

Revisión

Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutracéuticos

Carolina Suárez Arango^{a,*} e Ivonne Jeannette Nieto^b

^a Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Cundinamarca, Colombia

^b Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Cundinamarca, Colombia

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 17 de diciembre de 2011

Aceptado el 12 de marzo de 2012

On-line el 23 de marzo de 2012

Palabras clave:

Fermentación sumergida
Setas comestibles
Nutracéuticos
Alimentos funcionales
Compuestos bioactivos

R E S U M E N

Los macromicetos han sido parte de la cultura humana desde hace miles de años y aparecen descritos como alimento humano en las más importantes civilizaciones de la historia. Se han descrito muchísimas propiedades nutricéuticas de los macromicetos, como sus propiedades anticancerígenas y antitumorales, hipocolesterolémicas, antivirales, antibacterianas, o inmunomoduladoras, entre otras. Dado que la producción de hongos por cultivo tradicional y la extracción de los metabolitos bioactivos en algunos casos son muy dispendiosas, la biotecnología es fundamental para el desarrollo de técnicas rentables y productivas para la obtención de estos metabolitos. Es el desarrollo de esta tecnología y la facilidad que proporciona en cuanto al manejo de sus variables, lo que ha permitido realizar el cultivo en medio líquido del micelio de macrohongos con significativa reducción de tiempo y aumento en la producción de sus metabolitos, lo que ha impulsado aún más su obtención y el estudio de compuestos con potencial como medicamentos, nutricéuticos y cuasifarmacéuticos tanto del medio agotado como del micelio. El objetivo de esta revisión es el de ofrecer una visión general de la utilización de la fermentación en estado líquido como herramienta tecnológica para la obtención de hongos comestibles, su estudio y el de sus bioactivos, mediante la descripción de las diferentes condiciones de cultivo que en los últimos años se han empleado, así como los resultados obtenidos. Se discutirá lo correspondiente a los géneros *Agaricus*, *Flammulina*, *Grifola*, *Pleurotus* y *Lentinula*, con énfasis en este último, dado que el Shiitake ha sido considerado desde siempre como el hongo medicinal por excelencia.

© 2011 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Biotechnological cultivation of edible macrofungi: An alternative for obtaining nutraceuticals

A B S T R A C T

Keywords:

Submerged fermentation
Edible macromycetes
Nutraceuticals
Functional food
Bioactive compounds

Macromycetes have been part of the human culture for thousand years, and have been reported as food in the most important civilizations in history. Many nutraceutical properties of macromycetes have been described, such as anti-cancer, anti-tumour, cholesterol lowering, antiviral, antibacterial, or immunomodulatory, among others. Given that production of mushrooms by traditional cultivation and extraction of bioactive metabolites is very difficult in some cases, biotechnology is essential for the development of profitable and productive techniques for obtaining these metabolites. It is the development of this technology, and the ease in which it enables the use of its variables that has allowed mycelium to be cultivated in liquid medium of macrofungi, with a significant reduction in time and an increased production of metabolites. This increased production has led to the study of compounds that have medicinal, nutriceutical and quasi-farmaceutical potential, in the exhausted media and the mycelium. The aim of this review is to provide an overview of the use of liquid-state fermentation as a technological tool for obtaining edible fungi, and the study of these and their metabolites, by describing the different cultivation conditions used in recent years, as well as the results obtained. The relevance of *Agaricus*, *Flammulina*, *Grifola*, *Pleurotus* and *Lentinula* genera, will also be discussed, with emphasis on the last one, since Shiitake has been always considered as the ultimate medicinal mushroom.

© 2011 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: csuarez@unal.edu.co (C. Suárez Arango).

Las setas han sido empleadas por el hombre desde hace miles de años tanto para la alimentación, como para el tratamiento de diferentes enfermedades, siendo los países del lejano oriente, como Japón, China y Corea, los consumidores más habituales⁷⁵. En las últimas décadas, y debido a la comprobación de las diversas actividades biológicas exhibidas por sus metabolitos secundarios, entre las que se encuentran actividades antioxidante, hipcolesterolémica, hipoglucémica, antibacteriana, antiviral, reguladora del sistema cardiovascular, anticancerígena e inmunomoduladora⁵³, se ha intensificado a nivel mundial no solo el cultivo, sino el consumo de este tipo de hongos y el estudio de sus bioactivos.

Todos los metabolitos secundarios que producen los macromicetos y que les dan características nutracéuticas especiales han sido en su mayoría aislados del carpóforo y en la actualidad algunos de estos compuestos se extraen para ser empleados en la producción de medicamentos comerciales⁷⁵. Investigaciones preliminares realizadas sobre basidiomicetos⁸ han puesto de manifiesto que la proporción de estos compuestos varía tanto con el estadio del hongo como con el medio en que es cultivado.

Si bien es cierto que la obtención de cuerpos fructíferos es sencilla debido a que se pueden usar diferentes sustratos baratos y accesibles, el cultivo tradicional no permite obtener los bioactivos en breves períodos de tiempo (días) y con procesos de purificación sencillos^{56,76}. Es aquí donde el desarrollo de la biotecnología, por la facilidad en el manejo de sus variables, ha permitido realizar el cultivo en medio líquido del micelio de macrohongos con aumento en la producción de sus metabolitos, lo que ha impulsado considerablemente la obtención y determinación estructural de compuestos con potencial como medicamentos. Cabe anotar aquí que dichos compuestos se encuentran tanto en el micelio como en el medio agotado, lo que proporciona un mayor valor al empleo de la fermentación en estado líquido (FEL) o fermentación sumergida, como igualmente se la conoce, para la producción de macromicetos.

El objetivo de esta revisión es el de ofrecer una visión actualizada de la utilización de la FEL como herramienta tecnológica en la obtención de los hongos comestibles más conocidos, con especial énfasis en *Lentinula edodes*, y una descripción de las investigaciones realizadas sobre condiciones de cultivo para la obtención de compuestos bioactivos de interés farmacológico y alimenticio.

Fermentación en estado líquido

Desde el punto de vista biotecnológico, la fermentación se entiende como el proceso en que los microorganismos producen biomasa y metabolitos a partir de la utilización de sustancias orgánicas, en ausencia o presencia de oxígeno. La descomposición de los sustratos es llevada a cabo por enzimas producidas para tal fin por los microorganismos²⁸. Desde el enfoque bioquímico, la fermentación es definida como un conjunto de reacciones catabólicas que producen adenosín trifosfato (ATP), en las cuales los compuestos orgánicos sirven tanto de donadores primarios como de aceptores finales de electrones, produciendo el ATP por fosforilación a nivel sustrato⁵⁰. Se trata de un proceso intracelular, catabólico de oxidación incompleta, siendo el producto final un compuesto orgánico²⁹. Las fermentaciones pueden clasificarse como naturales o artificiales, según haya o no intervención del hombre en ellas. Asimismo pueden clasificarse también según el tipo de producto que se desea obtener, según la presencia o ausencia de oxígeno, o según el estado del sustrato²⁸. Es este último aspecto el que permite clasificarlas en FEL y fermentaciones en estado sólido (FES).

La FEL o fermentación sumergida es aquella en la cual hay por lo menos la misma concentración de agua y de sustrato sólido

(nutrientes) en el proceso, es decir, que hay una solución de los nutrientes^{17,68}. Es el tipo de fermentación más utilizado en la industria debido a que es sencillo, pueden controlarse muchas más variables que en la FES y el producto final es mucho más fácil de recuperar¹¹. En ella los microorganismos se desarrollan flotando en el medio de cultivo y en el caso de los hongos miciliares, estos pueden formar pequeñas esferas de micelio denominadas «pellets» cuando hay agitación, de otra forma, crecen en la superficie. En la FEL el desarrollo del microorganismo se presenta de una forma típica, dando origen a una fase de latencia, una de crecimiento (fase logarítmica), una fase estacionaria y, la última, la fase de muerte. La FEL a su vez puede dividirse en continua, por lote, y alimentada, según la entrada y salida tanto del sustrato como del producto, respectivamente¹¹.

La principal diferencia con la FES radica en que el crecimiento de los hongos filamentosos en esta última se efectúa en un sustrato sólido cercano a la ausencia de agua, pero con la suficiente presencia de esta para soportar el crecimiento y el metabolismo¹⁷. Sin embargo, a pesar de las muchas investigaciones que se han realizado desde que se conoce este tipo de fermentación, se siguen presentando algunos problemas como son la baja ratio de transferencia de O₂, CO₂, remoción de calor y la contaminación bacteriana. Por otro lado, es un proceso lento para el cual muy pocos organismos se prestan debido precisamente a su baja actividad de agua, siendo además un proceso difícil de monitorizar, controlar y escalar, lo que lo convierte en un proceso de difícil implementación en la industria a pesar de que la mayoría de ella, en especial la farmacéutica, la utiliza. Es por esto que la FEL se ha convertido en el método preferido de fermentación para aplicaciones industriales dado que es menos problemática al poderse controlar la transferencia de oxígeno. Además, la homogeneidad del cultivo es muy superior, haciéndola más repetitiva, reproducible y fácil de monitorizar. En lo que respecta a las setas comestibles, solo hasta hace unos años se ha empezado a desarrollar esta tecnología.

Las setas se han empleado en la alimentación y la medicina desde hace varias centurias, produciéndose en compost, cultivos tubulares, troncos, etc., que constituyen el cultivo tradicional (una FES). Sin embargo, el mayor inconveniente del empleo de setas como productor de bioactivos es la variabilidad de los mismos debida a la composición del medio en el que se cultiva (por ejemplo, no todos los aserrines son iguales, así aunque provengan de la misma especie). En contraste con la FES, la FEL ofrece un gran potencial gracias a que es una técnica mucho más rápida donde las condiciones de cultivo son fácilmente reproducibles e independientes de las variaciones climáticas. Si bien es cierto que los macromicetos crecen mucho más despacio que las bacterias y los micromicetos, se puede aplicar esta tecnología mediante una optimización del proceso dependiendo de la cepa y los metabolitos de interés.

Metabolitos fúngicos con potencial terapéutico

Las setas comestibles son conocidas por su alto valor proteico, su considerable concentración de vitaminas, minerales, fibra dietaria, bajos niveles de sodio y grasas insaturadas⁵⁶. Esto las convierte en un excelente nutracéutico ya que sus propiedades medicinales están directamente relacionadas con los compuestos que presentan acciones biológicas con potencial terapéutico. Dichos compuestos se pueden aislar tanto del micelio como del carpóforo y del medio de cultivo agotado. Dentro de estos se encuentran β-glucanos, enzimas, policétidos, ácidos grasos, polifenoles, flavonoides y terpenoides, entre otros. A continuación se describen los que se encuentran en mayor proporción en los macromicetos.

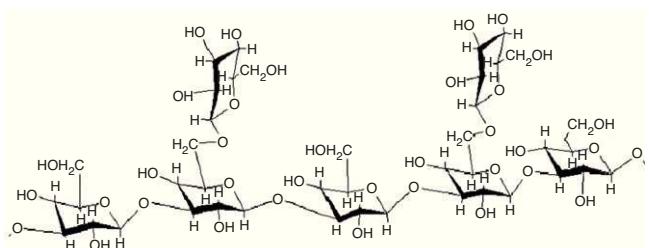


Figura 1. Estructura de la unidad básica del lentinan.

β -glucanos

Los β -glucanos son polisacáridos no celulósicos constituidos por unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos y con ramificaciones β -1-3 o β -1-6. Son aislados principalmente de la pared celular de las células fúngicas (aproximadamente la mitad de la biomasa de la pared celular está constituida de β -glucanos), aunque también pueden ser excretados al medio. Poseen actividades inmunoestimuladoras, anticancerígenas, antiinfecciosas, hipocolesterolémicas, hipoglucemias, antiinflamatorias y analgésicas^{10,74}. El β -glucano más conocido a nivel mundial es el lentinan (fig. 1), aislado de *L. edodes* (Shiitake), polisacárido de 27,5 kDa que es utilizado en Japón como una medicina anticancerígena^{8,75} debido a que estimula la secreción de citocinas por células T, lo que incrementa la generación de linfocitos T citotóxicos y células NK en presencia de interleucina 2^{52,91}.

Aunque el lentinan es un agente anticancerígeno, es necesario realizarle modificaciones químicas para aumentar su actividad. Las investigaciones al respecto pusieron de manifiesto que la sulfatación puede aumentar su eficacia^{19,91}. Aunado a lo anterior se encuentra un reporte preliminar sobre el efecto protector de este glucano frente a infecciones por *Mycobacterium tuberculosis*, in vitro e in vivo en ratones. El modelo in vivo demostró que la administración de lentinan antes de la infección puede movilizar las defensas potenciales del huésped y reducir la infección micobacteriana⁵¹.

Policétidos

Los policétidos son estructuralmente una familia muy diversa de productos naturales con actividades y propiedades farmacológicas diversas, entre las que se cuentan la antimicrobiana, la antifúngica, la citostática, la hipocolesterolémica, la antiparasitaria, la de estimulación del crecimiento animal y la insecticida. Dentro de los policétidos, las estatinas, policétidos no aromáticos, se constituyen en la actualidad como metabolitos muy importantes de los macromicetos dado que son inhibidores de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A reductasa, primera enzima involucrada en la biosíntesis de colesterol. La inhibición es debida a la similaridad estructural del sustrato natural de la enzima y las formas ácidas de las estatinas. Su uso es extendido en el tratamiento de pacientes con hipercolesterolemia, enfermedades cardiovasculares, así como también para aquellos propensos a la arterioesclerosis⁵⁸. Las estatinas de origen fúngico incluyen la lovastatina, la simvastatina, la pravastatina y la compactina²⁶ (fig. 2).

Los macromicetos descritos como los mayores productores de estos inhibidores pertenecen a los géneros *Pleurotus* y *Agaricus*, y la FEL ya se está empleando por las casas comerciales farmacéuticas para la producción de este tipo de medicamentos^{6,60}, ya que a diferencia de las sintetizadas químicamente no producen efectos secundarios indeseados en los pacientes.

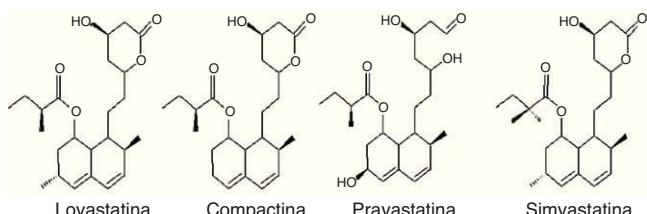


Figura 2. Estructura de las estatinas de origen fúngico.

Terpenoides

Corresponden a moléculas formadas por unidades de isopreno, unidas cabeza a cola. Se clasifican como hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos, triterpenos y tetraterpenos. Algunos de estos compuestos han mostrado actividades antiandrogénicas, antivirales y antibacterianas, entre otras^{37,40,47,64,75}. Dentro de los diterpenos, se ha aislado la pleuromutilina (fig. 3) de *Pleurotus mutabilis* y *Clitopilus pasquekerianus* (antes llamado *Pleurotus pasquekerianus*), metabolito con marcada acción antibiótica contra infecciones micoplasmáticas en animales, que ha permitido el desarrollo y la producción de este tipo de medicamento a nivel comercial⁴.

Los triterpenoides tetracíclicos tienen una gran relevancia en los macromicetos y, dentro de ellos, los esteroles son los metabolitos más abundantes. El ergosterol (fig. 4) es el principal componente triterpenoidal de los hongos. Los metabolitos secundarios de esta clase presentan interesantes propiedades de tipo farmacológico; entre ellas, la anticancerígena y la antimicrobiana^{57,73}; algunos presentan también actividad hipocolesterolémica⁸⁶, antimicrobiana³⁵, antiinflamatoria^{44,88}, antifúngica, antitumoral⁴¹ e insecticida⁸³, entre otras.

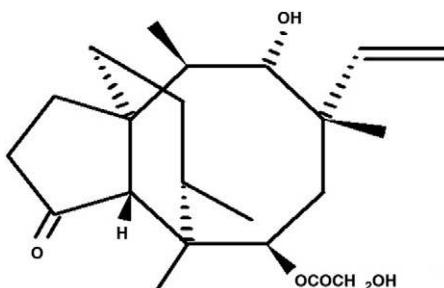


Figura 3. Estructura de la pleuromutilina.

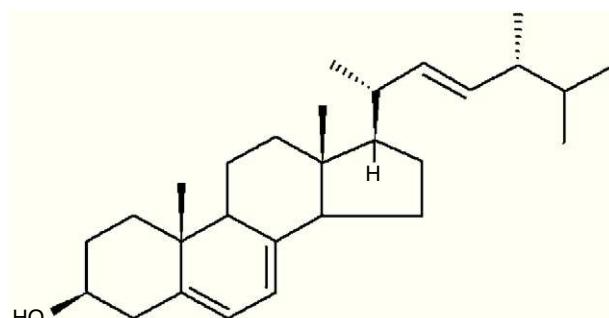


Figura 4. Estructura del ergosterol.

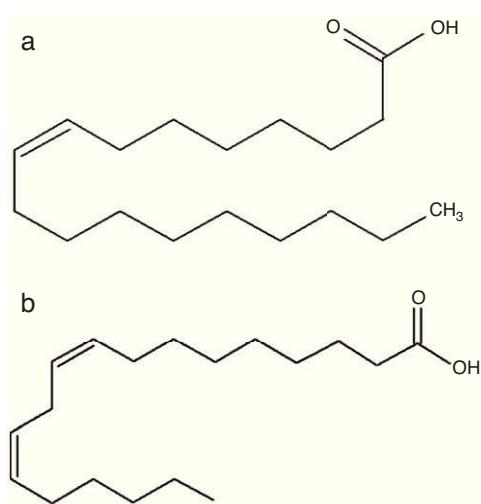


Figura 5. Estructuras de los ácidos oleico (a) y linoleico (b).

Ácidos grasos

La presencia de ácidos grasos insaturados como el ácido oleico y el linoleico (fig. 5) constituye una característica nutracéutica favorable, puesto que los ácidos grasos no saturados son esenciales en una dieta sana ya que brindan protección frente a enfermedades cardiovasculares y la arterioesclerosis producida por el colesterol⁵⁴.

Cultivo de macromicetos por fermentación en estado líquido

Debido a la gran capacidad que tienen los macromicetos de crecer en diferentes sustratos y condiciones medioambientales, se ha explorado el empleo de la FEL como una herramienta para obtener el mayor provecho de su cultivo. Dentro de las variables a considerar en cultivos sumergidos de macromicetos se encuentran la temperatura, el pH, la agitación y los medios de cultivo, entre otras.

Diversas investigaciones ponen de manifiesto la capacidad de los macromicetos de crecer en un amplio rango de pH, sin embargo, recomiendan usar un pH de 5 o inferior para evitar la contaminación bacteriana. Asimismo, cuando el pH es bajo (pH 4) se incentiva la producción de biomasa y el consumo de glucosa, mientras que un pH más básico (pH 6) puede estimular la producción de exopolisacáridos¹⁷.

La temperatura es clave para la fermentación de cualquier tipo de microorganismo. Los macromicetos también poseen la habilidad de crecer en un amplio rango de temperaturas en la naturaleza⁷⁶, sin embargo para las fermentaciones líquidas se ha empleado un rango entre 26 y 36 °C¹⁷. Si bien se ha evidenciado que un aumento de la temperatura puede influir en el aumento del metabolismo del hongo, dicha variación disminuye la solubilidad del oxígeno disuelto en el medio, lo que conllevaría que la disponibilidad de este sea menor en el interior del medio de cultivo y por consiguiente el crecimiento y el metabolismo disminuirían, ya que los macromicetos son organismos aerobios estrictos y son muy sensibles a las bajas concentraciones de oxígeno^{17,76}.

La aireación es otro factor importante y fácil de controlar que influye directamente en la oxigenación y la homogeneización del medio de cultivo durante la fermentación. La aireación puede darse por agitación de los caldos, lo que permite que el oxígeno del ambiente se disuelva en el medio de cultivo, o bien por inyección, donde el oxígeno es introducido en el medio de cultivo a través de tubos conectados al fermentador, con o sin agitación. Algunos investigadores establecieron que una agitación muy fuerte puede llevar al rompimiento del micelio por las fuerzas de agitación y por

lo tanto la formación de pellets (y en consecuencia, la producción de biomasa) se ve reducida, así como la producción de metabolitos como los exopolisacáridos¹⁷.

Otro parámetro determinante es la composición del medio de cultivo empleado para la fermentación líquida, ya que de este depende el crecimiento micelial y, por ende, la biosíntesis de metabolitos. En la producción de macromicetos se han empleado medios sintéticos, medios complejos y sustratos constituidos por desechos. Está claro que hay tener en cuenta que un medio puede ser bueno para una especie mientras que para otra no, afectando asimismo tanto la producción como la liberación de metabolitos. También es importante definir la relación carbono-nitrógeno ya que puede influir en la eficiencia de producción de biomasa y de metabolitos¹⁷.

Principales setas comestibles cultivadas por fermentación en estado líquido

Dentro de las más conocidas se encuentran *Agaricus bisporus*, *L. edodes*, *Pleurotus* spp. y *Flammulina velutipes*. Prácticamente todas estas setas han sido introducidas en la cultura occidental desde países como China y Japón, debido a la gran inmigración de habitantes de esas zonas al hemisferio occidental, y su aceptación se dio gracias a sus agradables sabores y excelente textura, lo que permitió la inclusión de las mismas en la dieta de casi todos los países del mundo. Los estudios realizados sobre los bioactivos producidos por los hongos comestibles permiten ver su potencial empleo en la farmacoterapia o en la elaboración de alimentos funcionales, haciendo necesario realizar su cultivo por técnicas biotecnológicas, a fin de obtener mayor cantidad de compuestos en menor tiempo y con procesos de purificación más sencillos.

Género Agaricus

La primera FEL de este género de macromicetos fue descrita por Humfeld en 1948 empleando *Agaricus campestris*. A pesar de que la especie más conocida de este género es *Agaricus bisporus*, comúnmente llamado champiñón de París, siendo el macromiceto comestible más cultivado a nivel mundial mediante técnica tradicional en sustratos compostados que por lo general se componen de desechos agroindustriales, el empleo de la fermentación en estado sumergido se ha realizado en su mayoría para procesos de biorremediación^{12,16}, encontrándose un solo reporte del empleo de la fermentación para la bioproducción del micelio de esta especie con el propósito de obtener un análogo de la carne³⁶.

La especie *Agaricus blazei*, también llamada *Agaricus brasiliensis* o seta del sol, es la especie más utilizada en FEL para la producción de polisacáridos y otros compuestos con acciones biológicas conocidas y posible uso farmacológico^{42,43}. Es así como en 2008 se realizó la caracterización de exopolisacáridos producidos por la especie en fermentación sumergida⁴³, estudios que fueron complementados en 2009 con la determinación del efecto de los polisacáridos extracelulares en la hipolipidemia y la selección de un medio de cultivo de bajo costo, con alta producción de biomasa y polisacáridos intracelulares^{42,46}. En 2010 se utilizó *A. brasiliensis* para la producción de exopolisacáridos y el estudio de la influencia de los diferentes métodos de secado en la actividad antitumoral presentada por estos metabolitos²⁰, cuya extracción también fue estandarizada en ese mismo año⁸⁴. Asimismo, se estudió el efecto de la aireación en la producción de ergosterol y blazeispírol⁷². *Agaricus novoi* se utilizó para hacer un estudio comparativo entre basidiomicetos en lo relacionado con la producción de exopolisacáridos por fermentación en estado sumergido empleando diferentes fuentes de carbono y nitrógeno¹⁵.

Género *Flammulina*

«Enokitake» es el nombre japonés con el que se conoce a este hongo; en Latinoamérica se conoce como «ñoki» y es una de las setas comestibles que presenta el carpóforo más pequeño pero con sabor muy agradable. La especie más conocida de este género es *Flammulina velutipes*. Los estudios desarrollados sobre ella son muy pocos a pesar de que es un hongo consumido a nivel mundial. El primer reporte hace referencia al estudio de las condiciones de cultivo del micelio para la producción de compuestos antimicrobianos⁶⁶. Posteriormente se realizó una evaluación completa de las condiciones de cultivo en FEL, composición y actividad biológica del micelio^{37,38}. En 2011 se evaluaron las peptidasas extracelulares durante la fermentación koji (fermentación del trigo o de la soya por acción de micromicetos) y se desarrolló la identificación diferencial de genes con actividad antitiroxina^{24,37}.

Género *Grifola*

La especie *Grifola frondosa* en Japón es llamada «maitake». Su consumo también está muy difundido en los países asiáticos, sin embargo en el hemisferio occidental apenas se la conoce. Este hongo exhibe actividades biológicas muy interesantes como son la inmunoestimuladora y la hipoglucemiantre. En cuanto a los estudios efectuados sobre este género que incluyen FEL, se encuentra la extracción de polisacáridos del micelio de *G. frondosa*⁴⁵, el estudio del efecto del trigo en el cultivo sumergido de *Grifola umbellata*⁹, la determinación de la inhibición en células de cáncer de ovario producida por el extracto en acetato de etilo de *G. frondosa*⁶⁹, el efecto de la ingesta del micelio, *G. frondosa* en la respuesta glucémica en ratas diabéticas⁴⁹, la elucidación estructural de 1,3 β-D-glucano en *G. frondosa*⁷⁷, el aumento en la producción de polisacáridos de *G. umbellata* mediante la optimización de las condiciones de cultivo en frasco agitado^{32,71} y el estudio del crecimiento micelial y la producción de polisacáridos bioactivos en *G. frondosa* en cultivos por lote y lote alimentado⁷¹.

Género *Pleurotus*

Es la segunda seta producida a nivel mundial. Es conocida en diferentes países como «hongo ostra», «gírgolas» u «orellanas». Aunque posee diferentes acciones biológicas, su mayor interés radica en la producción de polisacáridos inmunoestimuladores y estatinas naturales que son hipocolesterolémicas y que aventajan a las sintetizadas químicamente por sus pocos efectos secundarios. El género *Pleurotus*, debido a su gran producción de lacasas de baja especificidad y otras enzimas y a su eficiencia en la degradación de compuestos xenobióticos, ha sido estudiado ampliamente para la biorremediación de diferentes efluentes^{3,12,22,23,67}. En lo referente a la producción de compuestos bioactivos se han realizado diversos trabajos donde se ha estudiado la producción de exopolisacáridos y xylooligosacáridos en *Pleurotus citrinopileatus* y *Pleurotus tuber-regium*^{87,89,90}, y otros autores en *Pleurotus spp.* BCCB068 y *Pleurotus tailandia*¹³, respectivamente. Asimismo, se ha reportado el efecto de la soya en la producción de pleuroutilina en *P. utilis*³⁰, la formación y desarrollo de los pellets durante la fermentación, así como el estudio de la temperatura en este proceso y su influencia en la apoptosis de las células^{31,62}, la optimización de la producción de glucanos en *Pleurotus ostreatus*^{14,61}, la determinación de la actividad antioxidante del micelio de especies de *Pleurotus*⁴⁸, de las actividades antitumorales e inmunoestimuladoras de los endopolímeros obtenidos del cultivo sumergido de *Pleurotus eryngii*³⁴ y de las propiedades anti-proliferativas y antiadhesivas de los polisacáridos extraídos del micelio y carpóforos de *Pleurotus pulmonarius* y su aplicación

en el tratamiento de la caries³⁹. Algunos de los bioactivos obtenidos a partir de *Pleurotus spp.* cultivados por FEL ya se producen a escala industrial^{75,86}, sin embargo, también se hacen estudios para optimizar el proceso con nuevas tecnologías de fermentadores²⁵.

Lentinula edodes

L. edodes, conocida en Japón como «Shiitake», es la especie mejor conocida del género y la tercera seta de mayor consumo a nivel mundial. Es considerada la seta comestible más importante a nivel medicinal debido a sus comprobadas actividades farmacológicas^{5,7,33,55,85}. Son pocos los estudios que se han realizado sobre la FEL de *L. edodes*, destacándose las investigaciones en donde se evalúan las diferentes variables para el cultivo sumergido de 2 cepas diferentes del hongo, en donde se encontró que si bien su crecimiento se produce en un amplio rango de pH (de 3 a 8), fue el pH 7 el que proporcionó los mejores resultados²¹. Sin embargo, el empleo de pH 5,5 en posteriores estudios evitó la contaminación bacteriana⁵⁹. En cuanto a los medios de cultivo, se han desarrollado experimentos tanto con medios sintéticos comerciales, con propia fórmula, como con medios que incluyen materia prima o desechos industriales, siendo el concepto general el de emplear una fuente de carbono sencilla y una fuente de nitrógeno orgánica, ya que las sales de nitrógeno inorgánicas pueden producir cambios drásticos de pH que pueden inducir la apoptosis^{17,59}. Como fuentes de carbono se han usado desde caldos simples de glucosa y otros azúcares reductores, hasta medios más complejos (licores de maíz, melazas, almidones, caldo papa dextrosa, desechos agrícolas, líquido de estilados)^{18,22,59,65,81,82}. En cuanto a las fuentes de nitrógeno, las más empleadas en FEL han sido pepptona y extracto de levadura^{18,59,65,82}. Por otro lado, se ha discutido mucho en cuanto a la temperatura apropiada para la FEL de *L. edodes*. Los estudios realizados a diferentes temperaturas han arrojado como resultado que una temperatura superior a 35 °C inhibe el crecimiento del hongo⁵⁹. La mayoría de los estudios se han efectuado a una temperatura promedio de 26 °C^{59,78,79}. Otro punto controvertido es el de la agitación. Si bien algunas evaluaciones sobre este parámetro indican como ideal una agitación entre 100 y 150 rpm, con la que se obtiene prácticamente la misma producción de biomasa y polisacáridos¹⁹, estos resultados contrastan con los encontrados por otros autores, quienes realizaron estudios con cultivos estáticos y en agitación, encontrando una gran producción de biomasa en los estáticos e inhibición del crecimiento a una velocidad de agitación de 150 rpm⁵⁹. Lo anterior pone de manifiesto la conveniencia de realizar más estudios sobre este factor en *L. edodes*.

Las fermentaciones líquidas de *L. edodes* se han utilizado para fines diversos como son el estudio de la morfología del hongo en la fermentación, la formación de pellets, la producción de exoproteínas, la determinación de las bioacciones del producto biotecnológico, entre las que destacan la actividad antioxidante^{59,62,79-81}, la antimicrobiana contra fitopatógenos, la optimización de vitamina B₁₂^{27,63,79,82}, el desarrollo de técnicas para la alta producción de bioactivos como polisacáridos, peroxidases, lectinas y lacasas^{18,70}. Por otro lado, con miras a mejorar el proceso se ha explorado la utilización de compuestos que puedan aumentar la productividad, como es el caso del selenio⁸², así como la formulación de medios de cultivo apropiados para la producción de ergotioneína⁷⁸.

De los diferentes estudios que sobre la producción de macro-micetos empleando FEL se encuentran en la literatura, se puede concluir que las condiciones óptimas de cultivo son específicas y que dependen del hongo, la cepa y el metabolito de interés (tabla 1).

Tabla 1

Condiciones empleadas en la fermentación en estado líquido de macromicetos comestibles

Género de seta	Fuentes de carbono y nitrógeno empleadas	Temperaturas de incubación*	pH del medio de cultivo*	Agitación (rpm)*	Referencias
<i>Agaricus</i>	Caldo papa dextrosa Jugo de caña Licor de maíz Malta Azúcares reductores, el más usado es la glucosa Proteína de soya Extracto de levadura Peptona	25-45 °C (promedio de 27 °C)	2-7 (promedio de 6)	120-200	1,2,15,16,20,36,42,43,46,72,84
<i>Flammulina</i>	Caldo extracto de malta Extracto de levadura Asparginina Azúcares reductores, como la glucosa Gluten de trigo Peptona	24-28 °C	No se reporta	Estáticos, 150 y 750	24,37,38,66
<i>Grifola</i>	Jugos de caña Melazas Aceites vegetales Licor de maíz Suero de leche Azúcares reductores como la glucosa (la de mayor producción) y maltosa Peptona Extracto de levadura	Se usa 25 °C	pH bajos, el más usado 4,5	100-160	9,32,45,49,69,71,77
<i>Pleurotus</i>	Caldo papa dextrosa Aminoácidos Licor de maíz Extracto de malta Azúcares reductores, las más utilizadas, glucosa y xilosa Hidrolizado de caseína Torta de soya Extracto de levadura Peptona	25-30 °C	4-6	Estáticos, 100-160	3,12-14,22,23,25,31,34,39,48,61,62,67,75,86,87,89,90
<i>Lentinula</i>	Caldo papa dextrosa Melazas Almidón Licor de maíz Lixiviados Desechos industriales (sin especificar) Sacarosa Azúcares reductores, el más importante, la glucosa Extracto de soya Extracto de levadura Polvo de levadura Peptona	25-40 °C (promedio de 26 °C)	3-10 (promedio de 6)	Estáticos, 100-150	17-19,21,22,27,59,62,63,65,70,78-82

* Todas las condiciones se aplican para las fuentes de carbono y nitrógeno citadas.

Conclusiones

Los macromicetos y, entre ellos, las setas comestibles, ofrecen un sinnúmero de metabolitos con actividades biológicas reconocidas. El empleo de la biotecnología y, en especial, de la fermentación líquida por la mayor facilidad en el manejo de las variables del proceso, permitiría aprovechar al máximo la producción de bioactivos mediante la obtención de altos rendimientos de los mismos, lo que conllevaría una reducción de costes y, al final, una disminución del precio para el consumidor. Los estudios realizados hasta el presente con las principales setas comestibles ponen de manifiesto que las condiciones de crecimiento y producción de los metabolitos biológicamente activos difieren entre géneros y especies, así como también según el bioactivo que se desea obtener. De igual

manera, la implementación de esta tecnología para la producción a escala industrial se encuentra apenas en desarrollo, siendo muy pocos los bioactivos producidos de esta manera. Lo anterior evidencia el hecho de que se deben realizar más estudios de este tipo con la finalidad de lograr un desarrollo concienzudo de esta tecnología, lo que traerá como consecuencia natural el mejor aprovechamiento de los beneficios que los macrohongos aportan al ser humano.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Ahlawat OP, Rajender S. Influence of pH, temperature and cultural media on decolorization of synthetic dyes through spent substrate of different mushrooms. *J Sci Ind Res India*. 2009;69:1068–74.
2. Akar T, Dicirklioglu M. Biosorption applications of modified fungal biomass for decolorization of reactive red 2 contaminated solutions: batch and dynamic flow mode studies. *Bioresour Technol*. 2010;101:7271–7.
3. Anastasi A, Prigione V, Varese GC. Industrial dye degradation and detoxification by basidiomycetes belonging to different eco-physiological groups. *J Hazard Mater*. 2010;177:260–7.
4. Benkortbi O, Hanini S, Bentahar F. Batch kinetics and modeling of pleurotumulin production by *Pleurotus mutilis*. *Biochem Eng J*. 2007;36:14–8.
5. Bisen PS, Baghel RK, Sanodiya BS, Thakur GS, Prasad GB. *Lentinus edodes*: a macro-fungus with pharmacological activities. *Curr Med Chem*. 2010;17:2419–30.
6. Caglarmak N. The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula edodes* and *Pleurotus* species) and an estimated approach to the volatile compounds. *Food Chem*. 2007;105:1188–94.
7. Chandra LC, Smith BJ, Clarke SL, Marlow D, D'Offay JM, Kuvibidila SR. Differential effects of shiitake- and white button mushroom-supplemented diets on hepatic steatosis in C57BL/6 mice. *Food Chem Toxicol*. 2011;49:3074–80.
8. Chang ST, Miles PG. Mushrooms cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. 2^a ed. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc.; 2004.
9. Chen HB, Chen MJ, Chen CL, Huang HC, Liu YC. Effect of using whey in the submerged culture of *Grifola umbellata*. *J Biotechnol*. 2010;150:518.
10. Chen J, Seviour R. Medicinal importance of fungal β-(1-3), (1-6)-glucans. *Mycol Res*. 2007;111 Pt 6:635–52.
11. Cruger W, Cruger A. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Zaragoza: Ed. Acribia; 1993.
12. Daba AS, Youssef GA, Kabeil SS, Hafez EE. Production of recombinant cellulose enzyme from *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (type NRRL-0366). *Afr J Microbiol Res*. 2011;5:1197–202.
13. De Menezes CR, Silva IS, Pavarina EC, Guímaro EF, Guímaro F, Grossman MJ, et al. Production of xylooligosaccharides from enzymatic hydrolysis of xylan by the white-rot fungi *Pleurotus*. *Int Biodegr Biodegr*. 2009;63:673–8.
14. El-Enshasy H, Daba A, El-Demellawy M, Ibrahim A, El-Sayed S, El-Badry I. Bioprocess development for large scale production of anticancer exopolysaccharide by *Pleurotus ostreatus* in submerged culture. *J Appl Sci*. 2010;10:2523–9.
15. Eliashvili VI, Kachlishvili ET, Wasser SP. Carbon and nitrogen source effects on basidiomycetes exopolysaccharide production. *Priki Biokhim Mikrobiol*. 2009;45:531–5.
16. Ertugay N, Bayhan YK. The removal of copper (II) ion by using mushrooms biomass (*Agaricus bisporus*) and kinetic modeling. *Desalination*. 2010;255:137–42.
17. Fazenda M, Seviour R, McNeil B, Harvey L. Submerged culture fermentation of higher fungi: the macrofungi. *Adv Appl Microbiol*. 2008;63:33–92.
18. Feng Y, Li W, Wu X, Cheng J, Ma S. Statistical optimization of media form mycelia growth and exopolysaccharide production by *Lentinus edodes* and a kinetic model study of two morphologies. *Biochem Eng J*. 2010;49:104–12.
19. Feng Y, Li W, Wu W, He L, Ma S. Rapid and efficient microwave-assisted sulfate modification of lentinan and its antioxidant and antiproliferative activities in vitro. *Carbohydr Polym*. 2010;82:605–12.
20. Fernandes MB, Habu S, De Lima MA, Thomaz-Soccol CR. Influence by drying methods over in vitro antitumoral effects of exopolysaccharides produced by *Agaricus blazei* LPB03 on submerged fermentation. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2011;34:253–61.
21. Furlan S, Virmond L, Miers D, Bonatti M, Gern R, Jonas R. Mushrooms strains able to grow at high temperatures and low pH values. *World J Microb Biot*. 1997;13:689–92.
22. Giovannozzi G, D'Annibale A, Di Lena G, Vitale N, Di Mattia E, Minelli V. The production of exo-enzymes by *Lentinus edodes* and *Pleurotus ostreatus* and their use for upgrading corn straw. *Bioresour Technol*. 1994;48:173–8.
23. Goyal M, Soni G. Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Pleurotus florida*. *Afr J Microbiol Res*. 2011;5:1131–6.
24. Grimalth A, Berends P, Rabe S, Berger RG, Linke D. Koji fermentation based on extracellular peptidases of *Flammulina velutipes*. *Eur Food Res Technol*. 2011;232:415–24.
25. Gueguin EB, Oloke JK, Lateef A, Azanfack RH, Adeyemi A. Implementation details of computerized temporary immersion bioreactor (TIB): a fermentation case of *Pleurotus pulmonarius*. *Biotechnol Biotech Eq*. 2010;24:2149–53.
26. Gunde-Cimerman N, Friedrich J, Cimerman A, Benicki N. Screening fungi for the production of an inhibitor of HMG-CoA reductase: production of meviolin by the fungi of the genus *Pleurotus*. *FEMS Microbiol Lett*. 1993;11:203–6.
27. Hatvani N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *Int J Antimicrob Agents*. 2001;17:71–4.
28. Hernández A. Microbiología Industrial. Costa Rica: Ed. EUNED; 2003.
29. Hesseltine C. Solid state fermentations. *Biotechnol Bioeng*. 1972;14:517–32.
30. Hu C, Zou Y, Zhao W. Effect of soybean oil on the production of mycelia biomass and pleurotumulin in the shake-flask culture of *Pleurotus mutilis*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2009;25:1705–11.
31. Huang B, Lin W, Cheung PC, Wu J. Differential proteomic analysis of temperature-induced autolysis in mycelium of *Pleurotus tuber-regium*. *Curr Microbiol*. 2011;62:1160–7.
32. Huang HC, Liu YC. Enhancement of polysaccharide production by optimization of culture conditions in shake flask submerged cultivation of *Grifola umbellata*. *J Chin Inst Chem Eng*. 2008;39:307–11.
33. Iacomini M, Carbonero ER, Gracher AH, Komura DL, Marcon R, Freitas CS, et al. *Lentinus edodes* heterogalactan: antinociceptive and anti-inflammatory effects. *Food Chem*. 2008;111:531–7.
34. Jeong YT, Jeong SC, Gu YA, Islam R, Song CH. Antitumor and immunomodulating activities of endo-biopolymers obtained from a submerged culture of *Pleurotus eryngii*. *Food Sci Biotechnol*. 2010;19:399–404.
35. Jikai L. Biologically active substances from mushrooms in Yunnan, China. *Heterocycles*. 2002;57:157–67.
36. Kim K, Choi B, Lee I, Kwon S, Oh K, Kim AY. Bioproduction of mushroom mycelium of *Agaricus bisporus* by commercial submerged fermentation for the production of meat analogue. *J Sci Food Agric*. 2011;91:1561–8.
37. Kim SY, Kong WS, Cho JY. Identification of differentially expressed genes in *Flammulina velutipes* with anti-tyrosinase activity. *Curr Microbiol*. 2011;62:42–7.
38. Kozhemyakina NV, Ananyeva EP, Gurina SV, Galynkin VA. Conditions of cultivation, composition, and biological activity of mycelium of *Flammulina velutipes* (Fr) P Karst. *Appl Biochem Microbiol*. 2010;46:536–9.
39. Lavi I, Levinson D, Peri I, Tekoah Y, Hadar Y, Schwartz B. Chemical characterization, antiproliferative and antiadhesive properties of polysaccharides extracted from *Pleurotus pulmonarius* mycelium and fruiting bodies. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;85:1977–90.
40. Lee I, Ahn B, Choi J, Hattori M, Min B, Bae K. Selective cholinesterase inhibition by lanostane triterpenes from fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011;21:6603–7.
41. León F, Valencia M, Rivera A, Nieto I, Quintana J, Estévez F, et al. Novel cytostatic lanostanoid triterpenes from *Ganoderma australe*. *Helv Chim Acta*. 2003;86:3088–95.
42. Li P, Su IP, Li YR. The effects of extracellular polysaccharide from the submerged fermentation of *Agaricus brasiliensis* on hlipolipidemic. 5th International Technical Symposium on Food Processing, Monitoring Technology in Bioprocesses and Food Quality Management; 2009. p. 75–86.
43. Lima LF, Habu S, Gern JC, Nascimento BM, Parada JL, Noseda MD, et al. Production and characterization of the exopolysaccharides produced by *Agaricus brasiliensis* in submerged fermentation. *Appl Biochem Biotech*. 2008;151:283–94.
44. Lindequist U, Niedermeyer TH, Jülich WD. The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM*. 2005;2:285–99.
45. Liu GQ, Han WJ, Zhang HY, Jin XC. Polysaccharides extraction from submerged-cultured mycelium of *Grifola frondosa*. ICBBT 2010-2010 International Conference on Bioinformatics and Biomedical Technology, art no. 5478998. p. 111–114.
46. Liu GQ, Wang XL. Selection of a culture medium for reducing costs and enhancing biomass and intracellular polysaccharide production by *Agaricus blazei* AB2003. *Food Technol Biotechnol*. 2009;47:210–4.
47. Liu J, Shimizu K, Konishi F, Noda K, Kumamoto S, Kurashiki K, et al. Anti-androgenic activities of the triterpenoids fraction of *Ganoderma lucidum*. *Food Chem*. 2007;100:1691–6.
48. Liu X, Zhou B, Lin R, Jia L, Deng P, Fan K, et al. Extraction and antioxidant activities of intracellular polysaccharide from *Pleurotus* sp. mycelium. *Int J Biol Macromol*. 2010;47:116–9.
49. Lo HC, Hsu TH, Chen CY. Submerged culture mycelium and broth of *Grifola frondosa* improve glycemic responses in diabetic rats. *Am J Chin Med*. 2008;36:265–85.
50. Madigan M, Martinko J, Parker J, editores. Brock. Biología de los microorganismos. España: Prentice Hall; 1998.
51. Markova N, Kussovski V, Drandarska I, Nikolaeva S, Georgieva N, Radoucheva T. Protective activity of lentinan in experimental tuberculosis. *Int Immunopharmacol*. 2003;3:1557–62.
52. Martínez-Carrera D, Sobal M, Morales P, Martínez W, Martínez M, Mayett Y. Los hongos comestibles: propiedades nutricionales, medicinales y su contribución a la alimentación mexicana. Colegio de Posgraduados Campus Puebla: El shiitake; 2004.
53. Mattila P, Suonpää K, Piironen V. Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition*. 2000;16:694–6.
54. Miles PG, Chang ST. Biología de las setas: fundamentos básicos y acontecimientos actuales. Hong Kong: World Scientific; 1999.
55. Moore JE, Hearts R, Nelson D, McCollum G, Millar BC, Maeda Y, et al. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of shiitake (*Lentinula edodes*) and oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complement Ther Clin Pract*. 2009;15:5–7.
56. Mushroom Growers' Handbook 1. Oyster Mushroom Cultivation. Seoul, Corea: MushWorld-Heimeart Inc; 2004.
57. Nieto I. Química y biotecnología fúngica. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2010.
58. Nirogi R, Mudigonda K, Kandikere V. Chromatography-mass spectrometry methods for the quantitation of statins in biological samples. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;44:379–87.
59. Osman M, Hassan F, Khattab O, Ahmed W, El-Henawy H. Physiological studies on growth of two differ strains of *Lentinus edodes*. *Aust J Basic Appl Sci*. 2009;3:4094–103.
60. Papaspyridi LM, Katapodis P, Gonou-Zagou Z, Kapsanaki-Gotsi E, Christakopoulos P. Studies on the production of statins by greek isolates of basidiomycetes. *J Biotechnol*. 2007;131:S61–2.
61. Papaspyridi LM, Katapodis P, Gonou-Zagou Z, Kapsanaki-Gotsi E, Christakopoulos P. Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibers content by *Pleurotus ostreatus* THUM 4438 under submerged culture. *Biochem Eng J*. 2010;50:131–8.

62. Petre M, Teodorescu A, Tuluca E, Bejan C, Andronescu A. Biotechnology of mushroom pellets producing by controlled submerged fermentation. *Rom Biotechnol Lett.* 2010;15:50–5.
63. Pimentel M. Actividad antimicrobiana de extractos y fracciones del cultivo *in vitro* de *Lentinula edodes* contra *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae*, *Guignardia atricarpa*, *Colletotrichum sublireolum* y el virus del mosaico del tabaco. São Paulo: Universidad de São Paulo; 2008.
64. Popova M, Trusheva B, Gysheva M, Tsvetkova I, Bankova V. Antibacterial triterpenes from the threatened Wood-decay fungus *Fomitopsis rosea*. *Fitoterapia.* 2009;80:263–6.
65. Rendón M, de Villeros P. Evaluación del crecimiento y producción de exopolisacáridos del shiitake (*Lentinula edodes*) en cultivo sumergido. Medellín: Universidad EAFIT; 2004.
66. Rodrigues de Melo M, Paccola-Meirelles LD, Faria TJ, Ishikawa NK. Influence of *Flammulina velutipes* mycelia culture conditions on antimicrobial metabolite. *Mycoscience.* 2009;50:78–81.
67. Rodríguez S, Fernández M, Bermúdez RC, Morris H. Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus* spp. *Rev Iberoam Micol.* 2003;20:164–8.
68. Rodríguez-Couto S, Sanromán M. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *J Food Eng.* 2006;76:291–302.
69. Rouhana-Toubi A, Wasser SP, Fares F. Ethyl acetate extracts of submerged cultured mycelium of higher basidiomycetes mushrooms inhibit human ovarian cancer cell growth. *Int J Med Mush.* 2009;11:29–37.
70. Saeki N, Takeda H, Tanaseka E, Yoshida M. Induction of manganese peroxidase and laccase by *Lentinula edodes* under liquid culture conditions and their isozyma detection by enzymatic staining on native-PAGE. *Mycoscience.* 2011;52:132–6.
71. Shi IL, Chou BW, Chen CC, Wu JY, Hsieh C. Study of mycelia growth and bioactive polysaccharide production in batch and fed-batch culture of *Grifola frondosa*. *Bioresour Technol.* 2008;99:785–93.
72. Shu CH, Lin KJ. Effects of aeration rate on the production of ergosterol and blazeispiron A by *Agaricus blazei* in batch cultures. *J Taiwan Inst Chem Eng.* 2011;42:212–6.
73. Smania EF, Delle Monache F, Smania Jr A, Yunes RA, Cuneo RS. Antifungal activity of sterols and triterpenes isolated from *Ganoderma annulare*. *Fitoterapia.* 2003;74:375–7.
74. Smiderle F, Olsen L, Carbonero E, Baggio C, Freitas C, Marcon R, et al. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a(1→3),(1→6)-linked β-glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. *Eur J Pharmacol.* 2008;597:86–91.
75. Smith J, Rowan N, Sullivan R, editores. Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. Reino Unido: University of Strathclyde; 2002.
76. Stamets P. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. Berkeley: Ten Speed Press; 1993.
77. Tada R, Adachi Y, Ishibashi K, Ohno N. An unambiguous structural elucidation of a 1,3-β-D-glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa* by solution NMR experiments. *Carbohydr Res.* 2009;344:400–4.
78. Tepwong P, Ohshima T. Biosynthesis of ergothioneine during different stages of submerged fermentation of shiitake (*Lentinus edodes*) mushrooms and their bioactive properties. *J Biosci Bioeng.* 2009;108:S4–5.
79. Tsivileva OM, Nikitina VE, Loshchinina EA. Isolation and characterization of *Lentinus edodes* (Berk) singer extracellular lectins. *Biochemistry (Moscow).* 2008;73:1154–61.
80. Tsivileva OM, Pankratov AN, Nikitina VE. Extracellular protein production and morphogenesis of *Lentinula edodes* in submerged culture. *Mycol Prog.* 2010;9:157–67.
81. Turlo J, Gutkowska B, Herold F. Effect of selenium enrichment on antioxidant activities and chemical composition of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. mycelial extracts. *Food Chem Toxicol.* 2010;48:1085–91.
82. Turlo J, Gutkowska B, Herold F, Krzyczkowski W, Blazewicz A, Kocjan R. Optimizing vitamin B₁₂ biosynthesis by mycelia cultures of *Lentinula edodes* (Berk) Pegl. *Enzyme Microb Technol.* 2008;43:369–74.
83. Vocak K, Budesinský M, Harmatha J, Pís J. New ergostane type ecdysteroids from fungi. Ecdysteroid constituents of mushroom *Paxillus atrotomentosus*. *Tetrahedron.* 1998;54:1657–66.
84. Wang XL, Lui GQ, Zhang HY, Zhou GY. Extraction of mycelia polysaccharides from submerged-cultured *Agaricus blazei*. 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, iCBBE 2010. Art no. 5517607.
85. Wasser SP. Medicinal mushroom as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002;60:258–74.
86. Wasser SP, Weis AL. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives. *Int J Med Mushrooms.* 1999;1:31–62.
87. Wu CY, Mau JL, Liang ZC. The influence of cultivation conditions on mycelial growth and exopolysaccharide production of culinary-medicinal mushroom *Pleurotus citrinopileatus* singer (Agaricomycetidae). *Int J Med Mushrooms.* 2008;10:279–92.
88. Yasukawa K, Kaminaga T, Kitanaka S, Tai T, Nunoura Y, Natori S, et al. 3B-p-Hydroxybenzoyldehydrotumulosic acid from *Poria cocos*, and its anti-inflammatory effect. *Phytochemistry.* 1998;48:1357–60.
89. Zhang BB, Cheung PC. A mechanistic study of the enhancing effect of Tween 80 on the mycelia growth and exopolysaccharide production by *Pleurotus tuber regium*. *Bioresour Technol.* 2011;102:8323–6.
90. Zhang BB, Cheung PC. Use of stimulatory agents to enhance the production of bioactive exopolysaccharide from *Pleurotus tuber-regium* by submerged fermentation. *J Agric Food Chem.* 2011;59:1210–6.
91. Zhang Y, Li S, Wang X, Zhang L, Cheung P. Advances in lentinan: isolation, structure, chain conformation and bioactivities. *Food Hydrocolloids.* 2011;25:196–206.