



Universidad de Valladolid



PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN  
CIENCIAS DE LA SALUD

TESIS DOCTORAL:

**Caracterización antioxidante,  
antirradicalaria y polifenólica de carpóforos  
obtenidos en diferentes cultivos de cepas  
ibéricas de *Ganoderma lucidum* (Curtis) P.  
Karst. y *Ganoderma lingzhi* S.H. Wu, Y. Cao  
& Y.C. Dai. Composición nutricional, perfil  
proteico y digestibilidad proteica de ambos  
taxones.**

Presentada por Raul Fraile Fabero para optar al  
grado de Doctor/a por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Pilar Jiménez López y

Juan Andrés Oria de Rueda Salgueiro



## AGRADECIMIENTOS

A Rebeca, mi mujer, por su apoyo siempre incondicional, tanto para esta tesis como en todos mis proyectos. A mis hijos que, junto con mi mujer, son el principal motor y alegría de mi día a día y, por supuesto, también lo han sido durante todas las fases de elaboración de esta tesis. A mis padres Victoriano y María, por tanto que me ha regalado: la educación, los valores, la vida... sin ellos no habría habido camino. A Juan Andrés Oria de Rueda, mentor y amigo, que desde estudiante me motivó a trabajar con hongos y plantas y gracias a él trabajo en lo que me gusta y me siento realizado en mi vocación. A Tomas Girbés, ciencia pura, un sabio, un lujo con el que he podido contar durante todo el doctorado y que, en cada visita al despacho, no sólo me resolvía rápidamente cualquier duda que tuviera, si no que, como gran docente, me regalaba nuevas ideas, enfoques y motivación para aprender y formarme en nuevos campos. A M.<sup>a</sup> Pilar Jiménez, por su dirección y ayuda en las pequeñas-grandes dudas que me surgían en el laboratorio. A los correctores de la tesis, la Dra. Teresa Ortega, el Dr. José Carmelo Adsuar y el Dr. Oscar Arce, por su altruista revisión. A M.<sup>a</sup> Virginia Ozcariz y Diego Giménez, por su inestimable colaboración en los cultivos de las cepas de reishi. A mis hermanos y a otros familiares y amigos que me han apoyado y motivado para que esta tesis se pueda concluir. A Dios, que ha puesto en mi camino todas y cada una de las personas a las que tanto debo y agradezco.



# 1 ÍNDICE GENERAL

1	ÍNDICE GENERAL .....	3
1.1	Índice de tablas .....	6
1.2	Índice de figuras .....	6
2	INTRODUCCIÓN .....	9
2.1	Los hongos medicinales .....	9
2.2	<i>Ganoderma lucidum</i> y <i>Ganoderma lingzhi</i> .....	10
2.3	Tipos de productos elaborados con <i>Ganoderma lucidum</i> .....	17
2.4	Principales propiedades del reishi .....	19
2.4.1	Efectos sobre el sistema inmune .....	20
2.4.2	Propiedades antivirales y antibacterianas .....	23
2.4.3	Antioxidantes del reishi y efecto protector .....	24
2.4.4	Propiedades antitumorales .....	25
2.4.5	Protección hepática y cáncer hepático .....	27
2.4.6	Reishi y efecto en la diabetes .....	29
2.4.7	Seguridad del consumo del reishi .....	31
2.5	Cultivo de setas. El cultivo de <i>Ganoderma lucidum</i> .....	32
2.6	Radicales libres .....	39
3	JUSTIFICACIÓN .....	43
4	OBJETIVOS .....	45
5	METODOLOGÍA .....	46
5.1	Cultivo de <i>Ganoderma lucidum</i> .....	46
5.1.1	Obtención de cepas y replicación .....	46
5.1.2	Producción de blanco de hongo .....	47
5.1.3	Preparación de sustrato y cultivo .....	48
5.1.4	Inoculación, recolección y deshidratación .....	49
5.2	Diagnóstico y verificación genética .....	50
5.3	Procesado de las setas .....	51
5.4	Preparación de los extractos .....	52
5.4.1	Selección del tipo de extracto .....	52
5.4.2	Elección del tiempo y temperatura de extracción .....	56
5.4.3	Elección de concentración del extracto .....	58



5.4.4	Proceso de elaboración de los extractos .....	59
5.5	Análisis nutricional y perfil de ácidos grasos .....	60
5.6	Caracterización antioxidante, antirradicalaria y polifenólica .....	62
5.6.1	Análisis de capacidad antioxidante .....	62
5.6.2	Contenido de fenoles totales .....	63
5.6.3	Capacidad antirradicalaria .....	65
5.7	Concentración y limpieza de proteínas.....	65
5.7.1	Estimación inicial de la cantidad de proteína de las muestras.....	65
5.7.2	Purificación mediante el método TCL/acetona.....	67
5.7.3	Diálisis con membrana.....	68
5.7.4	Ultrafiltración con presión de gas.....	70
5.7.5	Ultrafiltración con microtubo centrífugo.....	71
5.8	Electroforesis de las muestras .....	72
5.8.1	Método de tinción con plata .....	74
5.9	Digestibilidad proteica .....	75
5.10	Técnica de conservación entre películas de celofán.....	77
5.11	Digitalización de geles.....	78
5.12	Análisis informático de datos.....	78
6	RESULTADOS .....	79
6.1	Caracterización genética .....	79
6.2	Cultivo .....	80
6.2.1	Seta promedio.....	81
6.3	Caracterización nutricional .....	82
6.3.1	Entre <i>Ganoderma lucidum</i> y <i>Ganoderma lingzhi</i> .....	82
6.3.2	Entre pies y sombreros de <i>Ganoderma lucidum</i> .....	83
6.4	Perfil de ácidos grasos .....	84
6.4.1	Entre <i>Ganoderma lucidum</i> y <i>Ganoderma lingzhi</i> .....	84
6.4.2	Entre pies y sombreros de <i>G. lucidum</i> .....	86
6.5	Ajustes de los métodos .....	88
6.5.1	Ajustes de la metodología CUPRAC.....	88
6.5.2	Ajustes de la metodología Folin-Ciocalteu .....	89
6.5.3	Ajustes de la metodología del radical DPPH .....	90
6.6	Comparación de Antioxidantes.....	91





6.6.1	Entre <i>Ganoderma lucidum</i> y <i>Ganoderma lingzhi</i> .....	91
6.6.2	Entre sombrero, pie y tubos de <i>Ganoderma lucidum</i> .....	92
6.7	Comparación de fenoles totales .....	92
6.7.1	Entre <i>Ganoderma lucidum</i> y <i>Ganoderma lingzhi</i> .....	92
6.7.2	Entre sombrero, pie y tubos de <i>Ganoderma lucidum</i> .....	93
6.8	Comparación de antirradicalarios.....	94
6.8.1	Entre <i>Ganoderma lucidum</i> y <i>Ganoderma lingzhi</i> .....	94
6.8.2	Entre sombrero pie y tubos de <i>Ganoderma lucidum</i> .....	95
6.9	Electroforesis.....	96
6.9.1	Estimación inicial de la cantidad de proteína de las muestras.....	96
6.9.2	Concentración y limpieza de proteínas. Elección de método.....	96
6.9.3	Diversidad proteica de <i>Ganoderma lucidum</i> y <i>Ganoderma lingzhi</i> .....	99
6.9.4	Tinción con plata.....	101
6.10	Digestibilidad enzimática en SGF (Simulated Gastric Fluid) .....	102
7	DISCUSIÓN .....	104
7.1	Caracterización genética .....	104
7.2	Cultivo .....	105
7.3	Análisis nutricionales.....	106
7.3.1	Fibra.....	108
7.3.2	Proteínas .....	109
7.4	Perfil de ácidos grasos .....	111
7.5	Antioxidantes, fenoles y antirradicalarios .....	112
7.6	Elección de método de concentración de proteínas.....	117
7.7	Electroforesis y digestibilidad enzimática .....	118
8	CONCLUSIONES.....	121
9	MEDIOS E INSTRUMENTOS .....	123
9.1	Aislamiento y cultivo de <i>Ganoderma lucidum</i> .....	123
9.2	Resto de análisis. ....	124
10	BIBLIOGRAFÍA.....	126



## 1.1 Índice de tablas

Tabla 1. Condiciones generales de cultivo para <i>Ganoderma lucidum</i> .	36
Tabla 2. Identidad de secuencias genéticas de los hongos	79
Tabla 3. Resumen de los cultivos de las cepas ibéricas de <i>Ganoderma lucidum</i> .	80
Tabla 4. Comparativa nutricional (%) entre carpóforos de <i>Ganoderma lingzhi</i> con carpóforos de <i>Ganoderma lucidum</i>	82
Tabla 5. Comparativa nutricional (%) entre pies y sombreros de carpóforos de <i>Ganoderma lucidum</i>	83
Tabla 6. Comparativa de contenido de ácidos grasos (%) entre carpóforos de <i>Ganoderma lingzhi</i> y <i>Ganoderma lucidum</i> .	85
Tabla 7. Comparativa de contenido de ácidos grasos (%) entre pies y sombrero de <i>Ganoderma lucidum</i> .	86
Tabla 8. Valores nutricionales encontrados para <i>Ganoderma lucidum</i> por diferentes autores.	107

## 1.2 Índice de figuras

Figura 1. Setas recogidas en Palencia para estudio.	10
Figura 2. Diferentes partes de la seta reishi.	11
Figura 3. Imagen del libro Shennong Materia Medica	12
Figura 4. Características Microscópicas de <i>Ganoderma lucidum</i> .	13
Figura 5. Diferencias morfológicas entre <i>Ganoderma lingzhi</i> y <i>Ganoderma lucidum</i> .	14
Figura 6. Dos setas de <i>Ganoderma lingzhi</i> deshidratadas.	15
Figura 7. <i>Ganoderma carnosum</i> , especie similar a <i>Ganoderma lucidum</i> .	16
Figura 8. Fotografías de los diferentes productos vendidos como reishi en el mercado.	17
Figura 9. Microfotografía de carpóforo, esporas y micelio de reishi.	18
Figura 10. Reishi en diferentes mercados del planeta	19
Figura 11. $\beta$ -D-glucanos de uniones 1-3 y 1-6.	21
Figura 12. Representación de la proteína Ling Zhi-8 del reishi.	22
Figura 13. Blanco de hongo de <i>Ganoderma lucidum</i> .	33



<b>Figura 14. Rokkaku reishi y reishi normal.....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 15. <i>Ganoderma lucidum</i> fructificando en un sustrato de madera de frondosas.....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 16. Pasta de dientes con reishi, vendida por la empresa LG.....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 17. Peroxidación lipídica y daños en la membrana.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 18. Microfotografía de micelio de <i>Ganoderma lucidum</i> (GLM).....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 19. Placa completamente colonizada por <i>Ganoderma lucidum</i>. Fotografía del autor.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 20. Micelio clonado sobre centeno integral biológico. Fotografía del autor.....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 21. Bolsa con sustrato invadido por <i>Ganoderma lucidum</i>.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 22. Separación de la carne del sombrero de los tubos (himenio). Fotografía del autor.....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 23. Setas y partes de setas trituradas listas para extraer. Réplica III. Fotografía del autor.....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 24. Láminas de seta reishi deshidratadas.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 25. Evolución del contenido en fenoles del té de reishi según el tiempo de extracción.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 26. Evolución de la temperatura y la concentración de polifenoles en el extracto caliente.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 27. Detalle de reishi triturado y pesado en báscula.....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 28. Proceso de infusión de las muestras.....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 29. Extractos 1:10 limpios y congelados.....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 30. Sombreros y pies de reishi en bolsas zip.....</b>	<b>61</b>
<b>Figura 31. Reacción de CUPRAC.....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 32. Esquema de Reacción de Folin-Ciocalteu.....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 33. Muestras en baño durante la reacción de Folin-Ciocalteu.....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 34. Los extractos de reishi tiñen de pardo la electroforesis.....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 35. Coloración de los diferentes extractos de reishi.....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 36. Método de concentración y purificación de proteínas TCA/acetona.....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 37. Proceso de diálisis.....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 38. Equipo de ultrafiltración funcionando.....</b>	<b>70</b>
<b>Figura 39. Funcionamiento de Amicon ultra-0,5 Centrifugal devices.....</b>	<b>72</b>



<b>Figura 40. Máquina de electroforesis funcionando y fin de la electroforesis</b> ....	74
<b>Figura 41. Mesa preparada para la tinción con plata</b> .....	75
<b>Figura 42. Prueba de pH después de la digestión con SGF</b> .....	76
<b>Figura 43. Técnica de conservación entre películas de celofán</b> .....	77
<b>Figura 44. Cultivos de <i>Ganoderma lucidum</i> en bolsa y en frasco</b> .....	81
<b>Figura 45. Foto detalle de pies y sombreros de <i>Ganoderma lucidum</i></b> .....	83
<b>Figura 46. Cubetas patrón del método CUPRAC</b> .....	88
<b>Figura 47. Recta patrón del método CUPRAC</b> .....	89
<b>Figura 48. Cubetas patrón del método de Folin-Ciocalteu.</b> .....	89
<b>Figura 49. Recta patrón del método Folin-Ciocalteu</b> .....	89
<b>Figura 50. Cubetas patrón del método del radical DPPH</b> .....	90
<b>Figura 51. Recta patrón del método del radical DDPH</b> .....	90
<b>Figura 52. Capacidad antioxidante de los distintos carpóforos del estudio. Método CUPRAC</b> .....	91
<b>Figura 53. Capacidad antioxidante de sombrero, tubos y pie de <i>Ganoderma lucidum</i>. Método CUPRAC</b> .....	92
<b>Figura 54. Contenido en fenoles totales de los distintos carpóforos del estudio. Método Folin-Ciocalteu</b> .....	93
<b>Figura 55. Contenido en fenoles totales de sombrero, tubos y pie de <i>Ganoderma lucidum</i>. Método Folin-Ciocalteu</b> .....	94
<b>Figura 56. Contenido de sustancias radicalarias de los distintos carpóforos del estudio. Método del radical DPPH</b> .....	95
<b>Figura 57. Contenido de sustancias radicalarias de sombrero, tubos y pie de <i>Ganoderma lucidum</i>. Método del radical DPPH</b> .....	96
<b>Figura 58. Electroforesis del método de TCA/Acetona</b> .....	97
<b>Figura 59. Electroforesis extracto concentrado con Amicon ultra-05</b> .....	98
<b>Figura 60. Otras electroforesis para la puesta a punto del método</b> .....	99
<b>Figura 61. Perfil proteico de diferentes partes de <i>Ganoderma lucidum</i> y <i>Ganoderma lingzhi</i></b> .....	100
<b>Figura 62 Electroforesis con tinción en plata</b> .....	101
<b>Figura 63. Proceso de revelado en el método de tinción con plata</b> .....	102
<b>Figura 64. Digestibilidad proteica de <i>Ganoderma lucidum</i> y <i>Ganoderma lingzhi</i></b> .....	103



<b>Figura 65. Detalle de fructificación de reishi en tubo de ensayo .....</b>	<b>105</b>
<b>Figura 66. <i>Ganoderma lucidum</i> fructificando al extremo de una bolsa de sustrato .....</b>	<b>114</b>
<b>Figura 67. Detalle de pigmentación de los extractos de <i>Ganoderma</i> .....</b>	<b>117</b>
<b>Figura 68. Detalle de una de las electroforesis realizadas.....</b>	<b>118</b>

## 2 INTRODUCCIÓN

### 2.1 Los hongos medicinales

Los hongos son el grupo más diverso y abundante del planeta. Recientemente se han estimado 5,1 millones de especies de hongos mediante métodos de detección molecular de las cuales algo más de 100.000 han sido citadas en la literatura (Kirk et al., 2008).

Los hongos verdaderos, reino fungi, se organizan en 5 divisiones taxonómicas: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota*, *Blastocladiomycota* y *Chytridiomycota*. La mayoría de las investigaciones farmacológicas, terapéuticas y medicinales se han centrado sobre todo en especies de los filos *Ascomycota* y *Basidiomycota*. (Hameed et al., 2017)

Se conocen aproximadamente 7.000 especies de hongos que producen setas comestibles. De estos, unas 3.000 especies englobadas dentro de 231 géneros distintos se consideran comestibles excelentes. Alrededor del 3% de las especies conocidas son venenosas y aproximadamente 700 especies tienen propiedades medicinales. (Chandra & Dhanasekaran, 2019)



**Figura 1. Setas recogidas en Palencia para estudio.**

Asociación de Estudios Micológicos Forestales. Campus de la Yutera, Palencia. Autor: R. Fraile.

En los hongos superiores, los que producen fructificaciones macroscópicas visibles, podemos encontrar metabolitos secundarios tanto en sus setas, como en su micelio o en el medio donde viven. Algunas de las propiedades encontradas para estos metabolitos son efectos antitumorales, inmunomoduladores, antioxidantes, cardiovasculares, antihipercolesterolémicos, antivirales, antibacterianos, antiparasitarios, antifúngicos, desintoxicantes, hepatoprotectores y antidiabéticos. (Sharma et al., 2018)

Hasta el 2017 se habían realizado más de 600 estudios clínicos con hongos medicinales. Varios de los compuestos de hongos han sido utilizados en estudios clínicos de fase I, II y III y se usan de manera extensiva y exitosa en Asia para tratar varios cánceres y otras enfermedades (Wasser, 2017).

La medicina con hongos es cada vez más conocida en occidente, aunque donde realmente se utilizan con miles de años de historia, es en zonas de oriente, donde son frecuentemente recetados por médicos a los pacientes que acuden a las consultas.

## ***2.2 Ganoderma lucidum y Ganoderma lingzhi***

*Ganoderma lucidum* es un hongo saprófito cuyas setas se usan como medicina tradicional desde hace más de dos mil años en diferentes lugares del planeta (Chatterjee et al., 2011).

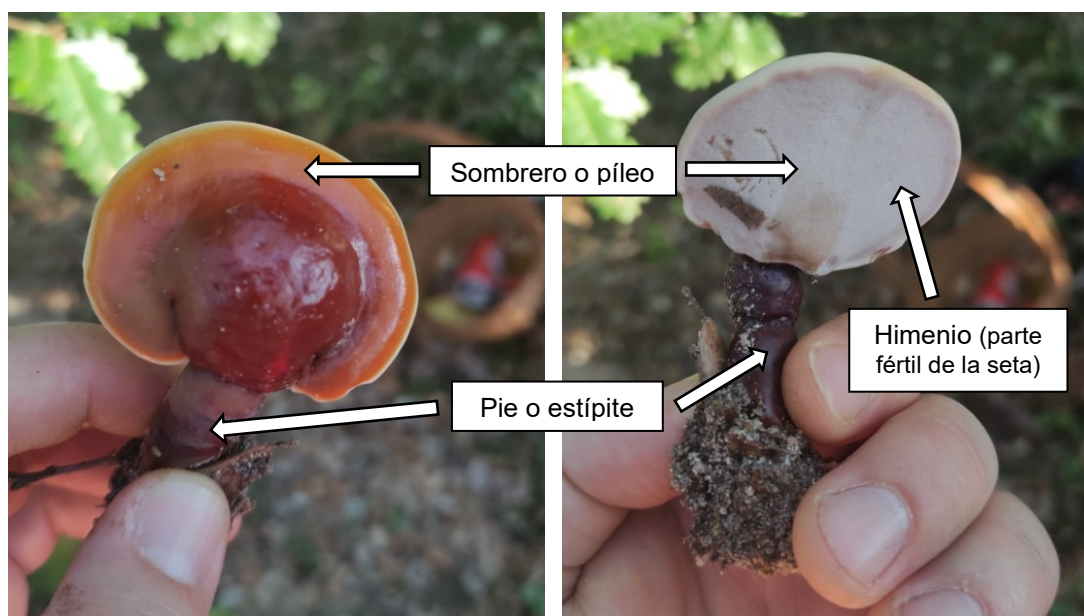




Las setas de esta especie presentan diferentes nombres comunes según el país, pero el nombre más establecido en el comercio internacional es el de Reishi. En China se denomina: *Ling zhi*, *ling zhi cao*, *ling chih*, *hong ling zhi*, *chi zhi*. En Japón: *Reishi*, *mannentake*, o *rokkaku reishi*. En Corea: *Young ji*. En Vietnam: *Ling chi*. (Upton R, 2000).

En España se la conoce como seta pipa debido a que el estípite (o pie, Figura 2) no sale del centro del sombrero, como en muchas especies, si no de un lateral, adquiriendo forma de una pipa de fumar.

Si bien el hongo se distribuye por buena parte de la región templada y subtropical del planeta, en las culturas orientales es donde más importancia se le otorga, debido a sus múltiples aplicaciones medicinales recogidas tanto en la medicina tradicional como en la actual.



**Figura 2. Diferentes partes de la seta reishi**

Seta pipa (*Ganoderma lucidum*) con sus partes principales: sombrero, pie e himenio.

Autor: R. Fraile, tomada con teléfono móvil Asus Zenphone 6.

Así, en China se encuentra inmortalizado en numerosas pinturas, estatuas, tapices de y en la túnica de algunos emperadores. La seta también ha sido venerada en la cultura japonesa, donde se considera el políporo medicinal más importante (Matsumoto, 1979).



El primer libro que recoge el uso medicinal del reishi es “Shennong Materia Medica” (100 a.d.C) donde se denomina *Lingzhi* “rojo” (*Cizhi*). Este libro describe su sabor amargo y su seguridad de consumo (carencia de efectos secundarios), así como su utilidad para el tratamiento de la “congestión y mejora de la memoria”. El libro: “Eruditos hablando sobre medicina” de la dinastía Zhou (1112-221 a.d.C) es la obra más antigua que da información sobre la seta reishi. Este libro habla de su crecimiento sobre madera podrida (Zhibin, 2009).

Sin embargo, si atendemos a datos arqueológicos, el uso del reishi se remonta a tiempos del neolítico. Así se han encontrado restos de *Ganoderma* en un yacimiento de las áreas bajas del río Yangtzé que se ha fechado de hace más de 6800 años (Mao-XL, 2000).



**Figura 3. Imagen del libro Shennong Materia Medica**

Obsérvese que en la mano carga una seta reishi. (Zhibin, 2009).

*Ganoderma lucidum* es un hongo saprófito, que se alimenta de materia orgánica en descomposición. Durante años se consideró un hongo patógeno, y donde aparecía se realizaba un tratamiento intensivo con fungicidas. Sin embargo, su patogenicidad es muy reducida, alimentándose prácticamente sólo de la zona muerta de árboles.

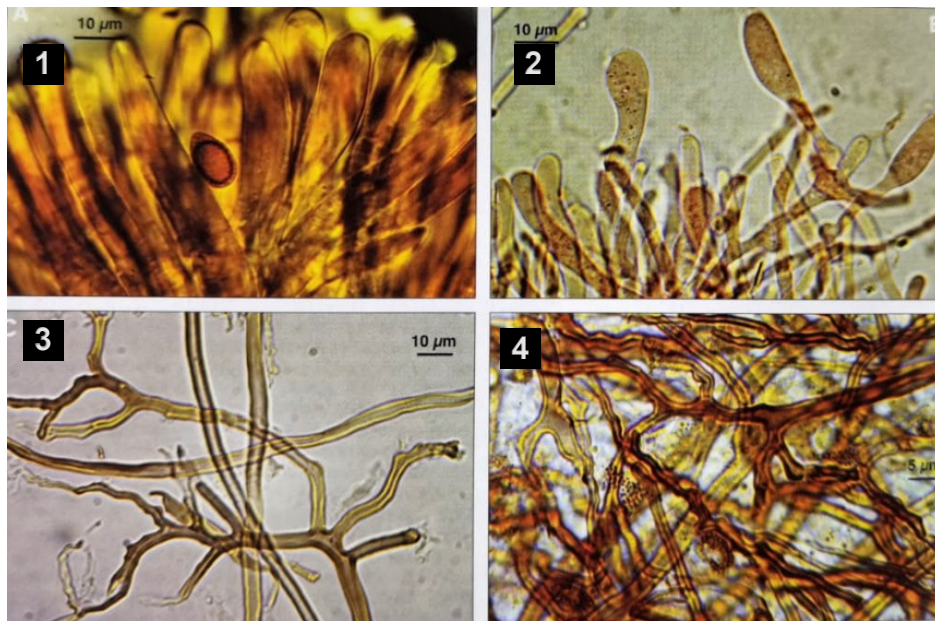
Es una especie lignolítica, que se alimenta principalmente de madera de árboles de tipo frondoso: robles, encinas, quejigos y alcornoques (*Quercus spp.*). Medra principalmente árboles de la familia fagaceae y betulaceae. Tiene citas de aparición en castaño (*Castanea sativa*), chopos (*Populus spp.*), plátano (*Platanus*





spp.), haya (*Fagus*), almez (*Celtis*), fresno (*Fraxinus*), arce (*Acer*), Tilos (*Tilia*) y robinias (*Robinia*) (Ozcariz Fermoselle, 2016). En Europa central aparece principalmente colonizando robles y hayas. (Pavlik et al., 2020).

Cuando fructifica lo hace principalmente entre la tierra de suelo, asemejando a una especie terrícola, pero en realidad se desarrolla en las raíces muertas del árbol de las que se está alimentando, siendo poco frecuente encontrar las setas agarradas directamente en la base de un árbol, como si hacen otras especies de *Ganoderma* (*Ganoderma resinaceum*, *G. applanatum*, *G. adpersum*, etc.). Esta forma de fructificar ayuda a identificar el taxón.



**Figura 4. Características Microscópicas de *Ganoderma lucidum*.**

1) Hifas en empalizada de la epicutis. 2) Elementos himeniales. 3) Hifas del contexto. 4) Hifas esqueléticas. Fuente: (Bernicchia & Gorjón, 2020)

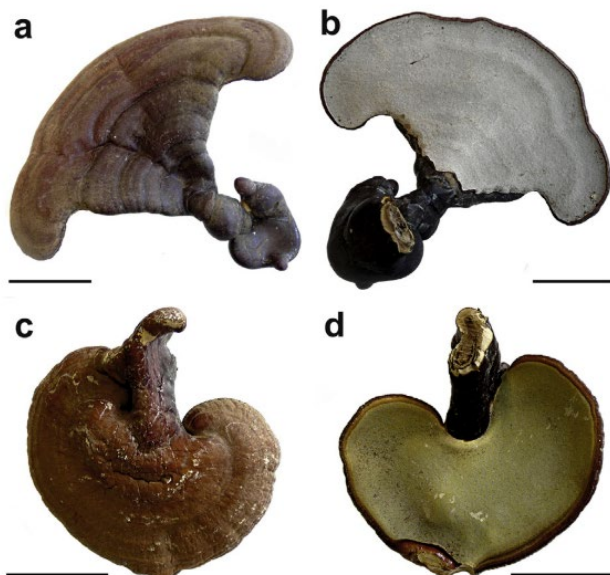
Se encuentra de forma silvestre por Europa, América, Asia, Australia y África (Arora, 1986). En España en los tratados técnicos, hasta hace poco, se consideraba un hongo pernicioso para los intereses del hombre ya que vive sobre la madera y las cepas de árboles descomponedores. (Oría de Rueda, 2007). Según nuestra experiencia, es especialmente abundante en áreas donde existe cierta actividad humana: áreas de extracción de leñas, bosques de uso recreativo, con cierta



ganadería extensiva, etc., actividades que parecen favorecer que el hongo crezca en raíces debilitadas por la actividad humana.

Dentro del reino de los hongos, el género *Ganoderma* se encuentra dentro del filo: *Basidiomycota*, subfilo: *Agaricomycotina*, clase: *Agaricomycetes*, orden: *Polyporales* y familia: *Polyporaceae*. (Robert et al., 2005).

En Europa sólo existen 7 especies de *Ganoderma* (Bernichia, 2005). Las características morfológicas que separan a *Ganoderma lucidum* de los demás taxones son: disponer de un pie excéntrico, una epicutis con hifas en empalizada, tener la cutícula lacada (no resinosa), el contexto de color marrón y crecer sobre árboles de angiospermas y *Picea spp.* (Bernicchia & Gorjón, 2020)



**Figura 5. Diferencias morfológicas entre *Ganoderma lingzhi* y *Ganoderma lucidum*** (a-b) Basidiocarpos de *Ganoderma lucidum*. (c-d) Basidiocarpo de *Ganoderma lingzhi*. Nótese la diferencia en el tono dorado del del himenóforo. Fuente: (Hennicke et al., 2016)

*Ganoderma lingzhi* es una especie típicamente oriental, muy similar a *Ganoderma lucidum* y cuyas setas también se denominan “reishi”. Difiere morfológicamente de *Ganoderma lucidum* en el tamaño del mixosporio esporal, solo visible bajo el microscopio (Hennicke et al., 2016) y macroscópicamente se diferencia por la tonalidad del himenio: *Ganoderma lucidum* presenta un color blanco y



*Ganoderma lingzhi* lo tiene dorado, como se muestra en la Figura 5. Sin embargo, esta coloración amarillenta se va perdiendo con el paso del tiempo después de la recolección, lo cual puede complicar la identificación de la especie (Figura 6).



**Figura 6. Dos setas de *Ganoderma lingzhi* deshidratadas.**

Obsérvese como la tonalidad amarillenta del himenio casi se ha perdido después de dos años de su recolección (imagen tomada con Nikon, D70, objetivo macro Mikro Nikkor 60mm, 2.8. Con balance de blancos calibrado. Setas procedentes del herbario de Mundoreishi Salud S.L. (Palencia, España). Autor: R. Fraile

*Ganoderma lingzhi* se ha utilizado durante siglos en los países de Asia oriental como un hongo medicinal muy importante. Prefiere crecer en madera podrida de árboles de hoja ancha y se distribuye principalmente en los trópicos y subtrópicos. (Pavlik et al., 2020). Esta especie reviste de una gran importancia económica, medicinal y cultural, y por todo esto, *Ganoderma lingzhi* se citó como el hongo del año 2013 en la revista Mycology (Yang & Feng, 2013) poco después de su descubrimiento. La diferenciación genética entre *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi* fue establecida en 2012 (Yun Cao et al., 2012) atendiendo a la región ITS2 del ADN ribosomal. Debido a que *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi* coexisten físicamente en algunas zonas de oriente, es importante indicar que en buena parte de las publicaciones anteriores a 2012 no es posible discernir si los investigadores han trabajado con una especie u otra y, por lo tanto, es complicado separar las



propiedades medicinales de uno u otro taxon. Esto sobre todo sucede para publicaciones en que el producto procede de Asia.

Para los estudios científicos realizados con reishi aislados y reproducidos en Europa, sí es posible estimar que traten de *Ganoderma lucidum* y, por lo tanto, son asumibles a este taxón ya que, actualmente, no se ha encontrado *Ganoderma lingzhi* silvestre en Europa (Bernichia, 2005). En Europa las especies con morfología muy similar a *Ganoderma lucidum* son: *Ganoderma valesiacum*, que aparece sobre madera de alerces (*Larix decidua*) y *Ganoderma carnosum* (Figura 7) que se asocia a madera de abetos (*Abies alba*) y es de una tonalidad más negruzca (Bernichia, 2005).



**Figura 7. *Ganoderma carnosum*, especie similar a *Ganoderma lucidum*.**

*Ganoderma carnosum* recolectada en un abetal junto al río Irati, Navarra. La tonalidad más oscura del carpóforo diferencia este taxón de *Ganoderma lucidum*. Fuente: Raúl Fraile Fabero.

*Ganoderma lingzhi* es, por lo tanto, un hongo que probablemente presente muchas de las virtudes medicinales que se le han asociado erróneamente a *Ganoderma lucidum* y por ello, se requiere de nuevas investigaciones para poder delimitar las propiedades de cada taxón.

Las únicas propiedades que hemos encontrado para *Ganoderma lingzhi* perfectamente identificada son: presencia de esteroides tipo ergostano con





propiedades citotóxicas, probados *in vivo* en tumores de pecho y pulmón (J. H. Yu et al., 2021), modulación de la microbiota, los ácidos biliares y el propionato en ratas (Yang et al., 2017), protección de daños renales por adriamicina en ratones (Yan, Wang, Zhou, et al., 2015), promoción de la formación de células madre neurales de ratón (Yan, Wang, Luo, et al., 2015), presencia de propiedades lactogénicas y antioxidantes (Kiss et al., 2021) e inhibidor de la rho-quinasa (Amen et al., 2017). Los extractos predigeridos de la seta: tienen efecto hipotensivo (Tran et al., 2014), protegen de la inflamación intestinal y sepsis provocada químicamente en ratones (Ishimoto et al., 2018) y tienen efecto inmunoestimulante (Ishimoto et al., 2017).

### 2.3 Tipos de productos elaborados con *Ganoderma lucidum*

En el mercado mundial se venden etiquetados como reishi 3 tipos de productos de *Ganoderma lucidum*/*Ganoderma lingzhi* muy distintos: Seta reishi, micelio de *Ganoderma lucidum* y esporas de *Ganoderma lucidum*.



**Figura 8. Fotografías de los diferentes productos vendidos como reishi en el mercado**

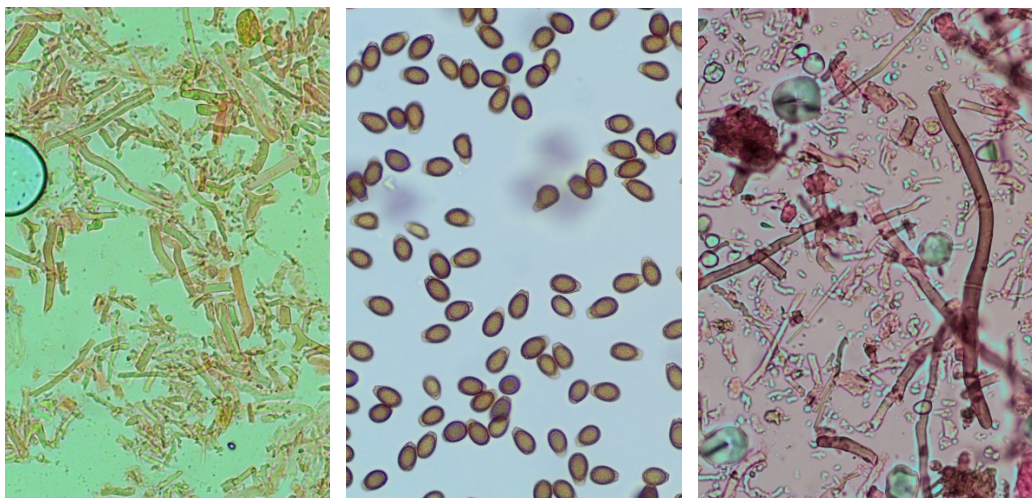
Izquierda: fotografía de reishi silvestre (Villamediana, Palencia). Autor: R. Fraile. Centro: micelio de *Ganoderma lucidum* creciendo en placa de agar (cedida por [www.aporsetas.com](http://www.aporsetas.com), Palencia). Derecha: esporas de *Ganoderma lucidum* colgando del borde del sombrero (cultivo realizado en laboratorio) y manchando de marrón la bolsa de cultivo situada debajo. Autor: R. Fraile

Las características de los tres productos son:



1) La seta reishi, es el producto que se consumía desde hace más de 2000 años; es lo que se ve y recoge en el campo para su consumo y es el producto con mayor seguridad de consumo y del que más se ha investigado y del que trata este trabajo.

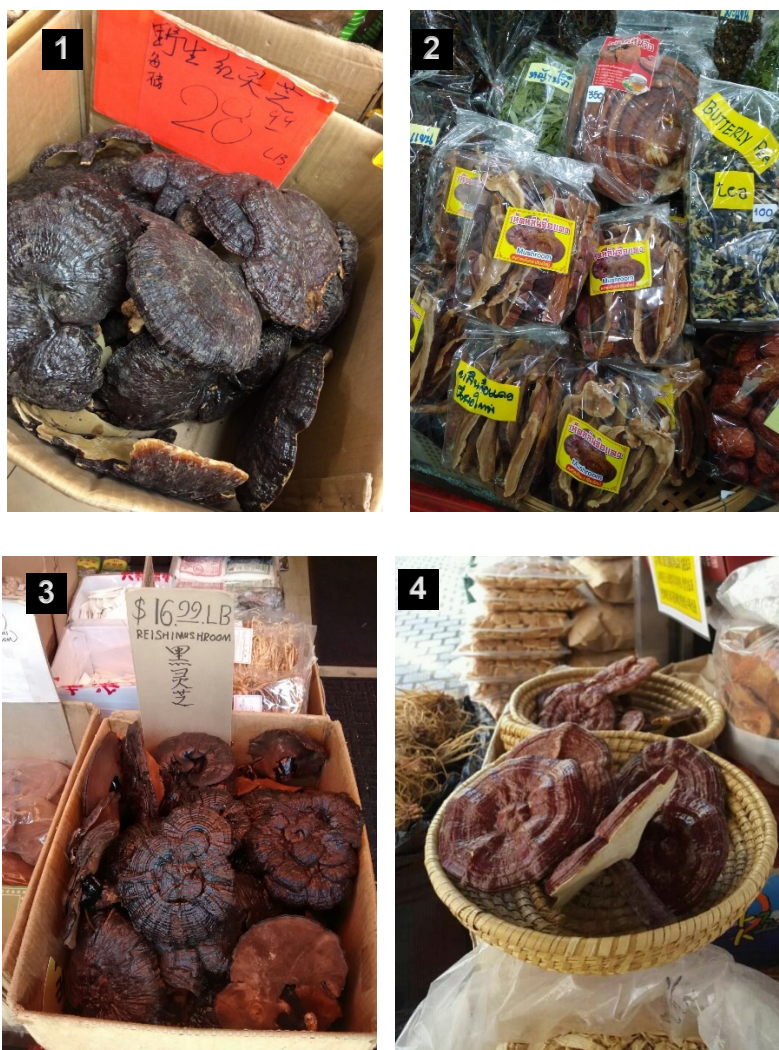
2) El micelio de reishi es el cuerpo vegetativo del hongo, visualmente es como pelusa blanca que invade el material del que se alimenta (raíces de árboles) (Figura 8). Cuando el micelio fructifica forma la seta reishi. En el 2015, la Comisión Europea prohibió la venta de micelio en Europa debido a su falta de seguridad de consumo.



**Figura 9. Microfotografía de carpóforo, esporas y micelio de reishi.**

Microfotografía de tres productos comercializados como reishi. Izquierda: reishi puro. Centro: esporas de reishi. Derecha: micelio de reishi. Fotos obtenidas sin calibrar obtenidas a 1000x. Obsérvese que el micelio de reishi contiene también coadyuvantes de encapsulación, que se dejan ver como cristales azulados. Autor: R. Fraile.

3) Las esporas de reishi, también vendidas como reishi, son el equivalente a la semilla del hongo. Las expulsa la seta desde su himenio (Figura 8). Cuando las esporas caen en un sustrato adecuado germinan y forma un micelio primario. Cuando dos micelios primarios se fusionan, el nuevo micelio ya puede dar origen a una seta reishi. El conjunto de esporas acumulada en masa (la esporada) se muestra como un polvo marrón.



**Figura 10. Reishi en diferentes mercados del planeta**

1- Reishi en mercado de Chinatown (Toronto), Canadá. Fuente: foto cedida por losody Silva Castro. 2- Reishi en mercado chino de Chian Mai, Tailandia. Fuente: foto cedida por Paloma Torroba Balmori. 3- Reishi en el Barrio Chino de San Francisco, EEUU. Foto cedida por Diego Merino González. 4- Reishi en mercado de Daejeon, Corea del Sur. Fuente: foto cedida por Luis Miguel Morejón Gallinas.

## 2.4 Principales propiedades del reishi

El reishi contiene diferentes principios activos que le otorgan distintas propiedades farmacológicas. Los polisacáridos de tipo  $\beta$ -D-glucanos y los triterpenos tetracíclicos (ácidos ganodericos, ganoderiol, ácidos lucidénicos) se consideran los de mayor interés en la seta (X. Sun et al., 2014), pero también





contiene  $\alpha$ -glucanos, otros triterpenoides, alcaloides, ergosterol, proteínas (*Ling Zhi-8*, *Ling Zhi-9*), nucleósidos (adenosina, inosina, uridina), y nucleótidos (guanina, adenina). (Ahmad et al., 2021).

*Ganoderma lucidum* está incluido como medicina en la farmacopea de algunos países como China o Estados Unidos (desde el 2014) (Liu et al., 2021). Por ello es muy frecuente encontrarlo a la venta en los mercados chinos de diferentes partes del planeta (Figura 10). En Europa, debido a que existe consumo desde antes de 1997, el Catálogo de Nuevos Alimentos de la Comisión Europea lo considera un alimento. Por el contrario, en España está prohibida su venta por considerarse tóxica, debido a que no está contenida en la Parte A del Anexo del Real Decreto 30/2009, de 16 de enero, por el que se establecen las condiciones sanitarias para la comercialización de setas para uso alimentario.

Entre las más de 3000 publicaciones científicas realizadas con *Ganoderma lucidum* destacan, como propiedades principales de la seta: sus efectos sobre el sistema inmune, sus propiedades protectoras debido a moléculas antioxidantes (destacando las propiedades hepatoprotectoras) y las propiedades antitumorales. Pero también son de interés las propiedades antivirales y sus estudios en la diabetes.

### **2.4.1 Efectos sobre el sistema inmune**

Actualmente existen más de 200 investigaciones referenciadas en la base de datos de PubMed / Medline (enero de 2022) que estudian la influencia de *Ganoderma lucidum* y sus compuestos en la respuesta inmunitaria tanto *in vitro* como *in vivo*.

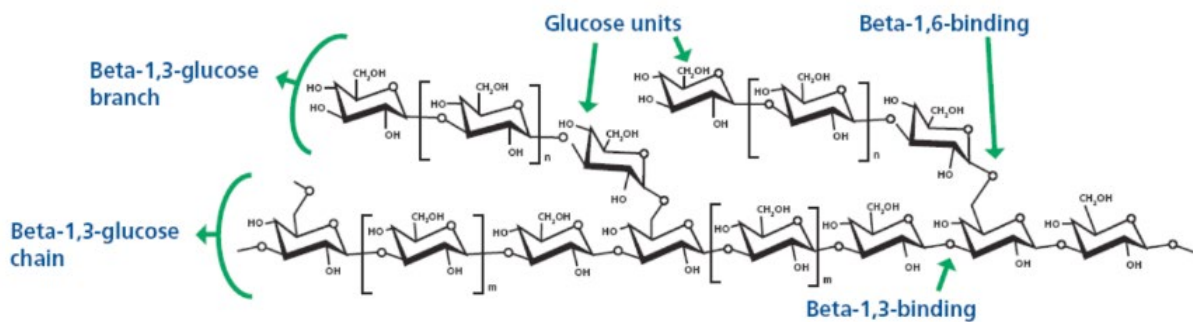
Las moléculas responsables de la inmunomodulación son principalmente polisacáridos y en particular  $\beta$ -D-glucanos (Yue et al., 2013), pero también ejercen efecto proteínas inmunomoduladoras como la *Ling Zhi-8* (Yeh et al., 2010), ácidos ganodéricos (Liu, Yang, et al., 2015), peptidoglicanos, oligosacáridos (Tsai et al., 2012) y proteoglicanos (Ye et al., 2011),

Se estima que una de las vías más importantes para la actividad de inmunomoduladora de los polisacáridos de *Ganoderma lucidum* reside en la respuestas originadas en la mucosa entérica (Zhao et al., 2010) y especialmente debida a los polisacáridos de tipo  $\beta$ -glucanos, ya que neutrófilos, macrófagos y las





células dendríticas, entre otras, expresan varios receptores capaces de reconocer beta-glucano en sus diversas formas. (Goodridge et al., 2009). Los  $\beta$ -glucanos pueden ser recogidos por las células M de los parches de Peyer, y / o interactuar con células dendríticas (DC) en el intestino delgado, para activar las respuestas sistémicas del organismo (Batbayar et al., 2012).



**Figura 11.  $\beta$ -D-glucanos de uniones 1-3 y 1-6.**

Las  $\beta$ -D-glucanos de uniones 1-3 y 1-6 del reishi son los de mayor actividad sobre el sistema inmune. Fuente: <https://orffa.com/>

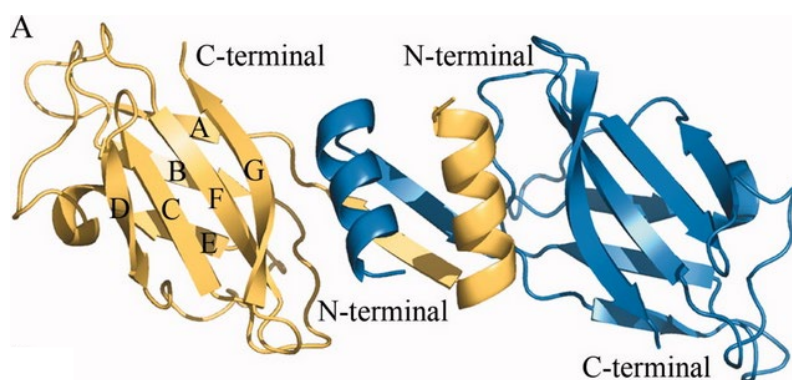
En el caso del reishi, para que los  $\beta$ -glucanos tengan la máxima actividad sobre el sistema inmune deben de tener una conformación en triple hélice (Liu et al., 2018). Esta conformación se puede dañar en los procesos de extracción en que se utilizan bases fuertes y, por ello, es probable que un reishi en polvo sin alterar, llegue a tener más actividad sobre el sistema inmune que extractos de la seta con los  $\beta$ -glucanos dañados.

Otras moléculas activadoras del sistema inmune son los peptidoglicanos y oligosacáridos del reishi, que parecen ser los responsables de la activación de la respuesta inmune en células mononucleares humanas: NK y T. (Tsai et al., 2012).

La proteína inmunomoduladora *Ling Zhi-8* contenida tanto en el micelio de *Ganoderma lucidum* (Kino et al., 1989) como en la seta (Tong et al., 2008) mejora el sistema inmune de ratones leucémicos (Zhou et al., 2013) y en ratas con cáncer gástrico (Pan et al., 2013). También aumenta significativamente la cicatrización de heridas en ratones (Lin et al., 2014).



Una fracción rica en polisacáridos obtenida a partir de un extracto acuoso alcalino del reishi incrementa el número las células dendríticas, linfocitos T reguladores, células CD4, CD8, linfocitos B, células NK y NKT en el bazo de ratones (Lai et al., 2010). Un proteoglicano complejo del reishi es capaz de aumentar de tres a cuatro veces del porcentaje de linfocitos en el bazo de ratón (Ye et al., 2011). Los linfocitos B fueron los más activados.



**Figura 12. Representación de la proteína Ling Zhi-8 del reishi**

Fuente: (Huang et al., 2009).

Entre los estudios clínicos que evalúan la influencia de *Ganoderma lucidum* en sistema inmune son de interés:

Un estudio realizado en niños de 3 a 5 años que recibieron un yogur con  $\beta$ -glucanos derivados de *Ganoderma lucidum* presentaban un recuento absoluto significativamente mayor de linfocitos totales de sangre periférica: CD3 +, CD4 + y células T CD8 + que en el grupo que recibía placebo.(Henao et al., 2018).

Otro estudio llevado a cabo con 40 futbolistas sometidos a alto estrés metabólico evidenció que los deportistas que tomaron una mayor cantidad de *Ganoderma lucidum* tenía una ratio de linfocitos CD4/CD8 mayor que los que tomaron una cantidad menor de producto o no habían tomado. (Zhang et al., 2008b). La disminución de la ratio CD4/CD8 es un indicador de la supresión inmunológica.

En personas afectadas con cáncer de pulmón, el consumo reishi previo al tratamiento oncológico evidenció que moléculas de la seta podían antagonizar el efecto inmunosupresor originado por las células cancerosas (L. X. Sun et al., 2014).



La evaluación del consumo de *Ganoderma lucidum* en 47 personas con cáncer colorectal avanzado, que habían sufrido radioterapia y quimioterapia, concluyó que la fracción estudiada de reishi incrementó el número de células NK en un 63,4-68,3% y redujo un 73,2% los parámetros inmunológicos relacionados con caquexia cancerosa TNF- $\alpha$  y IL-1 (Gao et al., 2003)

#### 2.4.2 Propiedades antivirales y antibacterianas

La modulación del sistema inmune por parte del reishi, junto con la presencia de compuestos antivirales, principalmente polisacáridos y triterpenos, se ha investigado con resultados positivos para diferentes enfermedades virales humanas.

Existe investigación para el papiloma humano (Donatini, 2014), dengue (Bharadwaj, 2019; Lim et al., 2019), herpes simplex (Donatini, 2010; Eo et al., 2000; Hijikata et al., 2007; Hijikata et al., 2005), neuralgias del herpes zoster (Hijikata et al., 2005), mononucleosis (Iwatsuki et al., 2003), sida (Kim et al., 1997), enterovirus a71 (Lin et al., 2020; Zhang et al., 2014), hepatitis B (Li & Wang, 2006) y SARS-CoV-2 (Jan et al., 2021). En numerosas investigaciones se concluye que las moléculas analizadas poseen alto interés debido a su elevado efecto inhibitorio viral inducido por diferentes mecanismos.

Entre las enfermedades virales de animales se ha estudiado para: circovirus de cerdos (Liu et al., 2019), necrosis nerviosa viral piscícola (Kuan et al., 2012) y enfermedad de Newcastle de las aves (Shamaki et al., 2014).

Sin embargo, en comparación con sus efectos antivirales, la actividad antibacteriana de las setas de *Ganoderma* y sus extractos, es muy reducida. Se ha evaluado el poder antibiótico del reishi mediante el método de difusión con discos para las bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* (Keypour Sangesari et al., 2009; J. Mishra et al., 2018; Sheena et al., 2003) solamente se observa actividad para *Echerichia coli*, y *Bacillus subtilis* y *Salmonella thyphi*, no observando efecto inhibitorio para las bacterias patógena más agresivas: *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.



Debido a la mejora de respuesta inmune, comentada ampliamente en el punto 2.4.1, es posible estimar una mejor respuesta del organismo ante infecciones bacterianas, especialmente porque componentes del reishi como proteína Lz-8 incrementa la formación de neutrófilos (Lei et al., 2020), con dominante función antibacteriana, y polisacáridos de la seta aumentan su actividad fagocítica (Hsu et al., 2003).

### **2.4.3 Antioxidantes del reishi y efecto protector**

El reishi actúa sobre los sistemas antioxidantes del organismo regulando positivamente la expresión de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (Pan et al., 2014; Sargowo et al., 2018), glutatión peroxidasa (Pan et al., 2014; Wu, 2018) y catalasa (Pan et al., 2014) y por la actividad antioxidante y captadora de radicales libres de algunos de sus componentes como compuestos fenólicos (Prasad et al., 2015), triterpenos (Smina, Mathew et al. 2011), polisacáridos (Kozarski, Klaus et al. 2011) y proteínas / péptidos (Sa-Ard, Sarnthima et al. 2015, Zhong, Wang et al. 2015), entre otros.

Debido a que la naturaleza química de estos antioxidantes es muy diversa, estos llegan a diferentes órganos y tejidos del cuerpo donde actúan contra radicales libres o procesos oxidativos que pueden provocar daños y/o enfermedad. Así encontramos peptidoglicanos antioxidantes que se consideran preventivos de aterosclerosis (Sargowo et al., 2018) y protegen también el riñón de daños por isquemia (Zhong et al., 2015). Proteoglicanos que reducen el estrés oxidativo en las células  $\beta$  de los islotes del páncreas (Pan et al., 2022). Polisacáridos que reducen la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones (Chen et al., 2016) y la esteatosis hepática inducida por ácido palmítico (Yuan et al., 2020). Triterpenos antioxidantes con efectos neuroprotectores (Wang et al., 2019) y que reducen el daño en membranas celulares provocados por radiación (Smina et al., 2015).

El efecto protector, debido a las moléculas antioxidantes de la seta también se ha estudiado para órganos como el corazón (Lasukova et al., 2015), los testículos (Ghajari et al., 2021), la piel (Lee et al., 2020; Ren et al., 2018), el bazo (Teng et al., 2019), y orgánulos como las mitocondrias (Ajith et al., 2009) o el ADN de linfocitos humanos (Pillai et al., 2014).



Por ello, resulta de gran interés realizar una evaluación de la capacidad antioxidante de los dos *Ganoderma* más empleados (*G. lucidum* y *G. lingzhi*) así como de cada una de sus partes (pie, tubos y sombrero) por separado pues no siempre se emplea la misma especie botánica ni la misma parte de la seta.

#### **2.4.4 Propiedades antitumorales**

El sistema inmunológico tiene la capacidad de prevenir la aparición de tumores. Esto es lo que se conoce como como vigilancia inmunológica (Kaplan et al., 1998). Debido a que el reishi es capaz de activar el sistema inmune (punto 2.4.1) se podría considerar que el reishi actúa vigilando la aparición de tumores. No obstante, diversas investigaciones indican que sus propiedades antitumorales van más allá de la potenciación inmunológica.

En cuanto a la investigaciones protectoras de tumoración, el reishi protege de daños en el ADN provocados por radiación ultravioleta (Kim & Kim, 1999) y radiación gamma (Smina et al., 2016; Zhao et al., 2012). Los extractos de la seta reducen la probabilidad de desarrollar cáncer de piel y mama provocados por 7,12-dimethyl benzoantraceno en ratas (Lakshmi et al., 2009) y de adenoma pulmonar en ratones, mediante inyección de benzopireno (Yun et al., 1995). Por ello, el reishi podría considerarse como quimiopreventivo de algunos tumores.

Otra posible vía de actuación del reishi es a través de la activación del gen antitumoral p53. La mutación de este gen, con su consecuente inactivación, es la más frecuente en cánceres humanos. (Kuusk et al., 2020). Se ha visto que polisacáridos del reishi son capaces de restablecer la transcripción del gen en cáncer de colon (Jiang et al., 2017; Jiang et al., 2011), un ácido ganodérico se ha visto que incrementa la expresión de dicho gen en células de tumores de hígado (Cao et al., 2021) y la proteína LZ-8 de la seta incrementa la expresión de dicho gen en cáncer de pulmón (Wu et al., 2011).

La actividad del reishi contra procesos metastáticos también se ha evaluado. El reishi posee virtudes antiangiogénicas en cáncer de próstata, es decir, que reduce el crecimiento de los vasos sanguíneos que alimentan al tumor y por ello puede reducir la probabilidad de metástasis (Stanley et al., 2005). Recientemente un peptidoglicano



de la seta se probado como reductor de metástasis en ratones con melanoma sometidos a fragmentación del sueño (Xian et al., 2021) y también se considera reductor de metástasis en cáncer de pulmón (Lin & Hsu, 2016).

Durante los tratamientos de cáncer, determinados tumores son capaces de crear resistencia a los quimioterápicos e impedir que estos afecten al cáncer como hacían en un inicio por bloqueo de la entrada de los fármacos a su interior. Sustancias de la seta permiten que determinados agentes quimioterápicos vuelvan a funcionar en cánceres que previamente habían creado resistencia. Así se ha estudiado para el cisplatino en cáncer de ovario (Qu et al., 2011) y en carcinoma urotelial (Huang et al., 2010), donde además el reishi reduce los daños originados al riñón por este agente quimioterápico (Kim et al., 2004). También se ha visto maximizar la actividad de la doxorubicina en células leucémicas resistentes (Li et al., 2008) y en cáncer de pulmón para la doxorubicina y para el etopósido (Sadava et al., 2009).

El reishi también incluye moléculas con actividad citotóxica directa para determinados tumores. Así recientemente se ha encontrado un proteoglicano prometedor contra el cáncer de páncreas (Wu et al., 2021) y existen pruebas de eficacia *in vivo* de citotoxicidad por inducción de apoptosis para cáncer de colon (Hong et al., 2004; X. Liu et al., 2020), próstata (Jiang et al., 2004), pulmón (Amen et al., 2016; L. X. Sun et al., 2014), cervix (Liu et al., 2012). En el hígado el reishi provoca la apoptosis de las células de hepatoma sin alterar las células sanas e inhibe también el crecimiento de los tumores (Lin et al., 2003; Lu et al., 2012; Chia Jui Weng et al., 2009). Debido a su gran actividad sobre este órgano, se tratarán los efectos del reishi en un título separado el 2.4.5.

La compatibilidad del reishi en quimioterapia hay que estudiarla principalmente analizando 3 factores: a) si modifica los tiempos de metabolización de los quimioterápicos. b) si puede influir negativamente en el riñón o el hígado y c) si la capacidad antioxidante de la seta puede bloquear la actividad oxidante de algunos quimioterápicos.

Wang et al. (2007) estudiaron la influencia de extractos de reishi en el citocromo P450, encargado de metabolizar la quimioterapia y muchos otros xenobióticos del organismo. Sus resultados mostraron que solo dosis muy elevadas del extracto





(equivalentes a 1400 g de seta reishi/día para un adulto de 60kg) de *Ganoderma lucidum* induce una ligera afectación del citocromo. Por ello se puede considerar que cantidades normales de reishi 6 g/día (Collado Mateo et al., 2015) no influye en las enzimas citocromo P450.

Al respecto de daños en los órganos que procesan (hígado) y excretan (riñón) los productos de la quimioterapia, el reishi se puede considerar uno de los mayores hepatoprotectores fúngicos que existen, tal como se trata en el punto 2.4.5. También protege de daños en el riñón por el quimioterápico cisplatino (Kim et al., 2004), como se ha comentado anteriormente, y una revisión reciente parece validar su eficacia para una gran variedad de tipos de lesiones renales tanto agudas como crónicas: lesión renal aguda (AKI) y enfermedad crónica renal (CKD), enfermedad renal poliquística autosómica, nefropatía diabética, lesión renal originada por isquemia, nefropatía renal inducida por la adriamicina, enfermedades renales proteinúricas crónicas, etc. (Geng et al., 2020), concluyendo que es una alternativa natural para tratar la enfermedad renal.

Por último, para concluir este apartado, a pesar de que el reishi tiene un elevado poder antioxidante tal como se muestran en las analíticas de esta tesis, no tiene una capacidad antioxidante tan elevada como para llegar a inhibir quimioterapias de tipo oxidante.

#### **2.4.5 Protección hepática y cáncer hepático**

Debido a la gran actividad del reishi sobre este órgano se ha separado la información en un punto aparte. Se ha evaluado el efecto protector del reishi frente a sustancias hepatotóxicas como formaldehído (Oluwafemi Adetuyi et al., 2020), benzopireno (Lakshmi et al., 2006), etanol (Shieh et al., 2001; Zhao et al., 2019), tetracloruro de carbono (Lee et al., 1996; Liu, Zhang, et al., 2017; Sudheesh et al., 2012), galactosamina (Shi et al., 2008) o  $\alpha$ -amanitina (Wu et al., 2016). En todos los casos los investigadores concluyen que reduce los efectos hepatotóxicos de estas sustancias en los animales.

La protección hepática también se ha encontrado en modelos de *Síndrome de Disfunción Orgánica Múltiple* (MODS) (Zhang, Feng, et al., 2021) y en las



inflamaciones hepáticas previas a una enfermedad neurodegenerativa (Zhang, Li, et al., 2021).

La hepatoprotección también se ha evaluado con agentes infecciosos de hígado como *Bacillus Calmette-Guerin* (Wang et al., 2007) en ratas, *Mycobacterium bovis* (G. L. Zhang et al., 2002) en ratones, *Propionibacterium acnes* (Han et al., 2006) en ratones, el virus de la hepatitis B: (Li et al., 2006) en ratones y en daños al hígado ocasionados por obstrucción del canal biliar (Park et al., 1997) en ratas, donde se considera un agente antifibrótico prometedor.

Entre los estudios clínicos, destaca el ensayo aleatorizado, doble ciego, controlado frente a placebo y cruzado en el que intervinieron 42 voluntarios sanos a los que se administró una dosis diaria de 225 mg de un extracto de *Ganoderma lucidum* normalizado en cuanto a su contenido en triterpenoides y peptidoglicanos (7% de ácidos ganodéricos A, B, C, C5, C6, D, E y G y un 6% de peptidoglicanos) durante un periodo de 24 semanas con un periodo de lavado de un mes antes de cruzar los tratamientos. Los resultados mostraron mediante ecografías que el consumo de *Ganoderma lucidum* invirtió la condición de hígado graso leve a condición normal todas las personas del estudio afectadas por esta enfermedad. También redujeron las enzimas marcadoras hepáticas como las transaminasas glutamato oxalacetato (GOT) y glutamato piruvato (GPT) (Chiu et al., 2017). Trabajos posteriores indican que un proteoglicano es el que parece presentar la mayor actividad hepatoprotectora, inhibiendo la esteatosis hepática por diferentes mecanismos antioxidantes (Yuan et al., 2020).

En cuanto a la actividad de las setas de *Ganoderma lucidum* en diferentes tumores de cáncer de hígado, si bien no existen estudios clínicos que estudien directamente el consumo del reishi y su actividad antitumoral existe una extensa bibliografía que evalúa los efectos *in vitro* e *in vivo*.

El ácido lucidénico contenido en el reishi podría servir como agente quimiopreventivo para la tumorigénesis y metástasis de células de hepatoma altamente invasivas (HepG2). (C. J. Weng et al., 2009). Al parecer Inactiva la ruta de transducción de señales MAPK / ERK y reduce las actividades de unión de NF-κB y AP-1. (Weng et al., 2008). Diversos triterpenos del reishi presentan fuerte actividad





contra el crecimiento de adenocarcinoma hepático humano (SK-Hep1), y pudieran ser de interés para el tratamiento del hepatoma humano. (Zhu et al., 2020).

Moléculas de *Ganoderma lucidum* inhibieron eficazmente el crecimiento tumoral en ratones C57 BL/6 portadores del modelo murino de hepatocarcinoma (Hepa1-6) mediante la modulación de 4 genes diana: NR3C2, AR, ESR1 y PGR (Zhao & He, 2018). La fracción de triterpenos de reishi inhiben el crecimiento de las células de hepatoma (Huh-7) deteniendo el ciclo celular en la fase G2 por mediación de la proteína cinasa c, sin alterar a células hepáticas normales.

El consumo de reishi llega a modular la microbiota de ratones y de esta forma mejorar las citocinas generadas en el íleo (inmunoglobulina A (IgA), factor de necrosis tumoral (TNF-alfa), interleucina-2 (IL-2) e interleuquina-10 (IL-10)) por tanto podría mejorar la capacidad inmunoprotectora frente al carcinoma hepático H22. (Zhou et al., 2009)

Polisacáridos de la seta mejoran la eficacia de la terapia fototermal en carcinoma hepatocelular inducido en ratón, a través de un efecto inmunomodulador y a sus propiedades antiproliferativas, proapoptóticas y antiangiogénicas. (Xia et al., 2021)

#### **2.4.6 Reishi y efecto en la diabetes**

Debido a la capacidad para proteger el sistema vascular, especialmente a nivel de corazón y riñón, a su actividad de sobre los islotes del páncreas y a su capacidad para reducir la resistencia a la insulina, el reishi puede considerarse un buen coadyuvante en personas con diabetes.

Una reciente investigación *in vivo* en ratas indica que los péptidoglicanos del reishi podrían reparar daños del sistema vascular de personas diabéticas mediante un incremento en el número de células progenitoras endoteliales circulantes (Heriansyah & Nurwidyaningtyas, 2019). También estas moléculas parecen atenuar la reticulación del colágeno miocárdico en ratas diabéticas (Meng et al., 2011); proteger de daños aórticos en ratas (Chen et al., 2011); y la prevenir y/o retrasar la progresión de las complicaciones renales en ratones con diabetes inducida por estreptozotocina



(He et al., 2006). También se ha visto que pueden acelerar la cicatrización de heridas también en un modelo experimental de ratas diabéticas (Cheng et al., 2013).

Polisacáridos del reishi promueven la reducción de los niveles de glucosa en ratones con diabetes tipo 2 asociada a la disminución de los niveles de expresión de mRNA de varias enzimas clave implicadas en la gluconeogénesis y o la glucogenólisis. (Xiao et al., 2012). De forma indirecta, estas moléculas también pueden ser beneficiosas en la enfermedad diabética, al ser capaces de restaurar la microbiota de ratas diabéticas (Chen et al., 2019).

Por otro lado, un proteoglicano contenido en la seta reduce la glucemia de manera dosis-dependiente en ratones con diabetes tipo 2. Este compuesto actúa inhibiendo la expresión y actividad de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) que, mediante diferentes mecanismos, promueve la mejora de la sensibilidad a la insulina. (Wang et al., 2012; F. Yu et al., 2021).

Aunque existen pocos ensayos en humanos, en un estudio clínico en fase II, aleatorizado y controlado frente a placebo, en el que se utilizó un preparado registrado rico en polisacáridos, se confirmó que la administración a 71 pacientes con diabetes mellitus tipo 2 de dicho preparado o placebo, a una dosis de 1800 mg, tres veces al día, durante 12 semanas disminuía significativamente los valores de hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>), glucemia en ayunas y glucemia posprandial. Estos valores correlacionaron con la normalización de los valores de insulina detectados en los pacientes al final del tratamiento. Además de la eficacia antidiabética del preparado, se observó una muy buena tolerabilidad. (Y. Gao et al., 2004). Estos resultados han sido parcialmente confirmados en otro ensayo clínico aleatorizado, doble ciego y controlado frente a placebo. En este caso se administraron 3000 mg/día de un extracto de *G. lucidum* o placebo junto con la medicación antidiabética a 46 pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Los resultados mostraron un mejor control de la enfermedad en el grupo tratado con el extracto (Wang et al. (2008).

La enzima alfa-glucosidasa está localizada en el epitelio del intestino delgado y cataliza la escisión de disacáridos y oligosacáridos a glucosa. Los inhibidores de alfa-glucosidasa se utilizan actualmente como medicamento para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (como la acarbosa) ya que, al ralentizar la asimilación de



glucosa, disminuyen la hiperglucemia postprandial y la hemoglobina glicosilada. El reishi posee un triterpenoide denominado ganoderol B que ha demostrado ser un potente inhibidor de la alfa-glucosidasa (Fatmawati et al., 2011). Otros investigadores también han encontrado otros 5 triterpenoides de *Ganoderma lucidum* con este mismo efecto (Fatmawati et al., 2013; Zhao et al., 2015).

Como mecanismo de acción antidiabético, algunos autores proponen la reducción de la expresión del gen PEPCK hepático. La fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) es una enzima de la familia de las liasas que participa en la ruta metabólica de la gluconeogénesis. Al inhibir esta se reduce la generación de glucosa en el hígado, y por ello se reducen los niveles de glucosa en la sangre. (Seto et al., 2009).

Los extractos de *Ganoderma lucidum* estimulan además la captación de glucosa, tanto a través de la PI3-quinasa como de la AMPK en las células del músculo esquelético L6, contribuyendo así a la homeostasis de la glucosa. (Kyung et al., 2006).

También se ha demostrado que algunos polisacáridos de *Ganoderma lucidum* facilitan de la entrada de  $Ca^{2+}$  a las células  $\beta$  pancreáticas incrementando la liberación de insulina y provocando un efecto hipoglucémico en ratones normales (Shafiee-Nick et al., 2012; Zhang & Lin, 2004).

Dada el posible beneficio del consumo de reishi por parte de personas diabéticas, tanto por su parte protectora como de posible control/reducción de la glucosa en sangre, es importante indicar que una persona medicada para la diabetes debe ser cauta al introducir el reishi en su dieta (Vanaclocha B., 2019) pues pudiera desestabilizarse la glucosa en sangre. La pauta correcta de consumo sería introducirlo muy poco a poco en la dieta, para que no exista este problema.

#### **2.4.7 Seguridad del consumo del reishi**

Se han realizado evaluaciones de toxicidad a largo plazo con ratas en tres grupos experimentales. Se les administró *Ganoderma lucidum* en dosis de 0,47, 0,94 y 1,87 g/kg x día<sup>-1</sup> durante 26 semanas y no se encontró anormalidad inducida por el tratamiento para ningún grupo. Las figuras patológicas de los órganos principales



también fueron normales. El estudio concluye que no hay toxicidad para setas de *Ganoderma lucidum* administradas a ratas a largo plazo. (Jian-bo & Jing, 2008).

Un estudio clínico en pacientes con fibromialgia (n=64) mostró que la administración de reishi puro micromolido (criomicropulverizado) a una dosis de 6g/día durante 6 semanas no inducía efectos adversos diferentes a los hallados en el grupo placebo (Collado Mateo et al., 2015). Otros estudios clínicos confirman esa buena tolerabilidad en pacientes con diabetes (Wang et al., 2008), futbolistas (Zhang et al., 2008a), ciclistas (Rossi et al., 2014), pacientes con cáncer colorectal (Gao et al., 2005) y en personas afectadas por el virus de papiloma humano (Donatini, 2014), entre otros.

Si bien el consumo del reishi se considera muy seguro, al poseer efectos inmunomoduladores, se desaconseja en terapias inmunosupresoras. En enfermedades autoinmunes no medicadas, debido a que no incrementa el factor de necrosis tumoral ni otras citocinas proinflamatorias (Mallard et al., 2019) podría ser consumido pero introduciéndolo con cautela. En este sentido se ha recomendado su consumo en el síndrome de Crohn (Liu, Dunkin, et al., 2015).

Varias investigaciones citan *Ganoderma lucidum* como potente anticoagulante por lo que podría estar contraindicado antes de una cirugía o en combinación con antiagregantes plaquetarios o fármacos anticoagulantes. Esto está demostrado para el micelio del *Ganoderma lucidum*, pero no para la seta, donde se ha demostrado clínicamente que cantidades de 1,5g al día no afectan a la coagulación después de 4 semanas de consumo (Kwok et al., 2005). Por el contrario, 3g/día de micelio consumidos durante dos semanas sí tienen un fuerte efecto antiagregante plaquetario (Tao & Feng, 1990). Se cree que ello es debido a dos moléculas ausentes en la seta: una proteasa fibrinolítica (Kumaran et al., 2011) y un ácido ganodérmico (Wang et al., 1991). El consumo de seta pura se evaluó por Collado Mateo et al. (2015) en una cohorte de 64 personas con fibromialgia. Consumieron cantidades de 6 g/día de seta reishi durante 6 semanas y no se documentaron problemas relacionados con la coagulación.



## 2.5 Cultivo de setas. El cultivo de *Ganoderma lucidum*

Para iniciar un cultivo de setas lo primero que hay que disponer es del hongo vivo que queremos cultivar, el llamado hongo “padre”. Este se puede aislar del campo o adquirirlo ya aislado a un laboratorio o empresa. Una vez obtenido hay que multiplicarlo, normalmente en placa, sobre un material de fácil manejo y que sea alimento de la especie seleccionada: trocitos de madera, grano de cereal, serrín, gusanos, etc. En el caso del reishi se suele multiplicar o bien sobre grano de cereales integrales, ideal para mezclar con sustratos preparados en bolsa, o en trozos cilíndricos de madera, o espigas, que permiten su introducción con un martillo en agujeros realizados sobre troncos de madera.

Este material ya colonizado por el hongo es lo que se denomina en el argot de cultivo “blanco de hongo” (Figura 13 y Figura 20)



**Figura 13. Blanco de hongo de *Ganoderma lucidum*.**

Grano de centeno inoculado con *Ganoderma lucidum*. Imagen facilitada por Francgia Contreras Nieto, gerente de [www.aporsetas.com](http://www.aporsetas.com).

Una vez tenemos el blanco de hongo, hay siete etapas básicas del cultivo de hongos saprofitos: 1) preparación del sustrato; 2) relleno de contenedores e inoculación del hongo; 3) colonización; 4) tiempo de espera; 5) formación de primordios; 6) maduración y cosecha; y 7) descanso. (Cotter, 2014).



**La preparación del sustrato:** consiste en preparar el alimento del hongo. Básicamente es fijarse en lo que el hongo consume en la naturaleza y llevarlo al laboratorio, sin embargo, cada cultivador tiene su receta y muchas veces se mantienen en secreto. Para el reishi se han probado decenas de sustratos: maderas y serrines de chopo, aliso, haya, roble, eucalipto... restos de cultivos de arroz, girasol, trigo, centeno, té... (Ozcariz-Fermoselle et al., 2018). El alimento que recibe el hongo de su sustrato condiciona la composición de la seta, sobre todo los minerales, ya que si no están en el sustrato elaborado tampoco podrán estar en la seta crecida. En el caso de reishi, por ejemplo, se han elaborado sustratos enriquecidos con selenio que incrementan la cantidad de flavonoides y antioxidantes de la seta (Gasecka et al., 2016).

**Relleno de contenedores:** El sustrato elaborado hay que introducirlo en contenedores. Esta es una fase importante porque contenedores con material muy prieto impedirán el crecimiento del hongo, mientras que, si este sustrato está muy poco compacto, dificultará mucho el crecimiento del hongo y se reducirá su producción, pues empleará mucha de su energía en trazar “puentes” entre las partículas de material. Actualmente existen filtros que se añaden a los contenedores, sean bolsas o botes, y permiten que el hongo respire a través del mismo y se incremente la ratio de crecimiento.

**Colonización:** una vez que el blanco de hongo se pone en contacto con el sustrato del contenedor, este empieza a colonizar el material. Es una fase donde el hongo busca crecer rápidamente tratando de invadir el máximo sustrato posible. En la naturaleza lucharía con otros hongos, bacterias e insectos, que consumen el mismo alimento y, por ello, el rápido crecimiento es en lo que el hongo utiliza sus recursos.

**Tiempo de espera:** cuando el hongo ya ha colonizado todo el sustrato, existe un periodo de espera donde lo que éste hace es introducir en su micelio los nutrientes del sustrato que ha colonizado. El hongo se carga al máximo de nutrientes para luego pasar a la siguiente fase (Cotter, 2014). En esta etapa el micelio tiene grandes niveles de azúcares y polioles, ácidos orgánicos, ácidos grasos y alcoholes grasos (Satria et al., 2019).



**Formación de primordios:** una vez que el micelio se ha cargado de nutrientes utiliza los mismos para fructificar: comienza así la producción de primordios, lo que serán las futuras setas. El micelio se aglutina en una zona determinada, donde detecta más luz y menos CO<sub>2</sub>. Estos factores le indican al hongo que ahí está el exterior y es ahí donde sus setas deben liberar las esporas. También a veces es necesario realizar una estimulación térmica; una bajada de temperatura que le indique al hongo que llegan los tiempos difíciles y debe fructificar. En la zona elegida por el micelio empieza a formar diferentes estructuras, dependiendo del tipo de setas, que irán evolucionando hasta transformarse en una seta.

**Maduración y cosecha:** manteniendo unas condiciones de alta humedad, oxigenación y luz, el hongo va a seguir trasladando sus nutrientes a la seta. Esta irá creciendo hasta desarrollarse completamente y empezar a producir esporas. Se suele recolectar justo antes de que madure, para incrementar la vida útil de la seta en el mercado (Cotter, 2014). A veces se fuerzan las condiciones de crecimiento para desarrollar formas no naturales del hongo, que pueden venderse como un producto diferente. Es lo que sucede con el reishi y su forma en que sólo son pies, denominada rokkaku reishi (Figura 14)



**Figura 14. Rokkaku reishi y reishi normal.**

A la izquierda setas de *Ganoderma lucidum* crecidas con alto contenido en CO<sub>2</sub> y baja intensidad de luz, el denominado en japonés como *rokkaku reishi* (*antled form*, en inglés). A la derecha, reishi crecido en condiciones adecuadas de CO<sub>2</sub> e iluminación. Fotos extraídas de [mundoreishi.com](http://mundoreishi.com) con permiso del propietario.

**Tiempo de descanso:** Después de la primera cosecha de setas, el hongo vuelve a centrarse en consumir los nutrientes del sustrato que quedaron en el contenedor. Cuando ha vuelto a almacenar suficientes nutrientes en su micelio, vuelve





a producir otros primordios que darán lugar a nuevas setas. Éstas se volverán a recolectar y puede volver a repetirse el proceso (espera, primordios, cosecha) hasta que el hongo acabe con los recursos del sustrato.

Las condiciones de temperatura, luz, humedad y CO<sub>2</sub> de las diferentes fases en el cultivo de un hongo depende de las características biológicas de cada especie. Así hay hongos que fructifican sólo cuando bajan las temperaturas, como *Flammulina velutipes*, otros lo pueden hacer durante el calor del verano, como *Agrocybe aegerita*, otros pueden crecer en total oscuridad, como algunas especies de *Agaricus*. En cuanto al proceso del cultivo de reishi y las principales condiciones ambientales para su cultivo se resumen en la Tabla 1 (Staments, 2000).

El primer cultivo exitoso de *Ganoderma lucidum* se realizó en Beijing en 1969, en el Instituto de Microbiología de la Academia China de Ciencias. (Bijalwan et al., 2021). Dos años después se realizó el cultivo industrial en la India en 1971 (Gupta et al., 2014). Actualmente se cultiva en más de 15 países (Rogers, 2011).

**Tabla 1. Condiciones generales de cultivo para *Ganoderma lucidum*.**

	Colonización	Primordios	Maduración
Temperatura (° C)	24	10-15	15-21
Humedad relativa (%)	90-95	95-100	90-95
CO <sub>2</sub> (ppm)	5,000-20,000	500-1,000	< 2,000
Luz (lx)	Sin luz	500-1,000	500-1,000

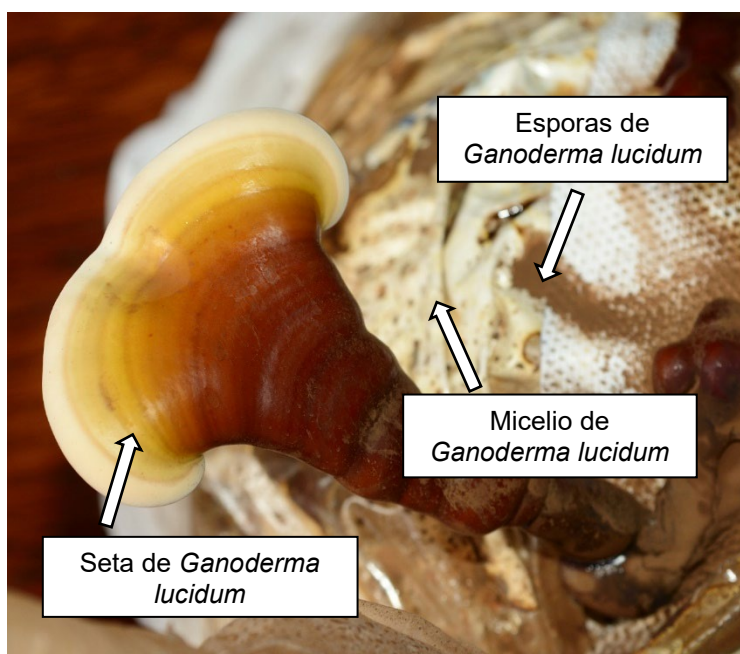
El gran valor económico que *Ganoderma lucidum* tiene a nivel mundial, calculado ya en 2004 en 2,5 billones de dólares americanos (Boon & Wong, 2004), fomenta a que cada año surjan nuevos cultivos de *Ganoderma*. Sin embargo, su comercialización puede complicarse debido a que el género *Ganoderma* incluye 458 taxones diferentes en todo el planeta (Robert et al., 2005), a su gran diversidad y la dificultad que entraña la correcta identificación de los taxones. Actualmente existen en el mundo producciones de reishi que no proceden del hongo *Ganoderma lucidum*, si no de especies muy próximas, en ocasiones mal identificadas.





El caos es tal que, analizando sólo las producciones de China (Liu et al., 2021) encontramos que algunas setas cultivadas y vendidas proceden de hongos que si bien pertenecen al género *Ganoderma*, aún son desconocidas para la ciencia (no tienen un nombre científico asociado), y se están vendiendo como reishi. En el artículo este autor las registra como 16JL01-OI y 16SHD01-01.

La confusión en el cultivo de taxones podrían explicar por qué, por ejemplo, existen dos publicaciones que indican hepatotoxicidad al reishi en polvo (Wanmuang et al., 2007; Yuen et al., 2004), lo cual es una contradicción, ya que esta seta es un evidente hepatoprotector con decenas de publicaciones que lo avalan (tratado en el punto 2.4.5).



**Figura 15. *Ganoderma lucidum* fructificando en un sustrato de madera de frondosas.**

Diferentes partes de hongo *Ganoderma lucidum*. Debido a que el reishi se alimenta de madera muerta es sencillo su cultivo sobre serrín de frondosas. Fotografía del autor.

Sin embargo, lo más frecuente es encontrar como seta reishi especies de diferentes países que sí tienen una amplia historia de consumo y que por ello se consideran seguras. Así encontramos *Ganoderma sinense* (Liao et al., 2015; Meng et al., 2014) y *Ganoderma lingzhi* (Fraile-Fabero et al., 2021; Liu et al., 2021) como frecuentes en China de amplio cultivo y comercio mundial, *Ganoderma oregonense* y



*Ganoderma sessile* cultivadas y vendidas en EEUU (Viceconte et al., 2021), *Ganoderma multipileum*, cultivada en Filipinas, India y la China tropical (Yun Cao et al., 2012), entre otras. Sin embargo, el caos taxonómico del reishi, con sus posibles implicaciones en la salud, sigue vigente a día de hoy (Ahmad et al., 2021).

Por todo esto es muy necesario investigar para caracterizar bien las principales especies de uso medicinal vendidas en el mundo a todos los niveles, nutricional, contenido en antioxidantes, perfil proteico, contenido en  $\beta$ -glucanos, etc. lo cual permitirá garantizar un consumo adecuado y seguro de cada taxón cultivado.



**Figura 16. Pasta de dientes con reishi, vendida por la empresa LG.**

El reishi es tan apreciado en algunos países de oriente que se encuentra incluso en la pasta de dientes. Foto realizada en Corea del Sur por Luis Miguel Morejón, y cedida para esta tesis.

## 2.6 Radicales libres

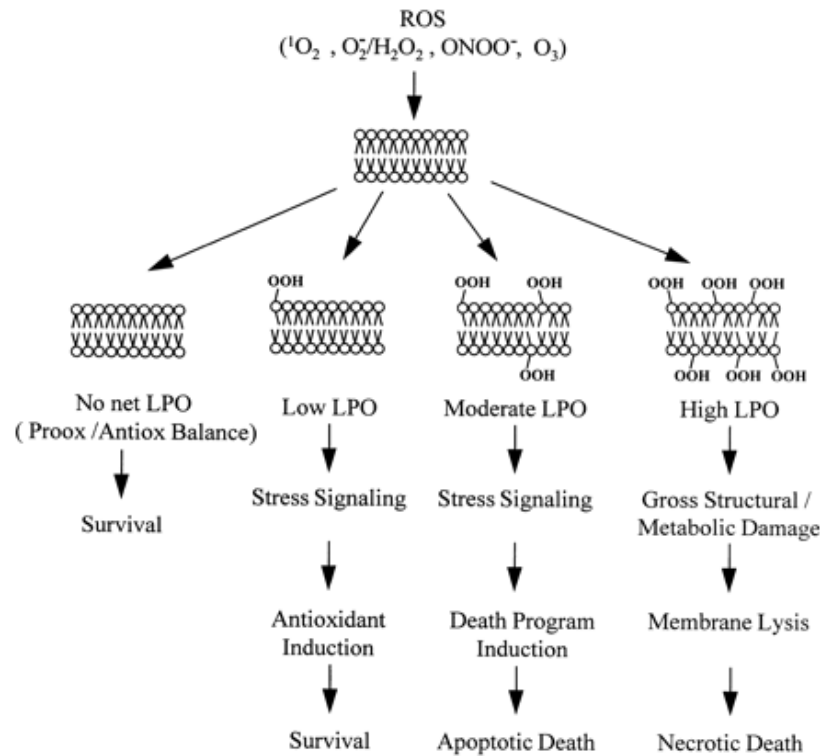
En la respiración celular se forman radicales libres, unos compuestos muy inestables que tienden a estabilizarse mediante la combinación con componentes celulares, en particular en el proceso de fosforilación oxidativa originado en las mitocondrias (Gauthier et al., 2013). Los radicales libres más frecuentes son los derivados del oxígeno (ROS), aunque existen también radicales libres de otros átomos, en particular del azufre, nitrógeno y cloro.

Dentro de los radicales libres del oxígeno, los más importantes son el oxígeno singlete ( $^1S$ ), el radical superóxido ( $H_2O_2$ ), el radical nitrosilo ( $ONOO^-$ ) y el ozono ( $O_3$ ). En general, los efectos nocivos de los radicales libres en las células se deben a 4 procesos: oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (peroxidación), daños al ADN, oxidación de aminoácidos en las proteínas y oxidación de glúcidos. La peroxidación lipídica genera sustancias nocivas, como aldehídos, que causan alteraciones en el ADN y reaccionan también con proteínas provocando daños estructurales y funcionales así como disfunción de las membranas celulares (Halliwell & Cross, 1991),



pudiendo disminuir su fluidez (Shigenaga et al., 1994), que es fundamental para el correcto desarrollo de muchas reacciones metabólicas.

La reacción de los radicales libres del oxígeno con los lípidos de las membranas biológicas es especialmente importante debido a que el daño que provocan puede llevar incluso a la destrucción celular (Figura 17)



**Figura 17. Peroxidación lipídica y daños en la membrana**

Efecto de los radicales libres del oxígeno (ROS) sobre las cadenas alifáticas de los fosfolípidos de membrana. LPO: lipoperoxidación. Fuente: documento de prácticas de análisis (método CUPRAC), facilitado por José Ezequiel Basterrechea Elizgaray del Área de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid.

Cuando los radicales libres reaccionan directamente con las moléculas que conforman el ADN (azúcares, bases nitrogenadas y grupos fosfatos) provocan daños estructurales y originan productos de degradación del ADN, que a su vez forman nuevas reacciones y productos tóxicos ocasionando, a largo plazo, daños en células y tejidos. La reacción de los radicales libres con proteínas puede ocasionar su desnaturalización y, por ello, la pérdida de alguna de sus funciones. Sobre todo, son



susceptibles las proteínas con aminoácidos compuestos por azufre (metionina y cisteína) (Adly, 2010)

El daño oxidativo producido sobre los glúcidos reviste particular importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que pueden dar lugar a procesos degenerativos (Marín et al., 2010).

Los radicales libres están implicados en procesos de envejecimiento celular, mutagénesis, carcinogénesis, enfermedades cardiovasculares y envejecimiento (Alam et al., 2013).

Para contrarrestar estos ROS, el organismo dispone de 3 mecanismos principales (Gallardo et al., 2014): el primero, sistemas enzimáticos que previenen la formación de radicales libres, incluye la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), carotenoides, transferrina, albúmina, glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa. El segundo, que se encarga de secuestrar radicales libres y eliminarlos, está conformado por el ácido úrico, bilirrubina, vitaminas A, C y E. El tercer grupo, que repara el daño ocasionado por los radicales libres en el entorno de la membrana celular, lo conforman enzimas de reparación del ADN, lipasas, proteasas y transferasas.

La pérdida de equilibrio entre la producción de radicales libres y la presencia de antioxidantes endógenos puede conducir a un fenómeno de salud grave llamado “estrés oxidativo” (Hameed et al., 2017).

Con la dieta se pueden incorporar antioxidantes al organismo y el aumento de los mismos puede repercutir positivamente en la salud (Moniruzzaman et al., 2012). Esto se debe a que pueden inhibir la iniciación y/o la propagación de la reacción de cadena oxidativa, actuando como captadores de radicales libres, volver a estado no excitado el oxígeno singlete o como agentes reductores. (Xu et al., 2017)

Los alimentos como frutas, verduras, té, hierbas y especias, entre otros, se consideran fuentes tradicionales ricas en antioxidantes y su potencial antioxidante es objeto de una intensa investigación (Apak et al., 2013; Carlsen et al., 2010; Serafini & Peluso, 2016; Tejero et al., 2014).



La ingesta de hongos ricos en antioxidantes puede ser una alternativa para incorporar potentes antioxidantes a la dieta, ya que los hongos tienen la capacidad de aumentar la capacidad oxido-reductiva sistémica (Rossi et al., 2014).

Las propiedades antioxidantes de los hongos silvestres han sido ampliamente investigados por Ferreira *et al.* (2009). Se han identificado muchos compuestos antioxidantes, como compuestos fenólicos, tocoferoles, ácido ascórbico y carotenoides. Kozarski et al. (2014) han sugerido que se podrían usar hongos comestibles silvestres o cultivados como productos alimenticios saludables en la dieta. Estos podrían ser de interés para el control de los radicales libres.





### 3 JUSTIFICACIÓN

*Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi* son dos especies de hongos que producen unas setas muy similares y denominadas comercialmente “reishi”, con un alto interés medicinal y comercial.

Hasta 2012 se han cultivado, vendido e investigado en todo el mundo como si fueran una sola especie. A partir de esa fecha se confirmó que eran organismos distintos, tanto genéticamente como morfológicamente, con pequeñas diferencias macro y microscópicas.

Debido a esto, actualmente existe una gran confusión sobre qué propiedades presenta cada uno de los taxones, por lo que es fundamental revisar de nuevo las propiedades de una y de otra debido a su alta importancia económica y medicinal, ya que está presente en las farmacopeas de China, EE.UU. o Corea, entre otras.

Existen muy pocos trabajos que evalúen las diferencias entre ambas especies y esta tesis pretende aportar luz en este aspecto. Además, ya que numerosas propiedades de estos hongos se deben a sus compuestos antioxidantes y a complejos de proteína-glucano (punto 2.4), esta tesis se ha enfocado a caracterizar tanto sus propiedades antioxidantes como su perfil proteico.

La caracterización proteica de *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi* también servirá como una herramienta eficaz para diferenciar ambos taxones, pues la identificación genética en muchos no es posible pues el ADN se destruye durante los procesos de elaboración del producto (Wu et al., 2017). La electroforesis proteica, permitirá que investigadores y empresas puedan discernir con qué producto están trabajando.

Hay muy poca información que compare la composición de las distintas partes de una seta reishi: pies (estípites), sombrero (píleo) y poros (himenio), otro de los puntos de la tesis. Sin embargo, conocer estas diferencias puede tener un alto valor industrial ya que modificando las condiciones de luz y aireación en una planta de cultivo de la seta el reishi pueden formarse desarrollando sólo pies (“antled form” = reishi en forma de cuernos) o casi todo sombrero, como se muestra en Figura 14. Encontrar diferencias en cuanto a su contenido en compuestos antioxidantes y



polifenoles y/o nutricionales entre estas partes permitirá que las empresas puedan adaptar su cultivo en aras de producir reishi de mayor interés medicinal. Ya hay investigaciones que avalan esto. Por ejemplo el ácido ganodérico A, de acción antitumoral, tiene una concentración 14 veces superior en los pies que en los sombreros de *Ganoderma lingzhi* (Sakamoto et al., 2016).

Por último, indicar que la mayoría de las setas contienen en su composición un porcentaje importante de proteínas no digeribles por el estómago humano. En el caso del reishi (*Ganoderma lucidum*) se ha encontrado la proteína *Ling Zhi-8* de gran interés médico e industrial (Kuan et al., 2012; H. Liu et al., 2020; Yang et al., 2020; Yeh et al., 2010), pero se desconoce de su existencia en *Ganoderma lingzhi*. Realizar la digestión externa de ambos taxones ayudará a verificar su existencia en ambos taxones y también permitirá identificar otras fracciones proteicas no digeribles con posibles aplicaciones beneficiosas sobre el organismo.



## 4 OBJETIVOS

Cultivar 3 cepas ibéricas del hongo medicinal *Ganoderma lucidum*.

Caracterizar genéticamente las especies de *Ganoderma lucidum* cultivadas y carpóforos de *Ganoderma lingzhi* comerciales.

Evaluar el contenido en fenoles, antioxidantes y antirradicalarios en las setas cultivadas y compararlos entre sí y con carpóforos de *Ganoderma lingzhi* comerciales.

Comparar el contenido en antioxidantes, fenoles y antirradicalarios entre las diferentes partes de *Ganoderma lucidum* cultivado: sombrero, tubos y pies

Comparar nutricionalmente las setas de *Ganoderma lucidum* obtenidas con *Ganoderma lingzhi* comercial.

Comparar la composición nutricional entre pies y sombreros de *Ganoderma lucidum* cultivado.

Caracterizar y comparar, mediante electroforesis, la diversidad proteica de *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi*.

Realizar una digestión externa con fluido gástrico simulado SGF (Simulated Gastric Fluid) de *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi* y comparar sus perfiles proteicos, con y sin digerir.



## 5 METODOLOGÍA

### 5.1 Cultivo de *Ganoderma lucidum*

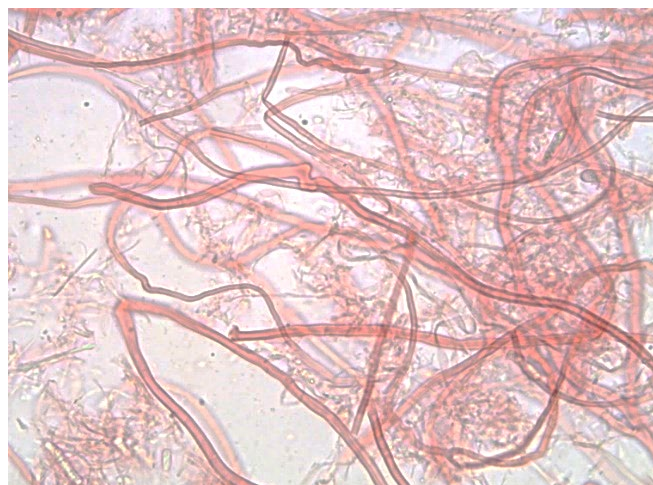
#### 5.1.1 Obtención de cepas y replicación

Las placas con los micelios de *Ganoderma lucidum* ibéricos se obtuvieron de la micoteca de la Cátedra de Micología de la Universidad de Valladolid procedentes de la tesis doctoral de María Virginia Ozcariz Fermoselle (Ozcariz Fermoselle, 2016). *Se trabajó con tres cepas ibéricas:*

1- Madrid: fue aislada de Robledo de Chavela (Madrid, España). El hongo estaba creciendo sobre raíces de encina (*Quercus ilex* subs. *ballota*). Cepa cedida por la Cátedra de Micología de la Universidad de Valladolid (Palencia, España).

2- Palencia: fue aislada de Valdespina, (Palencia, España). Estaba creciendo sobre madera de quejigo (*Quercus faginea*). Cepa cedida por la Cátedra de Micología de la Universidad de Valladolid (Palencia, España).

3- Aveiro: procedente del Distrito de Aveiro (Portugal) adquirida a la empresa Fungi Perfect (Mealhada, Distrito de Aveiro, Portugal). No indicaron la madera sobre la que crecía el hongo ni el lugar de procedencia del aislamiento.



**Figura 18. Microfotografía de micelio de *Ganoderma lucidum* (GLM).**

Micelio de GLM en agua teñido con rojo de Congo. Imagen 400X sin calibrar, tomada con microscopio Leica DM500 (Cátedra de Micología de la Universidad de Valladolid).



Dado que no fue posible obtener una cepa viva de *Ganoderma lingzhi* para la realización de un cultivo en paralelo, los análisis del estudio se realizaron sobre carpóforos deshidratados y pulverizados procedentes de cultivos en Shenzhen, China, facilitados por la empresa Mundoreishi Salud S.L, de su muestrario privado.

La replicación de las distintas cepas de hongos se realizó sobre placas con PDA (patata dextrosa agar, Panreac) (Figura 19).



**Figura 19. Placa completamente colonizada por *Ganoderma lucidum*. Fotografía del autor.**

Una vez colonizada la placa se procedió a replicar el hongo sobre cereal para crear el blanco de hongo.

### **5.1.2 Producción de blanco de hongo**

“Blanco de hongo” es un micelio de un hongo, multiplicado sobre un sustrato manejable y nutritivo que permite trabajar cómodamente con él, tal y como se indica en el punto 2.5.

La preparación del blanco de hongo se realizó en frascos de vidrio de preparación de conservas (autoclavables) con un 59,1 % de grano de centeno integral ecológico, 40% de agua destilada, 0,1 % de CaCO<sub>3</sub> (Panreac) y 0,8 % de CaSO<sub>4</sub> (Panreac) sobre peso seco (Curvetto et al., 2002). El centeno ecológico permite una práctica ausencia de fungicidas y por ello facilita el crecimiento del hongo sobre el mismo.



El sustrato así elaborado se esterilizó en autoclave Selecta P, modelo Presoclave-II a 121°C durante 45 minutos. Luego se procedió a inocular los frascos con aproximadamente un 5% de micelio de las placas anteriormente obtenidas.

La incubación se llevó a cabo en oscuridad a 25°C. Cuando el micelio invadió todo el frasco de centeno se procedió a una segunda replicación del mismo, pero ya desde grano a otro grano estéril, elaborado siguiendo el mismo procedimiento, para obtener más cantidad de blanco de hongo.



**Figura 20. Micelio clonado sobre centeno integral biológico. Fotografía del autor.**

### **5.1.3 Preparación de sustrato y cultivo**

Para el estudio se elaboraron dos sustratos de cultivo (1 y 2) en tiempos y momentos diferentes.

El sustrato 1 se elaboró para comparar el contenido en antioxidantes y componentes fenólicos de las diferentes cepas. Su composición fue de un 80% chopo (*Populus sp.*) y 20% trigo (*Triticum aestivum*). Con el sustrato así elaborado se llenaron 12 frascos de cristal de 200 ml (3 réplicas por cepa). La elección de este sustrato fue considerando la posibilidad de que *Ganoderma lingzhi* utilizado para el estudio pudiera haberse cultivado en un sustrato de chopo, ya que las especies de *Populus* son ampliamente distribuidas por el planeta, son fáciles de cultivar y de





crecimiento y producción elevada. Esta composición ya se ha utilizado con éxito en otros estudios (E. I. Erkel, 2009).

El sustrato 2, se elaboró para producir carpóforos destinados para el análisis nutricional y el perfil de ácidos grasos. Su composición fue un 80% de astillas de roble melojo (*Quercus pyrenaica*) con un 20% de centeno (*Secale cereale*) introducido en bolsas de polipropileno de 4 L con filtro de respiración. Se llenaron 4 bolsas por cepa. Este sustrato se eligió en una segunda fase del estudio. En este segundo cultivo se seleccionó madera de roble debido a que en la Península Ibérica las especies del género *Quercus* son el alimento más frecuente para *Ganoderma lucidum*, y, por esto, se consideró que utilizando este sustrato los resultados analíticos se asemejarían mejor a un reishi silvestre.

Las maderas utilizadas para elaborar los sustratos de cultivo se hicieron astillas con el triturador de residuos vegetales Herkules 4000. Los cereales integrales de cultivos ecológicos procedieron de agricultores de Palencia. La elección de granos ecológicos se hizo en base a minimizar la posible existencia de fungicidas en la materia prima que pudiera alterar el crecimiento de los hongos.

Todos los sustratos se hidrataron mediante agua desmineralizada procedente de desmineralizador DAFA, modelo FE 300 DÚO hasta obtener una humedad entre 60% y 70%. Como corrector de acidez se adicionó a cada sustrato un 0,1% de CaCO<sub>3</sub> (Panreac) sobre peso seco (FanChiang et al., 2003) y finalmente se esterilizaron en autoclave SELECTA P, modelo PRESOCLAVE-II a 121°C por 45 minutos.

#### **5.1.4 Inoculación, recolección y deshidratación**

Una vez esterilizadas las bolsas y frascos de vidrio se inocularon con el blanco de hongo obtenido según se indica en el apartado 5.1.2., y se envolvieron en un plástico negro para impedir que la luz afectara al crecimiento del micelio, ya que la mayoría de los hongos saprófitos son lucífugos.



**Figura 21. Bolsa con sustrato invadido por *Ganoderma lucidum***

Izquierda: bolsa con filtro de respiración que permite crecer al hongo en su interior.

Derecha: Frascos de 200 mL con reishi en fase de fructificación.

La fructificación se realiza en cámara CLIMAS, modelo GROW/HR 1300 con una humedad controlada del 85% y un fotoperiodo de 10 horas de luz diarias (700-500 lux).

La recolección de los carpóforos se realizó cuando éstos dejaron de crecer. Este punto se reconoce porque la línea blanca de crecimiento del borde del sombrero de la seta desaparece quedándose todo el sombrero del mismo color. En ese momento se cosechan las setas y se desecan en estufa de secado marca MEMMERT modelo HPP, a 40° C con aire forzado.

Los carpóforos deshidratados se almacenaron en bolsas zip herméticas y dentro de cajas de cartón, para preservarlas de la luz y se almacenaron a 4°C.

## 5.2 Diagnóstico y verificación genética

Todas las muestras de hongos, se enviaron a analizar al laboratorio de diagnóstico genético ALVALAB situado en La Rochela 47, 39012, Santander, donde se solicitó amplificación y secuenciación de la región ITS 4 (*Internal Transcribed Space*) del ADN ribosómico ya que esta región es la comúnmente utilizada para las especies de Basidiomycota (Vancov & Keen, 2009), filo donde se encuentra *Ganoderma lucidum* (punto 2.2)

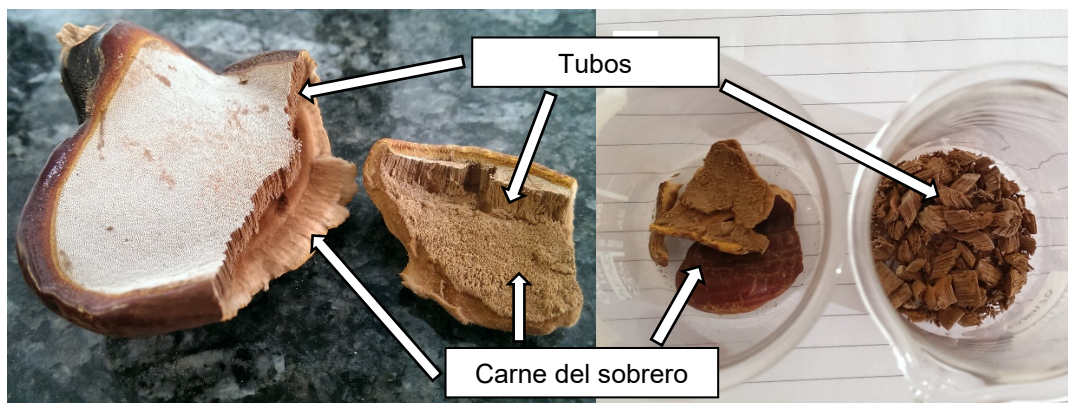


El laboratorio utilizó un protocolo modificado basado en el CTAB de Y. J. Zhang et al. (2010) que incluía los siguientes procedimientos: extracción del ADN total mediante dicho protocolo, amplificación de la región ITS 4 mediante *primers* específicos y secuenciación.

Los resultados en formato “ab1”, se interpretaron mediante el programa BioEdit Secuence Alignment Editor Versión 7.2.5. (Carspad, California, EEUU) y una vez revisadas las secuencias se llevaron a la aplicación BLAST del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) determinando la identidad específica de los hongos mediante comparación con secuencias de otros autores de referencia (Y Cao et al., 2012; Hennicke et al., 2016).

### 5.3 Procesado de las setas

Las setas de *Ganoderma lucidum* cosechadas según se describe en el punto 5.1 se procesaron de forma diferente dependiendo del sustrato donde crecen y del análisis al que van a ser sometidas.



**Figura 22. Separación de la carne del sombrero de los tubos (himenio). Fotografía del autor.**

Las setas cultivadas en bolsas de 4 L con madera de roble 80% y centeno 20% y destinadas a análisis nutricional y perfil de ácidos grasos, fueron enviadas tal cual cosechadas, separando pies y sombreros (300 gramos de cada), a Agrolab Ibérica, Tarragona, que realizó todo el procesado y análisis nutricional del producto. Las setas destinadas a determinar el perfil proteico y digestibilidad proteica fueron trituradas



tanto enteras como pies por un lado y sombreros por otro, para después preparar los extractos según se describe en el siguiente apartado.



**Figura 23. Setas y partes de setas trituradas listas para extraer. Réplica III. Fotografía del autor.**

Las cultivadas en los frascos de 200mL, sobre sustrato de chopo y trigo, fueron utilizadas para realizar el análisis de la composición fenólica y la valoración de sus propiedades antioxidantes. Se separaron manualmente las diferentes partes a estudiar, pie, carne del sombrero y tubos (Figura 22), se trocearon y se trituraron en molinillo triturador Moulinex. Luego se elaboraron los extractos según el procedimiento descrito en el punto 5.4.

## **5.4 Preparación de los extractos**

### **5.4.1 Selección del tipo de extracto**

El reishi es una seta de textura corchosa que no es sabrosa ni se puede preparar para consumo directo en la cocina, como se hace con otras setas comestibles. La tenacidad del carpóforo hace imposible su degustación y esto ha hecho que, de forma tradicional, se consuma como té. Así, la seta silvestre se recoleta, se lamina, se deshidrata y se guarda y, cuando se quiere utilizar, se realiza una





infusión o decocción de las láminas (Figura 24). Por todo esto, el extracto acuoso, en principio, parece ser el mejor método de extracción para realizar la experimentación.



**Figura 24. Láminas de seta reishi deshidratadas.**

Imagen de láminas de reishi: se deja ver la textura corchosa de la seta. Imagen cedida por Mundoreishi Salud S.L. de sus muestras de herbario.

Sin embargo, existen decenas de publicaciones que utilizan otros tipos de extractos: etanólico (Abate et al., 2020; Guo et al., 2018; Liu et al., 2010; Rajasekaran & Kalaimagal, 2011), clorofórmico (Joseph et al., 2009; Keypour et al., 2008), metanólico (Reis et al., 2015; Q. Zhang et al., 2010; Zohra et al., 2011), hidroalcohólico (Bidegain et al., 2020; Lai et al., 2019), entre otros.

Por ello, para estimar si la extracción acuosa es el método más adecuado para el estudio, se realizó una búsqueda bibliográfica que indicara si las principales propiedades y moléculas activas del reishi (punto 2.4) se llegan a extraer con agua. Así, se revisó bibliografía sobre polisacáridos, triterpenos y proteínas (proteoglicanos) por ser los de mayor interés en el hongo.

**Polisacáridos:** Como se comentó en el apartado de introducción, los polisacáridos y principalmente los  $\beta$ -glucanos, son los principales activadores de la respuesta enteroinmune que origina el consumo de la seta. Liu et al. encuentran un contenido en  $\beta$ -glucanos solubles en agua del 17,05% (Liu, Tang, et al., 2017). Los de tipo  $\beta$ -glucanos, con ramificaciones beta 1-3 y beta 1-6 y alto peso molecular de acción sobre el sistema inmune, corresponden a un 0,37% (w/w) (Liu et al., 2014).



Cui *et al.* encuentran un 4,32% de polisacáridos solubles en agua después de tres purificaciones con etanol y acetona (Cui *et al.*, 2012) y Zhao *et al.* indica que el contenido de polisacáridos solubles en la seta es del 0,8% (Zhao *et al.*, 2009). No obstante, en los residuos de extracción eliminados pueden quedar retenidos algunos  $\beta$ -glucanos insolubles, que también poseen propiedades antioxidantes (Kao *et al.*, 2012) y otros polisacáridos con actividad sobre la modulación de la microbiota intestinal, como el quitosano hallado en los residuos del *Ganoderma lucidum* (Savin *et al.*, 2020).

**Triterpenoides/ácidos ganodéricos.** Ruan *et al.* (2014) evaluaron la solubilidad de los **triterpenoides/ácidos ganodéricos** del reishi para agua pura, 50% con alcohol y alcohol puro a diferentes tiempos y temperaturas. De 4 extracciones 100% acuosas que coincidieron en tiempo y temperatura con extracciones en alcohol, dos de ellas extrajeron más triterpenos que su equivalente en alcohol (con una diferencia máxima del 66%) y otras dos extrajeron menos cantidad (con una diferencia máxima del 41%). Por ello, la extracción de ácidos ganodéricos por medio acuoso también se puede considerar adecuada.

Estos triterpenos son los principales componentes dotados de actividad citotóxica encontrados en *Ganoderma lucidum* (Yue *et al.*, 2008). Los más interesantes son triterpenos tetracíclicos denominados ácidos ganodéricos a los que se atribuyen propiedades citotóxicas y proapoptóticas, antiinflamatorias y beneficiosas en el tratamiento del asma y de la hepatitis B. (Hsu & Yen, 2014). Por otra parte, debido a que en disolución acuosa presentan un fuerte sabor amargo (J. J. Gao *et al.*, 2004; Kubota *et al.*, 1982; Nishitoba *et al.*, 1989), esta característica organoléptica se ha utilizado como parámetro de calidad del producto en muchos lugares del mundo.

Los **ácidos ganodéricos** mayoritarios en los extractos acuosos son los ácidos ganodéricos A, B, C y D (Zhu *et al.*, 1999), cuyas principales propiedades validadas mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* en animales son:

**Ácido ganodérico A:** inhibe el crecimiento y la capacidad invasiva de células de cáncer de mama (MDA-MB-231) en cultivo (Jiang *et al.*, 2008) y potencia la sensibilidad de células hepáticas de cáncer a quimioterápicos como el cisplatino (Yao *et al.*, 2012).





**Ácido ganodérico B:** posee actividad citotóxica (Guan et al., 2008; Yue et al., 2010), antinociceptiva (Koyama et al., 1997), inhibidora de las síntesis de colesterol (Komoda et al., 1989) y efectos inhibidores de la enzima proteasa del VIH (Akbar & Yam, 2011; el-Mekkawy et al., 1998).

**Ácido ganodérico C:** con actividad antiinflamatoria (Liu, Yang, et al., 2015). Inhibe la liberación del TNF-alfa por parte de los macrófagos, reduciendo así los efectos inflamatorios relacionados con el proceso asmático en ratones. Igualmente disminuye la liberación de TNF-alfa en cultivos primarios de mucosa procedentes de biopsias de niños con enfermedad de Crohn y en macrófagos (Liu, Dunkin, et al., 2015). Los autores proponen como mecanismo de acción una inhibición en la activación de la vía NF-kappaB. Atendiendo a que el TNF-alfa también está relacionado con la caquexia cancerosa, inflamaciones del hígado (activa la proteína C reactiva) y la resistencia a la insulina, se podría justificar en parte la eficacia de este compuesto en el tratamiento de estas enfermedades.

**Proteínas y proteoglicanos.** La proteína *Ling Zhi-8* presente en el reishi, de acción inmunológica, es de interés porque reduce la progresión de tumores hepáticos, cáncer de mama y cáncer de pulmón (Wu et al., 2015), por diferentes mecanismos de expresión génica (p53, p21) entre otros. En ratones se ha informado que la proteína *Ling Zhi-8* activa las células T efectoras murinas y activa las células presentadoras de antígenos. En células humanas se ha observado que estimula la proliferación celular y la producción de IL-2 en células T y promueve la maduración de las células dendríticas (Hsu et al., 2013). Esta proteína es perfectamente soluble en agua. Otras proteínas solubles en agua y contenidas en el reishi del carpóforo poseen también cierto efecto antibacteriano y antioxidante (Sa-Ard et al., 2015).

Los extractos acuosos del reishi también poseen proteoglicanos. Están formados por una composición media de un 95.3% en carbohidratos y un 3.3% de proteínas. (Ye et al., 2011). Los proteoglicanos solubles en agua poseen actividad antidiabética (Pan et al., 2015), inmunomoduladora (Ye et al., 2011; J. S. Zhang et al., 2002), antiherpética (Liu et al., 2004) y protectora renal (Pan et al., 2014). El extracto acuoso parece conservar las propiedades del reishi, en cuanto a las proteínas. Sin embargo, para mejorar la extracción de las mismas se puede añadir 0,1M Tris-HCL



ajustando el pH a 7,4 con HCl, ya que los tampones Tris a pH entre 6,5-9,5 mantienen la integridad conformacional de las proteínas y mejoran su solubilidad (Muinao et al., 2018). Por otro lado, para prevenir la oxidación de los polifenoles que también se evalúan en la tesis, al disolvente de extracción se le incorporó 10 mM de EDTA (ácido etilendiaminotetracético - Panreac) que es capaz de inhibir las enzimas de tipo polifenol oxidasas (frecuentes en las setas), pues actúa como agente quelante del cobre contenido en estas enzimas (Weemaes et al., 1999).

Por lo tanto, debido a que el método de extracción acuosa conserva las principales moléculas que definen las propiedades del reishi, pues extrae correctamente polisacáridos, triterpenoides de interés, proteínas y proteoglicanos, se seleccionó este método como el más correcto para la tesis, añadiéndole 0,1M Tris-HCl a pH a 7,4 para mejorar la extracción proteica y 10 mM de EDTA para preservar su contenido polifenólico. Además, este método es el más utilizado de forma tradicional, por lo que es el que más representa el consumo histórico de la seta.

#### **5.4.2 Elección del tiempo y temperatura de extracción**

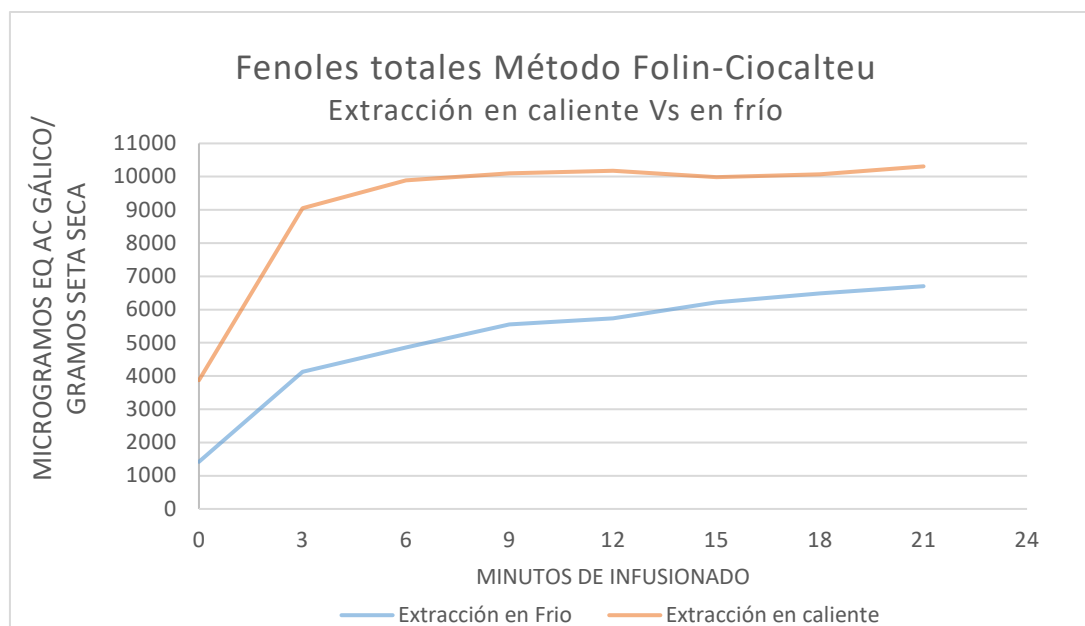
Para establecer los tiempos de extracción de las muestras, se realizaron dos extracciones acuosas, una en frío y otra en caliente (infusión, forma tradicional de utilización) de reishi: 1,75 g de seta triturada en 100 mL de agua. Se estudió a continuación la evolución de la concentración de los fenoles totales a lo largo del tiempo y dependiendo de la temperatura de extracción.

La elección de los fenoles se debió a que estas moléculas tienen un alto poder antioxidante y son muy abundantes en las setas, por lo que son muy representativas (Nowacka-Jechalke & Olech, 2018). El reishi utilizado procedía de cultivo en un sustrato 80% de roble marojo (*Quercus pyrenaica*) y 20% de centeno, recolectado el 5/12/2014 en primera cosecha y analizado el 21/04/2015.

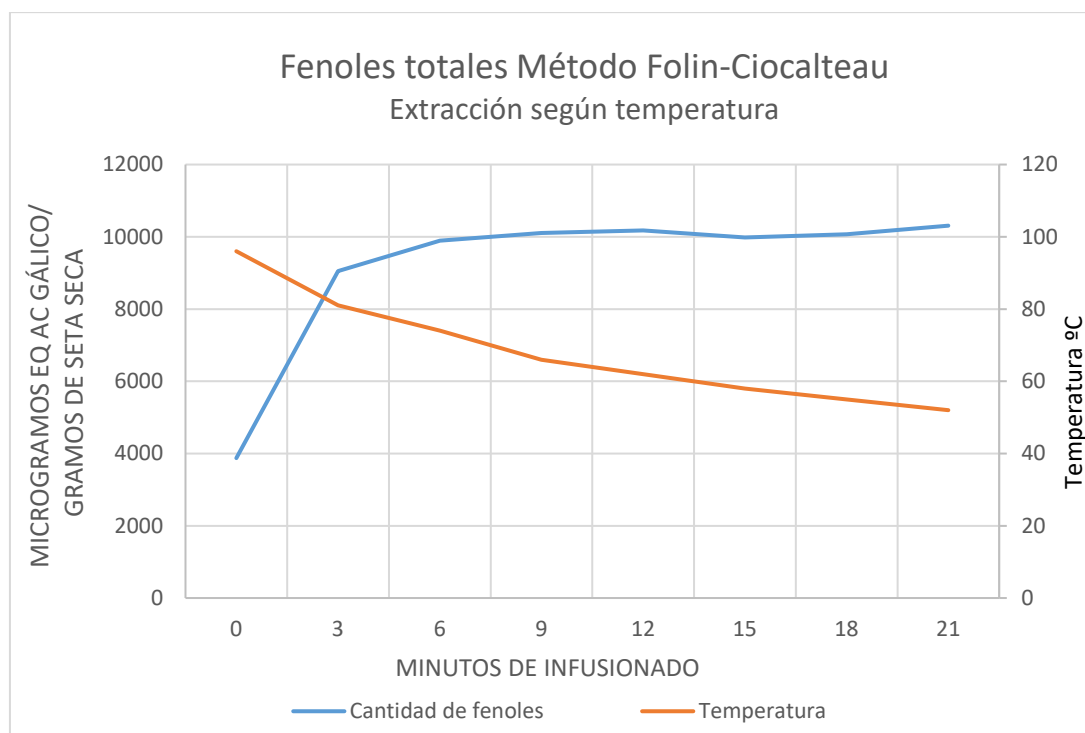
Para establecer el tiempo óptimo de extracción se realizó 3 muestreos para cada extracto (frío y caliente) a los 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21 minutos. Las muestras se pipetearon, se centrifugaron y los sobrenadantes se reservaron a -20°C hasta su análisis. Posteriormente se analizó la concentración de fenoles totales mediante la



metodología de Folin-Ciocalteu, explicada con detalle en el punto 5.6.2, y se graficaron los resultados (Figura 25).



**Figura 25. Evolución del contenido en fenoles del té de reishi según el tiempo de extracción**



**Figura 26. Evolución de la temperatura y la concentración de polifenoles en el extracto caliente**



Obsérvese que aproximadamente a 75°C se obtiene el máximo de concentración de polifenoles.

Como se observa en la Figura 25, el máximo de extracción de polifenoles se origina a los 8 minutos. Por su elevada polaridad, la solubilización en agua de los polifenoles es muy rápida y en el minuto 0, nada más añadir la muestra al agua, ya existe presencia de los mismos.

Durante la extracción también se midió la evolución de la temperatura del agua, tal y como se ve en la Figura 26. En base a estos ensayos estableció como el tiempo óptimo de extracción de 8 minutos y 75°C de temperatura.

### 5.4.3 Elección de concentración del extracto

La mayoría de setas comestibles como boletos, champiñones, setas de chopo, etc. se pueden triturar hasta hacerlos polvo con un molinillo/triturador casero. Sin embargo para el reishi esto no es posible: el reishi presenta una estructura trimítica (Bernichia, 2005) con presencia de hifas esqueléticas (Figura 4) que aporta una gran resistencia y fibrosidad, que ya de por sí es resistente en casi todos los poliporáceos. Esto hace que, al intentar triturarlo, se obtenga una especie de algodón capaz de absorber mucho líquido (Figura 27).



**Figura 27. Detalle de reishi triturado y pesado en báscula**

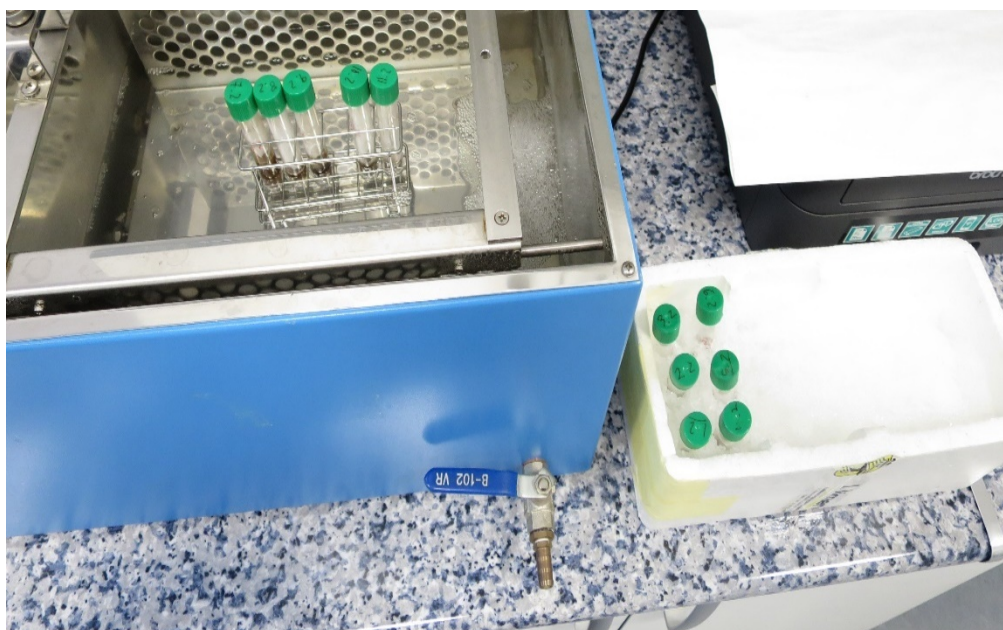
Al triturar reishi se origina una pelusa muy esponjosa que impide realizar una extracción concentrada de proteínas. Obsérvese la ligereza de este “algodón de reishi”. Fotografía del autor.



Al intentar hacer el extracto a concentración 1:5 con esta pelusa el tampón de extracción era absorbido totalmente por la misma y partes de la fibra de la seta permanecían secas, por lo que la extracción no era completa. Se tuvo que llegar a una proporción 1:10 de tampón de extracción para que todo el tejido de la seta estuviera en contacto con el disolvente.

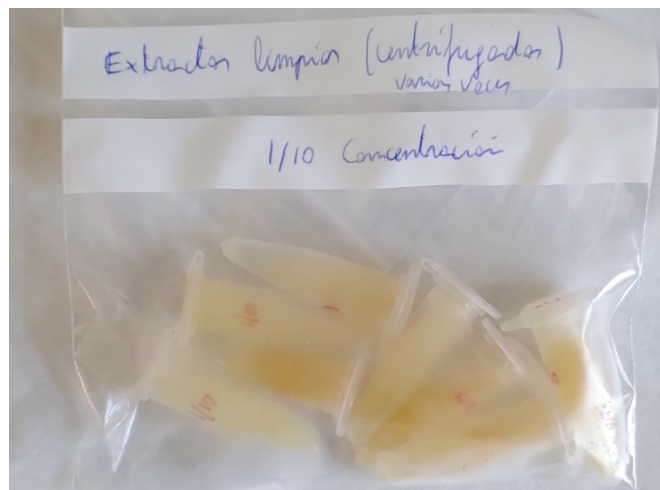
#### 5.4.4 Proceso de elaboración de los extractos

Las muestras se extrajeron en tubos de ensayo con tampón de extracción (Tris 0,1 M, EDTA 10 mM, pH 7,4) en concentración 1/10 a una temperatura 75°C en baño Velp Scientifica (multistirrer 6) durante 8 minutos e inmediatamente se colocaban en baño de hielo. (Figura 28)



**Figura 28. Proceso de infusión de las muestras**

Para obtener los extractos, se aplastaba el algodón fúngico y el líquido obtenido se sometía a una primera centrifugación en tubos de 50 mL durante 20 min a 3.500 rpm y 4°C en centrífuga Digicen-R de rotor basculante RT142. Se recuperaba el sobrenadante, se preparaban alícuotas de 1,5 mL en microtubos y estos se centrifugaban durante 3 min a 10.000 r.p.m. en centrífuga Labnet Spectrafuge 24D. Se recogían los sobrenadantes y se conservaban las muestras a -20°C en frigorífico.



**Figura 29. Extractos 1:10 limpios y congelados.**

Debido a que los extractos 1:10 tenían una reducida la concentración de proteínas, estimadas inicialmente por la metodología de Kalb y Bernlohr ( punto 5.7.1), y además tenían un color anaranjado debido a la abundancia de pigmentos de la seta, se tuvieron que probar diferentes métodos para la limpieza/purificación y concentración de las proteínas: método del TCA/acético, diálisis en tripa artificial de acetato de celulosa, ultrafiltración por presión a gas, y ultrafiltración con microtubo centrífugo (punto 5.7).

## 5.5 Análisis nutricional y perfil de ácidos grasos

Las analíticas nutricionales se realizaron externamente por la empresa Agrolab Ibérica S.L.U, (Tarragona, España). Para hacer los cálculos nutricionales, tanto de las setas completas como de los pies en comparación con los sombreros, se enviaron muestras de sombreros y pies de las setas obtenidas en el sustrato 2 (Figura 30). También se enviaron los 300 g de *Ganoderma lingzhi* procedentes de la empresa MundoReishi Salud S.L.

Se solicitó analizar: proteína, grasa, fibra dietética, azúcares totales, hidratos de carbono, sodio, cenizas y perfil de ácidos grasos. El perfil de ácidos grasos se realizó con 46 ácidos grasos de referencia. El laboratorio facilitó la incertidumbre de cada análisis para la comparación de resultados.





**Figura 30. Sombreros y pies de reishi en bolsas zip**

A la derecha dos bolsas con pies de setas de *Ganoderma lucidum* y a la izquierda una bolsa con sombreros de *Ganoderma lucidum*.

Debido a que el contenido en proteína indicado por el laboratorio fue dado calculando la proteína como  $N \times 6,25$ , para compararla con otros estudios, el valor fue convertido a proteína de hongos  $N \times 4,38$  según (Crisan & Sands, 1978).

Los 46 ácidos grasos analizados fueron: Ácido decanoico (cáprico). Ácido docosadienoico (13c,16c) [C22:2]. Ácido docosaheptanoico (4c, 7c,10c,13c,16c,19c) (cervónico). Ácido docosanoico (behénico). Ácido docosapentaenoico (7c, 10c, 13c, 16c, 19c) (clupadónico). Ácido docosatetraenoico (7c, 10c, 13c, 16c) (adrénico). Ácido docosenoico (13c) (erúcido). Ácido dodecanoico (láurico). Ácido eicosadienoico (11c,14c) [C20:2]. Ácido eicosanoico (aráquico). Ácido eicosapentaenoico (5c, 8c,11 c,14c,17c). Ácido eicosatetraenoico C20:4 (n- 3). Ácido eicosatetraenoico (5c, 8c,11c, 14c) (araquidónico). Ácido eicosatrienoico (11 c,14c,17c). Ácido eicosatrienoico (8c,11c,14c) (dihomo- $\gamma$ -Linolénico). Ácido eicosenoico (11c) (gadoléico). Ácido heneicosanoico (heneicosílico). Ácido heptadecanoico (margárico). Ácido heptadecenoico (10c) (margaroléico). Ácido hexadecanoico (palmitico). Ácido hexadecenoico (9c) (cis-palmitoléico). Ácido hexadecenoico (9t) (trans-palmitoléico). Ácido octadecadienoico (9c, 12c) (linoléico). Ácido octadecadienoico (9c, 12t). Ácido octadecadienoico (9t, 12c). Ácido octadecadienoico (9t, 12t) (linolelaídico). Ácido



octadecanoico (esteárico). Ácido octadecatetraenoico (6c,9c,12c,15c) (estearidónico). Ácido octadecatrienoico C18:3 (9c,12t,15t). Ácido octadecatrienoico (6c, 9c, 12c) ( $\gamma$ -Linolénico). Ácido octadecatrienoico (9c,12c,15t). Ácido octadecatrienoico (9c,12t,15c). Ácido octadecatrienoico (9c,12c,15c) ( $\alpha$ -linolénico). Ácido octadecatrienoico (9t,12t,15t). Ácido octadecatrienoico (9t,12c,15t). Ácido octadecatrienoico (9t,12c,15c). Ácido octadecenoico (11c) (cis-vaccénico). Ácido octadecenoico (6c) (petroselinílico). Ácido octadecenoico (9c) (oléico). Ácido octadecenoico (9t) (elaídico). Ácido octanoico (caprílico). Ácido pentadecanoico. Ácido tetracosanoico (lignocérico). Ácido tetracosenoico (15c) (nervónico). Ácido tetradecanoico (mirístico). Ácido tetradecenoico (9c) (miristoléico).

Con los datos obtenidos el laboratorio calculó: suma de ácidos grasos saturados, de ácidos grasos trans, de ácidos grasos monoinsaturados y de ácidos grasos poliinsaturados.

## 5.6 Caracterización antioxidante, antirradicalaria y polifenólica

### 5.6.1 Análisis de capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se calculó según el procedimiento CUPRAC (*Copper Reducing Antioxidant Capacity*) de Apak *et al.* (2004).

El método CUPRAC se fundamenta en que el reactivo Cu(II)-neocuproína [Cu(II)-Nc] reacciona como agente oxidante cromogénico de la siguiente forma (Figura 31)



**Figura 31. Reacción de CUPRAC**



En esta reacción los polifenoles (-OH) se oxidan a las correspondientes formas quinónicas (= O) y el Cu (II)-Nc es reducido a Cu(I)-Nc que es un compuesto coloreado y muestra un máximo de absorción a 450 nm.

Para los análisis se emplearon 25 µL de las muestras 1:10 obtenidas según el procedimiento descrito en el apartado 5.4.4. Las muestras se prepararon por triplicado con 25 µL de extracto, 1000 µL de cloruro de cobre II 10mM (Sigma-Aldrich), 1000 µL de neocuproína 7,5mM, 1000 µL de acetato de amonio 1M a pH 7 y 975 µL agua Milli-Q (un total de 4000 µL). El blanco se realizó sustituyendo la muestra por agua. Se elaboraron 3 muestras por extracto. La reacción se realizó durante 60 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. La recta patrón se elaboró con ácido gálico 1mM (Sigma-Aldrich) en etanol para cantidades de 0, 20, 40, 60 y 80 µL, adaptando el contenido de agua, para hacer el total de 4000 µL. La absorbancia se midió a 450 nm con espectrofotómetro (HELIOS Epsilon Thermo Scientific).

## 5.6.2 Contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales fue calculado por el método de Folin-Ciocalteu de acuerdo al procedimiento de (Singleton & Rossi, 1965). El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene una mezcla de volframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico que es capaz de reaccionar con restos fenólicos presentes en las proteínas (tirosinas) y con compuestos como ácido gálico y sus derivados, flavonoides, etc.

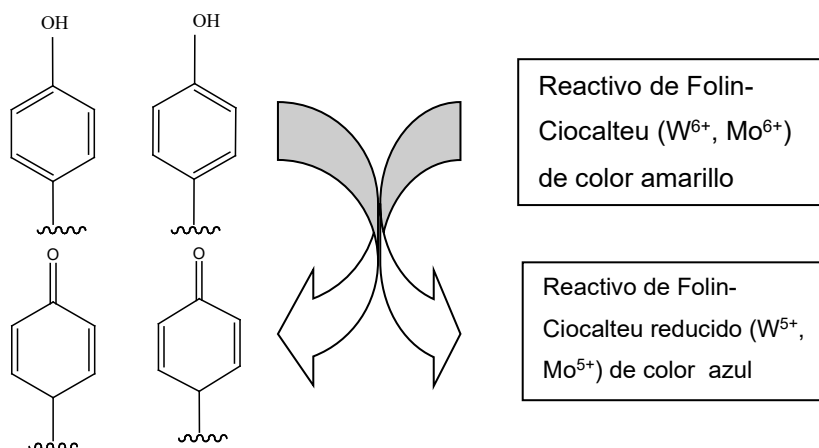


Figura 32. Esquema de Reacción de Folin-Ciocalteu



El ácido fosfomolibdotúngstico, formado por las dos sales en el medio ácido, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, que es el que se mide con el espectrofotómetro a 765 nm.

Las muestras se prepararon con 25  $\mu$ L de los extractos de reishi, 600  $\mu$ L de carbonato de sodio 7,5% (Sigma-Aldrich), 675  $\mu$ L de agua Milli-Q y 200  $\mu$ L de reactivo de Folin (un total de 1.500  $\mu$ L). El blanco para calibrar el espectrofotómetro se realizó sustituyendo la muestra por agua. Se elaboraron 3 muestras por extracto.

La reacción se realizó a 50°C durante 10 minutos en baño Velp Científica con temporizador Oregon Scientific (Figura 33)



**Figura 33. Muestras en baño durante la reacción de Folin-Ciocalteu**

Replica II de III del método Folin Ciocalteu. Fotografía del autor.

La recta patrón se realizó con ácido gálico 2,5 mM (Sigma-Aldrich) para cantidades de 0, 20, 40, 60 y 80  $\mu$ L, adaptando el contenido de agua, para completar 1500  $\mu$ L.

Las absorbancias fueron medidas con espectrofotómetro (HELIOS Epsilon Thermo Scientific) a 765 nm y los gráficos y cálculos matemáticos se realizaron según lo indicado en el apartado 0.



### 5.6.3 Capacidad antirradicalaria

La capacidad antirradicalaria fue medida usando el reactivo DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidrazilo) de acuerdo al procedimiento de (Brand-Williams et al., 1995). El radical orgánico DPPH es un radical orgánico nitrogenado estable, que presenta una coloración púrpura que se pierde progresivamente en presencia de sustancias antioxidantes, produciéndose así un descenso de la absorbancia a 515 nm.

Las muestras se prepararon con 25 µL de los extractos obtenidos según lo indicado en el apartado 5.4.4, 2900 µL de radical DPPH 0,1 mM (Sigma-Aldrich) en metanol y 75 µL de metanol al 80%, haciendo un total de 3000 µL. El blanco se realizó sustituyendo la muestra por agua. Se elaboraron 3 muestras por extracto. La reacción se mide a los 10 minutos exactos del inicio, ya que, en este intervalo, la mayoría de las sustancias completan la reacción con el DPPH y permite estandarizar el proceso.

La recta patrón se realizó con TROLOX (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico, un análogo de la vitamina E) 1mM en metanol para cantidades de 0, 25, 50, 75 y 100 µL, adaptando el contenido de metanol, para completar 3000 µL. El espectrofotómetro se calibró con el “blanco 1” compuesto por 3000 µL de metanol al 80%.

## 5.7 Concentración y limpieza de proteínas

### 5.7.1 Estimación inicial de la cantidad de proteína de las muestras

Antes de proceder con las electroforesis fue necesario estimar la cantidad de proteína que existe en los extractos obtenidos según el apartado 5.4.4. Lo ideal es que las muestras tengan una concentración próxima a 2 µg/µL de proteína para que se vean bien las bandas en la electroforesis.

La estimación de la concentración de proteínas se realizó por la metodología de Kalb and Bernlohr (1977). Este método permite estimar rápidamente el contenido de proteína disuelta mediante 3 mediciones de absorción y la aplicación de la formula indicada a continuación:

$$[\text{Proteína}] = 183 (A_{230} - A_{320}) - 75,8 (A_{260} - A_{320}) = \mu\text{g/ml}$$





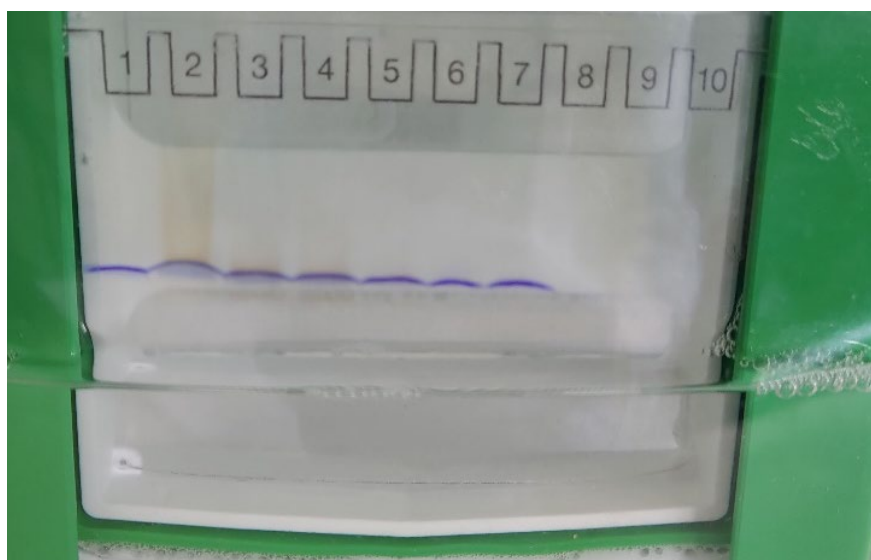
Donde  $A_{230}$ ,  $A_{260}$  y  $A_{320}$  corresponden con las medidas de la absorbancia de la muestra en un tampón fosfato salino a las longitudes de onda 230, 260 y 320nm respectivamente.

La estimación de proteína se realizó a partir del extracto de setas completa (pie más sombrero) cultivado en 80% roble + 20% centeno.

Para la medida de las absorbancias se utilizó un espectrofotómetro HELIOS  $\alpha$ Termo y una cubeta de cuarzo Hellman con un paso de luz de 10mm. Como blanco se emplearon 10  $\mu$ L de tampón de extracción.

Si bien el dato de concentración obtenido mediante este método es sólo orientativo, permite realizar una estimación de cuanto hay que concentrar los mismos para realizar las electroforesis.

Al concentrar los extractos de partida se observó que ensuciaban el carril de la electroforesis con pigmentos de un color pardo rojizo (Figura 34). Estos eran más abundantes en las muestras que procedían de los sombreros de la seta que en los pies por lo que es probable que procedieran de la cutícula rojiza del reishi.



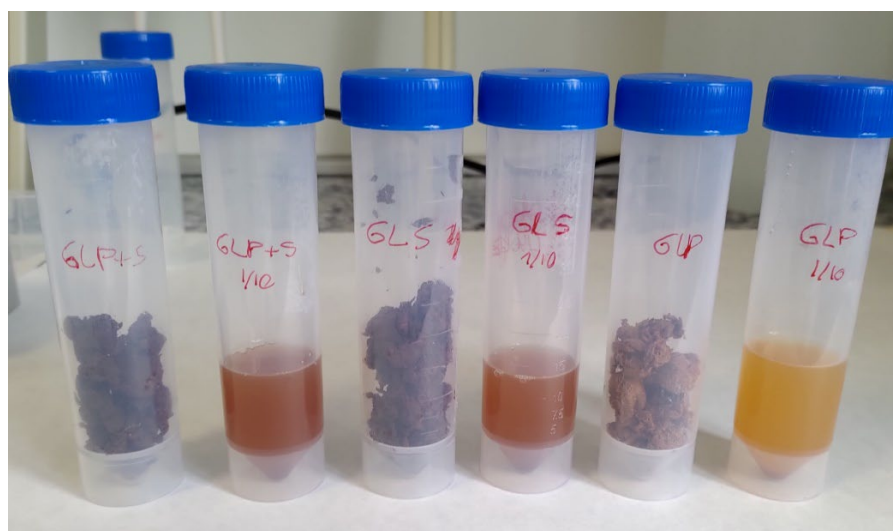
**Figura 34. Los extractos de reishi tiñen de pardo la electroforesis**

Los pocillos 2, 3 y 4, que contienen diferentes extractos de reishi, se ven teñidos por pigmentos de la seta. El pocillo 5 también tienen extracto de reishi, pero del pie. El pocillo 6 contine BSA, incoloro, y los pocillos 1 y 7 contienen los patrones de proteína, también incoloros.





Para tratar de eliminar estos pigmentos se probaron diferentes procedimientos de concentración y limpieza de proteínas. Así se testaron para la tesis: a) Concentración y purificación por el método TCA/acetona; b) Purificación por diálisis; c) Concentración con ultrafiltración a presión de gas; d) Ultrafiltración de las muestras con microtubo centrifugo.



**Figura 35. Coloración de los diferentes extractos de reishi**

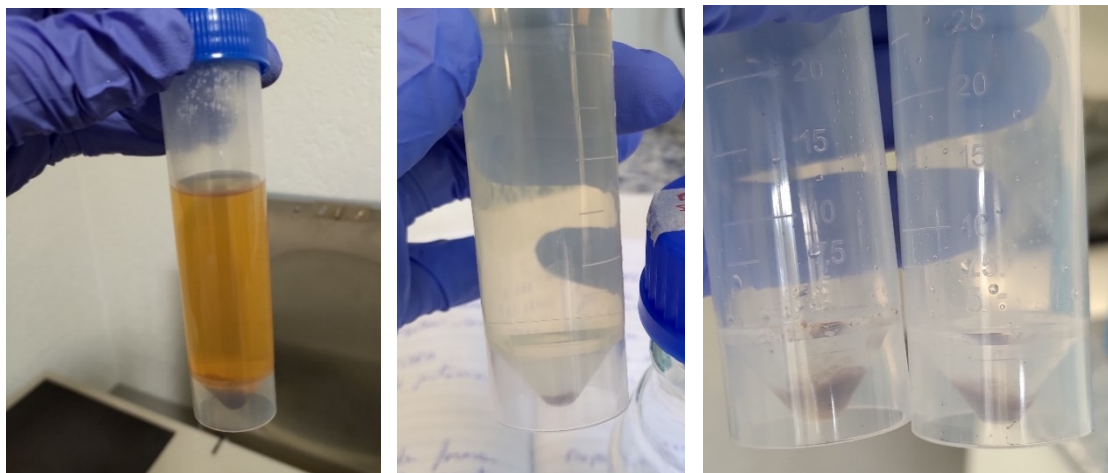
Extractos brutos (sin centrifugar) 1:10 de *Ganoderma lucidum*. Contenido de los tubos, de izquierda a derecha: Pellet setas completa. Extracto de seta completa. Pellet de sombreros. Extracto de sombreros. Pellet de pies. Extracto de pies.

### 5.7.2 Purificación mediante el método TCL/acetona.

Este método concentra las proteínas mediante precipitación de las mismas con ácido tricloroacético, separación por centrifugación y lavado de los sedimentos con acetona. Se utiliza cuando las muestras están demasiado diluidas o cuando tiene una alta concentración de polisacárido. En el reishi suceden ambas cosas, ya que es rico en polisacáridos, como comentamos en los puntos 2.4.1 y 5.4.1 y estamos trabajando con concentraciones 1:10, escasas en proteína, debido a los condicionantes físicos de la seta (punto 5.4.3). Por otro lado, si los polisacáridos son los responsables de arrastrar/adsorber los pigmentos de la seta, la muestra procesada quedará mucho más limpia al aplicar este método.



Con objeto de establecer la metodología más apropiada, se realizaron extractos con muestras nuevas a concentración 1:10 a partir de 2 gramos de sombreros de *Ganoderma lucidum* cultivada en 80% roble y 20% cereal con disolución tapón 0,28 M NaCl, 5mM de  $H_2NaO_4P$  a pH 7,4 (tampón PBS) previamente elaborada.



**Figura 36. Método de concentración y purificación de proteínas TCA/acetona**

Izquierda extracto precipitado con TCA y centrifugado. Centro: Extracto lavado con acetona y centrifugado. Izquierda: sedimentos obtenidos después del proceso

Al extracto obtenido se le añadió  $\frac{1}{4}$  de volumen de ácido tricloroacético 50% en baño de hielo. Se dejó reposar 30 minutos para permitir la precipitación de las proteínas y luego se centrifugó a 3.500 rpm durante 30 minutos. Se retiró el sobrenadante y se lavó el sedimento con acetona 3 veces. Todo el método del TCA/acetona se realizó en hielo y en centrifuga refrigerada a 4 °C.

### 5.7.3 Diálisis con membrana

Se realizó una diálisis en membrana de 12.000-14.000 MWCO (Molecular weight cutoff) con una luz de 19 mm (Medicell international Ltd., 239 Liverpool Road, Londres) para ver si se podían limpiar las muestras.

Para ello se cortó un trozo de 40 cm de longitud de dicha membrana y se preparó hirviéndola 10 minutos en 1 L de una solución de bicarbonato de sodio al 2% p/v y EDTA 2mM. A continuación, se limpió con agua Milli-Q y se hirvió de nuevo en

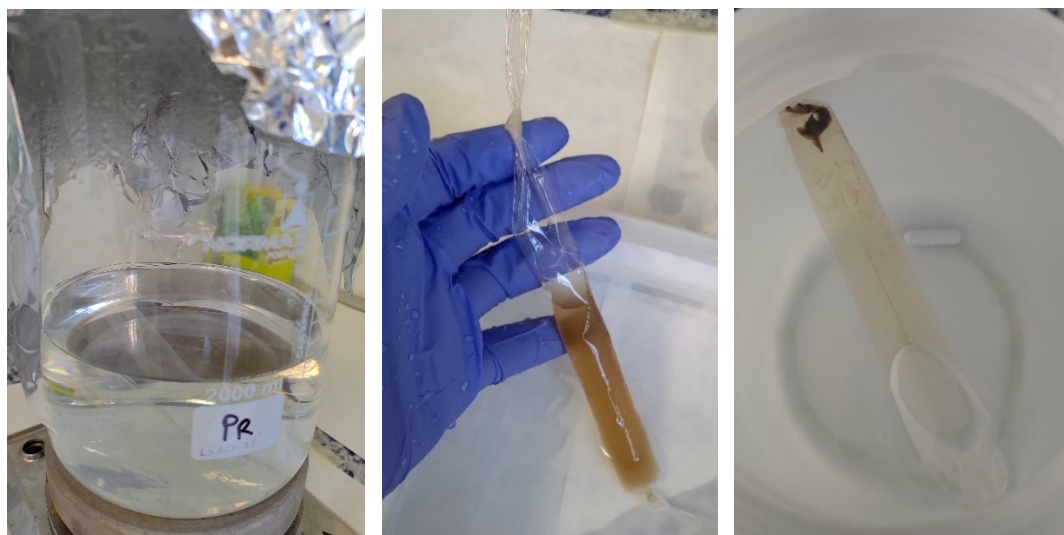


2mM de EDTA otros 10 minutos. Luego se lavó y almacenó en agua Milli-Q a 4° hasta su uso.

Posteriormente, el sedimento de proteínas y residuos obtenido según el apartado 5.7.2, se disolvió en tampón PBS hasta llegar a 20 mL y con este extracto se llenó la membrana de diálisis. Esta se sacó del frigorífico y se lavó con agua Milli-Q por fuera, luego se ató por un extremo y se limpió por dentro llenándola varias veces con este agua. Por último, se llenó con el extracto citado y se ató el extremo que quedaba libre dejando 1/3 de su capacidad llena de aire para prevenir la rotura de la tripa (Figura 37, centro).

La tripa así preparada se puso a dializar dentro de un bidón con 4 litros de agua Milli-Q sometido a agitación magnética en el interior de la nevera, a 4°C. A las 3 horas se cambió el agua y continuó la diálisis hasta el día siguiente.

Al día siguiente se extrajo la membrana del bidón y se vació en un tubo de 50 ml. Finalmente se obtuvieron 23 mL de muestra dializada. El líquido se centrifugó a 3.500 RPM durante 15 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante en un tubo de 50 ml.



**Figura 37. Proceso de diálisis**

Izquierda: preparación de la membrana. Centro: extracto dentro de la membrana listo para dializar. Derecha: diálisis terminada



Al igual que sucedió con el método de TCA/acético (punto 5.7.2), la diálisis no limpió las muestras de pigmentos pardo-rojizos.

#### 5.7.4 Ultrafiltración con presión de gas

Para concentrar los aproximadamente 23 mL de muestra dializada se realizó una ultrafiltración a través de membrana de celulosa regenerada (Amicon® Bioseparation Millipore Corporation, Billerica, MA01281, U.S.A) de 25mm de diámetro de 10.000 NMWL (Nominal Molecular Weight Limit), en el dispositivo Stirrel Ultrafiltration modelo de 10mL (Amicon® 8010, Millipore Corporation, Bedford, MA01730, U.S.A.).

El procedimiento consiste en aplicar presión de gas sobre la muestra a filtrar que está en un lado de la membrana. El empuje que ejerce el gas sobre la muestra hace que esta filtre al otro lado de la membrana. Las partículas superiores en peso al marcado en la membrana (10.000 Da) se quedan a un lado y las partículas inferiores pasan con el disolvente se al otro lado (Figura 38). Dentro del ultrafiltrador se introduce también un imán (inmerso en la muestra) que se mueve gracias a un agitador magnético; este impide que el filtro se obstruya por taponamiento con proteínas grandes.

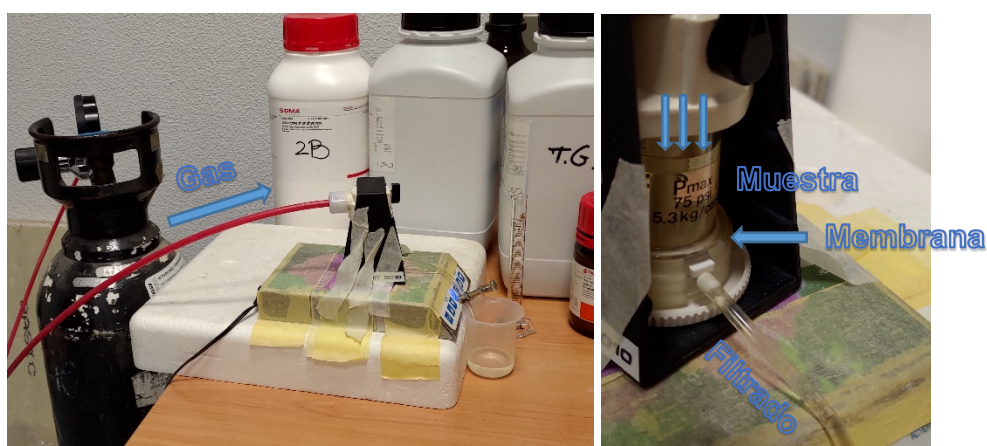


Figura 38. Equipo de ultrafiltración funcionando

Como la membrana era nueva, para eliminar el glicerol que la protege, se procedió a filtrar agua pura Milli-Q a 55psi de presión (3,7ATM) durante 5 minutos. La membrana así limpia se almacenó en etanol al 10% en agua y a 4°C, hasta su uso.



Para el proceso se sacó la membrana del refrigerador y se lavó varias veces con agua Mili-Q. Esta membrana se colocó dentro del Amicon 8010 con la parte brillante hacia arriba. Posteriormente se llenó el recipiente  $\frac{3}{4}$  partes de su volumen con el líquido de la diálisis obtenido según lo indicado en el punto 5.7.3.

Para el proceso de filtrado se estableció una presión de 50 psi en el equipo de gas (nitrógeno). Cuando el dispositivo estaba a punto de filtrar todo su contenido se cerraba el gas, se descargaba la presión del sistema, se abría el ultrafiltrador y se llenaba de nuevo el recipiente con más cantidad del extracto a filtrar. Así se procedió varias veces hasta concentrar todo el extracto de partida en un volumen medido con micropipetas (modelo Proline Plus marca Biohit) de 2,7ml. Estas micropipetas y todas las utilizadas fueron calibradas días antes en el laboratorio. Se calculó una velocidad aproximada de filtrado de 0,585 ml/min para una presión de 50 psi a temperatura ambiente y en la muestra utilizada.

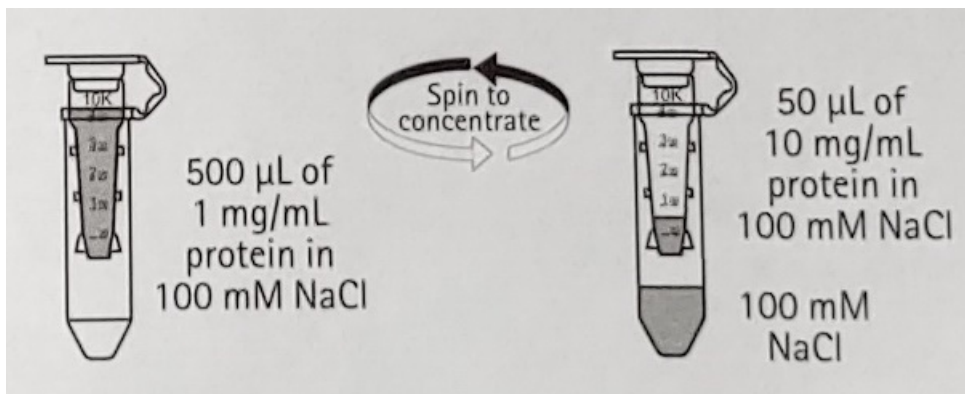
Una vez terminado el proceso, la membrana de ultrafiltración se lavó sumergiéndola 30 min en una solución de NaOH 0,1M. Luego se hizo pasar agua Milli-Q a través de ella en el aparato de ultrafiltración para terminar su limpieza y se almacenó en el frigorífico en la solución de alcohol ya comentada, para dejarla lista en sucesivos usos.

### **5.7.5 Ultrafiltración con microtubo centrífugo**

Tanto la muestra concentrada en el punto anterior como la muestra 1:10 sin purificar se concentraron más con microtubos centrífugos Amicon ultra-0,5 Centrifugal devices (Millipore Corporation. 290 Concord Road Billerica, MA 01821 United States) modelo de 10.000 NMWL para posteriormente someterlas a una electroforesis y dilucidar qué método es el mejor a la hora de concentrar proteínas.

Este método concentra proteínas aprovechando la fuerza centrífuga de una máquina centrífuga para hacer pasar el extracto a través de la membrana de ultrafiltración, de forma similar a la presión por gas que se explicó en el punto 5.7.4. La membrana incorporada dentro del tubo ultracentrífugo se adquiere con el peso molecular (NMWL) que se desea (Figura 39).





**Figura 39. Funcionamiento de Amicon ultra-0,5 Centrifugal devices**

Fuente: Hoja de instrucciones del microtubo.

Para proceder con las muestras, se llena el tubo interno con 500 µL de muestra y se centrifuga durante 10 min a 10.000 RPM. Luego se saca el concentrado con una micropipeta Hamilton para medir la cantidad y así poder estimar el incremento de concentración aproximado del extracto. El tubo se llena y las muestras se concentran de 500 µL a 56-62 µL, cerca de diez veces, y directamente con esos nuevos concentrados se realizan las electroforesis comparativas, tal como se muestra en los resultados (punto 5.21.2).

## 5.8 Electroforesis de las muestras

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas cargadas por migración en un campo eléctrico. Las moléculas se separan en función de su carga eléctrica. Con determinados reactivos se les otorga carga a las proteínas para que puedan moverse por un gel gracias a una diferencia de potencial.

Uno de los métodos de electroforesis más comúnmente aplicado para proteínas es el método PAGE (*polyacrylamide gel electrophoresis*) en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS). Esta técnica es conocida como SDS-PAGE (Laemmli, 1970) y se ha utilizado según los protocolos descritos previamente (Jiménez *et al.*, 2013).

Las muestras de proteína obtenidas de los carpóforos y concentradas, así como todas las muestras sometidas a electroforesis, se tamponaron con una solución: Tris-HCl 277.8 mM pH 6,8, SDS al 4,2 % (p/v), glicerol al 44,4 % (v/v) y azul de bromofenol





al 0,02 % (p/v). Cada 18  $\mu$ L de muestra se mezclaron con 6  $\mu$ L del buffer elaborado (24  $\mu$ L en total) y se hirvieron durante 5 minutos (aprox. 100°C). El agua hirviendo desnaturaliza las proteínas y permite que el SDS se una a las cadenas polipeptídicas. El SDS carga la proteína de forma negativa para que pueda ser desplazada por la diferencia de potencial que se aplica en la cámara de electroforesis.

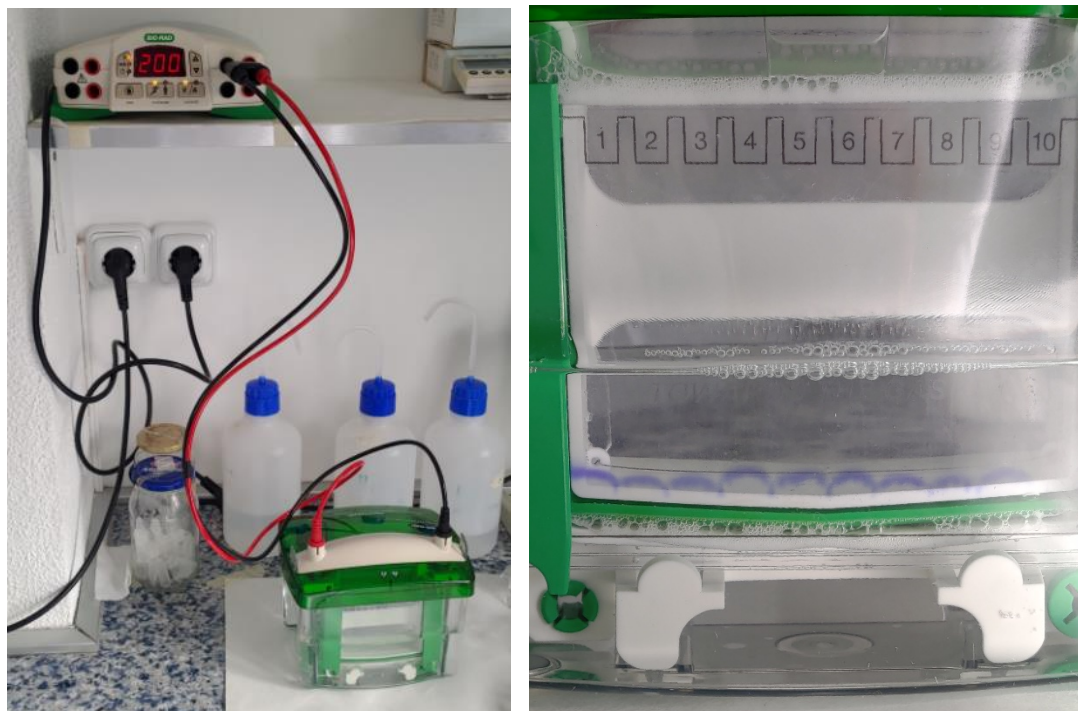
Después, las muestras se centrifugaron a bajas revoluciones (en una microcentrífuga) para eliminar las burbujas de aire y concentrar la muestra de proteína en la parte baja del tubo. Posteriormente se desprecintó un gel preformado, se colocó en la cubeta de electroforesis y se llenó el equipo con un tampón que contenía TRIS-HCl 25 mM (pH 8,3), glicina de 192 mM, y 0,1% (p / v).

Los geles preformados utilizados fueron Mini-Protean TGXTM 4-20% (laboratorios BIO-RAD. Alcobendas, España). El gel de 4-20% en poliacrilamida se eligió después de hacer pruebas con extractos de reishi en distintos geles y se vio que el gel de gradiente 4-20% mejoraba la separación de las proteínas de reishi.

Una vez colocado el gel en el equipo, los pocillos de la parte superior del gel se cargaron 20  $\mu$ L de cada muestra con una micropipeta Hamilton y luego se ajustó el equipo a una diferencia de potencial de 120 V y una intensidad de corriente de 25 mA. Se trabajó a 20°C.

Para estimar el tamaño de las proteínas de las muestras, se introdujeron 5  $\mu$ L del marcador de proteínas Precision Plus Protein™ Unstained Standards (Bio-Rad Labs. Alcobendas, España) en el primer y último pocillo de cada electroforesis. Este marcador está constituido por diferentes proteínas recombinantes, de las cuales se conoce su tamaño y que, al separarse durante la electroforesis, nos sirven de guía para estimar el tamaño de las proteínas de la muestra (Figura 40). El blanco utilizado para las proteínas era proteína de suero bovino (BSA) y en el caso de las electroforesis con extractos digeridos, también se incorporó una columna con BSA + SGF (fluido gástrico simulado) y otra sólo con SGF.

La electroforesis terminaba cuando la línea azul llegaba a la parte inferior del gel.



**Figura 40. Máquina de electroforesis funcionando y fin de la electroforesis**

Luego, los geles se extrajeron sobre agua, se lavaron 3 veces y se tñieron con una solución 1% (p / v) de coomassie brillant blue R-250 50% (v/v) metanol y 10% (v/v) de ácido acético (Jimenez et al., 2013) durante aproximadamente 14 horas en un agitador basculante Rocker 25 (Labnet) a 40 r.p.m. y a temperatura ambiente, exceptuando un gel comparativo para el que se realizó una tinción en plata (5.8.1). Transcurrido la noche, se destiñeron los geles con una solución de 7% (v/v) de ácido acético y 5% (v/v) de metanol, colocado en el mismo agitador.

### **5.8.1 Método de tinción con plata**

Como método alternativo de la tinción con coomassie brillant blue R-250, también se realizó una tinción por nitrato de plata adaptando el método de Blum *et al.* (1987) y Shevchenko *et al.* (1996). La tinción en plata es un método extremadamente sensible de tinción de proteínas y llega a mostrar bandas que no se aprecian en la tinción en azul brillante.



**Figura 41. Mesa preparada para la tinción con plata**

Para la tinción, se lavó el gel de poliacrilamida en una solución de etanol al 50% y ácido acético al 5% durante 1h y dejando pasar toda la noche en etanol al 50%. Al día siguiente se lavó 3 veces en agua Milli-Q, durante 10 minutos y se sensibilizó con  $\text{NaS}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 0,02% durante 1 minuto. Después de otros 3 lavados de 30 segundos en agua Milli-Q, se incubó el gel en  $\text{AgNO}_3$  al 0,01% durante 20 minutos a 4°C. Se lavó el gel en agua Milli-Q otras 3 veces durante 20 segundos y se transfirió el gel a un contenedor limpio donde se lavó una vez más durante 1 minuto. El gel se reveló en formalina al 0,05% con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 3% y la tinción se realizó con ácido acético al 5%. Después de la tinción, el gel se lavó 3 veces durante 10 minutos con agua Milli-Q y se guardó en ácido acético al 1% hasta su conservación entre películas de celofán (punto 5.10).

## 5.9 Digestibilidad proteica

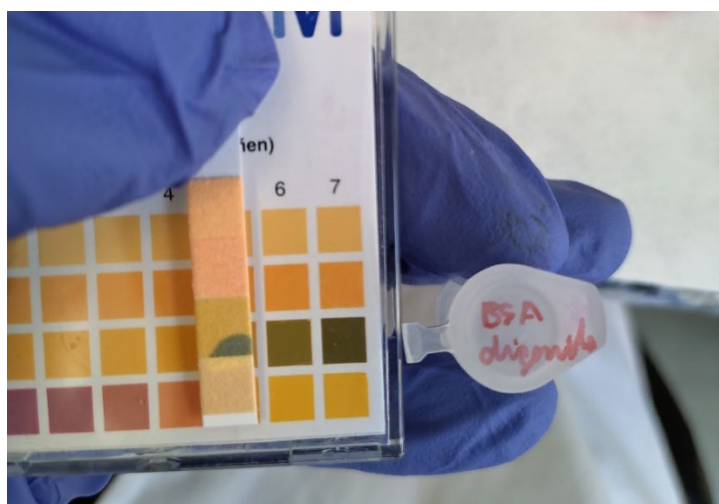
Los estudios de digestibilidad de proteínas *in vivo* de los extractos de *Ganoderma* se realizaron en fluido gástrico simulado (SGF) a 37 ° C durante 60 minutos de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente por (Jimenez et al.,



2013). El procedimiento consiste en poner las muestras en condiciones similares a las que encontramos en un estómago estándar: con pepsina como enzima digestiva, sal y ácido clorhídrico, y posteriormente se realiza una electroforesis comparativa para ver qué proteínas se digieren y cuáles no.

La digestión comparativa se realizó con los extractos 1:10 de seta completa de *Ganoderma lucidum* 80% de roble y 20% de centeno y *Ganoderma lingzhi*, posteriormente concentrados por microfiltración centrífuga. Para ver la eficacia de la digestión se puso también una muestra de proteína sérica bovina, con y sin digerir, y una muestra de SFG en otro pocillo. Además, se incorporaron los marcadores en el primer y último pocillo de la electroforesis, para estimar los tamaños proteicos.

Las digestiones se realizaron en microtubos con 90 microlitros que contenían 0,3 mg de pepsina (800-2500 U / mg; SIGMA Ref. P 7000), HCl (0,066 N), NaCl (30 mM) y las proteínas de prueba. Las incubaciones se llevaron a cabo a 37°C durante 60 minutos. La digestión se detuvo pasado este tiempo con 30 microlitros de NaHCO<sub>3</sub> (200 mM) (pH 11.0). Se verificó la correcta parada de la digestión mediante una prueba de pH de la proteína sérica bovina digerida.



**Figura 42. Prueba de pH después de la digestión con SGF**

Una vez verificado el proceso, se tomaron 18 µL de todas las muestras: *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma lucidum* digerida, *Ganoderma lingzhi*, *Ganoderma lingzhi* digerida, albúmina de suero bovino, albúmina de suero bovino digerida y fluido



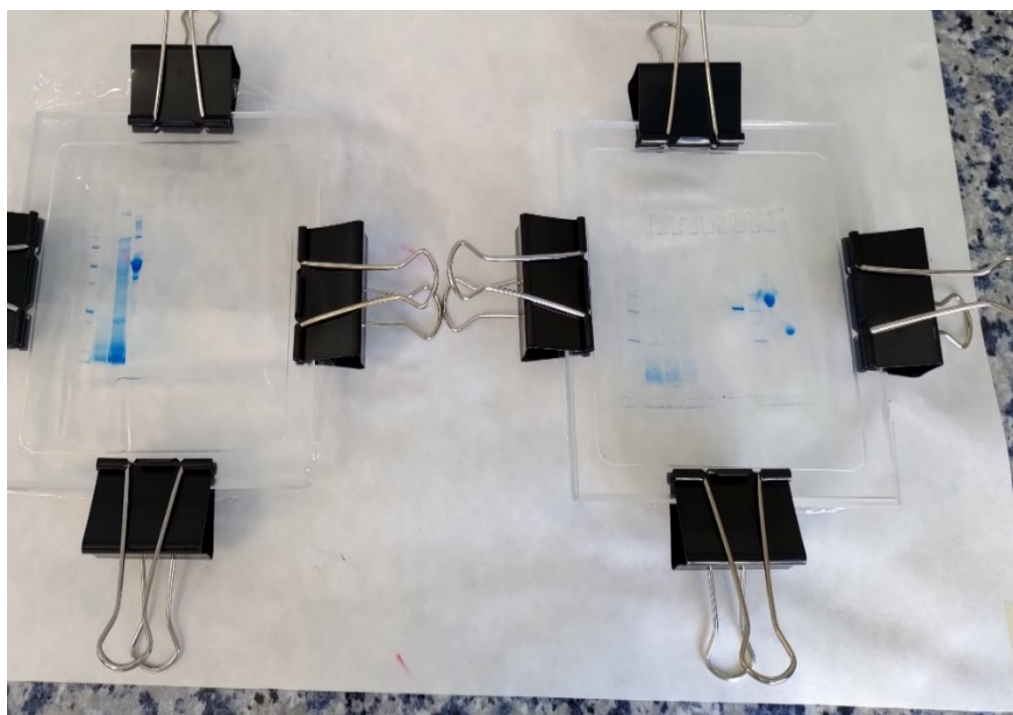


gástrico simulado y se procedió a realizar una electroforesis según la metodología explicada en el punto 5.8 mostrando los resultados en el punto 6.10.

## 5.10 Técnica de conservación entre películas de celofán

Para preparar y conservar los geles de las electroforesis se utilizó la técnica de conservación de geles en celofán (Heda, 2021), pero con concentraciones de un 20% de etanol y un 10% de glicerol.

Esta técnica consiste en hacer un sándwich con 3 capas: celofán, gel de poliacrilamida, y celofán. El gel de poliacrilamida se sumerge en la solución del alcohol y glicerol antes de hacer el sándwich y con unos marcos de plástico y pinzas se sujetan todos los bordes del celofán. Estos marcos se dejan reposar toda la noche y como el celofán es poroso, el alcohol se evapora a través del mismo y el glicerol se queda adherido al gel permitiendo que tenga cierta elasticidad y no se rompa Figura 41



**Figura 43. Técnica de conservación entre películas de celofán**

Dos geles de electroforesis listos para desecarse y conservarse mediante la técnica de celofán.



## 5.11 Digitalización de geles

Para la digitalización de los geles conservados en celofán se utilizó una réflex Nikon D750 con un objetivo AF Micro Nikkor 60mm f/2.8D sobre iluminador de geles disponible en el laboratorio de Bromatología y Nutrición de la Facultad de Medicina. Otras fotografías de geles de la tesis se realizaron con el móvil Asus Zenphone 6 (sensor Sony IMX586, 48MPco, F/1.79).

## 5.12 Análisis informático de datos

La revisión de las secuencias de ADN se realizó mediante el programa BioEdit Sequence Alignment Editor Versión 7.2.5. (Carspad, California, EEUU).

Las rectas patrón de cada método de análisis se realizaron por ajuste de mínimos cuadrados mediante el software Excel 2013, de la suite ofimática de Microsoft Office (Microsoft Corp., Redmond, Washington, Estados Unidos).

El análisis de la varianza (ANOVA) se realizó mediante el software estadístico Statgraphis Centurion 16.1 (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, Virginia, Estados Unidos). Las diferencias entre los tratamientos se compararon mediante la prueba de LSD (Least significant difference) de Fisher con un nivel de confianza del 95,0%.

Para la presentación de algunos resultados gráficos además de Excel 2013 también se utilizó el programa Graph Pad Prism 5 (GraphPad Software. 2365 Northside Dr. Suite 560 San Diego, CA 92108).





## 6 RESULTADOS

### 6.1 Caracterización genética

La determinación genética de todos los hongos del estudio coincidió con la identificación inicial facilitada por las empresas y entidades que suministraron las muestras y micelios.

La longitud de las secuencias de bases obtenidas para los carpóforos de *Ganoderma lingzhi* (C-GZ) y las tres cepas de micelio de *Ganoderma lucidum* (M-GLM, M-GLP y M-GLA) fueron de 593, 590, 630 y 634 nucleótidos respectivamente. Estas secuencias se compararon con secuencias de otros estudios mediante la herramienta BLAST del NCBI tal como recoge la Tabla 2.

**Tabla 2. Identidad de secuencias genéticas de los hongos**

Hongo	Identidad	Cobertura (%)	Valor de E	Identidad	Cepa comparada	Procedencia de la cepa comparada
<b>C-GZ</b>	<i>G. lingzhi</i>	99	0.0	99% 589/591	JQ781855.1	(Y Cao et al., 2012)
<b>M-GLM</b>	<i>G. lucidum</i>	99	0.0	100% 588/588	JQ781851.1	(Y Cao et al., 2012)
<b>M-GLP</b>	<i>G. lucidum</i>	99	0.0	100% 625/625	KU310900.1	(Hennicke et al., 2016)
<b>M-GLA</b>	<i>G. lucidum</i>	97	0.0	99% 615/616	KU310900.1	(Hennicke et al., 2016)

C-GZ: Carpóforos identificados como *Ganoderma lingzhi*, procedentes de cultivo en China. M-GLM: Micelio de *Ganoderma lucidum* originario de Madrid, M-GLP: Micelio de *Ganoderma lucidum* originario de Palencia. M-GLA Micelio de *Ganoderma lucidum* originario de Aveiro (Portugal)



## 6.2 Cultivo

Los resultados de los diferentes cultivos realizados se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3. Resumen de los cultivos de las cepas ibéricas de *Ganoderma lucidum*.**

Cultivo	Cepa	Composición Sustrato	Tipo de Cultivo	Volumen de sustrato (ml)	Tiempo de colonización (días)	Primera cosecha (días)	Tiempo total (días)
1	GLA	20%T – 80% Ch	Frasco	200	28,0 ±2,4	100,75 ±2,2	128,7 ±4,7
1	GLM	20%T – 80% Ch	Frasco	200	26,7 ±3,5	99,5 ±4,3	126,5 ±7,8
1	GLP	20%T – 80% Ch	Frasco	200	35,6 ±8,1	106,0 ±7,0	141 ±15
2	GLM	20%C – 80% Qp	Bolsa	4000	18,7 ± 2,3	79,7 ± 9,8	107,7±19,6

GLA, GLM y GLP: Carpóforos ibéricos de *Ganoderma lucidum* de cultivo en laboratorio provenientes respectivamente de los distritos de Aveiro (Portugal), Madrid (España) y Palencia (España). T: grano integral de trigo (*Triticum aestivum*). Ch: astillas de Chopo (*Populus sp.*). C: grano integral de centeno (*Secale cereale*). Qp: astillas de roble melojo (*Quercus pyrenaica*).

Del Cultivo 1, en botes de 200 mL y destinado a medición de antioxidantes, sólo se recolectaron los carpóforos producidos en el primer ciclo de producción (primera cosecha). Las 3 cepas del cultivo 1 respondieron de una manera muy similar tanto en tiempos de colonización como en fructificación, no habiendo diferencias significativas entre ellas.

El Cultivo 2 tuvo una segunda producción de carpóforos a los 59,3 días desde la primera recolección y una tercera producción residual 58 días después de la segunda cosecha. Todas las fructificaciones fueron recolectadas para el análisis nutricional, perfil de ácidos grasos y extracción de proteínas.



**Figura 44. Cultivos de *Ganoderma lucidum* en bolsa y en frasco**

Cultivo 1: 1) *Ganoderma lucidum* en bolsa, en plena fase de fructificación. 2) Parte de la cosecha de las bolsas. Cultivo 2: 3) *Ganoderma lucidum* cultivada en frascos 4) Parte de la cosecha de los frascos. Fotografías del autor.

### 6.2.1 Seta promedio

Para estimar la seta promedio, se tomaron las medidas y pesos de las setas procedentes del cultivo en bolsa (cultivo 2) antes de enviarlas a analizar nutricionalmente (Figura 30) (n=50). No se tomaron en cuenta las medidas de los carpóforos cultivados en frasco porque en cultivos artificiales destinados a su comercialización el hongo nunca se cultiva en tan poco volumen.

La seta promedio presenta un peso de  $14,97 \pm 7,41$  g con  $6,12 \pm 2,96$  g de sombrero y  $7,77 \pm 5,02$  g de pie con unas medidas de sombrero de  $6,12 \pm 2,96$  cm de ancho por  $4,84 \pm 1,88$  cm de largo. El largo de los pies fue de  $13,55 \pm 6,77$  cm. Los resultados obtenidos muestran que la seta promedio reparte aproximadamente su peso en un 41% para el sombrero y un 59% para el pie.



## 6.3 Caracterización nutricional

### 6.3.1 Entre *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi*

El análisis ha evidenciado diferencias significativas entre las 2 especies para el contenido de fibra dietética, proteínas, cenizas y sodio. En particular *Ganoderma lingzhi* ha mostrado un contenido en fibra de 7,46 g/100g superior a las setas de *Ganoderma lucidum* y 0,0024 g/100g superior en sodio.

*Ganoderma lucidum* tiene una mayor cantidad de proteínas, un 4,24 g/100g superior que *Ganoderma lingzhi* y también presenta un mayor contenido de cenizas, de 1,10 g/100g mayor. Ninguna otra diferencia estadísticamente significativa ha sido evidenciada en las demás variables analizadas (Tabla 4)

**Tabla 4. Comparativa nutricional (%) entre carpóforos de *Ganoderma lingzhi* con carpóforos de *Ganoderma lucidum***

Análisis	G. Lingzhi	G. Lucidum	Incertidumbre del análisis
Fibra dietética (%)	76,81 a	69,35 b	±4.5%
Proteína x4,38 <sup>1</sup> (%)	7,47 a	11,70 b	±3%
Hidratos de carbono (%)	9,88 a	11,02 a	±10.5%
Azúcares totales (%)	<1,00*	<1,00*	±14,0%
Cenizas (%)	1,21 a	2,31 b	±5,0%
Grasa bruta total (%)	1,44 a	1,26 a	±7,0%
Sodio (mg/100gr)	0,0050 <sup>a</sup>	0,0026 b	±12.5%
Calorías	876**	913**	---

\*Límite de detección. \*\*Incertidumbre de análisis no facilitada. Diferentes letras indican diferencias significativas.



### 6.3.2 Entre pies y sombreros de *Ganoderma lucidum*



**Figura 45.** Foto detalle de pies y sombreros de *Ganoderma lucidum*

1) Sombreros de *Ganoderma lucidum*. 2) Pies de *Ganoderma lucidum*.

**Tabla 5.** Comparativa nutricional (%) entre pies y sombreros de carpóforos de *Ganoderma lucidum*

Análisis	Pies	Sombreros	Incertidumbre del análisis
Fibra Dietética	73,68 a	64,33 b	±4,5%
Proteína (Nx4,38)	10,75 a	12,81 b	±3%
Hidratos de Carbono	9,50 a	12,78 b	±10,5%
Azúcares totales	<1,00*	<1,00*	±14%
Cenizas	1,48 a	3,26 b	±5%
Grasa bruta total	<1,00* a	1,38 b	±7%
Sodio	0,0029 a	<0,002* a	±12,5%
Calorías	213**	233**	---

\*Límite de detección. \*\*Incertidumbre de análisis no fue facilitada. Diferentes letras indican diferencias significativas.

El contenido en proteínas, hidratos de carbono, cenizas y grasa total es mayor en los sombreros de *G. lucidum* que en los pies. Destacan un 120% más de cenizas





en sombreros que pies. La fibra dietética de los pies es un 14,5% mayor que las de los sombreros (Tabla 5).

## 6.4 Perfil de ácidos grasos

### 6.4.1 Entre *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi*

De los 46 ácidos grasos analizados, fueron detectados 26 en *Ganoderma lucidum* y 15 en *Ganoderma lingzhi*, todos correspondientes a los detectados también en *Ganoderma lucidum*. Mientras que 20 de los ácidos grasos analizados no se encontraron en ninguna de las dos especies (<0,05%)

Como se muestra en la Tabla 4, la composición porcentual de los diferentes ácidos grasos encontrados en *Ganoderma lingzhi* y *Ganoderma lucidum* fue muy similar, no presentando diferencias significativas en: ácidos grasos monoinsaturados (37,5% y 28,7%), poliinsaturados (43,8% y 49,9%) y saturados (18,6% y 20,8%). Sólo respecto a los ácidos grasos trans se observaron diferencias significativas, con mayor presencia en *Ganoderma lingzhi* (0,1% y 0,3%).

*Ganoderma lingzhi* presenta como ácidos grasos más abundantes: linoléico (43,7%), oléico (34,2%) y palmítico 13,7%, representando el 91,6% del total de los ácidos grasos.

De forma similar, los ácidos grasos más abundantes para *Ganoderma lucidum* fueron linoléico (48,83%), oléico (25,7%) y palmítico (15,0%), representando el 89,6% del total.

Para el resto de ácidos grasos, *Ganoderma lingzhi* presenta un mayor contenido porcentual que *Ganoderma lucidum* en ácido aráquico, margárico, behénico, margaroléico, lignocérico y cis-vaccénico. Mientras que *Ganoderma lucidum* presenta una mayor cantidad porcentual en: ácido  $\alpha$ -linolénico, mirístico, esteárico, cáprico, erúcico, nervónico, elaídico, ácido octadecatrienoico (9t, 12c, 15t), ácido octadecadienoico (9c, 12t) y ácido eicosatrienoico (11 c, 14c, 17c).





**Tabla 6. Comparativa de contenido de ácidos grasos (%) entre carpóforos de *Ganoderma lingzhi* y *Ganoderma lucidum*.**

<b>Ácido graso</b>	<b><i>G. lingzhi</i></b>	<b><i>G. lucidum</i></b>
	<b>±15%</b>	<b>±15%</b>
Ácido decanoico / Cáprico	<0,05* a	0,09 b
Ácido docosahexaenoico (4c, 7c, 10c, 13c, 16c, 19c) / Cervónico	<0,05* a	0,051 a
Ácido docosanoico / Behénico	0,4 a	0,11 b
Ácido docosenoico (13c) / Erúcico	<0,05* a	0,10 b
Ácido dodecanoico / Láurico	<0,05* a	0,06 a
Ácido eicosadienoico (11c, 14c) [C20:2]	<0,05* a	0,31 a
Ácido eicosanoico / Aráquico	0,26 a	0,15 b
Ácido eicosatrienoico (11 c, 14c, 17c)	<0,05* a	0,14 b
Ácido eicosenoico (11c) / Gadoléico	0,2 a	0,27 a
Ácido heptadecanoico / Margárico	0,29 a	0,19 b
Ácido heptadecenoico (10c) / Margaroléico	0,52 a	0,26 b
Ácido hexadecanoico / Palmítico	13,7 a	15,02 a
Ácido hexadecenoico (9c) / cis- Palmitoléico	0,77 a	0,82 a
Ácido octadecadienoico (9c, 12c) / Linoléico	43,7 a	48,83 a
Ácido octadecadienoico (9c, 12t)	<0,05* a	0,09 b
Ácido octadecanoico / Esteárico	1,3 a	2,17 b
Ácido octadecatrienoico (9c, 12c, 15c) / α-Linolénico	0,1 a	0,46 b
Ácido octadecatrienoico (9c, 12t, 15c)	<0,05* a	0,05 a
Ácido octadecatrienoico (9t, 12c, 15t)	<0,05* a	0,09 b
Ácido octadecenoico (11c) / cis- Vaccenico	1,8 a	1,24 b
Ácido octadecenoico (9c) / Oléico	34,2 a	25,73 a



Ácido octadecenoico (9t) / Elaídico	<0,05* a	0,12 b
Ácido pentadecanoico	1,7 a	2,29 a
Ácido tetracosanoico / Lignocérico	0,69 a	0,21 b
Ácido tetracosenoico (15c) / Nervónico	<0,05* a	0,14 b
Ácido tetradecanoico / Mirístico	0,21 a	0,54 b
<b>Ácidos grasos trans</b>	0,1 a	0,31 b
<b>Suma Acidos Grasos monoinsaturados</b>	37,5 a	28,68 a
<b>Suma Acidos Grasos poliinsaturados</b>	43,84 a	49,93 a
<b>Suma de ácidos grasos saturados</b>	18,64 a	20,77 a

Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas. \* Límite de detección.

#### 6.4.2 Entre pies y sombreros de *G. lucidum*

De los 46 ácidos grasos analizados, fueron detectados 24 en pies y 23 en sombreros. Mientras que 19 de los ácidos grasos analizados no se encontraron para ninguna de las dos especies (<0,05%)

**Tabla 7. Comparativa de contenido de ácidos grasos (%) entre pies y sombrero de *Ganoderma lucidum***

Ácido graso	<b>Pies ±15%</b>	<b>Sombrero ±15%</b>
Ácido decanoico / Cáprico	<0,05* a	0,13 b
Ácido docosahexaenoico (4c, 7c, 10c, 13c, 16c, 19c) / Cervónico	<0,05* a	0,052 a
Ácido docosanoico / Behénico	0,15 a	0,068 b
Ácido docosenoico (13c) / Erúcico	0,085 a	0,12 b
Ácido dodecanoico / Láurico	0,076 a	<0,05* b
Ácido eicosadienoico (11c, 14c) [C20:2]	0,33 a	0,28 a
Ácido eicosanoico / Aráquico	0,21 a	0,071 b
Ácido eicosatrienoico (11 c, 14c, 17c)	0,16 a	0,12 a



<i>Ácido eicosenoico (11c) / Gadoléico</i>	0,21 a	0,33 b
<i>Ácido heptadecanoico / Margárico</i>	0,28 a	0,081 b
<i>Ácido heptadecenoico (10c) / Margaroléico</i>	0,31 a	0,2 b
<i>Ácido hexadecanoico / Palmítico</i>	18,7 a	10,7 b
<i>Ácido hexadecenoico (9c) / cis- Palmitoléico</i>	0,94 a	0,67 b
<i>Ácido octadecadienoico (9c, 12c) / Linoléico</i>	49,7 a	47,8 a
<i>Ácido octadecadienoico (9c, 12t)</i>	0,1 a	0,085 a
<i>Ácido octadecanoico / Esteárico</i>	3,4 a	0,73 b
<i>Ácido octadecatrienoico (9c, 12c, 15c) / <math>\alpha</math>-Linoléico</i>	0,47 a	0,44 a
<i>Ácido octadecatrienoico (9c, 12t, 15c)</i>	0,059 a	<0,05* a
<i>Ácido octadecatrienoico (9t, 12c, 15t)</i>	0,12 a	<0,05* b
<i>Ácido octadecenoico (11c) / cis- Vaccenico</i>	1,7 a	0,7 b
<i>Ácido octadecenoico (9c) / Oléico</i>	18,6 a	34,1 b
<i>Ácido octadecenoico (9t) / Elaídico</i>	0,16 a	0,069 b
<i>Ácido pentadecanoico</i>	2,2 a	2,4 a
<i>Ácido tetracosanoico / Lignocérico</i>	0,22 a	0,19 a
<i>Ácido tetracosenoico (15c) / Nervónico</i>	0,12 a	0,17 b
<i>Ácido tetradecanoico / Mirístico</i>	0,8 a	0,24 b
<b>Ácidos grasos trans</b>	0,44 a	0,15 b
<b>Suma Acidos Grasos monoinsaturados</b>	22,1 a	36,4 b
<b>Suma Acidos Grasos poliinsaturados</b>	50,9 a	48,8 a
<b>Suma de ácidos grasos saturados</b>	26 a	14,64 b

Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas. \* Límite de detección.



La composición por tipo de ácidos grasos entre pies y sombreros es muy diferente. Los pies de *Ganoderma lucidum* presentan mayor cantidad de ácidos grasos saturados y ácidos grasos trans que el sombrero. Mientras que el sombrero presenta mayor cantidad de ácidos grasos monoinsaturados. No se encuentra diferencia estadística entre los ácidos grasos poliinsaturados.

El ácido linoléico es el ácido graso más abundante en pies y sombreros de *Ganoderma lucidum*, con un 47,8% y 49,7% respectivamente.

Los pies además presentan, como más abundantes los ácidos palmítico (18,7%), oléico (18,6%) y esteárico (3,4%) y los sombreros, oléico (34,1%), palmítico (10,7%) y pentadecanoico (2,4%).

*Los pies de Ganoderma lucidum* presentan un mayor contenido porcentual que los sombreros en los ácidos: palmítico, esteárico, cis- vaccénico, cis- palmitoléico, mirístico, margaroléico, margárico, aráquico, elaídico, behénico, ácido octadecatrienoico (9t,12c,15t) y láurico. El sombrero presenta un mayor contenido porcentual que los pies en los ácidos: oléico, gadoléico, nervónico, cáprico y erúcico.

## 6.5 Ajustes de los métodos

Los métodos de CUPRAC y Folin tuvieron un ajuste excelente con un  $R^2$  de 0,9985 y 0,9996 respectivamente. El ajuste del método DPPH fue algo peor: 0,9725.

### 6.5.1 Ajustes de la metodología CUPRAC

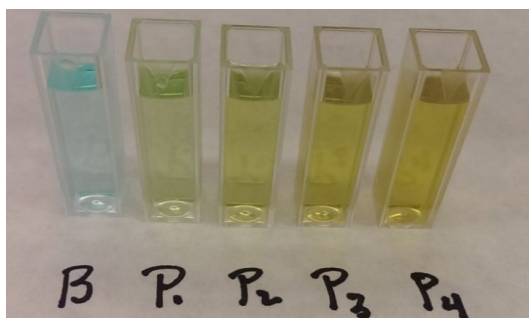


Figura 46. Cubetas patrón del método CUPRAC

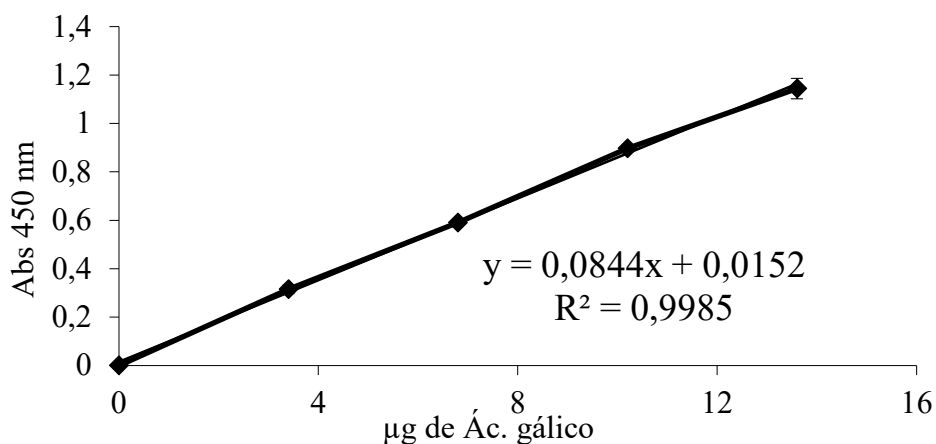


Figura 47. Recta patrón del método CUPRAC

### 6.5.2 Ajustes de la metodología Folin-Ciocalteu

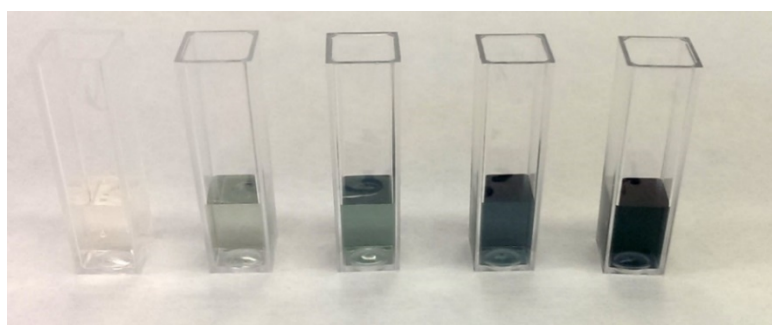


Figura 48. Cubetas patrón del método de Folin-Ciocalteu.

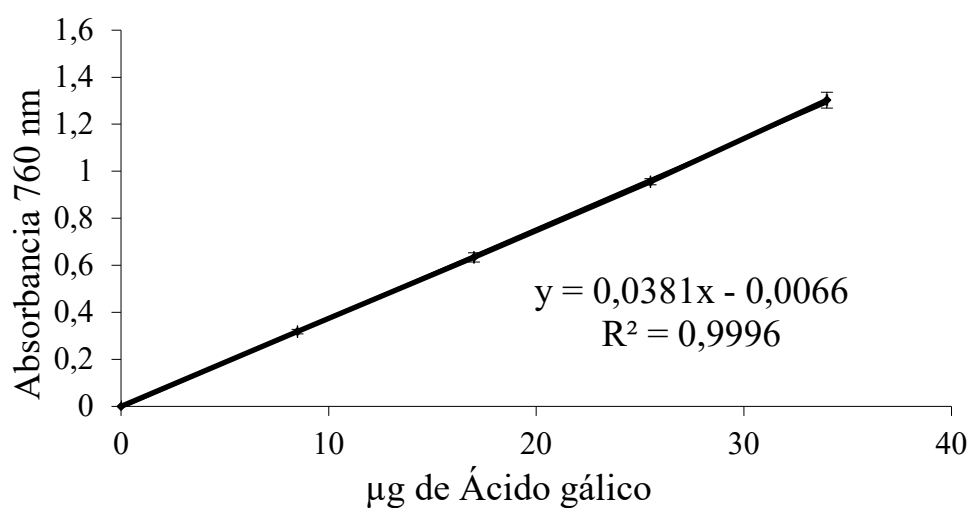


Figura 49. Recta patrón del método Folin-Ciocalteu



### 6.5.3 Ajustes de la metodología del radical DPPH

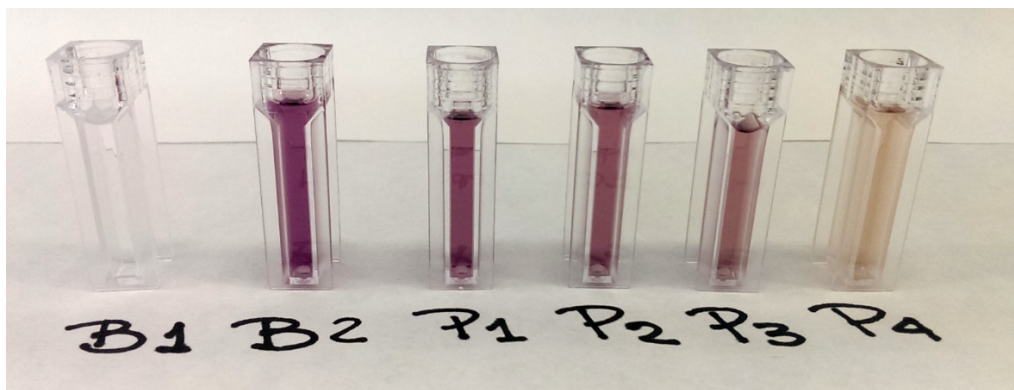


Figura 50. Cubetas patrón del método del radical DPPH

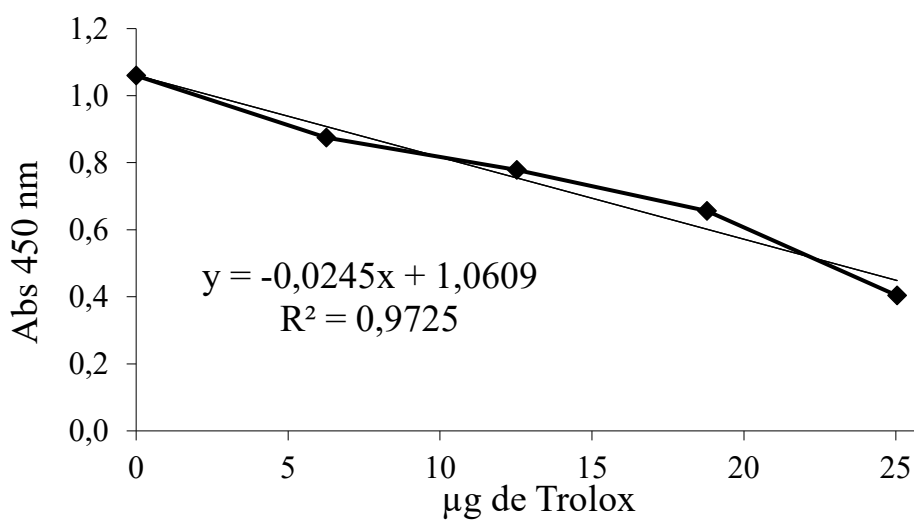


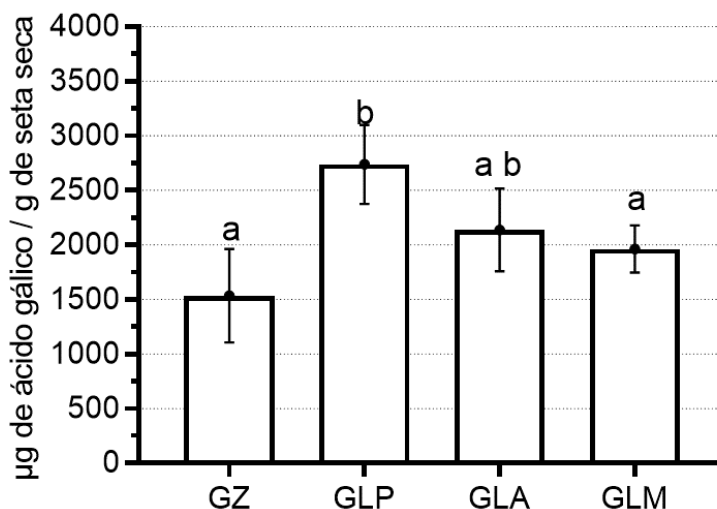
Figura 51. Recta patrón del método del radical DPPH





## 6.6 Comparación de Capacidad Antioxidante

### 6.6.1 Entre *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi*



**Figura 52. Capacidad antioxidante de los distintos carpóforos del estudio. Método CUPRAC**

Diferentes letras indican diferencias significativas entre los taxones ( $p < 0,05$ ). GZ: Carpóforos de *Ganoderma lingzhi* de cultivos asiáticos. GLP, GLA y GLM: Carpóforos ibéricos de *Ganoderma lucidum* de cultivo en laboratorio originarios de Palencia (España), Distrito de Aveiro (Portugal) y Madrid (España), respectivamente.

Los carpóforos obtenidos por cultivo de las diferentes cepas ibéricas de *Ganoderma lucidum* presentaron similar o superior capacidad antioxidante que los carpóforos de *Ganoderma lingzhi* (Figura 52).

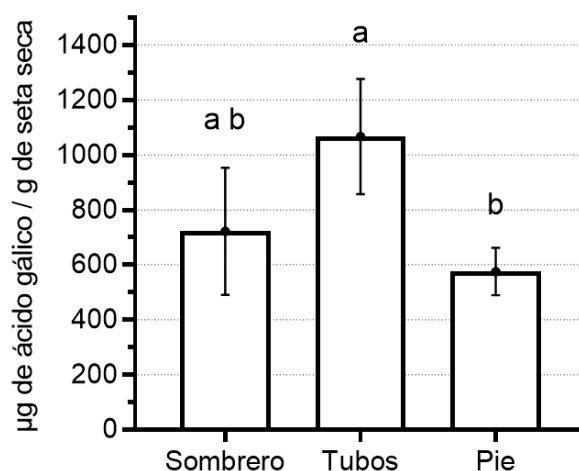
El reishi de la cepa de Palencia superó a *Ganoderma lingzhi* en un 78,5% sobre el valor medio. Ninguna otra cepa ibérica mostró diferencias significativas con *Ganoderma lingzhi*.

El estudio comparativo entre las 3 cepas ibéricas, mostró diferencias significativas entre la cepa de Palencia y la de Madrid, presentando la primera un poder antioxidante 39,6% superior que la segunda.



## 6.6.2 Entre sombrero, pie y tubos de *Ganoderma lucidum*

La carne de los tubos tiene un 85,4% más poder antioxidante que la carne del pie (Figura 53). No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre las otras partes de la seta.



**Figura 53. Capacidad antioxidante de sombrero, tubos y pie de *Ganoderma lucidum*. Método CUPRAC**

Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

## 6.7 Comparación de fenoles totales

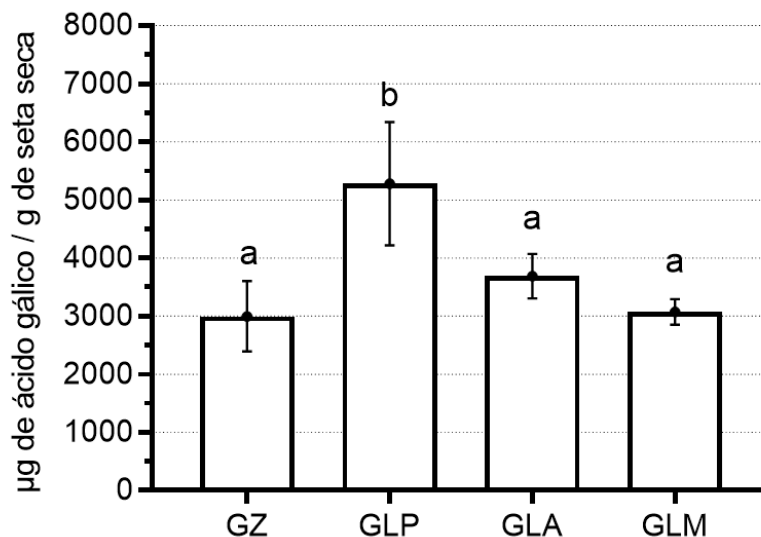
### 6.7.1 Entre *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi*

La Figura 54 muestra el contenido de fenoles totales de las diferentes setas de las cepas de *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi* obtenido mediante el método de Folin-Ciocalteu

Los carpóforos obtenidos por cultivo de las cepas ibéricas de GL presentaron similar o superior cantidad de fenoles totales que los carpóforos de *Ganoderma lingzhi*. GLP superó a GZ en un 76,0% respectivamente sobre el valor medio. Ninguna otra cepa ibérica mostró diferencias significativas con GZ.



GLP presentó un mayor contenido de fenoles que GLM y GLA, diferenciándose de ellos en un 71,6% y 43,1% respectivamente. Estas dos últimas cepas no mostraron diferencias entre sí.



**Figura 54. Contenido en fenoles totales de los distintos carpóforos del estudio.**

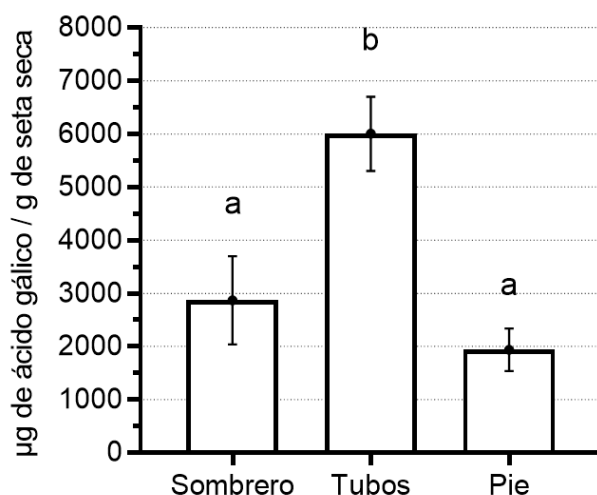
#### **Método Folin-Ciocalteu**

Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). GZ: Carpóforos de *Ganoderma lingzhi* de cultivos asiáticos. GLP, GLM y GLA: Carpóforos ibéricos de *Ganoderma lucidum* de cultivo en laboratorio; Palencia (España), Madrid (España) y Distrito de Aveiro (Portugal) respectivamente.

Tanto para *Ganoderma lucidum* ( $\text{eqCUPRAC} = 789,016 + 0,368916 * \text{eqFolin-Ciocalteu}$ ;  $R^2=86.51\%$ ) como para *Ganoderma lingzhi* ( $\text{eqCUPRAC} = -313,633 + 61,596 * \text{eqFolin-Ciocalteu}$ ;  $R^2=76.37\%$ ) encontramos una correlación positiva entre el contenido de polifenoles y su capacidad antioxidante.

### **6.7.2 Entre sombrero, pie y tubos de *Ganoderma lucidum***

Sólo se encontraron diferencias significativas en contenido fenólico entre tubos y pies de *Ganoderma lucidum*, teniendo los tubos un 210,0% más de contenido en fenoles que los pies.



**Figura 55. Contenido en fenoles totales de sombrero, tubos y pie de *Ganoderma lucidum*. Método Folin-Ciocalteu**

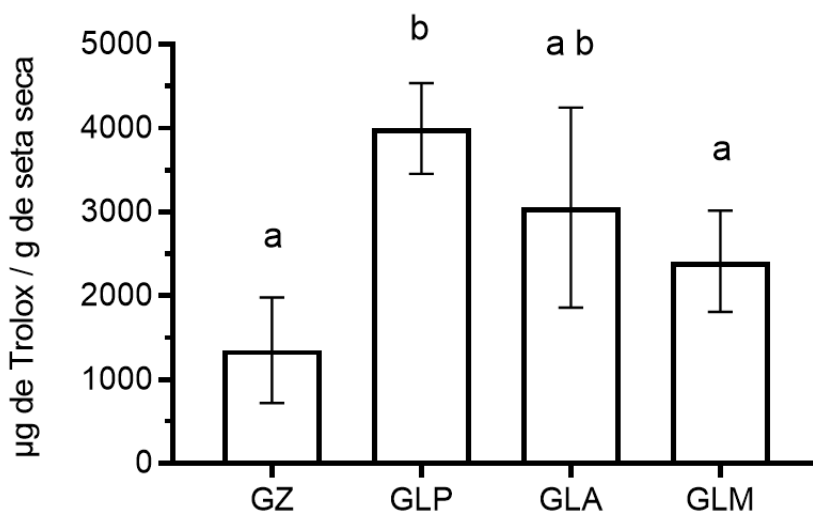
Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

## 6.8 Comparación de capacidad antirradicalaria

### 6.8.1 Entre *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi*

La Figura 56 muestra las propiedades antirradicalarias de las diferentes setas de las cepas de *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi* mediante el método de DPPH.

Los carpóforos obtenidos en cultivos de las cepas ibéricas de GL presentaron similar o superior cantidad de polifenoles que los carpóforos de GZ. GLP superó en cantidad de moléculas antirradicalarias a GZ y a GLM en un 196,5% y un 66,0% respectivamente. Ninguna otra cepa ibérica mostró diferencias significativas con GZ.

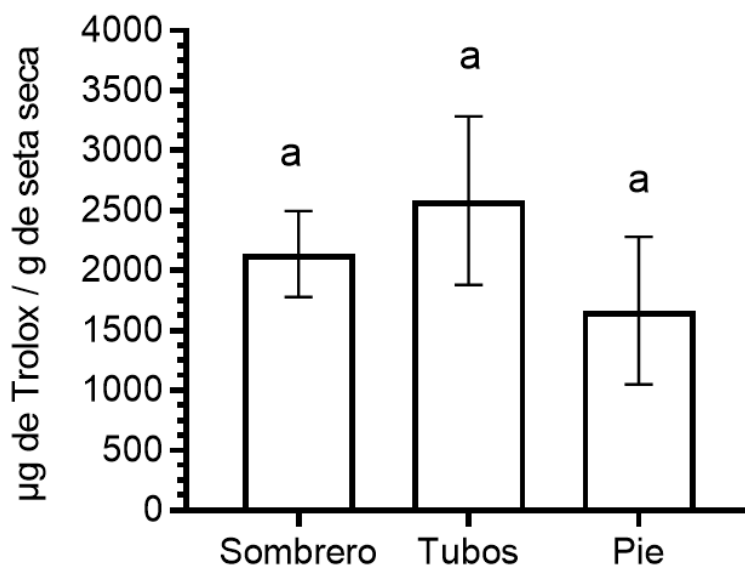


**Figura 56. Contenido de sustancias radicalarias de los distintos carpóforos del estudio. Método del radical DPPH**

Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). GZ: Carpóforos de *Ganoderma lingzhi* de cultivos asiáticos. GLP, GLM y GLA: Carpóforos ibéricos de *Ganoderma lucidum* de cultivo en laboratorio; Palencia (España), Distrito de Aveiro (Portugal) respectivamente y Madrid (España).

### 6.8.2 Entre sombrero pie y tubos de *Ganoderma lucidum*

Como se observa en la Figura 57, no hubo diferencias estadísticamente significativas en contenido en sustancias antirradicalarias entre sombrero, tubos y pies de *Ganoderma lucidum*, aunque las medias parecen mostrar una tendencia similar a las encontradas en otros métodos.



**Figura 57. Contenido de sustancias radicalarias de sombrero, tubos y pie de *Ganoderma lucidum*. Método del radical DPPH**  
Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

## 6.9 Electroforesis

### 6.9.1 Estimación inicial de la cantidad de proteína de las muestras

La cantidad de proteína estimada por la metodología de Kalb y Bernlohr en el extracto 1:10 de reishi (*Ganoderma lucidum*) fue de 0,14 mg/ml. Por ello se estimó que los extractos estudiados en esta tesis debían concentrarse entre 10 y 15 veces para llegar a una cantidad de proteína que fuera visible en las electroforesis, aunque como se verá en las electroforesis de la Figura 58 y Figura 59 esa estimación se quedó por debajo de lo esperado.

### 6.9.2 Concentración y limpieza de proteínas. Elección de método

El resultado de la electroforesis del reishi sometido al método de TCA/acetona y diálisis fue la mostrada en la Figura 58



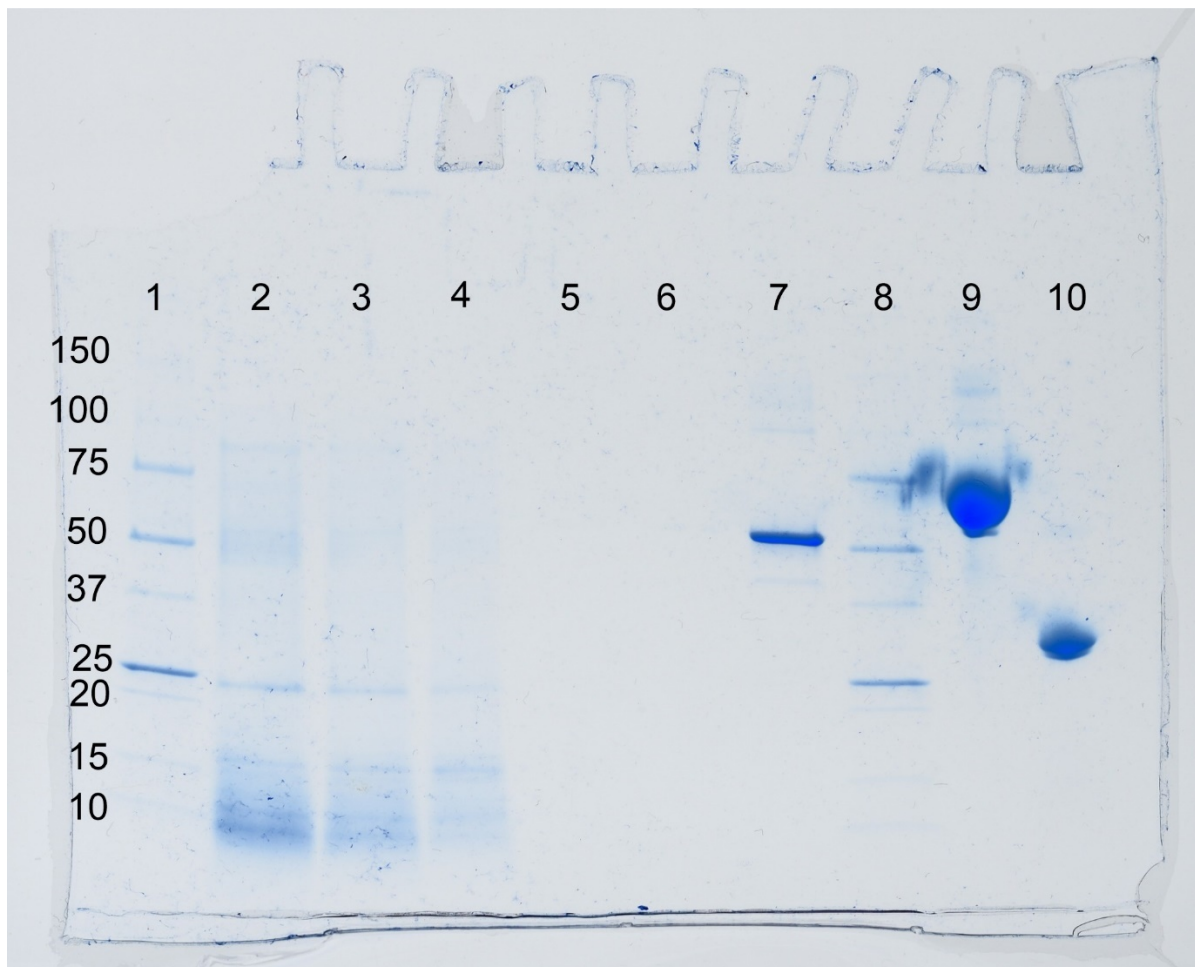


**Figura 58. Electroforesis del método de TCA/Acetona**

Columna 1: Patrones de proteínas. 2: *Ganoderma lucidum* 18 µL de extracto. 3: *Ganodemra lucidum* 10 µL de extracto. 4: *Ganodemra lucidum* 5 µL de extracto. 5: Patrón de albúmina de suero bovino. Se puede apreciar que las bandas de *Ganoderma lucidum* (2, 3 y 4) son muy poco visibles (marcado con una elipse roja).

El resultado de la electroforesis del reishi 1:10 sin purificar y concentrado posteriormente con microtubos centrifugos Amicon ultra-0,5 Centrifugal devices se puede ver en la Figura 59.

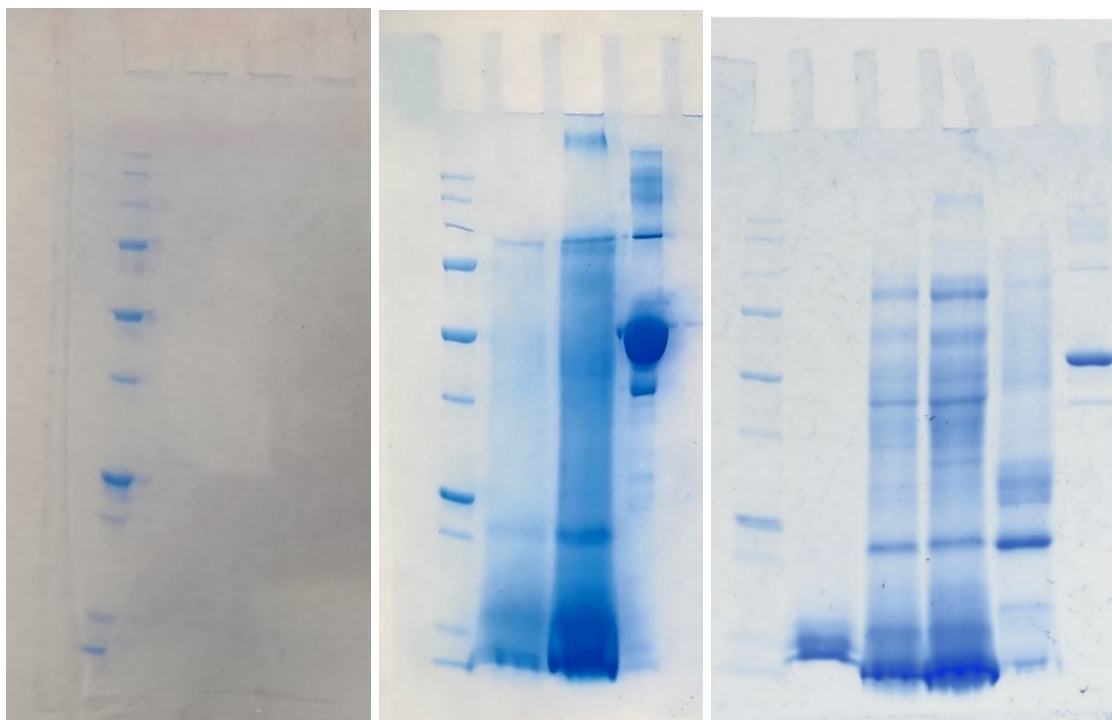
Se adoptó el metodo de concentración por ultrafiltración con tubo centrifugo como método principal de concentración de proteínas de los extractos 1:10, por similitud de resultados y método más sencillo, tal y como se comenta con detalle en el apartado de discusión (punto 7.6).



**Figura 59. Electroforesis extracto concentrado con Amicon ultra-05**

Columnas 1 y 8: Patrones de proteínas. 2: *Ganoderma lucidum* 20  $\mu$ L de extracto. 3: *Ganodemra lucidum* 10  $\mu$ L de extracto. 4: *Ganodemra lucidum* 5  $\mu$ L de extracto. 5: *Ganodemra lucidum* sin concentrar 18  $\mu$ L. 6: *Ganodemra lucidum* sin concentrar 10  $\mu$ L. 7: Albúmina de suero bovino 10  $\mu$ L. 9: Proteína SELfd 10  $\mu$ L procedente de otros ensayos del laboratorio de Bromatología y Nutrición. 10: Proteína *S. nigra* 10  $\mu$ L procedente de otros ensayos del laboratorio de Bromatología y Nutrición.

Además, después de realizar otras electroforesis de prueba (Figura 60) se estimó que había que concentrar los extractos de partida entre 26-31 veces para poder realizar el análisis.



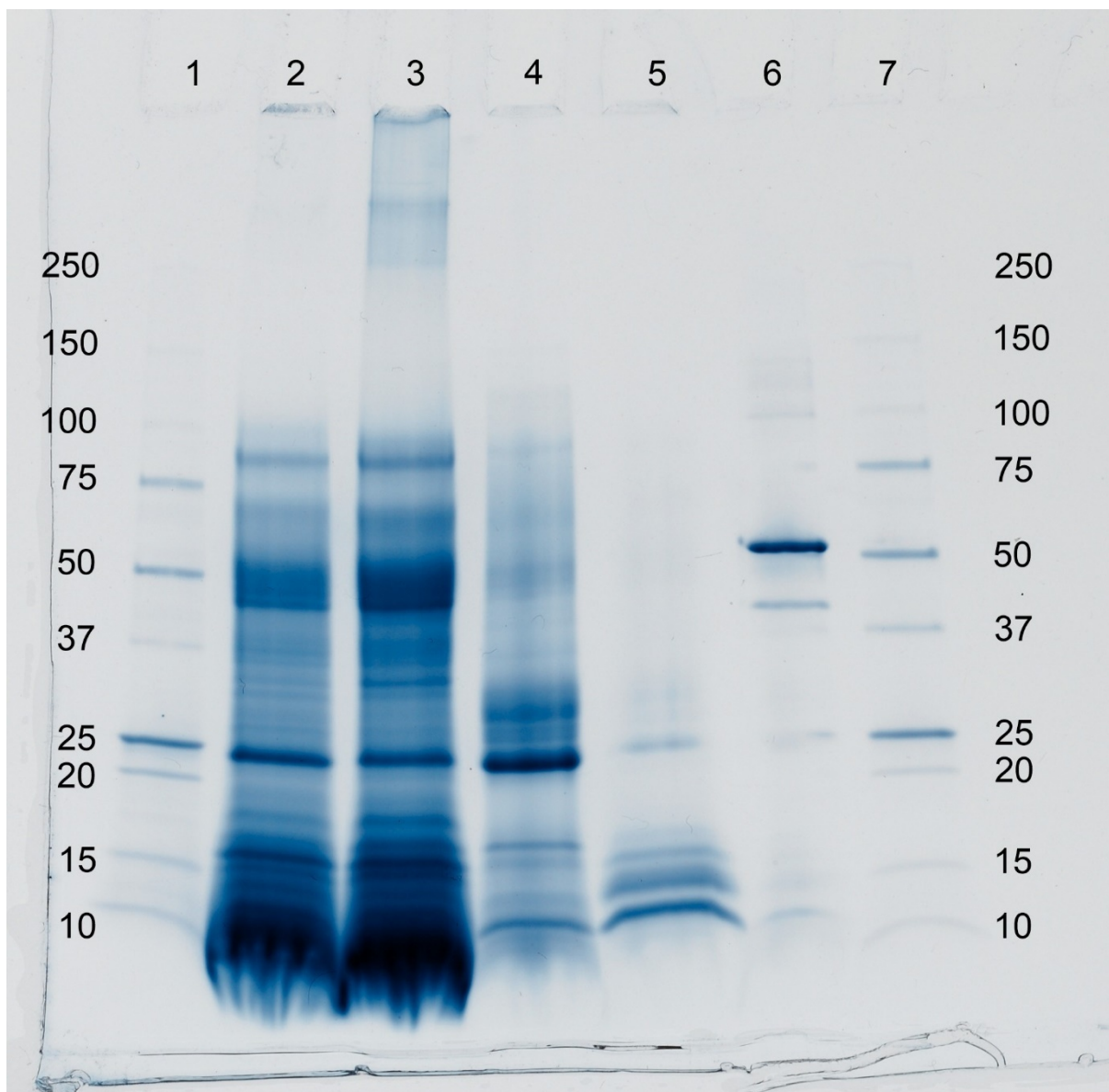
**Figura 60. Otras electroforesis para la puesta a punto del método.**

Izquierda: Muestras 1:10 sin concentrar. Centro: concentradas 4,88 y 54,22 veces (columnas 2 y 3). Derecha: Última prueba de electroforesis con concentración de 32 veces.

### 6.9.3 Diversidad proteica de *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi*

La Figura 61 muestra los perfiles proteicos de *Ganoderma lucidum* entera, pie y sombrero y de *Ganoderma lingzhi* entera.

Se observan grandes diferencias entre los perfiles proteicos de ambas especies. *Ganoderma lucidum* tiene muchas franjas de proteínas de 10 a 100 kD de Mr, mientras que *Ganoderma lingzhi* muestra las principales bandas sólo entre 10 y 15 kD de Mr. Para *Ganoderma lingzhi* también se observa una pequeña banda proteica a una Mr de 25 kD.



**Figura 61. Perfil proteico de diferentes partes de *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi***

Columnas 1 y 7: Patrones de proteínas. 2: *Ganoderma lucidum* entera. 3: *Ganoderma lucidum* sombrero. 4: *Ganoderma lucidum* pie. 5: *Ganoderma lingzhi*. 6: Albúmina de suero bovino.

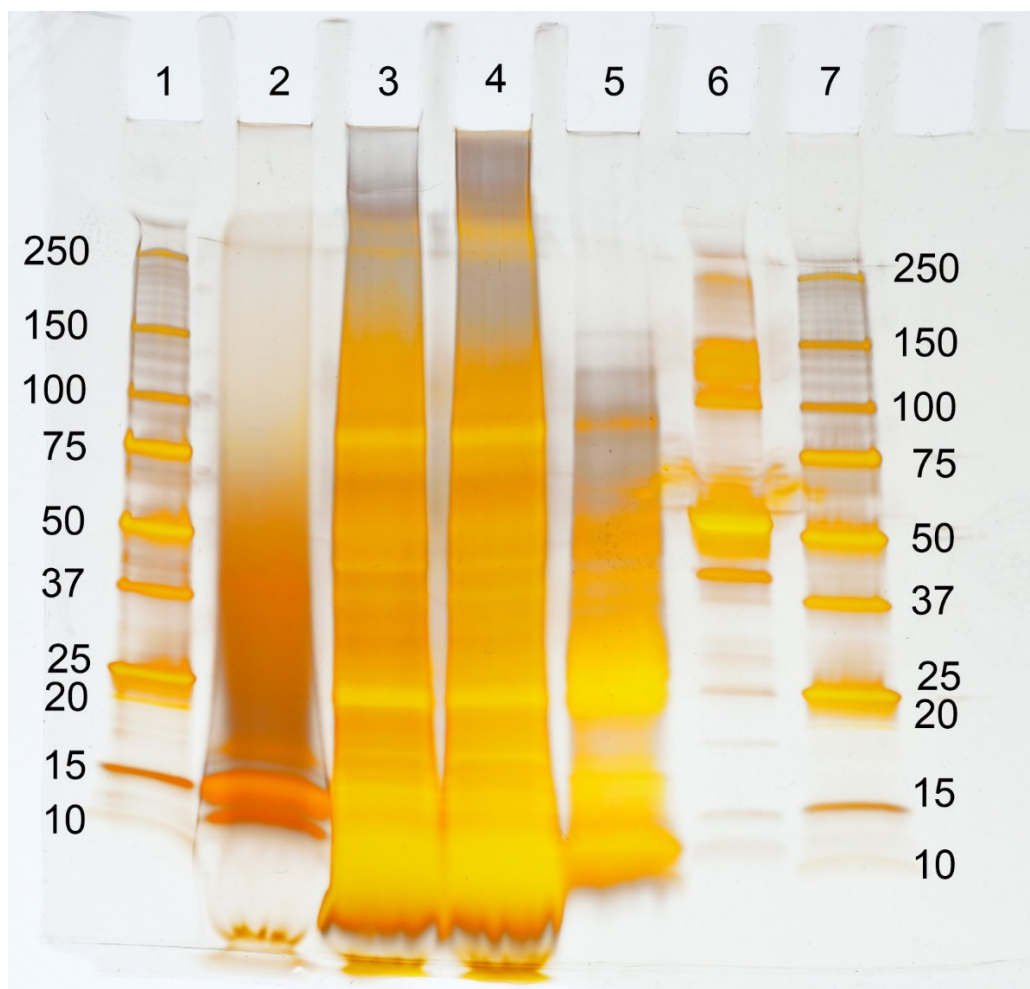
Si comparamos las proteínas de pie y sombrero (columnas 3 y 4), el sombrero parece tener una mayor cantidad de proteínas entre 31 y 100 kD de Mr. El sombrero también parece tener dos bandas de proteínas de gran peso, superiores a un Mr de 250 kD que no presenta el pie. El pie no presenta proteínas por encima de una Mr de





100-110 kD. Por otro lado, el pie parece tener mayor cantidad de proteínas entre 25 a 31kD, pues se ve más coloreada la zona que en el sombrero.

#### 6.9.4 Tinción con plata



**Figura 62 Electroforesis con tinción en plata**

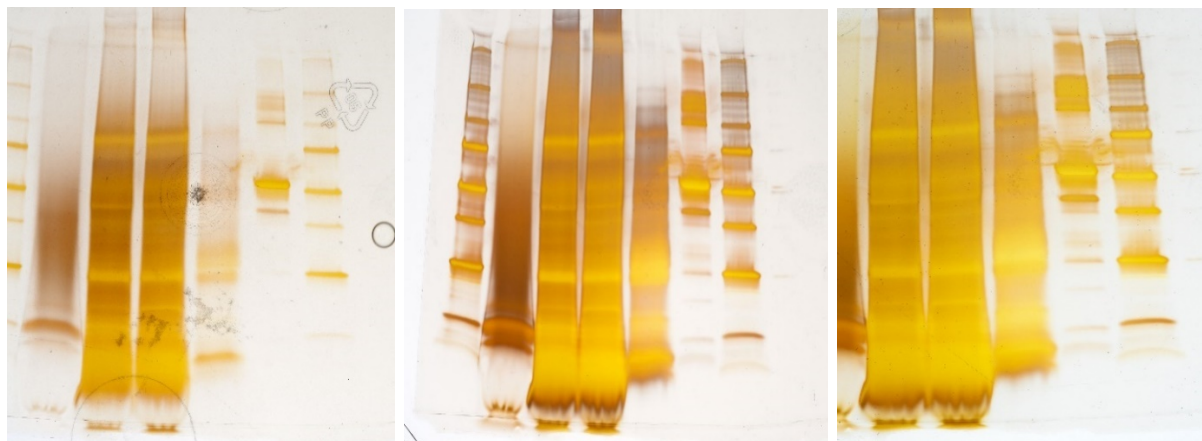
Columnas 1 y 7: Patrones de proteínas. 2: *Ganoderma lingzhi*. 3: *Ganoderma lucidum* completa. 4: *Ganoderma lucidum* sombreros. 5: *Ganoderma lucidum* pies. 6: Albúmina de suero bovino (BSA).

La tinción con plata es capaz de mostrar proteínas en tan poca cantidad que permite observar bandas proteicas intermedias entre las propias proteínas patrón (columnas 1 y 7). Estas bandas no se observan en las tinciones con Coomassie Brilliant Blue R-250. Por otro lado, las bandas de proteínas, tanto del reishi como las



BSA de prueba, tienen tanta proteína que no llegan a teñirse con la plata, quedando de tonalidad más amarilla que proteínas con menor concentración.

También se realizaron varias fotos durante el proceso de revelado de la tinción con plata. (Figura 63). Se observó que el proceso de revelado es muy rápido.



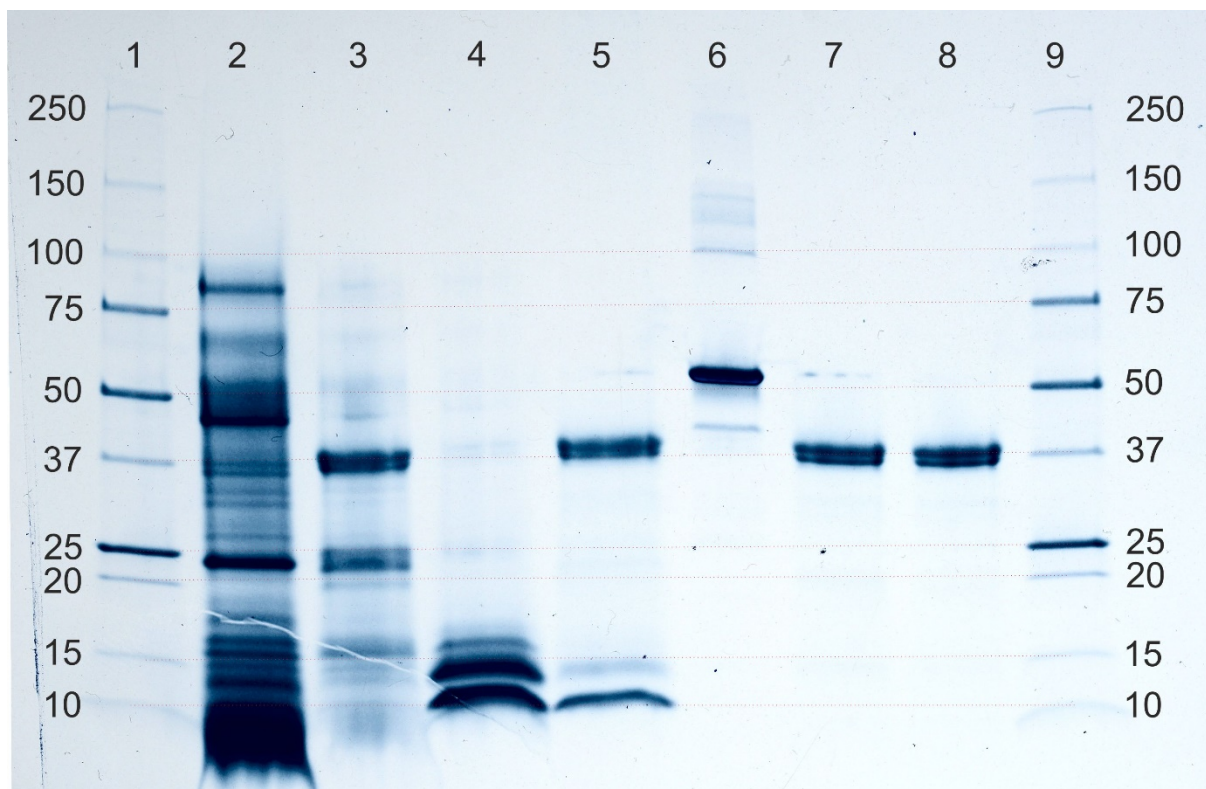
**Figura 63. Proceso de revelado en el método de tinción con plata**

Imágenes tomadas al iniciarse el revelado (izquierda), al minuto 3 (centro) y al minuto 6 (derecha) desde el inicio.

## 6.10 Digestibilidad enzimática en SGF (Simulated Gastric Fluid)

Como se muestra en la Figura 64, el proceso de digestibilidad produce la degradación total de la proteína BSA (columna 7). Cuando esto ocurre aparece sólo una banda de alta intensidad con Mr aparente de 37 kD, correspondiente a la pepsina del SGF. Esta banda se deja ver en todas las muestras de proteína donde se ha incorporado SGF: columnas 3, 5, 7 y 8.





**Figura 64. Digestibilidad proteica de *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi***

Columnas 1 y 9: Patrones de proteínas. 2: *Ganoderma lucidum*. 3: *Ganoderma lucidum* digerida. 4: *Ganoderma lingzhi*. 5: *Ganoderma lingzhi* digerida. 6: Albúmina de suero bovino. 7: Albúmina de suero bovino digerida. 8: Fluido gástrico simulado (SGF).

Cuando *Ganoderma lucidum* se somete a la digestión, la mayoría de las bandas desaparecen, manteniéndose bastante marcadas dos zonas alrededor de los 25 kD y 15 kD. *Ganoderma lingzhi*, después de la digestión, mantiene bandas muy marcadas entre 15 y 12 kD de Mr, producto de la digestión de las proteínas correspondientes a las bandas superiores.



## 7 DISCUSIÓN

### 7.1 Caracterización genética

La caracterización genética es un método que identifica con seguridad los taxones del género *Ganoderma*. La amplificación del ADN por PCR es una técnica de bajo coste y relativamente sencilla, sin embargo, cuando un producto se procesa inadecuadamente y se sobrecalienta, el ADN se daña y el producto no se puede caracterizar genéticamente. Por ello es necesario establecer otros métodos de identificación que, aun siendo más caros, permitan definir perfectamente la especie. En esta tesis se ha encontrado que la electroforesis proteica puede ser un método eficaz para diferenciar ambos taxones, sobre todo en los casos en los que el ADN no pueda ser amplificado.

Por otro lado, la lectura del ADN amplificado requiere aparatos de elevado coste que no están disponibles en la mayoría de los laboratorios y, por ello, lo normal es externalizar todo el proceso de amplificación y lectura del ADN. Depender de una empresa externa puede conllevar retrasos que supongan costes económicos para una empresa (bloqueo de materia prima) o posibles retrasos en estudios de laboratorio. Las electroforesis proteicas desarrolladas en este trabajo, también podrían ser de gran interés en estos casos.

Para no depender del ADN, sería interesante disponer de los perfiles proteicos de otras especies de interés del género *Ganoderma* de amplio uso medicinal en otras partes del mundo como *Ganoderma sinense*, *G. oregonense* y *G. sessile*, que se comercializan pulverizados. Sería interesante continuar los estudios por este lado.

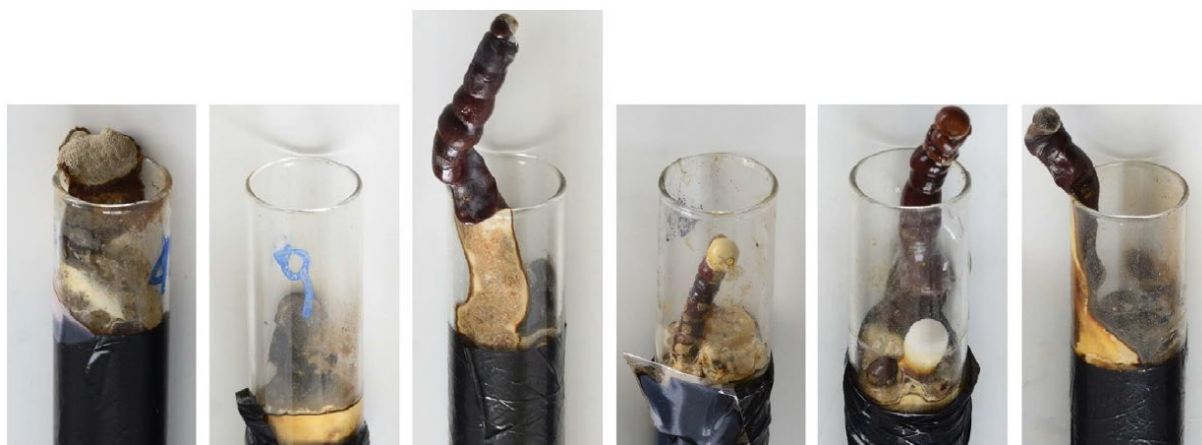
Otro método de identificación de especies sencillo y de bajo coste podría ser el propuesto por la American Pharmacopoeia (Graff, 2006), basado en la identificación de los componentes triterpénicos presentes en las muestras mediante cromatografía en capa fina (Thin layer chromatography, TLC). No obstante, como se comenta en dicha publicación, resulta difícil establecer cuáles son los marcadores de mayor eficacia, debido a la amplia variabilidad de triterpenos que contienen las especies de reishi.



## 7.2 Cultivo

Para la medición de polifenoles y antioxidantes se eligió cultivar las distintas cepas de *Ganoderma lucidum* en madera de chopo (sustrato 1). Esta elección se basó en que existía la posibilidad de las setas de *Ganoderma lingzhi* a comparar se hubieran cultivado en este sustrato, pues ha sido ampliamente utilizado a nivel mundial particularmente en países como India, Irán, Turquía y Nepal, entre otras (E. Erkel, 2009; Mehta et al., 2014; Petre & Teodorescu, 2009; Singh et al., 2014). También porque las especies de *Populus* están ampliamente distribuidas por el planeta, son fáciles de cultivar y muy productivas, lo cual incrementaba la posibilidad de que fueran elegidas para la producción de reishi.

*Ganoderma lucidum* es una especie sencilla para cultivar en laboratorio o interiores. Fructifica tanto en frascos de poco volumen (200 ml) o incluso en volúmenes mucho menores (Ozcariz-Fermoselle, 2018), como en bolsas grandes (4l), como hemos podido comprobar en este trabajo (Figura 65).



**Figura 65. Detalle de fructificación de reishi en tubo de ensayo**

El reishi fructifica en muy poco volumen de sustrato (Ozcariz-Fermoselle et al., 2018).

A pesar de que el cultivo 1 (en frasco) contenía 5 veces menos volumen de sustrato que el cultivo 2 (en bolsa), observamos que la cepa de *Ganoderma lucidum* cultivada en bolsa colonizó y fructificó mucho más rápido que las cepas cultivadas en frascos de cristal. En nuestra experiencia es posible que esto se deba a que para el cultivo 2 se utilizaron bolsas con amplios filtros que permitieron un mejor intercambio gaseoso del hongo, sin embargo, también podría deberse a la diferencia de



composición del sustrato (diferentes maderas de árbol) o a características de las cepas.

Por lo que observamos, este hongo adapta el tamaño de fructificación a la cantidad de alimento de que dispone, siendo más grande cuando más sustrato tiene. Así, el tamaño de los carpóforos fue superior en el sustrato de bolsa que en el del frasco. Esto se debe a que los hongos, antes de fructificar, incluyen en su micelio todos los nutrientes y agua que pueden captar y, desde estos nutrientes ya acumulados, forman sus setas (Cotter, 2014). Si la cantidad de micelio está limitada por el tamaño del envase, la cantidad de nutrientes disponibles en el micelio también lo estará y, por ello, los carpóforos generados serán pequeños.

Por esto, el valor de seta media comentado en los resultados (punto 6.2.1) hay que considerarlo para el volumen de 4l, y quizá no sea comparable con otros tamaños de sustrato.

### 7.3 Análisis nutricionales

Según nuestros conocimientos, este es el primer estudio donde se recogen las características nutricionales de *Ganoderma lingzhi* y, por ello, también el primero en el que se realiza un análisis comparativo entre las propiedades nutricionales de *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi*. También se realiza por primera vez un análisis de las diferencias nutricionales entre pies y sombreros de la *Ganoderma lucidum*.

Nuestros datos han evidenciado que *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi* difieren en el contenido de fibra dietética, proteínas, cenizas y sodio.

Las diferencias encontradas en los valores de fibra dietética y proteínas entre ambas especies de *Ganoderma* merecen ser estudiadas detenidamente, ya que intervienen en sus propiedades medicinales.

Si comparamos los datos nutricionales de *Ganoderma lucidum*, con los recogidos en otras investigaciones vemos que existen diferencias importantes (Tabla 8).



**Tabla 8. Valores nutricionales encontrados para *Ganoderma lucidum* por diferentes autores.**

Referencia	<i>Stojkovic et al. (2014)</i>	<i>Stojkovic et al. (2014)</i>	<i>Ogbe y Obeka (2013)</i>	<i>Stamets (2005)</i>	<i>Nuestro estudio</i>
<b>Variable</b>					
<i>Origen</i>	Serbia**	China*	Nigeria**	NR*	España
<i>Fibra dietética (%)</i>	ND	ND	7,77 ±0,34	66,80	69,35 ±4,5%
<i>Proteínas (%)</i>	11,34 ±1,21	9,93 ±0,26	16,79 ±0,13	15,05	11,7 ±3%
<i>Carbohidratos totales (%)</i>	81,48 ±1,11	78,16 ±0,21	63,27 ±0,20	71,00	11,02 ±10,5%
<i>Cenizas (%)</i>	2,8 ±0,01	8,19 ±0,10	8,42 ±0,13	ND	2,31 ±5%
<i>Grasa bruta total (%)</i>	4,43 ±0	3,72 ±0	1,52 ±0,09	3,48	1,26 ±7%
<i>AG saturados (%/Total AG)</i>	15,67 ±0,03	32,39 ±0,17	ND	13,70	20,77 ±15%
<i>AG monoinsaturados (%/Total AG)</i>	49,63 ±0,02	25,19 ±0,06	ND	60,91	28,68 ±15%
<i>AG polinsaturados (%/Total AG)</i>	34,70 ±0,01	42,42 ±0,11	ND	25,38	49,93 ±15%
<i>Sodio (mg/100g)</i>	ND	ND	229,88 ±0,34	0,006g	0,0026 ±15%
<i>Calorías</i>	410,93 ±0,04	385,86 ±0,29	1417,26 ±0,42	37600	1049,90

\*Cultivado; \*\*Silvestre; ND: No descrito; AG: Ácidos Grasos



### 7.3.1 Fibra

Las paredes celulares de los hongos son el principal aporte de fibra en un hongo. Contienen una mezcla de componentes que incluyen quitina, un polímero de cadena lineal (1 → 4) - $\beta$  de N-acetil-glucosamina), y polisacáridos tales como (1→3) - $\beta$ -D-glucanos y mananos. (Cheung, 2013). El contenido de  $\beta$ -glucanos en la materia seca del hongo suele ser mucho mayor que el de quitina (Cheung, 2013), y son de alto interés para el sistema inmune, como se ha indicado anteriormente.

Dentro de la parte no digerible y no asimilable del reishi encontramos betaglucanos con actividad inmunológica con ramificaciones de tipo (1→3) y (1→6) (Raa, 2015). Un reishi con mayor contenido en fibra tiene una mayor cantidad de  $\beta$ -glucanos y, por ello, podríamos pensar que tienen una mayor actividad sobre el sistema inmune, sin embargo los  $\beta$ -glucanos más activos son los que presentan, además de la ramificación ya comentada, alto peso molecular y conformación espacial en triple hélice (Semedo et al., 2015). Estos autores validaron la técnica de tinción con Rojo Congo en microplacas, técnica sencilla, de alta capacidad y de bajo coste, para detectar espectrofotométricamente estos  $\beta$ -D-glucanos en diferentes especies de hongos. Sería interesante implementar este método relativamente selectivo a las dos especies de hongos estudiados, *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi*, con objeto de conocer cual tiene mayor cantidad de  $\beta$ -D-glucanos de triple hélice y, en base a ello, predecir su actividad sobre el sistema inmune. Parece por tanto necesario realizar más investigación en este aspecto.

Al comparar sombreros y pies de *Ganoderma lucidum* se ha observado que los pies de reishi contienen más fibra que los sombreros (14,5%). Ya que es posible cultivar sólo los pies de las setas (Figura 14), este dato tiene relevancia porque se puede desarrollar un reishi con mejor concentración de  $\beta$ -D-glucanos. Sin embargo, debido a que el sombrero de *Ganoderma lucidum* presenta un 26,1% más de proteínas que los pies y, entre las proteínas de reishi existen varias con acción inmunomoduladora, no es posible discernir con seguridad si un cultivo de pies de reishi (*antled form* – reishi con aspecto de astas de ciervo, con más fibra), tendría más actividad global sobre el sistema inmune que uno cultivado con pies y sombrero (con más cantidad de proteína inmunomoduladora, pero menos fibra). Discernir esto con





cierta seguridad requeriría desarrollar estudios experimentales *in vitro* e *in vivo* comparando las respuestas inmunes en presencia de ambos productos.

Por otro lado, la fibra del reishi también presenta la capacidad de modular la microbiota intestinal incrementando bacterias con efectos positivos en la salud como *Lactobacillales*, *Roseburia* y *Lachnospiraceae*. (Li et al., 2016). Los (1-3) (1-6)- $\beta$ -D-glucanos de largas cadenas ramificadas son buenos prebióticos que estimulan el crecimiento de la flora intestinal beneficiosa. Por ejemplo, se ha visto que llegan a modificar la microbiota de ratones obesos corrigiendo su obesidad (Chang et al., 2015) y recientemente se ha probado que llegan a restaurar la microbiota intestinal alterada de ratas diabéticas, produciendo de nuevo metabolitos reguladores de la glucemia (Chen et al., 2019). Conforme a esto, este 14,5% más de fibra en el pie respecto al sombrero puede ser interesante para el desarrollo un reishi “prebiótico”, con más capacidad de modulación del microbioma intestinal. Sería muy interesante conocer la capacidad moduladora del microbioma de diferentes extractos alcohólicos (etanólicos, metanólicos), concentrados de triterpenos, etc. que carecen de fibra en su composición, ya que el mercado actual tiende a consumir estos extractos en vez de seta pura, que probablemente y en este aspecto sean menos eficaces en la modulación microbiana.

Comparando el contenido en fibra de *Ganoderma lucidum* con otros estudios, (González Matute et al., 2011) encuentran valores de fibra similares a los obtenidos en nuestra experimentación (66,8%), mientras que estos y otros autores (González Matute et al., 2011; Ogbe & Obeka, 2013) encuentran valores inferiores en cepas cultivadas de Taiwán (59,16% $\pm$ 0,85) y silvestres de Nigeria (7,77% $\pm$ 0,34) respectivamente.

### 7.3.2 Proteínas

Como se ha comentado, *Ganoderma lucidum* tiene un 56,6% más de proteína que *Ganoderma lingzhi*. Dentro de las proteínas del reishi existen varias con potencial inmunológico *Ling Zhi-8* y *Ling Zhi-9* (Ahmad et al., 2021; Bastiaan-Net et al., 2013). La proteína *Ling Zhi-8* además presenta propiedades antioxidantes y antibacterianas (Sa-Ard et al., 2015) y reducen la pérdida de masa ósea (Hsu et al., 2014), entre otras actividades. El mayor contenido de proteína que presenta *Ganoderma lucidum* podría



indicar una mayor actividad de los sombreros sobre el pie, en estos aspectos. Sin embargo, al igual que sucedía con la fibra y los  $\beta$ -glucanos inmunomoduladores, habría que distinguir que cantidad de proteína *Ling Zhi-8* tiene cada seta, y no considerar la cantidad global de las proteínas. Para discernir esto se podría utilizar el método Bradford (Bradford, 1976) en la banda proteica correspondiente a la *Ling Zhi-8*. Este es un método colorimétrico sencillo que mide la cantidad de proteínas en base a la absorción del colorante Coomassie Blue R-250 (595 nm) que tiñe las mismas.

Comparando con otras publicaciones, el contenido de proteínas encontrados para *Ganoderma lucidum* en nuestro estudio (11,70%) ha sido prácticamente igual al encontrado en cepas de *Ganoderma lucidum* aisladas en Serbia (11,34% $\pm$ 1,21) y superior al encontrado en China (9,93% $\pm$ 0,26) (Ferreira et al., 2015). Para *Ganoderma lucidum* silvestre de Nigeria se encontró un contenido del 16,79% $\pm$ 0,13 (Ogbe & Obeka, 2013), en Taiwán un 7,92%  $\pm$ 0.54 (González Matute et al., 2011) y para *Ganoderma lucidum* de cultivo en EEUU un 15,05% (Stamets, 2005). Para *Ganoderma lucidum* de origen sin determinar, se ha encontrado un 13,3% de proteína (Chaturvedi et al., 2018). Se observa que las setas analizadas en las zonas de distribución natural de *Ganoderma lingzhi*, China y Taiwán, contienen valores de proteína similares a los obtenidos en este estudio para *Ganoderma lingzhi* (7,47%) siendo inferiores al resto de ubicaciones estudiadas. Sería interesante conocer si esto pudiera deberse a un error de identificación entre ambas especies o a que verdaderamente *Ganoderma lingzhi* tienen menor cantidad de proteína que *Ganoderma lucidum*.

La publicación de Stamets (2005) tiene especial interés porque, además del reishi, el autor analizó las composiciones de proteína de otras setas comestibles y medicinales, todas cultivadas por él en similares condiciones ambientales y sometidas a los mismos métodos analíticos, por lo que se pueden comparar entre ellas y con nuestro estudio. Así, se observa como el contenido proteico en las especies carnosas de setas comestibles, como *Agaricus spp.* o *Pleurotus spp.*, suele ser más abundante que en especies de poliporáceos duros, rondando un contenido entorno al 30%, mientras que las especies de afiloforales fibrosas, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma oregonense* y *Trametes versicolor*, rondan el 10-15% de contenido. Parece



observarse que mientras más dura y resistente es la seta, más porcentaje de fibra contiene y menos porcentaje de proteínas.

Finalmente, atendiendo a otras diferencias analíticas entre las dos especies, las diferencias en sodio entre *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi* probablemente se deban a la diferencia de contenido de este elemento en el sustrato de cultivo. Si el hongo no tiene disponibilidad de un determinado mineral en su sustrato no puede incorporarlo a su micelio y, finalmente, a su carpóforo. Se han realizado pruebas con diferentes oligoelementos añadidos en el cultivo de reishi y se ha constatado que cuando están disponibles el hongo los incorpora a sus carpóforos, como por ejemplo con el selenio (Gasecka et al., 2016) y el cobre (Bidegain et al., 2015). Esto tienen un importante interés en el cultivo de setas, ya que la EFSA permite alegar virtudes saludables a alimentos cuando están en una concentración mínima (el 15% de la ingesta mínima diaria) y, por ello, a un sustrato se pueden agregar plantas ricas en determinados nutrientes para que el producto final contenga mayor cantidad de oligoelementos. Esto se ha encontrado por ejemplo para *Ganoderma lucidum* proveniente de la empresa colaboradora del estudio, cuyas setas son fuente natural de cobre y manganeso, gracias a los sustratos vegetales utilizados en sus cultivos, y por ello puede alegar propiedades beneficiosas sobre el sistema inmune (el cobre “contribuye al funcionamiento normal del sistema inmunitario”) y como antioxidante (manganeso “contribuyen a la protección de las células frente al daño oxidativo”).

## 7.4 Perfil de ácidos grasos

Los ácidos grasos como los ácidos mirístico, pentadecanoico, palmítico, margárico, linoléico y lignocérico son componentes esenciales de la membrana celular y la pared celular del hongo, ejerciendo un efecto protector, y además constituyen la principal reserva energética de alimentos (Satria et al., 2019). Todos estos ácidos se han encontrado tanto en *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi*.

Los ácidos linoléico, oléico y palmítico son los tres ácidos grasos más abundantes detectados en *Ganoderma lucidum*, resultados que están en consonancia con lo descrito en otros estudios (Lv et al., 2012).



Kavishree et al. (2008) indican que la relación linoléico:oléico podría proporcionar un criterio importante, desde un punto de vista quimiotaxonómico, útil para diferenciar entre las especies de un mismo género. En este estudio, la relación para *Ganoderma lucidum* es de 1,9 y de 1,28 para *Ganoderma lingzhi*, por lo que sí se observan diferencias. Sin embargo, en la valoración de estos ácidos grasos en 19 muestras de *Ganoderma lucidum*, obtenidas de diferentes provincias de China, se observaron relaciones que oscilan entre 0,46 y 2,59 (Lv et al., 2012), por lo que consideramos que, por lo menos para el género *Ganoderma*, este índice no tiene validez taxonómica.

Existen ácidos grasos, denominados ácidos grasos esenciales, fundamentales para el buen funcionamiento del organismo que, al no poder sintetizarlos endógenamente, han de ser obtenidos a través de la dieta humana. Entre ellos están los ácidos  $\alpha$ -linolénico (de tipo omega 3) y el linoléico (de tipo omega 6) (Aires et al., 2005). Según los análisis realizados, la cantidad de  $\alpha$ -linolénico en las dos especies estudiadas es prácticamente residual: 0,0066g/100g para *Ganoderma lingzhi* y 0,0013 g/100g para *Ganoderma lucidum*. En cuanto al ácido linoléico la cifra llega a ser de 0,7g/100g y 0,55 g/100g para cada especie respectivamente. Por tanto, si consideramos un consumo de reishi puro al día es de 6 g (Pazzi & Fraile, 2017), el aporte de omega 6 diario sería de aproximadamente 0,0,042g/día para *G. lingzhi* y de 0,033/día para *G. lucidum*, cifras muy alejadas de las recomendadas por EFSA para determinadas alegaciones de salud (al menos 10 g/día de ácido linoleico para “contribuir al mantenimiento de valores normales de colesterol”. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32012R0432>).

## 7.5 Antioxidantes, fenoles y antirradicalarios

Se han encontrado diferencias en cuanto a la concentración de antioxidantes y compuestos fenólicos entre *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi* de hasta 78,5% y 76% respectivamente. Sin embargo, no podemos asegurar que las diferencias se deban a la especie porque la composición del sustrato puede influir en la composición química del carpóforo (Lou et al., 2019), y aunque hemos estimado un posible sustrato para el cultivo, no es seguro que haya sido el utilizado en *Ganoderma lingzhi*.



También se encuentran diferencias entre las cepas de *Ganoderma lucidum*, y en estas tanto el sustrato como la metodología ha sido idéntica. Si bien las 3 cepas de *Ganoderma lucidum* utilizadas aquí se han cosechado en la Península Ibérica, se han recolectado en diferentes ecosistemas de España y Portugal (punto 5.1.1), donde las lluvias, el suelo y la vegetación, entre otras características, son diferentes. Esto, junto con un aislamiento geográfico de las cepas, puede haber condicionado la selección natural/evolución de ecotipos que expliquen esta diferencia en cuanto a los antioxidantes y polifenoles. Esto es bien conocido por los cultivadores de setas, que deben seleccionar los ecotipos adaptados a su clima a la hora de cultivar las especies. Así, por ejemplo, existen setas de *Pleurotus ostreatus* de climas tropicales, templados y fríos, cada una con unos parámetros de cultivo (Cotter, 2014) y que, además, presentan diferentes características organolépticas/químicas.

Dado que la deshidratación del reishi puede influir en el valor antioxidante del producto (Fan et al., 2012) y dado que para *Ganoderma lingzhi* se desconoce tanto su proceso de deshidratación como de trituración, no es posible extraer conclusiones definitivas de cuál es la especie que presenta mayor capacidad antioxidante.

Comparando la capacidad antioxidante y contenido en fenoles de las tres cepas de *Ganoderma lucidum* de la Península Ibérica, la única diferencia estadísticamente significativa se encontró entre las cepas de Palencia y Madrid, siendo la capacidad antioxidante un 28% mayor en la de Palencia y con un 39,6% más de contenido de polifenoles. Stojkovic *et al.* (2014) también encontraron diferencias en contenido fenólico para distintas cepas de *Ganoderma lucidum*, una silvestre de Serbia y otra cultivada en China, obteniendo un resultado de un  $0,37\% \pm 0,00$  para el reishi de Serbia y  $3,30\% \pm 0,03$  para el reishi de China. Considerando que una mayor concentración de antioxidantes y fenoles puede significar una mayor actividad biológica en un organismo, los resultados encontrados en este estudio podrían ser de un interés industrial significativo.



**Figura 66. *Ganoderma lucidum* fructificando al extremo de una bolsa de sustrato**

Palacios *et al.* (2011) compararon el contenido fenólico de 6 especies silvestres de setas comestibles y dos de cultivo: *Boletus edulis* > *Agaricus bisporus* > *Cantharellus cibarius* > *Calocybe gambosa* > *Craterellus cornucopioides* > *Pleurotus ostreatus* > *Lactarius deliciosus* > *Hygrophorus marzuolus*. Los resultados obtenidos en nuestro estudio sitúan a la cepa Palentina de *Ganoderma lucidum* al mismo nivel de *Boletus edulis* en términos de contenido fenólico, mientras que *Ganoderma lingzhi* tiene un contenido fenólico inferior a la de *Agaricus bisporus*. Otros autores han informado que el contenido total de fenoles detectado en los carpóforos de *Ganoderma lucidum* es superior a *Agrocybe aegerita* y *Hericiium erinaceus* (Gasecka *et al.*, 2016). Este mismo autor demostró que el contenido en selenio del sustrato, influye en el contenido fenólico y por tanto en la potencia antioxidante de la seta.

Abdullah *et al.* (2012) realizaron extractos acuosos de 14 especies medicinales y/o comestibles y calcularon el contenido fenólico de estos extractos en mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto (mg EAG/g de extracto). *Ganoderma* presentó el mayor contenido fenólico, 63,51, seguido de *Agrocybe sp.*, 25,4 > *Pleurotus eryngii*, 20,95 > *Volvariella volvaceae*, 20,88 > *Pleurotus flabellatus* 20,24 > *Pleurotus sajor-caju* 17,7 > *Flammulina velutipes*, 16,69 > *Schizophyllum commune*, 16,47 > *Lentinula edodes* 14,7 > *Pleurotus florida* 14,24 > *Termitomyces heimii* 11,31 > *Hericiium erinaceus* 10,2 > *Pleurotus cystidiosus* 9,26 > *Auricularia auricula-judae*, 6,19. Esto deja patente que *Ganoderma lucidum* es un hongo con un alto contenido fenólico, mayor que otras especies de interés culinario y/o medicinal.





Dong *et al.* (2019) sometieron a setas de *Ganoderma lingzhi* recién recolectadas a un tratamiento con oxígeno al 60% para incrementar la formación de fenoles. La mayor concentración de compuestos fenólicos la obtuvo a los 3 días de oxigenación, obteniendo 3,69 mg de EAG/g medidos por el método Folin-Ciocalteu. Nuestro estudio arroja para *Ganoderma lingzhi* valores muy similares: 3,0 mg EAG/ g. Para *Ganoderma lucidum*, Jigni Mishra *et al.* (2018) encuentran 4,13 mg EAG /g de contenido fenólico y, sobre el contenido fenólico, Kim *et al.* (2008) indican 12 compuestos fenólicos como los más abundantes: ácido gálico; pirogalol; ácido 5-sulfosalicílico; ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido gentísico, y los flavonoides naringina, miricetina, quercetina, kaempferol, hesperetina, formononetina y biochanina.

La liofilización es el proceso que mejor conserva las propiedades nutricionales del reishi (Lou *et al.*, 2019). En el presente estudio, *Ganoderma lucidum* se secó con el método más agresivo (aire caliente). Por lo tanto, es posible que el poder antioxidante de los carpóforos ibéricos de *Ganoderma lucidum* se vieran afectados. Desconocemos como se deshidrató *Ganoderma lingzhi*.

Estudiando las diferentes partes de *Ganoderma lucidum*, se encontró que la zona de tubos del sombrero, posee una mayor capacidad antioxidante y concentración de polifenoles que la zona del pie. La carne del sombrero, que está entre el pie y los tubos (Figura 22), parece mostrar una tendencia intermedia, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Estas diferencias en la concentración de fenoles en las diferentes partes de la seta también se han descrito para el níscolo (*Lactarius deliciosus*) y la seta de charol (*Tricholoma portentosum*) (Ferreira *et al.*, 2007) El contenido fenólico determinado por estos autores para los extractos metanólicos de *Lactarius deliciosus* fueron de 17,25 ±0,65 mg/g (10,66±0,52 mg/g para el sombrero y 6,31 ±0,29 mg/g para el pie) y de 10,80 ±0,47 mg/g (6,57±0,31 mg/g para el sombrero y 3,91 ±0,17 mg/g para el pie) en el caso de *Tricholoma portentosum*.

De la misma forma que la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles, se encontraron diferencias en capacidad antirradicalaria entre *Ganoderma lingzhi* y la cepa de Palencia de *Ganoderma lucidum*, teniendo esta última un 296% más de capacidad. De nuevo, hay que considerar lo comentado anteriormente: diferente



secado entre especies y diferente sustrato de cultivo puede provocar oxidaciones de compuestos antirradicalarios y cambiar su capacidad. Aun así, desde nuestros conocimientos, es la primera vez que se analiza la capacidad antirradicalaria de *Ganoderma lingzhi*.

Tel *et al.* (2015) evaluaron la capacidad antirradicalaria de extractos en etil acetato, hexano o metanol de *Ganoderma lucidum*, comparándolos con los mismos extractos de 4 especies de hongos: *Funalia trogii*, *Gyromitra esculenta*, *Lyophyllum decastes* y *Pleurotus ostreatus*. Se utilizó el mismo método del radical DDPPH pero con otros reactivos de control: hidroxianisol butilado como blanco y vitamina E ( $\alpha$ -tocopherol) como captador de radicales libres. Los 5 extractos de mayor poder antirradicalario fueron: *Ganoderma lucidum*-metanol > *Ganoderma lucidum*-etil acetato > *Funalia trogii* etil-acetato > *Gyromitra esculenta*-metanol > *Funalia trogii* - metanol.

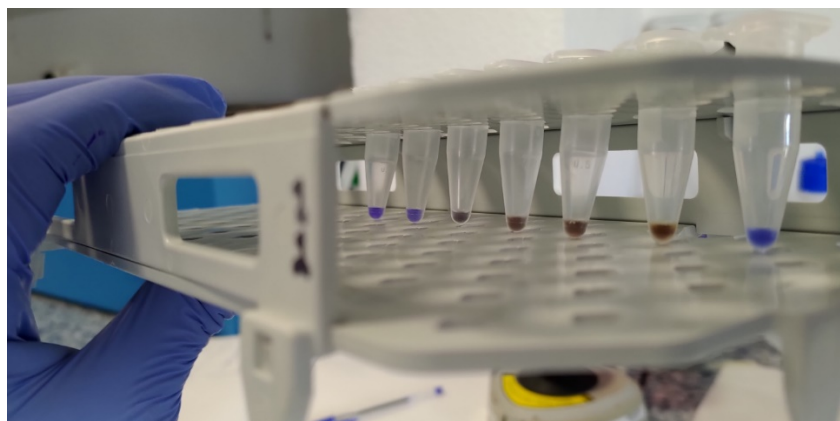
Comparando la capacidad antirradicalaria entre las 3 partes de las setas de *Ganoderma lucidum*: pie, carne del sombrero y tubos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estas. Si observamos la gráfica (Figura 57) parece observarse que la capacidad antirradicalaria sigue una tendencia similar a la obtenida para la actividad antioxidante (CUPRAC, Figura 53) y al contenido en fenoles (Folin-Ciocalteu, Figura 55) y el método, pero la varianza es demasiado grande para poder afirmar estas diferencias. Por otro lado, el ajuste del método del radical DPPH (Figura 51) no fue tan representativo como los ajustes del CUPRAC (Figura 47) y Folin-Ciocalteu (Figura 49), y esto pudo hacer incrementar la varianza de los resultados para no encontrar diferencias estadísticas, no obstante, un  $R^2 = 0,972$  sigue siendo un buen ajuste que no debiera influir tanto en los resultados.

La ausencia de diferencias estadísticas en la capacidad antirradicalaria entre las distintas partes de la seta podría deberse a la existencia de algún tipo de moléculas de alto poder antirradicalario que, estando uniformemente distribuidos por la seta y no tengan elevada capacidad antioxidantes ni contenido fenólico. Sería interesante realizar nuevos análisis con un mayor número de muestras.



## 7.6 Elección de método de concentración de proteínas

Ninguno de los dos métodos utilizados limpia de pigmentos pardo rojizos las muestras de *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi*. Sin embargo, durante el estudio se vio que, si bien el color de las muestras era muy marcado (Figura 67) y llegaba a teñir el carril de la electroforesis de un color pardo (Figura 34) esto no llegaba a apreciarse en las electroforesis finales ya teñidas por Coomassie Blue R-250 (Figura 60, Figura 61) y/o por tinción en plata (Figura 62).



**Figura 67. Detalle de pigmentación de los extractos de *Ganoderma***

Los tubos con coloración rojiza son muestras de *Ganoderma lucidum* justo antes de utilizarlos en una electroforesis.

Comparando las electroforesis obtenidas por ambos métodos (Figura 58 y Figura 59), a pesar de que la concentración de proteína era muy baja, mostraron diferencias que permitieron seleccionar el método de trabajo más adecuado. Así se vio que el método de TCA/acético elimina las proteínas del reishi con un Mr inferior a 10.000 kD (Figura 58, columnas 2, 3 y 4) algo lógico, pues esta muestra se sometió 3 veces a filtración: una por diálisis con membrana a 12.000-14.000 MWCO, otra por ultrafiltración a presión de gas con membrana de 10.000 kD y otra por ultrafiltración con microtubo centrífugo a 10.000 kD. Por el contrario, las muestras 1:10 brutas (Figura 59) al estar solamente sometidas a ultrafiltración con microtubo centrífugo de 10.000 kD de Mr, si muestran proteínas para este peso molecular e incluso por debajo.

Ya que ambos métodos arrojaron resultados similares, se decidió elegir el método de concentración de proteína mediante ultrafiltración con microtubo, pues era



más rápido, sencillo y minimizaba así las posibilidades de errores durante el procesado de las muestras.

## 7.7 Electroforesis y digestibilidad enzimática



**Figura 68. Detalle de una de las electroforesis realizadas**

Esta es la primera vez en la literatura que se realiza una electroforesis de setas de la especie *Ganoderma lingzhi*. Los resultados muestran que *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi* difieren enormemente en su perfil proteico, tanto en la cantidad de proteínas como en su diversidad. *Ganoderma lucidum* muestra una mayor cantidad de proteínas diferentes y con mucha más diversidad de masas. Así, mientras que *Ganoderma lingzhi* presenta casi todo su contenido proteico entre 10 y 18 kD, con otra pequeña región de proteínas en torno a 25 kD, *Ganoderma lucidum* tienen decenas de bandas proteicas desde 10 a 80 kD (Figura 61).

Por ello se puede considerar que la electroforesis proteica en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) es una técnica excelente para distinguir estas dos especies de gran valor económico mundial y ampliamente confundidas en la literatura científica (Hennicke et al., 2016).

Si comparamos los resultados obtenidos en nuestra investigación con la publicada por otros autores, los resultados son diferentes. Kumakura *et al.* (2018)



obtienen para *Ganoderma lucidum* una electroforesis muy similar al perfil proteico hallado en nuestra investigación para *Ganoderma lingzhi*. Es posible que esto se deba a que, al inicio de su estudio, antes de preparar los extractos, confundieran *Ganoderma lucidum* con *Ganoderma lingzhi* y trabajaran con esta segunda pensando que era la primera. Esta confusión es muy frecuente, especialmente antes de 2012, pues no existía diferenciación entre los dos taxones, como hemos comentado en numerosas partes del estudio.

Jeurink *et al.* (2008) realizaron una electroforesis de micelio de *Ganoderma lucidum*. Si la comparamos con nuestros resultados, parece observarse una gran similitud entre las bandas de proteína. Sin embargo, el micelio y seta de *Ganoderma lucidum* (recolectada a los 60 días de crecimiento) comparten únicamente 50 proteínas diferentes de las 247 encontradas para el micelio y 401 para la seta (Yu *et al.*, 2015) Las proteínas compartidas incluyen: *Ling Zhi-8*,  $\alpha$ -galactosidasa, exo-1,3- $\beta$ -glucanasa, factor de elongación de traducción 2, glicósido hidrolasas, aspergillopepsina, y glutatión reductasa y el total de proteínas encontradas, incluyendo las encontradas en distintas fases de crecimiento, son 803.

*Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi* contienen algunas proteínas que son total o parcialmente resistentes a la digestión con SGF. Se acepta que las proteínas resistentes a la pepsina pueden tener efectos alergénicos (Pali-Schöll *et al.*, 2018) y algunas poseen propiedades inmunomoduladoras (Bastiaan-Net *et al.*, 2013; Ou *et al.*, 2009). Sería interesante saber si otras proteínas resistentes de *Ganoderma lucidum*, con un Mr aproximado de 23, 16 y 15 kD, tienen propiedades inmunomoduladoras, ya que parecen ser especialmente abundantes.

Por otro lado, es importante indicar que los productos de degradación generados durante la digestión de las proteínas, tanto fragmentos de proteínas resistentes a la pepsina como péptidos, pueden presentar actividad sobre el organismo. Esto se ha documentado para péptidos provenientes de extractos digeridos de *Ganoderma lucidum*, de actividad hipotensiva (Tran *et al.*, 2014). Por tanto, sería interesante evaluar actividades de los productos de degradación de *Ganoderma lingzhi*.



La digestión de *Ganoderma lingzhi* presenta una proteína resistente de 12kD y muy abundante. Esta podría ser la proteína inmunomoduladora *Lingzhi-8* que se encuentra en *Ganoderma lucidum* cuyo peso molecular es de 12,4 kD (Tanaka et al., 1989). *Lingzhi-8* es una proteína de especial interés debido a su alta actividad biológica que aún está siendo investigada para diferentes fines, como reducción de pérdida de masa ósea (Yang et al., 2020), reducción de inflamación intestinal (Hsu et al., 2013), reducción de progreso en tumores hepáticos (Wu et al., 2015) o apoptosis en células de cáncer gástrico (Liang et al., 2012). Hay que indicar que existe la posibilidad de que el primer aislamiento de la proteína *Lingzhi-8* (Kino et al., 1989) se hubiera realizado en *Ganoderma lingzhi* en lugar de *Ganoderma lucidum*, ya que el aislamiento del hongo se realizó en Japón. Para saber si la proteína encontrada en *Ganoderma lingzhi* es la *Lingzhi-8* se debería realizar la secuenciación de la misma.





## 8 CONCLUSIONES

Este es el primer estudio experimental que desarrolla una electroforesis proteica de *Ganoderma lingzhi*. El perfil de proteínas permite diferenciar claramente *Ganoderma lingzhi* de *Ganoderma lucidum*, dos especies ampliamente comercializadas en el mercado internacional y muy confundidas en bibliografía científica.

En base a nuestros resultados presentamos las siguientes conclusiones:

1. Cepas distintas de *Ganoderma lucidum* aisladas en la Península Ibérica y cultivadas en idénticas condiciones, difieren ampliamente en contenido fenólico, antioxidantes y compuestos antirradicalarios. Esto es de gran interés a la hora de elegir una cepa de reishi para cultivo industrial.
2. Bajo las condiciones propias de esta investigación, se presentaron diferencias en el contenido fenólico, antioxidante y antirradicalario entre *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi*.
3. Hay diferencia en cantidad de fenoles y antioxidantes entre las diferentes partes de un mismo reishi (pie, sombrero y tubos), siendo la diferencia más marcada entre pie y tubos. Debido a que es posible cultivar *Ganoderma lucidum* que desarrolle únicamente pies (“*antled form*”), conocer este dato es de gran interés en cultivos industriales.
4. Desde nuestro conocimiento, también es el primer estudio comparativo entre las propiedades nutricionales de *Ganoderma lingzhi* y *Ganoderma lucidum*, reishis de alto valor económico mundial.
5. Las diferencias nutricionales más importantes entre las dos especies, por su actividad sobre el organismo, son su contenido proteico y el porcentaje de fibra.
6. Pies y sombrero de *Ganoderma lucidum*, presentan diferencias significativas en cuanto a su contenido en fibra y proteína, así como en el perfil de ácidos grasos. El pie es más fibroso y el sombrero tiene más proteína.



7. Las electroforesis proteicas de *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi* pueden utilizarse como método seguro de diferenciación, especialmente útil cuando el ADN ribosomal está dañado.
8. Las setas *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi* contienen proteínas que no se degradan durante la digestión y por tanto con posibles propiedades beneficiosas para el organismo. No obstante, los efectos beneficiosos observados en su uso tradicional podrían deberse también a proteínas y péptidos originados durante el proceso de digestión de estas setas.



## 9 MEDIOS E INSTRUMENTOS

### 9.1 Aislamiento y cultivo de *Ganoderma lucidum*

El aislamiento y cultivo de hongos se realiza en laboratorio 3 de la Cátedra de Micología de la Universidad de Valladolid situado en la ETSIIAA de Palencia.

Todo el equipamiento de cultivo indicado en la metodología está disponible en la Catedra de Micología de la Universidad de Valladolid, Laboratorio 3, exceptuando el triturador vegetal Herkules 4000 que lo facilitó la empresa MundoReishi Salud S.L.

Además de los materiales y equipos indicados en la metodología, se utilizaron los siguientes equipos disponibles en laboratorio 3 de la Cátedra de Micología:

- Balanza de precisión marca BLAUSCAT modelo AH-3100. Capacidad de pesaje 3100 g. Legibilidad 0.1 g.
- Balanza de precisión marca GRAM modelo STA-220E con calibración interna. Capacidad de pesaje 220 g. Legibilidad 0,1 mg.
- Balanza de precisión marca PCE modelo BS 3000. Capacidad de pesaje 3000 g. Legibilidad 0.1 g.
- Bisturí
- Botellas para autoclave
- Carbonato cálcico (Panreac)
- Frascos Erlenmeyer de vidrio de diferentes volúmenes.
- Frigoríficos marca Electrolux
- Guantes de látex estériles
- Imanes agitadores
- Mecheros de alcohol
- Medio de cultivo PDA (patata, dextrosa, agar) BioLife E-500
- Papel de aluminio (albal)
- Papel de filtro convencional
- Parafilm M
- pH metro marca pH-meter basic 20 + CRISON
- Pinzas de acero inoxidable



- Placa con agitador magnético analógico, marca SELECTA P, modelo AGITAMATIC-N. Potencia 630W. Temperatura máxima: 350°C. Velocidad: 60-1600rpm.
- Placas Petri 90 mm
- Termómetro FW21/BRAND
- Tijeras
- Tubos de ensayo 16 mm x 180 mm

## 9.2 Resto de análisis.

Todo el equipamiento de análisis indicado en la metodología está disponible en el laboratorio del área de Bromatología y Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid.

Además de los materiales y máquinas indicadas en la metodología, se utilizaron los siguientes equipos disponibles en el área de Bromatología y Nutrición:

- Agitador magnético ACS-160
- Balanza de precisión marca KERN ABS
- Balanza marca KERN 572
- Baño de agua marca Velp Scientifica (multistirrer 6)
- Botellas de vidrio de diversos volúmenes, desde 5 mL hasta 2 litros
- Cámara CLIMAS, modelo GROW/HR 1300
- Cazoletas de acero inoxidable
- Centrífuga marca Labnet Spectrafuge 24D
- Congelador -24°C marca Fagor
- Crisoles de porcelana
- Cronómetro
- Cubetas de poliestireno para espectrofotometría visible de 3 mL
- Desecador marca Raypa
- Disgregador marca MICCRA D-9 /RT
- Embudos
- Equipo de agua Elix Millipore
- Espátulas



- Espectrofotómetro marca HELIOS modelos Epsilon Thermo Scientific
- Estufa marca P. SELECTA 150 litros
- Frascos Erlenmeyer de vidrio de diferentes volúmenes
- Gradillas para tubos Falcon y para microtubos
- Guantes anticalóricos
- Guantes de látex
- Imanes agitadores y mangos imantados
- Matraces Erlenmeyer de diferentes volúmenes
- Microtubos de plástico de 1,5 y 2 ml
- Mufla CARBOLITE marca J. Jimeno. S.A.
- Papel de filtro convencional marca Afora
- Parafilm M
- pHmetro modelo pH-meter basic 20 + marca CRISON
- Pinzas de acero inoxidable
- Pipetas automáticas modelo Proline Plus marca Biohit
- Pipetas de plástico estériles de 5, 10 y 25 ml
- Probetas de vidrio y de plástico de diferentes volúmenes
- Puntas de pipeta automática
- Tijeras
- Tubos Falcon de 15 y 50 ml
- Vasos de precipitados de vidrio y plástico de diferentes volúmenes.



## 10 BIBLIOGRAFÍA

- Abate, M., Pepe, G., Randino, R., Pisanti, S., Basilicata, M. G., Covelli, V., Bifulco, M., Cabri, W., D'Ursi, A. M., Campiglia, P., & Rodriguez, M. (2020). *Ganoderma lucidum* Ethanol Extracts Enhance Re-Epithelialization and Prevent Keratinocytes from Free-Radical Injury. *Pharmaceuticals (Basel)*, 13(9).
- Abdullah, N., Ismail, S. M., Aminudin, N., Shuib, A. S., & Lau, B. F. (2012). Evaluation of selected culinary-medicinal mushrooms for antioxidant and ACE inhibitory activities. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- Adly, A. (2010). Oxidative Stress and Disease: An Updated Review. *Research Journal of Immunology*, 3.
- Ahmad, R., Riaz, M., Khan, A., Aljamea, A., Algheryafi, M., Sewaket, D., & Alqathama, A. (2021). *Ganoderma lucidum* (Reishi) an edible mushroom; a comprehensive and critical review of its nutritional, cosmeceutical, mycochemical, pharmacological, clinical, and toxicological properties. *Phytother Res*, 35(11), 6030-6062.
- Aires, D., Capdevila, N., & Segundo, M. J. (2005). Ácidos grasos esenciales. *Offarm*, 24(4), 96-102.
- Ajith, T. A., Sudheesh, N. P., Roshny, D., Abishek, G., & Janardhanan, K. K. (2009). Effect of *Ganoderma lucidum* on the activities of mitochondrial dehydrogenases and complex I and II of electron transport chain in the brain of aged rats. *Experimental Gerontology*, 44(3), 219-223.
- Akbar, R., & Yam, W. K. (2011). Interaction of ganoderic acid on HIV related target: molecular docking studies. *Bioinformation*, 7(8), 413-417.
- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
- Amen, Y., Zhu, Q., Tran, H. B., Afifi, M. S., Halim, A. F., Ashour, A., & Shimizu, K. (2017). Partial contribution of Rho-kinase inhibition to the bioactivity of *Ganoderma lingzhi* and its isolated compounds: insights on discovery of natural Rho-kinase inhibitors. *J Nat Med*, 71(2), 380-388.
- Amen, Y. M., Zhu, Q., Tran, H.-B., Afifi, M. S., Halim, A. F., Ashour, A., Mira, A., & Shimizu, K. (2016). Lucidumol C, a new cytotoxic lanostanoid triterpene from *Ganoderma lingzhi* against human cancer cells. *Journal of Natural Medicines*, 70(3), 661-666.
- Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., & Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 85(5), 957-998.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Arora, D. (1986). *Mushrooms demystified*. Ten Speed Press. Berkeley.
- Bastiaan-Net, S., Chanput, W., Hertz, A., Zwitterink, R. D., Mes, J. J., & Wichers, H. J. (2013). Biochemical and functional characterization of recombinant fungal immunomodulatory proteins (rFIPs). *Int Immunopharmacol*, 15(1), 167-175.
- Batbayar, S., Lee, D. H., & Kim, H. W. (2012). Immunomodulation of Fungal  $\beta$ -Glucan in Host Defense Signaling by Dectin-1. *Biomol Ther (Seoul)*, 20(5), 433-445.
- Bernicchia, A., & Gorjón, S. (2020). *Polypores of the Mediterranean Region*.
- Bernicchia, A. (2005). *Polyporaceae s.l.* Edizioni Candusso.
- Bharadwaj, S. (2019). Discovery of *Ganoderma lucidum* triterpenoids as potential inhibitors against Dengue virus NS2B-NS3 protease. *Prep Biochem Biotechnol*, 9(1), 19059.
- Bidegain, M. A., Cubitto, M. A., & 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. *Int J Med Mushrooms*, 17(11), 1095-1105.





- Bidegain, M. A., Palma, S. D., & Cubitto, M. A. (2020). Formulation and Evaluation of a Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes), Nutraceutical Hydroalcoholic Suspension. *Int J Med Mushrooms*, 22(8), 719-730.
- Bijalwan, A., Bahuguna, K., Vasishth, A., Singh, A., Chaudhary, S., Dongariyal, A., Kumar Thakur, T., Kaushik, S., Javed Ansari, M., Alfarraj, S., Ali Alharbi, S., Skalicky, M., & Brestic, M. (2021). Growth performance of *Ganoderma lucidum* using billet method in Garhwal Himalaya, India. *Saudi J Biol Sci*, 28(5), 2709-2717.
- Blum, H., Beier, H., & Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *ELECTROPHORESIS*, 8(2), 93-99.
- Boon, H., & Wong, J. (2004). Botanical medicine and cancer: A review of the safety and efficacy. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 5(12), 2485-2501.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Cao, L., Jin, H., Liang, Q., Yang, H., Li, S., Liu, Z., & Yuan, Z. (2021). A new anti-tumor cytotoxic triterpene from *Ganoderma lucidum*. *Nat Prod Res*, 1-7.
- Cao, Y., Wu, S.-H., & Dai, Y.-C. (2012). Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma* mushroom "Lingzhi". *Fungal Diversity*, 56(1), 49-62.
- Cao, Y., Wu, S. H., & Dai, Y. C. (2012). Species clarification for world-famous medicinal fungus Lingzhi ('*Ganoderma lucidum*') distributed in East Asia. *Fungal Diversity*, 56(1), 49-62.
- Carlsen, M. H., Halvorsen, B. L., Holte, K., Bøhn, S. K., Dragland, S., Sampson, L., Willey, C., Senoo, H., Umezono, Y., Sanada, C., Barikmo, I., Berhe, N., Willett, W. C., Phillips, K. M., Jacobs, D. R., Jr., & Blomhoff, R. (2010). The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutr J*, 9, 3.
- Chandra, D., & Dhanasekaran, M. (2019). *Medicinal Mushrooms. Recent Progress in Research and Development* (1 ed.). Springer, Singapore.
- Chang, C. J., Lin, C. S., Lu, C. C., Martel, J., Ko, Y. F., Ojcius, D. M., Tseng, S. F., Wu, T. R., Chen, Y. Y., Young, J. D., & Lai, H. C. (2015). *Ganoderma lucidum* reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota. *Nat Commun*, 6, 7489.
- Chatterjee, S., Biswas, G., Basu, S. K., & Acharya, K. (2011). Antineoplastic effect of mushrooms: a review. *Australian Journal of Crop Science*, 5(7), 904-911.
- Chaturvedi, V. K., Agarwal, S., Gupta, K. K., Ramteke, P. W., & Singh, M. P. (2018). Medicinal mushroom: boon for therapeutic applications. *3 Biotech*, 8(8), 334.
- Chen, J., Shi, Y., He, L., Hao, H., Wang, B., Zheng, Y., & Hu, C. (2016). Protective roles of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Int J Biol Macromol*, 92, 278-281.
- Chen, M., Xiao, D., Liu, W., Song, Y., Zou, B., Li, L., Li, P., Cai, Y., Liu, D., Liao, Q., & Xie, Z. (2019). Intake of *Ganoderma lucidum* polysaccharides reverses the disturbed gut microbiota and metabolism in type 2 diabetic rats. *Sci Rep*.
- Chen, Y., Qiao, J., Luo, J., Wu, F., Meng, G., Chen, H., Zheng, H., & Xu, J. (2011). [Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on advanced glycation end products and receptor of aorta pectoralis in T2DM rats]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 36(5), 624-627.
- Cheng, P. G., Phan, C. W., Sabaratnam, V., Abdullah, N., Abdulla, M. A., & Kuppasamy, U. R. (2013). Polysaccharides-Rich Extract of *Ganoderma lucidum* (M.A. Curtis:Fr.) P. Karst Accelerates Wound Healing in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 671252.
- Cheung, P. C. K. (2013). Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: Preparation and health benefits. *Food Science and Human Wellness*, 2(3), 162-166.



- Chiu, H. F., Fu, H. Y., Lu, Y. Y., Han, Y. C., Shen, Y. C., Venkatakrisnan, K., Golovinskaia, O., & Wang, C. K. (2017). Triterpenoids and polysaccharide peptides-enriched *Ganoderma lucidum*: a randomized, double-blind placebo-controlled crossover study of its antioxidation and hepatoprotective efficacy in healthy volunteers. *Pharm Biol*, 55(1), 1041-1046.
- Collado Mateo, D., Pazzi, F., Dominguez Munoz, F. J., Martin Martinez, J. P., Olivares, P. R., Gusi, N., & Adsuar, J. C. (2015). *Ganoderma lucidum* improves physical fitness in women with fibromyalgia. *Nutr Hosp*, 32(5), 2126-2135.
- Cotter, T. (2014). *Organic mushroom farming and mycoremediation. Simple to advanced and experimental techniques for indoor and outdoor cultivation*. (S. W. R. J. Chelsea Green Publishing, 85 North Main Street, VT 05001, Ed.).
- Crisan, E. V., & Sands, A. (1978). Nutritional value. In S. T. Chang, & W. A. Hayes. . *The biology and cultivation of edible mushrooms.*, 137-165.
- Cui, X. Y., Cui, S. Y., Zhang, J., Wang, Z. J., Yu, B., Sheng, Z. F., Zhang, X. Q., & Zhang, Y. H. (2012). Extract of *Ganoderma lucidum* prolongs sleep time in rats. *J Ethnopharmacol*, 139(3), 796-800.
- Curvetto, N. R., Figlas, D., Devalis, R., & Delmastro, S. (2002). Growth and productivity of different *Pleurotus ostreatus* strains on sunflower seed hulls supplemented with N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and/or Mn(II). *Bioresour Technol*, 84(2), 171-176.
- Donatini, B. (2010). Prevention of recurrence of herpes virus infection with *Ganoderma lucidum* plus *Coriolus versicolor*. *Prévention des récurrences d'herpès par l'association Ganoderma lucidum + Coriolus versicolor*, 8(4), 259-260.
- Donatini, B. (2014). Control of oral human papillomavirus (HPV) by medicinal mushrooms, *Trametes versicolor* and *Ganoderma lucidum*: a preliminary clinical trial. *Int J Med Mushrooms*, 16(5), 497-498.
- Dong, Q., Li, Y., Liu, G., Zhang, Z., Zhou, H., & Yang, H. (2019). High Oxygen Treatments Enhance the Contents of Phenolic Compound and Ganoderic Acid, and the Antioxidant and DNA Damage Protective Activities of *Ganoderma lingzhi* Fruiting Body. *Front Microbiol*, 10, 2363.
- el-Mekkawy, S., Meselhy, M. R., Nakamura, N., Tezuka, Y., Hattori, M., Kakiuchi, N., Shimotohno, K., Kawahata, T., & Otake, T. (1998). Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 49(6), 1651-1657.
- Eo, S. K., Kim, Y. S., Lee, C. K., & Han, S. S. (2000). Possible mode of antiviral activity of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* on herpes simplex viruses. *Journal of Ethnopharmacology*, 72(3), 475-481.
- Erkel, E. (2009). The effect of different substrate mediums on yield of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. *Journal of Food Agriculture & Environment Journal of Food Agriculture & Environment*, 77, 841-844.
- Erkel, E. I. (2009). Yield performance of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst cultivation on substrates containing different protein and carbohydrate sources. *African Journal of Agricultural Research*, 4, 1331-1333.
- Fan, L., Li, J., Deng, K., & Ai, L. (2012). Effects of drying methods on the antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1849-1854.
- FanChiang, Y., ChienYan, H., & HanMing, C. (2003). Use of stillage grain from a rice-spirit distillery in the solid state fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry*, 39 (1)(21-26).
- Fatmawati, S., Kondo, R., & Shimizu, K. (2013). Structure-activity relationships of lanostane-type triterpenoids from *Ganoderma lingzhi* as alpha-glucosidase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 23(21), 5900-5903.
- Fatmawati, S., Shimizu, K., & Kondo, R. (2011). Ganoderol B: A potent alpha-glucosidase inhibitor isolated from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. *Phytomedicine*, 18(12), 1053-1055.
- Ferreira, I. C., Barros, L., & Abreu, R. M. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Curr Med Chem*, 16(12), 1543-1560.



- Ferreira, I. C., Heleno, S. A., Reis, F. S., Stojkovic, D., Queiroz, M. J., Vasconcelos, M. H., & Sokovic, M. (2015). Chemical features of *Ganoderma* polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities. *Phytochemistry*, *114*, 38-55.
- Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P., Vilas-Boas, M., & Barros, L. (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*, *100*(4), 1511-1516.
- Fraile-Fabero, R., Ozcariz-Fermoselle, M. V., Oria-de-Rueda-Salgueiro, J. A., Garcia-Recio, V., Cordoba-Diaz, D., Jiménez-López, M. P., & Girbés-Juan, T. (2021). Differences in Antioxidants, Polyphenols, Protein Digestibility and Nutritional Profile between *Ganoderma lingzhi* from Industrial Crops in Asia and *Ganoderma lucidum* from Cultivation and Iberian Origin. *Foods*, *10*(8).
- Gallardo, I. F. B., Camacho, M. E. I., Robles, L. I. V., Celis, A. C., & Partida, A. H. (2014). Estrés oxidante: el sistema enzimático glutatión y la salud bucal [10.1016/j.cc.2015.06.002]. *Ciencias Clínicas*, *15*(1), 2-8.
- Gao, J. J., Nakamura, N., Min, B. S., Hirakawa, A., Zuo, F., & Hattori, M. (2004). Quantitative determination of bitter principles in specimens of *Ganoderma lucidum* using high-performance liquid chromatography and its application to the evaluation of *Ganoderma* products. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *52*(6), 688-695.
- Gao, Y., Lan, J., Dai, X., Ye, J., & Zhou, S. (2004). A Phase I/II Study of Ling Zhi Mushroom (<i>Ganoderma lucidum</i>) (W.Curt.:Fr.)Lloyd (Aphyllphoromycetidae) Extract in Patients with Type II Diabetes Mellitus. *6*(1), 8.
- Gao, Y., Zhou, S., Jiang, W., Huang, M., & Dai, X. (2003). Effects of Ganopoly® (a *Ganoderma lucidum* polysaccharide extract) on the immune functions in advanced-stage cancer patients. *Immunological Investigations*, *32*(3), 201-215.
- Gasecka, M., Mleczek, M., Siwulski, M., Niedzielski, P., & Kozak, L. (2016). Phenolic and flavonoid content in *Hericium erinaceus*, *Ganoderma lucidum*, and *Agrocybe aegerita* under selenium addition [Article]. *Acta Alimentaria*, *45*(2), 300-308.
- Gauthier, L. D., Greenstein, J. L., Cortassa, S., O'Rourke, B., & Winslow, R. L. (2013). A computational model of reactive oxygen species and redox balance in cardiac mitochondria. *Biophys J*, *105*(4), 1045-1056.
- Geng, X., Zhong, D., Su, L., Lin, Z., & Yang, B. (2020). Preventive and therapeutic effect of *Ganoderma lucidum* on kidney injuries and diseases. *Oxid Med Cell Longev*, *87*, 257-276.
- Ghajari, G., Nabiuni, M., & Amini, E. (2021). The association between testicular toxicity induced by Li<sub>2</sub>Co<sub>3</sub> and protective effect of *Ganoderma lucidum*: Alteration of Bax & c-Kit genes expression. *Tissue Cell*, *72*, 101552.
- González Matute, R., Figlas, D., & Curvetto, N. (2011). *Agaricus blazei* production on non-composted substrates based on sunflower seed hulls and spent oyster mushroom substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*(6), 1331-1339.
- Goodridge, H. S., Wolf, A. J., & Underhill, D. M. (2009). Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol Rev*, *230*(1), 38-50.
- Graff, A. (2006). *Reishi Mushroom. Ganoderma lucidum. Standards of Analysis, Quality Control and Therapeutics* (R. U. Herbalist, Ed.).
- Guan, S. H., Xia, J. M., Yang, M., Wang, X. M., Liu, X., & Guo, D. A. (2008). Cytotoxic lanostanoid triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Asian Natural Products Research*, *10*(8), 695-700.
- Guo, W. L., Pan, Y. Y., Li, L., Li, T. T., Liu, B., & Lv, X. C. (2018). Ethanol extract of *Ganoderma lucidum* ameliorates lipid metabolic disorders and modulates the gut microbiota composition in high-fat diet fed rats. *Food Funct*, *9*(6), 3419-3431.



- Gupta, A., Kirar, V., Keshri, G. K., Gola, S., Yadav, A., Negi, P. S., & Misra, K. (2014). Wound healing activity of an aqueous extract of the Lingzhi or Reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (higher Basidiomycetes). *Int J Med Mushrooms*, 16(4), 345-354.
- Halliwell, B., & Cross, C. E. (1991). Reactive oxygen species, antioxidants, and acquired immunodeficiency syndrome. Sense or speculation? *Archives of Internal Medicine*, 151(1), 29-31.
- Hameed, A., Hussain, S. A., Yang, J., Ijaz, M. U., Liu, Q., Suleria, H. A. R., & Song, Y. (2017). Antioxidants Potential of the Filamentous Fungi (*Mucor circinelloides*). *Nutrients*, 9(10).
- Han, H. F., Nakamura, N., & Hattori, M. (2006). Protective effects of an acidic polysaccharide isolated from fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* against murine hepatic injury induced by *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide. *Journal of Natural Medicines*, 60(4), 295-302.
- He, C. Y., Li, W. D., Guo, S. X., Lin, S. Q., & Lin, Z. B. (2006). Effect of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* on streptozotocin-induced diabetic nephropathy in mice. *J Asian Nat Prod Res*, 8(8), 705-711.
- Heda, G. D. (2021). A simple method of drying polyacrylamide slab gels that eliminates cracking. *Biotechniques*, 70(1), 54-57.
- Henao, S. L. D., Urrego, S. A., Cano, A. M., & Higuera, E. A. (2018). Randomized Clinical Trial for the Evaluation of Immune Modulation by Yogurt Enriched with beta-Glucans from Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes), in Children from Medellín, Colombia. *Int J Med Mushrooms*, 20(8), 705-716.
- Hennicke, F., Cheikh-Ali, Z., Liebisch, T., Maciá-Vicente, J. G., Bode, H. B., & Piepenbring, M. (2016). Distinguishing commercially grown *Ganoderma lucidum* from *Ganoderma lingzhi* from Europe and East Asia on the basis of morphology, molecular phylogeny, and triterpenic acid profiles. *Phytochemistry*, 127, 29-37.
- Heriansyah, T., & Nurwidyaningtyas, W. (2019). Polysaccharide peptide (PsP) *Ganoderma lucidum*: a potential inducer for vascular repair in type 2 diabetes mellitus model. 15, 419-427.
- Hijikata, Y., Yamada, S., & Yasuhara, A. (2007). Herbal mixtures containing the mushroom *Ganoderma lucidum* improve recovery time in patients with herpes genitalis and labialis. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 13(9), 985-987.
- Hijikata, Y., Yasuhara, A., & Sahashi, Y. (2005). Effect of an herbal formula containing *Ganoderma lucidum* on reduction of herpes zoster pain: A pilot clinical trial. *American Journal of Chinese Medicine*, 33(4), 517-523.
- Hong, K. J., Dunn, D. M., Shen, C. L., & Pence, B. C. (2004). Effects of *Ganoderma lucidum* on apoptotic and anti-inflammatory function in HT-29 human colonic carcinoma cells. *Phytotherapy Research*, 18(9), 768-770.
- Hsu, C. L., & Yen, G. C. (2014). Ganoderic Acid and Lucidenic Acid (Triterpenoid). *Enzymes*, 36, 33-56.
- Hsu, H. A., Wu, C. Y., Chu, J. S., Lin, L. H., Lu, C. A., & Ou, K. L. (2014). Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and Ling Zhi-8 on osteogenesis: a comparative study using a rabbit sinus model. *J Oral Maxillofac Surg*, 72(9), 1703.e1701-1703.e1710.
- Hsu, H. Y., Kuan, Y. C., Lin, T. Y., Tsao, S. M., Hsu, J., Ma, L. J., & Sheu, F. (2013). Reishi Protein LZ-8 Induces FOXP3(+) Treg Expansion via a CD45-Dependent Signaling Pathway and Alleviates Acute Intestinal Inflammation in Mice. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 513542.
- Hsu, M. J., Lee, S. S., Lee, S. T., & Lin, W. W. (2003). Signaling mechanisms of enhanced neutrophil phagocytosis and chemotaxis by the polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum*. *British Journal of Pharmacology*, 139(2), 289-298.
- Huang, C. Y., Chen, J. Y. F., Wu, J. E., Pu, Y. S., Liu, G. Y., Pan, M. H., Huang, Y. T., Huang, A. M., Hwang, C. C., Chung, S. J., & Hour, T. C. (2010). Ling-zhi polysaccharides potentiate cytotoxic effects of anticancer drugs against drug-resistant urothelial carcinoma cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8798-8805.



- Huang, L., Sun, F., Liang, C., He, Y. X., Bao, R., Liu, L., & Zhou, C. Z. (2009). Crystal structure of LZ-8 from the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*. *Proteins*, 75(2), 524-527.
- Ishimoto, Y., Ishibashi, K. I., Yamanaka, D., Adachi, Y., Ito, H., Igami, K., Miyazaki, T., & Ohno, N. (2017). Enhanced Release of Immunostimulating  $\beta$ -1,3- Glucan by Autodigestion of the Lingzhi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lingzhi* (Agaricomycetes). *Int J Med Mushrooms*, 19(1), 1-16.
- Ishimoto, Y., Ishibashi, K. I., Yamanaka, D., Adachi, Y., Ito, H., Igami, K., Miyazaki, T., & Ohno, N. (2018). Protection against Gut Inflammation and Sepsis in Mice by the Autodigested Product of the Lingzhi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lingzhi* (Agaricomycetes). *Int J Med Mushrooms*, 20(9), 809-823.
- Iwatsuki, K., Akihisa, T., Tokuda, H., Ukiya, M., Oshikubo, M., Kimura, Y., Asano, T., Nomura, A., & Nishino, H. (2003). Lucidenic Acids P and Q, Methyl Lucidenate P, and Other Triterpenoids from the Fungus *Ganoderma lucidum* and their Inhibitory Effects on Epstein-Barr Virus Activation. *Journal of Natural Products*, 66(12), 1582-1585.
- Jan, J. T., Cheng, T. R., Juang, Y. P., Ma, H. H., Wu, Y. T., Yang, W. B., Cheng, C. W., Chen, X., Chou, T. H., Shie, J. J., Cheng, W. C., Chein, R. J., Mao, S. S., Liang, P. H., Ma, C., Hung, S. C., & Wong, C. H. (2021). Identification of existing pharmaceuticals and herbal medicines as inhibitors of SARS-CoV-2 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118(5).
- Jeurink, P. V., Noguera, C. L., Savelkoul, H. F. J., & Wichers, H. J. (2008). Immunomodulatory capacity of fungal proteins on the cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. *International Immunopharmacology*, 8(8), 1124-1133.
- Jian-bo, G., & Jing, H. (2008). Study on the Long Term Toxicity of *Ganoderma lucidum* Capsule to Rats. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*(4), 972-974.
- Jiang, D., Wang, L., Zhao, T., Zhang, Z., Zhang, R., Jin, J., Cai, Y., & Wang, F. (2017). Restoration of the tumor-suppressor function to mutant p53 by *Ganoderma lucidum* polysaccharides in colorectal cancer cells. *Oncol Rep*, 37(1), 594-600.
- Jiang, J., Grieb, B., Thyagarajan, A., & Sliva, D. (2008). Ganoderic acids suppress growth and invasive behavior of breast cancer cells by modulating AP-1 and NF- $\kappa$ B signaling. *International Journal of Molecular Medicine*, 21(5), 577-584.
- Jiang, J. H., Slivova, V., Valachovicova, T., Harvey, K., & Sliva, D. (2004). *Ganoderma lucidum* inhibits proliferation and induces apoptosis in human prostate cancer cells PC-3. *International Journal of Oncology*, 24(5), 1093-1099.
- Jiang, Z., Jin, T., Gao, F., Liu, J., Zhong, J., & Zhao, H. (2011). Effects of Ganoderic acid Me on inhibiting multidrug resistance and inducing apoptosis in multidrug resistant colon cancer cells. *Process Biochemistry*, 46(6), 1307-1314.
- Jimenez, P., Tejero, J., Cabrero, P., Cordoba-Diaz, D., & Girbes, T. (2013). Differential sensitivity of D-galactose-binding lectins from fruits of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.) to a simulated gastric fluid. *Food Chem*, 136(2), 794-802.
- Joseph, S., Sabulal, B., George, V., Smina, T. P., & Janardhanan, K. K. (2009). Antioxidative and antiinflammatory activities of the chloroform extract of *Ganoderma Lucidum* found in South India. *Scientia Pharmaceutica*, 77(1), 111-121.
- Kalb, V. F., Jr., & Bernlohr, R. W. (1977). A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts. *Anal Biochem*, 82(2), 362-371.
- Kao, P. F., Wang, S. H., Hung, W. T., Liao, Y. H., Lin, C. M., & Yang, W. B. (2012). Structural characterization and antioxidative activity of low-molecular-weights beta-1,3-glucan from the residue of extracted *Ganoderma lucidum* fruiting bodies. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 673764.
- Kaplan, D. H., Shankaran, V., Dighe, A. S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(13), 7556-7561.





- Kavishree, S., Hemavathy, J., Lokesh, B. R., Shashirekha, M. N., & Rajarathnam, S. (2008). Fat and fatty acids of Indian edible mushrooms. *Food Chemistry*, 106(2), 597-602.
- Keypour, S., Riahi, H., Moradali, M. F., & Rafati, H. (2008). Investigation of the antibacterial activity of a chloroform extract of Ling Zhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphylllophoromycetidae), from Iran. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 10(4), 345-349.
- Keypour Sangesari, S., Riahi, H., Rafati, H., & Moradali, M. F. (2009). Antibacterial activity of aqueous extract of *Ganoderma lucidum* Karst. (Basidiomycota) from Iran. *Journal of Medicinal Plants*, 8(32), 53-59+190.
- Kim, H. W., Shim, M. J., Cho, E. C., & Kim, B. K. (1997). Inhibition of cytopathic effect of human immunodeficiency virus-1 by water-soluble extract of *Ganoderma lucidum*. *Archives of Pharmacal Research*, 20(5), 425-431.
- Kim, K. C., & Kim, I. G. (1999). *Ganoderma lucidum* extract protects DNA from strand breakage caused by hydroxyl radical and UV irradiation. *International Journal of Molecular Medicine*, 4(3), 273-277.
- Kim, M., Seguin, P., Ahn, J.-K., Kim, J.-J., Chun, S.-C., Kim, E.-H., Seo, S.-H., Kang, E.-Y., Kim, S.-L., Park, Y.-J., Ro, H.-M., & Chung, I.-M. (2008). Phenolic Compound Concentration and Antioxidant Activities of Edible and Medicinal Mushrooms from Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7265-7270.
- Kim, Y. S., Bae, W. C., Park, J. M., Lee, J. W., Baek, S. J., Lee, S. B., & Yoon, K. H. (2004). Protective effects of  $\beta$ -immunane isolated from the mycelium of *Ganoderma lucidum* IY009 against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(3), 271-276.
- Kino, K., Yamashita, A., Yamaoka, K., Watanabe, J., Tanaka, S., Ko, K., Shimizu, K., & Tsunoo, H. (1989). Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, Ling Zhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Biological Chemistry*, 264(1), 472-478.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D., & Stalpers, J. (2008). Dictionary of the Fungi.(10th edn). Wallingford, UK.
- Kiss, A., Grünvald, P., Ladányi, M., Papp, V., Papp, I., Némedi, E., & Mirmazloum, I. (2021). Heat Treatment of Reishi Medicinal Mushroom (*Ganoderma lingzhi*) Basidiocarp Enhanced Its  $\beta$ -glucan Solubility, Antioxidant Capacity and Lactogenic Properties. *Foods*, 10(9).
- Komoda, Y., Shimizu, M., Sonoda, Y., & Sato, Y. (1989). Ganoderic acid and its derivatives as cholesterol synthesis inhibitors. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37(2), 531-533.
- Koyama, K., Imaizumi, T., Akiba, M., Kinoshita, K., Takahashi, L., Suzuki, A., Yano, S., Horie, S., Watanabe, K., & Naoi, Y. (1997). Antinociceptive components of *Ganoderma lucidum*. *Planta Medica*, 63(3), 224-227.
- Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Van Griensven, L., Vrvic, M., & Jakovljevic, D. (2014). Polysaccharides of higher fungi: Biological role, structure and antioxidative activity. *Hemijaska Industrija*, 68, 305-320.
- Kuan, Y. C., Sheu, F., Lee, G. C., Tsai, M. W., Hung, C. L., & Nan, F. H. (2012). Administration of recombinant Reishi immunomodulatory protein (rLZ-8) diet enhances innate immune responses and elicits protection against nervous necrosis virus in grouper *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol*, 32(6), 986-993.
- Kubota, T., Asaka, Y., Miura, I., & Mori, H. (1982). Structures of Ganoderic Acid A and B, Two New Lanostane Type Bitter Triterpenes from *Ganoderma lucidum* (FR.) KARST. *Helvetica Chimica Acta*, 65(2), 611-619.
- Kumakura, K., Hori, C., Matsuoka, H., Igarashi, K., & Samejima, M. (2018). Protein components of water extracts from fruiting bodies of the reishi mushroom *Ganoderma lucidum* contribute to the production of functional molecules. *J Sci Food Agric*, 99(2), 529-535.
- Kumaran, S., Palani, P., Nishanthi, R., & Kaviyaran, V. (2011). Studies on screening, isolation and purification of a fibrinolytic protease from an Isolate(VK12) of *ganoderma lucidum* and





- evaluation of its antithrombotic activity. *Japanese Journal of Medical Mycology*, 52(2), 153-162.
- Kuusk, A., Boyd, H., Chen, H., & Ottmann, C. (2020). Small-molecule modulation of p53 protein-protein interactions. *Biol Chem*, 401(8), 921-931.
- Kwok, Y., Ng, K. F. J., Li, C. C. F., Lam, C. C. K., & Man, R. Y. K. (2005). A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study of the platelet and global hemostatic effects of *Ganoderma lucidum* (Ling-Zhi) in healthy volunteers. *Anesthesia and Analgesia*, 101(2), 423-426.
- Kyung, H. J., Ha, E., Kim, M. J., Yoon, K. U., Hye, K. K., Hong, S. J., Chung, J. H., & Yim, S. V. (2006). *Ganoderma lucidum* extract stimulates glucose uptake in L6 rat skeletal muscle cells. *Acta Biochimica Polonica*, 53(3), 597-601.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lai, C. Y., Hung, J. T., Lin, H. H., Yu, A. L., Chen, S. H., Tsai, Y. C., Shao, L. E., Yang, W. B., & Yu, J. (2010). Immunomodulatory and adjuvant activities of a polysaccharide extract of *Ganoderma lucidum* in vivo and in vitro. *Vaccine*, 28(31), 4945-4954.
- Lai, G., Guo, Y., Chen, D., Tang, X., Shuai, O., Yong, T., Wang, D., Xiao, C., Zhou, G., Xie, Y., Yang, B. B., & Wu, Q. (2019). Alcohol Extracts From *Ganoderma lucidum* Delay the Progress of Alzheimer's Disease by Regulating DNA Methylation in Rodents. *J Agric Food Chem*, 10, 272.
- Lakshmi, B., Ajith, T. A., Jose, N., & Janardhanan, K. K. (2006). Antimutagenic activity of methanolic extract of *Ganoderma lucidum* and its effect on hepatic damage caused by benzo[a]pyrene. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(2), 297-303.
- Lakshmi, B., Sheena, N., & Janardhanan, K. K. (2009). Prevention of mammary adenocarcinoma and skin tumour by *Ganoderma lucidum*, a medicinal mushroom occurring in South India. *Current Science*, 97(11), 1658-1664.
- Lasukova, T. V., Maslov, L. N., Arbuzov, A. G., Burkova, V. N., & Inisheva, L. I. (2015). Cardioprotective Activity of *Ganoderma lucidum* Extract during Total Ischemia and Reperfusion of Isolated Heart. *Bull Exp Biol Med*, 158(6), 739-741.
- Lee, J. W., Jeong, H., Han, M. D., Baek, S. J., Kim, Y. S., & Kang, S. M. (1996). Effect of G009 on CCl<sub>4</sub>-induced hepatic injury and lipid peroxidation in rats. *Korean Journal of Pharmacognosy*, 27(3), 159-166.
- Lee, S. H., Lee, E. S., Bae, I. H., Kim, S. H., Park, N. H., Shim, J. S., Lee, C. S., & Lee, J. (2020). The Protective Effect of *Ganoderma lucidum* Extract in Ultraviolet B-Induced Human Dermal Fibroblasts and Skin Equivalent Models. *Ann Dermatol*, 32(3), 251-254.
- Lei, X., Zhi, C., Huang, W., Sun, X., Gao, W., Yin, X., Zhang, X., Liang, C., Zhang, H., & Sun, F. (2020). Recombinant *Ganoderma lucidum* Immunomodulatory Protein Improves the Treatment for Chemotherapy-Induced Neutropenia. *Front Pharmacol*, 11, 956.
- Li, K., Zhuo, C., Teng, C., Yu, S., Wang, X., Hu, Y., Ren, G., Yu, M., & Qu, J. (2016). Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on chronic pancreatitis and intestinal microbiota in mice. *Int J Biol Macromol*, 93(Pt A), 904-912.
- Li, W. D., Zhang, B. D., Wei, R., Liu, J. H., & Lin, Z. B. (2008). Reversal effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharide on multidrug resistance in K562/ADM cell line. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(5), 620-627.
- Li, Y. Q., & Wang, S. F. (2006). Anti-hepatitis B activities of ganoderic acid from *Ganoderma lucidum*. *Biotechnology Letters*, 28(11), 837-841.
- Li, Y. Q., Yang, Y. L., Fang, L., Zhang, Z. B., Jin, J., & Zhang, K. C. (2006). Anti-hepatitis activities in the broth of *Ganoderma lucidum* supplemented with a Chinese herbal medicine. *American Journal of Chinese Medicine*, 34(2), 341-349.
- Liang, C., Li, H., Zhou, H., Zhang, S., Liu, Z., Zhou, Q., & Sun, F. (2012). Recombinant Lz-8 from *Ganoderma lucidum* induces endoplasmic reticulum stress-mediated autophagic cell death in SGC-7901 human gastric cancer cells. *Oncol Rep*, 27(4), 1079-1089.



- Liao, B., Chen, X., Han, J., Dan, Y., Wang, L., Jiao, W., Song, J., & Chen, S. (2015). Identification of commercial *Ganoderma* (Lingzhi) species by ITS2 sequences. *Chinese Medicine*, 10, 22.
- Lim, W. Z., Cheng, P. G., Abdulrahman, A. Y., & Teoh, T. C. (2019). The identification of active compounds in *Ganoderma lucidum* var. antler extract inhibiting dengue virus serine protease and its computational studies. *Environ Microbiol*, 1-16.
- Lin, H. J., Chang, Y. S., Lin, L. H., Haung, C. F., Wu, C. Y., & Ou, K. L. (2014). An Immunomodulatory Protein (Ling Zhi-8) from a *Ganoderma lucidum* Induced Acceleration of Wound Healing in Rat Liver Tissues after Monopolar Electrosurgery. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 916531.
- Lin, S. B., Li, C. H., Lee, S. S., & Kan, L. S. (2003). Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest. *Life Sciences*, 72(21), 2381-2390.
- Lin, T. Y., & Hsu, H. Y. (2016). Ling Zhi-8 reduces lung cancer mobility and metastasis through disruption of focal adhesion and induction of MDM2-mediated Slug degradation. *Cancer Lett*, 375(2), 340-348.
- Lin, Y. L., Shih, C., Cheng, P. Y., Chin, C. L., Liou, A. T., Lee, P. Y., & Chiang, B. L. (2020). A Polysaccharide Purified From *Ganoderma lucidum* Acts as a Potent Mucosal Adjuvant That Promotes Protective Immunity Against the Lethal Challenge With Enterovirus A71. *Front Immunol*, 11, 561758.
- Liu, C., Dunkin, D., Lai, J., Song, Y., Ceballos, C., Benkov, K., & Li, X. M. (2015). Anti-inflammatory Effects of *Ganoderma lucidum* Triterpenoid in Human Crohn's Disease Associated with Downregulation of NF-kappaB Signaling. *Inflamm Bowel Dis*, 21(8), 1918-1925.
- Liu, C., Yang, N., Song, Y., Wang, L., Zi, J., Zhang, S., Dunkin, D., Busse, P., Weir, D., Tversky, J., Miller, R. L., Goldfarb, J., Zhan, J., & Li, X. M. (2015). Ganoderic acid C1 isolated from the anti-asthma formula, ASHMI suppresses TNF-alpha production by mouse macrophages and peripheral blood mononuclear cells from asthma patients. *Int Immunopharmacol*, 27(2), 224-231.
- Liu, H., Qiu, F., Wang, Y., Liang, F., Liang, J., Lin, C., Liang, J., Gong, B., Chan, S., De Zhang, Z., Lai, X., Hou, S., & Dai, Z. (2020). A recombinant protein rLZ-8, originally extracted from *Ganoderma lucidum*, ameliorates OVA-induced lung inflammation by regulating Th17/Treg balance. *J Leukoc Biol*, 108(2), 531-545.
- Liu, J., Shimizu, K., & Kondo, R. (2010). The effects of ganoderma alcohols isolated from *Ganoderma lucidum* on the androgen receptor binding and the growth of LNCaP cells. *Fitoterapia*, 81(8), 1067-1072.
- Liu, J., Yang, F., Ye, L. B., Yang, X. J., Timani, K. A., Zheng, Y., & Wang, Y. H. (2004). Possible mode of action of antiherpetic activities of a proteoglycan isolated from the mycelia of *Ganoderma lucidum* in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, 95(2-3), 265-272.
- Liu, R. M., Li, Y. B., & Zhong, J. J. (2012). Cytotoxic and pro-apoptotic effects of novel ganoderic acid derivatives on human cervical cancer cells in vitro. *Eur J Pharmacol*, 681(1-3), 23-33.
- Liu, X., Xu, Y., Li, Y., Pan, Y., Sun, Z., Zhao, S., & Hou, Y. (2020). *Ganoderma lucidum* fruiting body extracts inhibit colorectal cancer by inducing apoptosis, autophagy, and G0/G1 phase cell cycle arrest in vitro and in vivo. *Am J Transl Res*, 12(6), 2675-2684.
- Liu, Y.-c., Tang, X.-c., Hu, H.-p., Chen, D.-l., Xie, Y.-z., Liang, X.-w., Li, X.-m., Xiao, C., Huang, L.-h., & Wu, Q.-p. (2021). Genetic diversity and main functional composition of Lingzhi strains from main producing areas in China. *AMB Express*, 11(1), 119.
- Liu, Y., Tang, Q., Yang, Y., Zhou, S., Wu, D., Tang, C., Zhang, Z., Yan, M., Feng, J., & Zhang, J. S. (2017). Characterization of Polysaccharides from the Fruiting Bodies of Two Species of Genus *Ganoderma* (Agaricomycetes) and Determination of Water-Soluble beta-D-Glucan Using High-Performance Liquid Chromatography. *Int J Med Mushrooms*, 19(1), 75-85.



- Liu, Y., Tang, Q., Zhang, J., Xia, Y., Yang, Y., Wu, D., Fan, H., & Cui, S. W. (2018). Triple helix conformation of beta-d-glucan from *Ganoderma lucidum* and effect of molecular weight on its immunostimulatory activity. *Int J Biol Macromol*, *114*, 1064-1070.
- Liu, Y., Zhang, C., Du, J., Jia, R., Cao, L., Jeney, G., Teraoka, H., Xu, P., & Yin, G. (2017). Protective effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharide against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in precision-cut carp liver slices. *Fish Physiol Biochem*, *43*(5), 1209-1221.
- Liu, Y., Zhang, J., Tang, Q., Yang, Y., Guo, Q., Wang, Q., Wu, D., & Cui, S. W. (2014). Physicochemical characterization of a high molecular weight bioactive beta-D-glucan from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *Carbohydr Polym*, *101*, 968-974.
- Liu, Z., Zhu, T., He, J., Zhang, Y., Gu, P., Qiu, T., Bo, R., Hu, Y., Liu, J., & Wang, D. (2019). Adjuvanticity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide liposomes on porcine circovirus type-II in mice. *Org Lett*, *141*, 1158-1164.
- Lou, H. W., Guo, X. Y., Zhang, X. C., Guo, L. Q., & Lin, J. F. (2019). Optimization of Cultivation Conditions of Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes) for the Highest Antioxidant Activity and Antioxidant Content. *Int J Med Mushrooms*, *21*(4), 353-366.
- Lu, H., Song, J., Jia, X. B., & Feng, L. (2012). Antihepatoma activity of the acid and neutral components from *Ganoderma lucidum*. *Phytother Res*, *26*(9), 1294-1300.
- Lv, G. P., Zhao, J., Duan, J. A., Tang, Y. P., & Li, S. P. (2012). Comparison of sterols and fatty acids in two species of *Ganoderma*. *Chem Cent J*, *6*(1), 10.
- Mallard, B., Leach, D. N., Wohlmuth, H., & Tiralongo, J. (2019). Synergistic immuno-modulatory activity in human macrophages of a medicinal mushroom formulation consisting of Reishi, Shiitake and Maitake. *PLoS One*, *14*(11), e0224740-e0224740.
- Mao-XL. (2000). *The macrofungi in China* (1st edn. ed.). Henan Science and Technology Press.
- Marín, D. M., Camacho, G. J. O., Andrada, R. T., Sayavera, F. J. B., Gil, M. C. R., & Mariño, M. M. (2010). Ejercicio físico y estrés oxidativo. *Revista Española de Educación Física y Deportes-N*, *14*, 93-107.
- Matsumoto, K. s. (1979). *Mysterious reishi mushroom*. Santa Barbara: Woodbridge Press Pub. Co.
- Mehta, S., Jandaik, S., & Gupta, D. (2014). Effect of cost-effective substrates on growth cycle and yield of lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (higher Basidiomycetes) from Northwestern Himalaya (India). *Int J Med Mushrooms*, *16*(6), 585-591.
- Meng, G., Zhu, H., Yang, S., Wu, F., Zheng, H., Chen, E., & Xu, J. (2011). Attenuating effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on myocardial collagen cross-linking relates to advanced glycation end product and antioxidant enzymes in high-fat-diet and streptozotocin-induced diabetic rats. *Carbohydrate Polymers*, *84*(1), 180-185.
- Meng, L. Z., Xie, J., Lv, G. P., Hu, D. J., Zhao, J., Duan, J. A., & Li, S. P. (2014). A comparative study on immunomodulatory activity of polysaccharides from two official species of *Ganoderma* (Lingzhi). *Nutr Cancer*, *66*(7), 1124-1131.
- Mishra, J., Joshi, A., Rajput, R., Singh, K., Bansal, A., & Misra, K. (2018). Phenolic Rich Fractions from Mycelium and Fruiting Body of *Ganoderma lucidum* Inhibit Bacterial Pathogens Mediated by Generation of Reactive Oxygen Species and Protein Leakage and Modulate Hypoxic Stress in HEK 293 Cell Line. *2018*, 6285615.
- Mishra, J., Joshi, A., Rajput, R., Singh, K., Bansal, A., & Misra, K. (2018). Phenolic Rich Fractions from Mycelium and Fruiting Body of *Ganoderma lucidum* Inhibit Bacterial Pathogens Mediated by Generation of Reactive Oxygen Species and Protein Leakage and Modulate Hypoxic Stress in HEK 293 Cell Line. *Adv Pharmacol Sci*, *2018*, 6285615.
- Moniruzzaman, M., Khalil, M. I., Sulaiman, S. A., & Gan, S. H. (2012). Advances in the analytical methods for determining the antioxidant properties of honey: a review. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, *9*(1), 36-42.



- Muinao, T., Pal, M., & Boruah, H. P. D. (2018). Cytosolic and Transmembrane Protein Extraction Methods of Breast and Ovarian Cancer Cells: A Comparative Study. *Journal of biomolecular techniques : JBT*, 29(3), 71-78.
- Nishitoba, T., Goto, S., Sato, H., & Sakamura, S. (1989). Bitter triterpenoids from the fungus *Ganoderma applanatum*. *Phytochemistry*, 28(1), 193-197.
- Nowacka-Jechalke, N., & Olech, M. (2018). Mushroom Polyphenols as Chemopreventive Agents. In (pp. 137-150).
- Ogbe, A. O., & Obeka, A. D. (2013). Proximate, Mineral and Anti-Nutrient Composition of Wild *Ganoderma lucidum*: Implication on Its Utilization in Poultry Production. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, Vol. 3(Issue 1), p161-166.
- Oluwafemi Adetuyi, B., Olamide Okeowo, T., Adefunke Adetuyi, O., Abraham Adebisi, O., Ogunlana, O. O., Janet Oretade, O., Marraiki, N., Beshbishy, A. M., N. N. W., & Batiha, G. E. (2020). *Ganoderma lucidum* from Red Mushroom Attenuates Formaldehyde-Induced Liver Damage in Experimental Male Rat Model. *Biology (Basel)*, 9(10).
- Oria de Rueda, J. A. (2007). *Hongos y Setas Tesoro de Nuestro Montes* (E. Cálamo, Ed.).
- Ou, C.-C., Hsiao, Y.-M., Wang, W.-H., Ko, J.-L., & Lin, M.-Y. (2009). Stability of fungal immunomodulatory protein, FIP-gts and FIP-fve, in IFN- $\gamma$  production. *Food and Agricultural Immunology*, 20(4), 319-332.
- Ozcariz-Fermoselle, M. V., Fraile-Fabero, R., Girbés-Juan, T., Arce-Cervantes, O., Oria de Rueda-Salgueiro, J. A., & Azul, A. M. (2018). Use of lignocellulosic wastes of pecan (*Carya illinoensis*) in the cultivation of *Ganoderma lucidum*. *Rev Iberoam Micol*, 35(2), 103-109.
- Ozcariz Fermoselle, M. V. (2016). *Aprovechamiento de residuos agroforestales, con particular interés en los originados en explotaciones de Nuez Pecán (Carya illinoensis), por medio del cultivo de Hongos Saprófitos Saludables Ibéricos* [info:eu-repo/semantics/doctoralThesis,
- Palacios, I., Lozano, M., Moro, C., D'Arrigo, M., Rostagno, M. A., Martínez, J. A., García-Lafuente, A., Guillamón, E., & Villares, A. (2011). Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 128(3), 674-678.
- Pali-Schöll, I., Untermayr, E., Klems, M., & Jensen-Jarolim, E. (2018). The effect of digestion and digestibility on allergenicity of food. *Nutrients*, 10(9), 1129.
- Pan, D., Wang, L., Chen, C., Hu, B., & Zhou, P. (2015). Isolation and characterization of a hyperbranched proteoglycan from *Ganoderma lucidum* for anti-diabetes. *Carbohydr Polym*, 117, 106-114.
- Pan, D., Zhang, D., Wu, J., Chen, C., Xu, Z., Yang, H., & Zhou, P. (2014). A novel proteoglycan from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies protects kidney function and ameliorates diabetic nephropathy via its antioxidant activity in C57BL/6 db/db mice. *Food Chem Toxicol*, 63, 111-118.
- Pan, K., Jiang, Q., Liu, G., Miao, X., & Zhong, D. (2013). Optimization extraction of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its immunity and antioxidant activities. *Int J Biol Macromol*, 55, 301-306.
- Pan, Y., Yuan, S., Teng, Y., Zhang, Z., He, Y., Zhang, Y., Liang, H., Wu, X., Li, J., Yang, H., & Zhou, P. (2022). Antioxidation of a proteoglycan from *Ganoderma lucidum* protects pancreatic  $\beta$ -cells against oxidative stress-induced apoptosis in vitro and in vivo. *Int J Biol Macromol*, 200, 470-486.
- Park, E. J., Ko, G. N., Kim, J. B., & Sohn, D. H. (1997). Antifibrotic effects of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*, glycyrrhizin, and pentoxifylline in rats with cirrhosis induced by biliary obstruction. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 20(4), 417-420.
- Pavlik, M., Zhou, S., Zhang, J., Tang, Q., Feng, N., Kurjak, D., Pavlík, M., Jr., & Kunca, A. (2020). Comparative Analysis of Triterpene Composition between *Ganoderma lingzhi* from China and *G. lucidum* from Slovakia under Different Growing Conditions. *Int J Med Mushrooms*, 22(8), 793-802.
- Pazzi, F., & Fraile, R. (2017). Effects of *Ganoderma lucidum* on Pain in Women with Fibromyalgia. *Fibrom Open Access*, 2(1), 115.





- Petre, M., & Teodorescu, A. (2009). *Biotechnology for in vitro growing of edible and medicinal mushrooms on wood wastes* [biotechnology, edible and medicinal mushrooms, wood wastes].
- Pillai, T. G., Maurya, D. K., Salvi, V. P., Janardhanan, K. K., & Nair, C. K. (2014). Fungal beta glucan protects radiation induced DNA damage in human lymphocytes. *Ann Transl Med*, 2(2), 13.
- Prasad, R., Varshney, V. K., Harsh, N. S., & Kumar, M. (2015). Antioxidant Capacity and Total Phenolics Content of the Fruiting Bodies and Submerged Cultured Mycelia of Sixteen Higher Basidiomycetes Mushrooms from India. *Int J Med Mushrooms*, 17(10), 933-941.
- Qu, H. G., Gao, L., He, D., Liu, C., Yan, W., Gao, S., & Wang, L. (2011). Effect of reversion of ganoderma lucidum polysaccharides on cisplatin resistant in ovarian cancer cells and its mechanism. *Journal of Jilin University Medicine Edition*, 37(2), 250-254.
- Raa, J. (2015). Immune modulation by non-digestible and non-absorbable beta-1,3/1,6-glucan. *Microb Ecol Health Dis*, 26, 27824. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.27824>
- Rajasekaran, M., & Kalaimagal, C. (2011). In vitro antioxidant activity of ethanolic extract of a medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum*. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(9), 1427-1433.
- Reis, F. S., Lima, R. T., Morales, P., Ferreira, I. C., & Vasconcelos, M. H. (2015). Methanolic Extract of *Ganoderma lucidum* Induces Autophagy of AGS Human Gastric Tumor Cells. *Molecules*, 20(10), 17872-17882.
- Ren, H., Meng, X., Yin, J., Sun, J., Huang, Q., & Yin, Z. (2018). *Ganoderma lucidum* Polysaccharide Peptide Attenuates Skin Flap Ischemia-Reperfusion Injury in a Thioredoxin-Dependent Manner. *Plast Reconstr Surg*, 142(1), 23e-33e.
- Robert, V., Stegehuis, G., & Stalpers, J. (2005). *The MycoBank engine and related databases* Retrieved 20/01/2020 from <https://www.mycobank.org/>
- Rogers, R. (2011). *The Fungal Pharmacy: The Complete Guide to Medicinal Mushrooms and Lichens of North America*. North Atlantic Books, Berkeley, CA, 608.
- Rossi, P., Buonocore, D., Altobelli, E., Brandalise, F., Cesaroni, V., Iozzi, D., Savino, E., & Marzatico, F. (2014). Improving Training Condition Assessment in Endurance Cyclists: Effects of *Ganoderma lucidum* and *Ophiocordyceps sinensis* Dietary Supplementation. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 979613.
- Ruan, W., Lim, A., Huang, L., & Popovich, D. (2014). Extraction optimisation and isolation of triterpenoids from *Ganoderma lucidum* and their effect on human carcinoma cell growth. *Natural Product Research*, 28, 1-9.
- Sa-Ard, P., Sarnthima, R., Khammuang, S., & Kanchanarach, W. (2015). Antioxidant, antibacterial and DNA protective activities of protein extracts from *Ganoderma lucidum*. *J Food Sci Technol*, 52(5), 2966-2973.
- Sadava, D., Still, D. W., Mudry, R. R., & Kane, S. E. (2009). Effect of *Ganoderma* on drug-sensitive and multidrug-resistant small-cell lung carcinoma cells. *Cancer Letters*, 277(2), 182-189.
- Sakamoto, S., Kohno, T., Shimizu, K., Tanaka, H., & Morimoto, S. (2016). Detection of Ganoderic Acid A in *Ganoderma lingzhi* by an Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Planta Med*, 82(8), 747-751.
- Sargowo, D., Ovianti, N., Susilowati, E., Ubaidillah, N., Widya Nugraha, A., Vitriyaturrida, Siwi Proboretno, K., Failasufi, M., Ramadhan, F., Wulandari, H., Waranugraha, Y., & Hayuning Putri, D. (2018). The role of polysaccharide peptide of *Ganoderma lucidum* as a potent antioxidant against atherosclerosis in high risk and stable angina patients. *Indian Heart J*, 70(5), 608-614.
- Satria, D., Tamrakar, S., Suhara, H., Kaneko, S., & Shimizu, K. (2019). Mass Spectrometry-Based Untargeted Metabolomics and  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activity of *Lingzhi* (*Ganoderma lingzhi*) During the Developmental Stages. *Molecules*, 24(11).
- Savin, S., Craciunescu, O., Oancea, A., Ilie, D., Ciucan, T., Antohi, L. S., Toma, A., Nicolescu, A., Deleanu, C., & Oancea, F. (2020). Antioxidant, Cytotoxic and Antimicrobial Activity of Chitosan



- Preparations Extracted from *Ganoderma lucidum* Mushroom. *Chem Biodivers*, 17(7), e2000175.
- Semedo, M. C., Karmali, A., & Fonseca, L. (2015). A high throughput colorimetric assay of beta-1,3-D-glucans by Congo red dye. *J Microbiol Methods*, 109, 140-148.
- Serafini, M., & Peluso, I. (2016). Functional Foods for Health: The Interrelated Antioxidant and Anti-Inflammatory Role of Fruits, Vegetables, Herbs, Spices and Cocoa in Humans. *Curr Pharm Des*, 22(44), 6701-6715.
- Seto, S. W., Lam, T. Y., Tam, H. L., Au, A. L. S., Chan, S. W., Wu, J. H., Yu, P. H. F., Leung, G. P. H., Ngai, S. M., Yeung, J. H. K., Leung, P. S., Lee, S. M. Y., & Kwan, Y. W. (2009). Novel hypoglycemic effects of *Ganoderma lucidum* water-extract in obese/diabetic (+db/+db) mice. *Phytomedicine*, 16(5), 426-436.
- Shafiee-Nick, R., Parizadeh, S. M., Zokaei, N., & Ghorbani, A. (2012). Effect of *Ganoderma lucidum* hydroalcoholic extract on insulin release in rat-isolated pancreatic islets. *Avicenna J Phytomed*, 2(4), 206-211.
- Shamaki, B. U., Sandabe, U. K., Ogbe, A. O., Abdulrahman, F. I., & El-Yuguda, A. D. (2014). Methanolic soluble fractions of lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (higher Basidiomycetes) extract inhibit neuraminidase activity in Newcastle disease virus (LaSota). *Int J Med Mushrooms*, 16(6), 579-583.
- Sharma, D., Singh, V. P., & Singh, N. K. (2018). A Review on Phytochemistry and Pharmacology of Medicinal as well as Poisonous Mushrooms. *Mini Rev Med Chem*, 18(13), 1095-1109.
- Sheena, N., Ajith, T. A., Mathew, A. T., & Janardhanan, K. K. (2003). Antibacterial activity of three macrofungi, *Ganoderma lucidum*, *Navesporus floccosa* and *Phellinus rimosus* occurring in South India. *Pharmaceutical Biology*, 41(8), 564-567.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., & Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, 68(5), 850-858.
- Shi, Y., Sun, J., He, H., Guo, H., & Zhang, S. (2008). Hepatoprotective effects of *Ganoderma lucidum* peptides against d-galactosamine-induced liver injury in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 117(3), 415-419.
- Shieh, Y. H., Liu, C. F., Huang, Y. K., Yang, J. Y., Wu, I. L., Lin, C. H., & Lin, S. C. (2001). Evaluation of the hepatic and renal-protective effects of *ganoderma lucidum* in mice. *American Journal of Chinese Medicine*, 29(3-4), 501-507.
- Shigenaga, M. K., Hagen, T. M., & Ames, B. N. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(23), 10771-10778.
- Singh, S., Harsh, N. S. K., & Gupta, P. K. (2014). A novel method of economical cultivation of medicinally important mushroom, *Ganoderma lucidum*. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research*, 55, 2033-2037.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Smina, T. P., Joseph, J., & Janardhanan, K. K. (2016). *Ganoderma lucidum* total triterpenes prevent gamma-radiation induced oxidative stress in Swiss albino mice in vivo. *Redox Rep*, 1-8.
- Smina, T. P., Maurya, D. K., Devasagayam, T. P., & Janardhanan, K. K. (2015). Protection of radiation induced DNA and membrane damages by total triterpenes isolated from *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst. *Chem Biol Interact*, 233, 1-7.
- Staments, P. (2000). *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms* (T. S. Press, Ed. 2 edición ed.).
- Staments, P. (2005). Notes on nutritional properties of culinary-medicinal mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 7(1-2), 103-110.
- Stanley, G., Harvey, K., Slivova, V., Jiang, J. H., & Sliva, D. (2005). *Ganoderma lucidum* suppresses angiogenesis through the inhibition of secretion of VEGF and TGF-beta 1 from prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330(1), 46-52.





- Stojkovic, D. S., Barros, L., Calhelha, R. C., Glamoclija, J., Ciric, A., van Griensven, L. J., Sokovic, M., & Ferreira, I. C. (2014). A detailed comparative study between chemical and bioactive properties of *Ganoderma lucidum* from different origins. *Int J Food Sci Nutr*, 65(1), 42-47.
- Sudheesh, N. P., Ajith, T. A., Mathew, J., Nima, N., & Janardhanan, K. K. (2012). *Ganoderma lucidum* protects liver mitochondrial oxidative stress and improves the activity of electron transport chain in carbon tetrachloride intoxicated rats. *Hepatol Res*, 42(2), 181-191.
- Sun, L. X., Li, W. D., Lin, Z. B., Duan, X. S., Li, X. F., Yang, N., Lan, T. F., Li, M., Sun, Y., Yu, M., & Lu, J. (2014). Protection against lung cancer patient plasma-induced lymphocyte suppression by *Ganoderma lucidum* polysaccharides. *Cell Physiol Biochem*, 33(2), 289-299.
- Sun, X., Wang, H., Han, X., Chen, S., Zhu, S., & Dai, J. (2014). Fingerprint analysis of polysaccharides from different *Ganoderma* by HPLC combined with chemometrics methods. *Carbohydr Polym*, 114, 432-439.
- Tanaka, S., Kino, K., Tsuchiya, K., Yamashita, A., Murasugi, A., Sakuma, S., & Tsunoo, H. (1989). Complete amino acid sequence of an immunomodulatory protein, Ling Zhi-8 (LZ-8): an immunomodulator from a fungus, *Ganoderma lucidum*, having similarity to immunoglobulin variable regions. *Journal of biological chemistry*, 264(28), 16372-16377.
- Tao, J., & Feng, K. Y. (1990). Experimental and clinical studies on inhibitory effect of *ganoderma lucidum* on platelet aggregation. *J Tongji Med Univ*, 10(4), 240-243.
- Tejero, J., Gayoso, S., Caro, I., Cordoba-Diaz, D., Mateo, J., Basterrechea, J., Girbes, T., & Jiménez, P. (2014). Comparative Analysis of the Antioxidant and Free-Radical Scavenging Activities of Different Water-Soluble Extracts of Green, Black and Oolong Tea Samples. *Food and Nutrition Sciences*, 05, 2157-2166.
- Tel, G., Ozturk, M., Duru, M. E., & Turkoglu, A. (2015). Antioxidant and anticholinesterase activities of five wild mushroom species with total bioactive contents. *Pharm Biol*, 53(6), 824-830.
- Teng, X., Zhang, W., Song, Y., Wang, H., Ge, M., & Zhang, R. (2019). Protective effects of *Ganoderma lucidum* triterpenoids on oxidative stress and apoptosis in the spleen of chickens induced by cadmium. *J Agric Food Chem*, 26(23), 23967-23980.
- Tong, M. H., Chien, P. J., Chang, H. H., Tsai, M. J., & Sheu, F. (2008). High processing tolerances of immunomodulatory proteins in enoki and reishi mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3160-3166.
- Tran, H. B., Yamamoto, A., Matsumoto, S., Ito, H., Igami, K., Miyazaki, T., Kondo, R., & Shimizu, K. (2014). Hypotensive effects and angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides of reishi (*Ganoderma lingzhi*) auto-digested extract. *Molecules*, 19(9), 13473-13485.
- Tsai, C. C., Yang, F. L., Huang, Z. Y., Chen, C. S., Yang, Y. L., Hua, K. F., Li, J., Chen, S. T., & Wu, S. H. (2012). Oligosaccharide and peptidoglycan of *Ganoderma lucidum* activate the immune response in human mononuclear cells. *J Agric Food Chem*, 60(11), 2830-2837.
- Upton R. (2000). *American Herbal Pharmacopeia and Therapeutic Compendium: Reishi Mushroom, Ganoderma lucidum. Standards of Analysis, Quality Control, and Therapeutics*. U.S.A. Canada: Santa Cruz.
- Vanaclocha B., C. S. (2019). *Fitoterapia, Vademécum de Prescripción* (5ª Edición ed.). Elsevier.
- Vancov, T., & Keen, B. (2009). Amplification of soil fungal community DNA using the ITS86F and ITS4 primers. *FEMS Microbiol Lett*, 296(1), 91-96.
- Viceconte, F. R., Diaz, M. L., Soresi, D. S., Lencinas, I. B., Carrera, A., Prat, M. I., & Gurovic, M. S. V. (2021). *Ganoderma sessile* is a fast polysaccharide producer among *Ganoderma* species. *Mycologia*, 113(3), 513-524.
- Wang, C., Liu, X., Lian, C., Ke, J., & Liu, J. (2019). Triterpenes and Aromatic Meroterpenoids with Antioxidant Activity and Neuroprotective Effects from *Ganoderma lucidum*. *Molecules*, 24(23).
- Wang, C. D., Teng, B. S., He, Y. M., Wu, J. S., Pan, D., Pan, L. F., Zhang, D., Fan, Z. H., Yang, H. J., & Zhou, P. (2012). Effect of a novel proteoglycan PTP1B inhibitor from *Ganoderma lucidum* on the



- amelioration of hyperglycaemia and dyslipidaemia in db/db mice. *Br J Nutr*, 108(11), 2014-2025.
- Wang, C. N., Chen, J. C., Shiao, M. S., & Wang, C. T. (1991). The inhibition of human platelet function by ganodermic acids. *The Biochemical journal*, 277 ( Pt 1)(Pt 1), 189-197.
- Wang, C. W., Tschen, J. S. M., & Sheu, W. H. H. (2008). *Ganoderma lucidum* on metabolic control in type 2 diabetes subjects - A double blinded placebo control study. *Journal of Internal Medicine of Taiwan*, 19(1), 54-60.
- Wang, X., Zhao, X., Li, D., Lou, Y. Q., Lin, Z. B., & Zhang, G. L. (2007). Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharide on CYP2E1, CYP1A2 and CYP3A activities in BCG-Immune hepatic injury in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(9), 1702-1706.
- Wanmuang, H., Leopairut, J., Kositchaiwat, C., Wananukul, W., & Bunyaratvej, S. (2007). Fatal fulminant hepatitis associated with *Ganoderma lucidum* (Lingzhi) mushroom powder. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 90(1), 179-181.
- Wasser, S. P. (2017). Medicinal Mushrooms in Human Clinical Studies. Part I. Anticancer, Oncoimmunological, and Immunomodulatory Activities: A Review. *Int J Med Mushrooms*, 19(4), 279-317.
- Weemaes, C. A., Ludikhuyze, L. R., Van den Broeck, I., & Hendrickx, M. E. (1999). Influence of pH, benzoic acid, glutathione, EDTA, 4-hexylresorcinol, and sodium chloride on the pressure inactivation kinetics of mushroom polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem*, 47(9), 3526-3530.
- Weng, C. J., Chau, C.-F., Yen, G.-C., Liao, J.-W., Chen, D.-H., & Chen, K.-D. (2009). Inhibitory Effects of *Ganoderma lucidum* on Tumorigenesis and Metastasis of Human Hepatoma Cells in Cells and Animal Models. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(11), 5049-5057.
- Weng, C. J., Chau, C. F., Hsieh, Y. S., Yang, S. F., & Yen, G. C. (2008). Lucidenic acid inhibits PMA-induced invasion of human hepatoma cells through inactivating MAPK/ERK signal transduction pathway and reducing binding activities of NF- $\kappa$ B and AP-1. *Carcinogenesis*, 29(1), 147-156.
- Weng, C. J., Chau, C. F., Yen, G. C., Liao, J. W., Chen, D. H., & Chen, K. D. (2009). Inhibitory Effects of *Ganoderma lucidum* on Tumorigenesis and Metastasis of Human Hepatoma Cells in Cells and Animal Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 5049-5057.
- Wu, C. T., Lin, T. Y., Hsu, H. Y., Sheu, F., Ho, C. M., & Chen, E. I. T. (2011). Ling Zhi-8 mediates p53-dependent growth arrest of lung cancer cells proliferation via the ribosomal protein S7-MDM2-p53 pathway. *Carcinogenesis*, 32(12), 1890-1896.
- Wu, D. T., Deng, Y., Chen, L. X., Zhao, J., & Bzhelyansky, A. (2017). Evaluation on quality consistency of *Ganoderma lucidum* dietary supplements collected in the United States. 7(1), 7792.
- Wu, H., Tang, S., Huang, Z., Zhou, Q., Zhang, P., & Chen, Z. (2016). Hepatoprotective Effects and Mechanisms of Action of Triterpenoids from Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes) on alpha-Amanitin-Induced Liver Injury in Mice. *Int J Med Mushrooms*, 18(9), 841-850.
- Wu, J. R., Hu, C. T., You, R. I., Ma, P. L., Pan, S. M., Lee, M. C., & Wu, W. S. (2015). Preclinical trials for prevention of tumor progression of hepatocellular carcinoma by LZ-8 targeting c-Met dependent and independent pathways. *PLoS One*, 10(1), e0114495.
- Wu, S. (2018). Hypolipidaemic and anti-lipidperoxidant activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharide. *Int J Biol Macromol*, 118(Pt B), 2001-2005.
- Wu, X., Jiang, L., Zhang, Z., He, Y., Teng, Y., Li, J., Yuan, S., Pan, Y., Liang, H., Yang, H., & Zhou, P. (2021). Pancreatic cancer cell apoptosis is induced by a proteoglycan extracted from *Ganoderma lucidum*. *Oncol Lett*, 21(1), 34.
- Xia, Q. H., Lu, C. T., Tong, M. Q., Yue, M., Chen, R., Zhuge, D. L., Yao, Q., Xu, H. L., & Zhao, Y. Z. (2021). *Ganoderma lucidum* Polysaccharides Enhance the Abscopal Effect of Photothermal Therapy in Hepatoma-Bearing Mice Through Immunomodulatory, Anti-Proliferative, Pro-Apoptotic and Anti-Angiogenic. *Front Pharmacol*, 12, 648708.



- Xian, H., Li, J., Zhang, Y., Li, D., Zhu, Y., Li, S., Tan, Z., Lin, Z., Li, X., & Pan, Y. (2021). Antimetastatic Effects of *Ganoderma lucidum* Polysaccharide Peptide on B16-F10-luc-G5 Melanoma Mice With Sleep Fragmentation. *Front Pharmacol*, *12*, 650216.
- Xiao, C., Wu, Q. P., Cai, W., Tan, J. B., Yang, X. B., & Zhang, J. M. (2012). Hypoglycemic effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in type 2 diabetic mice. *Arch Pharm Res*, *35*(10), 1793-1801.
- Xu, D.-P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J.-J., & Li, H.-B. (2017). Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(1), 96.
- Yan, Y. M., Wang, X. L., Luo, Q., Jiang, L. P., Yang, C. P., Hou, B., Zuo, Z. L., Chen, Y. B., & Cheng, Y. X. (2015). Metabolites from the mushroom *Ganoderma lingzhi* as stimulators of neural stem cell proliferation. *Phytochemistry*, *114*, 155-162.
- Yan, Y. M., Wang, X. L., Zhou, L. L., Zhou, F. J., Li, R., Tian, Y., Zuo, Z. L., Fang, P., Chung, A. C., Hou, F. F., & Cheng, Y. X. (2015). Lingzhi lactones from *Ganoderma lingzhi* ameliorate adriamycin-induced nephropathy in mice. *J Ethnopharmacol*, *176*, 385-393.
- Yang, Y., Nirmagustina, D. E., Kumrungsee, T., Okazaki, Y., Tomotake, H., & Kato, N. (2017). Feeding of the water extract from *Ganoderma lingzhi* to rats modulates secondary bile acids, intestinal microflora, mucins, and propionate important to colon cancer. *Biosci Biotechnol Biochem*, *81*(9), 1796-1804.
- Yang, Y., Yu, T., Tang, H., Ren, Z., Li, Q., Jia, J., Chen, H., Fu, J., Ding, S., Hao, Q., Xu, D., Song, L., Sun, B., Sun, F., & Pei, J. (2020). *Ganoderma lucidum* Immune Modulator Protein rLZ-8 Could Prevent and Reverse Bone Loss in Glucocorticoids-Induced Osteoporosis Rat Model. *Front Pharmacol*, *11*, 731.
- Yang, Z. L., & Feng, B. (2013). What is the Chinese “Lingzhi”? – a taxonomic mini-review. *Mycology*, *4*(1), 1-4.
- Yao, X., Li, G., Xu, H., & Lu, C. (2012). Inhibition of the JAK-STAT3 signaling pathway by ganoderic acid A enhances chemosensitivity of HepG2 cells to cisplatin. *Planta Med*, *78*(16), 1740-1748.
- Ye, L. B., Zheng, X. L., Zhang, J. S., Tang, Q. Q., Yang, Y., Wang, X. Y., Li, J. R., Liu, Y. F., & Pan, Y. J. (2011). Biochemical characterization of a proteoglycan complex from an edible mushroom *Ganoderma lucidum* fruiting bodies and its immunoregulatory activity. *Food Research International*, *44*(1), 367-372.
- Yeh, C.-H., Chen, H.-C., Yang, J.-J., Chuang, W.-I., & Sheu, F. (2010). Polysaccharides PS-G and Protein LZ-8 from Reishi (*Ganoderma lucidum*) Exhibit Diverse Functions in Regulating Murine Macrophages and T Lymphocytes. *Journal of agricultural and food chemistry*, *58*(15), 8535–8544-8535–8544.
- Yu, F., Wang, Y., Teng, Y., Yang, S., He, Y., Zhang, Z., Yang, H., Ding, C. F., & Zhou, P. (2021). Interaction and Inhibition of a *Ganoderma lucidum* Proteoglycan on PTP1B Activity for Anti-diabetes. *ACS Omega*, *6*(44), 29804-29813.
- Yu, G.-J., Yin, Y.-L., Yu, W.-H., Liu, W., Jin, Y.-X., Shrestha, A., Yang, Q., Ye, X.-D., & Sun, H. (2015). Proteome Exploration to Provide a Resource for the Investigation of *Ganoderma lucidum*. *PLoS One*, *10*(3), e0119439.
- Yu, J. H., Yu, S. J., Liu, K. L., Wang, C., Liu, C., Sun, J. Y., & Zhang, H. (2021). Cytotoxic ergostane-type steroids from *Ganoderma lingzhi*. *Steroids*, *165*, 108767.
- Yuan, S., Pan, Y., Zhang, Z., He, Y., Teng, Y., Liang, H., Wu, X., Yang, H., & Zhou, P. (2020). Amelioration of the Lipogenesis, Oxidative Stress and Apoptosis of Hepatocytes by a Novel Proteoglycan from *Ganoderma lucidum*. *Biol Pharm Bull*, *43*(10), 1542-1550.
- Yue, G. G., Chan, B. C., Han, X. Q., Cheng, L., Wong, E. C., Leung, P. C., Fung, K. P., Ng, M. C., Fan, K., Sze, D. M., & Lau, C. B. (2013). Immunomodulatory activities of *Ganoderma sinense* polysaccharides in human immune cells. *Nutr Cancer*, *65*(5), 765-774.



- Yue, Q. X., Song, X. Y., Ma, C., Feng, L. X., Guan, S. H., Wu, W. Y., Yang, M., Jiang, B. H., Liu, X., Cui, Y. J., & Guo, D. A. (2010). Effects of triterpenes from *Ganoderma lucidum* on protein expression profile of HeLa cells. *Phytomedicine*, *17*(8-9), 606-613.
- Yue, Q. X., Xie, F. B., Guan, S. H., Ma, C., Yang, M., Jiang, B. H., Liu, X., & Guo, D. A. (2008). Interaction of *Ganoderma* triterpenes with doxorubicin and proteomic characterization of the possible molecular targets of *Ganoderma* triterpenes. *Cancer Sci*, *99*(7), 1461-1470.
- Yuen, M. F., Ip, P., Ng, W. K., & Lai, C. L. (2004). Hepatotoxicity due to a formulation of *Ganoderma lucidum* (lingzhi). *J Hepatol*, *41*(4), 686-687.
- Yun, T. K., Kim, S. H., & Lee, Y. S. (1995). Trial of a new medium-term model using Benzo(a)pyrene induced lung tumor in newborn mice. *Anticancer Research*, *15*(3), 839-845.
- Zhang, G. L., Wang, Y. H., Ni, W., Teng, H. L., & Lin, Z. B. (2002). Hepatoprotective role of *ganoderma lucidum* polysaccharide against BCG-induced immune liver injury in mice. *World Journal of Gastroenterology*, *8*(4), 728-733.
- Zhang, H. N., & Lin, Z. B. (2004). Hypoglycemic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. *Acta Pharmacologica Sinica*, *25*(2), 191-195.
- Zhang, J. S., Tang, Q. J., Zimmerman-Kordmann, M., Reutter, W., & Fan, H. (2002). Activation of B lymphocytes by GLIS, a bioactive proteoglycan from *Ganoderma lucidum*. *Life Sciences*, *71*(6), 623-638.
- Zhang, Q., Andoh, T., Konno, M., Lee, J. B., Hattori, M., & Kuraishi, Y. (2010). Inhibitory effect of methanol extract of *Ganoderma lucidum* on acute itch-associated responses in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *33*(5), 909-911.
- Zhang, W., Tao, J., Yang, X., Yang, Z., Zhang, L., Liu, H., Wu, K., & Wu, J. (2014). Antiviral effects of two *Ganoderma lucidum* triterpenoids against enterovirus 71 infection. *Biochem Biophys Res Commun*, *449*(3), 307-312.
- Zhang, Y., Feng, Y., Wang, W., Jia, L., & Zhang, J. (2021). Characterization and Hepatoprotections of *Ganoderma lucidum* Polysaccharides against Multiple Organ Dysfunction Syndrome in Mice. *Oxid Med Cell Longev*, *2021*, 9703682.
- Zhang, Y., Li, H., Song, L., Xue, J., Wang, X., Song, S., & Wang, S. (2021). Polysaccharide from *Ganoderma lucidum* ameliorates cognitive impairment by regulating the inflammation of the brain-liver axis in rats. *Food Funct*, *12*(15), 6900-6914.
- Zhang, Y., Lin, Z., Hu, Y., & Wang, F. (2008a). Effect of *Ganoderma lucidum* capsules on T lymphocyte subsets in football players on "living high-training low". *Br J Sports Med*, *42*(10), 819-822.
- Zhang, Y., Lin, Z., Hu, Y., & Wang, F. (2008b). Effect of *Ganoderma lucidum* capsules on T lymphocyte subsets in football players on "living high-training low". *British Journal of Sports Medicine*, *42*(10), 519-522.
- Zhang, Y. J., Zhang, S., Liu, X. Z., Wen, H. A., & Wang, M. (2010). A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains. *Lett Appl Microbiol*, *51*(1), 114-118.
- Zhao, C., Fan, J., Liu, Y., Guo, W., Cao, H., Xiao, J., Wang, Y., & Liu, B. (2019). Hepatoprotective activity of *Ganoderma lucidum* triterpenoids in alcohol-induced liver injury in mice, an iTRAQ-based proteomic analysis. *Food Chem*, *271*, 148-156.
- Zhao, H., Luo, Y., Lu, C., Lin, N., Xiao, C., Guan, S., Guo, D. A., Liu, Z., Ju, D., He, X., & Lu, A. (2009). Enteric mucosal immune response might trigger the immunomodulation activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide in mice. *Planta Med*, *76*(3), 223-227.
- Zhao, H. Y., Luo, Y. Y., Lu, C., Lin, N., Xiao, C., Guan, S. H., Guo, D. A., Liu, Z. L., Ju, D. H., He, X. J., & Lu, A. P. (2010). Enteric Mucosal Immune Response might Trigger the Immunomodulation Activity of *Ganoderma lucidum* Polysaccharide in Mice. *Planta Medica*, *76*(3), 223-227.
- Zhao, R. L., & He, Y. M. (2018). Network pharmacology analysis of the anti-cancer pharmacological mechanisms of *Ganoderma lucidum* extract with experimental support using Hepa1-6-bearing C57 BL/6 mice. *J Ethnopharmacol*, *210*, 287-295.



- Zhao, W., Jiang, X., Deng, W., Lai, Y., Wu, M., & Zhang, Z. (2012). Antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and their role on DNA damage in mice induced by cobalt-60 gamma-irradiation. *Food Chem Toxicol*, 50(2), 303-309.
- Zhao, X. R., Huo, X. K., Dong, P. P., Wang, C., Huang, S. S., Zhang, B. J., Zhang, H. L., Deng, S., Liu, K. X., & Ma, X. C. (2015). Inhibitory Effects of Highly Oxygenated Lanostane Derivatives from the Fungus *Ganoderma lucidum* on P-Glycoprotein and alpha-Glucosidase. *J Nat Prod*, 78(8), 1868-1876.
- Zhibin, L. (2009). *Lingzhi: From Mystery to Science* (C. Press, Ed.). Pekin University Medical Press.
- Zhong, D., Wang, H., Liu, M., Li, X., Huang, M., Zhou, H., Lin, S., Lin, Z., & Yang, B. (2015). *Ganoderma lucidum* polysaccharide peptide prevents renal ischemia reperfusion injury via counteracting oxidative stress. *Sci Rep*, 5, 16910.
- Zhou, G. Q., Zhao, H. Y., & Lu, C. (2009). Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on intestinal mucosal immune system in H22 liver cancer bearing mice. *Zhongguo Zhong xi yi jie he za zhi Zhongguo Zhongxiyi jiehe zazhi = Chinese journal of integrated traditional and Western medicine / Zhongguo Zhong xi yi jie he xue hui, Zhongguo Zhong yi yan jiu yuan zhu ban*, 29(4), 335-339.
- Zhou, H., Sun, F., Li, H., Zhang, S., Liu, Z., Pei, J., & Liang, C. (2013). Effect of recombinant *Ganoderma lucidum* immunoregulatory protein on cyclophosphamide-induced leukopenia in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 35(3), 426-433.
- Zhu, L., Wu, M., Li, P., Zhou, Y., Zhong, J., Zhang, Z., Li, Y., Yao, W., & Xu, J. (2020). High-Pressure Supercritical CO(2) Extracts of *Ganoderma lucidum* Fruiting Body and Their Anti-hepatoma Effect Associated With the Ras/Raf/MEK/ERK Signaling Pathway. *Front Pharmacol*, 11, 602702.
- Zhu, M., Chang, Q., Wong, L. K., Chong, F. S., & Li, R. C. (1999). Triterpene antioxidants from *Ganoderma lucidum*. *Phytotherapy Research*, 13(6), 529-531.
- Zohra, F. T., Antara, N. H., Rahman, S., Rana, A. H., Noor, F. A., Khaleque, H. N., Sanam, S., Islam, F., Paul, A. K., Sarker, N. C., & Rahmatullah, M. (2011). Antinociceptive activity studies in mice with methanol extracts of two mushroom species: *Lentinula edodes* (Marasmiaceae) and *Ganoderma lucidum* (Ganodermataceae). *Advances in Natural and Applied Sciences*, 5(2), 127-130.