

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

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

César Díaz-Talamantes ¹, Cristina Burrola-Aguilar ¹, María Elena Estrada-Zúñiga ¹, Carmen Zepeda-Gómez ²

¹ Centro de Investigación en Recursos Bióticos, Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca km 14.5, San Cayetano, C.P. 50295, Toluca, Estado de México, México.

² Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca km 15.5, El Cerrillo Piedras Blancas, C.P. 50200, Toluca, Estado de México, México.

RESUMEN

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

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

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

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

ARTICLE HISTORY

Received: 31 July 2021 / Accepted: 08 October 2021

Published on line: 25 November 2021

CORRESPONDING AUTHOR

✉ Cristina Burrola-Aguilar, cba@uaemex.mx

ORCID 0000-0003-3499-8668

INTRODUCCIÓN

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

Los β -glucanos se encuentran en la pared celular de los hongos (Basidiomycetes) (Khan et al. 2018), ya sea de los esporomas o del micelio (Arango y Nieto 2013). Los β -glucanos son polímeros compuestos de unidades de glucosa unidas por enlaces glicosídicos de tipo β (1 \rightarrow 3) y ramificaciones laterales unidas por enlaces β (1 \rightarrow 6) (Pizarro et al. 2014). A pesar de presentar una composición simple de monosacáridos, los β -glucanos muestran una gran variabilidad estructural (Synytsya y Novak 2014). Esta variabilidad estructural les confiere diferentes propiedades fisicoquímicas como: masa molecular, longitud de sus cadenas (Wasser 2002), solubilidad (Xiao et al. 2004), frecuencia de ramificación (Miyazaki et al. 1979), estructuras y conformación en solución (Khan et al. 2018), que son los responsables de la actividad biológica y, por tanto, de su efecto sobre la salud humana.

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

Lycoperdon perlatum (Pers) 1796 (Lycoperdaceae) es un hongo comestible, valorado culturalmente como alimento de importancia nutricional en México (Burrola-Aguilar et al. 2012). Asimismo, en la medicina tradicional se le atribuyen propiedades curativas (Guzmán 1994) y se utiliza para tratar heridas, quemaduras, verrugas, picaduras de avispas o abejas (Guzmán 2008). Estudios científicos han demostrado que la actividad enzimática esterolítica de los esporomas silvestres de

L. perlatum tiene aplicaciones en la síntesis de productos químicos para la industria farmacéutica (Colak et al. 2009), así como la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos de metanol (Ramesh y Pattar 2010) y actividad antiproliferativa en una línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 de extractos acuosos, etanólicos y hexánicos (Novaković et al. 2015). Sin embargo, existen pocos estudios relacionados con el cultivo *in vitro* y la bioactividad de los β -glucanos de *L. perlatum*. Debido al potencial biotecnológico que presenta *L. perlatum* y a los escasos estudios sobre la bioactividad de los compuestos presentes en esta especie, este trabajo tiene el objetivo de evaluar la producción de fracciones acuosas y alcalinas de β -glucanos a partir de micelio cultivado *in vitro* y en esporomas silvestres de *L. perlatum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de biomasa

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

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

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

EC. 1

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

EC. 2

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

Extracción y purificación de β -glucanos

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

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

Extracción alcalina. La biomasa recuperada (micelio y esporomas) de la extracción acuosa se colocó en un recipiente con 10 volúmenes de una solución alcalina de NaOH al 2 % (p/v) con 0.1 % de NaBH_4 ; la solución con la biomasa se calentó a 80 °C durante 4 horas. Posteriormente se agregó ácido acético al 99.9 % gota a gota hasta obtener un pH neutro (Klaus *et al.* 2011). La biomasa se filtró sobre un papel filtro de poros de 125 μm . Con esto se obtuvo una fracción alcalina en el filtrado (Mizuno *et al.* 1992) y se descartó el residuo de biomasa.

Precipitación de fracciones con etanol y congelación-descongelación. La fracción acuosa y la fracción alcalina se colocaron individualmente en un recipiente con 3 volúmenes de etanol frío (Smiderle *et al.* 2013) para deshidratar los polisacáridos y generar un precipitado, el cual fue recuperado (Mizuno *et al.* 1992;

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

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

RESULTADOS

Obtención de biomasa

El cultivo de micelio *in vitro* presentó un peso fresco de 40.87 g con 96.5 % de contenido de agua y BPR de 0.04 g L^{-1} día⁻¹. Los esporomas de *L. perlatum* son pseudoestipitados redondos, de 3.5-7.5 cm de largo, de color blanco y crema, su hábitat suele ser terrícola o húmicola, crece en bosques de *Abies-Pinus* a altitudes de 3100-3400 metros. Los esporomas presentaron un peso fresco de 38.72 g con 84.89 % de contenido de agua. Microscópicamente presentan basidiosporas de (3.0-) 3.77 (-4.0) μm , redondas y ligeramente espinuladas, correspondientes a las características de la especie (Franco-Maass *et al.* 2012).

Extracción y purificación de β -glucanos

El contenido total de β -glucanos presentes en el micelio fue de 11.50 g de β -glucanos por 100 g de biomasa

seca, de los cuales 1.40 g de β -glucanos por 100 g de biomasa seca corresponden a FrAqM y 10.11 g de β -glucanos por 100 g de biomasa seca corresponden a FrAkM. En cuanto a los esporomas, se obtuvieron 13.80 g de β -glucanos totales por 100 g de biomasa seca, de los cuales, 2.36 g de β -glucanos por 100 g de biomasa seca corresponden a FrAqBF y 11.58 g de β -glucanos por 100 g de biomasa seca corresponde a FrAkBF.

Identificación de fracciones

Los espectros FTIR obtenidos de las fracciones correspondientes a FrAqM, FrAkM (Figura 1), FrAqBF y FrAkBF (Figura 2) concuerdan con el espectro de un β -glucano (Movasaghi et al. 2008), debido a que se observan las bandas características: una banda a 3200 cm^{-1} correspondiente a la región de las vibraciones de los enlaces OH, una banda correspondiente a 2922 cm^{-1} que se atribuye a la presencia de enlaces CH saturados (Figuras 1 y 2) (Šandula et al. 1999). El espectro de FrAqBF, FrAkBF (Figura 2) y FrAkM (Figura 1) mostró una señal de absorción a 1644 cm^{-1} , que está relacionada con las vibraciones de estiramiento del enlace CO (carbonilo) de un complejo polisacárido-proteína (Alzorqi et al. 2017), debido a esto, los β -glucanos de estas fracciones podrían acoplarse a una proteína. De esta manera, las cuatro fracciones (Figuras 1 y 2) presentan las dos regiones fundamentales de los β -glucanos, la "región de azúcar" que va desde 1.200 cm^{-1} a 950 cm^{-1} y la "región anomérica" que va desde 950

cm^{-1} a los 750 cm^{-1} (Synytsya y Novak 2014). En estas regiones, se observan las bandas características de los enlaces carbono-glucósido del β -glucano correspondientes a 1160, 1080, 1040, 970 y 890 cm^{-1} (Alzorqi et al. 2017). Por otro lado, en los espectros de las cuatro fracciones se observa una señal que va de 1160 a 1147 cm^{-1} . Münzberg et al. (1995) menciona que esta señal representa el estiramiento del enlace glucosídico COC, donde la señal en 1040 cm^{-1} corresponde al estiramiento de CO. También menciona que la disminución de la señal de absorción a 1080 cm^{-1} y la desaparición de la señal a 890 cm^{-1} en las fracciones alcalinas FrAkM (Figura 1) y FrAkBF (Figura 2) debe ser una degradación del polisacárido en la base cadena. La producción de β -glucanos en las fracciones obtenidas es similar entre el micelio y los esporomas. Sin embargo, se observa una mayor producción de β -glucanos en el FrAkM y FrAkBF correspondientes a la fracción alcalina.

DISCUSIÓN

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

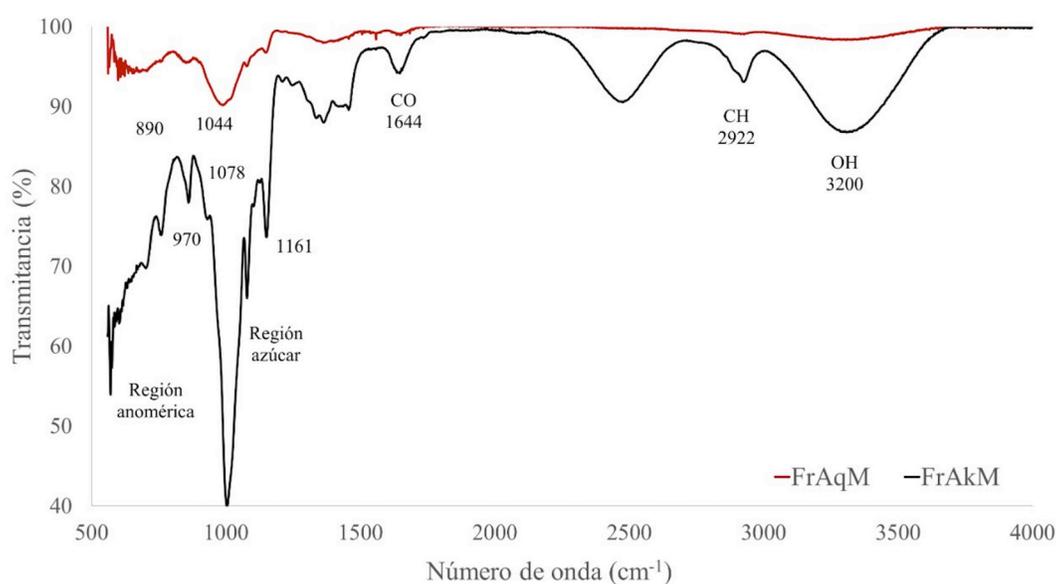


Figura 1.- Espectro FTIR de la fracción acuosa de micelio (FrAqM) y fracción alcalina del micelio (FrAkM) de *L. perlatum*.

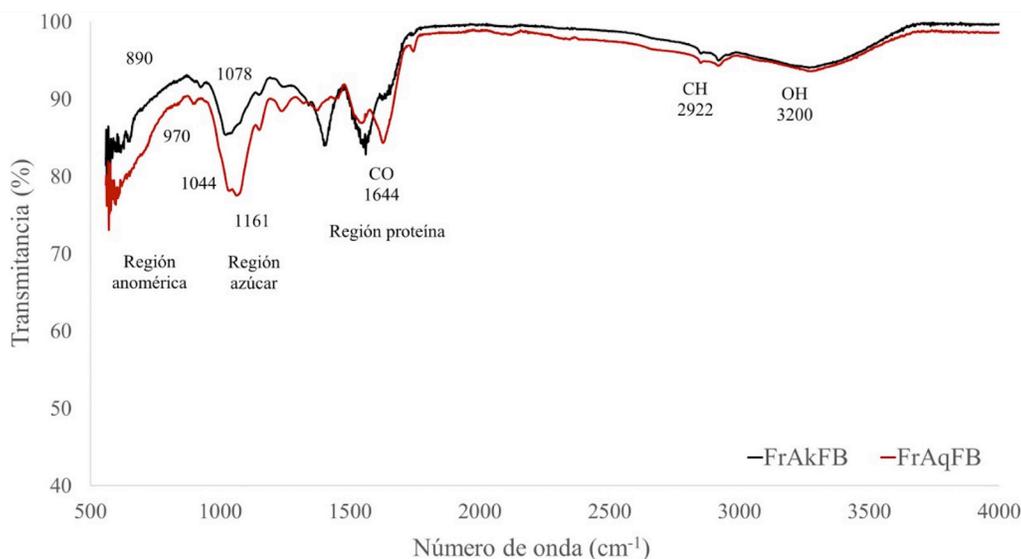


Figura 2.- Espectro FTIR de la fracción acuosa de esporomas (FrAqFB) y fracción alcalina de esporomas (FrAkFB) de *L. perlatum*.

gicos para la selección de cepas y optimización de las condiciones de cultivo *in vitro* (Song *et al.* 1998).

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

El contenido de agua es una variable primordial en la producción de metabolitos estructurales, ya que está directamente relacionado con el contenido de biomasa seca (Arango y Nieto 2013). Según Rathore *et al.* (2017) aproximadamente la mitad de la biomasa en peso seco de la pared celular de los basidiomicetos está constituida por metabolitos estructurales entre

ellos β -glucanos. En este estudio, el micelio presentó 96.5 % de contenido de agua y los esporomas un 84.89 %, por lo que, los esporomas presentaron una mayor concentración de β -glucanos en la biomasa seca.

La producción de β -glucanos totales presentes en las fracciones de micelio (11.50 g de β -glucanos por 100 g de BS) y esporomas (13.80 g de β -glucanos por 100 g de BS) se encuentran en el rango reportado, como lo sugiere Sari *et al.* (2017), donde el contenido de β -glucanos en esporomas silvestres de *L. perlatum* fue de 15.48-19.749 g de β -glucanos por 100 g de BS.

Además, la concentración de β -glucanos presentes en las fracciones alcalinas FrAkM y FrAkBF fue mayor que la fracción acuosa FrAqM y FrAqBF. Según Tseng *et al.* (2008) esto se debe a que en el proceso de extracción las paredes celulares se degradan y los compuestos insolubles en agua se transforman en componentes solubles. Sin embargo, es importante mencionar que la fracción acuosa de β -glucanos normalmente tiene mayor bioactividad que las insolubles (Xiao *et al.* 2004). Existen otros factores que pueden afectar la producción de biomasa y β -glucanos presentes en esporomas y micelio *in vitro*. De acuerdo a Paspaspyridi *et al.* (2010) el micelio representa la fase vegetativa del hongo, mientras que los esporomas la fase reproductiva, y la función estructural de los β -glucanos en la pared celular varía en cada fase. De la misma manera, la producción de biomasa y la bioactividad de los β -glucanos también se ven afectada por la fuente de nutrien-

tes. Según Ooi y Liu (2000) el sustrato natural donde se desarrollan los esporomas silvestres puede contener compuestos polifenólicos que inducen la síntesis de β -1,3-glucano sintasa, aumentando la producción de β -glucanos.

Reis *et al.* (2017) mencionan que los esporomas normalmente presentan mayor bioactividad que los sistemas *in vitro*, debido a que la composición química varía en relación a los nutrientes del sustrato.

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

CONCLUSIONES

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

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

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

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Secretaría de Educación Pública y a la Universidad Autónoma del Estado de México por el financiamiento de este proyecto, a través del Apoyo para Fortalecimiento de Cuerpos Académicos en Formación del Programa para el Desarrollo Profesional Docente de la Secretaría de Educación Pública (PRO-DEP-SEP) 2018 (Proyecto No. 4615/2018 CA: "Avances etnofarmacológicos, nutricionales y nutracéuticos de los recursos vegetales y fúngicos prioritarios para las comunidades del Santuario de Agua Presa Corral de Piedra) así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada al primer autor para sus estudios en el Posgrado de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales de la Universidad Autónoma del Estado de México.

LITERATURA CITADA

- Abdullah N, Ismail R, Johari NMK, Annuar M. 2013. Production of liquid spawn of an edible grey oyster mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél by submerged fermentation and sporophore yield on rubber wood sawdust. *Scientia Horticulturae* 161, 65-69. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.06.026>
- Alzorqi I, Sudheer S, Lu TJ, Manickam S. 2017. Ultrasonically extracted β -d-glucan from artificially cultivated mushroom, characteristic properties and antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry* 35, 531-540. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.04.017>
- Arango CS, Nieto IJ. 2013. Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutracéuticos. *Revista Iberoamericana de Micología* 30, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2012.03.011>
- Bae JT, Sinha J, Park JP, Song CH, Yun JW. 2000. Optimization of submerged culture conditions for exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 10, 482-487. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-5841-x>
- Burrola-Aguilar C, Montiel O, Garibay-Orijel R, Zizumbo-Villarreal L. 2012. Conocimiento tradicional y aprovechamiento de los hongos comestibles silvestres en la región de Amanalco, Estado de México. *Revista Mexicana de Micología* 35, 1-16.
- Carbonero ER, Gracher AHP, Smiderle FR, Rosado FR, Sasaki GL, Gorin PA, Iacomini M. 2006. A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. *Carbohydrate Polymers* 66, 252-257. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.03.009>
- Colak A, Camedan Y, Faiz O, Sesli E, Kolcuoğlu Y. 2009. An esterolytic activity from a wild edible mushroom, *Lycoperdon perlatum*. *Journal of Food Biochemistry* 33, 482-499. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2009.00232.x>
- Chegwin-Angarita C, Nieto-Ramírez IJ. 2014. Effect of non-conventional carbon sources on the production of triterpenoids in submerged cultures of *Pleurotus macrofungi*. *Journal of the Chilean*

- Chemical Society 59, 2287-2293. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072014000100010>
- Díaz-Talamantes C, Burrola-Aguilar C, Aguilar-Miguel X, Mata G. 2017. Crecimiento micelial *in vitro* de hongos comestibles silvestres de alta montaña en el centro de México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 23, 369-383. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2016.12.067>
- Franco Maass S, Burrola Aguilar C, Arana Gabriel Y. 2012. Hongos silvestres comestibles: un recurso forestal no maderable del Nevado de Toluca. Ediciones EON, México, D.F.
- Guzmán G. 1994. Los hongos en la medicina tradicional de Mesoamérica y de México. *Revista Iberoamericana de Micología* 11, 81-85.
- Guzmán G. 2008. Diversity and use of traditional Mexican medicinal fungi. A review. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 10, 209-217 <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v10.i3.20>
- Khan AA, Gani A, Khanday FA, Masoodi F. 2018. Biological and pharmaceutical activities of mushroom β -glucan discussed as a potential functional food ingredient. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 16, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2017.12.002>
- Klaus A, Kozarski M, Niksic M, Jakovljevic D, Todorovic N, Van Griensven LJ. 2011. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharides extracted from the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *LWT-Food Science and Technology* 44, 2005-2011. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.05.010>
- Miyazaki T, Oikawa N, Yadomae T, Yamada H, Yamada Y, Hsu HY, Ito H. 1979. Relationship between the chemical structure and anti-tumour activity of glucans prepared from *Grifora umbellata*. *Carbohydrate Research* 69, 165-170. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(00\)85761-4](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(00)85761-4)
- Mizuno T, Ando M, Sugie R, Ito H, Shimura K, Sumiya T, Matsuura A. 1992. Antitumor activity of some polysaccharides isolated from an edible mushroom, Ningyotake, the fruiting body and the cultured mycelium of *Polyporous confluens*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 56, 34-41. <https://doi.org/10.1271/bbb.56.34>
- Movasaghi Z, Rehman S, Rehman DI. 2008. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews* 43, 134-179. <https://doi.org/10.1080/05704920701829043>
- Münzberg J, Rau U, Wagner F. 1995. Investigations on the regioselective hydrolysis of a branched β -1, 3-glucan. *Carbohydrate Polymers* 27, 271-276. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(95\)00069-0](https://doi.org/10.1016/0144-8617(95)00069-0)
- Novaković AR, Karaman MA, Matavulj MN, Pejin BM, Belović MM, Radusin TI, Ilić NM. 2015. An insight into *in vitro* bioactivity of wild-growing puffball species *Lycoperdon perlatum* (Pers) 1796. *Food and Feed Research* 42, 51-58. <https://doi.org/10.5937/FFR1501051N>
- Ooi VE, Liu F. 2000. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Current Medicinal Chemistry* 7, 715-729. <https://doi.org/10.2174/0929867003374705>
- Papaspyridi LM, Katapodis P, Gonou-Zagou Z, Kapsanaki-Gotsi E, Christakopoulos P. 2010. Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibres content by *Pleurotus ostreatus* ATHUM 4438 under submerged culture. *Biochemical Engineering Journal* 50, 131-138. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.04.008>
- Pizarro S, Ronco AM, Gotteland M. 2014. β -glucanos: ¿Qué tipos existen y cuáles son sus beneficios en la salud? *Revista Chilena de Nutrición* 41, 439-446. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182014000400014>
- Ramesh C, Pattar M.G. 2010. Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of western ghats of Karnataka, India. *Pharmacognosy Research* 2, 107. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.62953>
- Rathore H, Prasad S, Sharma S. 2017. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. *Pharm-Nutrition* 5, 35-46. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2017.02.001>
- Reis FS, Martins A, Vasconcelos MH, Morales P, Ferreira IC. 2017. Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. *Trends in Food Science & Technology* 66, 48-62. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.010>
- Rinaldi A, Comandini O, Kuyper TW. 2008. Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity* 33, 1-45.
- Šandula J, Kogan G, Kačuráková M, Machová E. 1999. Microbial (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. *Carbohydrate Polymers* 38, 247-253. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00099-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00099-X)
- Sari M, Prange A, Lelley JI, Hambitzer R. 2017. Screening of Beta-glucan contents in commercially cultivated and wild growing mushrooms. *Food Chemistry* 216, 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.010>
- Smiderle FR, Alquini G, Tadra-Sfeir MZ, Iacomini M, Wichers HJ, Van Griensven LJ. 2013. *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1 \rightarrow 6)- β -d-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. *Carbohydrate Polymers* 94, 91-99. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.12.073>
- Song C, Jeon Y, Yang B, Ra K, Kim H. 1998. Anti-complementary activity of endopolymers produced from submerged mycelial culture of higher fungi with particular reference to *Lentinus edodes*. *Biotechnology Letters* 20, 741-744. <https://doi.org/10.1023/A:1005334719522>
- Synytysya A, Novak M. 2014. Structural analysis of glucans. *Annals of Translational Medicine* 2(2), 17. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.02.07>
- Tseng YH, Yang JH, Mau JL. 2008. Antioxidant properties of polysaccharides from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry* 107, 732-738. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.073>
- Wang JC, Hu SH, Liang ZC, Yeh CJ. 2005. Optimization for the production of water-soluble polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* in submerged culture and its antitumor effect. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67, 759-766. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1833-x>
- Wasser S. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60, 258-274. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1076-7>
- Xiao Z, Trincado CA, Murtaugh MP. 2004. β -Glucan enhancement of T cell IFN γ response in swine. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102, 315-320. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.09.013>