

Funcionalidad antibacteriana y antioxidante de extractos hidroalcohólicos de *Phellinus merrillii*

Juan Manuel Leyva, Julio Jesumar Pérez-Carlón, Gustavo Adolfo González-Aguilar
Martín Esqueda, Jesús Fernando Ayala-Zavala

Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Carretera a la Victoria km. 0.6. Apartado Postal 1735. Hermosillo (83000), Sonora, México

Antibacterial and antioxidant functionality of hydroalcoholic extracts from *Phellinus merrillii*

Abstract. Recently the food, pharmacy and cosmetic industries have focused on the search for natural compounds with antimicrobial and antioxidant properties, commonly these compounds are obtained from plants. Nowadays, macroscopic fungus are being considered for the extraction these compounds. For this reason, the objective of the present work was to evaluate the antibacterial and antioxidant capacity of fractionated methanolic extracts (polar and non-polar) from *Phellinus merrillii*. The non-fractionated methanolic extract showed the highest content of phenolics (913.91 mg gallic acid equivalents/g, mgGAE/g), flavonoids (563.83 mg quercetin equivalents/g, mgQE/g), the lowest efficient concentration to inactivate the 50% of the free radical DPPH (0.1767 g/L), and the highest inhibition percent against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* Choleraesuis and *Listeria monocytogenes*. Followed by the non-polar fraction with values 254.50 mgGAE/g, 179.44 mgQE/g and 0.7238 g/L, and the polar fraction 254.50 mgGAE/g, 163.98 mgQE/g and 1.1767 g/L. Moreover, the antibacterial activity correlated positively with the total phenolic, flavonoid content and antioxidant activity for all the extracts. Therefore, *P. merrillii* could be a source of antibacterial and antioxidant extracts.

Keywords: Basidiomycetes, natural products, total phenolics, free radicals, antibiotic.

Resumen. En los últimos años las industrias de alimentos, farmacéutica y cosmética se han enfocado en la búsqueda de compuestos naturales con propiedades antimicrobianas y antioxidantes, los cuales se obtienen principalmente de plantas. Sin embargo, recientemente los hongos han sido considerados foco de estudio para la extracción de estos compuestos. Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad antibacteriana y antioxidante de extractos metanólicos fraccionados (polar y no polar) del hongo *Phellinus merrillii*. El extracto metanólico sin fraccionar presentó el mayor contenido de fenoles (913.91 mg de equivalentes de ácido gálico/g, mgEAG/g), flavonoides totales (563.83 mg de equivalentes de quercetina/g, mgEQ/g), la concentración eficiente más baja para inhibir el 50% del radical libre DPPH (0.1767 g/L) y el mayor porcentaje de inhibición contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* Choleraesuis y *Listeria monocytogenes*. Seguido de la fracción no polar con valores de 254.50 mgEAG/g, 179.44 mgEQ/g y 0.7238 g/L, y la fracción polar 254.50 mgEAG/g, 163.98 mgEQ/g y 1.1767 g/L. Adicionalmente, la inhibición bacteriana correlacionó positivamente con el contenido de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante para todos los extractos. Por ello, el hongo *P. merrillii* podría ser una fuente de extractos con propiedad antibacteriana y antioxidante.

Palabras clave: Basidiomycetes, productos naturales, fenoles totales, radicales libres, antibiótico.

Received 18 October 2012; accepted 22 May 2013.

Recibido 18 de octubre 2012; aceptado 22 de mayo 2013.

Autor para correspondencia: J. Fernando Ayala-Zavala
e-mail: jayala@ciad.mx

Introducción

La actividad antimicrobiana y antioxidante de una gran variedad de compuestos fenólicos de origen natural a partir de diferentes plantas han sido estudiados en detalle (Rodríguez-Vaquero *et al.*, 2010). Estos compuestos desempeñan un papel importante en la protección contra agentes patógenos, reacciones de oxidación y pueden retrasar el crecimiento de microorganismos. Los compuestos fenólicos presentes en plantas como el ácido gálico y ácido elágico presentan capacidad para inhibir el crecimiento de hongos y bacterias (Zambuchini *et al.*, 2008). Por otro lado, el uso de extractos de hongos como antioxidantes se está volviendo cada vez más popular (Mau *et al.*, 2002).

Estudios recientes se han centrado en hongos de la división Basidiomycota, debido a la amplia gama de compuestos biológicamente activos que han sido aislados a partir de éstos (Muszynska *et al.*, 2011; Balakumar *et al.*, 2011). En especial los hongos del género *Phellinus*, son conocidos por su uso en la medicina tradicional de la cultura China (Muszynska *et al.*, 2011). Los cuerpos fructíferos de estos hongos representan una fuente importante de fenoles, flavonoides, vitaminas y alcaloides con capacidad antioxidante y antibacteriana (Balakumar *et al.*, 2011). Adicionalmente se ha considerado el cultivo sumergido de estos hongos para la obtención de extractos ricos en compuestos fenólicos (Jung *et al.*, 2008). El potencial biotecnológico de estos hongos se refleja en el reciente aumento del número de patentes de sus aplicaciones como fuente de antioxidantes y antimicrobianos en farmacia y cosmética. Se patentó el uso del compuesto Phellinsina aislado de extractos de *Phellinus* sp. para uso en la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares, inhibiendo la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL),

proponiendo su uso médico y alimentario (Kim *et al.*, 2010). Otra de las patentes publicadas es la generación de extractos inmunomoduladores a partir de cultivos sumergidos de una mezcla de hongos, de los cuales resaltan *Phellinus pini* y *Phellinus linteus* (Kristiansen, 2006). Adicionalmente se ha patentado el efecto antimicrobiano y antioxidante de extractos de distintos hongos (*P. linteus*) y plantas con la finalidad de tratar el acné y fotoenvejecimiento (Maloney y Barger, 2010). Una aplicación en la industria alimentaria se refleja en la patente que plantea la adicción de extractos de micelio de distintos hongos dentro de estos *P. linteus*, para la formulación de una bebida tipo café con potencial antioxidante, el cual fue probado sobre líneas celulares de cáncer (Hammond *et al.*, 2010).

Estudios previos sobre diferentes especies de *Phellinus* mostraron alta actividad antioxidante en sus extractos metanólicos, destacando el hongo *Phellinus merrillii* (Murr.) Ryv. (Ayala-Zavala *et al.*, 2012a). Dicho extracto presentó el mayor contenido de fenoles y flavonoides totales, así como un menor EC₅₀ para la inactivación del radical libre DPPH, comparado con extractos de los hongos *Phellinus badius* (Cooke) G. Cunn, *Phellinus fastuosus* (Lév.) Ryv. y *Phellinus grenadensis* (Murr.) Ryv. La actividad antioxidante y antibacteriana de extractos naturales depende del disolvente usado para la extracción (Yang *et al.*, 2009). Algunos procedimientos para la extracción de estos compuestos implican el uso de grasas y aceites, disolventes orgánicos, soluciones alcalinas y dióxido de carbono supercrítico (Pokorny y Korczak, 2001). Los disolventes alcohólicos han sido comúnmente empleados para extraer compuestos fenólicos de fuentes naturales; éstos dan un alto rendimiento del extracto total aunque no son altamente selectivos para compuestos fenólicos. Particularmente mezclas de alcoholes/agua han mostrado ser más eficientes en la extracción de compuestos fenólicos que el disolvente individual (Yilmaz y Toledo, 2006). Diferentes estudios

muestran que el contenido de fenoles en los extractos varía con la polaridad de los disolventes. Por ejemplo, metanol absoluto es regularmente utilizado para la extracción de polifenoles del té (Yao *et al.*, 2006), mientras que la fracción con acetona al 50% resultó ser más eficiente que el agua para la extracción de compuestos fenólicos del trigo (Zhou y Yu, 2004). En este contexto es importante optimizar el proceso de extracción que permita obtener el mayor potencial antibacteriano y antioxidante de extractos de hongos. Debido a esto, se propone evaluar el efecto de diferentes fracciones polares y no polares de extractos metanólicos del hongo *P. merrillii* sobre sus propiedades antibacterianas y antioxidantes.

Materiales y métodos

Preparación de extractos

Especímenes de hongos *Phellinus* fueron colectados en el municipio de Álamos, Sonora y secados a 60 °C por 3 días, la identificación taxonómica de *P. merrillii* se realizó de acuerdo a los métodos de Gilbertson y Ryvardeen (1986). Se realizaron cortes en los tejidos del himenio del cuerpo fructífero de los hongos, los cuales fueron identificados en base a sus características macro y microscópicas. El ejemplar de *Phellinus merrillii* se conserva en la colección de macromicetos del Centro de Estudios Superiores del Estado de Sonora (CESUES 10330). Muestras de *P. merrillii* (10 g) se colocaron en recipientes conteniendo 100 mL de metanol:agua (7:3), macerándose en oscuridad por 10 días. Después de este tiempo, el extracto se filtró y el metanol del filtrado fue retirado usando un evaporador rotatorio a presión reducida y temperatura de 45 °C. La fracción acuosa se liofilizó, obteniendo el extracto seco con un rendimiento del 15 %, el cual se sometió a una hidrólisis alcalina con NaOH 4 M por 4 h en ausencia de luz. Después se realizó una hidrólisis

ácida con HCl 4 M hasta alcanzar un pH de 2, en este punto se obtiene el extracto denominado metanólico. En la siguiente etapa el extracto hidrolizado se sometió a separación de fases mediante lavados con acetato de etilo, obteniendo dos fracciones: una fracción polar y una fracción no-polar (Oboh y Rocha, 2007). En total se obtuvieron 3 extractos: extracto metanólico, fracción polar y fracción no polar, a los cuales, se les evaluó la capacidad antioxidante y antibacteriana.

Contenido de fenoles totales

Los fenoles totales se determinaron de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu propuesto por Singleton y Rossi (1965). La absorbancia fue determinada en un espectrofotómetro UV-Visible (Varian Cary 50 Bio) a una longitud de onda de 765 nm. Esta técnica se aplicó a cada una de las muestras por triplicado, la concentración de fenoles se calcula con base a la curva de calibración y se expresó como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mgEAG/g).

Contenido de flavonoides totales

La determinación de flavonoides totales se realizó por el método descrito por Zhishen *et al.* (1999). La absorbancia de las muestras fue evaluada a una longitud de onda de 415 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Visible (Varian Cary 50 Bio), esto se realizó para cada uno de los extractos preparados anteriormente y por triplicado. La absorbancia de cada muestra se comparó con una curva estándar de quercetina. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de quercetina por gramo de extracto (mgEQ/g).

Capacidad antioxidante DPPH

La capacidad de los extractos de *P. merrillii* para inhibir el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) fue calculada de acuerdo al método propuesto por González-Aguilar *et al.* (2007). La inhibición del radical se observó mediante la disminución de la absorbancia a 515 nm en un

espectrofotómetro UV-Visible (Varian Cary 50 Bio). Los resultados se expresaron como EC_{50} que es la concentración eficiente de los extractos para inhibir al 50% la actividad del radical DPPH.

Capacidad antibacteriana

Se evaluó la capacidad antibacteriana de los diferentes extractos contra las cepas patógenas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Choleraesuis (ATCC 7001), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43890) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Como inóculo se utilizaron tubos con caldo soya tripticasa con un crecimiento de 1×10^5 UFC/mL para cada bacteria. Se agregó 1 mL de cada inóculo en tubos con caldo Muller Hinton (1 mL) y 2 concentraciones de cada extracto (4.2 mg/mL y 2.1 mg/mL) y se incubó por 24 h. Posteriormente se procedió a realizar un conteo en placa por estriado en agar Müller Hinton tomando una alícuota (1 μ L), y se incubó por 24 h a 37 °C. La inhibición bacteriana se calculó comparando las UFC de un control contra cada tratamiento y se expresó como porcentaje de inhibición.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza ($P \leq 0.05$) con un diseño completamente al azar, donde se evaluó el efecto de los factores: extracto metanólico, fracción polar y fracción no polar, sobre las variables de respuesta: fenoles totales, flavonoides totales, EC_{50} (DPPH), y % de inhibición de las bacterias, el análisis de medias se realizó por la prueba de Tukey-Kramer. Se realizaron correlaciones de Pearson ($P \leq 0.05$) del contenido de fenoles, flavonoides totales y capacidad antioxidante de cada cepa evaluada, esto se llevó a cabo en el paquete estadístico NCSS versión 2007.

Resultados y discusión

El contenido de fenoles totales obtenido de los distintos extractos de *P. merrillii* se muestra en la Figura 1a, en la cual podemos observar la diferencia significativa ($P \leq 0.05$) del contenido de fenoles encontrada entre el extracto metanólico y las fracciones polar y no polar (913.91, 257.89 y 254.50 mgEAG/g, respectivamente), siendo el extracto metanólico tres veces mayor que las fracciones polar y no polar, entre las cuales no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$).

Los resultados obtenidos en flavonoides (Figura 1b) muestran la misma tendencia observada para el caso de los fenoles. Encontrando diferencia significativa entre extractos ($P \leq 0.05$), siendo el extracto metanólico el de mayor contenido con 563.84 mgEQ/g, mientras que la fracción polar y no polar presentaron valores de 163.99 y 179 mgEQ/g, respectivamente, siendo estas últimas estadísticamente iguales. El contenido de estos compuestos podría otorgar a los extractos evaluados un alto potencial antioxidante, el cual se cree pudiera estar relacionado a su vez con la actividad antibacteriana.

El extracto metanólico presentó el valor menor para inhibir el 50% del radical estable DPPH de EC_{50} (0.1767 g/L), seguido de la fracción no polar (0.7238 g/L) y por último, la fracción polar (1.1776 g/L) (Figura 1c), encontrando diferencia significativa entre los extractos ($P \leq 0.05$). Lo que confirma la tendencia manifestada en la evaluación de los compuestos bioactivos (fenoles y flavonoides totales).

Trabajos previos indican que los procedimientos y los disolventes de extracción afectan el contenido de fenoles y flavonoides en extractos de *Phellinus* spp. Los extractos metanólicos obtenidos de *P. gilvus*, *P. rimosus* y *P. badius* presentaron un contenido de fenoles totales de 49.30, 46.50 y 44.76 mgEAG/g, respectivamente, y flavonoides totales 30.58, 28.04 y 26.48 mgEQ/g, respectivamente; sin embargo,

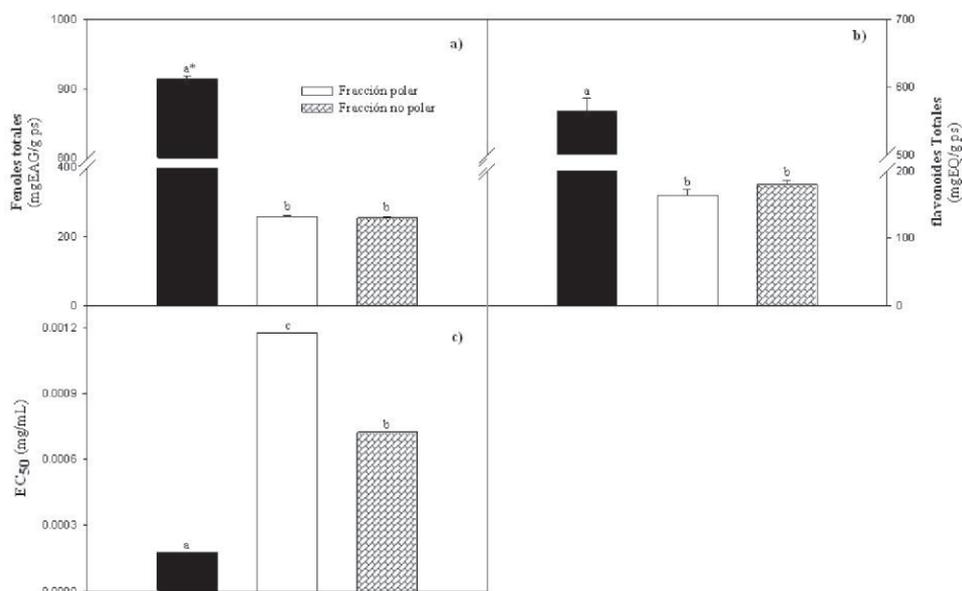


Figura 1. a) Contenido de fenoles totales de los distintos extractos de *P. merrillii*; b) flavonoides totales de los extractos; c) Concentración de los distintos extractos de *P. merrillii* necesaria para inhibir el cincuenta por ciento del radical DPPH (EC₅₀). * Diferente literal dentro de la misma gráfica indica diferencia entre extractos.

estos no fueron sometidos a hidrólisis ni separación de fases como en el presente estudio (Ayala-Zavala *et al.*, 2012b). Comparando con un estudio similar donde se realizaron extractos metanólicos de *P. merrillii*, *P. fastuosus*, *P. grenadensis* y *P. badius* (Ayala-Zavala *et al.*, 2012a), los cuales fueron hidrolizados y separados por polaridad en fracciones, se encontró que el organismo con mayor contenido de fenoles y flavonoides fue *P. merrillii* (873.66 mgEAG/g y 291.71 mgEQ/g, respectivamente). Se observó que las fracciones no polares presentaron el mayor contenido de dichos compuestos, incluso mayores a los resultados obtenidos en el presente estudio de la fracción no polar. Esta variación se puede atribuir a los diferentes factores bióticos y abióticos que se involucran en el hábitat de los hongos (Zhu *et al.*, 2011). Haciendo una comparación entre el contenido de fenoles y flavonoides de las fracciones polar y no polar del trabajo previo con *P. merrillii* y el presente estudio, se observa que la separación de fases puede causar una disminución del contenido fenólico en el extracto metanólico. El proceso de extracción de compuestos fenólicos a partir de *Xerula*

furfuracea, *Schizophyllum commune*, *Polyporus tenuiculus*, *Hygrocybe conica* y *Pleurotus florida*, presentó un mayor rendimiento al utilizar metanol como disolvente que éter de petróleo (Wong y Chye, 2009). En ese mismo estudio los extractos de *H. conica* presentaron contenidos de fenoles totales de 42.21 y 28.23 mgEAG/g, usando metanol y éter de petróleo, respectivamente.

Estudios previos muestran una relación directa entre el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de *Phellinus* spp. Extractos metanólicos de *P. gilvus* presentaron un EC₅₀ de 9 g/L, seguido por los extractos de *P. rimosus* y *P. badius* con 10 y 13 g/L, respectivamente; siendo alto el EC₅₀ de *P. gilvus* comparado con los obtenidos en el presente estudio (Ayala-Zavala *et al.*, 2012b). El extracto no polar de *P. badius* mostró la concentración más alta, seguido por su fracción polar, la fracción polar de *P. grenadensis*, polar de *P. merrillii*, polar de *P. fastuosus*, no polar de *P. grenadensis*, no polar de *P. fastuosus* y no polar de *P. merrillii* (6.00, 3.42, 2.22, 2.14, 1.89, 1.31, 0.88, 0.45 g/L, respectivamente) (Ayala-Zavala *et*

al., 2012a). El extracto de éter de petróleo de la especie *P. florida* presentó una EC_{50} de 1.87 g/L (Wong y Chye, 2009), la cual es mayor al valor obtenido en este estudio para el extracto metanólico de *P. merrillii*.

El potencial antibacteriano de los extractos de *P. merrillii* se evaluó contra cepas Gram (+) (*L. monocytogenes* y *S. aureus*) y Gram (-) (*S. Choleraesuis* y *E. coli* O157:H7). Se observaron diferencias ($P \leq 0.05$) entre extractos y concentraciones, la concentración de 4.2 mg/mL de cada uno de los distintos extractos presentó un 100% de inhibición contra todas las bacterias expuestas. No obstante, para la concentración de 2.1 mg/mL se observaron diferentes porcentajes de inhibición según la cepa evaluada; el extracto metanólico fue el más efectivo contra *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* y *S. Choleraesuis*, con valores de 63.14, 61, 38 y 35 %, respectivamente. Los extractos polar y no polar presentaron la misma tendencia, contra *S. aureus* (53.86 y 42 %), seguido de *E. coli* (36 y 48 %) y *S. Choleraesuis* (35 y 38 %) y *L. monocytogenes* (22 y 25 %), respectivamente. En este contexto se observa que el extracto metanólico fue el más efectivo contra *S. aureus*.

Extractos acuosos de *P. gilvus* fueron evaluados como antimicrobianos contra distintas cepas Gram positivas como *S. aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, y como Gram negativas *E. coli*, *Salmonella typhimurium* y *Klepsiella pneumonia*, presentando únicamente inhibición contra las cepas de *L. plantarum*, *E. coli* y *K. pneumonia* con concentraciones mínimas inhibitorias de 45, 360 y 90 mg/L, respectivamente (Sittiwet y Puangpronpitag, 2008), a diferencia de lo encontrado en nuestro estudio donde los extractos de *P. merrillii* presentaron actividad antibacteriana contra cepas gram positivas y gram negativas. En otro estudio se evaluaron extractos metanólicos de 22 plantas medicinales a las cuales se les determinó la concentración mínima de inhibición (CMI) contra *E. coli*, *S. typhimurium*, *Salmonella typhi*, *Shigella*

sonnei y *Helicobacter pylori* obteniendo CMI's hasta de 20 mg/mL (Sakunpak y Panichayupakaranant, 2012), mientras que en nuestro estudio se pudo observar que con una concentración de 4.2 mg/mL no hubo crecimiento bacteriana. Con ello observamos el potencial de los extractos obtenidos en este trabajo comparado con la literatura en el cual se observa un alto contenido de compuestos fenólicos con actividad antibacteriana.

Se correlacionó el contenido de fenoles, flavonoides y EC_{50} contra la actividad antibacteriana de los extractos, resultando coeficientes de correlación de person (r) de 0.89 ($P \leq 0.0013$), 0.7457 ($P \leq 0.0211$), 0.7087 ($P \leq 0.0015$) y 0.8853 ($P \leq 0.0326$), para la inhibición de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Choleraesuis* y *E. coli* O157:H7, respectivamente. El contenido de flavonoides totales correlacionó con valores de $R \leq 0.8816$ ($P \leq 0.0017$), 0.7598 ($P \leq 0.0175$), 0.6926 ($P \leq 0.0031$) y 0.8584 ($P \leq 0.0387$), para la inhibición de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Choleraesuis* y *E. coli* O157:H7, respectivamente. De la misma manera la actividad antioxidante (EC_{50}) se correlacionó con valores de $R \leq 0.8562$ ($P \leq 0.0032$), 0.4554 ($P \leq 0.2180$), 0.989 ($P \leq 0.0001$) y 0.8039 ($P \leq 0.0090$), para la inhibición de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Choleraesuis* y *E. coli* O157:H7, respectivamente. Las correlaciones obtenidas en este estudio representan favorablemente la relación entre el contenido y la actividad antioxidante de los extractos de *P. merrillii* contra su actividad antibacteriana.

Conclusiones

Los extractos obtenidos del hongo basidiomiceto *P. merrillii* (extracto metanólico, fracción polar y fracción no polar) presentaron un alto contenido de compuestos bioactivos como fenoles y flavonoides, siendo mayoritario para el extracto metanólico, seguido por las fracciones. Esta

tendencia se manifestó sobre la capacidad antioxidante y la capacidad antibacteriana contra cepas enteropatógenas. Por lo tanto, se propone el método de extracción metanólica como un método eficaz en la generación de extractos antioxidantes y antibacterianos a partir de *P. merrillii*.

Literatura citada

- Ayala-Zavala, J.F., J.J. Pérez-Carlón, M. Esqueda, G.A. Gonzalez-Aguilar, J.M. Leyva, M.R. Cruz-Valenzuela, E. Moctezuma, 2012a. Polar fractionation affects the antioxidant properties of methanolic extracts from *Phellinus* spp. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 14: 563-573.
- Ayala-Zavala, J.F., B.A. Silva-Espinoza, M.R. Cruz-Valenzuela, M.A. Villegas-Ochoa, M. Esqueda, G.A. Gonzalez-Aguilar, Y. Calderon-Lopez, 2012b. Antioxidant and antifungal potential of methanol extracts of *Phellinus* spp. from Sonora, Mexico. *Revista Iberoamericana de Micología* 29: 132-138.
- Balakumar, R., E. Sivaprakasam, D. Kavitha, S. Sridhar, J.S. Kumar, 2011. Antibacterial and antifungal activity of fruit bodies of *Phellinus* mushroom extract. *International Journal of Biosciences* 1: 72-77.
- Gilbertson, R., L. Ryvarden, 1986. 1987: North American polypores 1-2. *Fungiflora*, Oslo.
- González-Aguilar, G.A., M.A. Villegas-Ochoa, M. Martínez-Téllez, A. Gardea, J.F. Ayala-Zavala, 2007. Improving antioxidant capacity of fresh cut mangoes treated with UV C. *Journal of Food Science* 72: 197-202.
- Hammond, G., P. Bates, A. Vaiserg, L. Liu, B. Xu, 2010. Synthesis of stable Organogold compounds and methods of use thereof, WO Patent 2,010,062,846.
- Jung, J.Y., I.K. Lee, S.J. Seok, H.J. Lee, Y.H. Kim, B.S. Yun, 2008. Antioxidant polyphenols from the mycelial culture of the medicinal fungi *Inonotus xeranticus* and *Phellinus linteus*. *Journal of Applied Microbiology* 104: 1824-1832.
- Kim, S.U., E.I. Hwang, J.R. Kim, T.S. Jeong, S.H. Lee, J.S. Moon, M.C. Rho, 2010. Pharmaceutical composition and health food comprising extract of *Phellinus* sp. PL3 or phellinsin A isolated from the same as an effective component for prevention and treatment of cardiovascular disease, Google Patents.
- Kristiansen, B., 2006. Immune modulation compounds from fungi. WO Patent 2,006,007,848.
- Mau, J.L., H.C. Lin, C.C. Chen, 2002. Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6072-6077.
- Maloney, J., K. Barger, 2010. Acne treatment powder foundation. WO Patent 2,010,077,971.
- Muszyńska B, K. Sułkowska-Ziaja, H. Ekiert, 2011. Indole compounds in fruiting bodies of some edible Basidiomycota species. *Food Chemistry* 125:1306-8.
- Oboh, G.J., B.T. Rocha, 2007. Distribution and antioxidant activity of polyphenols in ripe and Unripe tree pepper (*Capsicum pubescens*). *Journal of Food Biochemistry* 31: 456-473.
- Pokorny, J., J. Korczak, 2001. Preparation of natural antioxidants, Woodhead Publishing Ltd.: Cambridge, England: 311-327.
- Rodriguez-Vaquero, M.J., L.R. Tomassini-Serravalle, M.C. Manca de Nadra, A.M. Strasser de Saad, 2010. Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions. *Food Control* 21: 779- 785.
- Sakunpak A., P. Panichayupakaranant, 2012. Antibacterial activity of Thai edible plants against gastrointestinal pathogenic bacteria and isolation of a new broad spectrum antibacterial polysoprenylated benzophenone, chamuangone. *Food Chemistry* 130: 826-831.
- Sittiwet, C., D. Puangprongpitag, 2008. Antibacterial activity of *Phellinus gilvus* aqueous extract. *International Journal of Pharmacology* 4: 500-502.
- Singleton, V.J., J.A. Rossi, 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.
- Wong, J.Y., F.Y. Chye, 2009. Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis* 22: 269-277.
- Yang, L., J.G. Jiang, W.F. Li, J. Chen, D.Y. Wang, L. Zhu, 2009. Optimum extraction process of polyphenols from the bark of *Phyllanthus emblica* L. based on the response surface methodology. *Journal of Separation Science* 32: 1437-1444.
- Yao, L.H., Y.M. Jiang, N. Caffin, B. D'Arcy, N. Datta, X. Liu, R. Singanusong, Y. Xu, 2006. Phenolic compounds in tea from Australian supermarkets. *Food Chemistry* 96: 614-620.
- Yilmaz, Y., R.T. Toledo, 2006. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 41-48.
- Zambuchini, B., D. Fiorini, M.C. Verdenelli, C. Orpianesi, R. Ballini, 2008. Inhibition of microbiological activity during sole (*Solea solea* L.) chilled storage by applying ellagic and ascorbic acids. *LWT - Food Science and Technology* 41: 1733-1738.
- Zhishen, J., T. Mengcheng, W. Jianming, 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64: 555-559.
- Zhou, K.Q., L.L. Yu, 2004. Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *LWT-Food Science and Technology* 37: 717-721.
- Zhu, H., S. Sun, S. Zhang, 2011. Enhanced production of total flavones and exopolysaccharides via *Vitreoscilla* hemoglobin biosynthesis in *Phellinus igniarius*. *Bioresource Technology* 102: 1747-1751.

