



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**EXTRACTOS DE MADERA DE VID PARA LA POTENCIACIÓN
DE BIOMASA DE *Ganoderma* spp. EN CULTIVO LÍQUIDO**

Por:

María Concepción Cruz Félix

TESIS APROBADA POR LA

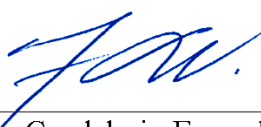
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de María Concepción Cruz Félix la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



Dr. Martín Candelario Esqueda Valle
Director de Tesis



Dr. Miguel Beltrán García
Integrante del comité de tesis



M. en C. Aldo Hiram Gutiérrez Saldaña
Integrante del comité de tesis



M. en C. Jesús Antonio Orozco Avitia
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Extractos de Madera de Vid para la Potenciación de Biomasa de *Ganoderma* spp. en Cultivo Líquido” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora María Concepción Cruz Félix, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Pablo Wong González", is written over a horizontal line.

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado durante la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A.C.) por permitir el estudio del posgrado en sus instalaciones y el desarrollo en mi formación profesional.

Al proyecto de Ciencia Básica A1-S-34237 “Búsqueda de nuevos triterpenoides con actividad anticancerígena en cepas de *Ganoderma* spp. nativas del desierto Sonorense” por su financiamiento.

A la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV) por facilitar el uso de equipos y materiales.

Al Dr. Martín Esqueda por permitir que me incorporara nuevamente a su equipo de trabajo, por su paciencia, por cada herramienta, lección, aprendizaje y charla brindada. Al M. en C. Aldo Gutiérrez por su apoyo técnico, académico y personal, por el día a día, no se hubiera concluido este trabajo sin ti. Al M. en C. Antonio Orozco por su apoyo técnico, sus comentarios, por su apoyo y presencia en cada momento. Al Dr. Miguel Beltrán por formar parte del comité, observaciones y recomendaciones.

Al personal de la Coordinación de Programas Académicos (CPA), intendencia, biblioteca, mantenimiento y seguridad.

Al Laboratorio de Biotecnología de Hongos y Plantas y el Laboratorio de Micropropagación, a Georgina Vargas gracias por el apoyo técnico, disposición y cada plática compartida, a Edgardo Zayas, Lucía Angulo, Lucía Ruvalcaba, Ximena Martínez, Jonathan Montalván, Odeth Muñoz, Ana Lilia Murrieta y Samantha Rodríguez por su apoyo técnico, por cada plática, risa, convivio, compañía, por todos esos momentos vividos dentro y fuera del laboratorio, los aprecio mucho, no hubiera sido posible sin ustedes.

Por su apoyo técnico a los miembros del Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular de Plantas, en especial a Javier Ojeda y Eduardo Trillo. A los integrantes del Laboratorio de Tecnologías Emergentes, en especial a Fernando Ayala, Brenda Silva, Karen Quintero, Yessica Enciso y Melvin Tapia. Al Laboratorio de Antioxidantes, Mónica Villegas, Jacqueline Ruiz, Shain Zúñiga, Diana León, Daniela Pérez, Beatriz Belmonte y Alejandra Preciado. Al Laboratorio de Fisiología Vegetal, Emmanuel Aispuro, Francisco Soto, Alejandro Tiznado y Laura Ochoa. A Marisela Rivera y Karen

Astorga del Laboratorio de Biotecnología Molecular de Plantas.

A Katya Félix, Alfonso Sánchez, Alberto Sánchez por el apoyo técnico brindado.

A mis profesores y compañeros.

A mis amigos CIAD Glenda Gutiérrez, Marisol Padilla, Azael Castro, Fernanda Campa, Francisco Laborín, Ángela Nieblas, Miriam Zambrano y Daniel Varela, por todos los momentos compartidos y la amistad que formamos.

A mis amigas de la comedera Karen Quintero, Shain Zúñiga, Yessica Enciso, Brissa García, Albani Rivera y Patricia Palafox por su apoyo en clases, tantas horas de estudio y desveladas.

A mis biólogas Carolina, Diana, Areli, Karla, Teresita y Elizabeth porque a pesar de estar en diferentes ciudades siguen estando presentes. A mis amigos Zulay, Valeria, Yazmín, Victoria, Paola, Magda, Yomaira, Cire y Reta por cada plática, distracción y palabras de aliento. A mis compañeros de la oficina por estar al pendiente.

A mi papá, mamá, Ana Paula, Andrea, Alejandra y César, siempre presentes, por su amor incondicional y por ser un gran ejemplo para mí. A los Cruz y a los Félix.

A Hugo por tu compañía, paciencia, comprensión, amor, los buenos y malos ratos, tiempo y motivación. Asimismo, gracias a su familia.

Y a aquellas personas que pude haber olvidado, gracias.

DEDICATORIA

A mis padres Reynaldo y Conchita

A mis hermanas Ana Paula, Andrea y Alejandra

A mi sobrino César

A Hugo

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE CUADROS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES	15
2.1. Generalidades de <i>Ganoderma</i>	15
2.1.1. Taxonomía, Distribución y Hábitat	15
2.1.2. Propiedades Nutricionales y Medicinales	16
2.1.3. Importancia Económica	17
2.1.4. Conocimiento de <i>Ganoderma</i> en Sonora, México.....	17
2.2. Cultivo de <i>Ganoderma</i>	18
2.2.1. Cultivo Sólido	18
2.2.2. Cultivo Líquido.....	19
2.2.3. Sustratos Alternativos	19
2.3. Compuestos Bioactivos en <i>Ganoderma</i>	21
2.4. Potencial Antioxidante de <i>Ganoderma</i>	24
2.5. Elicitores que Mejoran la Producción de Polisacáridos y Ácidos Ganodéricos en <i>Ganoderma</i>	25
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	28
4.1. Objetivo General.....	28
4.2. Objetivos Específicos	28
5. METODOLOGÍA	29
5.1. Obtención y Preparación de los Extractos de Madera de Vid	29
5.2. Establecimiento y Condiciones del Cultivo de Cepas Nativas de <i>Ganoderma</i> spp.	29
5.3. Preparación de Extractos	31
5.4. Evaluación de la Capacidad Antioxidante.....	31
5.4.1. TEAC	31
5.4.2. FRAP	31
5.4.3. ORAC	32

CONTENIDO (continuación)

5.5. Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	32
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
6.1. Obtención de Extractos de Madera de Vid.....	33
6.2. Extractos de Madera de Vid en la Producción de Biomasa.....	34
6.3. Capacidad Antioxidante del Micelio de <i>Ganoderma</i> spp.....	41
7. CONCLUSIÓN.....	46
8. RECOMENDACIONES.....	47
9. REFERENCIAS.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema general de la biosíntesis de los ácidos ganodéricos. Modificado de Trigos y Suárez-Medellín (2011)	25
2	Producción de biomasa de las diferentes cepas de <i>Ganoderma</i> spp.....	36
3	Superficie de respuesta de <i>Ganoderma lucidum</i> (FP-34D)	38
4	Superficie de respuesta de <i>Ganoderma subincrustatum</i> (BH-1).....	39
5	Superficie de respuesta de <i>Ganoderma weberianum</i> (BH-21).....	40
6	Superficie de respuesta de <i>Ganoderma oerstedii</i> (BH-17).....	41
7	Producción de biomasa de <i>Ganoderma oerstedii</i> (BH-17) suplementado con el extracto polar a 500 µg/L y <i>G. lucidum</i> (FP-34D) con todos los extractos a 1000 µg/L a los 15 días de crecimiento.....	43
8	Capacidad antioxidante determinada con ORAC de la biomasa de <i>Ganoderma oerstedii</i> (BH-17) y <i>G. lucidum</i> (FP-34D). A) Total. B) Con respecto al tiempo (días 3, 6, 9, 12 y 15).....	45
9	Capacidad antioxidante determinada con FRAP de la biomasa de <i>Ganoderma oerstedii</i> (BH-17) y <i>G. lucidum</i> (FP-34D). A) Total. B) Con respecto al tiempo (días 3, 6, 9, 12 y 15).....	46
10	Capacidad antioxidante determinada con TEAC de la biomasa de <i>Ganoderma oerstedii</i> (BH-17) y <i>G. lucidum</i> (FP-34D). A) Total. B) Con respecto al tiempo (días 3, 6, 9, 12 y 15).....	47

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Clasificación taxonómica de <i>Ganoderma</i>	16
2	Actividad biológica de los ácidos ganodéricos aislados de <i>Ganoderma lucidum</i>	22
3	Ácidos ganodéricos obtenidos a partir de distintos elicitores.....	27
4	Cepas nativas de <i>Ganoderma</i> spp. de Sonora utilizadas en el presente estudio	31
5	Rendimiento de los extractos.....	35
6	Biomasa obtenida con las cepas de <i>Ganoderma</i> aplicando diferentes concentraciones de extractos de madera de vid.....	37

RESUMEN

El cultivo de la vid genera un gran volumen de residuos lignocelulósicos y una alternativa para su reciclaje es el cultivo de hongos comestibles y medicinales. Por más de dos milenios el género *Ganoderma* se ha utilizado en la medicina asiática, por el efecto benéfico para la salud. Sus compuestos bioactivos son principalmente polisacáridos y triterpenos, los cuales se encuentran en el cuerpo fructífero, micelio y esporas. Una tendencia actual es el cultivo líquido de especies de *Ganoderma* para producir estos metabolitos. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de los extractos de madera de vid (*Vitis vinifera* L. cv. 'Ruby Seedless') en cultivo líquido sobre la producción de biomasa de cepas nativas de *Ganoderma* spp. del desierto Sonorense, México. La madera de vid se molió y colocó en un Soxhlet con diferentes solventes (tolueno, cloroformo, etanol y agua). Los extractos obtenidos se diluyeron en etanol al 70 % y se dividieron en polares, una combinación de todos y una mezcla de polares y no polares (3:1) a diferentes concentraciones (250, 500, 1000, 1500 y 2000 µg/L). Se colocaron en matraces Erlenmeyer con medio de cultivo harina de maíz-glucosa-peptona, se agregó un disco de micelio de cada cepa y se cultivó en oscuridad a 25 °C con agitación. Al mejor tratamiento se determinó la capacidad antioxidante mediante ORAC, FRAP y TEAC. La producción de biomasa fúngica varió según la cepa, el tipo y la concentración del extracto, con una mayor producción global en *Ganoderma oerstedii* (BH-17), seguido de *G. subincrustatum* (BH-1) ($P < 0.05$), sin diferencias entre *G. lucidum* (FP-34D) y *G. weberianum* (BH-21) ($P > 0.05$). Con base en los extractos, la mayor producción de biomasa se obtuvo con el extracto polar a una concentración de 500 µg/L, seguido por la polar a 2000 µg/L y la combinación de polares y no polares (3:1), y la menor con la mezcla de los cuatro extractos a 250 µg/L. Aunque la capacidad antioxidante entre *G. oerstedii* vs. *G. lucidum* fue disímil, sin una tendencia definida en el periodo de evaluación, destaca la presencia de actividad en el micelio dicarióntico de ambas especies, siendo mayor FRAP en la cepa nativa. Con base en los resultados del análisis de superficie de respuesta se concluye que los extractos de madera de vid potencian la producción de biomasa de *Ganoderma* spp. en cultivo sumergido con variación según la cepa, la polaridad y la concentración del extracto.

Palabras clave: hongo medicinal, reishi, cultivo sumergido, capacidad antioxidante

ABSTRACT

Vineyard pruning generates a large volume of lignocellulosic wastes and an alternative for recycling is medicinal and edible mushrooms cultivation. For more than two millennia the genus *Ganoderma* has been used in Asian medicine for beneficial effect on health. Its bioactive compounds are mainly polysaccharides and triterpenoids which are found in fruiting body, mycelia, and spores. A current trend is the liquid culture of *Ganoderma* species to obtain these metabolites. The aim of this work is to evaluate the effect of vineyard pruning extracts (*Vitis vinifera* L. cv. 'Ruby Seedless') in liquid culture on the biomass production of native strains of *Ganoderma* spp. from Sonoran Desert, Mexico. The vineyard pruning was chopped and placed in a Soxhlet with different solvents (toluene, chloroform, ethanol, and water). The obtained extracts were diluted in 70 % ethanol and divided into polar, a combination of all and a mixture of polar and nonpolar (3:1) at different concentrations (250, 500, 1000, 1500 and 2000 µg/L). They were placed in Erlenmeyer flasks with cornmeal-glucose-peptone liquid culture, a mycelial disk of each strain was added and cultivated under darkness at 25 °C with shaking. The best treatment was determined antioxidant capacity by ORAC, FRAP, and TEAC. The results showed significant differences in the obtained extracts and the highest biomass production was in the mixture of polar and non-polar (3:1). The production of fungal biomass varied according to the strain, type, and concentration of the extracts with a higher global production in *G. oerstedii* (BH-17), followed by *G. subincrustatum* (BH-1) ($P < 0.05$), without differences between *G. lucidum* (FP-34D) and *G. weberianum* (BH-21) ($P > 0.05$). Based on the extracts, the highest biomass production was obtained with the polar extract at a concentration of 500 µg/L, followed by the polar extract at 2000 µg/L, and the combination of polar and non-polar (3:1). The lowest biomass was with the mixture of the four extracts at 250 µg/L. Although the antioxidant capacity between *G. oerstedii* vs. *G. lucidum* was dissimilar, without a defined trend in the evaluation period, the presence of activity in the dikaryotic mycelia of both species stands out with higher FRAP in the native strain. Based on results of response surface analysis, it is concluded that vineyard pruning extracts enhance the biomass production of *Ganoderma* species in submerged culture with variation according to the strain, and extracts polarity and concentration.

Keywords: medicinal mushroom, reishi, submerged culture, antioxidant capacity

1. INTRODUCCIÓN

En México se cosechan cerca de 21 millones de hectáreas de frutas y hortalizas anualmente (SIAP, 2019), lo que genera una gran cantidad de residuos de los cuales solo un pequeño porcentaje es aprovechado. Estos residuos agrícolas son subproductos no utilizados y en ocasiones representan serias complicaciones como generación de patógenos y problemas ambientales. Uno de estos cultivos es vid (*Vitis vinifera* L.) donde Sonora es el principal productor en el país (Vázquez, 2011). En 2017 se obtuvieron en el estado 334,355 t de las 415,889 t producidas a nivel nacional (SIAP, 2019). Anualmente se generan toneladas de residuos producto de la poda de este cultivo, una porción de estos se incorpora al suelo; sin embargo, la mayor parte es incinerada (Morales-Estrada *et al.*, 2018). Por lo tanto, es de suma importancia realizar un adecuado aprovechamiento de estos residuos agrícolas.

Actualmente el cultivo de hongos es una industria en crecimiento y en la cual se ha visto el potencial de aprovechar estos residuos agrícolas, transformándolos en alimentos y suplementos, reduciendo así los problemas de su disposición final. Esta producción de hongos presenta un panorama biotecnológico prometedor que abarca gran cantidad de campos de aplicación (Andrino *et al.*, 2011). En lo que respecta a la madera de vid se ha observado que las características de su composición química como el alto contenido de azúcares y de diversos compuestos susceptibles a la rápida oxidación, favorecen el desarrollo de cuerpos fructíferos (Cabrera *et al.*, 2013). Especies como *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* y *Ganoderma* spp., se han utilizado para evaluar el potencial de esta madera con resultados promisorios (Sánchez *et al.*, 2002; Gaitán-Hernández *et al.*, 2006; Morales-Estrada *et al.*, 2018). *Ganoderma* representa una gran importancia económica debido a su alta cantidad de compuestos bioactivos con potencial uso farmacológico.

Ganoderma lucidum es la especie más distintiva del género; basidiomiceto perteneciente a la familia Ganodermataceae, utilizado en la cultura oriental durante más de 2000 años (Stamets, 2000), especialmente en China y Japón, donde es popularmente llamado *lingzhi* y *reishi*. “El hongo de la inmortalidad” se ha empleado para tratar diferentes tipos de enfermedades como diabetes, hipertensión, problemas cardiovasculares y distintos tipos de cáncer. Debido a ello, existe una gran cantidad de investigaciones con diferentes enfoques en todo el mundo desde nutracéuticos hasta fitopatógenos, pero sobre todo hacia sus bioactivos con potencial farmacológico (Karthikeyan *et*

al., 2009; Paterson, 2006; Sliva *et al.*, 2003). Esta versatilidad se debe al gran número de compuestos aislados de estos hongos, diversos estudios revelaron que sus principales constituyentes son polisacáridos y ácidos ganodéricos. Estos últimos exhiben una potente actividad antioxidante, inmunoestimulante, antitumoral, hepatoprotectora, hipoglucemiante, hipocolesterolemiante, entre otras (Batra *et al.*, 2013; Russell y Paterson, 2006; Sanodiya *et al.*, 2009; Sliva *et al.*, 2003). Debido a ello, es de suma importancia la óptima producción de los ácidos ganodéricos para satisfacer la alta demanda que existe en el mercado.

Tradicionalmente, *G. lucidum* se cultiva en medio sólido, ya que se ha observado que cosechados de esta forma presentan una mayor actividad antiproliferativa. Sin embargo, tiene las desventajas de que requiere algunos meses para producir cuerpos fructíferos y existe variabilidad en la calidad del producto por su susceptibilidad ante cambios ambientales. Se desarrolló una tecnología de fermentación sumergida para cultivos miceliales de *G. lucidum* y atrajo mucha atención como una alternativa promisoriosa porque no presenta ninguna de las debilidades mencionadas anteriormente (Tang *et al.*, 2006). La fermentación sumergida es una tecnología competente para la producción de ácidos ganodéricos. Sin embargo, los rendimientos de biomasa micelial y de bioactivos continúan siendo bajos, a pesar de las mejoras realizadas en los últimos años, lo cual es una limitante importante para su comercialización (Hu *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2014). El conocimiento sobre el cultivo sumergido de *G. lucidum* se ha incrementado evaluándose elicitores para mejorar la producción de polisacáridos y ácidos ganodéricos. Por ello, se evaluará el efecto de extractos de madera de vid de diferente polaridad sobre la producción de biomasa en cultivo líquido de cepas nativas de *Ganoderma* spp. de Sonora.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de *Ganoderma*

Ganoderma es un hongo de pudrición blanca que actúa en la descomposición de la madera, degradando principalmente lignina y celulosa. Estos hongos poseen una cutícula característica de color marrón claro a púrpura oscuro, con poros pequeños a medianos generalmente estratificados, ocráceos, en ocasiones blanquecinos y el contexto de blanco a marrón (Wang *et al.*, 2012). Distintas especies de este género, en especial *G. lucidum*, se han utilizado en la cultura oriental como medicina tradicional durante más de 2000 años, especialmente en China y Japón, popularmente llamado *lingzhi* y *reishi*; mejor conocido como “el hongo de la inmortalidad” (Xu *et al.*, 2010). Este basidiomiceto es utilizado para incrementar la actividad inmune y tratar la hipertensión, artritis, asma, gastritis, hemorroides, hepatitis, problemas vasculares, cáncer y otros padecimientos (Trigos y Suárez-Medellín, 2011; Wang *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2010) como tónico medicinal en infusiones, tanto de carpóforo como micelio pulverizado (Stamets, 2000). Debido a esto, existe una variedad de investigaciones con distinto enfoque alrededor del mundo.

2.1.1. Taxonomía, Distribución y Hábitat

El género *Ganoderma* pertenece a la familia Ganodermataceae del orden Polyporales (Cuadro 1), comprende dos subgéneros: *Ganoderma* y *Elfvigia*, el primero se caracteriza por la superficie lacada del píleo vs. opaca en el segundo. En general es un género complejo, presenta una alta variabilidad morfológica, debido a ello ha generado confusiones taxonómicas con determinaciones incorrectas (López-Peña *et al.*, 2016), principalmente por diferencias ante condiciones climáticas y de cultivo. En la actualidad, en conformidad con Index Fungorum (2019) se conocen 234 especies válidas para *Ganoderma* (www.indexfungorum.org), las cuales se encuentran distribuidas alrededor del mundo en zonas templadas, tropicales y desérticas. Regularmente se desarrollan sobre troncos, son anuales o plurianuales, en forma de repisa, pileada, sésil y estipitada al centro o

lateralmente (Seo y Kirk, 2000).

Las características morfológicas de importancia taxonómica del género son el color del contexto, forma del margen, presencia/ausencia de laca en el píleo, con/sin estípite, las cuales están sujetas a variaciones por el efecto de la ubicación geográfica, condiciones climáticas y el origen del genoma (Wachtel-Galor *et al.*, 2011). Dentro de los caracteres microscópicos se encuentra el color, textura, tamaño y forma de las basidiosporas, presencia o ausencia de clamidosporas en cultivos *in vitro*, entre otros. La metodología empleada en la taxonomía clásica suele tomar en cuenta estas características además de la especificidad del hospedero y algunas pruebas químicas como la reacción amiloide o dextrinoide en presencia del reactivo de Melzer (Seo y Kirk, 2000).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Ganoderma*

Categoría	Taxón
Reino	Fungi
División	Basidiomycota
Clase	Agaricomycetes
Orden	Polyporales
Familia	Ganodermataceae
Género	<i>Ganoderma</i>

2.1.2. Propiedades Nutricionales y Medicinales

El consumo de *Ganoderma* es único dentro de los hongos cultivados, debido al gran valor nutricional y farmacéutico que se le atribuye. Wachtel-Galor *et al.* (2011) compararon la composición de basidiomicetos en general, los cuales contienen alrededor del 90 % de agua en peso. El 10 % restante consiste en 10–40 % de proteínas, 2–8 % de grasa, 3–28 % de carbohidratos, 3–32 % de fibra, 8–10 % de algunas vitaminas y minerales (Borchers *et al.*, 2008). Con resultados disímiles, en especies de *Ganoderma* cultivadas sobre residuos vitivinícolas, Morales-Estrada *et al.* (2018) determinaron promedios de humedad de 4.3 a 6.4 %, proteínas de 5.7–13.5 %, minerales de 1.3–4.0 % y grasa de 0.8–1.7 %. Mau *et al.* (2001) registraron un contenido de 21.8–27.7 % de carbohidratos y 59.1–65.2 % de fibra para *G. lucidum*.

Los hongos contienen una amplia variedad de moléculas bioactivas como terpenoides, esteroides,

fenoles, nucleótidos y sus derivados, glicoproteínas y polisacáridos. Las proteínas fúngicas contienen todos los aminoácidos esenciales y son especialmente ricos en lisina y leucina. En el estudio realizado por Trigos y Suárez-Medellín (2011) entre las principales actividades biológicas ejercidas por los derivados del lanosterol se encuentran la citotoxicidad contra varias líneas de células cancerosas, la actividad antiinflamatoria, antiviral y hepatoprotectora. Por otro lado, se sabe que los polisacáridos mejoran el sistema inmunológico y ayudan a eliminar radicales libres. Sin embargo, aún se requiere investigación en este campo.

2.1.3. Importancia Económica

La producción de hongos comestibles y medicinales ha aumentado significativamente en las últimas décadas, debido a las propiedades nutrimentales y al potencial farmacológico que le atribuyen. En la actualidad, *Ganoderma* es comercializado en diferentes formas en todo el mundo, donde se estima un mercado de 5 a 6 mil millones de dólares por año y solamente para Estados Unidos el consumo genera 1.6 mil millones, mientras que en los países asiáticos como China, Japón y Corea del Sur se estiman 2.5 mil millones (Hapuarachchi *et al.*, 2018). El cultivo de hongos no requiere grandes costos de inversión, infraestructura, mano de obra y el tiempo de cultivo es menor que en condiciones naturales (Bidegain *et al.*, 2015). Asimismo, es una alternativa para el reciclaje de residuos agroindustriales y contribuir a la disminución de la contaminación ambiental.

2.1.4. Conocimiento de *Ganoderma* en Sonora, México

Ganoderma presenta amplia distribución alrededor del mundo. Se han registrado 16 especies para México y ocho en Sonora, donde se encuentra en bosque de encino, encino-pino, pino-encino, encino abierto y en zonas xerófilas con mezquital (López-Peña *et al.*, 2016). Los basidiomicetos reportados de Sonora se encuentran distribuidos en la zona urbana de Hermosillo, Reserva Forestal Nacional y Refugio de Fauna Silvestre Ajos-Bavispe, Reserva de la Biosfera Sierra de Álamos-Río

Cuchujaqui, Sierra de Yécora, Sierra de San Javier y Sierra de Mazatán (López-Peña *et al.*, 2016). Los especímenes que se encuentran en la colección de hongos “Dr. Martín Esqueda Valle” del herbario de la Universidad Estatal de Sonora (UES) son: *G. applanatum*, *G. curtisii* (presenta la distribución más amplia), *G. lobatum*, *G. oerstedii*, *G. sessile*, *G. sessiliforme*, *G. subincrustatum* y *G. weberianum*.

2.2. Cultivo de *Ganoderma*

Ganoderma lucidum es la especie más cultivada del género, la cual se produce tradicionalmente en medio sólido. Este método presenta algunas desventajas como el largo tiempo que se requiere para fructificar (3-5 meses) y la dificultad de controlar la calidad del producto por su susceptibilidad ante cambios ambientales. En las últimas décadas se ha desarrollado una tecnología de fermentación sumergida para cultivos miceliales, la cual atrajo mucha atención como una alternativa promisoriosa porque no presenta ninguna de las debilidades mencionadas anteriormente (Tang y Zhong, 2003). No obstante, tiene desventajas como la oxigenación, el riesgo de contaminación, la alta viscosidad como resultado de la producción de polisacáridos extracelulares y una tasa de crecimiento lenta, por lo que se requiere un cultivo celular de alta densidad para aumentar la productividad de los metabolitos, especialmente para productos intracelulares (Zhang *et al.*, 2014). Este cultivo es complejo por lo que requiere una optimización del protocolo de producción.

2.2.1. Cultivo Sólido

A partir de 1970 comenzó la producción de carpóforos de *Ganoderma* y desde ese momento los procesos se han desarrollado rápidamente. Los cultivos sólidos fueron ampliamente adoptados por los cultivadores para su producción comercial, los cuales se llevan a cabo en madera leñosa o tocones de árboles, así como en mezclas de aserrín enriquecido con fuentes de carbono y nitrógeno

(Stamets, 2000). Los métodos involucran convencionalmente cinco etapas: elaboración del inóculo, siembra, formación de primordios, desarrollo de carpóforos y cosecha. Las ventajas que presenta el cultivo sólido son el aprovechamiento de residuos agrícolas y el bajo costo que implica (Morales *et al.*, 2018). Lo que se busca en la producción es obtener altos rendimientos, que están directamente relacionados con las condiciones del cultivo como sustrato, temperatura, humedad, pH, luz, CO₂, entre otros.

2.2.2. Cultivo Líquido

Actualmente, la práctica de cultivo sumergido de hongos medicinales se ha incrementado, debido a que se pueden dirigir los procesos de fermentación hacia la obtención de productos específicos, tener uniformidad entre lotes y disminuir los tiempos de producción. Existen ventajas sobre el cultivo sólido: alta productividad, control de calidad y un fácil procesamiento posterior al cultivo. Diversas investigaciones se han orientado en los últimos años a la optimización del medio, pH, suministro de oxígeno y la velocidad de agitación (Hu *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2014). Hu *et al.* (2018) mostraron que la limitación adecuada de nitrógeno y el líquido estático pueden promover la acumulación de ácidos ganodéricos y un suministro de aire mejora aún más su producción. Algunos elicitores potencian la producción de polisacáridos y ácidos ganodéricos en cultivo sumergido de *G. lucidum* (Feng *et al.*, 2017). Además de potenciar la síntesis de metabolitos secundarios, los elicitores pueden desempeñar un papel importante en las vías biosintéticas (Zhao *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2011).

2.2.3. Sustratos Alternativos

En México se cosechan cerca de 20 millones de hectáreas de frutas y hortalizas (SIAP, 2019), lo que genera una gran cantidad de residuos y solo un pequeño porcentaje es aprovechado. Estos subproductos sin importancia económica, en ocasiones representan serias complicaciones como la

generación de patógenos y alteración del equilibrio ecológico. *Ganoderma* es un hongo xilófago con capacidad de degradar celulosa y lignina. Por ello, la utilización de residuos agrícolas presenta grandes beneficios, ya que son aprovechados como fuente de carbono. Estos hongos secretan un amplio grupo de enzimas capaces de modificar los carbohidratos y la lignina presente. Por medio del desarrollo tecnológico que se ha empleado en diferentes países se realiza la producción controlada de *G. lucidum*, en diversos sustratos lignocelulósicos como subproductos de la industria y la agricultura (Martínez *et al.*, 2005; Morales-Estrada *et al.*, 2018).

La lignocelulosa está conformada por lignina, celulosa y hemicelulosa. El primero es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado, constituido por alcoholes aromáticos que brindan fortaleza a los polisacáridos estructurales. El segundo es la celulosa, un polímero de largas cadenas lineales de D-glucosa unida por enlaces glucosídicos β -1,4 que forman una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática. El tercero es un polímero complejo de heteropolisacáridos con pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) arregladas en cadenas ramificadas (Cuervo *et al.*, 2009). Estos componentes de la lignocelulosa altamente resistente son degradados por hongos xilófagos.

Para la producción de *Ganoderma* se ha utilizado como sustrato el residuo de soya; sin embargo, es de suma importancia una mezcla adecuada con otro medio para obtener un correcto ajuste de la relación C/N debido a que es un factor decisivo en su desarrollo. De igual forma, se ha evaluado el residuo de té negro como sustrato para el cultivo de *G. lucidum*; no obstante, es necesario suplementarlo para aumentar el rendimiento y mejorar las características del cuerpo fructífero (Peksen y Yakupoglu, 2009). El cultivo de hongos es un proceso biotecnológico que añade valor a los residuos agroindustriales ricos en compuestos orgánicos que pueden ser recuperados y transformados para la producción de hongos comestibles y medicinales. Sin embargo, es de gran importancia encontrar residuos que sean accesibles en cada región, que proporcionen ventajas contra los utilizados de manera tradicional, para contribuir en el aprovechamiento de subproductos y obtener carpóforos en menos tiempo.

La vid es uno de los cultivos utilizados, donde Sonora es el principal productor (Vázquez, 2011), con un 80 % de la producción nacional en 2017 (SIAP, 2019). Anualmente se generan >200 mil toneladas de subproductos de la poda de este cultivo, una porción se incorpora al suelo; sin embargo, la mayor parte es incinerada. Por lo tanto, es de suma importancia realizar un adecuado

aprovechamiento de estos residuos agrícolas. Morales-Estrada *et al.* (2018) estableció un protocolo utilizando medio sólido para la producción de carpóforos de cepas nativas de *Ganoderma*, empleando como sustrato a la madera de vid con eficiencias biológicas, rendimientos y tasas de producción variables. Se observó diferencia en la composición química de la madera, viéndose influenciada por hemicelulosa, proteína y minerales, los cuales repercuten directamente en los carpóforos. Por otra parte, es necesario que se evalúe el potencial de un protocolo en medio de cultivo líquido.

2.3. Compuestos Bioactivos en *Ganoderma*

Ganoderma lucidum s.l. contiene alrededor de 400 compuestos bioactivos y existen más de 150 tipos de triterpenoides aislados de los cuerpos fructíferos, micelio y esporas. Estos son un tipo de terpeno formado por seis unidades de isopreno, los más predominantes son los ácidos ganodéricos conformados por cuatro unidades de isopreno cíclicas y dos lineales. Las diferentes investigaciones a través de los años han encontrado nuevos metabolitos con potencial farmacológico, la mayoría derivados del lanosterol o polisacáridos. Trigos y Suárez-Medellín (2011) resumieron los principales metabolitos biológicamente activos aislados de *Ganoderma spp.*, una compilación de estudios de los últimos 30 años en búsqueda de nuevos compuestos entre ellos el ergosterol, peróxido de ergosterol, cerevisterol, ganodermanondiol, ácido lucidénico, lucidimol, ganoderiol, lucialdehído, ganodermadiol, excluyendo a los ácidos ganodéricos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Actividad biológica de los ácidos ganodéricos aislados de *Ganoderma lucidum*

Metabolito	Bioactividad	Referencia
Ácido ganodérico F	Supresión de la angiogénesis <i>in vitro</i> e inhibición del crecimiento y metástasis hepática de células de carcinoma de pulmón en ratones; supresión del crecimiento y comportamiento invasivo de las células de cáncer de mama mediante la inhibición de los factores de transcripción AP-1 y NF-kB; actividad antiinflamatoria en ratones	Morigiwa <i>et al.</i> , 1986; Sliva <i>et al.</i> , 2003; Jiang <i>et al.</i> , 2008; Weng <i>et al.</i> 2008

Ácido ganodérico DM	Inhibidor <i>in vitro</i> de 5-reductasa; prevención de enfermedades relacionadas con los andrógenos; actividad antiinflamatoria; inhibición de la osteoclastogénesis en células RAW 264; actividad antiplasmodial	Liu <i>et al.</i> , 2006 a,b; Liu <i>et al.</i> , 2009; Xu <i>et al.</i> , 2010; Adams <i>et al.</i> , 2010
Ácidos ganodéricos R, T, U, V, W, X, Y y Z	Carcinostáticos de base citotóxica en células cancerosas	Toth <i>et al.</i> , 1983; Sliva <i>et al.</i> , 2003; Yuen y Gohel, 2005
Ácidos ganodéricos C1, G, γ , ϵ y θ	Citotoxicidad directa en líneas de células tumorales Meth-A y LLC	Min <i>et al.</i> , 2000; Yuen y Gohel, 2005
Ácido ganodérico Me	Mejora de las células IL-2, IFN-gand NK e inhibición de la metástasis pulmonar en ratones C57BL / 6 implantados con tumores LLC; inhibición de la adhesión, migración y expresión de los genes MMP2 / 9 en células tumorales de pulmón 95-D	Wang <i>et al.</i> , 2007; Weng y Yen, 2010
Ácidos ganodéricos TR y S	Actividad antiplasmodial	Adams <i>et al.</i> , 2010
Ácido ganodérico D	Inhibidor de la 5 α -reductasa	Liu <i>et al.</i> , 2006, 2009
Ácido ganodérico X	Inhibición de topoisomerasas y apoptosis de la inducción de células cancerosas; carcinostáticos de base citotóxica en células cancerosas; activación de quinasas ERK y JNK e inducción de la apoptosis de células de hepatoma humano	Toth <i>et al.</i> , 1983; Sliva <i>et al.</i> , 2003; Yuen y Gohel, 2005; Li <i>et al.</i> , 2005
Ácido ganodérico H	Modulación de la señalización de AP-1 y NF-kB, para supresión del crecimiento e invasión del cáncer	Jiang <i>et al.</i> , 2008; Weng <i>et al.</i> , 2008
Ácidos ganodéricos T-Q	Antiinflamatorio en ratones	Sliva <i>et al.</i> , 2003
Ácidos ganodéricos α , B, C1, GS-2 y H	Inhibición contra el VIH-1 PR	El-Mekkawy <i>et al.</i> , 1998; Sato <i>et al.</i> , 2009
Ácido ganodérico T	Inducción de la apoptosis en células de tumor de pulmón metastásico a través de una vía intrínseca relacionada con la disfunción mitocondrial y la expresión de p53	Tang <i>et al.</i> , 2006; Weng y Yen, 2010

Ácido ganodérico A	Hepatoprotector	Kin <i>et al.</i> , 1998
Ácidos ganodéricos C y D	Actividad liberadora de antihistamínico en mastocitos de rata	Kohda <i>et al.</i> , 1985
Ácidos ganodéricos S1 y C1	Inhibición de glucosiltransferasa	Hada <i>et al.</i> , 1989
Ácido ganodérico D	Inhibición de la proliferación de células de carcinoma humano HeLa e inducción de la detención del ciclo celular G2/M y la apoptosis	Yue <i>et al.</i> , 2008
Ácido ganodérico Sz	Actividad anti-complemento contra la vía clásica del sistema complementario	Seo <i>et al.</i> , 2009
Ácido ganodérico C	Inhibición de farnesil proteína transferasa	Shiao, 2003

Modificado de Trigos y Suárez-Medellín (2011).

Todos los ácidos ganodéricos se sintetizan mediante la vía mevalonato/isopreno, que implica la conversión de difosfato de farnesilo en escualeno y luego en 2,3 epóxido de escualeno (Figura 1). La enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa cataliza el primer paso específico de la biosíntesis de isoprenoides, la escualeno sintasa cataliza el primer paso enzimático desde la ruta isoprenoide central hasta la biosíntesis de esterol y triterpenoide, y la lanosterol sintasa cataliza la ciclación de 2,3 epoxisqualeno para producir lanosterol, que es el esqueleto básico de los ácidos ganodéricos. Aunque se sabe que los ácidos ganodéricos se sintetizan a partir de lanosterol, los pasos finales de su ruta biosintética incluyen varias reacciones de acilación, oxidación y reducción, que aún no se conocen completamente (Trigos y Suárez-Medellín, 2011).

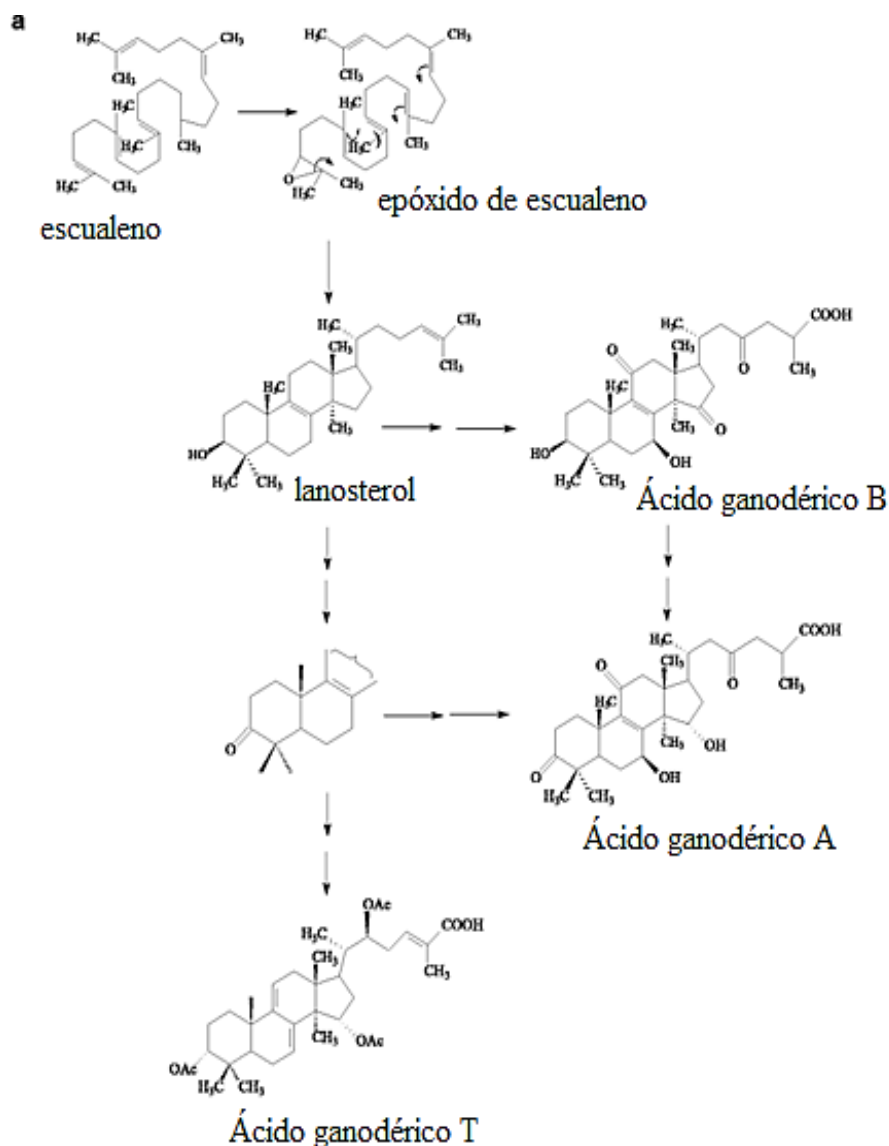


Figura 1. Esquema general de la biosíntesis de los ácidos ganodéricos. Modificado de Trigos y Suárez-Medellín (2011).

2.4. Potencial Antioxidante de *Ganoderma*

Los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno se producen en una gran cantidad de procesos metabólicos y pueden dañar las células a través de mecanismos de oxidación (Cör *et al.*, 2018), para evitar esta afectación celular se ha estudiado ampliamente el uso de antioxidantes naturales como frutas, verduras y algunos hongos como *Ganoderma* han tomado un papel muy

importante (Kan *et al.*, 2015). Los antioxidantes son sustancias biológicamente activas que se encuentran en distintos alimentos que ayudan a proteger la salud (Rodríguez-Roque *et al.*, 2012). En particular, se han analizado los extractos de *G. lucidum* obteniendo fracciones ricas en polisacáridos y terpenos, demostrándose que estos últimos presentan una mayor actividad antioxidante, en los que se destacan los ácidos ganodéricos (Cör *et al.*, 2018). Smina *et al.* (2011) determinaron el efecto de los triterpenos totales de *G. lucidum* sobre la actividad de especies reactivas de oxígeno, mejorando la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y catalasa.

2.5. Elicitores que Mejoran la Producción de Polisacáridos y Ácidos Ganodéricos en *Ganoderma*

El cultivo sumergido se considera una tecnología promisoría para mejorar la producción de metabolitos. Tang y Zhong (2003) desarrollaron un proceso para una producción simultánea eficiente de polisacáridos y ácidos ganodéricos, con la manipulación de las condiciones de fermentación para el crecimiento celular y su acumulación. Los rendimientos de ácidos ganodéricos se han incrementado a través de cambios en la fermentación, la adición de promotores y el desarrollo de nuevas estrategias de bioprocesamiento (Tang y Zhong, 2003; Tang *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2018). Zhao *et al.* (2011) demostraron que limitar las fuentes de nitrógeno conduce a un aumento de ácidos ganodéricos, al parecer a través de la inducción transcripcional de sus genes biosintéticos.

Diversos estudios se han realizado añadiendo elicitores. Heydarian *et al.* (2015) utilizaron metil jasmonato como inductor de ácidos ganodéricos, además agregaron ácido salicílico durante el cultivo para causar apoptosis; asimismo realizaron la evaluación del efecto sinérgico y obtuvieron una relación significativa en la producción de metabolitos. Igualmente, Zhang *et al.* (2014) identificaron a la celulasa como un elicitor eficaz para la mejora en la obtención de ácidos ganodéricos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Ácidos ganodéricos obtenidos a partir de distintos elicitores

Elicitor	Concentración	Medio de cultivo	Cantidad de ácidos ganodéricos	Referencia
Metil jasmonato y ácido salicílico	250 mM y 4.4 mM	Medio sólido, PDA	85 mgKg ⁻¹	Heydarian <i>et al.</i> , 2015
Ácido salicílico	200 µM	Medio sólido, PDA	2.29 mgKg ⁻¹	Cao <i>et al.</i> , 2017
Celulasa	5 mgL ⁻¹	N.R.	1608 mgL ⁻¹	Zhang <i>et al.</i> , 2014
Extracto de éter de <i>Catharsius molossus</i>	200 mgL ⁻¹	N.R.	313.7 ± 10.6 mgL ⁻¹	Liu <i>et al.</i> , 2009

N.R. No reportado

Diversos estudios han mostrado un incremento de la productividad de los hongos mediante su cultivo sumergido con la suplementación de extractos vegetales. Harris-Valle *et al.* (2007) probaron la producción de biomasa y la actividad de las enzimas lignolíticas de *L. edodes*, por el efecto de los extractos de madera de vid de diferente polaridad, donde el extracto acuoso y etanólico potenciaron un 650 % más comparado con los no polares (tolueno y cloroformo). López-Peña *et al.* (2013) evaluaron también estos extractos sobre la producción de biomasa, la cinética de crecimiento y la composición química de *L. edodes*, logrando un mayor rendimiento con los compuestos polares. Beltrán-García *et al.* (2001) lavaron con varios solventes tallos de maíz secos y molidos, los cuales aplicaron para el crecimiento de *Pleurotus* spp. obteniendo incrementos significativos. Es por ello, que surge la siguiente pregunta de investigación: ¿cuál es el efecto de los extractos de madera de vid en la producción de biomasa y ácidos ganodéricos de cepas nativas de *Ganoderma* spp. de Sonora en medio de cultivo líquido?

3. HIPÓTESIS

La adición de elicitores polares y no polares de madera de vid al medio de cultivo líquido incrementa la producción de biomasa y la capacidad antioxidante de cepas nativas de *Ganoderma* provenientes del desierto Sonorense.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de la polaridad de los extractos de madera de vid en medio de cultivo líquido sobre la producción de biomasa y la capacidad antioxidante de cepas nativas de *Ganoderma* spp. de Sonora para potenciar su crecimiento.

4.2. Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de los extractos polares y una mezcla de polares y no polares (1:1 y 3:1) de los extractos de madera de vid sobre la producción de biomasa de cepas nativas de *Ganoderma* spp. de Sonora en medio de cultivo líquido.
- Optimizar un protocolo de producción de micelio con cepas nativas de *Ganoderma* spp. de Sonora en medio de cultivo líquido.
- Determinar la capacidad antioxidante del micelio de *Ganoderma* proveniente del medio de cultivo líquido suplementado con extractos de madera de vid.

5. METODOLOGÍA

5.1. Obtención y Preparación de los Extractos de Madera de Vid

Para la obtención de los extractos se utilizó como sustrato la madera seca de vid (*Vitis vinifera* L. cv. 'Ruby Seedless') proveniente de La Costa de Hermosillo, Sonora, México; producto de la poda del 2017. Acorde con lo descrito por Harris-Valle *et al.* (2007) el sustrato se trituró en molino forrajero y posteriormente se tamizó a un tamaño de partícula de 1-2 mm. La muestra seca se colocó en un extractor Soxhlet (120 g), a reflujo constante con los diferentes solventes, siguiendo el orden de menor a mayor polaridad, iniciando con tolueno a 110 °C; después cloroformo (62 °C), seguido por etanol (78 °C) y agua (100 °C). De cada uno se utilizaron 480 mL durante 3 h, permitiendo la evaporación y secado de la muestra entre solventes. Después, los extractos se concentraron con un rotavapor en baño María a una temperatura de 50-55 °C para posteriormente secarse. Una vez eliminado completamente el solvente, se pesaron y almacenaron a 4 °C.

La preparación de los extractos de madera de vid se realizó con 1 g del extracto de cada solvente y se diluyó en etanol al 70 % utilizando un matraz volumétrico para posteriormente elaborar las soluciones stock. Después se realizaron las distintas concentraciones de 250, 500, 1000, 1500 y 2000 µg/L de los extractos de madera de vid: polares (1:1) y una mezcla de polares y no polares (3:1).

5.2. Establecimiento y Condiciones del Cultivo de Cepas Nativas de *Ganoderma* spp.

Se utilizaron cepas nativas de *Ganoderma* spp. de Sonora depositadas en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. y una cepa comercial de *G. lucidum* (Fr) Karst (34D) de Fungi Perfecti (Cuadro 4), las cuales se mantienen en tubos de ensayo con extracto de malta agar (EMA, BD Difco) en oscuridad, en un intervalo de 2 a 4 °C, en incubadora a 25 °C o a temperatura ambiente según corresponda la cepa.

Para su reactivación se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo EMA preparado de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

Cuadro 4. Cepas nativas de *Ganoderma* spp. de Sonora utilizadas en el presente estudio

Cepa	Especie	Origen
BH-1	<i>G. subincrustatum</i>	La Costa de Hermosillo
BH-17	<i>G. oerstedii</i>	Pueblo de Álamos
BH-21	<i>G. weberianum</i>	Sierra de Mazatán
FP-34D	<i>G. lucidum</i>	Fungi Perfecti (comercial)

Para el medio líquido se utilizaron 21 g de harina de maíz (Maseca ®), 16 g de glucosa, 2.9 g de peptona y 7 g de proteína de soya por cada L de agua destilada de acuerdo con lo reportado por Xu *et al.* (2008). El pH inicial se ajustó a 5.5. De manera inicial, para cada cepa se prepararon tres matraces Erlenmeyer de 250 mL en los que depositaron 50 mL de medio y se agregó un disco de micelio de 1 cm de diámetro a cada uno. Se incubaron en agitación durante 7 d con las diferentes concentraciones de los extractos de madera de vid. En el caso de *G. oerstedii* y *G. lucidum* se realizó mayor producción de biomasa colocando 400 mL de medio en matraces Erlenmeyer de 1 L por cada cepa y se agregaron ocho discos de micelio a cada uno.

Después los matraces se colocaron en una incubadora refrigerada con agitación modelo TE-421 (Tecnal) bajo oscuridad a 25 °C con agitación a 120 rpm durante 3, 6, 9, 12 y 15 d con el extracto que obtuvo la mayor producción en las pruebas. Luego se filtró con un papel filtro Whatman #1 y se realizaron lavados con 400 mL de agua destilada, la alícuota se almacenó a -20 °C. Posteriormente, las muestras se liofilizaron en un liofilizador modelo LyoQuest -85 PLUS ECO (Lyoquest, Telstar). Estas se congelaron por 90 min, en seguida se mantuvo frío + vacío (0.200 mBar) por 3.5 h y finalmente calefacción por 16.5 h (0.200 mBar de vacío y 30 °C la temperatura de las bandejas). Las muestras se pesaron para determinar la producción de biomasa y se almacenaron a 25 °C.

5.3. Preparación de Extractos

Las muestras liofilizadas se pulverizaron manualmente. Se pesó 1 g de muestra, se homogeneizó con 20 mL de metanol al 80 %; posteriormente se sonicó durante 30 min y se centrifugó a 9,400 g por 15 min a 4 °C (Sigma 2-16 KL). Se recuperó el sobrenadante obtenido y se filtró a través del papel filtro Whatman #1; los residuos de la extracción se lavaron dos veces más con 10 mL. El extracto obtenido se alicuotó y almacenó a -20 °C en contenedores ámbar.

5.4. Evaluación de la Capacidad Antioxidante

5.4.1. TEAC

Se llevó a cabo el método de TEAC (capacidad antioxidante equivalente al trolox) para inactivar el radical ABTS⁺. Se pesaron 19.3 mg del radical y se disolvieron en 5 mL de agua destilada. Se añadieron 37.8 mg de K₂S₂O₈ en 1 mL de agua destilada; 88 µL de esta se agregaron a la solución inicial de ABTS⁺ (5 mL) y se dejó reposar en oscuridad a temperatura ambiente por 16 h. Posteriormente se ajustó el radical en etanol a una absorbancia de 0.7. Para la reacción se añadieron 245 µL del radical ajustado y 5 µL del extracto. La determinación se realizó por duplicado. Se dejó en reposo durante 5 min y se analizó a 754 nm en un espectrofotómetro (FLUOstar Omega).

5.4.2. FRAP

En el método de FRAP (capacidad de reducción férrica del plasma) se diluyeron 0.5 mL de TPTZ (2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina) 10 mM con HCl 40 mM y 5 mL de acetato de sodio 0.3 M (ajustando el pH a 3.6) y 0.5 mL de solución de FeCl₃ 20 mM. Después se mezclaron 20 µL del extracto y 280

μL del reactivo FRAP y se dejó reposar por 30 min; se midió la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro FLUOstar Omega. Se elaboró una curva de calibración utilizando como estándar el compuesto Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico).

5.4.3. ORAC

Con el método de ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno) se colocaron 150 μL de fluoresceína 10 nM, 25 μL de fosfato 75 mM (ajustando el pH a 7.4) como blanco, 25 μL del estándar Trolox (curva estándar 6.25 – 200 μM), 25 μL del extracto; la reacción comienza al añadir el AAPH [dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)] (240 mM). La disminución de la fluorescencia se midió cada 90 s durante 90 min a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 520 nm en el lector de microplacas FLUOstar Omega. Los resultados obtenidos se calcularon con una ecuación de regresión lineal usando una curva estándar de Trolox (Ou *et al.*, 2001).

5.5. Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Con respecto a la producción de biomasa se realizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 \times 4, donde los factores son los tres tipos de extractos y las cuatro especies, como variable respuesta fue la producción de biomasa. En caso de encontrar diferencias significativas se emplearon pruebas de comparación de medias por Tukey-Kramer a un nivel de $p < 0.05$ con el software NCSS 2020. Asimismo, se utilizó el software Design Expert 11 para llevar a cabo la metodología de superficie de respuesta para evaluar la producción de biomasa y encontrar el tipo y la concentración de extracto óptimo para cada especie. Para la capacidad antioxidante se realizó un análisis de varianza de una sola vía, usando como variables respuesta: TEAC, FRAP y ORAC. En caso de existir diferencias significativas se aplicó la prueba de comparación de medias por Tukey-Kramer con el software NCSS 2020.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Obtención de Extractos de Madera de Vid

El rendimiento más alto de los extractos correspondió al acuoso (5.34 g), con un poco más del doble que el etanólico (2.61 g). En general, la proporción de extractos polares fue de aproximadamente un poco más de tres veces que los no polares (3.3:1), siendo de 1.28 g en el toluénico y 1.12 g en el clorofórmico (Cuadro 5). Harris-Valle *et al.* (2007) reportaron rendimientos similares con la madera de vid, siendo aún mayor en polares vs. no polares (7.6:1). Las diferencias pueden deberse a la variedad de vid, el origen del material, el tamaño de partícula, la temporada de cosecha y el tiempo de almacenamiento.

Cuadro 5. Rendimiento de los extractos

Extracto	Peso	Rendimiento
Acuoso	5.34 g	4.45 %
Etanólico	2.61 g	2.17 %
Toluénico	1.28 g	1.06 %
Clorofórmico	1.12 g	0.93 %

Tay y Chong (2016), encontraron esta misma tendencia en extractos de hoja de papaya con solventes polares y no polares, lo cual atribuyen a la capacidad de los polares de disolver más compuestos incluidos fenoles (polares extraen polares), a su proporción más alta en el sustrato y la mayor facilidad de extracción. El análisis de los extractos polares de madera de vid en cuanto a compuestos fenólicos mostró la presencia de ácidos hidroxibenzoicos como ácido gálico, homovanílico y elágico, entre otros. Al igual, se determinaron estilbenos como el resveratrol y flavonoides como apigeninas, isoquercitrinas y naringeninas, los cuales se identificaron con el método de Muñoz-Bernal *et al.* (2021).

6.2. Extractos de Madera de Vid en la Producción de Biomasa

Las especies evaluadas de *Ganoderma* presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en cuanto a la producción de biomasa cuando se comparó con el tipo de extracto: polares, todos los solventes y la combinación de polares y no polares (3:1); la mayor producción se obtuvo en *G. oerstedii*, seguido de *G. subincrustatum*. No se presentaron diferencias entre *G. lucidum* y *G. weberianum* ($p > 0.05$).

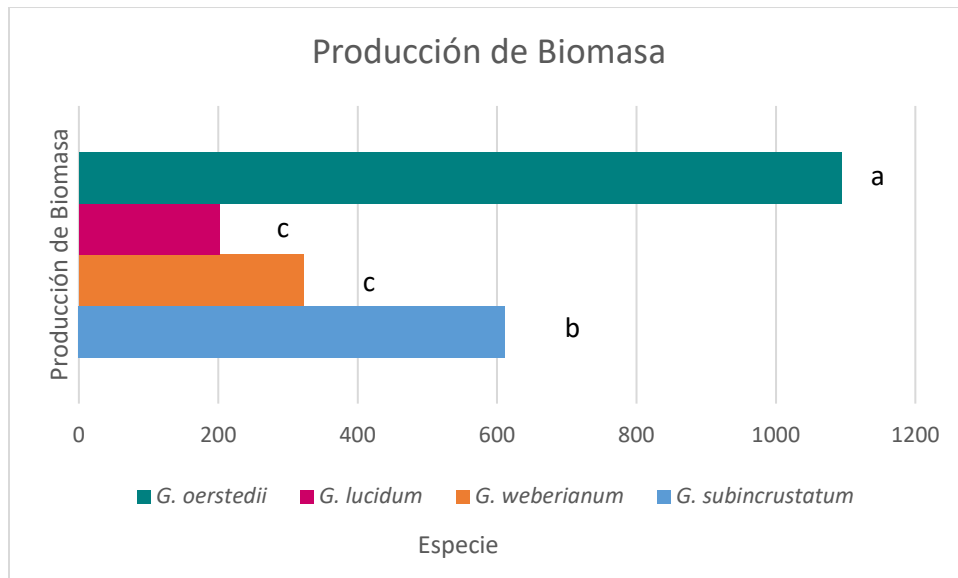


Figura 2. Producción de biomasa de las diferentes cepas de *Ganoderma* spp.

La producción de biomasa de cada una de las cepas de *Ganoderma*, con los diferentes extractos se presenta en el Cuadro 6. La mayor biomasa se alcanzó con el extracto polar a una concentración de 500 $\mu\text{g/L}$, seguido por ese mismo extracto con la mayor concentración (2000 $\mu\text{g/L}$) y después en la combinación de polares y no polares (3:1) con la menor concentración (250 $\mu\text{g/L}$). La generación de biomasa más baja se registró con la combinación de polares y no polares (3:1) en 500 $\mu\text{g/L}$. En segundo lugar, la mezcla de todos los solventes a una concentración de 250 $\mu\text{g/L}$,

Cuadro 6. Biomasa obtenida con las cepas de *Ganoderma* aplicando diferentes concentraciones de extractos de madera de vid

Tratamiento †	Biomasa (mg)				Total
	<i>G. lucidum</i>	<i>G. oerstedii</i>	<i>G. subincrustatum</i>	<i>G. weberianum</i>	
Control	185	1285	499	133	2104
Polar 250	164	1519	216	317	2218
Polar 500	146	1617	773	270	2806 [^]
polar 1000	243	1098	837	219	2399
Polar 1500	97	979	734	281	2093
Polar 2000	175	1282	854	436	2749 [^]
Todos 250	204	1027	363	379	1973 [~]
Todos 500	202	1143	623	472	2443
Todos 1000	371	968	399	287	2026 [~]
Todos 1500	198	1174	578	376	2328
Todos 2000	244	1203	811	232	2492
3:1 250	192	1243	874	316	2627 [^]
3:1 500	192	455	424	389	1462 [~]
3:1 1000	269	914	827	301	2313
3:1 1500	309	978	973	292	2553
3:1 2000	247	954	693	565	2460
Total	3445	17847	10487	5272	

† Concentración en µg/L de las diferentes fracciones de los extractos y sus combinaciones. [^]: mejor producción de biomasa. [~]: Menor producción de biomasa. Control: Sin elicitores. Todos: Extractos polares y no polares.

Combinación de extractos polares y no polares (1:1:1:1). 3:1 (proporción de polares:no polares). seguido por ese mismo tratamiento a una concentración de 1000 µg/L. Así, para obtener un mayor rendimiento en la producción de biomasa, la concentración necesaria y el tipo de elicitores, dependerá de la especie.

Derivado de lo anterior se realizó la metodología de superficie de respuesta para identificar las condiciones más adecuadas. Las variables utilizadas fueron los extractos, la producción de biomasa y la concentración de extractos. En *G. lucidum* (Figura 3), no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos con extractos de todos los solventes y la combinación de polares y no polares (3:1); sin embargo, el rendimiento fue significativamente menor con el extracto polar ($p < 0.05$). La mayor producción de biomasa se obtuvo con el extracto de todos los solventes con una concentración de 1000 µg/L, seguido por la combinación de polares y no polares

(3:1) a una concentración de 1500 $\mu\text{g/L}$. La menor producción se registró con el extracto polar a 1500 y 500 $\mu\text{g/L}$. Con ello se recomendaría la combinación de todos los extractos a una concentración de 1000 $\mu\text{g/L}$ para una generación de biomasa más alta con esta cepa.

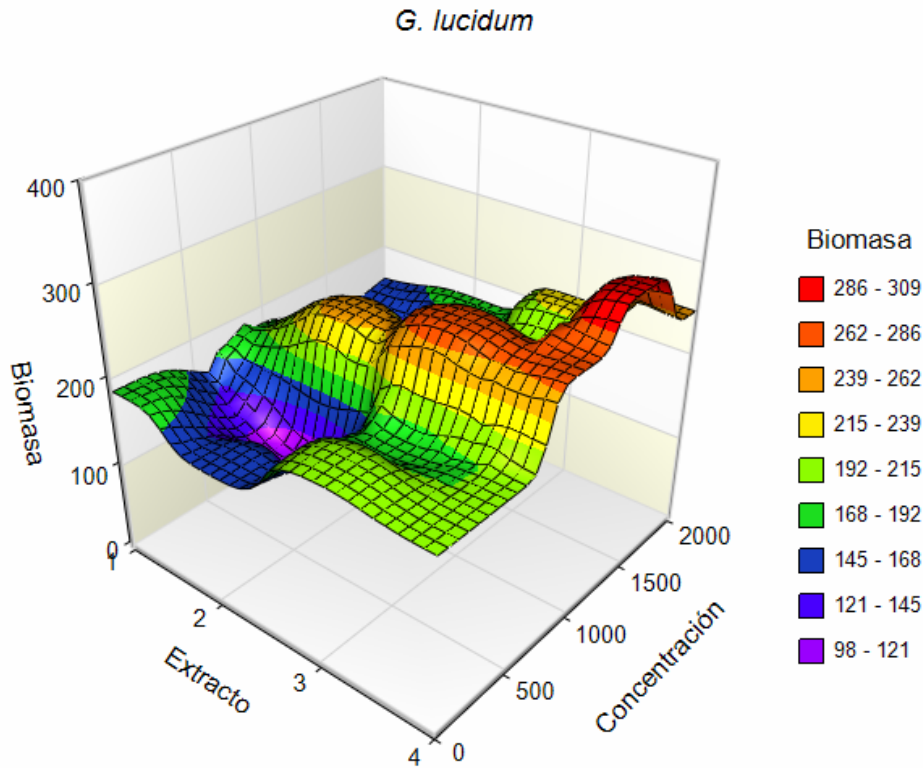


Figura 3. Superficie de respuesta de *Ganoderma lucidum* (FP-34D). Biomasa (mg), concentración ($\mu\text{g/L}$) y extractos (control [1], polares [2], polares + no polares [3] y 3:1 de polares y no polares [4]).

En *G. subincrustatum* se registraron diferencias significativas entre los extractos (Figura 4). La mayor producción de biomasa se obtuvo en la combinación de polares y no polares (3:1), seguido por el extracto polar y por último el extracto de los cuatro solventes. La formación de biomasa más alta se registró con la combinación de polares y no polares (3:1) a 1500 $\mu\text{g/L}$, seguido por 250 $\mu\text{g/L}$. La menor producción ocurrió en el extracto polar con 250 $\mu\text{g/L}$, seguido por el extracto de todos los solventes a la concentración más baja (250 $\mu\text{g/L}$). Por lo tanto, la mejor condición para una mayor generación de biomasa en esta cepa es con la combinación de extractos polares y no polares (3:1).

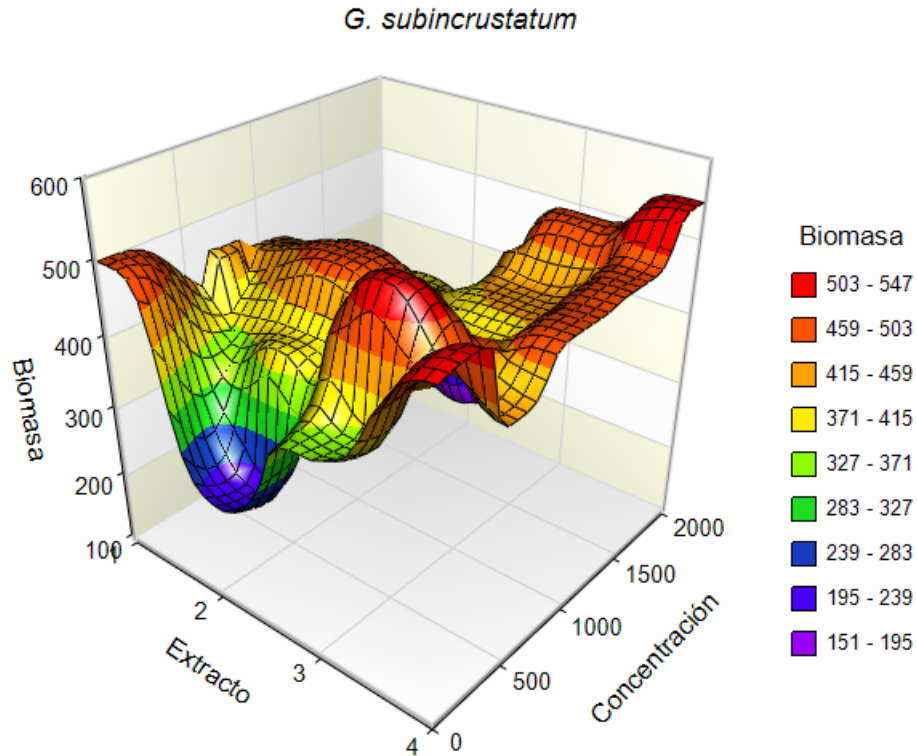


Figura 4. Superficie de respuesta de *Ganoderma subincrustatum* (BH-1). Biomasa (mg), concentración ($\mu\text{g/L}$) y extractos (control [1], polares [2], polares + no polares [3] y 3:1 de polares y no polares [4]).

En *G. weberianum* (Figura 5), no se observaron diferencias entre los extractos ($p > 0.05$). La mayor producción se obtuvo con la combinación de polares y no polares (3:1) a la concentración más alta (2000 $\mu\text{g/L}$), seguido por el extracto de todos los solventes a 500 $\mu\text{g/L}$. La menor producción se registró con el extracto polar a 1000 $\mu\text{g/L}$, seguido por todos los extractos a 2000 $\mu\text{g/L}$. Para una mayor generación de biomasa con esta cepa se sugiere el extracto de la combinación de polares y no polares (3:1).

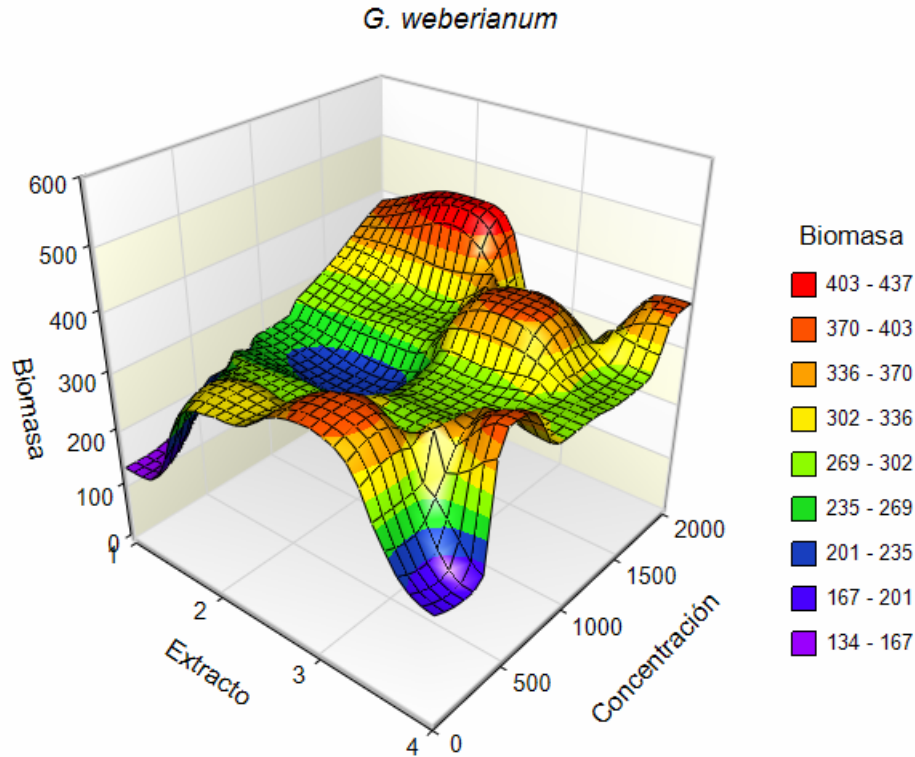


Figura 5. Superficie de respuesta de *Ganoderma weberianum* (BH-21). Biomasa (mg), concentración ($\mu\text{g/L}$) y (control [1], polares [2], polares + no polares [3] y 3:1 de polares y no polares [4]).

En *G. oerstedii* (Figura 6), se encontraron diferencias entre los extractos ($p < 0.05$). La mayor formación de biomasa se logró con el extracto polar, seguido por todos los extractos y la menor producción con la combinación de polares y no polares (3:1). La generación de biomasa más alta ocurrió con el extracto polar a 500 $\mu\text{g/L}$, seguido por este mismo a 2000 $\mu\text{g/L}$, mientras que la menor con la combinación 3:1 a 1000 $\mu\text{g/L}$, seguido por el extracto de todos los solventes a 1000 $\mu\text{g/L}$. Aunque la mejor condición se presentó en el extracto polar, la producción de biomasa se potenció con todos los extractos en sus diferentes concentraciones.

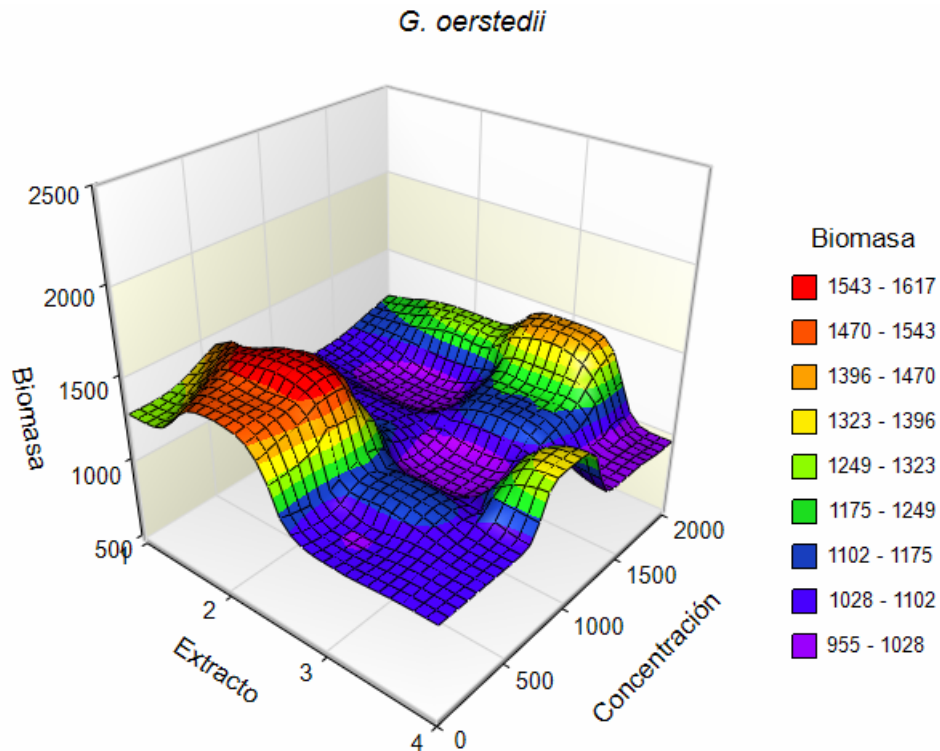


Figura 6. Superficie de respuesta de *Ganoderma oerstedii* (BH-17). Biomasa (mg), concentración ($\mu\text{g/L}$) y extractos (control [1], polares [2], polares + no polares [3] y 3:1 de polares y no polares [4]).

Tay y Chong (2016), mencionan que los extractos antifúngicos de papaya (*Carica papaya* L.) a bajas concentraciones mejoran de manera inicial el crecimiento y desarrollo del micelio de *Ganoderma boninense* Pat., causante de la pudrición basal de la palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq. Asimismo, Abd-Elaah *et al.* (2006) observaron este efecto con extractos de plantas del desierto vs. hongos dermatofitos como *Microsporom canis* y *Aspergillus niger*; sin embargo, en *Microsporom gypseum* no se potenció el crecimiento.

Harris-Valle *et al.* (2007) y López-Peña *et al.* (2013) evaluaron el efecto de los extractos de madera de vid polares y no polares sobre la producción de biomasa de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler; ambos trabajos reportan un efecto significativo. Harris-Valle *et al.* (2007), suplementaron el medio de cultivo con extractos polares, no polares y mezcla de ambos; al agregar la fracción clorofórmica no se afectó el crecimiento, pero disminuyó con el extracto toluénico. Los extractos polares acuoso y etanólico por separado, mostraron un efecto promotor de crecimiento vs. control ($p < 0.05$). Contrario al estudio actual donde la mezcla de todos los extractos fue en proporción 1:1:1:1, tanto Harris-Valle *et al.* (2007) como López-Peña *et al.* (2013), lo realizaron con base en los

rendimientos de extracción de la madera de vid, manteniendo esa diferencia al combinarlos. Por ello, en este trabajo se incluyó la proporción 3:1 de polares y no polares, ya que con esa relación se incrementó el crecimiento de *L. edodes* en un 50 (Harris-Valle *et al.*, 2007) y 100 % (López-Peña *et al.*, 2013) con el medio de cultivo de glucosa-peptona 40:10 (v/v).

Para las diferentes cepas de *Ganoderma*, el elicitor varió según el tipo y la concentración de la mezcla, siendo mejor la combinación de todos los extractos en *G. lucidum*, la proporción 3:1 en *G. subincrustatum* y *G. weberianum*, mientras que en *G. oerstedii* la fracción polar. El medio de cultivo empleado se considera adecuado para el desarrollo de estas especies; sin embargo, debido a que es un medio complejo podría enmascarar el efecto promotor de los extractos de madera de vid (López-Peña *et al.*, 2013). Estos autores emplearon también un caldo enriquecido con un aumento discreto en la producción de *ca* 14 %, pero una potenciación en el crecimiento del hongo, ya que en 15 días lograron la cantidad de biomasa que en el control tarda 21 días.

Para evaluar la capacidad antioxidante se seleccionó *G. oerstedii*, debido a que presentó un rendimiento significativamente superior en la producción de biomasa con todos los extractos de madera de vid ($p < 0.05$), siendo mayor que en *G. lucidum* (cepa control) (Figura 7). La cepa de *G. oerstedii* del desierto Sonorense posee un gran potencial para su aprovechamiento biotecnológico comparada con la cepa comercial *G. lucidum*.

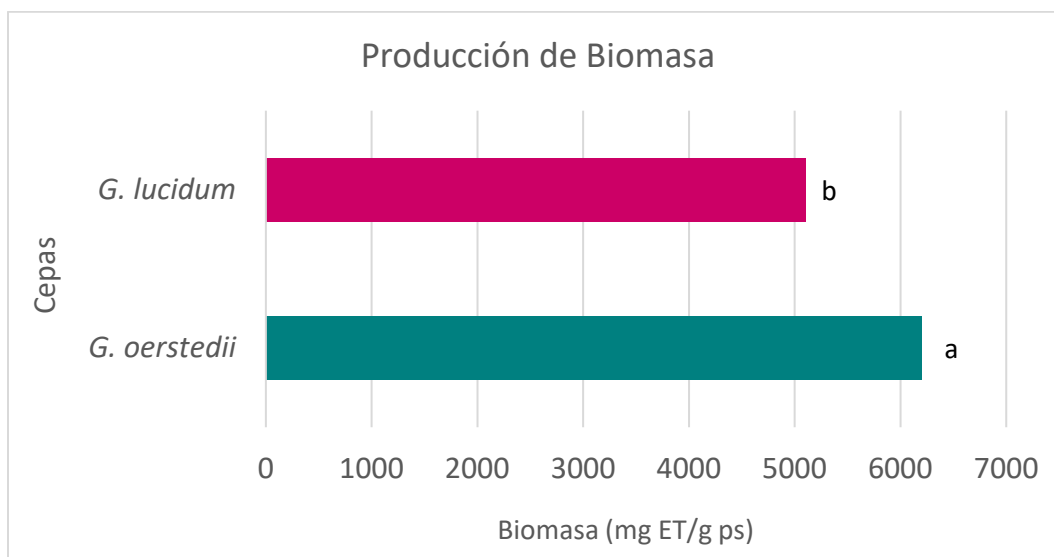


Figura 7. Producción de biomasa de *Ganoderma oerstedii* (BH-17) suplementado con el extracto polar a 500 $\mu\text{g/L}$ y *G. lucidum* (FP-34D) con todos los extractos a 1000 $\mu\text{g/L}$ a los 15 días de crecimiento ($p < 0.05$).

6.3. Capacidad Antioxidante del Micelio de *Ganoderma* spp.

Para estimular el crecimiento y desarrollo de *G. oerstedii*, se empleó el extracto polar a 500 µg/L y la combinación de todos los extractos a 1000 µg/L para *G. lucidum*, los cuales fueron los que promovieron la mayor cantidad de biomasa en la fase anterior para cada una de las cepas. Se utilizaron tres de las metodologías más comunes para evaluar la capacidad antioxidante con un amplio espectro de detección: ORAC, FRAP y TEAC. Con el método de ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno), no se registraron diferencias significativas entre *G. lucidum* y *G. oerstedii* ($p > 0.05$) (Figura 8A). En *G. oerstedii* se obtuvo la mayor capacidad antioxidante con el medio suplementado a los 12 d y la menor con el tratamiento a los 3 d. En *G. lucidum* se produjo la capacidad antioxidante más alta con el control a los 15 d y la menor con el tratamiento a los 3 d (Figura 8B). Con FRAP (capacidad de reducción férrica del plasma) se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre *G. lucidum* y *G. oerstedii*, con una mayor actividad en esta última (Figura 9A). En *G. oerstedii* se registró la mayor capacidad antioxidante con el control a los 12 d y la inferior a los 3 d. En *G. lucidum* se observaron los mayores valores de capacidad antioxidante con el tratamiento a los 15 d y la menor a los 3 d (Figura 9B).

Con TEAC (capacidad antioxidante equivalente al trolox), no se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre *G. lucidum* y *G. oerstedii* (Figura 10A). En *G. oerstedii* se logró la mayor capacidad antioxidante con el control a los 15 d y la menor con el tratamiento a los 3 d. En *G. lucidum* se registró la mayor actividad antioxidante con el tratamiento a los 15 d, y la inferior con el control a los 9 d (Figura 10B). El comportamiento fue disímil, sin una tendencia definida en el tiempo para una mayor o menor capacidad antioxidante. Lo relevante es destacar la presencia de esta actividad en el micelio dicariótico de ambas especies de *Ganoderma*, la cual es mayor (FRAP) en la especie nativa.

Una alternativa para potenciar el efecto de los elicitores sería utilizar un medio de cultivo no enriquecido o agregar de manera inicial el elicitador como sugiere el estudio realizado por microcalorimetría con diferentes cepas de *Ganoderma* spp. nativas de Sonora (Martínez, 2021), donde se observó un incremento en la tasa de crecimiento después de establecerse el hongo en el medio de cultivo.

La respuesta disímil es común en las metodologías empleadas, ya que sus fundamentos difieren;

cada una tiene sus ventajas y desventajas con una correlación muy baja o inexistente (Cao y Prior, 1998). ORAC se utiliza frecuentemente porque detecta una amplia variedad de antioxidantes, en especial en muestras o reacciones cinéticas complejas. Puede detectar antioxidantes lipofílicos, hidrofílicos, proteicos y no proteicos, además de flavonoides. Una de las principales limitantes con respecto a los otros métodos es el tiempo necesario para su determinación de hasta 10 veces o más (Cao y Prior, 1998; Karadag *et al.* 2009).

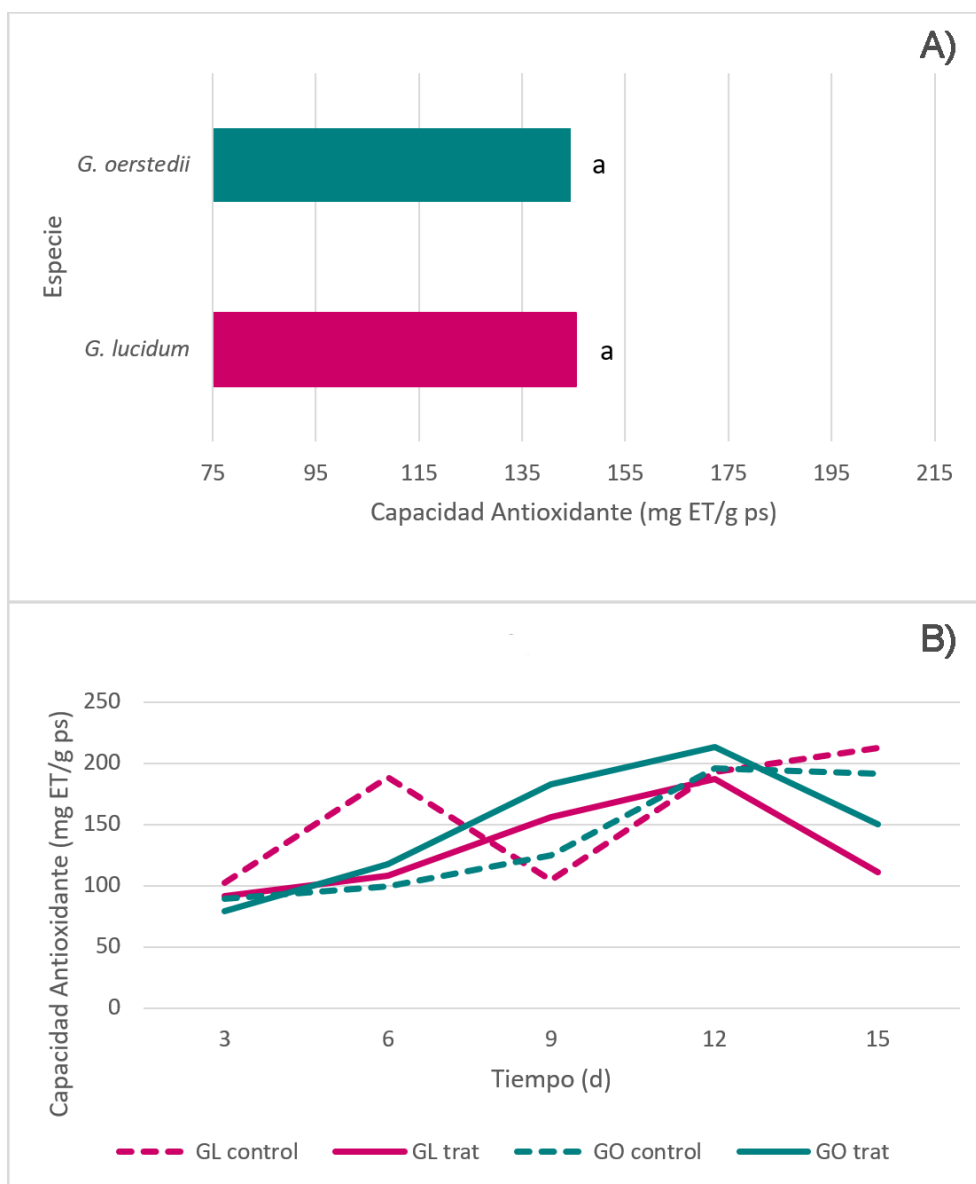


Figura 8. Capacidad Antioxidante determinada con ORAC de la biomasa de *Ganoderma oerstedii* (BH-17) y *G. lucidum* (FP-34D). A) Total. B) Con respecto al tiempo (días 3, 6, 9, 12 y 15) ($p < 0.05$).

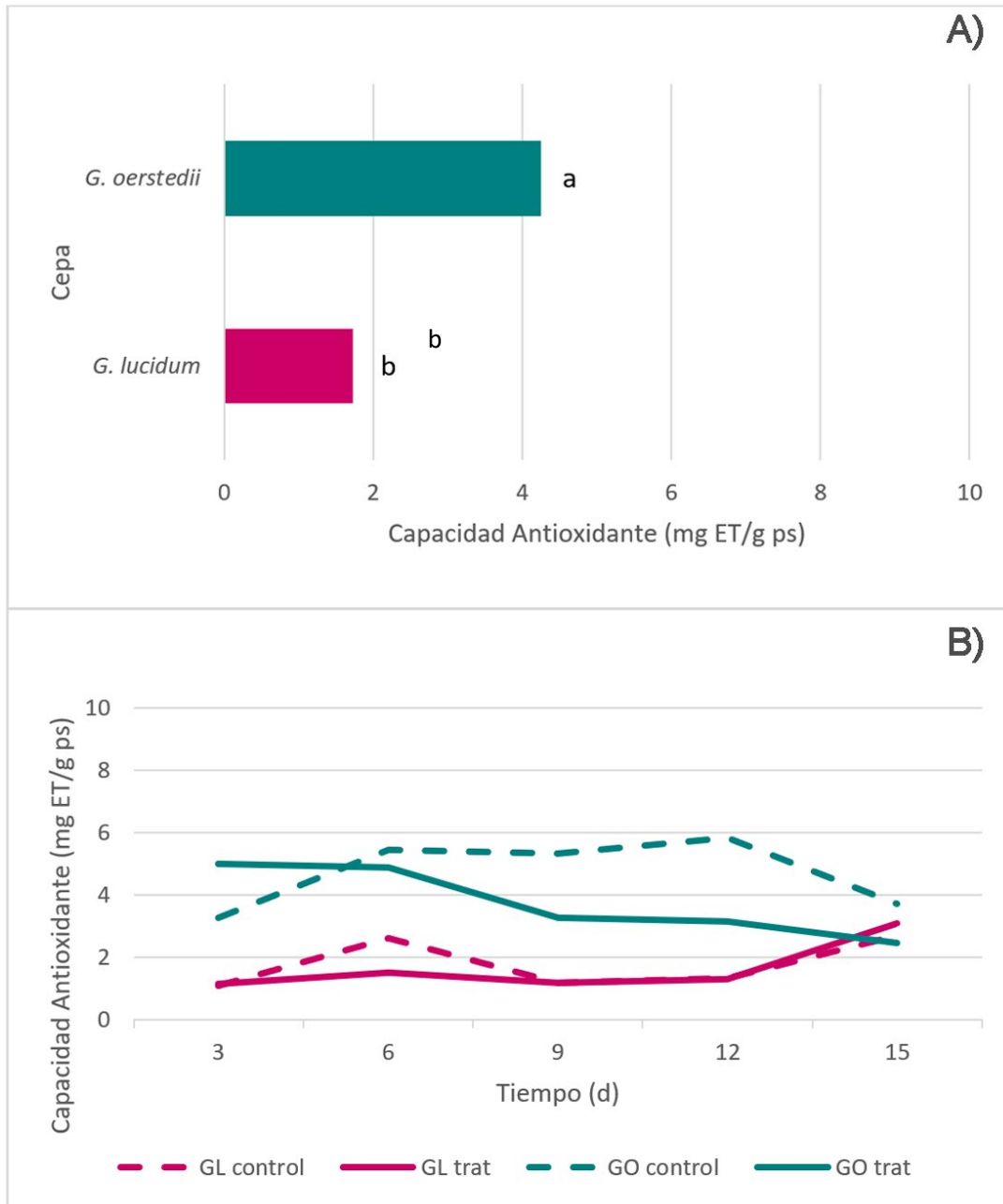


Figura 9. Capacidad antioxidante determinada con FRAP de la biomasa de *Ganoderma oerstedii* (BH-17) y *G. lucidum* (FP-34D). A) Total. B) Con respecto al tiempo (días 3, 6, 9, 12 y 15) ($p < 0.05$).

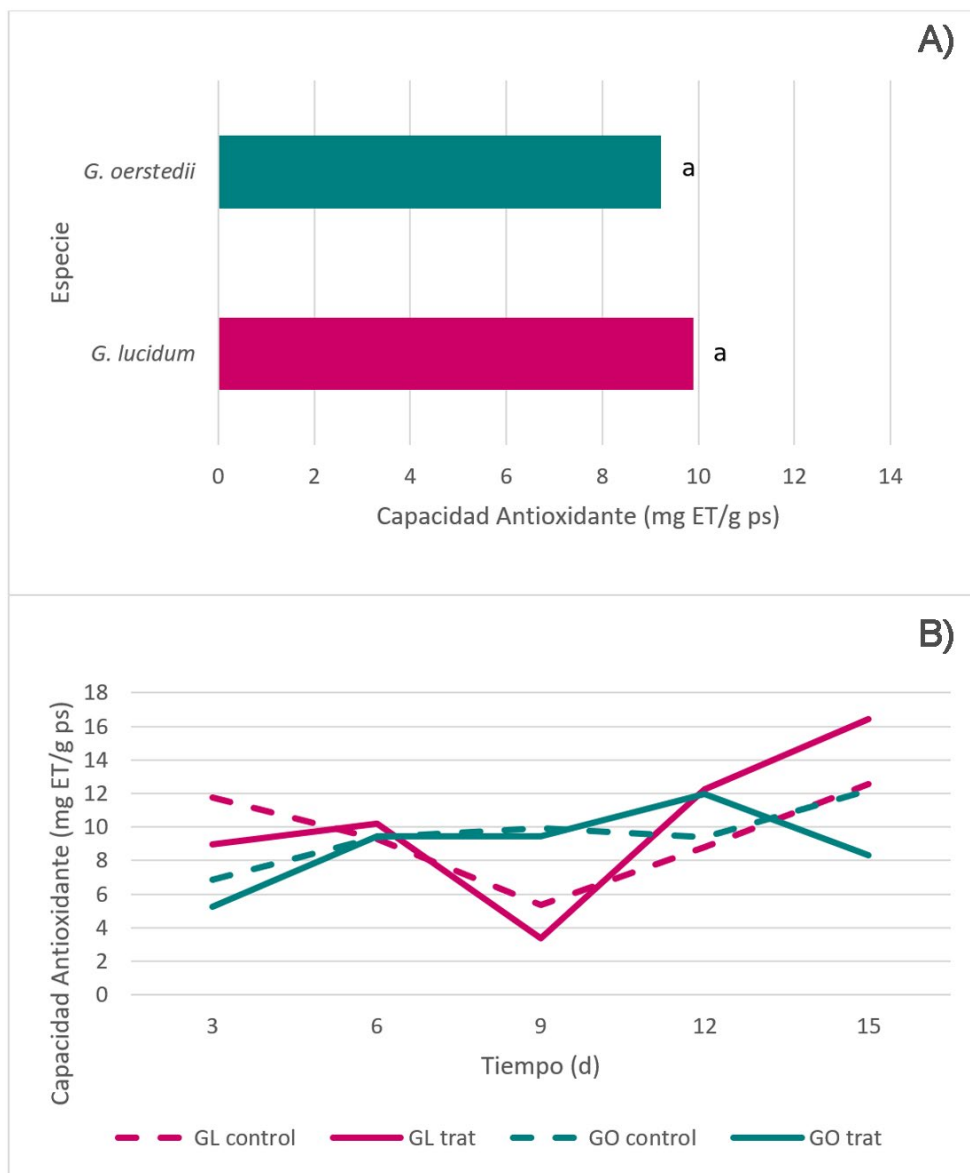


Figura 10. Capacidad antioxidante determinada con TEAC de la biomasa de *Ganoderma oerstedii* (BH-17) y *G. lucidum* (FP-34D). A) Total. B) Con respecto al tiempo (días 3, 6, 9, 12 y 15) ($p < 0.05$).

TEAC se emplea para medir una amplia variedad de sustancias puras, así como muestras biológicas de fluidos corporales, materiales vegetales y antioxidantes fitoquímicos como flavonoides, teaflavinas, carotenos y xantofilas, entre otros. Detecta antioxidantes liposolubles e hidrosolubles (Cao y Prior, 1998; Shahidi y Zhong, 2015) en un amplio rango de pH, lo cual es una limitante en otras técnicas cuyos reactivos suelen ser costosos (Cao y Prior, 1998; Karadag *et al.* 2009). FRAP tiene la ventaja de ser un método simple, barato, rápido y no requiere equipo especializado. Los

antioxidantes pueden tener un origen diferente y además, presenta la capacidad de detectar algunos no enzimáticos como el ácido ascórbico, ácido úrico y glutatión. Una de sus limitaciones es el pH, en el que se realiza el análisis (Karadag *et al.* 2009; Mora *et al.*, 2009; Shahidi y Zhong, 2015).

La variabilidad de cada una de las metodologías en los antioxidantes a detectar, brinda indicios de los compuestos presentes en la muestra y permite profundizar su análisis para precisar su composición. Shah y Modi (2015), compararon la actividad antioxidante de un extracto acuoso de tres especies de hongos cultivadas en medio líquido: *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes* y *Agaricus bisporus*; registraron diferencias significativas ($p < 0.05$), siendo mayor en *G. lucidum*. Ayala-Zavala *et al.* (2015) analizaron extractos etanólicos de basidiomas de especies de *Ganoderma* endémicas de Sonora, México, para conocer su potencial antioxidante. Determinaron el contenido de fenoles y flavonoides obteniendo la mayor cantidad de estos compuestos en *G. subincrustatum*, seguido por *Ganoderma* sp., *G. curtisii* y *G. oerstedii*. La correlación entre la concentración de estos compuestos y la capacidad antioxidante fue positiva. Aruwa *et al.* (2021), evaluaron la capacidad antioxidante de basidiomas de *G. lucidum*. Para ello, elaboraron extractos de diferente polaridad y los probaron a diferentes concentraciones con un incremento proporcional a la concentración del extracto. La capacidad fúngica antioxidante puede atribuirse a micoquímicos. Determinaron una cantidad significativa de alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos y terpenoides.

Sułkowska-Ziaja *et al.* (2022), cultivaron en medio líquido seis especies de *Ganoderma*, analizando bioactividad y el perfil micoquímico de extractos de cultivos miceliales, determinando compuestos orgánicos como ácidos fenólicos, aminoácidos, indoles, esteroides y ácido kójico, con una variabilidad según la especie que podría repercutir en la capacidad antioxidante, la cual cambió significativamente ($p < 0.05$). En el presente estudio, los resultados de una de las pruebas variaron en la actividad antioxidante ($p < 0.05$). Conocer el perfil micoquímico de las cepas de *G. oerstedii* y *G. lucidum*, ayudaría en explicar esas diferencias.

7. CONCLUSIÓN

Los extractos de madera de vid potencian la producción de biomasa de especies de *Ganoderma* cultivadas en medio líquido con una respuesta diferencial según la cepa, la composición y la concentración del extracto. Por lo cual, la optimización de generación de biomasa fúngica deberá realizarse para cada cepa con diversos factores y niveles, y definir el mejor tratamiento con el análisis de superficie de respuesta. Las cepas nativas del desierto Sonorense tienen potencial para producir biomasa a un nivel competitivo como la cepa comercial de *Ganoderma lucidum* utilizada como control.

8. RECOMENDACIONES

Determinar la capacidad antioxidante de la biomasa fúngica en las restantes cepas nativas del desierto Sonorense, así como de los extractos de madera de vid, no solamente del micelio. Utilizar un medio de cultivo más simple en cuanto a su composición para evitar un posible enmascaramiento del efecto potenciador de los extractos.

9. REFERENCIAS

- Abd-Elaah G.A., Abo-Amer A.E. and Soliman S.A. 2006. Protein patterns and mycelial growth of dermatophytic fungi affected by desert plant extracts. *International Journal of Agriculture & Biology* 8(4): 434–439.
- Andrino A., Morte A. y Honrubia M. 2011. Caracterización y cultivo de tres cepas de *Pleurotus eryngii* (Fries) Quélet sobre sustratos basados en residuos agroalimentarios. *Anales de Biología* 33: 53–66.
- Aruwa G., Adenipekun C.O., Ogunbanwo S.T. and Akinbode E.O. 2021. Phytochemical evaluation and antioxidant capacity of *Ganoderma lucidum* and *Pleurotus pulmonarius* in Ibadan, Nigeria. *Biotechnology Journal International* 25(1): 23–32.
- Ayala-Zavala J.F., Tapia-Rodríguez M.R., Palomares-Navarro J.J., Esqueda M. y López-Peña D. 2015. Potencial antioxidante y antibacteriano de extractos etanólicos de especies de *Ganoderma* endémicas de Sonora. XI Congreso Nacional de Micología Mérida, Yucatán.
- Batra P., Sharma A.K. and Khajuria R. 2013. Probing lingzhi or reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (higher Basidiomycetes): a bitter mushroom with amazing health benefits. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 15: 127–143.
- Beltrán-García M.J., Orozco A., Samayoa I. and Ogura T. 2001. Lignin degradation products from corn stalks enhance notably the radial growth of basidiomycete mushroom mycelia. *Revista de la Sociedad Química de México* 45(2): 77–81.
- Bidegain M.A., Cubitto M.A. and Curvetto N.R. 2015. Optimization of the yield of lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (higher Basidiomycetes), cultivated on a sunflower seed hull substrate produced in Argentina: effect of olive oil and copper. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 17: 1095–1105.
- Borchers A.T., Krishnamurthy A., Keen C.L., Meyers F.J. and Gershwin M.E. 2008. The immunobiology of mushrooms. *Experimental Biology and Medicine* 233: 259–276.
- Cabrera R., Valenzuela-Soto E., Reyes-Vidal Y., Esqueda M. y Asaff A. 2013. Caracterización de los extractos metanólicos de poda de vid y paja de trigo y su oxidación por enzimas extracelulares de *Lentinula edodes*. *Revista Mexicana de Micología* 37: 61–67.
- Cao G and Prior R.L. 1998. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry* 44(6): 1309–1315.
- Cao P.F., Wu C.G., Dang Z.H., Shi L., Jiang A.L., Ren A. and Zhao M.W. 2017. Effects of exogenous salicylic acid on ganoderic acid biosynthesis and the expression of key genes in the ganoderic acid biosynthesis pathway in the lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 19: 65–73.
- Cör D., Knez Ž. and Knez-Hrnčič M. 2018. Antitumour, antimicrobial, antioxidant and antiacetylcholinesterase effect of *Ganoderma lucidum* terpenoids and polysaccharides: A Review. *Molecules* 23(3): 649.

- Cuervo L., Folch J. y Quiroz R. 2009. Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Biocología* 13(3): 11–18.
- Feng J., Zhang J.S., Feng N., Yan M.Q., Yang Y., Jia W. and Lin C.C. 2017. A novel *Ganoderma lucidum* G0119 fermentation strategy for enhanced triterpenes production by statistical process optimization and addition of oleic acid. *Engineering in Life Sciences* 17: 430–439.
- Gaitán-Hernández R., Esqueda M., Gutiérrez A., Sánchez A., Beltrán-García M.J. and Mata G. 2006. Bioconversion of agrowastes by *Lentinula edodes*: the high potential of viticulture residues. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 432–439.
- Hapuarachchi K.K., Elkhateeb W.A., Karunarathna S.C., Cheng C.R., Bandara A.R., Kakumyan P., Hyde K.D., Daba G.M. and Wen T.C. 2018. Current status of global *Ganoderma* cultivation, products, industry and market. *Mycosphere* 9: 1025–1052.
- Harris-Valle C., Esqueda M., Sánchez A., Beltrán-García M.J. and Valenzuela-Soto E.M. 2007. Polar vineyard pruning extracts increase the activity of the main ligninolytic enzymes in *Lentinula edodes* cultures. *Canadian Journal of Microbiology* 53: 1150–1157.
- Heydarian M., Hatamian-Zarmi A., Amoabediny G., Yazdian F. and Doryab A. 2015. Synergistic effect of elicitors in enhancement of ganoderic acid production: optimization and gene expression studies. *Applied Food Biotechnology* 2(3): 57–62.
- Hintze J. 2007. NCSS 2007. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA. www.ncss.com.
- Hu G., Zhai M., Niu R., Xu X., Liu Q. and Jia J. 2018. Optimization of culture condition for ganoderic acid production in *Ganoderma lucidum* liquid static culture and design of a suitable bioreactor. *Molecules* 23(10): 2563.
- Hu Y., Ahmed S., Li J., Luo B., Gao Z., Zhang Q., Li X. and Hu X. 2017. Improved ganoderic acids production in *Ganoderma lucidum* by wood decaying components. *Scientific Reports* 7: 46623.
- Index Fungorum. 2019. Index Fungorum Partnership. Recuperado de: <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>
- Karadag A., Beraat O. and Samim S. 2009. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods* 2: 41–60.
- Karthikeyan M., Radhika K., Bhaskaran R., Mathiyazhagan S. and Velazhahan R. 2009. Rapid detection of *Ganoderma lucidum* and assessment of inhibition effect of various control measures by immunoassay and PCR. *African Journal of Biotechnology* 8: 2202–2208.
- Liu G., Ding C., Zhang K. and Wang X. 2009. Effects of medicinal insect, *Catharsius molossus* on biosynthesis of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* in submerged culture. *Chinese Journal of Biotechnology* 25: 914–919.
- Liu J., Shimizu K., Tanaka A., Shinobu W., Ohnuki K., Nakamura T. and Kondo R. 2012. Target proteins of ganoderic acid DM provides clues to various pharmacological mechanisms. *Scientific Reports* 2: 905.
- López-Peña D., Gutiérrez A., Hernández-Navarro E., Valenzuela R. y Esqueda M. 2016. Diversidad y distribución de *Ganoderma* (Polyporales: Ganodermataceae) en Sonora, México. *Botanical Sciences* 94: 431–439.

- López-Peña D., Gutiérrez A. y Esqueda M. 2013. Cinética de crecimiento y composición del micelio de *Lentinula edodes* cultivado en medio líquido suplementado con extractos de madera de vid. 2013. Revista Mexicana de Micología 37: 51–59.
- López-Peña D., Samaniego-Rubiano C., Morales-Estrada I., Gutiérrez A., Gaitán-Hernández R. and Esqueda M. 2019. Morphological characteristics of wild and cultivated *Ganoderma subincrustatum* from Sonora, Mexico. Scientia Fungorum 49: e1213.
- Martínez A.T., Speranza M., Ruiz-Deñás F.J., Ferreira P., Camarero S., Guillén F., Martínez M.J., Gutiérrez A. and del Río J.C. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. International Microbiology 8: 195–204.
- Martínez X. 2021. Metabolismo de cepas de *Ganoderma* spp. nativas del desierto Sonorense por microcalorimetría isotérmica (Tesis de licenciatura). Universidad de Sonora, Hermosillo.
- Mau J.L., Lin H.C. and Chen C.C. 2001. Non-volatile components of several medicinal mushrooms. Food Research International 34(6): 521–526.
- Mora H., Aragón D.M. y Ospina L.F. 2009. Caracterización del estrés oxidativo en ratas wistar diabéticas por estreptozotocina. Vitae 16(3): 311–319.
- Morales-Estrada R.I., Gaitán-Hernández R., Gutiérrez A., Vargas G., Jiménez A., Rascón A. and Esqueda M. 2018. Vineyard pruning waste improves bioconversion and chemical composition of native *Ganoderma* spp. (Agaricomycetes) strains from Mexico. International Journal of Medicinal Mushrooms 20: 775–789.
- Muñoz-Bernal O.A., de la Rosa L.A., Rodrigo-García J., Martínez-Ruiz N.R., Sáyago-Ayerdi S.C., Rodríguez L., Fuentes E., Palomo I., and Álvarez-Parrilla E. 2021. Phytochemical characterization and antiplatelet activity of Mexican red wines and their byproducts. South African Journal of Enology and Viticulture 42(1):1–14.
- Ou B., Hampsh-Woodill M. and Prior R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49 (10): 4619–4626.
- Paterson R.R.M. 2006. *Ganoderma* - A therapeutic fungal biofactory. Phytochemistry 67: 1985–2001.
- Peksen A. and Yakupoglu G. 2009. Tea waste as a supplement for the cultivation of *Ganoderma lucidum*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25: 611–618.
- Rodríguez-Roque M.J., Grigelmo-Miguel N., Rojas-Graü M.A. y Martín-Belloso O. 2012. Métodos para determinar la capacidad antioxidante en alimentos y sistemas biológicos. En: E. Álvarez Parrilla, G.A. González-Aguilar, L.A. de la Rosa y J.F. Ayala Zavala (eds.). Antioxidantes en alimentos y salud. Clave Editorial, México, 403–452 pp.
- Russell M. and Paterson R. 2006. *Ganoderma*: a therapeutic fungal biofactory. Phytochemistry 67: 1985–2001.
- Sánchez A., Ysunza F., Beltrán-García M.J. and Esqueda, M. 2002. Biodegradation of viticulture wastes by *Pleurotus*: A source of microbial and human food and its potential use in animal feeding. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 2537–2542.
- Sanodiya B.S., Thakur G.S., Baghel R.K., Prasad G.B.K.S. and Bisen P.S. 2009. *Ganoderma lucidum*: a potent pharmacological macrofungus. Current Pharmaceutical Biotechnology 10:

717–42.

- Seo G. and Kirk P. 2000. Ganodermataceae: nomenclature and classification. En: J. Flood, P.D. Bridge, M. Holderness (eds.). *Ganoderma* diseases of perennial crops. CABI Publishing, Egham, UK. 3–22 pp.
- Shah P. and Modi H.A. 2015. Comparative study of DPPH, ABTS and FRAP assays for determination of antioxidant activity. *International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology* 3(6): 636–41.
- Shahidi F. and Zhong Y. 2015. Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods* 18: 757–781.
- SIAP. 2019. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. México: SIAP. Recuperado de: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Sliva D., Sedlak M., Slivova V., Valachovicova T., Lloyd F. and Ho N. 2003. Biologic activity of spores and dried powder from *Ganoderma lucidum* for the inhibition of highly invasive human breast and prostate cancer cells. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 9: 491–497.
- Smina T.P., De S., Devasagayam T.P.A., Adhikari S., Janardhanan K.K. 2011. *Ganoderma lucidum* total triterpenes prevent radiation-induced DNA damage and apoptosis in splenic lymphocytes *in vitro*. *Mutation Research* 726:188–194.
- Stamets P. 2000. *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. 3 ed. Ten Speed Press. Berkeley.
- Sułkowska-Ziaja K., Zengin G., Gunia-Krzyżak A., Popiół J., Szewczyk A., Jaszek M., Rogalski J. and Muszyńska B. 2022. Bioactivity and Mycochemical profile of extracts from mycelial cultures of *Ganoderma* spp. *Molecules* 27, 275.
- Tang W., Liu J.W., Zhao W.M., Wei D.Z. and Zhong J.J. 2006. Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells. *Life Science* 80: 205–211.
- Tang Y.J. and Zhong J.J. 2003. Scale-up of a liquid static culture process for hyperproduction of ganoderic acid by the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Biotechnology Progress* 19: 1842–1846.
- Tay Z.H. and Chong K.P. 2016. The potential of papaya leaf extract in controlling *Ganoderma boninense*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. Vol. 36. No. 1. IOP Publishing, p. 012027.
- Trigos A. and Suárez-Medellín J. 2011. Biologically active metabolites of the genus *Ganoderma*: three decades of myco-chemistry research. *Revista Mexicana de Micología* 34: 63–83.
- Vázquez N. 2011. Asociación Agrícola de Productores de Uva de Mesa, Modelo de la Agricultura Moderna en México en el Siglo XXI. Fundación Produce Sonora A.C., Hermosillo.
- Wachtel-Galor S., Yuen J. and Buswell J.A. 2011. *Ganoderma lucidum* (lingzhi or reishi): A medicinal Mushroom. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2 ed. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton.
- Wang X., Xi R., Li Y., Wang D. and Yao Y. 2012. The species identity of the widely cultivated

Ganoderma, '*G. lucidum*' (Ling-zhi), in China. PLoS ONE 7(7): e40857.

- Xu J.W., Zhao W. and Zhong J.J. 2010. Biotechnological production and application of ganoderic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87: 457–466.
- Xu P., Ding Z.Y., Qian Z., Zhao C.X. and Zhang K.C. 2008. Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media. *Enzyme and Microbial Technology* 42: 325–331.
- Zhang J., Zhong J.J. and Geng A. 2014. Improvement of ganoderic acid production by fermentation of *Ganoderma lucidum* with cellulase as an elicitor. *Process Biochemistry* 49: 1580–1586.
- Zhao J., Davis L.C. and Verpoorte R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 23: 283–333.
- Zhao W., Xu J.W. and Zhong J.J. 2011. Enhanced production of ganoderic acids in static liquid culture of *Ganoderma lucidum* under nitrogen-limiting conditions. *Bioresource Technology* 102: 8185–8190.