína y rendimiento de extracción empleando dos buffers de extracción diferentes 52
Figura 2-3. Concentración inhibitoria efectiva media IC50 (ug/mL) de la captura del radical DPPH para los diferentes extractos evaluados 53
Figura 2-4. Concentración inhibitoria efectiva media IC50 (ug/mL) de la captura del cation radical ABTS para los diferentes extractos evaluados 54
Figura 2-5. Concentración inhibitoria efectiva media IC_{50} (ug/mL) de la inhibición de peroxidación lipídica para los diferentes extractos evaluados 55
Figura 2-6. Concentración efectiva media EC_{50} (ug/mL) para la reducción del ion Férrico de los diferentes extractos evaluados 56
Figura 2-7. Concentración inhibitoria efectiva media IC50 (ug/mL) de la formación de AGES para los extractos evaluados 57
Figura 2-8. Identificación de los grupos sanguíneos de acuerdo con los aglutinógenos presentes en la membrana de los eritrocitos (Dean, L. (2005)) 59
Figura 2-9. Screening preliminar de la aglutinación de los extractos crudos para las dos cepas 60
Figura 3-1. Cuantificación espectrofotométrica de las diferentes familias de metabolitos de interés 70
Figura 3-2. PCA para la actividad antioxidante frente al modelo de captura del radical ABTS*+ de los diferentes extractos de las dos cepas, considerando los grupos funcionales cuantificados por espectrofotometría. A. PCA y B. Diagrama de cargas 72
Figura 3-3. PCA para la actividad antioxidante frente al modelo de captura del radical DPPH* de los diferentes extractos de las dos cepas, considerando los grupos funcionales cuantificados por espectrofotometría A. PCA y B. Diagrama de cargas 72

Figura 3-4. Gráficos de puntuaciones de Variable de Importancia (VIP)..... 73
Figura 3-5. Cromatogramas de los estándares empleados para la implementación de un método de CLAE-DAD para el análisis de los extractos obtenidos..... 75
Figura 3-6. Cromatogramas de los extractos en DCM (A), EtOH (B) y Acuosos (C) de las dos cepas obtenidos por el método de CLAE-DAD 76
Figura 3-7. Señales promedio integradas con alta resolución y selectividad (diversidad) y promedio del área bajo la curva (abundancia) (Ver anexo D)..... 78
Figura 3-8. PLSDA y B. Diagrama de volcán para los datos de CLAE-DAD de los extractos en EtOH de las dos cepas, para la actividad ABTS 80
Figura 3-9. Gráficos de puntuaciones de Variable de Importancia (VIP)..... 81
Figura 3-10. Cromatogramas CG-EM de los extractos en DCM para las cepas de Bélgica (color azul) y Estados Unidos (color rojo)..... 83
Figura 3-11. A. PLSDA y B. Diagrama de volcán para los datos de CG-EM de los extractos en DCM de las dos cepas, para la actividad ABTS 85
Figura 3-12. Gráficos de puntuaciones de Variable de Importancia (VIP)..... 86
Figura 3-13. Cromatogramas CG-EM de los extractos en DCM (color azul) y EtOH (color rojo) para la cepa de Bélgica..... 87
Figura 3-14. A. PLSDA Diagrama de volcán para los datos de CG-EM de los extractos en DCM y EtOH de la cepa BEL, para la actividad ABTS..... 88
Figura 3-15. Gráficos de puntuaciones de Variable de Importancia (VIP)..... 89
Figura 4-1. Determinación de los títulos de aglutinación de los extractos crudos de proteínas obtenidos de la cepa EUA 99
Figura 4-2. Determinación de los títulos de aglutinación de los extractos crudos de proteínas obtenidos de la cepa BEL..... 99
Figura 4-3. Inhibición de la aglutinación 101
Figura 4-4. Microscopias de la inhibición de la aglutinación empleando las diferentes soluciones de carbohidratos..... 101
Figura 4-5. A: Cromatograma de afinidad y B: SDS PAGE 10% 104
Figura 4-6. Punto isoeléctrico lectina de G. lucidum cepa de Bélgica. F1 FR y F2 FR (40µg de proteína total), PPI: Patrón de punto isoeléctrico 105
Figura 4-7 Efecto del pH en la actividad. (Ver anexo H-5)..... 107
Figura 4-8. Efecto de la temperatura en la actividad. (Ver anexo H-6)..... 107

Lista de tablas

Tabla 2-1. Contenido de Nitrógeno (N) y cantidad de proteína en las dos cepas. ..... 48 Tabla 2-2. Resumen de actividades biológicas asociadas a los extractos de metabolitos para las dos cepas en estudio. Los datos se presentan como promedio de la IC_{50} y EC_{50} y
su desviación estándar. 55
Tabla 3-1. Metabolitos con mayor importancia para la discriminación estadística identificados mediante el análisis de VIPs, presentes en el extracto en DCM de la cepa de BEL. 84
Tabla 3-2. Metabolitos identificados mediante el análisis de VIPs, presentes en el extracto en DCM de la cepa de BEL. 88
Tabla 4-1. Actividad aglutinante de las dos cepas en estudio y su concentración mínima aglutinante para las dos cepas en estudio. 98
Tabla 4-2. Inhibición de la aglutinación con el empleo de diferentes carbohidratos. ..... 100 Tabla 4-3. Seguimiento de la purificación de la lectina aislada del cuerpo fructífero de *G.*
lucidum cepa de BEL. 102
Tabla 4-4. Características moleculares y porcentaje de coincidencia con la secuencia de AA de LZ-8 para de lectinas aisladas de hongos del género Ganoderma. 104

Lista de Símbolos y abreviaturas

ABS	Absorbancia
ABTS	2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]-sal de diamonio
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGEs	Advanced glycation end products
ANOVA	Analysis of variance
ANR	Azúcares no reductores
AQ	Acuoso
AR	Azúcares Reductores
AT	Azúcares Totales
BEL	Bélgica
BSA	Albumina de suero bovino
C	Carbono
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CLAE-DAD	Cromatografía liquida de alta eficiencia acoplada a detección de arreglo de diodos
DAD	Arreglo de diodos
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo
DTT	Ditiotreitol
EC50	Concentración efectiva media
ERO	Especies reactivas de oxigeno
EtOH	Etanólico
EUA	Estados Unidos
Fv	Flavonoides
GNPS	Global Natural Products Searcher
H	Hidrogeno
HMF	Hidroximetilfurfural
IC50	Concentración inhibitoria efectiva media

IEF	Isoelectroenfoque
IL	Interleucina
INVIMA	Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos
IPAL	Inhibición de la peroxidación del ácido linoleico
IPP	Isopentilpirofosfato
LZ-8	Linzhi-8
LZ-9	Linzhi-9
MVA	Ácido mevalónico
MW	Molecular weight
N	Nitrógeno
P	Presión
PBS	Buffer fosfatos
PCA	Análisis de componentes principales
PFRAP	Poder reductor férrico
Ph	Fenólicos
PI	Punto isoeléctrico
PPI	Patrón de punto isoeléctrico
ppm	Partes por millón
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
Rd	Reductores
RFU	Unidades de fluorescencia
RH	Factor Rhesus
ROS	Reactive oxigen species
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
T	Temperatura
TCA	Ácido tricloroacético
TNF	Factor de necrosis tumoral
Tt	Triterpenoides
UV	Ultravioleta
VIP	Variables de importancia

Introducción.

El hongo macromiceto *Ganoderma lucidum* es un hongo coriáceo, de carne amarga rojiza, comúnmente conocido como Reishi o Lingshi en China y Japón, presenta una gran importancia por su excelente potencial como “fitoterapéutico”, se han reportado numerosas actividades biológicas comprobadas desde la antigüedad, atribuidas a la variedad y cantidad de metabolitos bioactivos, así mismo a proteínas funcionales y péptidos con actividades de gran interés en el tratamiento de patologías crónicas transmisibles y no transmisibles. Estos compuestos bioactivos han sido principalmente aislados de los cuerpos fructíferos y a pesar de no ser propiamente considerado comestible por sus características texturales, se han desarrollado algunos alimentos funcionales con fracciones de su cuerpo fructífero, su micelio o sus extractos, convirtiendo a este hongo en una joya de la micología (1,2).

Ganoderma lucidum, (Reishi), es uno de los basidiomicetos más utilizados en la medicina tradicional china y en los países del este asiático, lo que lo convierte en un candidato potencial para el uso en industria farmacéutica, fitoterapéutica y alimenticia para el desarrollo de alimentos funcionales y suplementos dietarios, entre otros (3). La composición química de *Ganoderma lucidum* es muy variada, se han reportado diferentes sustancias como potenciales responsables de su actividad biológica, entre los que se destacan los triterpenos, polisacáridos, análogos de adenosina y lectinas (4). Los macromicetos son biorreactores naturales capaces de transformar sustancias complejas y producir metabolitos funcionales y de gran interés para diferentes actividades económicas. Sin embargo, se sabe que la cepa del hongo, y el medio de cultivo pueden afectar su composición y por ende causar diferencias en la actividad biológica (4)

El cultivo del hongo se realiza principalmente de manera artesanal, aprovechando los residuos agrícolas y generando la colonización de leños de madera muertos y materiales sintéticos. No obstante, se han venido implementando medios de cultivo estandarizados para garantizar la calidad de la fructificación del hongo con características controladas y de mayor interés en la industria de alimentos. En Colombia,

por ejemplo, la planta agroecológica de bioprocesos de la Universidad de Caldas ha desarrollado estrategias para el cultivo tradicional a escala industrial, generando grandes volúmenes de producción y buscando garantizar condiciones del proceso que permitan que las características de la fructificación del hongo sean constantes o reproducibles y repetibles(5). No obstante, no existe evidencia bioquímica que permita confirmar que dos de las cepas de mayor producción bajo estas condiciones provenientes de Estados Unidos y de Bélgica (para efectos de este trabajo EUA y BEL), presenten la actividad biológica reportada para este organismo. Al respecto, en su momento, tampoco se tenía información de cuál de estas presentaba las mejores actividades biológicas y por tanto mayor potencial para el desarrollo de alimentos funcionales.

Es por ello que, en el presente trabajo de investigación, con el fin de aportar al fortalecimiento de la industria productora de hongos a nivel nacional, usando las fructificaciones obtenidas directamente de dichas condiciones de producción industrial, se realizó un estudio bioguiado sobre 3 actividades biológicas de particular interés en la industria de alimentos; la actividad antioxidante y la anti-AGE (inhibición de la formación de productos avanzados de glicosilación AGEs) presente en extractos metabólicos y la de aglutinación presente en extractos proteicos. Esta última ha generado particular interés, ya que dicha actividad está relacionada con la presencia de lectinas; las cuales son proteínas que, por sus propiedades bioquímicas y actividad biológica, pueden tener diferentes aplicaciones en la medicina y en la industria de alimentos.

El desarrollo de la investigación se realizó en diferentes fases aplicando la evaluación conjunta de actividades biológicas y el análisis químico y bioquímico, en las dos cepas citadas anteriormente: EUA y BEL. En la primera etapa se realizó un análisis comparativo de las dos cepas usando un diseño experimental pertinente y comparando las diferentes actividades biológicas de interés, tanto a nivel de metabolitos como de proteínas. En la segunda etapa, se planteó un análisis tanto espectrofotométrico de los grupos de metabolitos más importantes, como de sus perfiles usando técnicas cromatográficas (HPLC-DAD y CG-EM) y un análisis estadístico multivariado de correlación, que permitió plantear posibles relaciones entre la composición y la actividad biológica. Finalmente, se realizó una purificación y caracterización parcial de la lectina mayoritaria presente en la

cepa del hongo de mayor potencial por su actividad aglutinante. Los resultados de las diferentes fases del estudio permitieron identificar cuál de las cepas presenta el perfil bioquímico más interesante en términos de su potencial en bioprospección, específicamente para ser usado en la industria de alimentos, considerando el conjunto de actividades asociadas a los compuestos y proteínas beneficiosos.

Los resultados de la presente investigación han sido socializados en la comunidad académica en los siguientes eventos a nivel nacional e internacional.

47º Congreso Mundial de Química de la IUPAC Trabajo títulado ““HPLC and GC-MS conditions for separation and analysis of metabolites from Ganoderma sp. and Lentinula edodes mushrooms””.

XVIII Congreso Colombiano de Química Trabajo titulado “Evaluación del crecimiento radial y descripción fenotípica de Ganoderma sp. Nativo en diferentes medios de cultivo por fermentación en estado sólido (FES)”

Primer congreso colombiano de Micología Trabajo titulado “Comparación de actividades antioxidante e inhibición de productos avanzados de glicosilación presente en dos cepas de *Ganoderma lucidum*”

XI Congreso Latinoamericano de Micología (CLAM) Trabajo titulado “Perfilado de metabolitos responsables de la inhibición de AGEs en una cepa de *Ganoderma lucidum* cultivada a escala industrial en Colombia”

V Congreso colombiano de Bioquímica y Biología Molecular (C2B2) Trabajo titulado “Extracción, purificación y caracterización parcial de una lectina a partir del cuerpo fructífero del hongo *Ganoderma lucidum*”

Sin duda, el estudio bioquímico de este organismo cultivado en condiciones de producción de nuestro país contribuye al desarrollo inteligente de alimentos funcionales enriquecidos con los compuestos bioactivos del hongo y sirve como base para la

formulación y el diseño de alimentos funcionales que aprovechen las propiedades saludables del *G. lucidum* (6).

1 Capítulo: Estado actual del tema

1.1 Hongos macromicetos

1.1.1 Generalidades de los hongos medicinales

Los macromicetos son organismos caracterizados por poseer membrana celular, membrana nuclear, pared celular, además de muchas otras características típicas de los eucariotas (7). Generalmente se desarrollan como filamentos microscópicos, los cuales crecen como elongaciones de estructuras hiladas llamadas hifas. Pueden vivir sobre material orgánico en descomposición, animales o plantas, y aunque algunos son microscópicos, otros producen una estructura visible conocida como cuerpo fructífero (macrohongos). El último censo etnobotánico estima que existen alrededor de 140.000 especies de hongos sobre la tierra y solamente el 10% son conocidas y están clasificadas (8). Los hongos basidiomicetos son una de las clasificaciones de estos organismos que presentan un papel ecológico y ambiental muy importante, utilizando como fuente de nutrición residuos agroindustriales, mediante el uso de enzimas especializadas, las cuales los transforman en sustancias que presentan diversas actividades biológicas (9). Estas características bioquímicas de los hongos para biosintetizar estructuras complejas con el propósito de utilizarlas como agentes defensivos en su lucha por la supervivencia y para lograr una mayor adaptabilidad de las especies a su hábitat, son un aspecto que despierta un gran interés en la comunidad científica, ya que muchas de las sustancias producidas pueden ser empleadas para control de plagas en los cultivos o para el tratamiento de múltiples enfermedades que afectan la salud del hombre (10).

Varios hongos exhiben características organolépticas agradables y poseen un alto valor nutricional debido a su bajo contenido de grasa, alto contenido de proteína de excelente calidad y carbohidratos insolubles, lo que los ha catalogado como un alimento tradicional y ampliamente valorado por la cultura asiática (9). Los estudios microterapéuticos sobre las propiedades medicinales de los hongos, han sido desarrollados por siglos en la medicina tradicional china y su mercado fuera de Asia se ha

incrementado. A continuación, se revisarán algunas de las principales generalidades del *Ganoderma lucidum*.

1.2 Ganoderma lucidum: actividades biológicas y su composición química

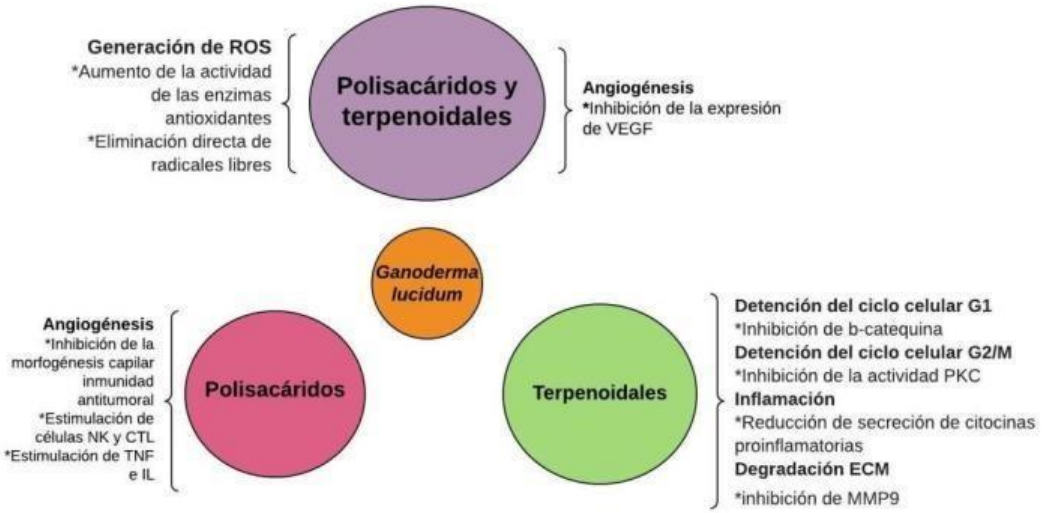
La composición química de *Ganoderma lucidum* es muy variada, tradicionalmente se ingiere la infusión del carpóforo para mejorar la salud, aumentar la longevidad y para la prevención y/o tratamiento de hepatitis, bronquitis crónica, gastritis, crecimientos tumorales y trastornos inmunológicos. Existen dos grupos principales de compuestos relacionados con estas actividades: los triterpenos y los polisacáridos, junto a derivados esteroidales, lectinas y análogos de la adenosina (11,12).

Aprovechando esto, si la planta agroecológica de bioprocesos de la Universidad de Caldas ha generado estrategias para el cultivo a escala industrial, controlando grandes volúmenes de producción y buscando garantizar que las condiciones de cultivo y las características de las fructificaciones de diferentes cepas del hongo den resultados constantes y reproducibles(5).

Diversos estudios demuestran que el hongo *Ganoderma lucidum* (Reishi), designado por excelencia como el hongo de la longevidad, presenta acciones biológicas como antioxidante, hipercolesterolémico, antitumoral, inmunomoduladora, anticancerígena, antiinflamatoria, reguladora del sistema cardiovascular y antiviral, entre otras (13). Un gran número de estudios realizados sobre extractos crudos y moléculas aisladas de G. *Lucidum* demuestran su actividad farmacológica, nutracéutica, inmunocéutica y cosmecéutica (14).

G. Lucidum contiene una composición química bastante compleja, sin embargo, los principales responsables de sus propiedades farmacológicas se pueden agrupar en esteroles, triterpenoides y polisacáridos. Se han aislado más de 80 derivados triterpenoidales, destacando los denominados ácidos ganodéricos (alrededor de 40), ganoderioles (cerca de 14), ácidos ganolucídicos (5), ácidos lucidénicos (15) y derivados del lanosterol (30). En la figura 1-1 se encuentran esquematizados algunos de los principales grupos de metabolitos y sus actividades biológicas reportadas (14,15).

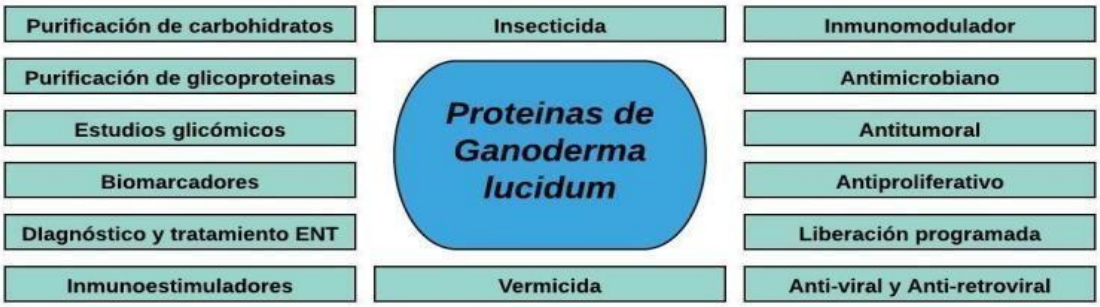
Figura 1-1. Relación entre la familia de metabolitos especializados de G. lucidum y su actividad biológica.



Esquema adaptado por el autor

Adicionalmente, se han descrito diferentes polisacáridos en la especie, como los denominados heteroglucanos PL-1 y PL-2, homoglucano PL-3 y algunas proteínas, como lectinas, y derivados análogos de la adenosina. (16), (17), de igual manera con diferentes actividades biológicas comprobadas (figura 1-2).

Figura 1-2. Relación entre algunas proteínas de *G. lucidum* y su actividad biológica



Esquema adaptado por el autor

A continuación, se profundizará en la naturaleza química de los metabolitos listados y su relación con las diversas actividades reportadas.

1.2.1 Compuestos terpenoidales

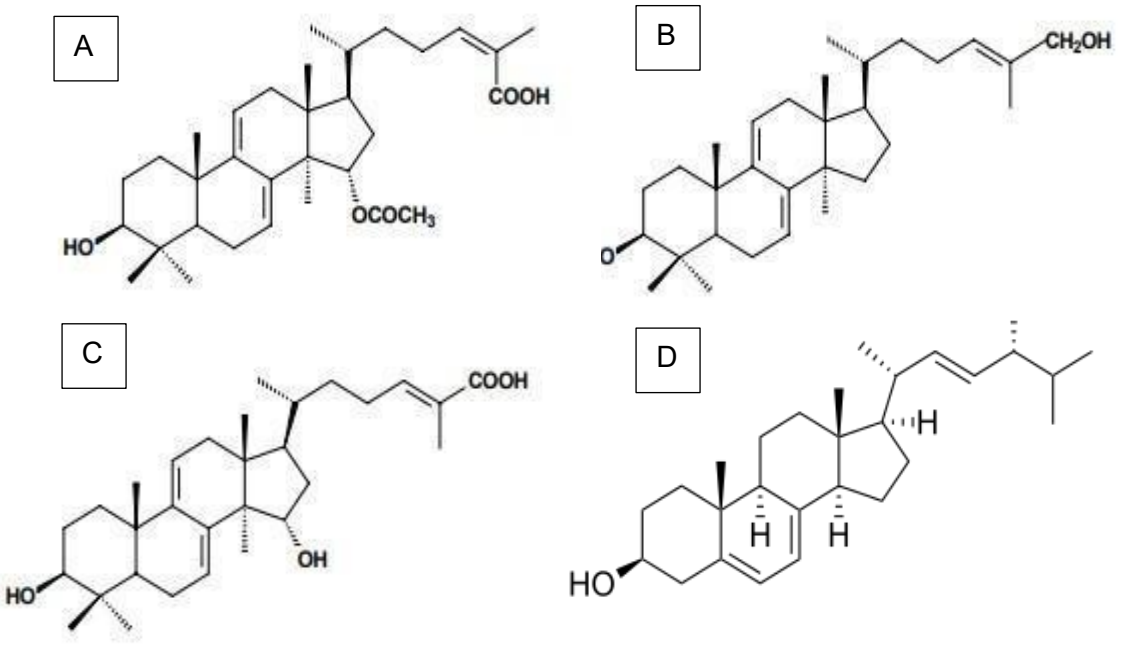
Los compuestos triterpenoidales tetracíclicos son compuestos de la familia de los terpenoides a menudo también llamados isoprenoides teniendo en cuenta que están constituidos por varias unidades de isopreno el cual es su precursor biológico. Se han encontrado una gran variedad estructural, derivada de la fusión repetitiva de unidades ramificadas de cinco carbonos basadas en la estructura del isopentenilo, estos se consideran como unidades isoprénicas y se clasifican por el número de unidades de cinco carbonos que contienen en mono, sesqui, di, tri, tetraterpenos todos estos provienen del metabolismo del isopreno abarcando a los terpenos, los carotenos, las vitaminas, los esteroides, entre otros. La ruta biosintética de todos estos metabolitos puede dividirse en cuatro etapas generales, que son: primera etapa: síntesis del isopentenilpirofosfato (IPP): puede adoptar la vía del ácido mevalónico (MVA) o la vía del 1-desoxi-D-xilosa-5-fosfato (DOXP). Segunda etapa: isomerización del IPP a dimetilalilpirofosfato (DMAPP), adición repetitiva de IPP y DMAPP. La tercera etapa: síntesis de moléculas de prenilpirofosfato y una etapa final donde ocurren las modificaciones estructurales de los esqueletos de escualeno realizada por enzimas especializadas (18).

Entre esta familia de metabolitos destacan los compuestos triterpenoidales tetracíclicos los cuales presentan tres núcleos de ciclohexano modificados unidos a un ciclo pentano que también puede presentar modificaciones (enlaces dobles, sustituciones de grupos funcionales entre otras) y una cadena lateral ramificada sobre el carbono 1 del ciclopentano. Principalmente responsables de inhibir el desarrollo tumoral, algunos investigadores también han documentado su capacidad para regular procesos angiogénicos, bloquear la acción de la enzima conversora de angiotensina, además de suprimir la liberación de citocinas proinflamatorias. Asimismo, demuestran aumentar la actividad de enzimas antioxidantes, eliminar directamente radicales libres y deshacerse de productos avanzados de glicosilación, como las melanoidinas (19)(20).

El esqueleto de los triterpenos está constituido por 30 átomos de carbono, son compuestos naturales que se forman a partir de seis unidades de isopreno, se ha

evidenciado una amplia variedad y distribución desempeñando un importante papel en la naturaleza. Desde una perspectiva biológica, se asume que el esqueleto del lanosterol es la estructura más importante dentro de este grupo de metabolitos. Estas estructuras policíclicas pueden encontrarse, ya sea en su estado libre o en forma de glucósidos (unidos a diferentes unidades de mono, oligo y polisacáridos). Como consecuencia, presentan una gran diversidad estructural. Hasta ahora, se conocen alrededor de 100 diferentes tipos de esqueleto estructural básico en la naturaleza y cientos de derivados han sido modificados y sintetizados. Los efectos biológicos correspondientes a este tipo de compuestos son muy diversos y se encuentran reportes de actividad, antitumorales (21)(22), anti-inflamatorios (23), anti-virales y anti-microbianos (24) (25,26), hepa y cardioprotectores (20) (27) analgésicos, anti-micóticos y quimiopreventivos (28). A continuación, se presenta la estructura química de algunos triterpenos tetraciclicos aislados de G. lucidum (figura 1-3).

Figura 1-3. Estructura de algunos compuestos triterpenoidales aislados de *G. lucidum.*



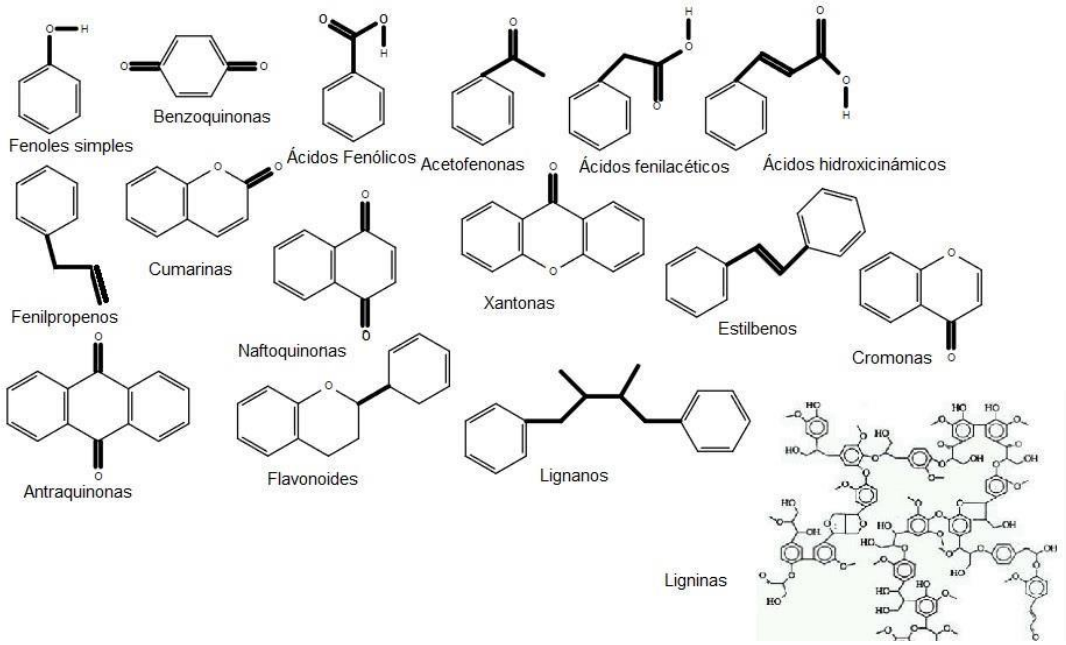
La figura muestra la formula molecular desarrollada para los compuestos A). Ácido ganodérico X, B). Ganoderol B, C). Ácido lanosta-7,9(11),24-trien-3,15-dihidroxi-26-oico, D). Ergosterol

1.2.2 Compuestos polifenólicos

Los compuestos polifenólicos son metabolitos especializados que se generan a través de las rutas del ácido shiquímico y la ruta de los poliacetatos, poseen en su estructura al menos un anillo aromático al que está unido uno o más grupos hidroxilo. Se clasifican como ácidos fenólicos, flavonoides y taninos. Existen alrededor de 8000 identificados y la mayoría de estos poseen una estructura de 3 anillos, dos aromáticos (anillos A y B) y uno heterociclo oxigenado (anillo C). Los más sencillos poseen solo un anillo aromático y conforme aumenta el número de sustituyentes, se va incrementando la complejidad de la estructura, generando así la gran diversidad de derivados, agrupados en 12 familias (figura 1-4). Los flavonoides tienen dos anillos aromáticos unidos por una cadena de tres átomos de carbono (C6C3C6) y los taninos son compuestos poliméricos más complejos que se clasifican en hidrolizables y condensados. Los taninos condensados resultan de la unión de unidades de flavan-3-oles, tales como la catequina que tienden a polimerizarse (29).

Estos metabolitos, debido a su estructura molecular, pueden captar especies reactivas de oxígeno por lo que se les atribuyen propiedades destacables para la industria alimentaria por sus cualidades como nutrientes. Se considera nutriente, al conjunto de compuestos asimilables y aprovechables de los alimentos por el organismo que los ingiere, generalmente están distribuidos de manera diversa y desempeñan funciones diferentes según su naturaleza química y bioquímica; una de las características principales es la antioxidante, estas sustancias, existentes en algunos alimentos y suplementos alimenticios, actúan protegiendo al organismo de la acción de los radicales libres y de las especies reactivas de oxígeno (ROS), causantes de los procesos de envejecimiento, deterioro cognitivo y neurodegenerativo, desarrollo de patologías transmisibles y no transmisibles, y enfermedades relacionadas con el metabolismo. Los antioxidantes retrasan el proceso de envejecimiento y detienen procesos degenerativos de tejidos y muerte celular inducida y programada (29). El metabolismo secundario de plantas y hongos macromicetos le provee una gran variedad de fitonutrientes, muchos de los cuales tienen propiedades antioxidantes, sobre este tema se profundizará más adelante.

Figura 1-4. Estructura química de diversos compuestos polifenólicos tomado de la referencia (1).



También se ha reportado actividad por parte de estos metabolitos en la inhibición de productos de AGEs, principalmente tiene responsabilidad los compuestos de la familia de los flavonoides. En un apartado posterior se describirán más detalles con relación a la importancia de la actividad AGES en la industria alimentaria (29).

1.2.3. Lectinas

Las lectinas son un grupo de proteínas de origen no-inmune que comparten la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a los carbohidratos, ya sean libres o que formen parte de estructuras más complejas. Estas proteínas usualmente tienen al menos dos sitios de unión por molécula: un azúcar específico y una molécula glicosilada. Como característica particular tienden a aglutinar las células a las cuales se unen (31). Se encuentran distribuidas en la naturaleza, en diferentes organismos como hongos, animales y plantas.

Las lectinas de los hongos son moléculas de potente actividad biológica, que se encuentran en diferentes partes de la seta (basidiomas, esporas, estípites y micelios). En los últimos años, las lectinas fúngicas han despertado gran interés, debido al

descubrimiento de su potente actividad biológica. Estudios recientes han mostrado algunos trabajos sobre su obtención del micelio y del extracto extracelular de hongos (17,32,33).

Entre las proteínas aisladas de cuerpos fructíferos de *G. lucidum* se han encontrado lectinas como Lingzhi-8 (LZ-8); un homotetrámero que presenta selectividad hacia glucosamina, edulcorantes naturales como taumatinas y algunos péptidos inmunogénicos con actividad antiviral como las α-defensinas que inhiben la síntesis de ADN de virus de hepatitis (33,34). Por otro lado, los agentes antirresortivos (fármacos diseñados para inhibir la actividad de los osteoclastos) son considerados como el pilar del tratamiento de la osteoporosis. Estudios recientes presentan la relación entre los agentes antirresortivos y la proteína LZ-8, la cual parece estar involucrada o tener algún efecto sobre los osteoclastos y la resorción ósea *in vitro* y resorción ósea *in vivo*, al igual que como agente inmunomodulador e inmunosupresor ensayando su efecto contra la diabetes mellitus tipo 1 (dependiente de insulina) (35).

Como se puede evidenciar del análisis de las diferentes actividades mencionadas y sus componentes responsables, los hongos medicinales y en particular el *G. lucidum*, tiene un alto potencial para ser usado en la industria alimentaria. A continuación, se mencionarán algunas generalidades sobre los alimentos funcionales y conceptos afines.

1.3 Alimentos funcionales y nutraceúticos

Un alimento funcional es aquel que, además de proporcionar nutrientes básicos, ofrece otros beneficios para la salud cuando se consume como parte de una dieta equilibrada. Estos alimentos contienen componentes bioactivos, como vitaminas, minerales, fibra, ácidos grasos esenciales, antioxidantes o probióticos, que pueden tener efectos positivos en el organismo más allá de la nutrición básica (14,36).

Para obtener los beneficios de los alimentos funcionales, se requiere su consumo regular como parte de una dieta equilibrada. No se trata de consumirlos de manera aislada o en grandes cantidades, sino de incluirlos como parte de un patrón alimentario saludable (37).

Algunos ejemplos de alimentos funcionales incluyen el yogur con probióticos para promover una flora intestinal saludable, los productos enriquecidos con ácidos grasos omega-3 para apoyar la salud cardiovascular, los alimentos fortificados con calcio y vitamina D para fortalecer los huesos, los alimentos ricos en antioxidantes para combatir el estrés oxidativo y los alimentos enriquecidos con fibra para favorecer una buena digestión. Es importante destacar que los alimentos funcionales no son un sustituto de una alimentación equilibrada y variada, ni deben utilizarse como tratamiento para enfermedades. (2)

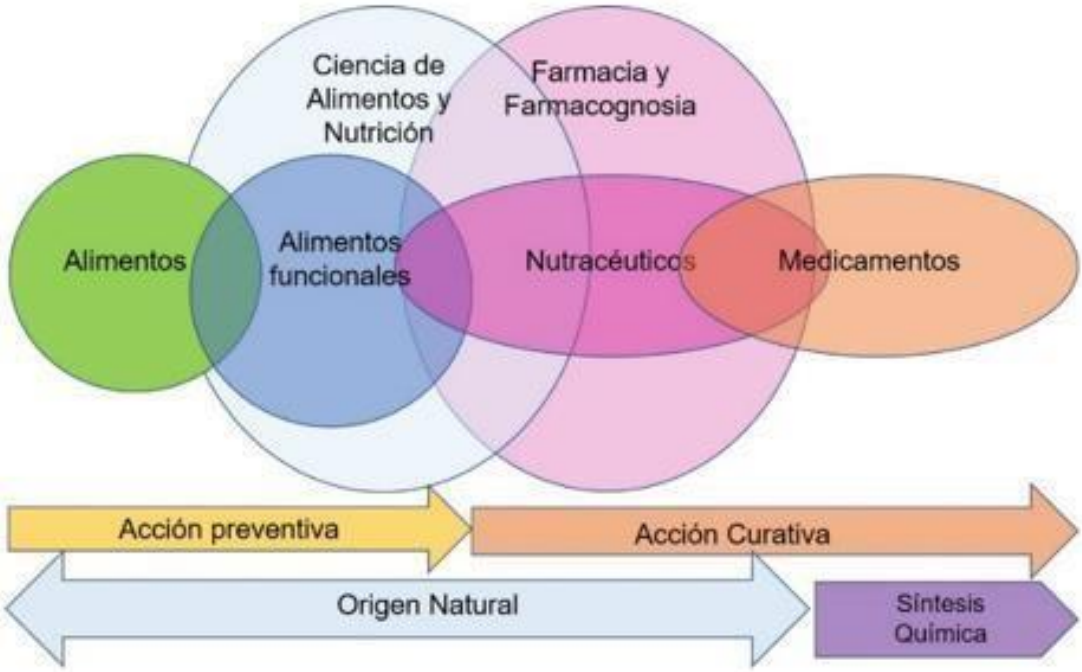
G. lucidum puede incorporarse en productos alimentarios como barras energéticas, cereales, sopas, chocolates y otros alimentos procesados. Estos alimentos funcionales pueden promocionarse como apoyo al sistema inmunológico, la salud cardiovascular y otras funciones corporales (36–38).

Los nutracéuticos son compuestos bioactivos presentes en los alimentos que se cree que proporcionan beneficios para la salud más allá de los nutrientes básicos que contienen. Estos compuestos pueden incluir vitaminas, minerales, hierbas, aminoácidos y otros componentes naturales o sintéticos. Se caracterizan por ser más concentrados y en algunos casos procesados, diseñados para brindar beneficios terapéuticos específicos. A diferencia de los alimentos funcionales y los medicamentos, los nutracéuticos no están diseñados para tratar o curar enfermedades, sino que se enfocan en mantener y mejorar la salud general. Por su parte, los alimentos funcionales son alimentos convencionales que contienen componentes biológicamente activos beneficiosos para la salud, como vitaminas, minerales y antioxidantes. Los nutracéuticos, en cambio, son suplementos dietéticos, productos ingeridos por vía oral que contienen nutrientes adicionales como vitaminas y minerales, con el propósito de complementar la dieta regular y brindar beneficios para la salud. (39).

La aplicación de conceptos de la ciencia de alimentos facilita la investigación y el desarrollo de alimentos que no serían comúnmente accesibles, permitiendo el desarrollo de alimentos funcionales, al mismo tiempo que permite la comprensión de cómo los compuestos activos interactúan dentro del metabolismo humano. La Figura 1-5 muestra la

interacción de diversos elementos involucrados en la conservación y el entendimiento de los mecanismos de acción asociados con estos tipos de alimentos.

Figura 1-5. Importancia de la relación entre los diferentes actores involucrados en el estudio y desarrollo de alimentos funcionales y nutraceúticos Adaptado de Blades, 2000 y Yeung et al., 2018 (40).



1.4 Antioxidantes, AGES y lectinas en la industria de los alimentos

1.4.1 Importancia de la evaluación de la capacidad antioxidante en la industria de alimentos

Entre las evidencias científicas de la eficacia de un alimento funcional se encuentra la determinación y cuantificación de la capacidad antioxidante de los alimentos y compuestos bioactivos que se encuentran en las materias primas a emplear en la formulación de dicho alimento funcional; entre los análisis se puede establecer la protección contra el estrés oxidativo, el cual ocurre cuando hay un desequilibrio entre los antioxidantes y los radicales libres en el cuerpo (41). La actividad antioxidante de los

alimentos y compuestos bioactivos puede ayudar a neutralizar los radicales libres y proteger contra el estrés oxidativo y/o el tiempo de vida útil del alimento funcional desarrollado (29,42–44).

Esto es relevante en formulaciones donde se busca seleccionar ingredientes que proporcionen beneficios adicionales para la salud. La capacidad antioxidante puede ser un criterio importante para la selección de ingredientes saludables y la mejora de la calidad nutricional de los alimentos. Los alimentos con actividad antioxidante pueden considerarse alimentos funcionales, ya que ofrecen beneficios adicionales para la salud más allá de su valor nutricional básico. Estas evidencias permiten comparar diferentes alimentos y compuestos para determinar cuáles son más efectivos en la neutralización de los radicales libres. Esto es útil tanto para la investigación científica, como para la toma de decisiones en la industria alimentaria, al seleccionar los ingredientes y alimentos más adecuados para promover la salud y prevenir enfermedades (45).

1.4.2 Importancia de la evaluación de la inhibición de la formación de AGEs en la industria de alimentos

La evaluación de la inhibición de AGEs en la industria de alimentos ha tomado gran importancia por varias razones ya que diferentes reportes demuestran que el aumento de los niveles de AGEs en el cuerpo está asociado con el desarrollo de enfermedades metabólicas, como la diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas. La evaluación de la inhibición de AGEs en los alimentos puede ayudar a reducir la formación de estos compuestos y contribuir a la prevención de estas enfermedades (46). Los AGEs son productos de reacciones asociadas al pardeamiento no enzimático, y son considerados como un amplio espectro de compuestos heterogéneos derivados de la reacción entre una proteína o péptido con un extremo amino terminal libre, lípidos y ácidos nucleicos, los cuales son glicosidados y oxidados en forma no enzimática mediadas por la reacción de Maillard (47).

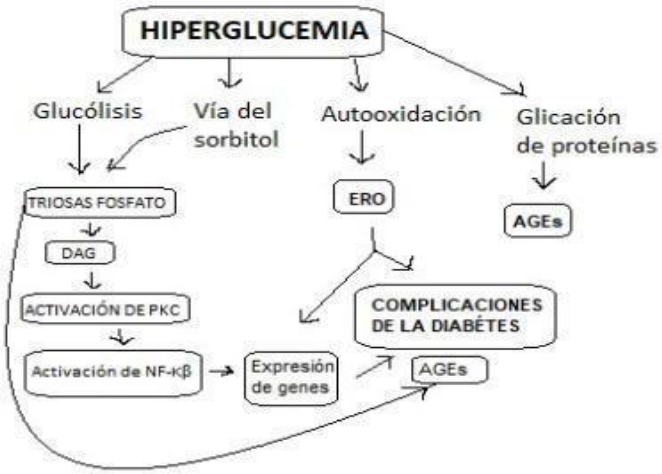
Los AGEs pueden formarse durante el procesamiento y la cocción de los alimentos, especialmente en condiciones de alta temperatura y baja humedad. Estos compuestos pueden afectar negativamente la calidad de los alimentos, ya que pueden dar lugar a

cambios en el color, sabor y textura (47,48). La evaluación de la inhibición de AGEs en la industria de alimentos puede ayudar a identificar ingredientes y procesos que reduzcan la formación de estos compuestos y, por lo tanto, mejoren la calidad de los alimentos procesados.

Adicionalmente la inhibición de AGEs en los alimentos puede considerarse un aspecto importante en el desarrollo de productos alimentarios saludables. Los consumidores están cada vez más interesados en alimentos que no solo satisfagan sus necesidades nutricionales básicas, sino que también ofrezcan beneficios adicionales para la salud. La evaluación de la inhibición de AGEs puede ayudar a seleccionar ingredientes y desarrollar procesos de producción que minimicen la formación de estos compuestos perjudiciales, lo que resulta en productos más saludables y funcionales (3).

El modelo de acción de los AGEs en cuadros de hiperglucemia (figura 1-6) permite identificar la potencial aplicación de productos naturales encontrados en hongos macromicetos para el desarrollo de alimentos y suplementos nutricionales funcionales a partir de organismos diferentes a las plantas, proponiendo una estrategia interesante para contribuir a terapias alternativas en patologías no transmisibles degenerativas.

Figura 1-6. Modelo integrativo del mecanismo de inducción de las complicaciones de la diabetes (41).



Nota: La gráfica muestra las vías afectadas por la hiperglucemia, incluyendo la glucólisis, la vía del sorbitol, la autooxidación y la glicación de proteínas. Las triosas fosfato y la glicación de proteínas están relacionadas con la acumulación de productos finales de glicación avanzada (AGEs). El Diacilglicerol (DAG) induce la activación de la

proteína quinasa C (PKC) y el factor de transcripción (NF-KB), mientras que la autooxidación aumenta las especies reactivas de oxígeno (ERO). En conjunto, estos procesos resultan en la expresión de genes asociados a la complicación de la diabetes (41).

1.4.3 Importancia del estudio de las lectinas en la industria de alimentos

Las lectinas, en ciertos casos, pueden tener beneficios como alimentos funcionales debido a sus propiedades específicas. Ejemplo de ello es su potencial efecto antitumoral; algunas investigaciones sugieren que ciertas lectinas pueden tener propiedades antitumorales al interactuar con las células cancerosas y provocar su apoptosis (muerte celular programada) (33,49). Estos hallazgos prometedores respaldan el potencial uso de lectinas como parte de una dieta o suplemento para prevenir o tratar ciertos tipos de cáncer. Sin embargo, se requiere más investigación en esta área (50).

Las lectinas pueden influir en la regulación del metabolismo y la saciedad. Estas proteínas pueden unirse a los receptores en el intestino, afectando la liberación de hormonas relacionadas con el apetito y la sensación de saciedad. Como resultado, las lectinas pueden ayudar a controlar el peso corporal y regular la ingesta alimentaria. Algunas lectinas pueden interactuar con la mucosa intestinal y modular su microbiota, presentando la capacidad de promover el crecimiento de bacterias beneficiosas en el intestino, lo que puede contribuir a un microbiota saludable y mejorar la salud intestinal en general (51).

Se ha sugerido que ciertas lectinas pueden tener propiedades antiinflamatorias al modular la respuesta inmunológica. Estos efectos pueden ser beneficiosos para reducir la inflamación crónica asociada con diversas enfermedades, como enfermedades cardiovasculares, diabetes y enfermedades autoinmunes (52).

Evaluar la aglutinación y hemaglutinación de las lectinas en la industria de alimentos es importante, un ejemplo de ello está centrado hacia favorecer o cumplir con la seguridad alimentaria. Las lectinas son proteínas presentes en muchos alimentos de origen vegetal, como legumbres, cereales y frutas. Algunas lectinas pueden tener propiedades aglutinantes, lo que significa que pueden unir y aglutinar células sanguíneas, como los glóbulos rojos. La evaluación de la aglutinación de las lectinas en los alimentos

es fundamental para determinar si existen riesgos para la salud asociados con su consumo. A pesar de los beneficios que conlleva su consumo las lectinas pueden ser tóxicas o antinutricionales, y su presencia en niveles elevados en los alimentos puede ser perjudicial (4).

Las lectinas también pueden desencadenar reacciones alérgicas o intolerancias en algunas personas. La evaluación de la aglutinación y hemaglutinación de las lectinas en los alimentos es importante para identificar posibles fuentes de alergias o intolerancias alimentarias y tomar medidas para evitar la exposición de los consumidores sensibles a estas proteínas (53).

Las lectínas son las proteínas responsables del reconocimiento de residuos polihidroxilados de los azúcares, se conoce como aglutinación a un agregado de células o bacterias debido a una formación entrelazada mediante reacciones inmunoquímicas que produce dicho fenómeno de agregación (31).

La reacción de la aglutinación generalmente ocurre en tres fases, una primera fase produce el contacto antígeno-anticuerpo sobre la superficie de la partícula (o célula) empleada, la segunda consiste en la agregación y permite visualizar el fenómeno, finalmente la tercera fase es observable sin la necesidad de un microscopio. El atractivo analítico radica en que los glóbulos rojos y blancos al igual que las plaquetas, presentan este fenómeno en presencia de los anticuerpos presentes en el plasma y en presencia de algunas glicoproteínas especializadas como es el caso de las lectínas (52).

1.5 Uso del hongo *Ganoderma lucidum* en la industria de alimentos

El hongo *G. lucidum* ha sido empleado en el desarrollo de suplementos dietéticos, donde se ha logrado cultivar en condiciones controladas para garantizar la calidad y la concentración de los compuestos bioactivos presentes en él, como los triterpenos y los polisacáridos. Estos suplementos se promocionan por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y estimulantes del sistema inmunológico (12,26,54–62).

También se ha empleado en la formulación de bebidas saludables con la inclusión o uso para la producción de café, té de hierbas y otras bebidas funcionales. Estas bebidas combinan los beneficios nutricionales del hongo con otros ingredientes saludables para ofrecer opciones de bebidas funcionales (63–65). Los alimentos funcionales que contienen este hongo o derivados del mismo pueden ofrecer beneficios para la salud, como la mejora de la función inmunológica, la reducción del estrés oxidativo y la promoción de la salud cardiovascular.

Además, se ha observado su capacidad para regular los niveles de glucosa en la sangre y mantener un equilibrio en los lípidos, lo que podría ser beneficioso para personas con diabetes o enfermedades metabólicas (66). En cuanto al desarrollo de alimentos funcionales, o nutraceúticos, la investigación ha demostrado que *G. lucidum* es una excelente materia prima para el desarrollo de diversos productos de interés comercial en estas industrias, teniendo en cuenta las diversas disciplinas que comprenden la obtención de dichos productos (66,67).

1.6 Desarrollo de alimentos funcionales en la industria colombiana

La industria de alimentos funcionales en Colombia ha experimentado un crecimiento significativo en los últimos años, impulsado por el aumento de la conciencia de los consumidores sobre la importancia de una alimentación saludable y el bienestar general. Las empresas colombianas están desarrollando nuevos productos y reformulando los existentes para ofrecer opciones más saludables y funcionales basados en la Innovación en productos. Esto incluye la adición de ingredientes beneficiosos como probióticos, prebióticos, antioxidantes, fibras, ácidos grasos omega-3, vitaminas y minerales (5).

Se ha observado un crecimiento notable en categorías como los productos lácteos funcionales, los alimentos enriquecidos con fibra, los alimentos fortificados con vitaminas y minerales, los productos sin gluten, los alimentos orgánicos y los alimentos dirigidos a necesidades dietéticas específicas, como los productos para diabéticos, estos productos generan el fenómeno conocido como crecimiento en categorías específicas (5).

Los alimentos funcionales en Colombia se promocionan con base en sus beneficios para la salud, como el fortalecimiento del sistema inmunológico, la mejora de la digestión, el control del peso, la reducción del colesterol, la salud cardiovascular y el bienestar general. Esto genera un efecto de mayor conciencia del consumidor ya que los consumidores colombianos están más informados sobre la importancia de llevar un estilo de vida saludable y están dispuestos a invertir en productos alimenticios que les ofrezcan beneficios para la salud. La demanda de alimentos funcionales está en aumento debido a esta creciente conciencia (68).

Adicional a ello, la industria de alimentos funcionales está regulada por el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), que establece los requisitos y las normativas para la producción y comercialización de estos productos. Esto garantiza la seguridad y la calidad de los alimentos funcionales en el mercado colombiano (69).

No obstante, son escasas las investigaciones dedicadas a corroborar la actividad biológica de estos productos, lo que se presenta como una imperante necesidad para consolidar este sector prometedor de la economía en nuestra nación. Entre las empresas que cuentan con alimentos funcionales a base de hongos comestibles y medicinales con registro Sanitario concedido por el INVIMA son Laboratorios Naturtech, aitia Biotech y Progal. Según la base de datos de registros sanitarios con corte al 6 de junio de 2023, se han registrado un total de 37 productos a base de hongos que cuentan con registros sanitarios vigentes, mientras que otros dos se encuentran en proceso de renovación en la categoría de suplementos dietarios. Considerando el potencial de crecimiento, el mercado de hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica podría expandirse significativamente, alcanzando los 6350 millones de dólares en 2030. Esto representa un notable aumento desde los 4110 millones de dólares calculados en 2018, según cifras proporcionadas por el portal Statista (70).

Estos datos reflejan una clara tendencia de creciente interés en los productos a base de hongos en la región, lo que podría brindar oportunidades prometedoras tanto para la industria Nacional, como para la salud pública. Es esencial que se realicen investigaciones adicionales para comprender completamente el alcance de este mercado emergente y

garantizar la seguridad y eficacia de estos productos para el bienestar de los consumidores.

2 Capítulo: Evaluación de las actividades antioxidantes, inhibitorias de la formación de AGEs y actividad aglutinante presentes en dos cepas de *G. lucidum* producidas en Colombia

2.1 Resumen

En este capítulo se compara la actividad antioxidante, la inhibición de la formación de productos avanzados de glicación (AGEs), y la aglutinación de eritrocitos, presente en dos cepas del hongo *G. lucidum* cultivadas de manera industrial en nuestro país (EUA y BEL), con el fin de determinar cuál de las dos presentaba el mejor conjunto de actividades biológicas y por tanto mayor potencial para la producción de alimentos funcionales. Se emplearon diferentes solventes para extraer los metabolitos presentes en el cuerpo fructífero y métodos colorimétricos para determinar las actividades biológicas de interés. Por otro lado, en extractos proteicos, se determinó la actividad aglutinante de eritrocitos mediante técnicas de microscopía. Los resultados mostraron que los extractos de la cepa de Bélgica (BEL) presentaron una mayor actividad antioxidante e inhibitoria de AGEs en comparación con la cepa de Estados Unidos (EUA). Adicionalmente las dos cepas exhibieron aglutinación frente a eritrocitos específicos del grupo A. En general, estos hallazgos sugieren que los extractos etanólicos y en diclorometano del hongo *Ganoderma lucidum* podrían tener potencial como agentes antioxidantes y antihiperglicémicos. Sin embargo, se requieren más investigaciones para comprender los mecanismos subyacentes de estos efectos y su posible uso terapéutico en el tratamiento de enfermedades crónicas no transmisibles.

2.2 Abstract

In this chapter we compared the antioxidant activity, Inhibition of advanced glycation end products (AGEs), and erythrocyte agglutination, in two strains of *G. lucidum*, cultivated industrially in Colombia (USA and BEL), to determine presents the best set of biological

activities and therefore greater potential for the production of functional foods. Different solvents were used to extract the metabolites present in the mycelium and colorimetric methods were used to determine the biological activities of interest. On the other hand, in protein extracts, erythrocyte agglutinating activity was determined by microscopy techniques. The results showed that extracts from the Belgian strain exhibited higher antioxidant and AGEs inhibitory activity compared to the US strain. Additionally, both strains exhibited agglutination against specific group A erythrocytes. Overall, these findings suggest that ethanolic and dichloromethane extracts of *Ganoderma lucidum* mushroom may have potential as antioxidant and antihyperglycemic agents. However, further research is required to understand the underlying mechanisms of these effects and their potential therapeutic use in the treatment of chronic non-communicable diseases.

2.3 Introducción

G. lucidum, es un hongo saprofito cuyo micelio subsiste y se nutre sobre material rico en lignocelulosa en estado de descomposición; sus carpóforos aparecen sobre la base de troncos muertos o a través de grietas en las cortezas. Este hongo ha sido empleado desde hace miles de años, principalmente en la cultura oriental, existen datos de su uso como medicina tradicional asiática desde hace 2000 años.

Actualmente se cultiva a nivel industrial convirtiéndose en una excelente oportunidad comercial en países del trópico como Colombia. Este hongo de color marrón rojizo, con apariencia brillante y lacada además de poseer características medicinales llamativas puede presentar valores nutricionales interesantes como un alto contenido de proteína y aportes bajos de calorías y grasas. Desde el punto de vista de su composición, llama la atención la abundancia de compuestos triterpenoidales entre los cuales están los denominados ácidos ganodéricos, además del ergosterol y sus derivados, presencia de compuestos con efectos clínicos demostrados como son los polisacáridos de tipo α y βglucano también conocidos como ganoderanos, además de la eritadenina (derivado de adenina que actúa como reductor de niveles de colesterol), también existen reportes de compuestos de la ruta fenilpropanoide como polifenoles y flavonoides. Con respecto al estudio de proteínas con actividad biológica en este hongo se ha logrado el análisis y caracterización de algunas lectinas con potencial inmunomodulador, antiinflamatorio e

incluso prebiótico. En general la composición metabólica de este hongo ha hecho que se aumente el número de investigaciones dirigidas tanto al mejoramiento de la producción a través de técnicas tradicionales, como hacia encontrar evidencias solidas de su acción, elucidar nuevas actividades biológicas o encontrar novedosas aplicaciones de este tipo de moléculas (12,16,19,24,62,66,71–78).

En la primera etapa de la presente investigación, usando el cuerpo fructífero de dos cepas del hongo *G. lucidum* obtenido por cultivo biotecnológico en la planta industrial de bioprocesos de la Universidad de Caldas, se evaluó la potencial actividad antioxidante total e inhibición de la formación de AGEs de extractos con diferente polaridad, además de la actividad aglutinante de extractos proteicos. La finalidad de esta primera etapa era seleccionar la cepa que, bajo las condiciones de cultivo usadas, permitiera la obtención de mejores resultados de actividad y por tanto mayor potencial para la generación de alimentos funcionales. Así mismo, se seleccionaron los extractos más activos para realizar en la siguiente etapa, un estudio de los metabolitos potencialmente activos, usando métodos espectrofotométricos y cromatográficos. En paralelo y de manera simultánea, se realizó la puesta a punto del protocolo de extracción de proteínas, y se comparó la actividad aglutinante presente en las dos cepas objeto de estudio; esta información era fundamental para seleccionar la cepa en la cual se realizaría la posterior caracterización parcial de lectinas con potencial funcional. El análisis conjunto de los resultados obtenidos permitió proponer cuál de las dos cepas evaluadas funcionaria mejor para el desarrollo de un alimento funcional con potencial nutraceútico(6).

2.4 Materiales y Métodos

2.4.1 Cultivo de las cepas del hongo

Para el desarrollo de la investigación se empleó material biológico otorgado por la planta industrial de bioprocesos de la Universidad de Caldas (ver anexo A). Las fructificaciones de *G. lucidum* fueron codificadas como WC806 o EUA proveniente de Estados Unidos y M9726 o BEL proveniente de Bélgica, se conservaron a temperatura ambiente, protegidas de luz y selladas con *Parafilm*® para evitar su degradación durante el desarrollo del trabajo experimental (79).

2.4.2 Extracción de metabolitos

Se llevó a cabo una extracción exhaustiva de la biomasa seca y molida utilizando solventes de diferente polaridad. En primer lugar, se realizó una extracción con diclorometano y ultrasonido durante 30 min a temperatura ambiente. Luego, se llevó a cabo una extracción de los componentes medianamente polares con etanol y ultrasonido durante 30 minutos a 40°C. Finalmente, se realizó una extracción acuosa con agua ultra purificada y cavitación a 90°C durante 1 hora. El sobrenadante recuperado de esta última extracción se sometió a una precipitación en frío con una mezcla de etanol y acetona (1:1:1) (v/v), y el *pellet* generado se separó por centrifugado (80). Se determinó la masa del extracto final y se estimó el rendimiento de extracción de las diferentes fracciones (DCM; EtOH; Acuoso y *Pellet*) mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{masa\ seca\ del\ extracto(g)}{biomasa\ de\ partida\ (g)} \times 100 = \%\ Rendimiento\ de\ extracción\ (eq.\ 1).$$

2.4.3 Determinación del contenido total de proteína en las cepas del hongo

El contenido total de proteína en la biomasa seca se determinó mediante análisis elemental (C, H, N) utilizando el equipo Microanalizador Thermo FLASH 2000 Organic Elemental Analyzer. Para expresar el contenido total de proteína, se utilizó el porcentaje (p/p) y se aplicó un factor de corrección previamente reportado para hongos. Aunque la norma establece un factor de 6,25 para esta determinación, se tuvo en cuenta que los hongos tienen una cantidad relativamente alta de nitrógeno no proteico. Basándose en investigaciones previas (104), se utilizó un factor de conversión de 4,38 para determinar la cantidad de proteína. Los resultados se reportaron como mg de proteína / mg de biomasa seca (94).

2.4.4 Extracción de proteínas

La solubilización de proteínas se realizó partiendo de una cantidad aproximada de 100 mg de biomasa seca y molida, macerada con N_2 (l), se realizaron seis lavados con acetona (ACE) fría para eliminar la mayor cantidad de pigmentos e interferentes.

Posteriormente se realizó una precipitación con buffer fosfatos 50mM ($H_2PO_4^-/HPO_4^{-2}$) (PBS) con pH entre 7.2 y 7.4, Se evaluaron dos sistemas, el primer sistema (TIOUREA) con una adición de tiourea [3mM] (81) y el segundo sistema (PVPP) con la adición de polivinilpolipirrolidona (PVPP) 0,1% v/v, cloruro de sodio (NaCl) [1M], tiourea y ácido ascórbico 0,01% v/v (82) con el fin de evitar oxidación de las proteínas, las muestras se colocaron en agitación constante y refrigerada en un equipo Thermomixer® a 1400 rpm (revoluciones por minuto) 4°C, durante 8 horas; finalizado este tiempo se recuperó el sobrenadante, por centrifugación refrigerada a 4°C, 9000 rpm por 30 minutos; el sobrenadante se colectó en un nuevo tuvo y se repitió por tres ciclos este proceso, buscando garantizar una extracción exhaustiva de las proteínas. El sobrenádate total se concentró en amicones, de tamaño de membrana de 10 KDa, conservando la cadena de frío y empleando una centrifugación con una velocidad de 5000 rpm por 10 minutos.

2.4.5 Determinación de proteína total y extraída.

Se cuantifico la proteína de los extractos por el método espectrofotométrico de Bradford con la linealización de Zor y Sellinger (83,84) Para el caso del rendimiento de extracción se determinó empleando la siguiente ecuación:

$$\frac{(mg)de\ proteína\ total}{biomasa} \times 100 = \%\ Rendimiento\ de\ extracción\ (eq.2).\ (mg)de$$

2.4.6 Evaluación de la actividad biológica

La evaluación de la actividad antioxidante (DPPH y ABTS) y anti-AGEs se realizó sobre los extractos en DCM, EtOH, acuoso y el precipitado de las dos cepas, mientras que la actividad IPAL y PFRAP se realizó únicamente sobre los extractos en DCM y EtOH (85,86). Para la evaluación de las actividades antioxidantes frente a los modelos IPAL y PFRAP se contó con el apoyo y acompañamiento del Grupo de investigación en estudios biológicos y fisicoquímicos de líquenes colombianos, asesorados por los profesores José Leopoldo Rojas y Norma Angélica Valencia. Por otro lado, la actividad anti-AGEs se realizó con el apoyo del grupo Principios bioactivos en plantas medicinales y la asesoría de la profesora Diana Marcela Aragón.

Por otra parte, la evaluación de la aglutinación se realizó sobre los extractos proteicos obtenidos bajo las dos condiciones de extracción mencionadas anteriormente en el numeral 2.4.4. Los ensayos de aglutinación en este capítulo, como de la purificación en el capítulo 4, se realizaron en el marco de una colaboración con el Grupo de Investigación en Proteínas y la asesoría de la profesora Nohora Angélica Vega.

2.4.7 Evaluación de la actividad antioxidante

2.4.7.1 Capacidad captadora del radical DPPH* y del radical catión ABTS*+

La determinación de la capacidad antioxidante de los extractos de las dos cepas de los hongos se evaluó mediante la captura del radical DPPH* y el radical catión ABTS*+ (86). Se realizó un tamizaje previo para seleccionar los extractos con una actividad mayor o igual al 25%. La mezcla de reacción consistió en la solución de los radicales, controles negativos (metanol), controles positivos (Trolox Sigma®) y cada extracto disuelto en metanol, incubados durante 30 minutos. Se determinó la actividad antioxidante a través de la lectura de las absorbancias a una longitud de onda específica para cada radical. El porcentaje de actividad antioxidante se calculó utilizando la ecuación 2 (87). Cada ensayo se realizó por triplicado biológico y por duplicado técnico.

$$\%\ capacidad\ antioxidante =$$

$$Abs\ (control\ (-)) - [Abs\ extracto - Abs\ blanco\ del\ extracto]\ Abscontrol\ (+) * 100$$

$$(eq.\ 3).$$

Se realizaron curvas de concentración entre 62,5 y 1000 µg/mL con cinco puntos del extracto para determinar la concentración inhibitoria efectiva media IC50 y reportar el resultado como promedio de la IC_{50} ± DS.

2.4.7.2 Capacidad antioxidante para inhibir la peroxidación lipídica del ácido linoleico (IPAL)

Se emplearon las mismas soluciones mencionadas en el ensayo anterior y el control positivo Trolox Sigma®. Esta prueba se realizó con el método descrito por (88) y

el porcentaje de actividad antioxidante se calculó con la ecuación 4 donde Ac es la absorbancia del control negativo (0,1 mL PBS) y Am es la absorbancia de la muestra (0,1mL extractos en diclorometano y etanol) (13).

$$\%\ actividad\ antioxidante = Ac - AmAc * 100\ (eq.4).$$

Las soluciones empleadas para la evaluación fueron las siguientes: 2,5 mL de una emulsión de ácido linoleico y tween 20 0,2 M en buffer fosfatos PBS ($H_2PO_4^-/HPO_4^{-2}$) 0,2 M pH 7.4, incubadas a 37°C ± 0,1°C por 24 h y 48 h independientes, con la adición de 0,1 mL de las diferentes muestras a evaluar, con diluciones de (50, 100, 200 y 450 ppm) de los extractos en DCM y EtOH secos en rotaevaporador fueron redisueltos en etanol (EtOH) respectivamente. Pasados los tiempos de incubación se tomaron alícuotas de 0,1mL de esta emulsión, con la adición de 4,7 mL de etanol al (75% v/v), 0,1mL de tiocianato de amonio (NH4SCN) (30% p/v) y 0,1 mL de cloruro ferroso (1% p/v), una vez las muestras se homogenizaron, se realizaron lecturas de absorbancia a 500 nm para determinar el potencial de reducción de la peroxidación de lípidos (88).

2.4.7.3 Capacidad antioxidante para reducir el ion Férrico (PFRAP)

Para evaluar el poder reductor férrico, se prepararon soluciones madre en etanol absoluto de una concentración aproximada de 500ppm de los diferentes extractos a evaluar (DCM y EtOH redisueltos en EtOH). Como patrón positivo se empleó el reactivo TROLOX Sigma®. A partir de estas soluciones se realizaron diluciones de cuatro diferentes concentraciones (50, 100, 200, 450 ppm).

Se emplearon las siguientes soluciones: 1,0 mL de buffer fosfatos PBS (H_2PO_4/HPO_4^{-2}) 0,2 M (89) pH 6.6 con adición de 1,0 mL de ferricianuro de potasio ($K_3Fe(CN)_6$) (0,1%p/v) y 1,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) (10% p/v). Se dejó incubar por 1 minuto para luego agitar mecánicamente, pasado este tiempo, se realizó la adición de 2,5 mL de tricloruro férrico ($FeCl_3$) (0,1%p/v) en agua destilada y desionizada y se dejó incubar por 30 minutos a temperatura ambiente, la actividad se corroboró mediante el seguimiento de la formación del complejo de azul de Turnbull ($Fe_4[Fe(CN)_6]_3$) midiendo absorbancia a 700 nm .

Para la cuantificación de la actividad se realizó una curva de calibración (con siete niveles entre 0,06 mM y 0,4 mM) del complejo midiendo absorbancia a 700 nm con el fin de poder cuantificar la cantidad de hierro (III) que se produjo por efectos de la acción antioxidante de los extractos y expresarla como concentración de dosis efectiva media EC_{50}.

2.4.8 Evaluación de la inhibición de productos avanzados de glicosilación AGEs

Para este ensayo se construyó una curva de calibración promoviendo la formación de AGEs a partir de una solución de BSA de 10 mg/mL y un azúcar reductor libre (ribosa) 5 mM. Esta curva presentaba 5 niveles entre 15 y 35 µg/mL para cada una de las sustancias, en donde la mezcla más concentrada presentaba un total de 70 µg/mL de ambos componentes. Esta curva sirvió como control negativo de la inhibición y para seleccionar la concentración que generaba mayor producción de estas; en este caso se seleccionó 70 µg/mL (35 µg/mL para cada sustancia). Esta concentración sería usada para los posteriores ensayos.

Como control positivo de inhibición, se preparó una curva de calibración variando la concentración de un flavonoide (quercetina), disuelto en dimetilsulfóxido DMSO en un rango entre 30 y 70 µg/mL. Para la determinación de la actividad en las muestras se prepararon de la misma manera, diluciones secuenciales de 5 niveles, de los extractos en DCM, EtOH, acuoso y el precipitado (90)

Las mezclas de reacción compuesta por la adición de la solución de BSA y ribosa (70 µg/mL), los extractos de manera individual y control positivo se colocaron en una cubeta de agitación orbital (con incubación a 37°C constantes durante 24 horas). Se realizaron medidas de fluorescencia con un haz de incidencia de 360nm y uno de emisión de 450nm, en un lector de placas múltiples. El resultado se expresó como % de inhibición (ecuación 7) y se estimó la concentración inhibitoria efectiva media IC_{50} para cada extracto y el control quercetina:

$$RFU\ corregida\ de\ MP\ y\ (C+) = RFU\ de\ MP\ y\ (C+) - RFU\ B\ (eq.\ 5.)$$

$$\%\ Formación\ de\ AGE = \left(\frac{RFU\ corregida}{\qquad\qquad}\right) \times 100\ (eq.\ 6.)$$

$$((RFU\ (C-) - (RFU\ B))$$

$$\%\ Inhibición = 100 - \%\ Formación\ de\ AGEs\ (eq.\ 7.)$$

$RFU = Florescencia$
$MP = Muestras\ problema$
$B = Blanco$
$C+= Control\ positivo$
$C-= Control\ negativo$

2.4.9 Evaluación de la actividad aglutinante de los extractos de proteína.

Para la evaluación de la aglutinación se empleó una solución de eritrocitos de los grupos A, B y O, indiferente del factor RH y eritrocitos de sangre de caballo. Para ello, cada una de las muestras de sangre fueron lavadas, en PBS 50mM pH 7,3 y se preparó una solución independiente de cada tipo de sangre de una concentración final de 0,2% v/v en PBS. Para la evaluación de la actividad se colocaron 5 µL de la solución de eritrocitos y 5 µL (35 mg/mL) de cada uno de los extractos crudos de proteína obtenidos con los dos sistemas de solubilización de proteínas descritos en el numeral 2.4.4. por duplicado biológico en una microplaca de aglutinación entre 30 y 45 min. Posteriormente, se siguió la aglutinación en un espejo de aumento y se corroboró la actividad por microscopia óptica con objetivos de 10X y 40X, sin fijación en la placa, estableciendo una escala arbitraria de aglutinación según criterio cualitativo (3,17,49,52,60,91).

2.4.10 Análisis estadístico

Se realizó un diseño experimental completamente aleatorizado con 3 réplicas biológicas, en donde cada unidad experimental consiste en una mezcla del cuerpo fructífero proveniente de cada hongo. Los datos obtenidos para los rendimientos de extracción de mediana, y alta polaridad, así como la evaluación de las diferentes actividades biológicas se analizaron usando el programa Statgrafics 19, utilizando un análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

2.5 Resultados y Discusión

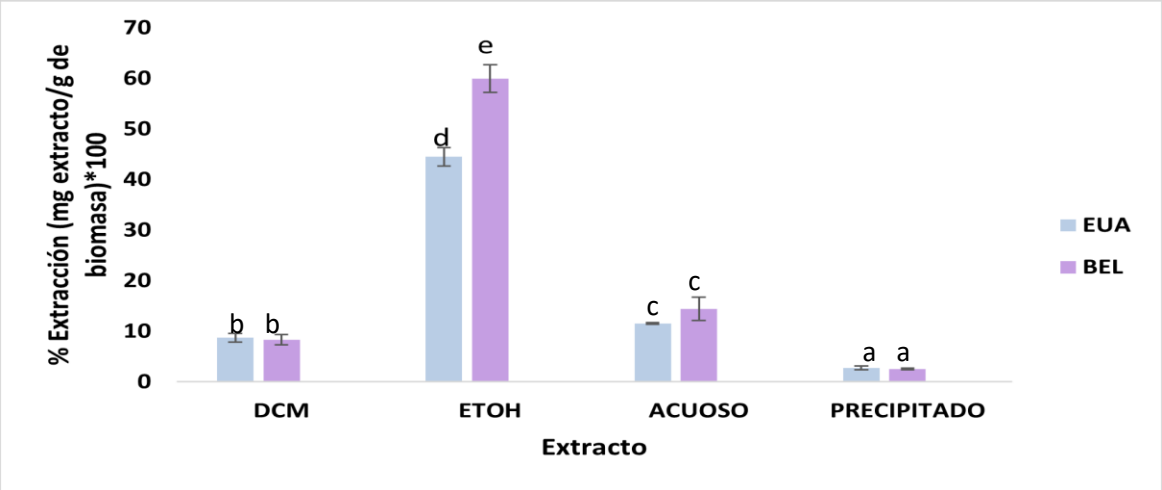
A continuación, se presentan los resultados principales de esta etapa de la investigación en la que se buscaba determinar, cuál de las cepas del hongo cultivado

tradicionalmente de manera industrial, presenta los mejores resultados en términos de su actividad biológica. Esta información era necesaria para en el capítulo siguiente, en el que se quiere profundizar en los estudios de su perfilado metabólico y establecer una relación entre este y las actividades biológicas determinadas. Esto permitiría confirmar el potencial uso de este material fúngico para la industria de alimentos.

2.5.1 Extracción de metabolitos

Durante la determinación de los rendimientos de extracción, se evidencia que se da una mayor extracción usando el solvente etanol, lo que indica una mayor presencia de metabolitos de mediana-alta polaridad en el material fúngico objeto de estudio. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado en estudios previos, en los que la presencia de este tipo de compuestos es mayoritaria en estos organismos (11,92,93). Por otro lado, se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos cepas con este mismo solvente (Figura 2-1). Se observa que el contenido del extracto etanólico de la cepa BEL, es significativamente mayor, lo que indica que esta cepa puede tener mayores niveles de dichos compuestos de mediana-alta polaridad.

Figura 2-1. Rendimiento de extracción de las diferentes fracciones de metabolitos.



Se presentan los resultados como promedio más la desviación estándar, las letras corresponden a las diferencias estadísticamente significativas con un análisis de varianzas ANOVA con un valor *p>0,05*.

2.5.2 Contenido total y rendimiento de extracción de proteínas

La determinación del contenido de proteína total en el cuerpo fructífero del hongo estimado por el método análisis elemental, indico que existen diferencias significativas en el contenido de proteína para las dos cepas. Estos resultados se presentan en la tabla 21 y están en parte relacionados con el rendimiento de extracción de proteínas en la figura 2-2.

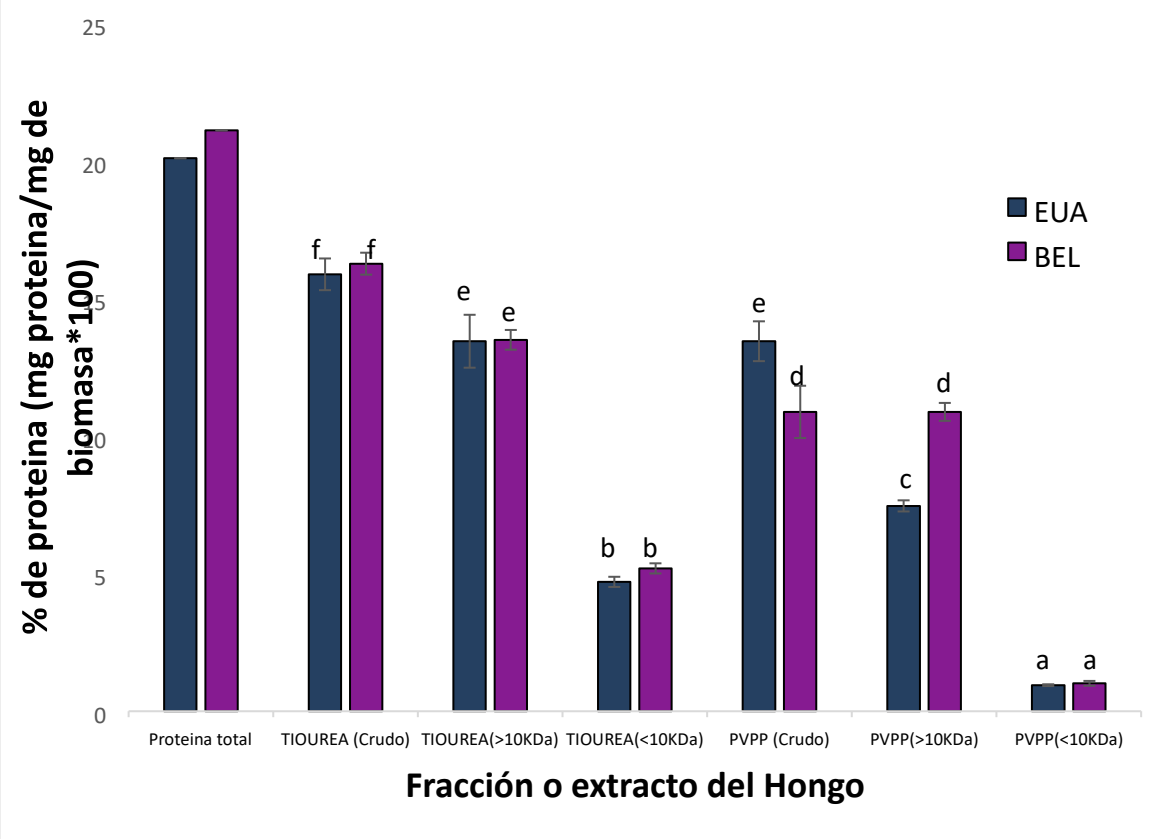
Tabla 2-1. Contenido de Nitrógeno (N) y cantidad de proteína en las dos cepas.

Cepa	Contenido de Nitrógeno	Contenido de proteína (mg)
EUA	4,59	21,92
BEL	4,82	22,39

Resultados obtenidos del Microanalizador Thermo FLASH 2000 Organic Elemental Analyzer.

La cepa de Bélgica muestra una mayor cantidad de nitrógeno lo que indica un mayor contenido de proteína en comparación con la cepa de Estados Unidos; esto posiblemente sugiere un mayor valor nutricional (94). Sin embargo, es importante mencionar que ese resultado es preliminar y requiere ser confirmado. Si bien se trabajó con una sola muestra representativa que corresponde a la mezcla de fructificaciones proveniente de varios organismos, es necesario confirmar dicho comportamiento usando replicas biológicas en próximas investigaciones. Vale la pena mencionar que desde el punto de vista técnico el análisis de proteína mediante el microanalizador permite cuantificar el nitrógeno total obtenido de manera consistente y confiable (94,95). Las diferencias en el contenido de proteína entre las dos cepas del hongo indican que posiblemente existen algunas diferencias fenotípicas determinadas por la variabilidad genética y la regulación génica que es propia de aislamientos con diferente procedencia
(95).

Figura 2-2. Contenido total de proteína y rendimiento de extracción empleando dos buffers de extracción diferentes.



Las barras en color azul corresponden a los resultados para la cepa de EUA, las barras en color morado corresponden a los resultados para la cepa de BEL. Las letras corresponden a las diferencias estadísticamente significativas con un análisis de varianzas ANOVA con un valor *p>0,05*.

En cuanto a las diferencias observadas en el método de extracción empleado, de acuerdo con los resultados encontrados se evidencia que la extracción con el buffer con la adición de PVPP, ácido ascórbico y cloruro de sodio, generó una disminución significativa de la proteína extraída; esto es de esperarse para algunas matrices biológicas en las que las proteínas con residuos aromáticos, son retenidas al usar este polímero insoluble. Por otro lado, se evidencia que la cantidad de proteína extraída con pesos moleculares superiores a 10 kDa (Retenida en el proceso de ultrafiltración con centricones) es mucho mayor que la que presenta un menor peso molecular. Estos resultados son de esperarse para este tipo de muestras biológicas (83).

Considerando que los resultados presentados indican que el método de extracción de proteína con el buffer PBS+Tiourea, resultó en una mayor cantidad de proteína soluble,

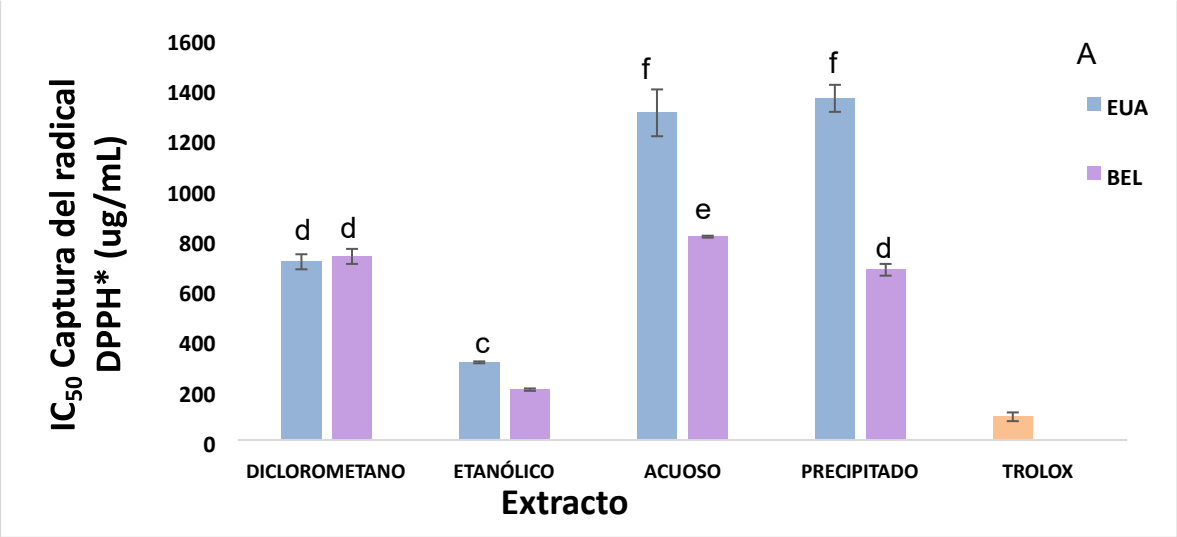
este fue el que se usó para la extracción preliminar de las lectinas presentes en los hongos de interés. Este buffer ha sido usado en otros estudios de extracción de lectinas con matrices biológicas diferentes (96). Es importante aclarar que la selección preliminar de este buffer permitirá continuar con los posteriores ensayos del presente capítulo. Sin embargo, para efectos de la purificación, se verificó más adelante (capítulo 4), la pertinencia del uso de dicha solución extractora.

2.5.3 Actividad antioxidante e inhibitoria de AGEs

La actividad antioxidante frente al modelo de captura del radical DPPH* y radical catión ABTS*+ para los cuatro extractos evaluados, se presenta en las figuras 2-3 y 2-4, los datos.

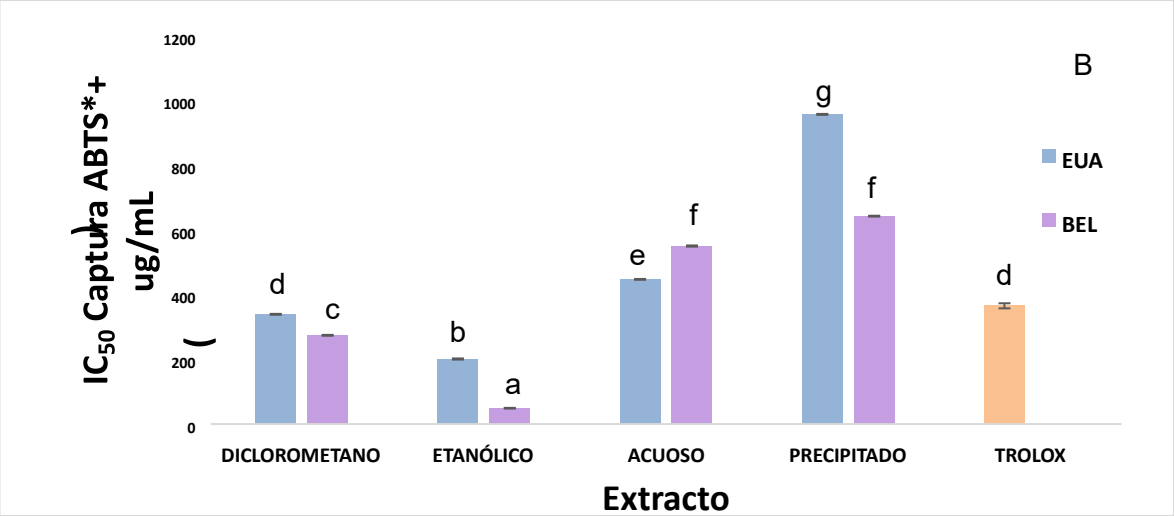
La IC_{50}, representa la concentración necesaria de la sustancia para inhibir el 50% de la formación de ROS y es un parámetro clave en este estudio. Su determinación permite cuantificar la efectividad de la sustancia evaluada y establecer la dosis óptima requerida para obtener una respuesta antioxidante significativa. Este dato es de gran utilidad tanto desde un punto de vista científico, como aplicado, ya que proporciona información crucial para el diseño de futuros estudios y aplicaciones terapéuticas, en el desarrollo de un alimento funcional.

Figura 2-3. Concentración inhibitoria efectiva media IC50 (ug/mL) de la captura del radical DPPH para los diferentes extractos evaluados.



La figura muestra Inhibición de la generación del radical DPPH*. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre cada uno de los tratamientos estudiados mediante un ANOVA con un valor *p<0,05*.

Figura 2-4. Concentración inhibitoria efectiva media IC50 (ug/mL) de la captura del cation radical ABTS para los diferentes extractos evaluados.

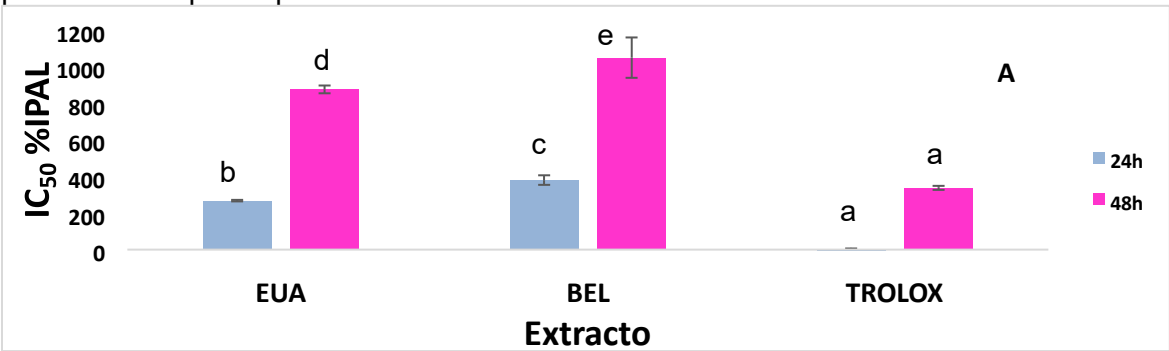


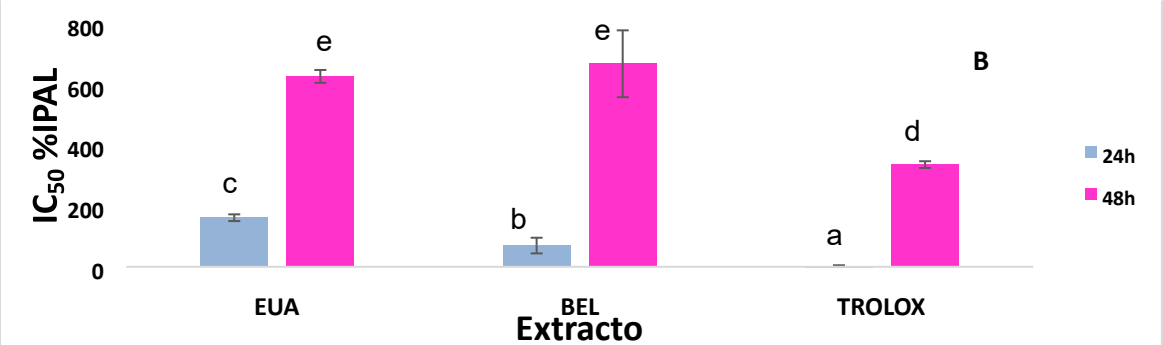
La figura muestra Inhibición de la generación del radical catión ABTS*+. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre cada uno de los tratamientos estudiados mediante un ANOVA con un valor *p<0,05*.

Los extractos etanólicos de la cepa de origen belga (BEL), presentan una buena actividad antioxidante en modelos DPPH*, ABTS*+ (figura 2-3 y figura 2-4), IPAL (figura 2-5), y PFRAP (figura 2-6), seguido de los extractos etanólicos de la cepa de Estados Unidos (EUA).

La evaluación simultánea de diferentes modelos de ensayo es necesaria para correlacionar la capacidad antioxidante total con la composición de los extractos. Diferentes autores mencionan que es ideal el uso simultaneo de métodos espectrofotométricos y cromatográficos para establecer los mecanismos predominantes en las actividades evaluadas (30,92,97–100).

Figura 2-5. Concentración inhibitoria efectiva media IC_{50} (ug/mL) de la inhibición de peroxidación lipídica para los diferentes extractos evaluados.

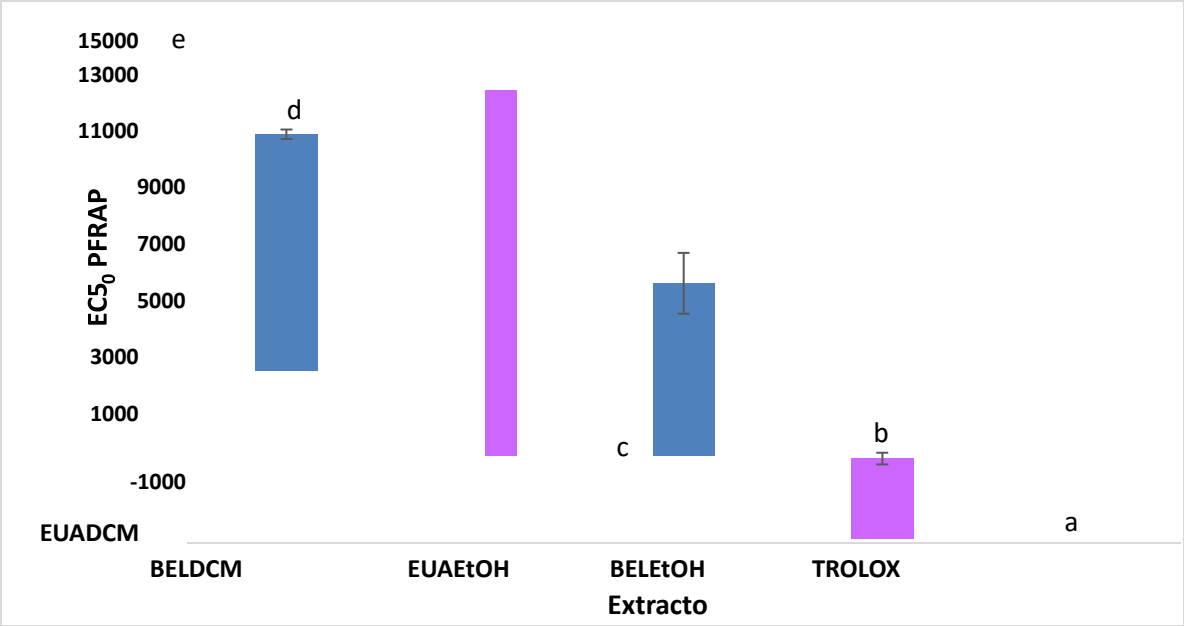




Inhibición de la peroxidación del ácido linoleico a 24 horas y 48 horas para los extractos en DCM(A) y EtOH(B). Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre cada uno de los tratamientos estudiados mediante un ANOVA con un valor *p<0,05*.

Existen reportes que relacionan la actividad antioxidante medida mediante el modelo de DPPH* y la inhibición de la peroxidación lipídica, explicando que un compuesto con una alta actividad antioxidante puede tener también la capacidad de proteger contra el daño celular asociado (85,101). Dichos autores han señalado que no todos los EROs comparten el mismo patrón de reacción hacia los antioxidantes y que los diferentes tipos de EROs, afectan de manera diferencial los compuestos insaturados; es posible que el contenido de estos compuestos sea mayor en los extractos de la cepa de Bélgica.

Figura 2-6. Concentración efectiva media EC_{50} (ug/mL) para la reducción del ion Férrico de los diferentes extractos evaluados.



Evaluación del poder reductor férrico para los extractos en DCM y EtOH. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre cada uno de los tratamientos estudiados mediante un ANOVA con un valor *p<0,05*.

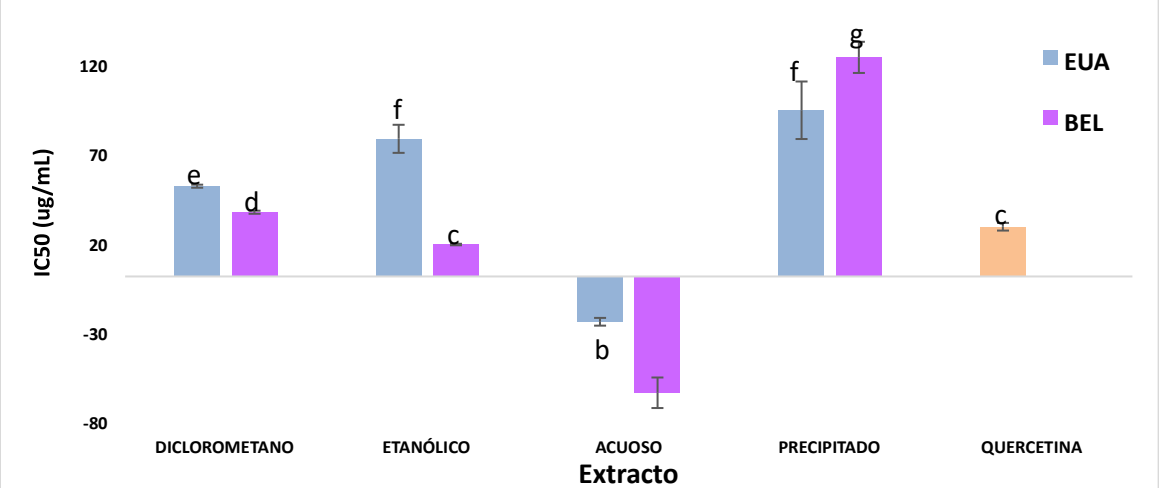
Los modelos IPAL y PFRAP además de requerir de una menor cantidad de extracto para lograr una inhibición del 50% de la oxidación de los radicales en estudio, permiten aproximarse más a los fenómenos experimentados en el ambiente celular; esto considerando que tanto el DPPH* como el ABTS*+ no son radicales que se formen de manera natural en los procesos de acumulación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno EROs (85).

La figura 2-7, muestra los resultados de la IC50 de extractos para la inhibición de la formación de productos finales de glicación avanzada o melanoidinas, compuestos que pueden tener efectos negativos en patologías no transmisibles. Los extractos etanólicos de las dos cepas presentan mayor actividad que los demás extractos, similar a lo encontrado en la actividad antioxidante. Por otro lado, los extractos acuosos presentan valores de IC50 negativos, lo que puede indicar la generación de AGEs; esto era de esperarse debido a la presencia de azúcares que afectan el ensayo (102).

La acumulación de AGEs se ha relacionado con el envejecimiento y diversas enfermedades crónicas. Los AGEs pueden alterar la estructura y función de las proteínas,

interferir con su capacidad para realizar sus funciones biológicas normales, activar receptores específicos de AGEs en las células desencadenando una respuesta inflamatoria y la producción de especies reactivas de oxígeno (23,28,90,103,104).

Figura 2-7. Concentración inhibitoria efectiva media IC50 (ug/mL) de la formación de AGES para los extractos evaluados.



Inhibición de la formación de AGEs para los diferentes extractos de las dos cepas del hongo *G. lucidum*. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre cada uno de los tratamientos estudiados mediante un ANOVA con un valor *p<0,05*.

Un alimento funcional con los compuestos presentes en los extractos en DCM y EtOH de la cepa de Bélgica podría ser de gran interés para la industria de alimentos gracias a su naturaleza y actividad. La implementación de métodos y condiciones de extracción que involucren el uso del etanol puede ser conveniente en los procesos industriales por su baja toxicidad. Los resultados demuestran que los extractos etanólicos derivados del cuerpo fructífero de dos cepas del hongo *Ganoderma lucidum* podrían tener los efectos benéficos asociados a la estabilidad de proteínas y a la inhibición de la producción de fibras y depósitos extracelulares asociados a AGEs(105–107), siendo más interesante la cepa BEL.

Por otro lado, es evidente que los precipitados obtenidos de la extracción acuosa que fueron redisueltos en etanol/acetona, no presentaron ninguna de las actividades biológicas de interés (Figura 2-4, 2-5 y 2-7). En este extracto se esperaba obtener una fracción rica en polisacáridos, que en otros casos han presentado actividad biológica, principalmente inmunomoduladora (16,93,108). De acuerdo con los resultados del

presente estudio, al menos en las dos cepas objeto de estudio, este tipo de extractos ricos en polisacáridos, no presentan actividad antioxidante o antiAGEs.

En la Tabla 2-2 se muestra que los extractos etanólicos de ambas cepas exhiben un conjunto sobresaliente de actividades biológicas evaluadas, siendo la cepa belga la que presenta una mayor actividad en comparación con la cepa estadounidense. Además, se observa una relación entre la capacidad antioxidante total de los extractos de mediana y baja polaridad (EtOH y DCM respectivamente) y la inhibición de los productos finales de glicación avanzada (AGEs).

Tabla 2-2. Resumen de actividades biológicas asociadas a los extractos de metabolitos para las dos cepas en estudio. Los datos se presentan como promedio de la IC_{50} y EC_{50} y su desviación estándar.

Cepa	Extracto	DPPH*	ABTS*+	IPAL	PFRAP	AGEs
			IC 50 (µg/mL)		EC 50 (µg/mL)	IC 50 (µg/mL)
EUA WC806	DCM	709,4 ± 29,9	339,5 ± 1,4	267,5 ± 4,2	8351,3 ± 168,2	50,7 ± 0,8
	EtOH	309,0 ± 3,9	**201,3 ± 1,7**	133,6 ± 6,8	6094,4 ± 1075,4	77,3 ± 7,9
	Acuoso	1302,4 ± 93,9	447,6 ± 1,3	N.A.	N.A.	N.D.
	Precipitado	1360,0 ± 53,8	892,2 ± 1,5	N.A.	N.A.	93,3 ± 16,1
BEL M9726	DCM	730,8 ± 4,8	274,5 ± 1,1	379,8 ± 26,1	12891,9 ± 1578,7	36,0 ± 0,9
	EtOH	200,4 ± 24,4	**49,1 ± 1,3**	85,0 ± 1,6	2837,9 ± 206,6	**17,9 ± 0,4**
	Acuoso	809,3 ± 2,2	550,8 ± 0,9	N.A.	N.A.	N.D.
	Precipitado	677,3 ± 13,3	643,2 ± 1,0	N.A.	N.A.	123,0 ± 8,7
Patrones						
Quercetina						27,9 ± 2,1
Trolox		92,3 ± 17,3	365,8 ± 7,9	2,6 ± 0,4	258,0 ± 8,9	

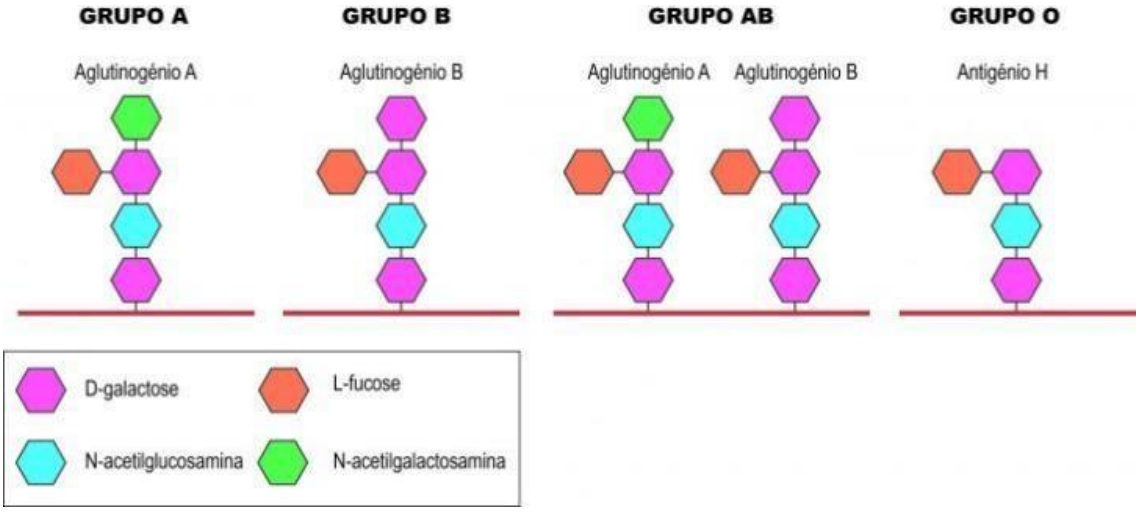
Como se observa, los resultados de la evaluación de las actividades biológicas en los extractos de las dos cepas del hongo *G. lucidum*, tienen resultados muy atractivos para la industria de alimentos y le confieren beneficios aprovechables para el desarrollo de alimentos funcionales, los resultados de la capacidad antioxidante obtenidos en esta etapa son comparables con los resultados presentados por otros autores (7).

2.5.4 Actividad aglutinante de los extractos proteicos

Con el fin de evaluar la actividad aglutinante debida a la presencia de lectinas en los extractos proteicos de las dos cepas objeto de estudio, se realizaron inicialmente un estudio de la selectividad de reconocimiento a carbohidratos. Para ello, se realizó un screening preliminar de la aglutinación frente a los grupos sanguíneos A, B y O indiferente

del factor RH esto debido a la naturaleza de los carbohidratos que expresan este tipo de células sanguíneas y permite su clasificación en dichos grupos sanguíneos figura 2-8.

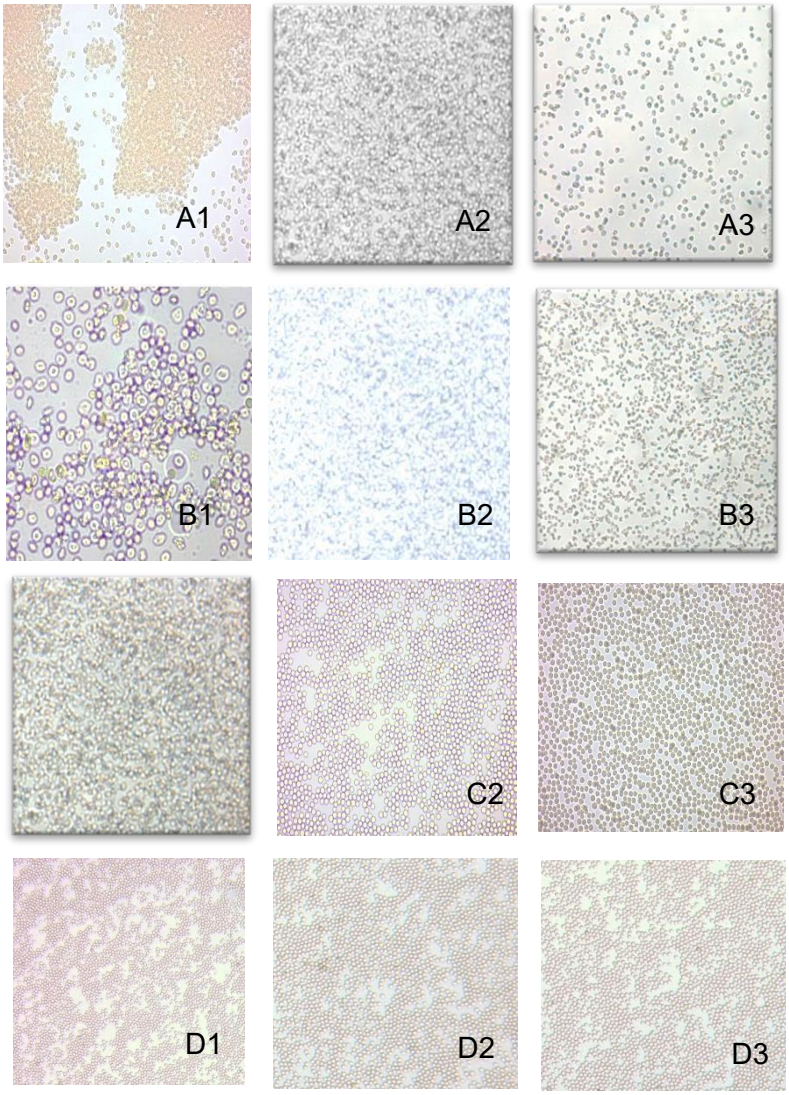
Figura 2-8. Identificación de los grupos sanguíneos de acuerdo con los aglutinógenos presentes en la membrana de los eritrocitos (Dean, L. (2005)).



2.5.4.1 Screening preliminar de la actividad aglutinante

Los resultados del screening preliminar indican que los extractos de proteína de ambas cepas del hongo tienen aglutinación frente a la solución de eritrocitos al 2% v/v, específicamente con eritrocitos de tipo A (presencia de N-acetilgalactosamina) figura 2-9. Debido a esta capacidad aglutinante, se decidió utilizar eritrocitos de sangre de caballo en estudios posteriores (3); esto considerando que la cantidad de N-acetilgalactosamina en términos generales, es mayor en sangre de caballo en comparación con la sangre de un humano de tipo A (110). Estos hallazgos sugieren que los extractos de proteína de ambas cepas del hongo pueden tener interacciones específicas con los eritrocitos y que podrían ser de interés para futuras investigaciones relacionadas con las propiedades aglutinantes y potenciales aplicaciones biológicas.

Figura 2-9. Screening preliminar de la aglutinación de los extractos crudos para las dos cepas.



A1: Eritrocitos A (Extracto Cepa EUA)
A2: Eritrocitos B (Extracto Cepa EUA)
A3: Eritrocitos O (Extracto Cepa EUA)

B1: Eritrocitos A (Extracto Cepa BEL)
B2: Eritrocitos B (Extracto Cepa BEL)
B3: Eritrocitos O (Extracto Cepa BEL)

C1: Eritrocitos A (Buffer PBS 50 mM C-)
C2: Eritrocitos B (Buffer PBS 50 mM C-)
C3: Eritrocitos O (Buffer PBS 50 mM C-)

D1: Eritrocitos A (Buffer PBS 50 mM C-)
D2: Eritrocitos B (Buffer PBS 50 mM C-)
D3: Eritrocitos O (Buffer PBS 50 mM C-)

Aglutinación empleando 5,3 mg/mL de proteína para la cepa EUA y 5,2 mg/mL de proteína para la cepa BEL, en presencia de los diferentes tipos de sangre humana frente a los extractos crudos de las dos cepas objeto de estudio, A1 (++++), A2 (-), A3 (-), B1 (++), B2 (-), B3 (-), C1(-), C2(-), C3(-), D1 (-), D2 (-), D3 (-). Imágenes observadas a través del microscopio con un objetivo de 10x.

Se observa que los extractos proteicos de las dos cepas presentan afinidad por el mismo grupo sanguíneo A; en donde al parecer la cepa de Estados Unidos es más activa que la cepa de Bélgica. Sin embargo, las dos cepas presentan actividad significativa de aglutinación y se requieren hacer otros ensayos cuantitativos para confirmar dichas diferencias. De acuerdo con los resultados de esta investigación, las dos cepas podrían ser investigadas para profundizar sobre el papel de las lectinas y su potencial en la generación

de alimentos funcionales. Estas proteínas tienen la capacidad de unirse a carbohidratos y, al contar con dos sitios de reconocimiento, son altamente versátiles en su interacción con diversas moléculas (4,33). La variabilidad de estas lectinas entre diferentes cepas del mismo hongo es relevante, sugiriendo que podrían dirigirse específicamente a algunos carbohidratos, lo que tendría implicaciones importantes en el diseño de alimentos funcionales (4).

El hecho de que una lectina muestre actividad específica frente a la Nacetilgalactosamina, establece su capacidad de reconocer y unirse preferentemente a esta molécula en lugar de otros azúcares (3). Esta interacción puede desencadenar respuestas biológicas como aglutinación de células y activación de vías de señalización intracelular. Esto permite establecer relevancia en procesos biológicos como adhesión celular, respuesta inmunitaria y reconocimiento de patógenos, y puede tener aplicaciones en la detección y purificación de moléculas con N-acetilgalactosamina (31). Sin embargo, el potencial prebiótico de una lectina con esta especificidad depende de varios factores, y es necesario realizar estudios adicionales para determinar su capacidad de promover el crecimiento selectivo de microorganismos beneficiosos en el tracto gastrointestinal. El efecto prebiótico de una sustancia se basa en su capacidad de promover el crecimiento y actividad de microorganismos beneficiosos en el intestino (51,53). Si una lectina con actividad específica hacia la N-acetilgalactosamina puede interactuar con los microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal y favorecer su crecimiento, podría considerarse como un posible compuesto prebiótico.

No obstante, la actividad prebiótica no solo depende de la capacidad de unión a carbohidratos, sino también de factores como resistencia a la degradación enzimática, fermentabilidad, selectividad hacia bacterias beneficiosas y capacidad de modular el microbiota intestinal. Para evaluar su actividad prebiótica, se requieren estudios *in vitro*, que corroboren que impacto tendría la lectina en la composición y función del microbiota intestinal. Estas investigaciones específicas son necesarias para determinar el potencial prebiótico de una lectina con actividad hacia la N-acetilgalactosamina.

De manera general, en este capítulo se han comparado las actividades biológicas de los extractos de metabolitos y proteínas de las cepas de *G. lucidum*. Los resultados obtenidos han proporcionado información relevante para determinar qué la cepa de Bélgica

presenta una mayor actividad y, por lo tanto, podría ser más adecuada para su uso en la industria de alimentos (45,68,80,111,112).

2.6 Conclusiones

Los extractos etanólicos de ambas cepas exhibieron el conjunto más destacado de actividades biológicas, seguidos por los extractos en diclorometano. Esto sugiere que compuestos de mediana y baja polaridad podrían ser responsables de las actividades antioxidantes y la inhibición de la formación de AGEs (90,102).

La cepa de Bélgica mostró una mayor actividad en términos de los extractos de metabolitos, posiblemente relacionada con sus características genotípicas y fenotípicas de origen, las cuales parecen no modificarse significativamente por su cultivo en el trópico (95). Sin embargo, para confirmar se requiere contar con información sobre la actividad biológica de las cepas cultivadas en el territorio de origen.

La actividad aglutinante presente en ambas cepas BEL y EUA, es específica sobre eritrocitos de tipo A, lo que indica afinidad hacia el carbohidrato N-acetilgalactosamina.

La cepa de Bélgica parece ser la más adecuada para el desarrollo de un alimento funcional y promete mejores resultados en su aplicación en la industria de alimentos. Sin embargo, se requiere continuar con investigaciones adicionales para obtener un panorama más completo y confirmar estos hallazgos.

3 Análisis de metabolitos de las dos cepas de *Ganoderma lucidum*

3.1 Resumen

En esta etapa de la investigación se realizó un perfilado químico de los metabolitos responsables de las actividades antioxidantes e inhibitoria de AGEs, de las dos cepas del hongo *Ganoderma lucidum* producidas por cultivo tradicional bajo condiciones industriales. Para ello se determinaron, mediante el uso de técnicas espectrofotométricas, los niveles totales de algunos compuestos de interés, como son terpenoides, fenoles, flavonoides, azúcares totales y azúcares reductores. Posteriormente, se realizó un perfilado por cromatografía liquidad de alta eficiencia, acoplada a detección de arreglo de diodos (HPLCDAD) de las fracciones en DCM, EtOH y acuosas. Así mismo, se realizó un perfilado por cromatografía de gases con detección de espectrometría de masas (CG-EM) de los extractos en DCM de las dos cepas; se estableció mediante herramientas de análisis multivariado dirigido (PLS-DA), las posibles diferencias de composición que determinan la actividad biológica encontrada previamente. Para identificar los metabolitos responsables de la destacada capacidad antioxidante e inhibidora de AGEs, se analizó el extracto en EtOH de la cepa de Bélgica mediante CG-EM para realizar anotaciones estructurales a nivel 3. Los resultados revelaron que los compuestos terpenoidales son los principales agentes responsables de estas propiedades.

3.2 Abstract

During this phase of the research, a comprehensive analysis was conducted to identify the metabolites accountable for the antioxidant and AGE inhibitory properties of two strains of *Ganoderma lucidum* fungus cultivated under industrial conditions using traditional methods. The levels of various compounds of interest, including terpenoids, phenols, flavonoids, total sugars, and reducing sugars, were quantified using spectrophotometric techniques. Additionally, the fractions obtained from dichloromethane (DCM), ethanol (EtOH), and aqueous extracts were profiled using high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection (HPLC-DAD). Furthermore, gas chromatography with mass spectrometry detection (GC-MS)

was employed to analyze the DCM extracts of both strains, enabling the identification of potential compositional differences associated with the observed biological activities through statistical correlation tools (PLS-DA). Finally, to have information on the structure of metabolites that may be responsible for the best antioxidant and AGEs inhibitory capacity, the results obtained by GC-MS of the EtOH extract of the Belgian strain were analyzed to perform structural annotation at level 3. Terpenoidal compounds were found to be the main responsible for AGEs inhibition and antioxidant capacity.

3.3 Introducción

G. lucidum es un hongo ampliamente estudiado en los últimos años, en cuanto a la caracterización de los metabolitos responsables de las propiedades antioxidantes; se ha reportado el aislamiento y caracterización empleando técnicas de cromatografía liquida y de gases acoplada a detectores de masas, e incluso el uso de resonancia magnética nuclear de protones (RMN) para elucidar la estructura de sus metabolitos. (71,79,113– 115). Se ha reportado un gran número de compuestos aislados de diferentes fracciones del hongo *G. lucidum*, es el caso de los ácidos ganodéricos que tienen actividad antioxidante, antiinflamatoria e incluso anticancerígena (52,80,110). En esta etapa se caracterizaron los extractos de las dos cepas del hongo *G. lucidum* cultivadas en nuestro país, mediante el empleo de técnicas espectrofotométricas y cromatográficas, con el fin de tener información sobre qué tipo de compuestos están relacionados con las actividades antioxidantes e inhibitoria de los AGEs. Es importante citar que, a la fecha, son pocos o casi nulos los estudios sobre la capacidad para inhibir la formación de AGEs presentes en
G. lucidum, el cual ha sido reconocido por sus actividades antioxidantes (66,67,72,73,75–77,93,116,117),

La finalidad de esta etapa fue la de obtener los niveles totales de metabolitos de interés empleando métodos espectrofotométricos y complementarlos con el perfilado por cromatografía líquida (HPLC) y cromatografía de gases (GC). Gracias al acoplamiento con espectrometría de masas de esta última herramienta analítica y a la aplicación de análisis estadísticos multivariados dirigidos (PLS-DA), se logró información estructural de algunos compuestos que pueden ser responsables de la actividad antioxidante e inhibitoria de AGEs objeto de estudio. Es importante recordar que el nivel de identificación de un metabolito depende de las estrategias

analíticas empleadas y que los análisis de CG-MS con comparación en bases de datos, permiten una anotación a nivel 3 (*MSI Metabolomics Standard Initiative*), la cual ha sido exitosamente usada en diferentes estudios relacionados (118). La presente etapa genera información sobre los compuestos con actividad biológica del *G. lucidum* cultivado en nuestro país y tiene implicaciones importantes en el desarrollo de alimentos funcionales (119,120).

3.4 Materiales y Métodos

3.4.1 Preparación de extractos de metabolitos para el análisis por métodos espectrofotométricos y cromatográficos

Para la obtención de los extractos empleados en este capítulo se siguió la metodología consignada en el numeral 2.4.2. Los extractos de las dos cepas fueron secados a temperatura y presión reducida en rotaevaporador, una vez secos fueron redisueltos en el solvente apropiado para cada determinación espectrofotométrica o cromatográfica.

3.4.2 Determinación de compuestos terpenoidales

Se utilizó el método colorimétrico de Lieberman-Burchard (121). Las lecturas se realizaron por espectrofotometría UV-Vis, a una longitud de onda de 640 nm. La cantidad de compuestos triterpenoidales fue obtenida por interpolación en la curva de calibración y expresada como compuestos triterpenoidales totales en equivalentes de estigmasterol (en mg/mL).

3.4.3 Determinación de compuestos polifenólicos

La cantidad de compuestos polifenólicos totales se realizó empleando el método de Folin–Ciocalteu (122), modificado para empleo de lector de placas múltiples La cantidad de polifenoles totales se expresó en equivalentes de ácido gálico (en mg/mL).

3.4.4 Determinación de compuestos flavonoides

Los flavonoides totales fueron determinados por el método de Kostennikova Z. (123), modificado para empleo de lector de placas múltiples. Los flavonoides totales se reportaron en equivalentes de catequína (en mg/mL).

3.4.5 Determinación de azúcares totales

El contenido de azúcares totales se determinó empleando el método colorimétrico de Dubois modificado (124). Una vez realizada la curva de calibración se analizaron las muestras en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm, con la absorbancia obtenida se determinó la concentración de azúcares que contiene la fracción y se obtendrá de la interpolación en la curva de calibración expresada como azúcares totales en equivalentes de glucosa (en mg/mL).

3.4.6 Determinación de azúcares reductores

El contenido de azúcares reductores totales se determinó empleando el método colorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalicilico Miller (125), Una vez realizada la curva de calibración se analizaron las muestras en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm, con la absorbancia obtenida se determinó la concentración de azúcares que contiene la fracción y se obtendrá de la interpolación en la curva de calibración expresada como azúcares reductores totales en equivalentes de glucosa (mg/mL).

3.4.7 Determinación de azúcares no reductores

El contenido de azúcares no reductores se estimó de la diferencia entre el contenido de azúcares totales y azúcares reductores (124).

3.4.8 Perfilado cromatográfico de los extractos con actividad antioxidante e inhibitoria de productos avanzados de glicosilación (anti-AGEs)

Para establecer la correlación entre el conjunto de actividades biológicas de las cepas del hongo en estudio y su composición química, se implementó un sistema cromatográfico por HPLC-DAD aplicable a diferentes familias de metabolitos de interés.

Mediante esta estrategia se lograron analizar de manera simultánea compuestos de alta polaridad como polifenoles y flavonoides, así como de mediana polaridad. Esta estrategia se complementó con la información de los compuestos de baja polaridad mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas CG-EM.

3.4.8.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a detector de arreglo de diodos (CLAE-DAD)

Con el objetivo de implementar un método para el estudio de los extractos por HPLC-DAD, se analizaron estándares de ácido graso (ácido linoleico), compuestos triterpenoidales (estigmasterol, β-sitosterol y ergosterol), compuestos polifenólicos (ácido gálico, ácido cafeico y ácido p-cumárico) y flavonoides (quercetina y naringenina. Para esto, se trabajó con un equipo de cromatografía líquida Dionex Ultimate 3000S, Thermo
Scientific, USA auto inyección y loop de 20 µL WPS-3000TFC/TBFC, equipado con una bomba de solvente cuádruple Ultimate™ LPG-3400RS, un detector DAD-3000RS Dionex, y el software Chromeleon 7.2. Se utilizó una columna C18 de fase reversa marca Phenomenex (4.5 mm×150 mm y 4 µm de tamaño de partícula) para la separación. Las longitudes de onda de adquisición se fijaron a 236, 254, 280 y 330 nm, con ancho de banda de 1 nm, flujo del gradiente de 0,5 mL/min empleando un sistema binario en gradiente compuesto por dos fases móviles partiendo de la mezcla de A: H_2O:CH_3COOH 0.1% v/v y B: ACN. El gradiente de elución aplicado en este estudio fue: min 0-B:0%, min 5-B:20%, min 20-B:25%, min 30-B:30%, min 40-B:50%, min 45-B:80%, min 47-B: 90%, min 55B:95%, min 60-B:0% (79) Cada inyección de los estándares disueltos en H_2O:CH_3COOH:ACN:DMSO (70:0,1:28:2 v/v) se realizó por triplicado, así como los extractos en DCM, EtOH y acuoso en 3 concentraciones diferentes 100, 500 y 1000 ppm redisueltos en la misma mezcla.

3.4.8.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

Los extractos en DCM y el extracto EtOH de la cepa de Bélgica, secos y redisueltos en DCM se analizaron por CG-EM en un cromatógrafo marca Agilent 7890B acoplado a un detector EM 5977A (Agilent Technologies, Wilmington, DE, EE. UU), con fuente de ionización de 70 eV, bajo las siguientes condiciones: Helio 1,1 mL/min; modo Splitless; temperatura del inyector 300 °C; rampa de calentamiento 60 °C 1 min: 7,4 °C/min hasta 310 °C - 10 min (80,126). Para ello los extractos fueron sometidos a eliminación total del solvente y redisolución en diclorometano grado cromatográfico; para el caso del solvente etanólico se logró la disolución de al menos un 65% de extracto total. El método de integración empleado utilizó un filtro de 3 mínimos empleando el método de Savitzky-Golay y señales con alturas superiores a 350 mA garantizando que la relación señal/ruido (N/S) siempre fuera superior a 250. También se realizó desisotopado, deconvolución y enriquecimiento de las señales utilizando el software MZ-MINE

2.56. Se trabajó con la base de datos NIST-17 comparando con datos colaborativos de la base de datos GNPS frente a levaduras para lograr una determinación de los compuestos presentes y de acuerdo con el análisis estadístico analizar los espectros de masas de los compuestos promotores de las actividades biológicas. El nivel de anotación de los metabolitos es de 3 de acuerdo con la MSI Metabolomics Standard Initiative (118).

3.4.9 Análisis estadístico

Los datos obtenidos para la cuantificación espectrofotométrica, y perfiles de metabolitos se analizaron usando el programa Statgrafics 19, utilizando un análisis de varianza (ANOVA). El análisis estadístico de los datos espectrofotométricos y cromatográficos se realizó mediante el uso de la plataforma web MetaboAnalyst (V5.0). Los cromatogramas de HPLC (mAU) fueron procesados mediante el software Chromeleon 7.3, los cromatogramas de iones totales (TIC) fueron procesados con la herramienta MZmine 3.51, para filtrar, alinear y escalar las señales (i.e., intensidad) y así construir la matriz de intensidad de las señales [observaciones (muestras) × variables (señales)]. Posteriormente, esta matriz se empleó, utilizando la herramienta MetaboAnalyst 5.0, para hacer una comparación basada en reducción de dimensiones a través de análisis de componentes principales (PCA) (de modo exploratorio), seguido de un análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS) (como abordaje supervisado). El análisis por PLS permitió reconocer los metabolitos mayoritariamente discriminantes mediante puntajes VIP (variable importance in projection), y así seleccionar los metabolitos con acumulación diferencial entre controles y tratamientos (VIP > 1).

3.5 Resultados y Discusión

3.5.1 Cuantificación de algunas familias de metabolitos en las cepas de *G. lucidum*

En la cuantificación de compuestos fenólicos, flavonoides y triterpenoides en extractos de las dos cepas utilizando métodos colorimétricos (figura 3-1 A), se encontró que el contenido de éstos está relacionado con los porcentajes de extracción, siendo el extracto etanólico el que presentó mayor porcentaje de extracción (sección 2.5.1). Estos resultados son de esperarse considerando que los reportes a la fecha indican que dichos compuestos son abundantes en los hongos macromicetos (127–129) y que, de acuerdo con su polaridad, se extraen en solventes

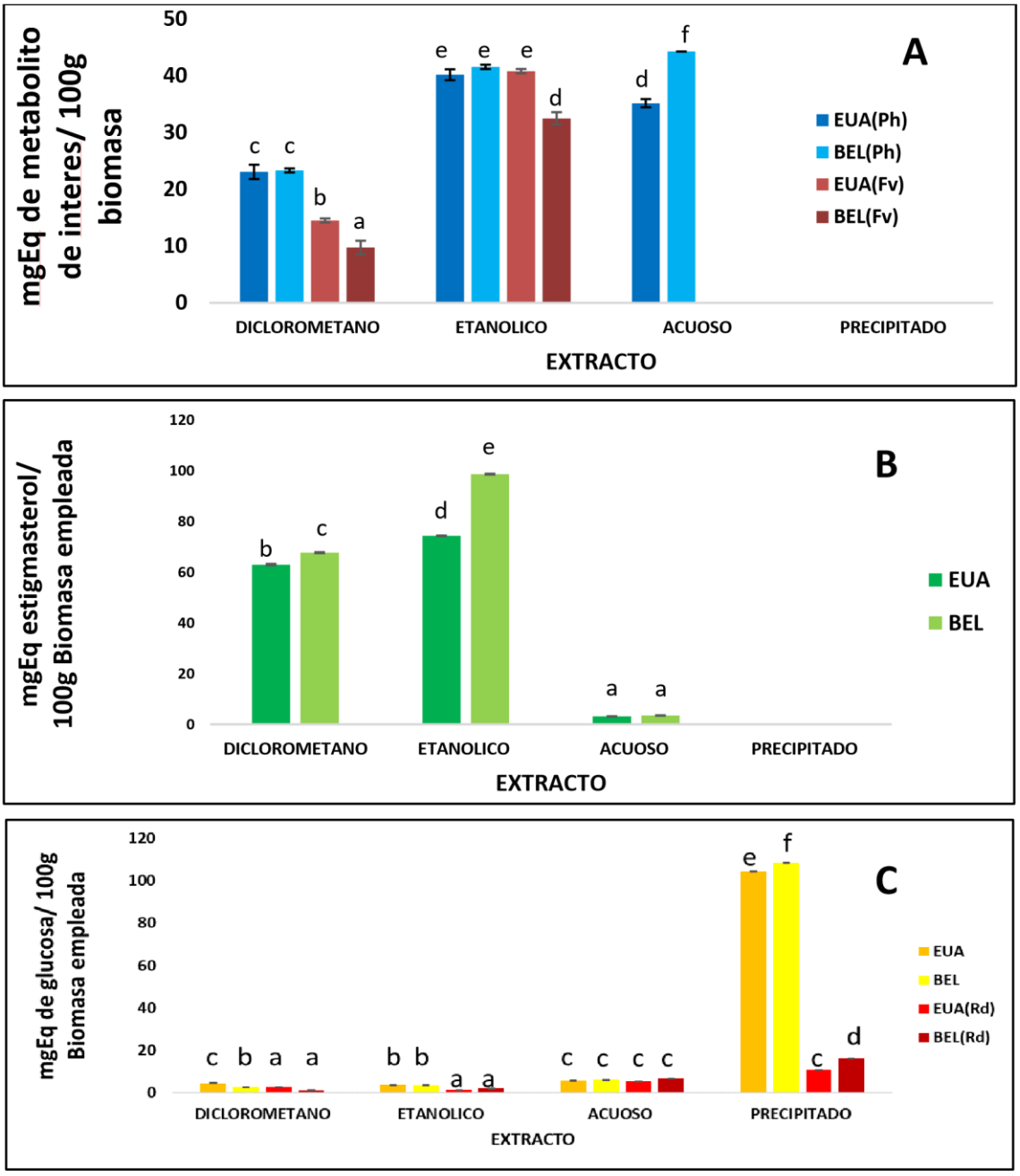
polares como el etanol. A su vez, también es interesante resaltar que el extracto acuoso presenta un alto contenido de compuestos fenólicos. Esto indica que posiblemente los compuestos fenólicos presentes en esta matriz biológica pueden ser glicosilados; se ha reportado que la presencia de azúcares aumenta la polaridad de este tipo de metabolitos y por tanto su solubilidad en agua (65,130). Los resultados de la presente investigación son comparables con otros reportes para extractos etanólicos de este mismo hongo (109)

Con respecto a los niveles de compuestos triterpenoidales en los extractos, como era de esperarse, son más abundantes en los extractos menos polares (DCM y etanol) (Figura 3-1 B). Sin embargo, se presentan niveles detectables de los mismos en los extractos acuosos; esto puede ser debido también a la glicosilación de dichos compuestos que aumentarían su polaridad y estaría de acuerdo con los reportes de triterpenos glicosilados en este hongo. Los contenidos de estos compuestos encontrados en esta investigación son comparables con los reportados previamente para diversos extractos en este mismo hongo (131,132).

Por otro lado, también se observa que el contenido de azúcares reductores libres podría estar promoviendo la formación de productos avanzados de glicación; esto considerando que los extractos acuosos presentan actividad promotora de AGEs (Figura 2-6) y los altos niveles de azúcares en dichos extractos (Figura 3-1- C). Esto es de esperarse considerando que los azúcares aumentan la formación de productos de condensación durante el ensayo espectrofotométrico, generando una respuesta de formación de AGEs. El contenido de azúcares reductores encontrados en esta investigación, son comparables con lo encontrado en extractos etanólicos y acuosos de este mismo hongo en estudios previos (109) El alto contenido de compuestos fenólicos en dichos extractos y su posible relación con la actividad formadora de AGEs debe ser objeto de futuros estudios. Por otro lado, como era de esperarse, se presenta un alto contenido de azúcares totales en los precipitados de la extracción acuosa debido a la presencia de polisacáridos tal y como ha sido previamente reportado (63,93,133)

Por otro lado, los niveles de compuestos flavonoides son muy bajos en los extractos acuosos (Figura 3-1 A); es posible que en estas matrices biológicas los niveles predominantes de dichos compuestos sean no glicosilados. Sin embargo, se requieren hacer estudios detallados que permitan determinar los perfiles de flavonoides en estos extractos usando herramientas cromatográficas específicas como HPLC-MS-MS.

Figura 3-1. Cuantificación espectrofotométrica de las diferentes familias de metabolitos de interés.



Contenido de compuestos polifenólicos totales (Ph), flavonoides (Fv) de las dos cepas (A). Contenido de compuestos triterpenoidales (B). Contenido de azúcares totales (tonalidades ámbar) y azúcares reductores (Rd) de las dos cepas (C). Las letras indican diferencias estadísticamente significativas empleando un ANOVA con valor *p<0.05*.

Con el fin de encontrar relaciones entre los niveles totales de los metabolitos (Figura 3-1) y las actividades biológicas de los extractos previamente determinadas (Capitulo 2), se

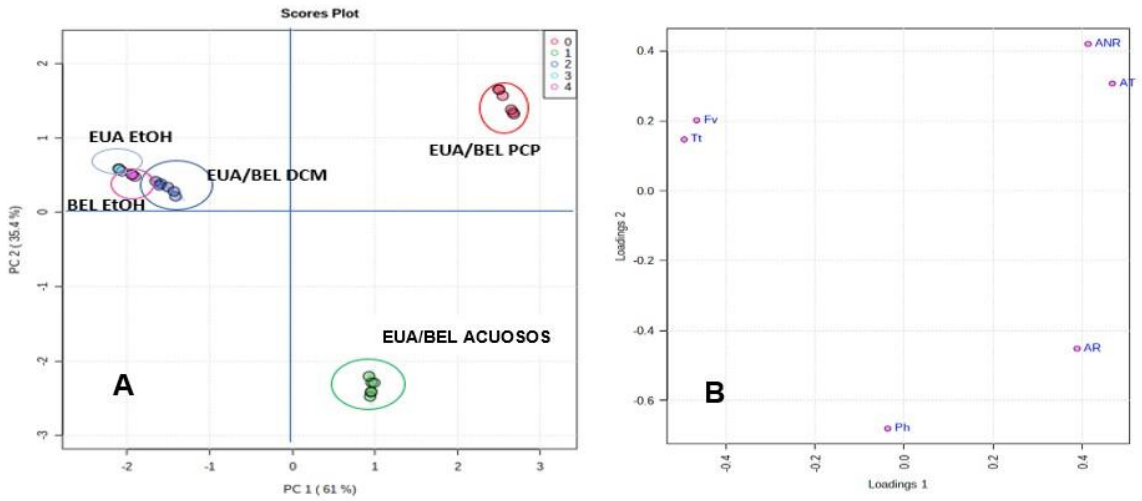
realizaron análisis multivariados del tipo PCA (Análisis de componentes principales) y PLS-DA (Análisis discriminante con mínimos cuadrados).

Al respecto, en el PCA que se presenta en la figura 3-2 (Actividad ABTS), los componentes 1 y 2 cubren el 85% de la varianza total (VT), permitiendo la discriminación de grupos bien definidos en el espacio de dos dimensiones. El componente 1 (65%) separa los extractos etanólico y de DCM de las dos cepas (izquierda), de los precipitados y extractos acuosos (derecha). Comparando con el diagrama de cargas o *score plot* correspondiente, se encuentra que los niveles de flavonoides y compuestos triterpenoidales son los responsables de dicha discriminación. Esto se debe a que dichos extractos están mayoritariamente compuestos por ese grupo de metabolitos. Con respecto al PCA de la actividad DPPH (Figura 3-3), el comportamiento es parecido al anteriormente descrito; haciendo la discriminación de los extractos en etanol y DCM en el componente 1 hacia la izquierda, con respecto a los demás.

En conclusión, estos análisis, muestran que el contenido flavonoides (Fv) y compuestos terpenoidales (Tt) (figura 3-2 y 3-3) son posiblemente los responsables de las actividades antioxidantes evaluadas. Esto indica que el contenido de azúcares totales (AT), azúcares reductores (AR), azúcares no reductores (ANR) y compuestos fenólicos (Ph), no son determinantes en la discriminación de los extractos y dichas actividades biológicas. Es interesante comentar que este comportamiento se mantuvo para las demás actividades evaluadas anti AGEs, iPAL yFRAP (Anexo B-2).

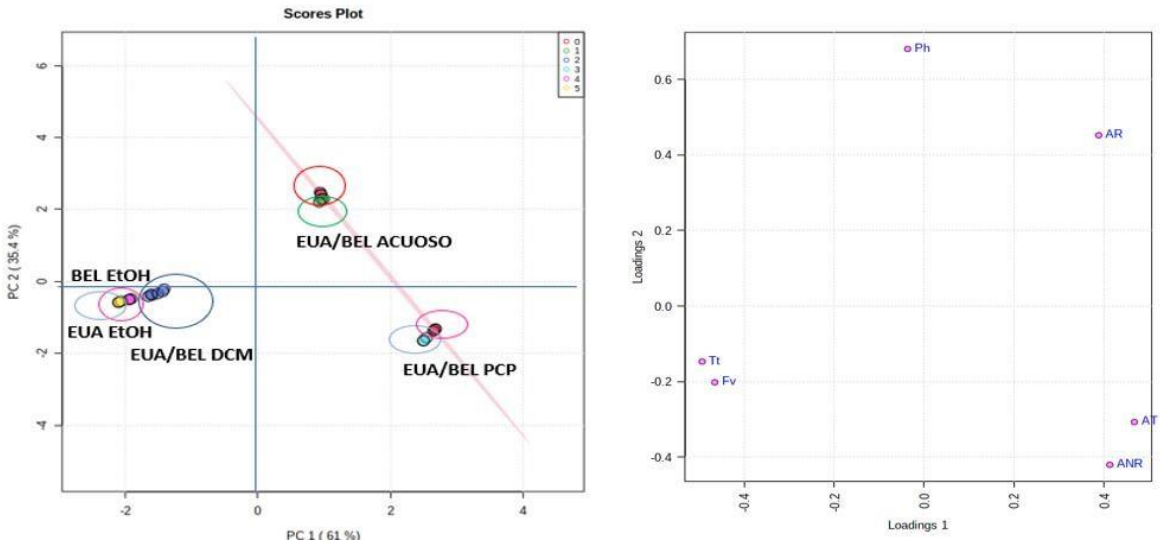
Con el fin de encontrar los metabolitos diferenciales que determinan la discriminación de las dos cepas y sus actividades biológicas, se realizaron los análisis dirigidos de estadística multivariada PLS-DA. De acuerdo con los resultados encontrados (ver anexo B-3), se obtuvieron los resultados del diagrama de VIPs (Figura 3-4) que permiten establecer que los compuestos flavonoides y triterpenoides son efectivamente los que permiten realizar la discriminación de las actividades biológicas de estudio.

Figura 3-2. PCA para la actividad antioxidante frente al modelo de captura del radical ABTS*+ de los diferentes extractos de las dos cepas, considerando los grupos funcionales cuantificados por espectrofotometría. A. PCA y B. Diagrama de cargas.



PCP: Precipitado, Flavonoides (Fv); Terpenoidales (Tt); Fenólicos (Ph); azúcares totales (AT); azúcares reductores libres (AR); azúcares no reductores (ANR).

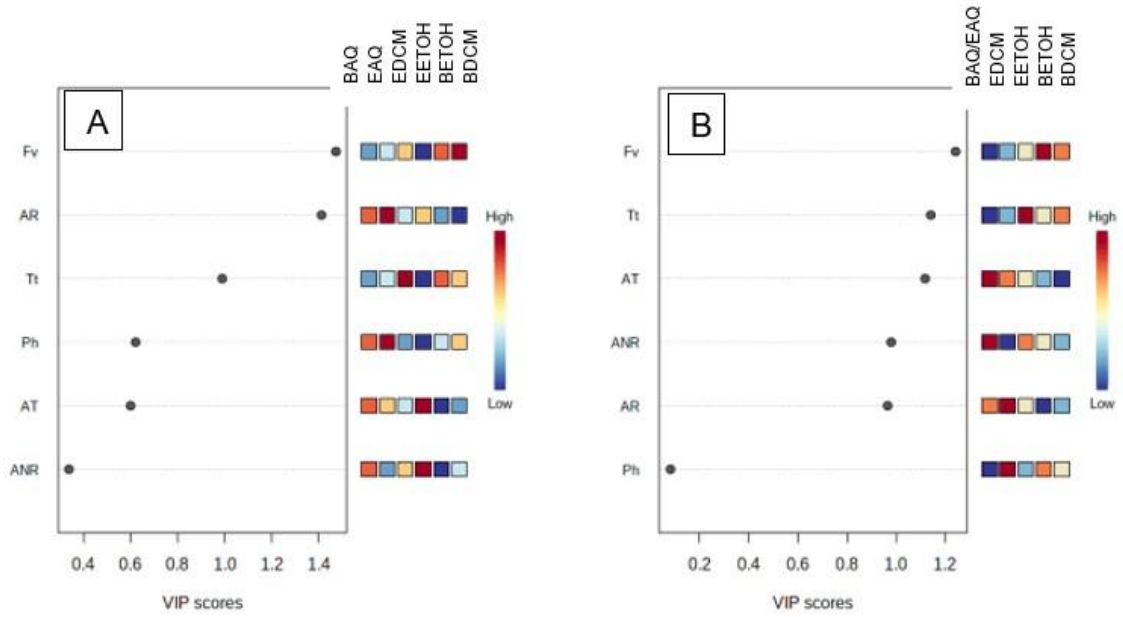
Figura 3-3. PCA para la actividad antioxidante frente al modelo de captura del radical DPPH* de los diferentes extractos de las dos cepas, considerando los grupos funcionales cuantificados por espectrofotometría A. PCA y B. Diagrama de cargas.



PCP: Precipitado, Flavonoides (Fv); Terpenoidales (Tt); Fenólicos (Ph); azúcares totales (AT); azúcares reductores libres (AR); azúcares no reductores (ANR).

Es interesante comentar que el comportamiento descrito para ABTS (Figura 3-4 B), es el mismo que se presenta para las otras actividades objeto de estudio (AGEs, iPAL y PFRAP). Esto indica que los flavonoides y los triterpenoides pueden jugar un papel importante en estos casos. Para DPPH (Figura 3-4A), los azúcares reductores pueden tener un aporte en la discriminación de la actividad biológica; esto es consistente con reportes previos en los que algunos azúcares como la fructosa y la ribosa, pueden afectar este radical (134). Sin embargo, este efecto está relacionado con una respuesta *in vitro* durante el ensayo únicamente; su papel como antioxidantes con efecto *in vivo* es claramente discutible.

Figura 3-4. Gráficos de puntuaciones de Variable de Importancia (VIP).



Los colores representan las 5 familias de metabolitos más significativos (VIP > 0,4 y 0,2) respectivamente para los modelos de captura del radical DPPH* (A) y ABTS*+ (B), que contribuyen a la actividad antioxidante total obtenidos del análisis de componentes principales PLSA realizados con la herramienta web MetaboAnalyst 5.0 e identificados mediante la cuantificación espectrofotométrica de los extractos diferentes extractos en DCM, EtOH, Acuosos y el Precipitado para las dos cepas. Los recuadros de color de la derecha indican el nivel de significancia siendo el color rojo de mayor significancia que el color azul. Flavonoides (Fv); Terpenoidales (Tt); Fenólicos (Ph); azúcares totales (AT); azúcaresreductores libres (AR); azúcares no reductores (ANR).

De manera interesante los compuestos terpenoidales y flavonoides podrían ser responsables de la capacidad antioxidante e inhibitoria de AGEs, considerando información obtenida mediante el análisis de componentes principales y la selección de variables importantes, esta información es muy valiosa para la formulación de un alimento funcional (23,28,45,68,69,90,112). Estos resultados respaldan la importancia de los compuestos

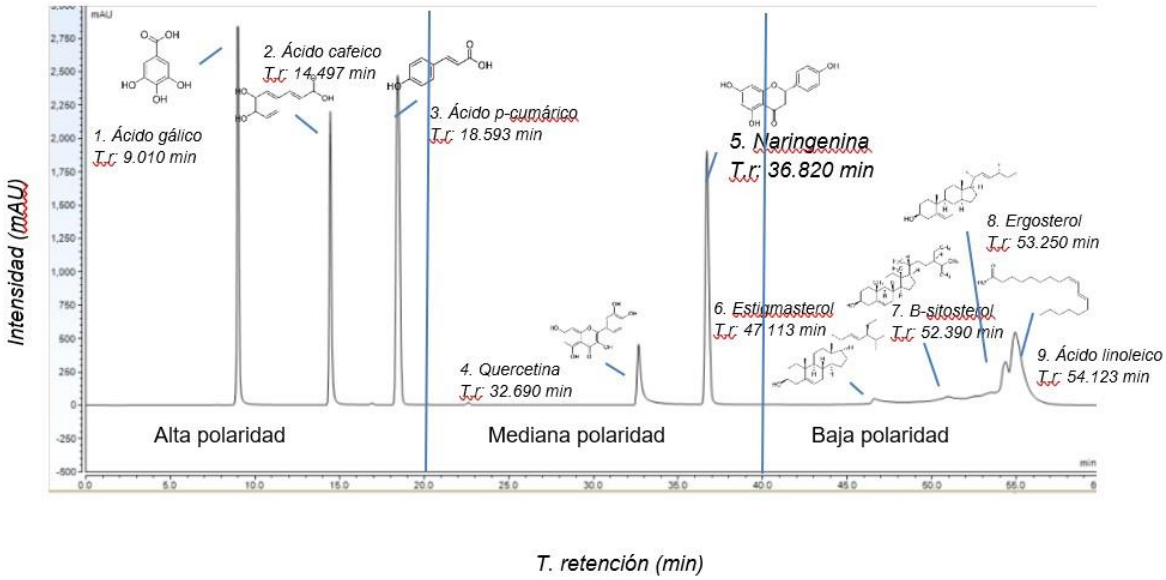
triterpenoidales y flavonoides como componentes bioactivos en el hongo *G. lucidum* y su potencial aplicación en estrategias terapéuticas o en la formulación de productos funcionales. Además, estos resultados están de acuerdo con estudios previos que indican su papel en la actividad de inhibición de AGEs y peroxidación lipídica (23,72– 75,77,78,90,135). Es posible que también, tal y como se ha reportado en otros estudios, este tipo de compuestos sean importantes en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (44,45,136–141).

3.5.2 Perfilado cromatográfico de los extractos más activos de *Ganoderma lucidum*

3.5.2.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a detector de arreglo de diodos (CLAE-DAD).

Con el fin de aportar en el estudio de los metabolitos responsables de la actividad biológica de los extractos, se implementó el método cromatográfico descrito previamente en la metodología (79). Tal y como se presenta en la figura 3-5, el mismo permitió realizar la separación de las familias de compuestos que son de interés en este tipo de extractos. Se observa que los compuestos de mayor polaridad eluyen en tiempos tempranos y los compuestos con menor polaridad tienen mayores tiempos de retención en la fase estacionaria. Las señales 1, 2 y 3 corresponden a compuestos fenólicos y se encuentran en el rango de 0 a 20 minutos, las siguientes señales 4 y 5 corresponden a compuestos de tipo flavonoide entre los 30 y 40 minutos, del minuto 45 a 60 se observan señales que corresponden a estándares de compuestos terpenoidales tipo esteroles y la señal 9 corresponde a un ácido graso polinsaturado (Ver anexo C). Es posible observar que el método funciona muy bien para los compuestos de alta polaridad como compuestos fenólicos y flavonoides, pero pierde resolución y eficiencia frente a compuestos de baja polaridad, algunos autores sugieren el análisis de estos metabolitos empleando cromatografía HPLC-DAD en fase normal como es el caso de la determinación de vitamina D en suplementos dietarios y formulaciones farmacéuticas (142).

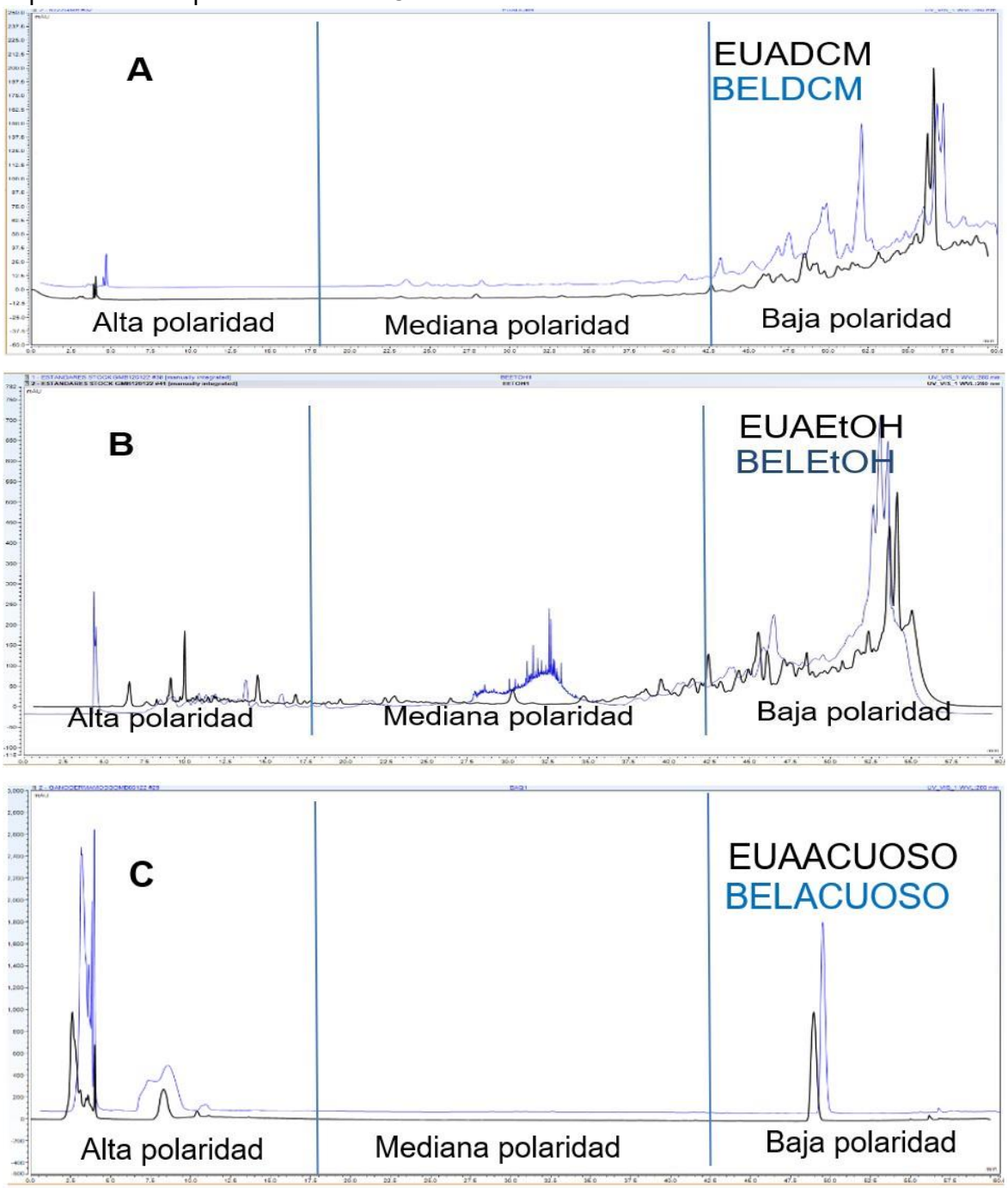
Figura 3-5. Cromatogramas de los estándares empleados para la implementación de un método de CLAE-DAD para el análisis de los extractos obtenidos.



Durante el análisis cromatográfico, se examinaron individualmente las señales cromatográficas de cada estándar y se compararon con el cromatograma de la mezcla de estos, para evitar solapamientos de señales. Además, se consideraron los parámetros de resolución y eficiencia de separación para determinar la calidad cromatográfica de la mezcla. Se estableció que este método cromatográfico podía ser empleado en el análisis de los extractos en DCM, EtOH y acuosos obtenidos de las dos cepas de *G. lucidum*. Es importante mencionar que métodos cromatográficos similares son usados en el análisis de este tipo de compuestos en matrices fúngicas (143).

La figura 3-6 presenta los cromatogramas de los extractos en DCM, EtOH y acuosos, En la figura 3-7 presenta el número de señales promedio integradas con alta resolución (Rs>1,75), selectividad (α≥1) y una apropiada relación señal/ruido (N/S>250), además del promedio del área bajo la curva (144), en las diferentes regiones que fueron establecidas con el empleo de los estándares de metabolitos de diferente naturaleza y polaridad.

Figura 3-6. Cromatogramas de los extractos en DCM (A), EtOH (B) y Acuosos (C) de las dos cepas obtenidos por el método de CLAE-DAD.



La figura muestra los cromatogramas de los extractos en A. DCM, B. EtOH, C. Acuosos para las dos cepas EUA (en color negro) y BEL (en color azul, se observa la rampa de las fases empleadas en el análisis descritas en la metodología y el flujo empleado.

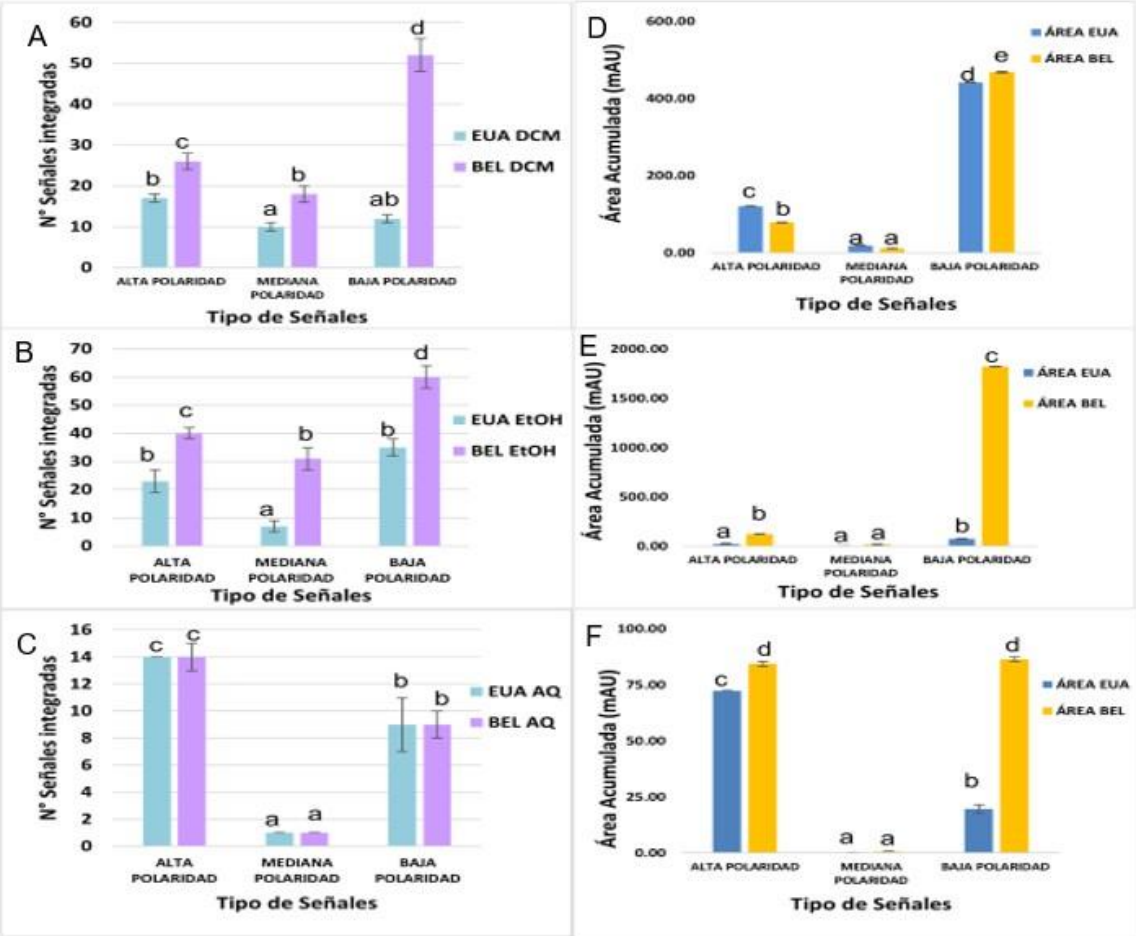
Se observa que los perfiles de los metabolitos para los diferentes extractos de las dos cepas son bastante diferentes, a excepción de los extractos acuosos. Se realizó un análisis de integración y área bajo la curva de las diferentes señales, resultados que corroboran que existe mayor diversidad y abundancia de compuestos de baja y mediana polaridad, que podrían corresponder a flavonoides (media) y triterpenos (baja polaridad). Llama la atención en el extracto etanólico de la cepa de Bélgica (Figura 3-6B) la región entre los 27 y 35 minutos (mediana polaridad), en donde se presenta un número importante de señales no resueltas (No presentan parámetros mínimos de resolución) que podrían corresponder a metabolitos similares a flavonoides. Sin embargo, la presencia de dichas señales no guarda relación con el contenido total de estos compuestos cuantificados mediante empleo de métodos espectrofotométricos (Figura 3-1 A). Es posible que dichas señales correspondan a metabolitos terpenoidales como lo son los ácidos ganodéricos y otros compuestos terpenoidales glicosilados ya que estos tienen mayor polaridad que los esteroles, conservan la estructura de triterpenos y pueden eluir en dicha zona de mayor polaridad (1,5,16,19,24,66,67,72,73,75,77–79,92,93,117,135,145–150).

En la figura 3-7, se representa el número de señales integradas en los cromatogramas en DCM (figura 3-7 A), EtOH (figura 3-7 B), y acuosos (figura 3-7 C) para las dos cepas del hongo *Ganoderma lucidum* en las tres regiones de diferente polaridad, que se pudieron establecer mediante el análisis de los cromatogramas de la figura 3-6. Los resultados revelaron diferencias significativas en la cantidad de señales integradas entre las dos cepas para los extractos en DCM y EtOH, siendo más diverso el número de señales integradas para la cepa de Bélgica frente a la cepa de Estados Unidos. Este comportamiento no se mantiene en el análisis de los extractos acuosos, ya que la diversidad de las señales integradas no evidencia diferencias estadísticamente significativas. Estas diferencias en el número de señales integradas podrían indicar la presencia de compuestos distintos en las cepas en estudio, lo cual podría estar relacionado con su actividad biológica y potencial terapéutico. Es importante recordar que, en la cepa BEL se presenta un importante número de señales de mediana polaridad, que no son incluidas en este análisis debido a que, como se discutió antes, no presentan una adecuada relación señal ruido, selectividad y resolución.

Con el área bajo la curva de las señales integradas en los diferentes extractos DCM, (Figura 3-7 D), EtOH (Figura 3-7 E) y acuoso (Figura 3-7 F) se analizaron las abundancias, evidenciando un comportamiento similar al encontrado en el análisis de la diversidad de las

señales. Se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativas en la abundancia de señales resueltas de mediana polaridad para las dos cepas en los tres diferentes extractos, pero si una mayor abundancia en las señales de alta y baja polaridad en los extractos en DCM y EtOH para la cepa de Bélgica.

Figura 3-7. Señales promedio integradas con alta resolución y selectividad (diversidad) y promedio del área bajo la curva (abundancia) (Ver anexo D).



A. Número de señales promedio integradas a una longitud de onda 254 nm (A extracto en DCM; B Extracto en EtOH; C Extracto Acuoso). Y Áreas promedio acumuladas de las señales integradas (D extracto en DCM; E Extracto en EtOH; F Extracto Acuoso). Las letras indican diferencias estadísticamente significativas empleando un ANOVA con valor $p<0.05$.

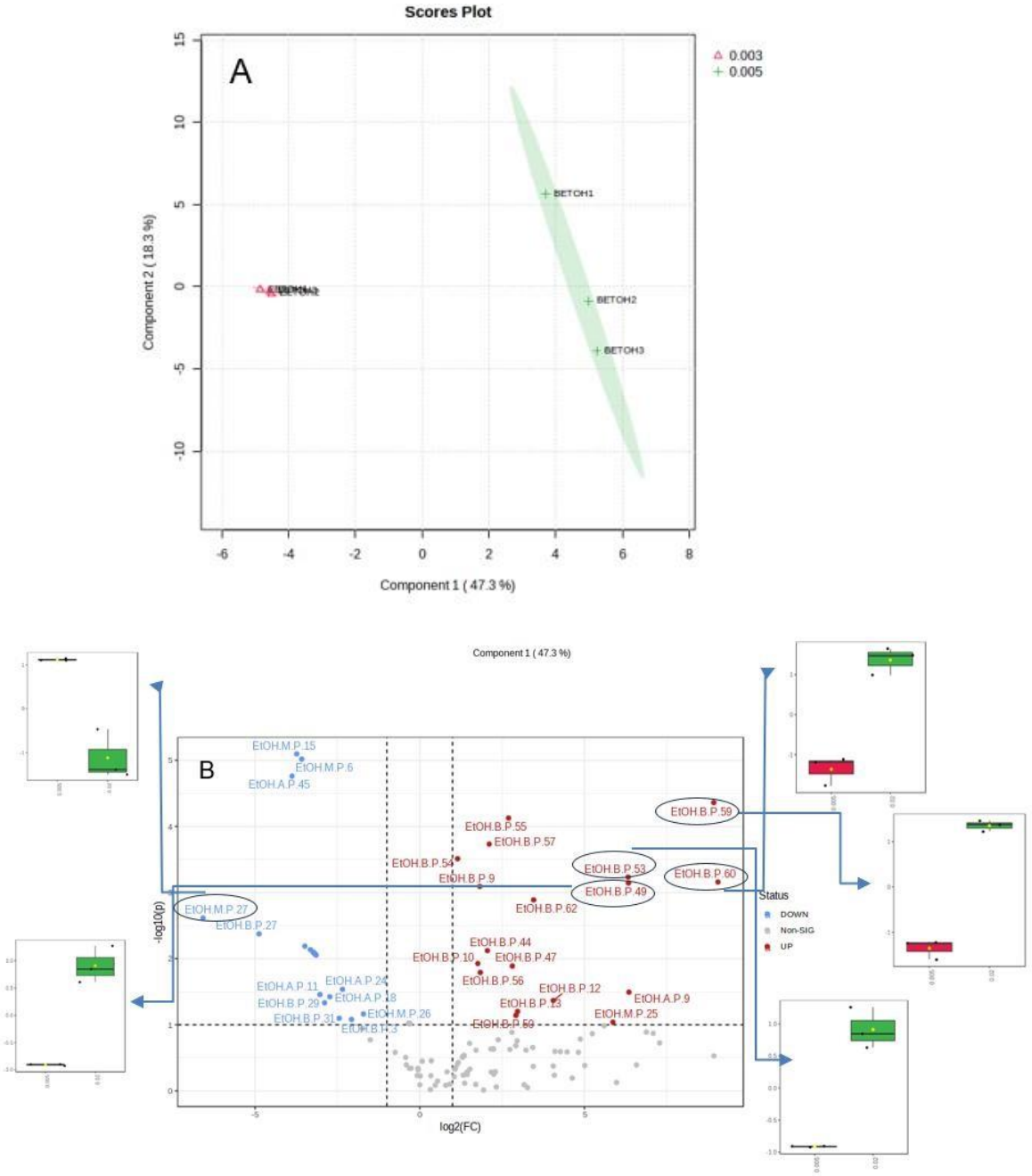
Para tener información de la relación que existe entre las señales integradas por HPLC-DAD y las actividades biológicas en estudio, se realizó un análisis multivariado dirigido PLS-DA. Este permitió mediante un análisis pareado individual con los extractos en EtOH (los extractos más activos) y manteniendo la selección de polaridad establecida previamente, encontrar unos metabolitos posiblemente asociados a las actividades biológicas de estudio. Este análisis

pareado se realizó comparando los valores de abundancia de cada una de las señales integradas entre de las dos cepas (BEL / EUA), las cuales se caracterizaron por presentar los valores diferenciales en términos de las actividades biológicas. Esta aproximación estadística buscaba encontrar cuales podrían ser los potenciales metabolitos relacionados con las diferencias de actividad biológica objeto de estudio entre cepas. Es evidente que esta información debe ser objeto de posterior verificación para cada metabolito, usando otras herramientas analíticas para su purificación y análisis estructural, con posterior verificación de su actividad biológica.

A continuación, se muestran los gráficos del análisis supervisado PLS-DA para la actividad ABTS en el extracto en EtOH (Figura 3-8 A). Los componentes 1 y 2 cubren el 95% de la variación total (VT) de los datos, indicando la presencia de grupos bien definidos en el espacio de dos dimensiones. El componente 1 (45%) permite discriminar de una manera apreciable la separación del comportamiento de las dos cepas en estudio, indicando que la herramienta permitió la diferenciación en función de su respuesta al criterio de la actividad antioxidante ABTS.

Por otro lado, se empleó el diagrama de Volcán para determinar el conjunto de señales responsables de dicha actividad (Figura 3-8 B). Se encontró de las 61 señales totales, 34 son significativas siendo 12 las más representativas de la actividad ABTS, estos datos son resultado del análisis multivariado obtenido del PCA y el score plot (Ver anexo E). Es interesante comentar que el comportamiento descrito para ABTS (Figuras 3-8 A y 3-8 B) es el mismo que se presenta para las otras actividades objeto de estudio (DPPH, AGEs, iPAL y PFRAP). Indicando que posiblemente, dichas actividades biológicas están generadas por los mismos metabolitos. Estos resultados deben ser sujetos a posterior verificación, realizando análisis específicos *in vitro*, con cada uno de los posibles metabolitos purificados.

Figura 3-8. PLSDA y B. Diagrama de volcán para los datos de CLAE-DAD de los extractos en EtOH de las dos cepas, para la actividad ABTS.

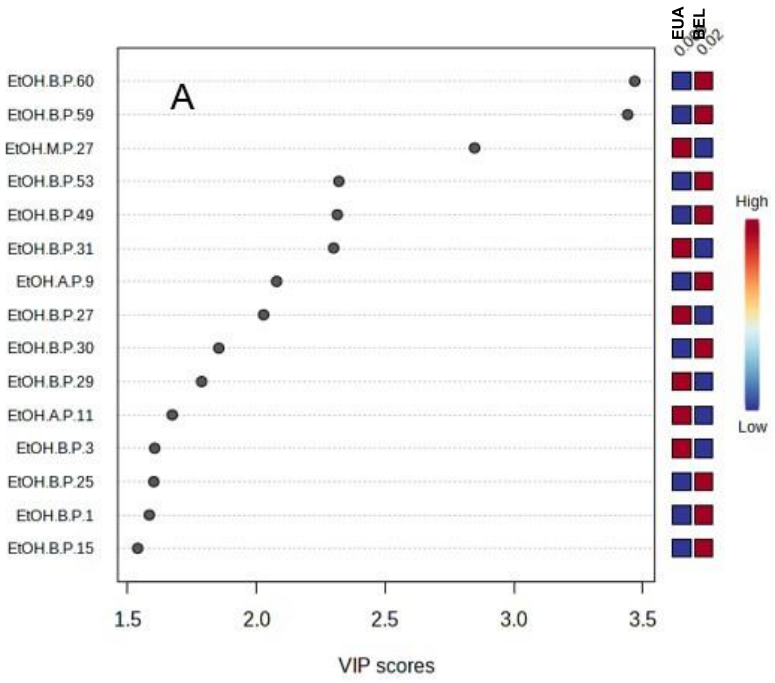


Resultados del análisis de estadístico multivariado. En el gráfico B, los puntos rojos indican una relevancia significativa frente a la actividad evaluada de gran magnitud en el eje x y alta relevancia estadística en el eje y (log10 del valor p). PLSDA (A) Diagrama de volcán (B); frente a las señales cromatográficas integradas en el extracto etanólico por CLAE-DAD, los diagramas de bigotes muestran las concentraciones normalizadas de los 5 metabolitos más relevantes en color rojo para la cepa de EUA y en color verde para la cepa BEL. A.P (Alta polaridad), M.P.

(Mediana polaridad), B.P. (Baja polaridad).

Dentro de los compuestos encontrados como más significativos se encuentran un importante número de metabolitos de baja polaridad, para las diferentes actividades objeto de estudio. Con el fin de tener mayor claridad en las señales más significativas en cuanto a la discriminación durante el análisis estadístico se realizó un análisis de variables de importancia (VIP). Estos resultados se pueden observar en la figura 3-9. Se evidencia que los metabolitos que tienen una mayor relevancia estadística en la discriminación de las dos cepas y posiblemente, en las actividades biológicas objeto de estudio, son principalmente metabolitos de baja polaridad; es decir en la zona en donde se encuentran metabolitos del tipo triterpenoide y posiblemente flavonoides no glicosilados.

Figura 3-9. Gráficos de puntuaciones de Variable de Importancia (VIP).



Los datos representan los metabolitos más significativos (Ver anexo G), (VIP > 0,5) que contribuyen a la actividad antioxidante frente al modelo de captura del radical ABTS*+ 15 compuestos observados en los análisis de modelos PLS-DA realizados con MetaboAnalyst, identificados de los cromatogramas CG-EM los extractos en DCM de las dos cepas. A.P (Alta polaridad), M.P. (Mediana polaridad), B.P. (Baja polaridad).

El papel de los triterpenoides como antioxidantes ha sido previamente discutido. Distintos autores proponen que los terpenoides contienen enlaces dobles carbono-carbono (C=C) conjugados que pueden estabilizar los radicales libres y prevenir la oxidación de otros compuestos. Se ha demostrado que muchos terpenoides tienen una capacidad antioxidante

significativa en diferentes sistemas biológicos. Los triterpenoides aislados de micelio y cuerpos fructíferos de hongos comestibles y medicinales, por ejemplo, tienen efectos antioxidantes en células, animales y humanos. Además, algunos estudios han demostrado que los terpenoides pueden mejorar la actividad antioxidante en células dañadas por estrés oxidativo (18,22,93,151).

Los compuestos terpenoidales y los flavonoides son dos clases importantes de compuestos naturales que se encuentran en plantas y hongos. Aunque estas dos clases de compuestos tienen estructuras químicas diferentes, los compuestos terpenoidales son compuestos que se derivan del isopreno y que tienen una estructura alifática. En contraste, los flavonoides son compuestos polifenólicos que consisten en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres átomos de carbono, A pesar de sus diferencias estructurales, ambos grupos de compuestos muestran actividad biológica (18,22,98,127,128).

De acuerdo con los resultados del presente estudio, dichos metabolitos posiblemente pueden ser los que determinan la actividad antioxidante y anti AGEs encontrada. Es por ello por lo que con el fin de obtener más información estructural del tipo de moléculas que serían responsables de los beneficios estudiados, y basados en estudios previos dentro del grupo de investigación de química de hongos macromicetos colombianos (80,152), se realizó un perfilado de metabolitos por CG-MS de los extractos para las dos cepas objeto de estudio. Sin duda esta herramienta analítica es la más adecuada para el análisis de dichas moléculas de baja polaridad (1,115,153). Se espera en próximos estudios, realizar un análisis por HPLC-HRMS con el fin de tener información estructural especifica de los metabolitos de interés con importancia estadística en este estudio.

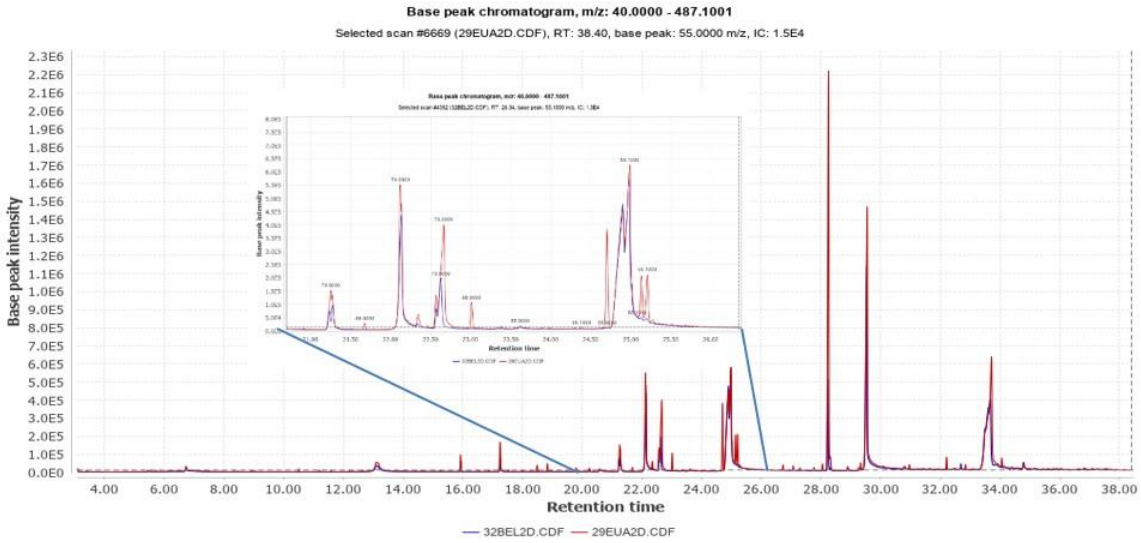
Para el análisis de CG-MS, con fines comparativos, se analizaron en primer lugar los extractos en DCM de las dos cepas objeto de estudio EUA y BEL. Esto con el fin de obtener información de los compuestos de baja polaridad presentes en dichos extractos y obtener información complementaria de la actividad biológica; no se debe olvidar que con DCM también se presentó la extracción de metabolitos con actividad biológica (Capitulo 2). Posteriormente, solo con la cepa de origen belga (más activa en el estudio), se llevó a cabo un análisis comparativo usando CG-MS, entre el extracto de DCM y el etanólico, para este último, fue necesario secar y posteriormente resuspender en DCM. Esta última comparación, permitiría encontrar aquellos metabolitos de baja polaridad que están presentes en el extracto etanólico y

que posiblemente son responsables de la potencial capacidad antioxidante e inhibitoria de AGEs.

3.5.2.2 Cromatografía de gases acoplada a detector de espectrometría de masas (CG-EM)

En la figura 3-10, se comparan los cromatogramas de los extractos en DCM para las dos cepas objeto de estudio. En general este análisis permitió, mediante la comparación con las bases de datos NIST 17 y la base de datos colaborativa GNPS, anotar dentro del extracto 55 metabolitos, todos ellos con un % de identidad superior del 70% y en algunos de los casos, un patrón de fragmentación coincidente con lo reportado para cada metabolito (anotación a nivel 3 de acuerdo con la MSI Metabolomics Standard Initiative) (118). Estos valores son los esperados para este tipo de análisis y son coincidentes con estudios previos del grupo de investigación en Hongos Macromicetos (80,152). Como se presenta en el anexo G, a cada metabolito se le asigno con un número de 3 cifras que incluye información estructural sobre el tipo de metabolito (i.e. Alcano, ácido graso, etc), subgrupo (i.e. monoterpeno, sesquiterpeno, etc) y el orden de aparición en el cromatograma (Anexo G).

Figura 3-10. Cromatogramas CG-EM de los extractos en DCM para las cepas de Bélgica (color azul) y Estados Unidos (color rojo).

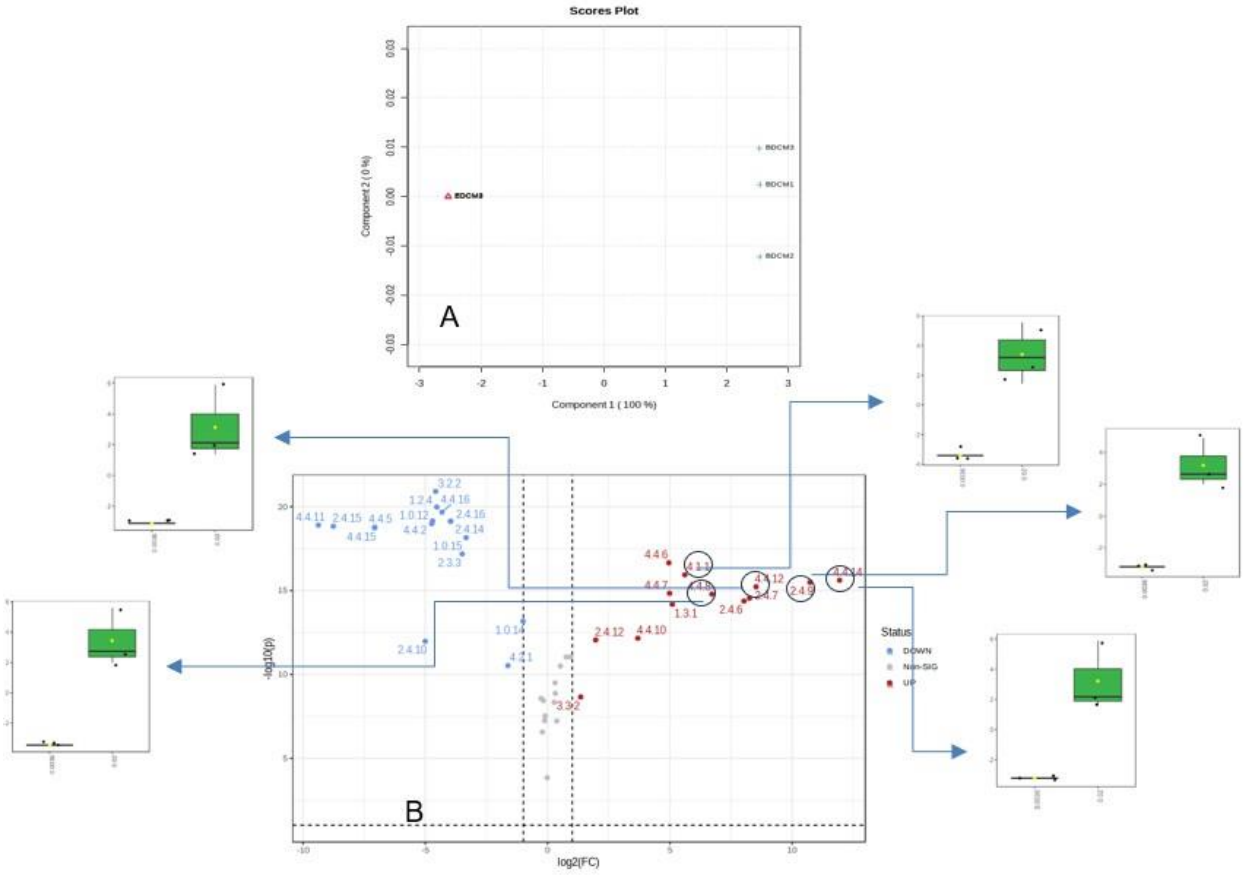


Los perfiles de los extractos en DCM de las dos cepas son bastante similares, sin embargo, presentan entre otros, diferencias en la región entre los 21 y 27 minutos; esta región es rica entre otros, de ácidos grasos y derivados de ácidos grasos (Ver anexo G).

Con el fin de realizar un análisis más específico del efecto de los metabolitos identificados tentativamente por CG-EM, sobre las actividades biológicas en estudio, se realizó un análisis dirigido del tipo PLS-DA, este dará información de los metabolitos diferenciales entre los extractos en DCM de las dos cepas, realizando una categorización arbitraria (Ver anexo G). A continuación, se muestran los gráficos de este análisis en la figura 3-11 para la actividad ABTS para los extractos en DCM. Se evidencia que, en el PCA, el componente 1 explica el 100% de la varianza total (VT) de los datos, indicando la presencia de grupos completamente definidos en el espacio de dos dimensiones. Por lo tanto, el componente 1 (94,5%) es suficiente para discriminar el comportamiento de las dos cepas en estudio. En este caso se empleó el diagrama de Volcán para determinar las señales responsables de la discriminación y por tanto posiblemente determinantes de las actividades en estudio de manera individual.

Para este caso en la figura 3-11 B se evidencia en el diagrama de volcán que, de las 32 señales totales, 19 son significativas, siendo 12 las más representativas de la actividad ABTS, estos datos son resultado del análisis multivariado obtenido del PCA y el score plot, (Ver anexo E). Es interesante comentar que el comportamiento descrito para ABTS (figuras 3-11 A y 3-11 B) es el mismo que se presenta para las otras actividades objeto de estudio (DPPH, AGEs, IPAL y PFRAP).

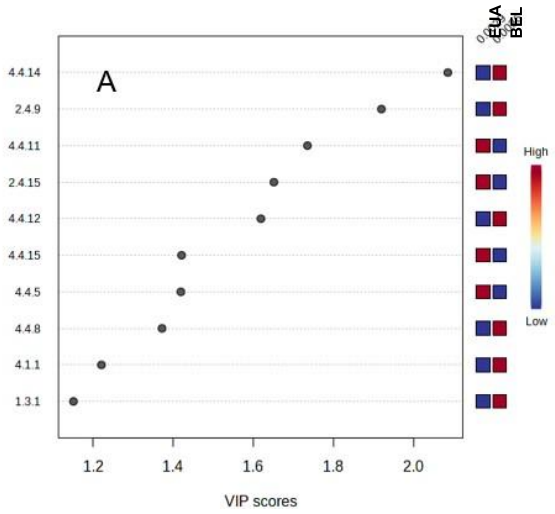
Figura 3-11. A. PLSDA y B. Diagrama de volcán para los datos de CG-EM de los extractos en DCM de las dos cepas, para la actividad ABTS.



Resultados del análisis de estadístico multivariado. En el gráfico B, los puntos rojos indican una relevancia significativa frente a la actividad evaluada de gran magnitud en el eje x y alta relevancia estadística en el eje y (log10 del valor p). PLSDA (A) Diagrama de volcán (B); frente a las señales cromatográficas integradas en el extracto en DCM por CG-EM, los diagramas de bigotes muestran las concentraciones normalizadas de los 5 metabolitos más relevantes en color rojo para el extracto en DCM cepa de EtOH y en color verde extracto en DCM para la cepa BEL.

Con el fin de tener mayor claridad en las señales más significativas en cuanto a la discriminación entre las dos cepas se realizó un análisis de variables de importancia (VIP). Estos resultados se pueden observar en la figura 3-12. Se evidencia que los metabolitos que tienen una mayor relevancia estadística en la discriminación de las dos cepas son variados y solo algunos de ellos, al presentarse en la cepa BEL son posiblemente, los relacionados con la actividad biológica.

Figura 3-12. Gráficos de puntuaciones de Variable de Importancia (VIP).



Los datos representan los metabolitos más significativos (Ver anexo G), (VIP > 0,5) que contribuyen a la actividad antioxidante frente al modelo de captura del radical ABTS*+ (A) 10 compuestos observados en los análisis de modelos PLS-DA realizados con MetaboAnalyst, identificados de los cromatogramas CG-EM los extractos en DCM de las dos cepas.

De acuerdo con este análisis, los metabolitos importantes son (4.4.14 acetato de Neoergosterol; 2.4.9 Ester etílico del ácido linoleico, 4.4.2 Sitostanol, 4.4.8 Ergosterol y 4.4.1 Isopulegol), los cuales corresponden a compuestos de la familia triterpenoidal y un ester de ácido graso.

Tabla 3-1. Metabolitos con mayor importancia para la discriminación estadística identificados mediante el análisis de VIPs, presentes en el extracto en DCM de la cepa de BEL.

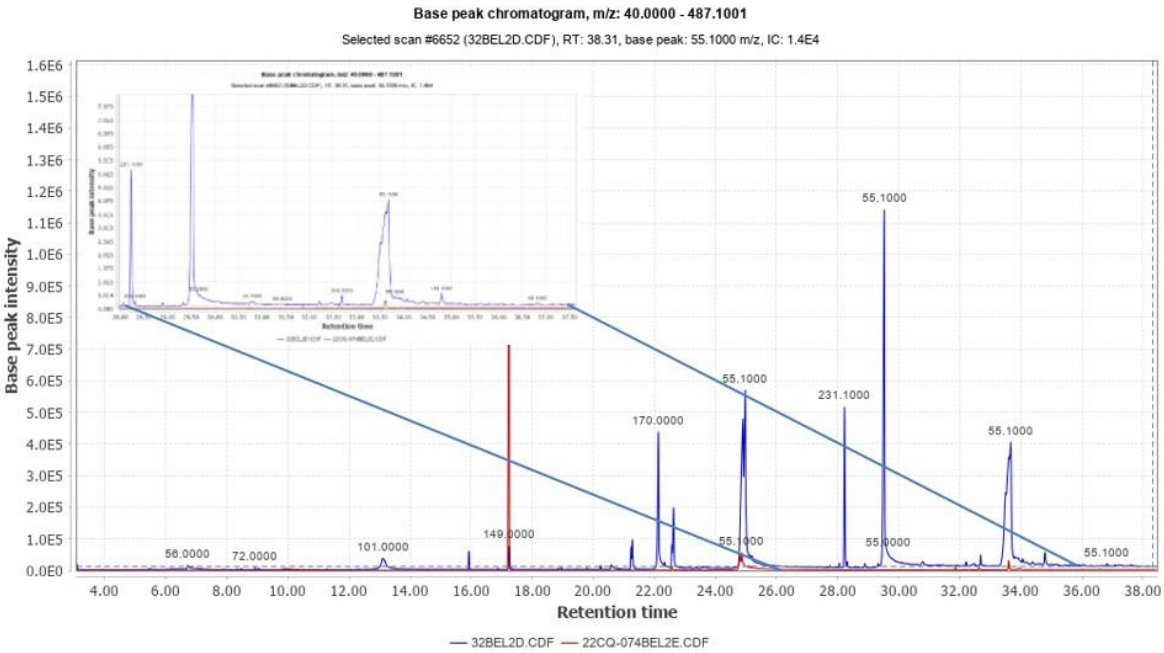
ID, DEF	***Nombre***	***m/Z***	***Formula***	***Referencia***
4.4.14	*Acetato de Neoergosterol,*	*456,83*	$C_{29}H_{42}O_2$	(147)
2.4.9	*Ester etílico del ácido linoleico*	*312,47*	$C_{15}H_{26}O$	(148)
4.4.12	*Sitostanol*	*416,73*	$C_{29}H_{52}O$	(147)
4.4.8	*Ergosterol*	*394,71*	$C_{28}H_{44}O$	(111)
4.1.1	*Isopulegol*	*154,29*	$C_{10}H_{18}O$	(149)

Como era de esperarse estos metabolitos presentan baja polaridad y de acuerdo con la revisión bibliográfica realizada presentan actividad antioxidante reportada (última columna

Tabla 3-2). Esto sugiere que efectivamente dichos metabolitos pueden ser los responsables de la actividad encontrada en la presente investigación, en la cepa BEL cultivada en nuestro país.

Al analizar el comportamiento de los extractos en DCM y EtOH de esta misma cepa BEL (extractos con el mejor conjunto de actividades) por CG-EM (figura 3-13), se encontró que el extracto en DCM, como era de esperarse, presentó una mayor diversidad y abundancia de señales, debido a la polaridad y naturaleza de los compuestos presentes. Sin embargo, se encontró también que es posible que por cosolubilidad en el extracto etanólico exista la presencia de este tipo de compuestos (157), (ver anexo G).

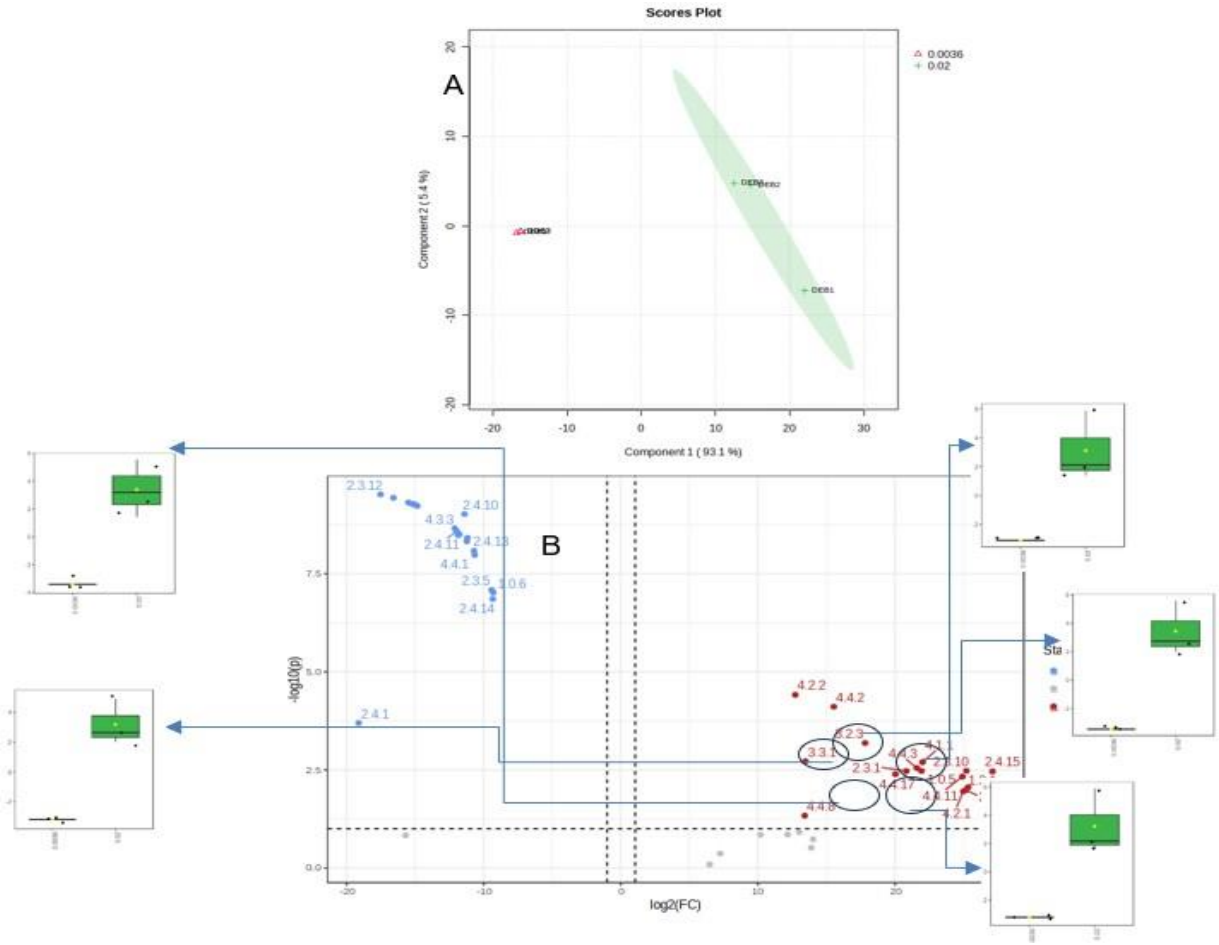
Figura 3-13. Cromatogramas CG-EM de los extractos en DCM (color azul) y EtOH (color rojo) para la cepa de Bélgica.



Se realizó un análisis estadístico multivariado dirigido PLS-DA, buscando tener una idea aproximada de los metabolitos responsables de la actividad, presentes en estos extractos etanólicos de la cepa BEL; esto considerando que presentaban la más alta actividad en este estudio. A continuación, en el PCA que se presenta en la figura 3-14 A
(Actividad ABTS para los extractos en DCM y EtOH de la cepa BEL), los componentes 1 y 2 cubren el 95% de la variación de los datos, indicando la presencia de grupos bien definidos en el espacio de dos dimensiones. El componente 1 (93%) permite discriminar de una manera notoria la separación del comportamiento de las dos cepas en estudio. En este caso se empleó

el diagrama de Volcán para determinar el perfil de señales responsables de las distintas actividades en estudio de manera individual. El comportamiento del PLSDA para las otras actividades objeto de estudio, (DPPH, AGEs, IPAL y PFRAP) frente a los extractos en DCM y EtOH de la cepa de BEL, es el mismo.
(ver anexo F).

Figura 3-14. A. PLSDA Diagrama de volcán para los datos de CG-EM de los extractos en DCM y EtOH de la cepa BEL, para la actividad ABTS.

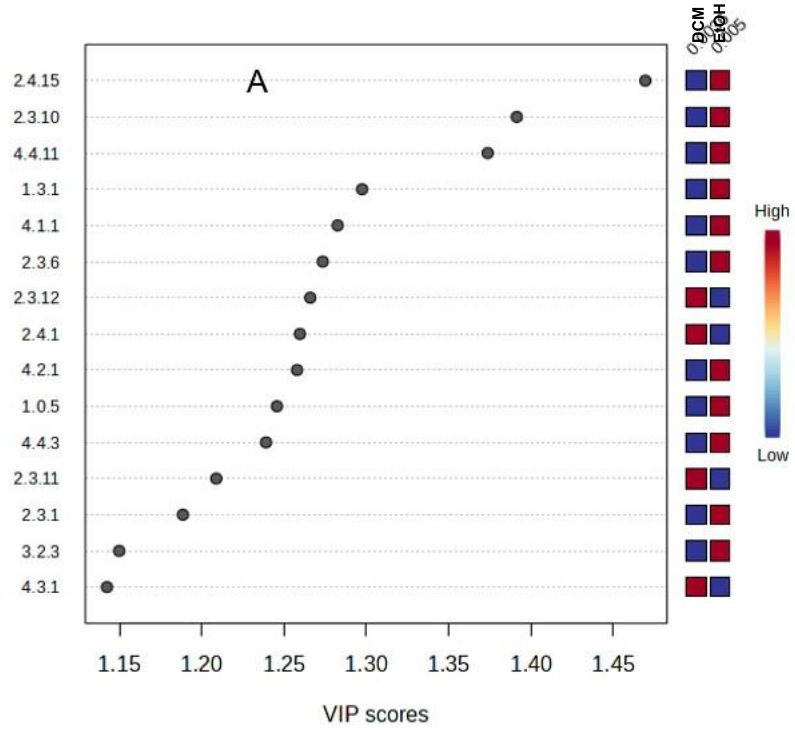


Resultados del análisis de estadístico multivariado. PLSDA (A) Diagrama de volcán (B); frente a las señales cromatográficas integradas en el extracto en DCM por CG-EM. En el gráfico B, los puntos rojos indican una relevancia significativa frente a la actividad evaluada de gran magnitud en el eje x y alta relevancia estadística en el eje y (-log10 del valor p)., los diagramas de bigotes muestran las concentraciones normalizadas de los 5 metabolitos más relevantes en color rojo para el extracto en DCM cepa de BEL y en color verde extracto en EtOH cepa BEL.

La comparación de los resultados presentados en la Figura 3-14, para los compuestos anotados por CG-EM (ver anexo G) permite señalar 15 compuestos que tienen una contribución

significativa en la discriminación de las clases o grupos. En el análisis de VIP, se presentan aquellos metabolitos principales en la discriminación (Figura 3-15), allí se encuentran los metabolitos 2.4.15 Ácido heptadecanoico, 2.3.10 Eicosanoato de metilo, 4.4.11 β-sitosterol, 1.3.1 Octacosanol y 4.1.1. Isopulegol. Los cuales corresponden a triterpenoides, derivados de ácidos grasos, y un alcohol. Estos metabolitos se encuentran principalmente en el extracto etanólico y por tanto pueden estar asociados a las actividades objeto de estudio (45,68,69,111,112).

Figura 3-15. Gráficos de puntuaciones de Variable de Importancia (VIP).



Los datos representan los 15 metabolitos (Ver Anexo F) más significativos (VIP > 0,5) que contribuyen a la actividad antioxidante frente al modelo de captura del radical ABTS*+ observadas en los análisis de modelos PLSA realizados con MetaboAnalyst, identificados de los cromatogramas CG-EM los extractos etanólicos y en DCM de la cepa de Bélgica.

Los compuestos que se identificaron por este análisis presentan actividad biológica reportada en algunos casos, siendo reportados también en esta clase de organismos.

Tabla 3-2. Metabolitos identificados mediante el análisis de VIPs, presentes en el extracto en DCM de la cepa de BEL.

ID, DEF	*Nombre*	*m/Z*	*Formula*	*Referencia*

2.4.15	*Ácido heptadecanoico*	*284,43*	$C_{17}H_{34}O_2$	(151)
2.3.10	*Ácido palmitoleico*	*254,43*	$C_{16}H_{30}O_2$	(151)
4.4.11	*B-sitosterol*	*414,71*	$C_{29}H_{50}O$	(152)
1.3.1	*Octacosanol*	*410,72*	$C_{28}H_{58}O$	(153)
4.1.1	*Isopulegol*	*154,29*	$C_{10}H_{18}O$	(149)

Los resultados encontrados guardan relación con reportes sobre la actividad antioxidante del β-sitosterol, el cual ha demostrado ser efectivo en la eliminación de especies radicales en estudios previos (114,152). En dicho estudio, se logra la identificación de estos compuestos en una fracción etanólica del extracto en acetato de etilo obtenida del hongo *Ganoderma lucidum*, confirmando que la presencia de compuestos con estructura tipo ergosterol en los hongos guarda una relación con su capacidad antioxidante. (90,114).

La presente investigación permite comparar por primera vez, dos cepas de hongos cultivados tradicionalmente en condiciones industriales en nuestro país. Esto se consiguió gracias a la aplicación de herramientas metabolómicas, las cuales permiten hacer este tipo de estudio con la consistencia estadística adecuada, encontrándose metabolitos con actividades biológicas reportadas, principalmente antioxidante (92,99,100). Por otro lado, el presente estudio se posiciona como el primero de actividad anti-AGEs reportado para extractos de hongos macromicetos; siendo así un importante avance en la investigación de compuestos naturales con potencial terapéutico para el tratamiento y prevención de enfermedades relacionadas con la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs).

3.6 Conclusiones

Los extractos etanólicos del cuerpo fructífero de las dos cepas de *Ganoderma lucidum* analizadas representan una valiosa fuente de compuestos bioactivos, especialmente

compuestos triterpenoidales, ácidos grasos y derivados de ácidos grasos, que exhiben propiedades antioxidantes e inhibitoria de productos avanzados de glicación

(AGEs).

Se observa que el contenido de compuestos triterpenoidales podría considerarse como un parámetro relevante en la selección de materias primas provenientes de hongos comestibles y medicinales. Estos resultados indican las posibilidades que tiene el cuerpo fructífero del hongo de la cepa BEL, para el desarrollo de alimentos funcionales enfocados en la capacidad antioxidante y anti-AGEs.

4 Purificación y caracterización parcial de una lectina presente en *Ganoderma lucidum.*

4.1 Resumen

En este capítulo, se estudiaron las propiedades bioquímicas de las lectinas presentes en el hongo *Ganoderma lucidum*. Aunque se han investigado las lectinas de plantas y animales, los estudios relacionados en hongos macromicetos son pocos; no se conoce completamente el potencial de dichas proteínas en la industria de alimentos y biotecnología. Es por ello por lo que se llevó a cabo la purificación y caracterización parcial de una de estas proteínas, a partir del cuerpo fructífero de la cepa BEL; el conocimiento de sus propiedades moleculares es fundamental para determinar su potencial para diferentes aplicaciones. La extracción de la proteína se realizó usando tratamiento previo del cuerpo fructífero con acetona para la eliminación de pigmentos interferentes, extracción en buffer y posterior precipitación con sulfato de amonio en el rango del 0 al 30%. Los ensayos de inhibición de aglutinación con carbohidratos revelaron que las lectinas reconocían principalmente la D-lactosa. Además, se observó que la lectina aglutinaba preferentemente los glóbulos rojos de tipo A humano y eritrocitos de caballo. El precipitado con sulfato de amonio fue dializado y purificado utilizando un método cromatográfico de afinidad. Esta proteína se caracterizó como una proteína con un peso molecular de 12 kDa según la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Además, presentó un punto isoeléctrico ácido de 4.4 y una alta estabilidad en un rango de pH de 7,4-11, así como temperaturas entre 20°C y los 50°C. Los resultados encontrados evidencian el potencial que tiene el hongo *G. lucidum* para la producción de lectinas con potencial uso en la industria de alimentos.

4.2 Abstract

In this chapter, the biochemical properties of lectins present in the fungus *Ganoderma lucidum* were studied. Although lectins from plants and animals have been investigated, related studies in macromycete fungi are few; the potential of these proteins in the food and

biotechnology industry is not fully known. Therefore, the purification and partial characterization of one of these proteins from the fruiting body of strain BEL was carried out; knowledge of its molecular properties is fundamental to determine its potential for different applications. Protein extraction was performed using pretreatment of the fruiting body with acetone for removal of interfering pigments, extraction in buffer and subsequent precipitation with ammonium sulfate in the range of 0 to 30%. Carbohydrate agglutination inhibition assays revealed that the lectins recognized mainly D-lactose. In addition, the lectin was observed to preferentially agglutinate human type A red blood cells and horse erythrocytes. The ammonium sulfate precipitate was dialyzed and purified using an affinity chromatographic method. This protein was characterized as a protein with a molecular weight of 12 kDa according to polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). In addition, it presented an acidic isoelectric point of 4.4 and a high stability in a pH range of 7.4-11, as well as temperatures between 20°C and 50°C. The results obtained show the potential of the fungus *G. lucidum* to produce lectins with potential use in the food industry.

4.3 Introducción

La caracterización molecular de lectinas es de gran importancia debido a su amplia gama de funciones biológicas y su potencial aplicabilidad en diversos campos. Estas proteínas tienen la capacidad de reconocer y unirse específicamente a carbohidratos, lo que las convierte en herramientas valiosas para el estudio de interacciones moleculares, la identificación de estructuras de carbohidratos y la comprensión de procesos biológicos fundamentales. La caracterización de lectinas permite determinar su especificidad de unión a diferentes azúcares y carbohidratos, lo que proporciona información crucial sobre las interacciones celulares y los mecanismos de reconocimiento molecular (17,31,53,60,91).

Además, las lectinas han demostrado poseer propiedades bioactivas, como la capacidad de aglutinación de células, la actividad antimicrobiana, antitumoral y antiinflamatoria (17). Por lo tanto, su caracterización no solo contribuye al conocimiento fundamental de estas proteínas, sino que también abre la puerta a su aplicación en diversos campos, como la medicina, la biotecnología y la industria alimentaria (51,53). Por ejemplo, la identificación de las propiedades específicas de una lectina puede permitir su uso en el diagnóstico de enfermedades, la detección de patógenos o la modulación de respuestas inmunológicas. Además, las lectinas también pueden desempeñar un papel importante en la mejora de

procesos industriales, como la clarificación de jugos o la producción de alimentos funcionales (4,31,49,51).

La caracterización estructural y funcional de proteínas requiere de procesos de aislamiento y purificación que permitan eliminar interferentes que afectan las técnicas de caracterización bioquímica. La cromatografía en columna abierta se ha utilizado ampliamente para separar y purificar proteínas, aprovechando las diferencias en propiedades como forma, carga y actividad biológica. Técnicas como cromatografía de afinidad, se han convertido en herramientas esenciales en el estudio de este tipo de proteínas (161,162).

En el proceso de purificación, es crucial contar con un extracto inicial que contenga la proteína de interés en su forma nativa y funcional, para realizar un seguimiento preciso durante la purificación. En el caso de las lectinas, el seguimiento se realiza mediante la aglutinación con carbohidratos que permitan realizar la medición de la actividad (3,31,60,91). Es necesario el empleo de técnicas como electroforesis e inmunoquímica utilizando anticuerpos, como alternativas para el seguimiento de la purificación (162).

Procesos como precipitación con sulfato de amonio, ultrafiltración o precipitación con solventes orgánicos permiten concentrar los extractos proteicos y fracciones parcialmente purificadas generadas durante el proceso. Estas técnicas de separación y concentración de proteínas han demostrado ser eficientes en la purificación de diversos tipos de proteínas. Sin embargo, es importante evaluar su uso para cada proteína, a fin de determinar posibles procesos de desnaturalización que puedan resultar en pérdida de actividad biológica (162).

Es por ello por lo que, en la presente etapa de la investigación, con el fin de caracterizar la actividad aglutinante previamente descrita en el micelio del hongo *G. lucidum* (capitulo 2), se realizó inicialmente la selección de un buffer que permitiera la mayor extracción de la proteína objeto de estudio. Posteriormente, usando diferentes herramientas bioquímicas, se realizó la purificación y caracterización parcial de una lectina presente en el cuerpo fructífero de la cepa BEL. Esta parte del estudio se realizó en un trabajo conjunto con el Grupo de investigación en proteínas (GRIP) del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia. La información encontrada es fundamental para entender el potencial que tiene el cultivo biotecnológico bajo condiciones industriales, para la producción de hongos macromicetos

productores de lectinas, no solo para la industria de alimentos, si no para diferentes fines biotecnológicos.

4.4 Materiales y Métodos.

4.4.1 Selección de condiciones para la extracción de lectinas

De acuerdo con el trabajo previamente descrito en el numeral 2.4.4. se seleccionaron unas condiciones para la extracción de proteínas en los ensayos de “screening” de la actividad aglutinante. Sin embargo, era necesario determinar unas condiciones que permitieran realizar la mayor extracción posible de las proteínas de interés manteniendo su actividad biológica. Es por ello por lo que se compararon en términos de la actividad aglutinante, los dos buffers de extracción previamente descritos en el capítulo 2 (PBS 50 mM con tiourea 3mM y PBS con la adición de polivinilpolipirrolidona (PVPP) 0,1% v/v, cloruro de sodio (NaCl) 1M, tiourea 3mM y ácido ascórbico 0,01% v/v). En este caso la comparación se realizó determinando el correspondiente título de aglutinación para las dos cepas de interés EUA y BEL, en los extractos obtenidos usando los buffers propuestos. Estos han sido usados para la extracción de proteínas con actividad biológica a partir de diferentes matrices biológicas (96,163).

4.4.2 Determinación de los títulos de aglutinación

Los títulos de aglutinación se determinaron realizando diluciones secuenciales del extracto crudo de proteína y cuantificando el contenido de proteína según se describe en el numeral 2.4.5. En este punto se compararon los promedios de dos réplicas de los títulos de aglutinación para las dos cepas con las diferentes disoluciones extractantes evaluadas.

4.4.3 Evaluación de la inhibición de la actividad aglutinante

Se determinó la inhibición de la actividad aglutinante frente a cuatro soluciones de carbohidratos diferentes; Glucosa 0,1 M; Galactosa 0,1 M, Manosa 0,1 M y Lactosa 0,1 M. Estos resultados serían esenciales para el proceso de purificación por afinidad que se describirá más adelante. Para ello se prepararon soluciones en PBS 50mM con diluciones secuenciales, con el fin de establecer la cantidad mínima necesaria de cada carbohidrato para lograr la inhibición de la aglutinación. Se utilizaron en este punto, extractos de las dos cepas obtenidos con el buffer de extracción previamente seleccionado en la fase anterior.

4.4.4 Purificación parcial de la lectina

Para realizar la purificación de la lectina, se realizó la obtención del extracto usando la cepa y el buffer que generaron los mejores resultados en términos de título y de inhibición de aglutinación. Se emplearon técnicas de purificación como el "*salting out*" mediante la precipitación con sulfato de amonio y la cromatografía de afinidad, usando para ello un soporte generado con el azúcar que presentó la inhibición en los ensayos previos.

4.4.4.1 Precipitación son sulfato de amonio

Al extracto crudo de proteína obtenido se le realizó precipitación con $(NH_4)2SO_4$ a 4°C en cuarto frio durante 24 horas consiguiendo una saturación del 30%, luego se centrifugo la muestra a 9000 rpm 4°C por 30 minutos, el *pellet* recuperado se resuspendió en PBS 50 mM y se colocó en membranas de diálisis para realizar cambios frente a un volumen de 1L de agua Mili Q (dos cambios en total) y por ultimo frente a un buffer NH_4HCO_3 para ultracongelar y liofilizar, el contenido liofilizado fue resuspendido nuevamente en PBS 50mM(162).

4.4.4.2 Cromatografía de afinidad

El material dializado se sembró en un soporte de Sepharosa B modificada con acople de lactosa sobre divinilsulfona y bloqueando los lugares no acoplados con βmercaptoetanol, la cantidad de proteína que se colocó en el soporte fue de 3,87 mg sobre 3mL del soporte. Se realizaron cuatro eluciones cambiando el buffer de elución con las siguientes características: 1. Fase de acondicionamiento con PBS 50mM pH 7,2; 2. Primera elución de la fracción retenida con PBS 50mM pH 7,2 + Lactosa 0.3M; 3. Segunda elución de la fracción retenida con un buffer Glicina-HCl pH 3.01; 4. Tercera elución de la fracción retenida con un buffer Tris-HCl pH 10.02 (164). Cada conjunto de fracciones que contenían proteína, fueron dializados frente a dos cambios de agua destilada y desmineralizada y 2 cambios de buffer NH_4HCO_3 para ultracongelar y liofilizar, finalmente se redisolvió el contenido de proteína en 1mL de PBS 50 mM y se realizó una cuantificación de la proteína presente en cada fracción colectada mediante el método de Bradford y evaluación de la actividad aglutinante, de acuerdo con las condiciones previamente descritas en el numeral 2.4.8. (Capitulo 2).

4.4.5 Seguimiento de la purificación de la lectina

Para el seguimiento de la purificación de la lectina responsable de la actividad aglutinante, se determinó la Absorbancia a longitudes de onda de 220nm y 280nm. Así mismo, las fracciones que presentaron proteína fueron evaluadas en términos de su actividad aglutinante en placas de aglutinación de acuerdo con las condiciones previamente descritas. Se llevó a cabo seguimiento del proceso de purificación, mediante análisis de actividad de acuerdo con una escala cualitativa de aglutinación, contenido de proteína por el método de Bradford (Capitulo 2), actividad específica y veces de purificación (60,62,151). Para ello se realizó el cálculo de la actividad como el reciproco del título de aglutinación (61). Así mismo, se realizó análisis electroforético de las diferentes fracciones obtenidas.

4.4.6 Separación electroforética

4.4.6.1 SDS-PAGE

Se realizó la determinación de los perfiles proteicos durante la purificación de los extractos mediante electroforesis en condiciones denaturantes y reductoras. Para ello, se utilizaron geles discontinuos de poliacrilamida en formato de 7 cm, con un porcentaje de gel concentrador del 4,8% y un gel separador del 10%, en condiciones reductoras con βmercaptoetanol. La electroforesis se realizó a corriente constante (13 mA para el gel de concentración y 18 mA para el gel separador), utilizando el equipo mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, California, USA). El buffer de corrido empleado consistió en Tris base 25 mM, glicina 0,2 M y SDS 0,1% p/v.

En cada pozo de los geles se cargaron 20 µg de proteína obtenida de los extractos analizados. Para la asignación de pesos moleculares, se utilizaron los marcadores de peso molecular de Bio-Rad®. La visualización de las proteínas separadas se llevó a cabo mediante tinción con Comassie y se utilizó el equipo Gel Doc™ EZ System de Bio-Rad®.
(83,162).

4.4.6.2 Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque se llevó a cabo utilizando geles de poliacrilamida al 10% en un rango de pH entre 3 y 10 usando las condiciones descritas en (81,165,166) El gel fue sometido a un acondicionamiento a 100V durante 1 hora. A continuación, se aplicó la muestra en el gel y se procedió a la separación por punto isoeléctrico, utilizando diferentes voltajes en distintos

intervalos de tiempo. Para la corrida, se utilizaron soluciones de NaOH y CH_3COOH 20mM en el cátodo y ánodo, respectivamente.

La asignación de los puntos isoeléctricos se realizó mediante la comparación de los resultados obtenidos con patrones de IEF. Además, se realizó la tinción correspondiente y se evaluó el punto isoeléctrico de las lectinas mediante una curva construida con los patrones utilizados (162).

4.4.7 Evaluación del efecto la temperatura y el pH sobre la actividad aglutinante

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la aglutinación, la fracción purificada (retenida en el soporte de Sepharosa 4B-Lactosa) se incubó a 4ºC, 20ºC, 37ºC, 50ºC, 60ºC, 70ºC, 80ºC y 90°C. Posteriormente, se agregó una suspensión de eritrocitos de caballo al 2%, se dejó que la interacción ocurriera durante 1 hora y se evaluó la correspondiente de aglutinación. La evaluación del efecto del pH se realizó mediante la resuspensión de la fracción retenida en el soporte de Sepharosa 4B-Lactosa en varios buffers con diferentes valores de pH: Buffer A: Glicina-HCl pH 3.0, Buffer B: Citrato-fosfatos pH 5.0, Buffer C: Fosfatos PBS pH 6.5, Buffer D: Fosfatos PBS pH 7.4, Buffer E: Tris-HCl pH 9.5, Buffer F: Carbonatos pH 11.0 y Buffer E: Tris-OH pH 12.0. Luego, se agregó la suspensión de eritrocitos de caballo al 2% y se dejó que la interacción ocurriera durante 1 hora. Finalmente, se evaluó la aglutinación de manera cualitativa. Estos experimentos permitieron determinar los efectos de la temperatura y el pH en la interacción entre la proteína purificada y los eritrocitos de caballo. La concentración de proteína en cada ensayo mencionado se ajustó a la hallada previamente, en los títulos de aglutinación del extracto crudo.

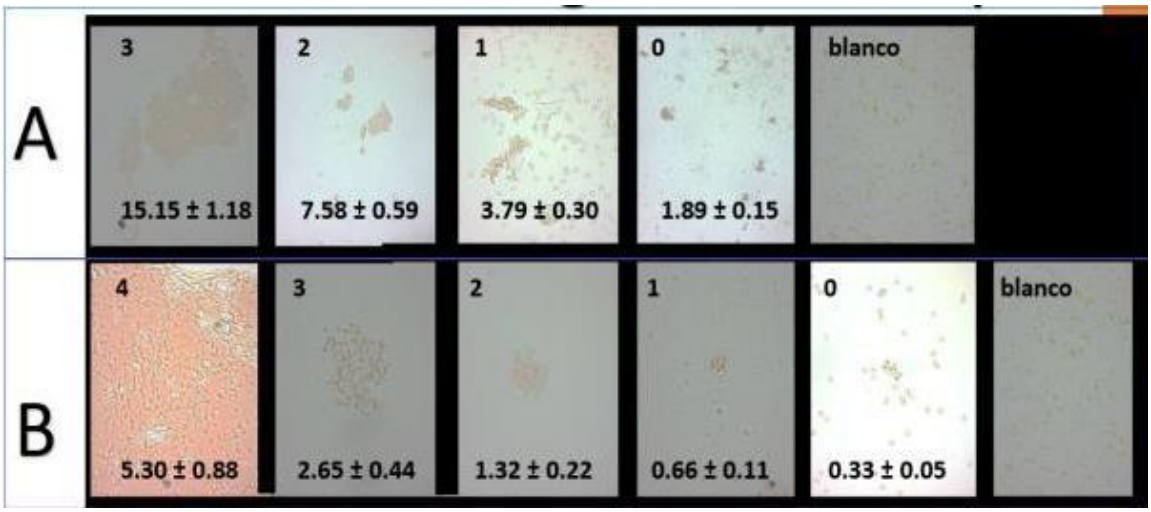
4.5 Resultados y Discusión

4.5.1 Selección del buffer de extracción de proteínas, títulos e inhibición de la aglutinación

Se determinaron los títulos de aglutinación de los extractos obtenidos con las dos soluciones de extracción. Se estableció que, para los dos casos, la cepa de EUA requiere de una menor cantidad de proteína extraída que la cepa BEL, para generar una aglutinación observable por microscopia (Figuras 4-1 y 4-2). Por otro lado, se determinó que el buffer con

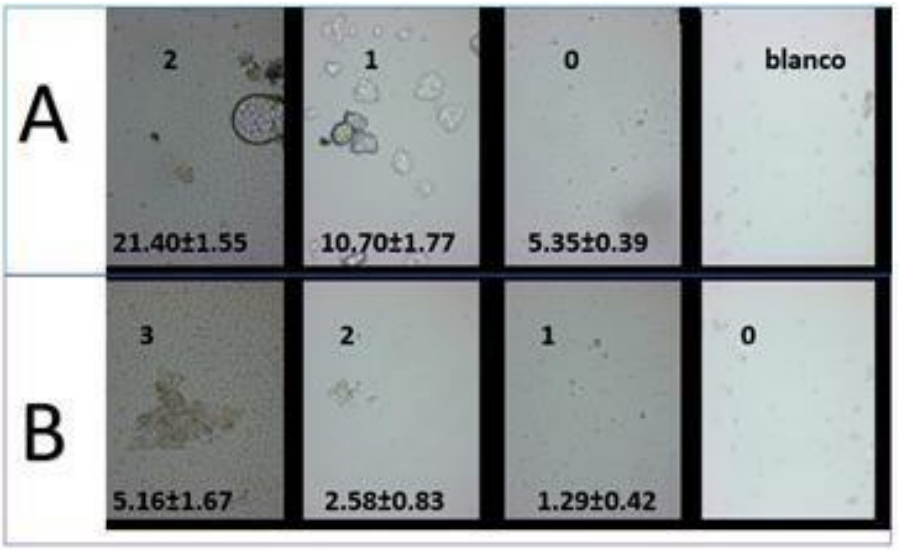
adición de PVPP, ácido ascórbico y cloruro de sodio, genera mejores resultados frente a la cantidad mínima necesaria para la determinación de la actividad aglutinante para las dos cepas, siendo estos de 0,7 ± 0,1 µg/mL y 2,6 ± 0,8 µg/mL, para EUA y BEL, respectivamente (Tabla 4-1).

Figura 4-1. Determinación de los títulos de aglutinación de los extractos crudos de proteínas obtenidos de la cepa EUA.



Se evaluaron los dos diferentes buffers de extracción buffer (TIOUREA; A) y (PVPP; B) determinación del título de aglutinación realizando diluciones secuenciales del extracto crudo obtenido (recuadro resaltado), se reporta la concentración de proteína como promedio más desviación estándar de dos replicas x ± s (mg⁄mL) la actividad hematoaglutinante se reporta según escala semicuantitativa (0-4). Microscopias observadas con el objetivo 10X.

Figura 4-2. Determinación de los títulos de aglutinación de los extractos crudos de proteínas obtenidos de la cepa BEL.



Se evaluaron los dos diferentes buffers de extracción buffer (TIOUREA; A) y (PVPP; B) determinación del título de aglutinación realizando diluciones secuenciales del extracto crudo obtenido (recuadro resaltado), se reporta la concentración de proteína como promedio más desviación estándar de dos replicas x ± s (mg⁄mL) la actividad hematoaglutinante se reporta según escala semicuantitativa (0-4). Microscopias observadas con el objetivo 10X.

Tabla 4-1. Actividad aglutinante de las dos cepas en estudio y su concentración mínima aglutinante para las dos cepas en estudio.

Cepa	***Buffer***	*Aglutinación*	*Título* (ug)
EUA	*Tiourea*	+	*3,8*
	PVPP	**+**	***0,7****
BEL	*Tiourea*	+	*10,7*
	PVPP	**+**	***2,6****

*** Mejores resultados en cuanto a los títulos aglutinación ya que se requiere de una menor cantidad de proteína en el extracto crudo obtenido.**

Estos resultados indican que la composición del buffer es determinante para la extracción de lectinas con actividad aglutinante, es posible que la presencia de la PVPP elimine compuestos que puedan actuar como interferentes en la aglutinación; se ha demostrado que la PVPP puede retener compuestos fenólicos de los extractos (163,167). Es posible que dichos fenoles sean glicosilados, tal y como se propuso previamente (Capitulo 3), esto aumentaría la actividad aglutinante de los extractos obtenidos bajo dichas condiciones.

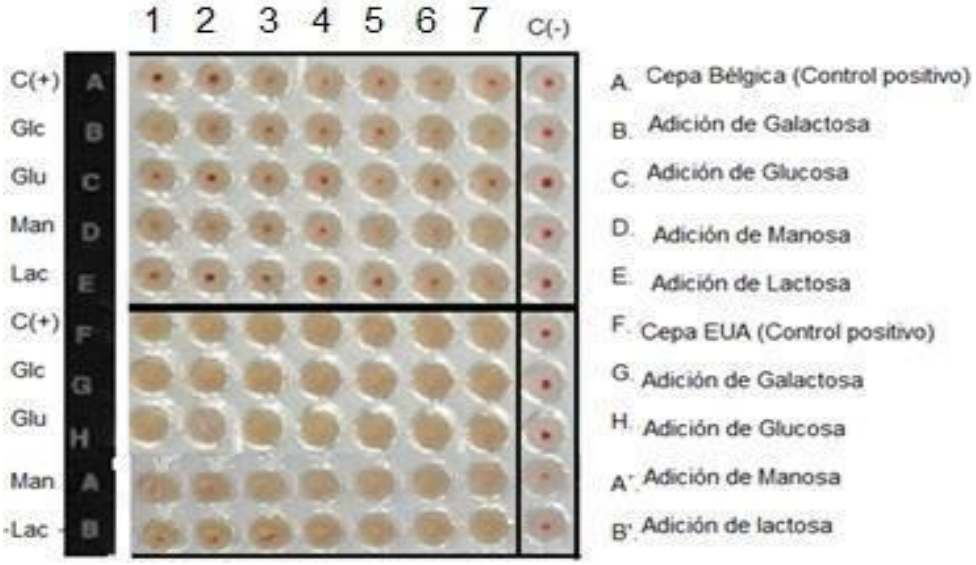
Por otro lado, es evidente que la actividad aglutinante es mucho mayor en la cepa de EUA, lo que indica que es posible que existan diferencias en el perfil de lectinas entre ambas cepas, no se puede descartar la presencia de más lectinas o de mayor actividad. No obstante, se requieren de nuevos estudios que permitan determinar las diferencias bioquímicas entre ambas cepas.

Con respecto a la inhibición de la aglutinación, se determinó que, de los 4 carbohidratos evaluados, únicamente la lactosa afecto la aglutinación del extracto crudo de la cepa de BELPVPP (Figuras 4-3 y 4-4). Para el caso del extracto de la cepa EUA-PVPP, del análisis de la figura 4-3 se evidencia que ninguno de los carbohidratos afecta la aglutinación,

resultado que se confirma al observar las muestras en el microscopio donde se encontraron pequeños

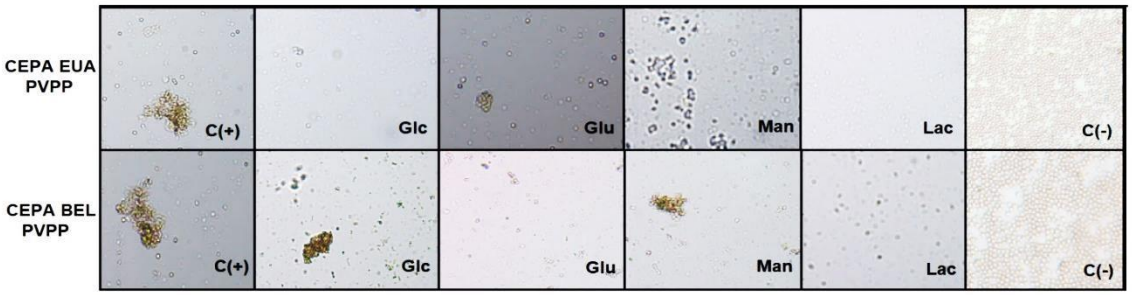
aglutinados.

Figura 4-3. Inhibición de la aglutinación.



La grafica muestra el empleo de diferentes soluciones de carbohidratos para los extractos crudos de las dos cepas empleando como buffer de extracción la solución con polivinilpolipirrolidona (PVPP; B) Control positivo de la aglutinación C (+) extracto + solución de eritrocitos, Control negativo de la aglutinación C (-) PBS + solución de eritrocitos. 1. 33,3 mM; 2. 16,7 mM; 3. 8,3 mM; 4. 4,2mM; 5. 2,1 mM; 6. 1,04 mM; 7. 0,52 mM. (la flecha indica el pozo donde se obtuvo la inhibición de la actividad aglutinante).

Figura 4-4. Microscopias de la inhibición de la aglutinación empleando las diferentes soluciones de carbohidratos.



La grafica muestra el empleo de buffer de extracción la solución con polivinilpolipirrolidona (PVPP; B) Control positivo de la aglutinación C (+) extracto + solución de eritrocitos, Control negativo de la aglutinación C (-) PBS + solución de eritrocitos. Microscopias observadas con el objetivo 10X (la flecha la inhibición de la actividad aglutinante).

La tabla 4-2 resume los resultados de la anti-aglutinación frente a las soluciones de carbohidratos.

Tabla 4-2. Inhibición de la aglutinación con el empleo de diferentes carbohidratos.

Carbohidrato	***EUA***		***BEL***	
	µg/mL	***Aglutinación***	***mM***	***Aglutinación***
Galactosa	*N.I.*	+	*N.I.*	+++
Glucosa	*N.I.*	++	*N.I.*	+
Manosa	*N.I.*	++	*N.I.*	+++
Lactosa	*N.I.*	+	*2,08*	-

N.I. No inhibida.

Algunos autores han reportado que la mayoría de las lectinas de hongos muestran una especificidad por monosacáridos o disacáridos de manera bien definida, como las de afinidad sobre (L-Fucosa), (D-Glucosamina), (D-Galactosa), (GalNAc), (Lactosa), (Galβ1 → 3GalNAc), (LacNAc) y (ácido siálico). Han sido pocos los reportes sobre lectinas de hongos que no muestran dicha especificidad haciéndolas afines hacia glicanos complejos como son las lectinas de *Volvariella volvácea* y *Mycoleptodonoides aitchisonii* (61).

De acuerdo con los resultados obtenidos se logró una inhibición de la actividad aglutinante con el disacárido lactosa para la cepa de BEL (Tabla 4-2) y concuerda con algunos reportes positivos sobre la inhibición de lectinas de *G. lucidum* en cuerpo fructífero por este carbohidrato, al igual que en otros organismos próximos a *G. lucidum* como es el caso de *Boletus edulis* (60).

Estos ensayos de inhibición son importantes pues permiten encontrar propiedades de interés de las lectinas y asociarlas con su actividad biológica. En el caso particular de la presente investigación, este ensayo permitió además seleccionar el carbohidrato que sería usado para el proceso de purificación de afinidad, este es sin duda el procedimiento más utilizado para la purificación de dichas proteínas (60,168,169). Es por ello por lo que, a pesar de que la cepa de EUA presentó mayor actividad aglutinante, el proceso de purificación se realizó para la cepa de BEL; usando un soporte con lactosa como ligando. Es claro que en

próximos estudios se deben usar otras estrategias cromatográficas que permitan realizar la purificación de las lectinas de la cepa de EUA.

Por otro lado, considerando que la cepa BEL era la que había presentado mejores resultados en términos de actividad antioxidante y anti AGEs, era de particular interés conocer más sobre las lectinas presentes en esta cepa.

4.5.2 Purificación de lectinas usando cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-Lactosa.

Durante la purificación de la lectina presente en el cuerpo frutífero de la cepa BEL, se usó la fracción precipitada del 0-30% en sulfato de amonio y el soporte Sepharosa 4BLactosa (60). En este proceso, se obtuvieron 5 fracciones, una no retenida (F1 FNR) y cuatro (4) retenidas (FR) (Figura 4-5); en todas las fracciones retenidas se presentó actividad aglutinante, mientras que en la fracción no retenida no se observó actividad lo que es concordante con la especificidad por este carbohidrato; las lectinas de hongos macromicetos presentan dos sitios de reconocimiento a carbohidratos y pueden modificar la especificidad sobre el reconocimiento en dichas especies (168) (Tabla 4-3).

De acuerdo con los resultados del proceso de purificación, se evidencia que las fracciones F1 y F4 retenidas presentan la mayor purificación con valores de 92 y 177 veces de purificación con respecto al extracto crudo, respectivamente. Se evidencia que la fracción F4 se encuentra con la mayor purificación, indicando una alta retención sobre el soporte, muy posiblemente relacionada con la presencia de más de un punto de reconocimiento; esto estaría de acuerdo con el buffer usado para su elución el cual presenta el pH y concentración más alto

Tabla 4-3. Seguimiento de la purificación de la lectina aislada del cuerpo fructífero de *G. lucidum* cepa de BEL.

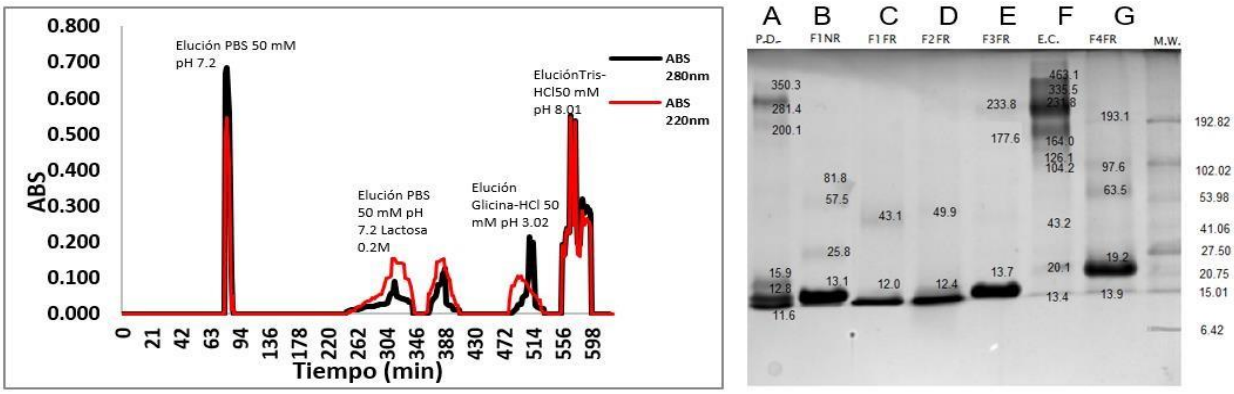
Fracción *	Proteína total (mg)	Título (ug) de proteína	Actividad (U)**	Actividad especifica (U/mg)	Veces de purificación
Extracto crudo	35.680	2.60	0.385	0.011	1.00
Dializado	3.870	3.87	0.258	0.067	6.19
F1NR	0.111	N.D.	0.000	0.000	0.00

F1 FR	0.340	2.97	0.337	0.991	91.9
F2 FR	0.593	6.79	0.147	0.248	23.0
F3 FR	0.242	4.84	0.207	0.854	79.2
F4 FR	0.162	3.24	0.309	1.907	177

***: Las fracciones fueron dializadas y liofilizadas previa determinación de la concentración por el método de Bradford. **: Evaluación de la aglutinación con una suspensión de eritrocitos de caballo al 2% en PBS. #: Cantidad mínima de proteína (µg) requerida para observar aglutinación. (Ver anexo H)**

En el análisis electroforético por SDS-PAGE se observaron dos bandas bien definidas en la fracción no retenida y con mayor intensidad la correspondiente a 12 kDa, que también se observa en la fracción retenida y las eluídas con los buffers Glicina 3,02 y Tris 8,01 en condiciones reductoras. Comparando con reportes de lectinas aisladas de *G. lucidum*, es posible que la banda encontrada por SDS-PAGE podría corresponder efectivamente a una de ellas (168). Se evidencia que la fracción F4 presenta una banda de 19 kDa, mientras que todas las demás fracciones presentan proteínas con tamaños alrededor de los 12 a 13 KDa. Se deben realizar estudios adicionales que permitan establecer si estas corresponden a la misma proteína o si se tratan de isoformas de lectinas, lo cual ha sido reportado para otros hongos (163, 165, 166, 170).

Figura 4-5. A: Cromatograma de afinidad y B: SDS PAGE 10%.

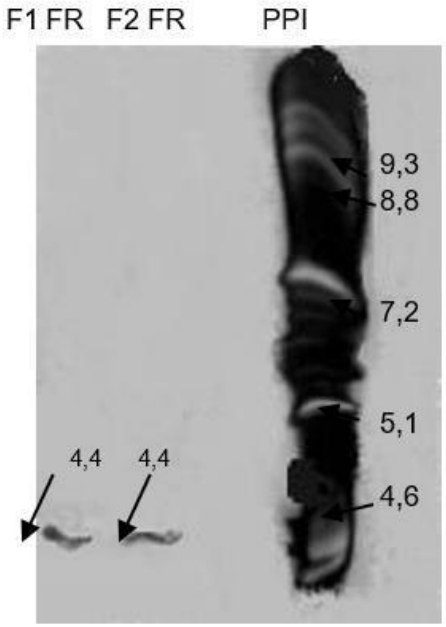


Para la cromatografía de afinidad se sembraron 2,0 ml de proteína precipitada y dializada (+3). Volumen de columna 3ml, flujo 0,6 mL/ min. Se colectaron cinco fracciones, una no retenida F1 FNR, y cuatro retenidas, dos eluidas con PBS 50mM pH 7,2 + Lactosa 0,2 M F1 FR y F2 FR, una eluida con Glicina-HCl pH 3.02 F3 FR, y una eluida con TrisHCl pH 8.01 F4 FR. Tris-tricina +Δ -DTT. A) P.D. (precipitado y dializado) B). F1 FNR, C) F1 FR, D) F2 FR, E) F3 FR, F) E.C. (Extracto crudo), G). F4 FR H). MW: marcador de peso molecular. 50µg proteína/carril.

4.5.3 Isoelectroenfoque de las fracciones retenidas y eluidas con PBS + Lactosa

Para la evaluación del punto isoeléctrico mediante isoelectroenfoque se emplearon únicamente las fracciones F1 FR y F2 FR, las cuales fueron eluídas con el buffer PBS + Lactosa 0,2 M y para la identificación del punto isoeléctrico (PI) por comparación frente a los patrones de punto isoeléctrico (PPI) (Figura 4-6).

Figura 4-6. Punto isoeléctrico lectina de *G. lucidum* cepa de Bélgica. F1 FR y F2 FR (40µg de proteína total), PPI: Patrón de punto isoeléctrico.



En general para todas las lectinas de hongos del género Ganoderma, se presentan pI ácidos, en los que el ácido aspártico (D), ácido glutámico (Q), y aminoácidos hidroxilados están en mayor proporción, aunque la composición de aminoácidos es muy variada (166,170–174). Comúnmente, los puntos isoeléctricos para lectinas de este género se encuentran en pHs ácidos, entre pH 4.0 -5.0 (Tabla 4-4), las lectinas aisladas de *G. lucidum* en este estudio presentan pI cercanos a los reportados para otras lectinas, además presentan afinidad por eritrocitos ricos en el grupo N-acetilgalactosamina rica en sangre de caballos y ovejas como reportan algunos autores sobre LZ-8 y LZ-9 aisladas de diferentes fracciones del hongo *G. lucidum* (60,166,175).

Tabla 4-4. Características moleculares y porcentaje de coincidencia con la secuencia de AA de LZ-8 para de lectinas aisladas de hongos del género Ganoderma.

Lectina	Especie	(KDa)	pI	Referencia
F1 FR	*G. lucidum*	12,0	4,4	*
F2 FR	*G. lucidum*	12,4	4,4	*
LZ-8	*G. lucidum*	13,10	4,40	(159)
LZ-9	*G. lucidum*	12,40	4,33	(168)
FIP-gts	*G. tsugae***	13,00	-	(163)(167)
FIP-gsi	*G. sinensis***	12,42	4,81	(166)(169)
FIP-gap1	*G. applanatum*	12,74	4,93	(165)(165
FIP-gap2	*G. applanatum*	12,52	4,86	(165)
FIP-gat	*G. atrum*	12,45	4,80	(164)(170)

***: Lectinas aisladas en este estudio aun sin secuenciar; **: FIPs sin propiedades de lectina registrada**

4.5.4 Efecto la temperatura y el pH sobre la actividad aglutinante del extracto crudo de proteína

Con respecto al efecto del pH y la temperatura sobre la actividad aglutinante, se determinó que esta se presenta en un rango de pH entre 3 y 11 y de temperatura entre 2080ºC. Para el caso del pH como se mantiene una actividad del 80% en un rango entre 7.411 siendo el pH óptimo de 11, y presentando un decaimiento de la actividad a pH muy ácidos inferiores a 6 y pH muy básicos superiores a 11 (Figura 4-7). En cuanto a la temperatura se mantiene un 100% de la actividad entre los 20°C y los 50°C, y disminuye un 20% al alcanzar los 80º, a partir de 80ºC la actividad disminuye en su totalidad a un 0% hasta llegar a los 90°C cerca de la temperatura de ebullición del sistema PBS 50mM pH 7,2 (figura 4-8), estos resultados están en concordancia con lo reportado para lectinas encontradas en *G. microsporum* donde se presenta inestabilidad térmica de una estructura tetrámerica con actividad tipo lectina (178). La estabilidad térmica característica de las lectinas del género Ganoderma y de algas marinas puede estar relacionada con la estructura tridimensional, su bajo peso molecular (168,178), y la presencia de puentes disulfuro (179).

Figura 4-7 Efecto del pH en la actividad. (Ver anexo H-4).

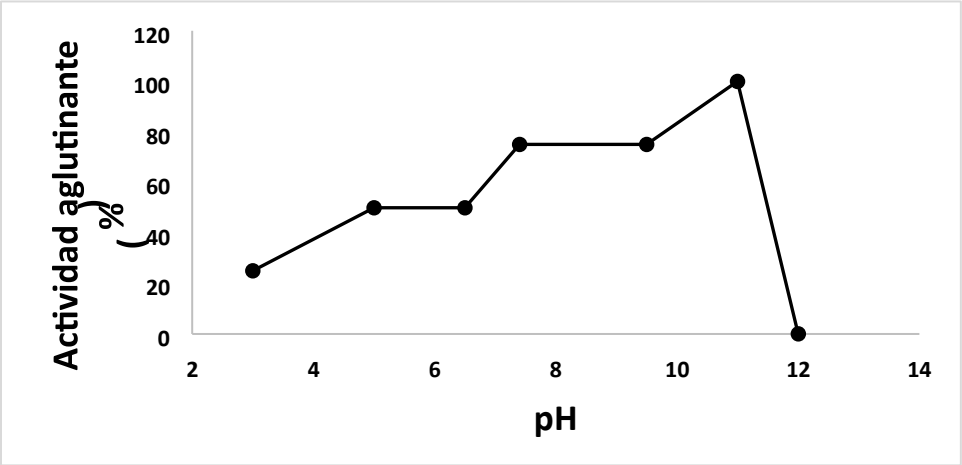
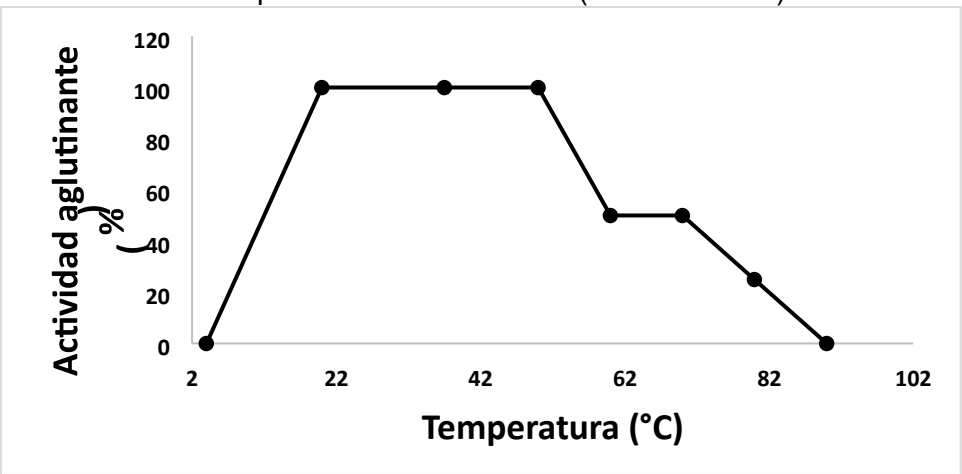


Figura 4-8. Efecto de la temperatura en la actividad. (Ver anexo H-5).



Además de su especificidad, la estabilidad de las lectinas de *G. lucidum* y de los hongos del género Ganoderma en un rango amplio de pH ha demostrado como estas pueden unirse de manera reversible a promotores de absorción que podrían beneficiar la proliferación de flora bacteriana benéfica, pudiéndose usar como probiótico para aportar al crecimiento de organismos que ayuden a procesos de asimilación de nutrientes y compuestos bioactivos para su administración oral. Si bien se reconoce la amplia actividad biológica de las lectinas in vitro, es necesario realizar estudios de estabilidad en procesos de digestión con retos in vitro que simulen las condiciones del tracto digestivo. Esta información es necesaria para que puedan ser usadas bien sea de manera aislada o como harina, para el desarrollo de alimentos funcionales o incluso nutraceúticos (50,51,68,69,180). En general, la actividad en un amplio rango de pH y temperatura podría darse por la adaptación de estos organismos que ocurre

debido al reto térmico en el proceso de fructificación para la obtención industrial de cuerpos fructíferos.

4.6 Conclusiones

El uso de un coctel antioxidante y el reactivo PVPP ayuda a mejorar la actividad aglutinante en los extractos y fracciones obtenidas durante el proceso de purificación.

Se aisló una lectina de una cepa belga del hongo *Ganoderma lucidum* cultivado a escala industrial en Colombia con características moleculares similares a otras lectinas reportadas en hongos del género *Ganoderma* (Tabla 4-4).

Se desarrollo un protocolo de purificación de la lectina, consistente en la precipitación con sulfato de amonio entre 0-30% y cromatografía de afinidad con Sepharosa 4B-Lactosa.

La lectina aislada tiene por tener un peso molecular de 12 KDa por SDS-PAGE, una pI de 4,4, reconociendo de manera diferencial eritrocitos de tipo A y eritrocitos de caballo ricos en el carbohidrato N-Acetilgalactosamina, su actividad aglutinante se vio inhibida parcialmente por el carbohidrato Lactosa (Lac).

Además, se encontró que es activa y estable en un intervalo de pH de 3,0 – 11,0 y temperatura entre 20°C - 80°C.

5 Recomendaciones

Se sugiere realizar la evaluación de las actividades antioxidantes e inhibitoria de la formación de AGEs sobre la fracción remanente del proceso de extracción denominada fibra.

Realizar estudios de cromatografía liquida de alta resolución acoplada a detección de masas para poder identificar la estructura de los metabolitos de mayor polaridad presentes en los diferentes extractos.

Se recomienda realizar el análisis del extracto etanólico de la cepa de Estados Unidos mediante CG-EM para tener información sobre las estructuras de metabolitos de baja polaridad presentes en dicho extracto y poder realizar una comparación de los metabolitos presentes en el mismo.

Finalmente es importante realizar un ensayo para realizar la evaluación de glicosilación de la lectina aislada y estudiar el efecto de la temperatura y el pH sobre la misma para verificar cómo se comporta la especie aislada en sistemas in vitro que simulen el proceso de digestión.

Bibliografía

1. Xia Q, Zhang H, Sun X, Zhao H, Wu L, Zhu D, et al. A comprehensive review of the structure elucidation and biological activity of triterpenoids from Ganoderma spp. Vol. 19, Molecules. MDPI AG; 2014. p. 17478–535.

2. Kong M, Yao Y, Zhang H. Antitumor activity of enzymatically hydrolyzed *Ganoderma lucidum* polysaccharide on U14 cervical carcinoma – bearing mice. 2019;

3. Ángel M, Alarcón V, López RO, Martínez AR, Garza MA, Garza JS. Lectina fijadora de manosa en la respuesta inmunitaria innata. Medicina Universitaria. 2008;10(39):102–7.

4. Varrot A, Basheer SM, Imberty A. Fungal lectins : structure , function and potential applications. Curr Opin Struct Biol [Internet]. 2013; Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2013.07.007

5. Wen H, Kang S, Song Y, Song Y, Sung SH, Park S. Differentiation of cultivation sources of *Ganoderma lucidum* by NMR-based metabolomics approach. Phytochemical Analysis. 2010;21(1):73–9.

6. Sharma SK, Gautam N. Chemical, Bioactive, and Antioxidant Potential of Twenty Wild Culinary Mushroom Species. Biomed Res Int. 2015;2015.

7. Cepero de García MC, Restrepo Restrepo S, Franco-Molano AE, Cárdenas Toquica M, Vargas Estupiñán N. Biología de Hongos. 1o. Bogotá D.C.: Universidad de Los Andes Departamento de Ciencias Facultad de Ciencias Biológicas: Uniandes E.; 2012. 497–497 p.

8. Wasser SP, Weis AL. Medicinal Properties of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: Current Perspectives (Review). Int J Med Mushrooms. 1999;1(1):31–62.

9. Sivanandhan S, Khusro A, Paulraj M, Ignacimuthu S, AL-Dhabi N. Biocontrol Properties of Basidiomycetes: An Overview. Journal of Fungi. 2017 Jan 10;3(1):2.

10. Shiao MS. Natural products of the medicinal fungus*Ganoderma lucidum*: Occurrence, biological activities, and pharmacological functions. The Chemical Record. 2003 Jul;3(3):172–80.

11. Kolniak-Ostek J, Oszmiański J, Szyjka A, Moreira H, Barg E. Anticancer and Antioxidant Activities in *Ganoderma lucidum* Wild Mushrooms in Poland, as Well as Their Phenolic and Triterpenoid Compounds. Int J Mol Sci. 2022 Aug 1;23(16).

12. Paterson RRM. Ganoderma – A therapeutic fungal biofactory. Phytochemistry. 2006 Sep;67(18):1985–2001.

13. Li L, Xu JX, Cao YJ, Lin YC, Guo WL, Liu JY, et al. Preparation of *Ganoderma lucidum* polysaccharide chromium (III) complex and its hypoglycemic and hypolipidemic activities in high-fat and high-fructose diet-induced pre-diabetic mice. Int J Biol Macromol. 2019;140(Iii).

14. El Sheikha AF El. Nutritional Profile and Health Benefits of *Ganoderma lucidum* "Lingzhi, Reishi, or Mannentake" as Functional Foods: Current Scenario and Future Perspectives. Foods. 2022 Apr 1;11(7):1030.

15. Basnet BB, Liu L, Bao L, Liu H. Current and future perspective on antimicrobial and anti-parasitic activities of Ganoderma sp.: an update. Mycology. 2017 Apr 3;8(2):111–24.

16. Bao XF, Wang XS, Dong Q, Fang JN, Li XY. Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. Phytochemistry. 2002 Jan;59(2):175–81.

17. Varrot A, Basheer SM, Imberty A. Fungal lectins: structure, function and potential applications. Curr Opin Struct Biol. 2013 Oct;23(5):678–85.

18. Quin MB, Flynn CM, Schmidt-Dannert C. Traversing the fungal terpenome. Nat Prod Rep. 2014;31(10):1449–73.

19. Smania E de FA, Delle Monache F, Yunes RA, Paulert R, Smania Junior A. Antimicrobial activity of methyl australate from Ganoderma australe. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2007 Mar;17(1):14–6.

20. Zhao C, Fan J, Liu Y, Guo W, Cao H, Xiao J, et al. Hepatoprotective activity of *Ganoderma lucidum* triterpenoids in alcohol-induced liver injury in mice, an iTRAQbased proteomic analysis. Food Chem [Internet]. 2019;271(July 2018):148–56. Available from: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.115

21. de Oliveira JSF, Xavier LP, Lins A, Andrade EHA, Maia JGS, de Mello AH, et al. Effects of inoculation by arbuscular mycorrhizal fungi on the composition of the essential oil, plant growth, and lipoxygenase activity of Piper aduncum L. AMB Express. 2019 Dec 26;9(1):29.

22. Das A, Begum K, Akhtar S, Ahmed R, Kulkarni R, Banu S. Genome-wide detection and classification of terpene synthase genes in Aquilaria agallochum. Physiology and Molecular Biology of Plants. 2021 Aug 5;27(8):1711–29.

23. Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the antiinflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 2009;41(1):40–59.

24. Zhang W, Tao J, Yang X, Yang Z, Zhang L, Liu H, et al. Antiviral effects of two *Ganoderma lucidum* triterpenoids against enterovirus 71 infection. Biochem Biophys Res Commun. 2014 Jul;449(3):307–12.

25. Romero-Córdoba SL, Salido-Guadarrama I, Meneses ME, Cosentino G, Iorio M V., Tagliabue E, et al. Mexican *ganoderma lucidum* extracts decrease lipogenesis modulating transcriptional metabolic networks and gut microbiota in C57BL/6 mice fed with a high-cholesterol diet. Nutrients. 2021 Jan 1;13(1):1–24.

26. Shi L, Ren A, Mu D, Zhao M. Current progress in the study on biosynthesis and regulation of ganoderic acids. Vol. 88, Applied Microbiology and Biotechnology. 2010. p. 1243–51.

27. Griendling KK, Touyz RM, Zweier JL, Dikalov S, Chilian W, Chen YR, et al. Measurement of Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, and RedoxDependent Signaling in the Cardiovascular System: A Scientific Statement from the American Heart Association. Vol. 119, Circulation Research. Lippincott Williams and Wilkins; 2016. p. e39–75.

28. Nakagawa-Goto K, Yamada K, Taniguchi M, Tokuda H, Lee KH. Cancer preventive agents 9. Betulinic acid derivatives as potent cancer chemopreventive agents. Bioorg Med Chem Lett. 2009 Jul;19(13):3378–81.

29. de la Rosa LA, Moreno-Escamilla JO, Rodrigo-García J, Alvarez-Parrilla E. Phenolic Compounds. In: Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables. Elsevier; 2019. p. 253–71.

30. Lizárraga-Velázquez CE, Hernández C, González-Aguilar GA, Basilio-Heredia J. Propiedades antioxidantes e inmunoestimulantes de polifenoles en peces carnívoros de cultivo. CienciaUAT. 2018 Jan 31;12(2):127.

31. Franz H, Ziska P, Mohr J. Lectins — definition and classification. Acta Histochem. 1982 Jan;71(1):19–21.

32. FIPS Y LECTINE.

33. Tirta Ismaya W, Tjandrawinata RR, Rachmawati H. Lectins from the Edible Mushroom Agaricus bisporus and Their Therapeutic Potentials. Molecules. 2020 May 20;25(10):2368.

34. Arunachalam K, Sasidharan SP, Yang X. A concise review of mushrooms antiviral and immunomodulatory properties that may combat against COVID-19. Food Chemistry Advances. 2022 Oct;1:100023.

35. Kino K, Mizumoto K, Sone T, Yamaji T, Watanabe J, Yamashita A, et al. An immunomodulating protein, Ling Zhi-8 (LZ-8) prevents insulitis in non-obese diabetic mice. Diabetologia. 1990 Dec;33(12):713–8.

36. Topolska K, Florkiewicz A, Filipiak-Florkiewicz A. Functional Food—Consumer Motivations and Expectations. Int J Environ Res Public Health. 2021 May 17;18(10):5327.

37. Plasek B, Temesi Á. The credibility of the effects of functional food products and consumers' willingness to purchase/willingness to pay– review. Appetite. 2019 Dec;143:104398.

38. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turroni F, Mahony J, et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2017 Dec;81(4).

39. Khalaf AT, Wei Y, Alneamah SJA, Al-Shawi SG, Kadir SYA, Zainol J, et al. What Is New in the Preventive and Therapeutic Role of Dairy Products as Nutraceuticals and Functional Foods? Biomed Res Int. 2021 Feb 22;2021:1–9.

40. Yeung AWK, Mocan A, Atanasov AG. Let food be thy medicine and medicine be thy food: A bibliometric analysis of the most cited papers focusing on nutraceuticals and functional foods. Food Chem. 2018 Dec;269:455–65.

41. Díaz-Flores M, Arturo Baiza-Gutman L, Ángel Ibáñez-Hernández M, Pascoe-Lira D, Guzmán-Greenfel AM, Kumate-Rodríguez J. Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. Vol. 140. 2004.

42. Moldogazieva NT, Mokhosoev IM, Feldman NB, Lutsenko S V. ROS and RNS signalling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications. Vol. 52, Free Radical Research. Taylor and Francis Ltd; 2018. p. 507–43.

43. Murcia Artunduaga KS, Castañeda M del R. Evaluación del contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante de extractos etanólicos de la cáscara de cacao (Theobroma cacao L.). Revista de Investigación Agraria y Ambiental. 2022 Jun 17;13(2):53–66.

44. Alejandro Parada-Flores O, López-Cervantes J, Isabel Sánchez-Machado D, Ramírez-Wong B, Nydia Campas-Baypoli O, del Rosario Martínez-Macias M, et al. Biochemical profile and antioxidant activity of Lagascea decipiens, a native Asteraceae plant. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences. 2022;

45. Benítez-Estrada A, Villanueva-Sánchez J, González-Rosendo G, Alcántar-Rodríguez VE, Puga-Díaz R, Quintero-Gutiérrez AG. Determinación de la capacidad antioxidante total de alimentos y plasma humano por fotoquimioluminiscencia: Correlación con ensayos fluorométricos (ORAC) y espectrofotométricos (FRAP). TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 2020 Sep 1;23.

46. Abate G, Marziano M, Rungratanawanich W, Memo M, Uberti D. Nutrition and AGEing: Focusing on Alzheimer's Disease. Vol. 2017, Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Hindawi Limited; 2017.

47. Frye EB, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins: Advanced glycation end product-dependent increase in imidazolium cross-links in human lens proteins. Journal of Biological Chemistry. 1998 Jul 24;273(30):18714–9.

48. Avery NC, Bailey AJ. The effects of the Maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen. Pathologie Biologie. 2006 Sep;54(7):387–95.

49. Mendoza W, Gandolfo L, Ponce L, Novello J, Marangoni S. Estudios Estructura Y Función De Una Lectina Aislada De Semillas De Caesalpinia Spinosa Kuntze (Tara). Idesia (Arica). 2007;25(2):49–58.

50. Rodríguez M, Riquelme B, Valverde J, Gattuso S. Caracterización del efecto aglutinante de lectinas de la familia de las Fabaceas sobre los eritrocitos humanos mediante el análisis de imágenes. Anales Afa. 2004;16:247–8.

51. Lakhtin Vladimir, Lakhtin Mikhail, Davydkin Valeriy, Melikhova Alexandra, Davydkin Igor. Relationships between probiotic lectins and postbiotics. World Journal of Advanced Research and Reviews. 2020 Jul 30;7(1):142–8.

52. Dean JW, Chandrasekaran S, Tanzer ML. Lectins inhibit cell binding and spreading on a laminin substrate. Biochem Biophys Res Commun. 1988 Oct;156(1):411–6.

53. Hamid R, Masood A. Dietary Lectins as Disease Causing Toxicants. Pakistan Journal of Nutrition. 2009 Feb 15;8(3):293–303.

54. Loyd AL, Linder ER, Smith ME, Blanchette RA, Smith JA. Cultural characterization and chlamydospore function of the Ganodermataceae present in the eastern United States. Mycologia [Internet]. 2019;111(1):1–12. Available from: https://doi.org/10.1080/00275514.2018.1543509

55. Cheng CR, Ding J, Yang Y, Liang XY, Guo DA, Yang M, et al. Pharmacokinetic Studies of Ganoderic Acids from the Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes), by LC-MS/MS [Internet]. Vol. 18, International Journal of Medicinal Mushrooms. 2016. Available from: www.begellhouse.com

56. Ding N, Yang Q, Huang SS, Fan LY, Zhang W, Zhong JJ, et al. Separation and determination of four ganoderic acids from dried fermentation mycelia powder of *Ganoderma lucidum* by capillary zone electrophoresis. J Pharm Biomed Anal. 2010 Dec;53(5):1224–30.

57. Yang C, Li W, Li C, Zhou Z, Xiao Y, Yan X. Metabolism of ganoderic acids by a *Ganoderma lucidum* cytochrome P450 and the 3-keto sterol reductase ERG27 from yeast. Phytochemistry. 2018 Nov 1;155:83–92.

58. Wang Q, Xu M, Zhao L, Wang F, Li Y, Shi G, et al. Transcriptome dynamics and metabolite analysis revealed the candidate genes and regulatory mechanism of ganoderic acid biosynthesis during liquid superficial-static culture of *Ganoderma lucidum*. Microb Biotechnol. 2021 Mar 1;14(2):600–13.

59. Gill BS, Navgeet, Kumar S. Antioxidant potential of ganoderic acid in Notch-1 protein in neuroblastoma. Mol Cell Biochem [Internet]. 2019;456(1–2):0. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/s11010-018-3485-7

60. Thakur A, Rana M, Lakhanpal TN, Ahmad A, Khan MI. Purification and characterization of lectin from fruiting body of *Ganoderma lucidum*. Lectin from *Ganoderma lucidum*. Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2007 Sep;1770(9):1404–12.

61. Thakur A, Rana M, Lakhanpal TN, Ahmad A, Khan MI. Purification and characterization of lectin from fruiting body of *Ganoderma lucidum*. Lectin from *Ganoderma lucidum*. Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2007 Sep;1770(9):1404–12.

62. Ríos-Cañavate JL. *Ganoderma lucidum*, un hongo con propiedades inmunoestimulantes. Rev fitoter. 2008;135–46.

63. Fernandes A, Nair A, Kulkarni N, Todewale N, Jobby R. Exploring Mushroom Polysaccharides for the Development of Novel Prebiotics: A Review. Int J Med Mushrooms. 2023;25(2):1–10.

64. El Sheikha AF El. Nutritional Profile and Health Benefits of *Ganoderma lucidum* “Lingzhi, Reishi, or Mannentake” as Functional Foods: Current Scenario and Future Perspectives. Foods. 2022 Apr 1;11(7):1030.

65. Reis FS, Martins A, Vasconcelos MH, Morales P, Ferreira ICFR. Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. Trends Food Sci Technol. 2017 Aug 1;66:48–62.

66. Gong T, Yan R, Kang J, Chen R. Chemical Components of Ganoderma. In 2019. p. 59–106.

67. Zhang JJ, Wang DW, Peng YL, Cai D, Cheng YX. Spiroganodermaines A−G from Ganoderma species and their activities against insulin resistance and renal fibrosis. Phytochemistry. 2022 Oct;202:113324.

68. Fuentes Berrio L, Acevedo Correa D, Chantré CA, Gelvez Ordoñez VM. ALIMENTOS FUNCIONALES: IMPACTO YRETOS PARA EL DESARROLLO Y BIENESTAR DE LA SOCIEDAD COLOMBIANA. Biotecnoloía en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 2015;13(2):140.

69. Camila Cabrera Baez M. ALIMENTOS FUNCIONALES: UN ANALISIS CRITICO DEL ESTADO DEL ARTE DEL MARCO REGULATORIO DE COLOMBIA.

70. https://www.bloomberglinea.com/latinoamerica/colombia/del-campo-a-la-mesacuantos-productos-con-hongos-han-sido-registrados-en-colombia/.

71. Ramírez Ayala W, Guevara Bravo CA, Rodríguez Espinosa JA. Ácidos ganodéricos en Ganoderma sp, *Ganoderma lucidum* y en su sustrato agotado. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 2020 Oct 20;19(1).

72. Galappaththi MCA, Patabendige NM, Premarathne BM, Hapuarachchi KK, Tibpromma S, Dai DQ, et al. A Review of Ganoderma Triterpenoids and Their Bioactivities. Vol. 13, Biomolecules. MDPI; 2023.

73. Liao GF, Wu ZH, Liu Y, Yan YM, Lu RM, Cheng YX. Ganocapenoids A–D: Four new aromatic meroterpenoids from Ganoderma capense. Bioorg Med Chem Lett [Internet]. 2019;29(2):143–7. Available from: https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.12.011

74. Acharya K, Bera M, Tarafder E, Dasgupta A. Pharmacognostic standardization of *Ganoderma lucidum*: A commercially explored medicinal mushroom. Pharm Lett. 2015;7(7):175–81.

75. Ahmad MF. *Ganoderma lucidum*: Persuasive biologically active constituents and their health endorsement. Biomedicine and Pharmacotherapy [Internet]. 2018;107(August):507–19. Available from: https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.036

76. Bai M, Wu SY, Zhang WF, Song XP, Han CR, Zheng CJ, et al. One new Lignan derivative from the fruiting bodies of Ganoderma lipsiense. Nat Prod Res [Internet]. 2018;0(0):1–5. Available from: https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1501691

77. Huh S, Lee S, Choi SJ, Wu Z, Cho JH, Kim L, et al. Quercetin synergistically inhibit EBV-associated gastric carcinoma with *ganoderma lucidum* extracts. Molecules. 2019 Oct 24;24(21).

78. Meneses ME, Martínez-Carrera D, Torres N, Sánchez-Tapia M, Aguilar-López M, Morales P, et al. Hypocholesterolemic properties and prebiotic effects of Mexican *Ganoderma lucidum* in C57BL/6 mice. PLoS One. 2016 Jul 1;11(7).

79. Ramírez Ayala W, Guevara Bravo CA, Rodríguez Espinosa JA. Ácidos ganodéricos en Ganoderma sp, *Ganoderma lucidum* y en su sustrato agotado. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 2020 Oct 20;19(1).

80. Oliveros CV. Estudio de la composición del hongo Lentinula edodes usando herramientas ómicas y su potencial en la producción de un alimento funcional.

81. Nagano C, Debray H, Nascimento K, Pinto V, Cavada B, Saker-Sampaio S, et al. isolated from the red marine algae Hypnea cervicornis y Hypnea musciformis define a novel lectin family. Protein science 14,. 2005;2167-2176.

82. Ramírez E, Martínez ST. Química Orgánica y Bioquímica. Vol. 44. 2015.

83. Vega-Oliveros C, Chegwin-Angarita C, Ardila-Barrantes HD. Conditions for protein analysis of lentinula edodes mycelium obtained from liquid state fermentation. Revista Colombiana de Quimica. 2019 Sep 1;48(3):3–12.

84. Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies. Vol. 236, ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. 1996.

85. Dudonné S, Vitrac X, Coutiére P, Woillez M, Mérillon JM. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. J Agric Food Chem. 2009 Mar 11;57(5):1768–74.

86. Ozgen M, Reese RN, Tulio AZ, Scheerens JC, Miller AR. Modified 2,2-azino-bis-3ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2′-diphenyl-1- picrylhydrazyl (DPPH) methods. J Agric Food Chem. 2006 Feb 22;54(4):1151–7.

87. Li H Bin, Wong CC, Cheng KW, Chen F. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. LWT. 2008;41(3):385–90.

88. Arango O, Pérez E, Granados H, Rojano B, Sáez J. INHIBICIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA Y CAPACIDAD ATRAPADORA DE RADICALES LIBRES DE ALCALOIDES AISLADOS DE DOS ANNONACEAE, Xylopia amazonica cf. Y Duguetia vallicola INHIBITION OF THE LIPID PEROXIDATION AND FREE RADICAL SCAVENGING CAPACITY OF ALKALOIDS ISOLATED FROM TWO ANNONACEAE, Xylopia amazonica cf. AND Duguetia vallicola. Vol. 26, Actual Biol. 2004.

89. Nilsson J, Pillai D, Önning G, Persson C, Nilsson Å, Åkesson B. Comparison of the 2,2′-azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to asses the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. Mol Nutr Food Res. 2005 Mar;49(3):239–46.

90. Derbré S, Gatto J, Pelleray A. Automating a 96-well microtiter plate assay for identification of AGEs inhibitors or inducers : Application to the screening of a small natural Automating a 96-well microtiter plate assay for identification of AGEs inhibitors or inducers : application to . 2010;(May 2014).

91. Nagano CS. Estudios Estructurales de Lectinas de Algas Marinas y de Vegetales Superiores. Tesis. 2007;166.

92. Angulo Ortiz A, Santafe Patiño G, Zuluaga Vega J, Pérez C. C, Torres O. Química y actividades antioxidante y bactericida del extracto etanólico del hongo *ganoderma lucidum*. Scientia et Technica. 2007;1(33):329–32.

93. Cör D, Knez Ž, Hrnčič MK. Antitumour, antimicrobial, antioxidant and antiacetylcholinesterase effect of *Ganoderma Lucidum* terpenoids and polysaccharides: A review. Vol. 23, Molecules. MDPI AG; 2018.

94. El Sheikha AF El. Nutritional Profile and Health Benefits of *Ganoderma lucidum*

“Lingzhi, Reishi, or Mannentake” as Functional Foods: Current Scenario and Future Perspectives. Foods. 2022 Apr 1;11(7):1030.

95. Durán EL, Mujica MT, Jewtuchowicz VM, Finquelievich JL, Pinoni MV, Iovannitti CA. Estudio de la variabilidad genética entre aislamientos clínicos de Candida albicans formadores de biopelículas. Rev Iberoam Micol. 2007 Dec;24(4):268–71.

96. Patricia A, Tayo D. Estudio de las lectinas presentes en el alga roja Tricleocarpa cylindrica.

97. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. Vol. 94, Archives of Toxicology. Springer; 2020. p. 651–715.

98. Trueba GP. Los flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes. Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas. 2003;22(1):48–57.

99. Felipe D, Flórez R. Antioxidante De Un Macromiceto. 2018;

100. Islas Santillán MÁ, Castañeda Ovando A, Álvarez Delgadillo A, Valenzuela Garza R, Romero Bautista L, Torres Valencia JM. Estudio preliminar de la actividad antioxidante de tres especies del género Ganoderma (Polyporaceae) nativas del estado de Hidalgo, México. Sci Fungorum. 2018;46:37–45.

101. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Original Contribution ANTIOXIDANT ACTIVITY APPLYING AN IMPROVED ABTS RADICAL CATION DECOLORIZATION ASSAY. 1999.

102. Derbré S, Gatto J, Pelleray A, Coulon L, Séraphin D, Richomme P. Automating a 96well microtiter plate assay for identification of AGEs inhibitors or inducers: Application to the screening of a small natural compounds library. Anal Bioanal Chem.
2010;398(4):1747–58.

103. Abate G, Marziano M, Rungratanawanich W, Memo M, Uberti D. Nutrition and AGEing: Focusing on Alzheimer's Disease. Vol. 2017, Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Hindawi Limited; 2017.

104. Buss P, Buss P, Cruz D do C de RI em S (Cris) da FO. Agenda 2030. Revista Radis [Internet]. 2017;22–6. Available from: http://www6.ensp.fiocruz.br/radis/revistaradis/177/reportagens/agenda-2030

105. Olson LC, Redden JT, Schwartz Z, Cohen DJ, McClure MJ. Advanced glycation endproducts in skeletal muscle aging. Vol. 8, Bioengineering. MDPI; 2021.

106. Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, et al. Advanced Glycation End Products in Foods and a Practical Guide to Their Reduction in the Diet.
J Am Diet Assoc. 2010 Jun;110(6):911-916.e12.

107. Hansen LM, Gupta D, Joseph G, Weiss D, Taylor WR. The receptor for advanced glycation end products impairs collateral formation in both diabetic and non-diabetic mice. Laboratory Investigation. 2017 Jan 1;97(1):34–42.

108. Lin YL, Lee SS, Hou SM, Chiang BL. Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* induces gene expression changes in human dendritic cells and promotes T helper 1 immune response in BALB/c mice. Mol Pharmacol. 2006;70(2):637–44.

109. Mohsin M, Negi PS, Ahmed & Z. Determination of the Antioxidant Activity and Polyphenol Contents of Wild Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt. Fr.) P. Karst. (Higher Basidiomycetes) from Central Himalayan Hills of India [Internet]. Vol. 13, International Journal of Medicinal Mushrooms. 2011. Available from: www.begellhouse.com

110. Zancada Valderrama L. Estudio del contenido de oligosacáridos, glicolípidos y fosfolípidos de la leche de oveja. Participación en la defensa del recién nacido frente a infecciones. Universidad de Salamanca; 2008.

111. Palasí Mascarós JT. Caracterización físico-química y nutricional de algas en polvo empleadas como ingrediente alimentario. Tesis Doctoral [Internet]. 2015;48. Available from: https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/55641/PALASÍ - Caracterización físico-química y nutricional de algas en polvo empleadas como ingredient....pdf?sequence=4

112. Irene Y, Gaitén G, Martínez MM, Torres NV, Rodríguez AT. Instituto de Farmacia y Alimentos Universidad de La Habana. Vol. 34, Rev Cubana Farm. 2000.

113. Feng N, Wei Y, Feng J, Tang Q, Zhang Z, Zhang J, et al. Preparative isolation of ganoderic acid S, ganoderic acid T and ganoderol B from *Ganoderma lucidum* mycelia by high-speed counter-current chromatography. Biomedical Chromatography. 2018 Oct 1;32(10).

114. Weng Y, Xiang L, Matsuura A, Zhang Y, Huang Q, Qi J. Ganodermasides A and B, two novel anti-aging ergosterols from spores of a medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* on yeast via UTH1 gene. Bioorg Med Chem. 2010 Feb;18(3):999–1002.

115. Ding HY, Wang TY, Wu JY, Zhang YR, Chang TS. Novel Ganoderma triterpenoid saponins from the biotransformation-guided purification of a commercial Ganoderma extract. J Biosci Bioeng. 2023 May;135(5):402–10.

116. Ramírez Ayala W, Guevara Bravo CA, Rodríguez Espinosa JA. Ácidos ganodéricos en Ganoderma sp, *Ganoderma lucidum* y en su sustrato agotado. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 2020 Oct 20;19(1).

117. Shao Y, Qiao L, Wu L, Sun X, Zhu D, Yang G, et al. Structure identification and anticancer pharmacological prediction of triterpenes from *Ganoderma lucidum*. Molecules. 2016 May 1;21(5).

118. Sumner LW, Amberg A, Barrett D, Beale MH, Beger R, Daykin CA, et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. Metabolomics. 2007 Sep 19;3(3):211–21.

119. La Facultad De Química Farmacéutica R DE, Moreno HP, Martínez AM, Fujimoto Y. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE DOS ESTEROLES Y UN TRITERPENOIDE DEL CUERPO FRUCTÍFERO DE *Ganoderma lucidum* CULTIvADO EN COLOMbIA ISOLATION AND IDENTIFICATION OF TWO STEROLS AND A TRITERPENE FROM DRY FRUITING bODIES OF *Ganoderma lucidum* CULTIvATED IN COLOMbIA artículo corto.

120. Pérez CA, Gilmar I, Santafé G, Torres MG, Torres OL, Montaño MC, et al. Composición lipídica y evaluación de las actividades antioxidante y leishmanicida del basidiomiceto Ganoderma sp. Lipid composition and evaluation of the antioxidant and leishmanicidal activities of the basidiomycete Ganoderma sp [Internet]. Vol. 21, Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2016. Available from: http://scielo.sld.cu

121. Adu JK, Amengor CDK, Kabiri N, Orman E, Patamia SAG, Okrah BK. Validation of a Simple and Robust Liebermann-Burchard Colorimetric Method for the Assay of Cholesterol in Selected Milk Products in Ghana. Int J Food Sci. 2019;2019.

122. Bastola KP, Guragain YN, Bhadriraju V, Vadlani PV. Evaluation of Standards and Interfering Compounds in the Determination of Phenolics by Folin-Ciocalteu Assay Method for Effective Bioprocessing of Biomass. Am J Analyt Chem. 2017;08(06):416–31.

123. Gutiérrez Gaitén YI, Miranda Martínez M, Varona Torres N, Rodríguez AT. Validación de 2 métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en Psidium guajaba, L. Revista Cubana de Farmacia. 2000;34(1):50–5.

124. López-Legarda X, Taramuel-Gallardo A, Arboleda-Echavarría C, Segura-Sánchez F, Luis Fernando Restrepo-Betancur E. Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales Comparison of methods using sulfuric acid for determination of total sugars [Internet]. Vol. 29, Rev. Cubana Quím. 2017. Available from: http://ojs.uo.edu.cu/index.php/cq

125. Bello Gil C, Bocourt C, Maqueira D. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. Available from: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120664006

126. Barrera López RE, Arrubla Vélez JP. Análisis de fitoesteroles en la semilla de Persea americana miller (Var. Lorena) por cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta eficiencia. Revista Facultad de Ciencias Básicas. 2017 Feb 7;13(1):35–41.

127. Mohanta TK. Fungi contain genes associated with flavonoid biosynthesis pathway. J Funct Foods [Internet]. 2020;68(December 2019):103910. Available from: https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103910

128. Zou CX, Wang XB, Lv TM, Hou ZL, Lin B, Huang XX, et al. Flavan derivative enantiomers and drimane sesquiterpene lactones from the Inonotus obliquus with neuroprotective effects. Bioorg Chem. 2020 Mar 1;96.

129. Sato N, Li W, Tsubaki M, Higai K, Takemoto M, Sasaki T, et al. Flavonoid glycosides from Japanese Camellia oil cakes and their inhibitory activity against advanced glycation end-products formation. J Funct Foods. 2017;35:159–65.

130. Argueta-Solís MG, Aguilar CN, Pintor-Ibarra LF, Chávez-González M, Rojas-Molina R, Wong-Paz JE, et al. INHIBICIÓN DE LA OXIDACIÓN DE LÍPIDOS Y CONSTITUYENTES FENÓLICOS RELACIONADOS EN LA MADERA Y LA CORTEZA DE TRES ESPECIES DE ENCINO (Quercus candicans, Q. laurina y Q. rugosa) INHIBITION OF LIPID OXIDATION AND RELATED PHENOLIC CONSTITUENTS IN THE WOOD AND BARK OF THREE OAK SPECIES (Quercus candicans, Q. laurina, and Q. rugosa).

131. Ahmad MF. *Ganoderma lucidum*: Persuasive biologically active constituents and their health endorsement. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2018 Nov;107:507–19.

132. Aramabašić Jovanović J, Mihailović M, Uskoković A, Grdović N, Dinić S, Vidaković M. The Effects of Major Mushroom Bioactive Compounds on Mechanisms That Control Blood Glucose Level. Journal of Fungi. 2021 Jan 16;7(1):58.

133. Kuang H, Jiao Y, Wang W, Wang F, Chen Q. Characterization and antioxidant activities of intracellular polysaccharides from Agaricus bitorquis (QuéL.) Sacc. Chaidam ZJU-CDMA-12. Int J Biol Macromol. 2020 Aug 1;156:1112–25.

134. Cabrera Navarro SA, Sandoval Aldana AP, Forero Longas F. Potencial antioxidante y antimicrobiano de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de Passiflora ligularis (Granadilla). Acta Agron. 2014 Jun 26;63(3):204–11.

135. Andrés Zárate-Chaves C, Camila Romero-Rodríguez M, Camilo Niño-Arias F, Robles-Camargo J, Linares-Linares M, Ximena Rodríguez-Bocanegra M, et al. Optimizing a culture medium for biomass and phenolic compounds production using *Ganoderma lucidum* [Internet]. 2013. Available from: www.sbmicrobiologia.org.br

136. Abate M, Pepe G, Randino R, Pisanti S, Basilicata MG, Covelli V, et al. *Ganoderma lucidum* ethanol extracts enhance re-epithelialization and prevent keratinocytes from free-radical injury. Pharmaceuticals. 2020 Sep 1;13(9):1–16.

137. Rivas-Santiago B, Sada E, Hernández-Pando R, Tsutsumi V. Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. Salud Publica Mex. 2006;48(1):62–71.

138. Smallwood MJ, Nissim A, Knight AR, Whiteman M, Haigh R, Winyard PG. Oxidative stress in autoimmune rheumatic diseases. Vol. 125, Free Radical Biology and Medicine. Elsevier Inc.; 2018. p. 3–14.

139. Michailidis M, Moraitou D, Tata DA, Kalinderi K, Papamitsou T, Papaliagkas V. Alzheimer's Disease as Type 3 Diabetes: Common Pathophysiological Mechanisms between Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes. Vol. 23, International Journal of Molecular Sciences. MDPI; 2022.

140. Severyn B, Liehr RA, Wolicki A, Nguyen KH, Hudak EM, Ferrer M, et al. Parsimonious discovery of synergistic drug combinations. ACS Chem Biol. 2011 Dec 1;6(12):1391–
8.

141. Tanrikulu Y, Krüger B, Proschak E. The holistic integration of virtual screening in drug discovery. Vol. 18, Drug Discovery Today. 2013. p. 358–64.

142. Serrano Díaz N, Guío Mahecha E, González A, Plata Paredes L, Quintero Lesmes

DC, Becerra Bayona S. CUANTIFICACIÓN DE VITAMINA D: DE LA INVESTIGACIÓN A LA PRÁCTICA CLÍNICA. Biosalud [Internet]. 2017 Jun 20;16(1):67–79. Available from: http://biosalud.ucaldas.edu.co/downloads/Biosalud16(1)_8.pdf

143. The fitness for purpose of analytical methods : a laboratory guide to method validation and related topics. 70 p.

144. Exclusivamente para fines educativos CONSTRUYENDO UNA CIENCIA MEJOR ENTRE AGILENT Y USTED Cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC): fundamentos y teoría. 2016.

145. Shiao MS. Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: Occurrence, biological activities, and pharmacological functions. Vol. 3, Chemical Record. 2003. p. 172–80.

146. Cör D, Knez Ž, Hrnčič MK. Antitumour, antimicrobial, antioxidant and antiacetylcholinesterase effect of *Ganoderma Lucidum* terpenoids and polysaccharides: A review. Vol. 23, Molecules. MDPI AG; 2018.

147. Qian Z, Zhao J, Li D, Hu D, Li S. Analysis of global components in Ganoderma using liquid chromatography system with multiple columns and detectors. J Sep Sci. 2012 Oct;35(20):2725–34.

148. Qin FY, Yan YM, Tu ZC, Cheng YX. (±) Gancochlearols A and B: cytotoxic and COX2 inhibitory meroterpenoids from Ganoderma cochlear. Nat Prod Res [Internet]. 2018;0(0):1–7. Available from: https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1531859

149. Abate M, Pepe G, Randino R, Pisanti S, Basilicata MG, Covelli V, et al. *Ganoderma lucidum* ethanol extracts enhance re-epithelialization and prevent keratinocytes from free-radical injury. Pharmaceuticals. 2020 Sep 1;13(9):1–16.

150. Abate M, Pepe G, Randino R, Pisanti S, Basilicata MG, Covelli V, et al. *Ganoderma lucidum* ethanol extracts enhance re-epithelialization and prevent keratinocytes from free-radical injury. Pharmaceuticals. 2020 Sep 1;13(9):1–16.

151. Oluba OM. Ganoderma terpenoid extract exhibited anti-plasmodial activity by a mechanism involving reduction in erythrocyte and hepatic lipids in Plasmodium berghei infected mice. Lipids Health Dis. 2019;18(1):1–9.

152. Rubiano Flórez DF, Chegwin-Angarita C, Melo OO, Nieto-Ramírez IJ. Estudio comparativo de la producción de biomasa en fermentación superficial y en estado líquido de macromicetos con diferentes fuentes nutrimentales. Rev Colomb Biotecnol. 2019 Jan 1;21(1):39–46.

153. Shao Y, Qiao L, Wu L, Sun X, Zhu D, Yang G, et al. Structure identification and anticancer pharmacological prediction of triterpenes from *Ganoderma lucidum*. Molecules. 2016 May 1;21(5).

154. Torres S, Cajas D, Palfner G, Astuya A, Aballay A, Pérez C, et al. Steroidal composition and cytotoxic activity from fruiting body of Cortinarius xiphidipus. Nat Prod Res. 2017 Feb 16;31(4):473–6.

155. Roach JAG, Yurawecz MP, Kramer JKG, Mossoba MM, Eulitz K, Ku Y. Gas chromatography—High resolution selected-ion mass spectrometric identification of trace 21:0 and 20:2 fatty acids eluting with conjugated linoleic acid isomers. Lipids. 2000 Jul;35(7):797–802.

156. Silva MIG, de Aquino Neto MR, Teixeira Neto PF, Moura BA, do Amaral JF, de Sousa DP, et al. Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. Pharmacol Biochem Behav. 2007 Dec;88(2):141–7.

157. Castro AJ, Juárez JR, Ramos NJ, Raez JE, Retuerto P FO, Gonzales SA. Structural analysis of ethanol extract of the stem of Brunfelsia grandiflora D. Don and its neuropathological effect on rat cerebellum. Vol. 15, Ciencia e Investigación. 2012.

158. Luo Y, Huang Y, Yuan X, Zhang L, Zhang X, Gao P. Evaluation of Fatty Acid Composition and Antioxidant Activity of Wild-Growing Mushrooms from Southwest China. Int J Med Mushrooms. 2017;19(10):937–47.

159. Babu S, Jayaraman S. An update on β-sitosterol: A potential herbal nutraceutical for diabetic management. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2020 Nov;131:110702.

160. Zrnić-Ćirić M, Kotur-Stevuljević J, Stanković I, Đordjević B, Baralić I, Ostojić M. Association of octacosanol supplementation with redox status in patients on chronic statin therapy. J Med Biochem. 2023;42(1):47–57.

161. Hernández-Sámano AC, Guzmán-García X, García-Barrientos R, GuerreroLegarreta I. Actividad enzimática de proteasas de Cyprinus carpio (Cypriniformes: Cyprinidae) extraídas de una laguna contaminada en méxico. Rev Biol Trop. 2017;65(2):589–98.

162. Deutscher M P. Guide to protein purification. Methods in enzymology. Vol. 182. San Diego California: Academic Press, INC; 1990. 174–185 p.

163. edilene maestria.

164. HERMANSON G., MALLIA A., SMITH P. Immobilized affinity ligand techniques. San Diego: Academic Press, INC.; 1992. 88-90. p.

165. Perera Marín G, Falcón Alcántara A, Murcia Mejía C, Hernández Cerón J, González Padilla E. Purifi cación de cinco isoformas de la hormona luteinizante bovina (bLH).

Caracterización fi sicoquímica, biológica e inmunológica Purifi cation of fi ve bovine luteinizing hormone (bLH) isoforms. Chemical, physical, biological and immunological characterization. Vol. 35, Vet. Méx. 2004.

166. Kino K, Yamashita A, Yamaoka K, Watanabe J, Tanaka S, Ko K, et al. Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, Ling Zhi-8 (LZ-8), from Ganoderma lucidium. Journal of Biological Chemistry. 1989;264(1):472–8.

167. Siebert KJ, Lynn PY. Comparison of Polyphenol Interactions with

Polyvinylpolypyrrolidone and Haze-Active Protein. Journal of the American Society of Brewing Chemists. 1998 Jan 6;56(1):24–31.

168. Ejike UC, Chan CJ, Okechukwu PN, Lim RLH. New advances and potentials of fungal immunomodulatory proteins for therapeutic purposes. Crit Rev Biotechnol. 2020 Nov 16;40(8):1172–90.

169. Liu C, Zhao X, Xu XC, Li LR, Liu YH, Zhong SD, et al. Hemagglutinating activity and conformation of a lactose-binding lectin from mushroom Agrocybe cylindracea. Int J Biol Macromol. 2008 Mar;42(2):138–44.

170. Li Q zhang, Wang X fei, Zhou X wei. Recent status and prospects of the fungal immunomodulatory protein family. Crit Rev Biotechnol. 2011 Dec 9;31(4):365–75.

171. Li QZ, Chang YZ, Su KQ, Wang XL, Bai XH, Zhou XW. Cloning and Characterization of Promoters of the Fungal Immunomodulatory Protein Genes from Ganoderma spp. (Agaricomycetes) and Their Response to Methyl Jasmonate and Salicylic Acid. Int J Med Mushrooms. 2018;20(2):177–89.

172. Zhou S, Guan S, Duan Z, Han X, Zhang X, Fan W, et al. Molecular cloning, codonoptimized gene expression, and bioactivity assessment of two novel fungal immunomodulatory proteins from Ganoderma applanatum in Pichia. Appl Microbiol Biotechnol. 2018 Jul 28;102(13):5483–94.

173. Zhou X, Xie M, Hong F, Li Q, Lin J. Genomic Cloning and Characterization of a FIPgsi Gene Encoding a Fungal Immunomodulatory Protein from Ganoderma sinense Zhao et al. (Aphyllophoromycetideae). Int J Med Mushrooms. 2009;11(1):77–86.

174. Lin WH, Hung CH, Hsu CI, Lin JY. Dimerization of the N-terminal Amphipathic α-Helix Domain of the Fungal Immunomodulatory Protein from Ganoderma tsugae (Fip-gts) Defined by a Yeast Two-hybrid System and Site-directed Mutagenesis. Journal of Biological Chemistry. 1997 Aug;272(32):20044–8.

175. Bastiaan-Net S, Chanput W, Hertz A, Zwittink RD, Mes JJ, Wichers HJ. Biochemical and functional characterization of recombinant fungal immunomodulatory proteins (rFIPs). Int Immunopharmacol. 2013 Jan;15(1):167–75.

176. Li Q, Wang X, Chen Y, Lin J, Zhou X. Cytokines Expression Induced by Ganoderma sinensis Fungal Immunomodulatory Proteins (FIP-gsi) in Mouse Spleen Cells. Appl Biochem Biotechnol. 2010 Nov 20;162(5):1403–13.

177. Xu H, Kong YY, Chen X, Guo MY, Bai XH, Lu YJ, et al. Recombinant FIP-gat, a Fungal Immunomodulatory Protein from Ganoderma atrum , Induces Growth Inhibition and Cell Death in Breast Cancer Cells. J Agric Food Chem. 2016 Apr 6;64(13):2690–8.

178. Hsin IL, Hsu JC, Wu WJ, Lu HJ, Wu MF, Ko JL. GMI, a fungal immunomodulatory protein from Ganoderma microsporum , induce apoptosis via β-catenin suppression in lung cancer cells. Environ Toxicol. 2018 Sep;33(9):955–61.

179. Han JW, Yoon KS, Klochkova TA, Hwang MS, Kim GH. Purification and characterization of a lectin, BPL-3, from the marine green alga Bryopsis plumosa. J Appl Phycol. 2011 Aug 1;23(4):745–53.

180. Irene Y, Gaitén G, Martínez MM, Torres NV, Rodríguez AT. Instituto de Farmacia y Alimentos Universidad de La Habana. Vol. 34, Rev Cubana Farm. 2000.