

Artículo original

## Obtención y caracterización estructural de $\beta$ -D-glucanos de la seta comestible *Pleurotus pulmonarius*

### Obtention and structural characterization of $\beta$ -D-glucan from the edible mushroom *Pleurotus pulmonarius*

Aracely del Carmen García-Cuan<sup>1\*</sup>, Ricardo Gutiérrez-De Aguas<sup>2</sup>,  
Daniel R. Molina-Velasco<sup>3</sup>, Carlos Silvera-Redondo<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Investigación de Medicina y Biotecnología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Libre, Barranquilla, Colombia

<sup>2</sup> Grupo de Investigación en Química y Biología, departamento de Química y Biología, División de Ciencias Básicas, Universidad del Norte de Barranquilla, Barranquilla, Colombia

<sup>3</sup> Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

<sup>4</sup> Grupo de Investigación en Genética y Medicina Molecular, departamento de Medicina, División de Ciencias de la Salud, Universidad del Norte de Barranquilla

## Resumen

Se describe aquí el proceso de extracción, aislamiento y purificación para obtener un extracto crudo de  $\beta$ -D-glucanos de la seta comestible *Pleurotus pulmonarius*. A partir de una mezcla de micelio y cuerpos fructíferos del hongo (basidiocarpóforo), se preparó el extracto crudo, del cual se extrajeron  $\beta$ -D-glucanos en fracción acuosa y alcalina. El extracto crudo en fracción alcalina se purificó por diálisis. En la muestra de la mezcla de micelio y cuerpos fructíferos de la seta se detectaron los  $\beta$ -D-glucanos mediante las técnicas de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier y resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Se confirmó la triple hélice característica de su estructura con el método espectrofotométrico del rojo Congo. Los resultados mostraron que los  $\beta$ -D-glucanos representaban el 32,5 % (p/p) en la seta y el 17,10 % (p/p) en el micelio. Se concluyó que la metodología utilizada para la extracción fue eficaz, al confirmarse la presencia de  $\beta$ -D-glucano en un porcentaje elevado en el hongo *P. pulmonarius*.

**Palabras clave:**  $\beta$ -D-glucanos; *Pleurotus pulmonarius*; Métodos de extracción.

## Abstract

Here, we describe the extraction, isolation, and purification process to obtain a crude extract of  $\beta$ -D-glucans from the edible mushroom *Pleurotus pulmonarius*. From a mixture of mycelium and fruiting bodies of the fungus (basidiocarp), we prepared the crude extract from which we extracted  $\beta$ -D-glucan in aqueous and alkaline fractions. The alkaline fraction in the crude extract was purified by dialysis; in the mycelium and fruiting bodies mixture,  $\beta$ -D-glucans were identified using Fourier-transform infrared spectroscopy and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance, confirming the presence of the characteristic triple helix structure by the congo red spectrophotometric method. The results showed that  $\beta$ -D-glucans in the mushroom represented 32.5% (w/w) and 17.10% (w/w) in the mycelium. Therefore, the methodology used for the extraction was effective in confirming the presence of high percentages of  $\beta$ -D-glucans in *P. pulmonarius*.

**Keywords:**  $\beta$ -D-glucans; *Pleurotus pulmonarius*; Extraction methods.

**Citación:** García-Cuan AdelC, Gutiérrez-De Aguas R, Molina-Velasco DR, et al. Obtención y caracterización estructural de  $\beta$ -D-glucanos de la seta comestible *Pleurotus pulmonarius*. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 48(186):65-78, enero-marzo de 2024. doi: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.2075>

**Editor:** Elizabeth Castañeda

**\*Correspondencia:**

Aracely del Carmen García-Cuan;  
aracely450@gmail.com

**Recibido:** 12 de octubre de 2023

**Aceptado:** 19 de enero de 2023

**Publicado en línea:** 7 de febrero de 2024



Este artículo está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional

## Introducción

La composición química de los hongos varía según las especies y las condiciones de crecimiento (Smiderle *et al.*, 2012). Las especies de *Pleurotus*, capaces de digerir una gran cantidad de materiales, generan un amplio espectro de enzimas, tienen buenas tasas de desarrollo en diferentes sustratos y producen varios compuestos fúngicos de interés como los polisacáridos  $\beta$ -D-glucanos (Das *et al.*, 2007).

*Pleurotus pulmonarius* es uno de los hongos con propiedades nutraceuticas con funciones nutricionales y medicinales. Al igual que otras especies del género *Pleurotus*, como *P. ostreatus*, *P. eringyii* y *P. Sajor Caju*, aporta beneficios de tipo metabólico al actuar como antioxidante, reducir las concentraciones plasmáticas de colesterol y glucosa y, además, por su actividad hematológica, antiviral, antibiótica, antitumoral e inmunomoduladora (Cohen *et al.*, 2002; Pizarro *et al.*, 2014). *P. pulmonarius* se consume como hortaliza, pero su producción y su comercialización son todavía limitadas localmente y no se conocen estudios nacionales ni regionales sobre sus propiedades nutricionales y su bioactividad. Dado su contenido de betaglucano, su desarrollo como herramienta terapéutica sería una alternativa económica asequible, efectiva y segura que contribuiría a la prevención de enfermedades.

Para obtener fracciones de mayor pureza del polisacárido, se requieren varios pasos. En general, los  $\beta$ -D-glucanos se extraen usando agua o soluciones acuosas alcalinas a diferentes temperaturas (Ruthes *et al.*, 2013). La purificación es necesaria para eliminar otras sustancias como proteínas, compuestos fenólicos, monosacáridos y disacáridos, aminoácidos y otras moléculas que no hayan sido separadas durante el proceso de extracción. Así, las proteínas pueden eliminarse por precipitación con ácido tricloroacético (20 % p/v) (Rajalingam *et al.*, 2012) mediante un tratamiento con proteasas y el método Sevag (Li X *et al.*, 2012) o utilizando reactivo fenólico (Synytsya *et al.*, 2009). La estructura general más común de los  $\beta$ -D-glucanos (polisacáridos) en vegetales como los cereales, y en algas y setas comestibles del tipo de los basidiomicetos (Pizarro *et al.*, 2014), consiste en una cadena principal formada por unidades de D-glucosa unidas mediante enlaces glicosídicos  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3), que pueden tener o no ramificaciones con enlaces  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6) (Ruthes *et al.*, 2015); se ha demostrado que esta estructura ramificada es más activa en el sistema inmune que los  $\beta$ -D-glucanos de cadena lineal (Smiderle *et al.*, 2008). Estos autores encontraron que la fracción soluble en agua a 100 °C del extracto de la seta comestible *P. pulmonarius* estaba compuesta de fucosa (2 %), xilosa (1 %), glucosa (8 %), manosa (27 %), 3-O-metilgalactosa (15 %) y galactosa (47 %), en tanto que el glucano extraído, un manogalactano con actividades analgésicas (antinociceptivas), analizado por resonancia magnética nuclear estaba constituido por una cadena principal de unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosilos y 3-O-metil- $\alpha$ -D-galactopiranosilo unidas por enlaces (1 $\rightarrow$ 6), ambas sustituidas en O-2 por extremos no reductores de  $\beta$ -D-manopiranosilo.

Se describe a continuación el proceso de extracción, aislamiento y purificación mediante la adaptación de varios métodos para obtener un extracto crudo de  $\beta$ -D-glucanos de la seta comestible *P. pulmonarius*.

## Materiales y métodos

### Condiciones de cultivo del hongo

La cepa de *P. pulmonarius* fue suministrada por el Centro Nacional de Investigación de Café - Cenicafé. La semilla de *P. pulmonarius* se obtuvo a los cinco (5) días de incubación de la cepa en sustrato de maíz (granos) en una caja de Petri (Figura 1). El cultivo se hizo en medio líquido con infusión de papa y sacarosa (200 gramos de papa y 15 g por litro de azúcar de mesa), se ajustó el pH a  $5,4 \pm 0,2$  y se esterilizó a 121 °C y 15 lb de presión durante 15 minutos. Se adicionaron 5 a 10 gramos del inóculo de “semilla” del hongo y se incubaron a 28 °C - 32°C sin iluminación y se controlaron la temperatura, el pH y el tiempo de crecimiento de la biomasa micelial. A los 18 días se observó una cantidad de



**Figura 1.** Etapas del cultivo del hongo *Pleurotus pulmonarius*. **A.** Micelio en medio líquido, infusión de papa liofilizada y sacarosa. **B.** Semilla del hongo *Pleurotus pulmonarius* a los cinco (5) días de incubación de la cepa en maíz (*Zea mays*) en granos. **C.** Bolsas de sustrato con residuos vegetales selladas e inoculadas con semilla del *Pleurotus pulmonarius* en fase micelial, incubación aislada de la luz a temperatura ambiente. **D.** seta comestible *Pleurotus pulmonarius*

biomasa húmeda de aproximadamente 9 g en cada ensayo. Este procedimiento de cosecha de biomasa se repitió hasta obtener 685 g de biomasa micelial húmeda, necesaria para la preparación del extracto crudo de micelio de *P. pulmonarius* ( $\beta$ -D-glucanos).

El cultivo en residuos vegetales se hizo en paquetes de 2 kg de mezcla de sustratos: 25 % de residuos vegetales de frutas y hortalizas más 40 % de maíz en tusa más 29,2 % de poda de hojas de árboles más 0,8-1 % de carbonato de calcio, en una proporción de carbono y nitrógeno de 25:1; estos se trituraron y pasteurizaron previamente a 80 °C durante 10 minutos y se inocularon con 100 gramos de semillas del hongo (un 5 % por paquete de sustrato). Posteriormente, la mezcla se empacó en bolsas de polietileno esterilizadas en autoclave a 121 °C y 15 libras de presión durante 15 minutos. Las bolsas inoculadas se aislaron de la luz para la incubación a 28 – 30 °C en la oscuridad y una humedad de 90 a 96 % hasta que el micelio invadió todo el sustrato; después, se pusieron cerca de la luz diurna (ventana, zona tropical) en un balance entre oscuridad y luminosidad de 60 a 500 unidades lux durante 8 a 12 horas diarias hasta el crecimiento máximo de la seta madura (carpóforos) (López, 2006). El tamaño de los cuerpos fructíferos cosechados 60 días después estuvo entre 5 y 10 cm de diámetro (promedio de 7 cm).

La biomasa micelial y los cuerpos fructíferos se desecaron a 60 °C y se molieron en una picadora Moulinex (tamaño de partícula 1 mm). Para la obtención de la muestra se mezclaron 29,4 y 137,6 g (peso seco) de estos, respectivamente, para un total de 167 g. El polvo de hongo molido resultante se guardó protegido de la luz a una temperatura de 80 °C.

#### **Obtención y método de caracterización del extracto crudo de $\beta$ -D-glucanos**

La extracción de polisacáridos de la seta comestible *P. pulmonarius* se hizo a partir de la modificación de procedimientos de varios autores (Bao *et al.*, 2001; Li X *et al.*, 2012; Li K *et al.*, 2016; Choong *et al.*, 2019).

*Extracción de polisacáridos.* Se usó una muestra de 1,0 g de polvo molido (peso seco) de la mezcla de micelio y cuerpo fructífero en un proceso de cuatro etapas:

1) La extracción se hizo durante 24 horas con 20 mL de éter de petróleo a 70 °C (3 horas cada vez), baño de agua termostático (WNB45, Memmert GmbH) (Li K *et al.*, 2016). Se centrifugó a 4500 rpm por 15 minutos y se disolvió el residuo con agua Millipore (proporción 1:4). Las proteínas se eliminaron añadiendo el reactivo de Sevag

(cloroformo + n-butanol (5:1) en una proporción de 2:1) en cuatro ocasiones (**Li et al.**, 2012). Se centrifugó a 4500 rpm durante 15 minutos cada vez, se agregó etanol 95 % (proporción de 1:4) al sobrenadante y el residuo resultante se liofilizó y conservó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

2) Se pesó 1,0 g del extracto crudo de polisacáridos obtenido en fracción alcalina (NaOH). Se agregaron 20 mL de agua Millipore y se calentó a  $95\text{-}100\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 3 a 4 horas; el calentamiento se repitió seis veces en un lapso de 24 horas. Se centrifugó a 4500 rpm a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, se separó el sobrenadante y se almacenó como fracción soluble en agua caliente. El residuo obtenido (**Liu et al.**, 2014; **Palacios et al.**, 2016) se disolvió en 20 mL de NaOH 1M y se calentó a  $95\text{-}100\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3 a 4 horas, repitiendo el calentamiento seis veces en un lapso 24 horas; así como se hizo con el agua caliente, se centrifugó a 4500 rpm a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos y se recolectó el sobrenadante rotulándolo como fracción-NaOH. El residuo se desechó. Se precipitaron los polisacáridos disueltos en el sobrenadante añadiendo etanol 95 % en una proporción de 2:1 v/v. Se centrifugó a 4500 rpm a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos y el precipitado volvió a disolverse con agua Millipore en una proporción de 1/4, rotulándolo como extracto crudo– fracción NaOH.

3) Para la desproteínización con proteinasa K (20 mg/mL, 100  $\mu\text{L}$  por cada 5 mL de extracto) del extracto crudo de polisacáridos - fracción NaOH después del ajuste a pH 8,0, se incubó con proteinasa K (rango de pH: 4,0-12,5, pH óptimo: 8,0) a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante la noche (también se puede incubar a  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 4 horas). La modificación del método de adición de esta enzima que degrada proteínas (proteasa), se hizo para optimizar la eliminación de proteínas remanentes al usar el reactivo de Sevag (**Li et al.**, 2012) y así aumentar la pureza del polisacárido. Se adicionó después ácido tricloroacético (TCA) al 20 % (p/v) en proporción v/v para precipitar las proteínas residuales (**Rajalingam et al.**, 2009).

4) Para la purificación se agregó NaOH 1 M al sobrenadante, con el fin de neutralizar el ácido tricloroacético (TCA) antes de la precipitación con NaCl 1 % (p/v) y etanol 95 % en proporción de 2:1 de los polisacáridos presentes en el sobrenadante. El precipitado se disolvió en 5 mL de agua Millipore de tipo I y se ajustó a pH neutro antes de ser dializado. En la diálisis se usó un tubo de membrana de diálisis (Spectra/Por™ 3 RC, MerckMillipore) de 0,45 mm y límite de peso molecular de 3500 daltons en agua Millipore de tipo I durante seis horas y hasta las 48 horas, cambiando el agua cada dos horas. El contenido retenido dentro del tubo de diálisis se liofilizó, se pesó y se guardó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para su uso, este extracto crudo – fracción NaOH de  $\beta$ -glucanos (denominado así de aquí en adelante) se reconstituyó con 5 mL de agua Millipore y se ajustó a pH neutro; los polisacáridos aislados, identificados y reconocidos provenían de este extracto.

En todas las etapas se hicieron pruebas de identificación y reconocimiento de los compuestos presentes como impurezas, tales como proteínas (usando la reacción cualitativa de Biuret y el método espectrofotométrico de rojo pirogalol con el kit de Byosistem S.A.) (**Watanabe et al.**, 1986). Asimismo, en la etapa 4 se hicieron pruebas después de la diálisis para identificar y reconocer carbohidratos, monosacáridos y disacáridos reductores (reacción cualitativa de Benedict, GODPAP- Byosistem S.A.) y polisacáridos (pruebas de Molish y Lugol) (**Iturbe & Sandoval.**, 2011). Las pruebas de detección de proteínas, glucosa oxidasa/peroxidasa y la de Benedict fueron negativas, en tanto que la de Molisch fue positiva, indicando la presencia de polisacáridos complejos en el extracto crudo – fracción NaOH dializado.

*Cuantificación de azúcares totales.* Se utilizó el método de fenol-sulfúrico modificado (**Dubois et al.**, 2016) para la determinación de azúcares en el extracto crudo dializado, obtenido de 1,0 g de hongo molido de *P. pulmonarius* (mezcla de micelio y cuerpo fructífero). El producto final del liofilizado (peso = 7,1 mg) se disolvió en 5 mL de agua Millipore de tipo I.

La curva de calibración se hizo con D-glucosa (Merck) a distintas concentraciones: 3; 5; 8,5; 12,5; 25 y 50  $\mu\text{g/mL}$  (no se muestra aquí con  $R^2=0,9869$ ). Las absorbancias se realizaron a una longitud de onda de 490 nm en un lector de microplaca (Thermo Scientific™

Multiskan™ Go) a los 25 min contra blanco de agua Millipore de tipo I. Todos los análisis se hicieron por duplicado. La muestra se preparó tomando 17,6  $\mu$ L del extracto crudo y completando el volumen con agua Millipore de tipo I hasta los 500  $\mu$ L. Se agregaron, además, 500  $\mu$ L de fenol al 5 % (p/v) y 2500  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado.

*Medición de  $\beta$ -glucanos de la seta comestible *P. pulmonarius*.* Para estimar la concentración del  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6)-D-glucano en la muestra molida de la mezcla de micelio y cuerpo fructífero, se usó el método enzimático (exo-1,3  $\beta$ -glucanasa /  $\beta$ -glicosidasa / amiloglicosidasa / glucosaoxidasa / peroxidasa) (K-EBHLG®, Megazyme International) en un espectrofotómetro Thermo Fisher Scientific Multiskan™ GO Microplate (Satitmanwivat *et al.*, 2012). El  $\beta$ -glucano se determinó por la diferencia entre el  $\beta$ -glucano total y el  $\alpha$ -glucano (AOAC Method 996.11). El control de  $\beta$ -glucano de levadura (*Aspergillus niger*, 49 % de pureza) fue suministrado por K-EBHLG®-Megazyme (Ireland). Todas las muestras y el control se analizaron por duplicado.

*Demostración de la estructura de triple hélice.* En el extracto crudo dializado de *P. pulmonarius* se evaluó con el método espectrofotométrico del rojo Congo el cambio en el máximo de absorción visible del color ( $\lambda$ : 488 – 516 nm), producto de la formación del complejo  $\beta$ -1,3-D-glucano-rojo Congo (Wood, 1980), para demostrar la conformación de la triple hélice de los  $\beta$ -1,3-D-glucanos en *P. pulmonarius* (Nitschke *et al.*, 2011).

Los  $\beta$ -glucanos del hongo se aislaron siguiendo la metodología de Sietsma *et al.* (1977), Nitschke *et al.* (2011) y Semedo *et al.* (2014), lo que se hizo por triplicado a partir de 10 mg de micelio o cuerpo fructífero del hongo molidos y desecados a 60 °C. Se prepararon las siguientes fracciones: fracción KOH, fracción HCl y fracción NaOH. Como patrón se utilizó el  $\beta$ -1,3-D-glucano de levadura con un 80 % de pureza (Megazyme, Ireland).

*Determinación de la longitud de onda y la concentración de rojo Congo.* En el espectro-fotómetro (Thermo Fisher Scientific Multiskan™ GO Microplate) se hizo un barrido espectral de las longitudes de onda de 300 a 700 nm con las fracciones - NaOH extraídas del micelio y los cuerpos fructíferos utilizando rojo Congo 0,08 %. El control positivo fueron 150  $\mu$ g/mL de  $\beta$ -1,3-D-glucano con 80 % de pureza (Megazyme, Ireland) y el control negativo, un blanco sin  $\beta$ -glucano. Con una concentración constante de estas soluciones, se determinó en cada una la longitud de onda en la que se presentó el pico máximo de absorbancia.

*Ensayo del efecto de la concentración de NaOH en el máximo de absorción del complejo rojo Congo- $\beta$ -1,3-D-glucano.* En un ensayo por duplicado con las fracciones NaOH y KOH extraídas de la mezcla de micelio y cuerpo fructífero, se evaluó la formación del complejo  $\beta$ -1,3-D-glucano con rojo Congo a partir del cambio en el máximo de absorción visible del color en orden creciente de concentración de NaOH (rango: 0 a 2,0 M) (Semedo *et al.*, 2014). Las lecturas de la absorbancia se hicieron con un espectrofotómetro UV/VIS (Thermo Fisher Scientific Multiskan™ GO Microplate) en la longitud de onda en que presentaron el pico de máxima absorción.

*Determinación de la concentración de  $\beta$ -1,3-D- glucano en el extracto-fracción NaOH de *P. pulmonarius*.* Definidos los parámetros del método, la concentración del rojo Congo, el tiempo de reacción, la temperatura ambiente y la longitud de onda de máxima absorbancia (Semedo *et al.*, 2014), se determinó la curva de calibración (no se muestra aquí). Para ello, se pesaron 750  $\mu$ g (0,75 mg) de  $\beta$ -1,3-D-glucano (Megazyme) con 49 % de pureza y se disolvieron en 5,0 mL de NaOH 1,0 M para preparar el estándar de  $\beta$ -1,3-D-glucano de 150  $\mu$ g/mL. En tubos de ensayo se agregaron 35, 70, 140, 210, 280 y 350  $\mu$ L de la solución estándar para completar un volumen de 350  $\mu$ L con agua Millipore de tipo I después de ajustar a pH neutro con HCl y agregar 300  $\mu$ L de tampón (50  $\mu$ L de ácido cítrico/didróxido de sodio 0,2 M, pH 7.0, y 20  $\mu$ g/mL de rojo Congo preparado con el mismo tampón). Las absorbancias del complejo de color resultante se hicieron a 505 nm (Nitschke *et al.*, 2011). Todas las concentraciones de las soluciones estándar y las muestras se prepararon por triplicado.

*Preparación de las muestras.* Se agregó tampón (ácido cítrico/hidróxido de sodio 0,2 M, pH 7,0) a 22 mL del extracto-fracción NaOH de *P. pulmonarius* hasta completar un volumen de 525  $\mu$ L. De esta dilución se extrajeron 350  $\mu$ L para la reacción de color, empleando 300  $\mu$ L de tampón (ácido cítrico/NaOH, 0,2 M, pH 7,0) y 50  $\mu$ L de solución de rojo Congo. Se calculó el resultado según el dato registrado en la curva de calibración.

*Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).* La determinación de la configuración anomérica de los monosacáridos se analizó mediante espectroscopía infrarroja en un interferómetro IRAffinity-1S (Shimadzu). Se analizaron las moliendas de tres fuentes de  $\beta$ -glucanos; estas muestras se maceraron con polvo de KBr de grado espectrofotométrico y se prensaron en gránulos de 1 mm (rango de frecuencia de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ).

*Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .* Se utilizó un espectrómetro Bruker Avance III (9.4 T) de 400 MHz y una sonda de 5 mm. Se analizaron muestras de hongo molido, mezcla de micelio y cuerpo fructífero y extracto crudo - fracción NaOH dializado de *P. pulmonarius*, y como control se empleó un  $\beta$ -1,3-D-glucano obtenido de levaduras con 80 % de pureza (Megazyme, Ireland). Se disolvieron aproximadamente 25 mg de cada muestra en 600  $\mu$ L de DMSO- $d_6$  (99,8 %) y sulfóxido de dimetilo- $D_6$  con tetrametilsilano (TMS) 0,03% (Merck). Los análisis se realizaron a 45 °C. Para los espectros de protones se utilizó la secuencia de pulso zg30 y para los del carbono-13, la zgpg30. Con el TMS se ajustó la escala de desplazamiento químico (0,00  $\delta$ , ppm).

## Resultados y discusión

### *Eficiencia biológica (EB) del cultivo del hongo P. pulmonarius*

Esta se determinó expresando en porcentaje la relación entre el peso fresco de los hongos producidos y el peso del sustrato seco, utilizando la ecuación (1):

$$\%EB = \frac{\text{Peso de biomasa húmedo} \times 100}{\text{Gramos de sustrato}} = \quad (1)$$

La eficiencia biológica de la producción de biomasa de las setas húmedas fue del 60 %, lo que se considera un valor óptimo (Romero *et al.*, 2000; García, 2003; Fernández, 2004).

### *Caracterización estructural de los $\beta$ -D-glucanos del extracto crudo obtenido*

*Contenido de polisacáridos totales.* El contenido de azúcares totales del extracto crudo de polisacáridos dializado según la técnica de fenol sulfúrico fue de 1.198 mg en el liofilizado (peso=7,1 mg) y de 119,89 mg por cada 100 g de hongo molido (peso seco), expresado como glucosa.

*Contenido de  $\beta$ -1,3:1,6-D-glucano en la muestra original.* Cabe destacar el contenido de  $\beta$ -1,3-1,6-D-glucano analizado con el método enzimático (exo-1,3- $\beta$ -glucanasa /  $\beta$ -glicosidasa / amiloglicosidasa / glucosaoxidasa / peroxidasa) de Megazyme, pues las muestras de polvo molido de micelio y cuerpo fructífero del hongo original dieron un porcentaje total del 32,5 % (p/p) en la seta y de 17,10 % (p/p) en el micelio. Estos datos son semejantes a los reportados por otros autores (Ruthes *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2017). McCleary & Draga (2016) encontraron que el peso seco del cuerpo fructífero de los hongos comestibles *Pleurotus ostreatus* y de *P. eringyii* fue de 32,3 % y 37,1 %, respectivamente. Satitmanwivat *et al.* (2012) registraron un 30,5 % de contenido de  $\beta$ -glucanos del polvo de *P. sajor-caju* y reportaron que en los hongos *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, *Coriolus versicolor*, *Agaricus bisporus*, *Flammulina velutipes*, *Agaricus blazei* Murill, *P. ostreatus*, *Phellinus linteus*, *Gyrophora esculenta*, *Auricularia auricular*, *Inonotus obliquus* y *P. eringyii* el contenido de  $\beta$ -glucanos determinados con el kit de Megazyme (Ireland) fluctuó entre el 4,7 y el 46,2 % en peso seco. Por el contrario, Baeva *et al.* (2019) encontraron en fracciones extraídas de *P. eringyii* un contenido de  $\beta$ -glucanos entre 45 y 60 %.

### Confirmación de la estructura de triple hélice

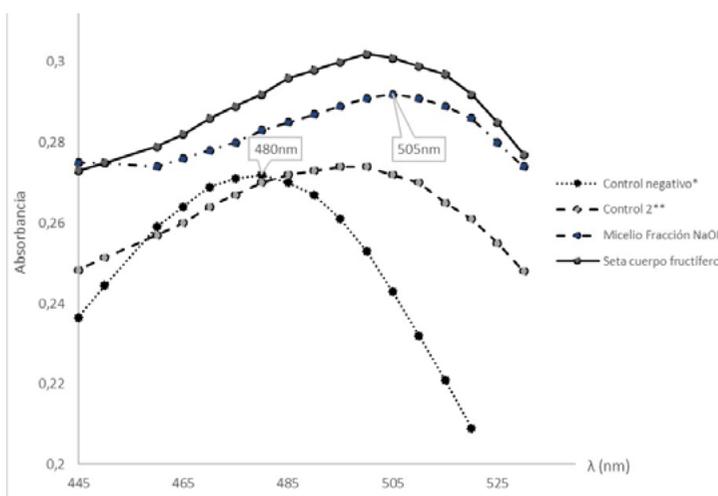
**Espectro de absorción UV-vis del complejo 1,3-  $\beta$ -glucano en rojo Congo.** La **figura 2** muestra la región de máxima absorbancia en los espectros de absorción de las mezclas de rojo Congo al 0,08 % con soluciones de  $\beta$ -1,3-1,6-D-glucano, las cuales revelaron un cambio batocrómico en las longitudes de onda de máxima absorción (480 a 505 nm), y un desplazamiento de 25 nm por la interacción específica del  $\beta$ -1,3-1,6-D-glucano de triple hélice ramificada de *P. pulmonarius*, datos similares a los publicados en otros estudios (Nitschke *et al.*, 2011; Semedo *et al.*, 2014).

**Estudio de la estructura conformacional de triple hélice mediante la transición hélice-espiral en solución de NaOH.** La **figura 3** muestra la evaluación del efecto de varias concentraciones de NaOH y KOH (rango de 0 a 2 M) en los espectros de absorción de los complejos formados con el rojo Congo y los polisacáridos presentes en el extracto crudo dializado de  $\beta$ -glucanos extraídos del micelio y el cuerpo fructífero de *P. pulmonarius*.

En las curvas espectrales del complejo rojo Congo- $\beta$ -1,3-glucanos, se observaron los cambios en los máximos de absorción visibles debidos a las condiciones alcalinas en concentraciones crecientes, que rompieron los enlaces de hidrógeno intramoleculares e intermoleculares y las interacciones hidrofóbicas estabilizadoras de la unión del polisacárido y la molécula del rojo Congo, lo que revela el cambio transicional de la triple hélice a una conformación en espiral.

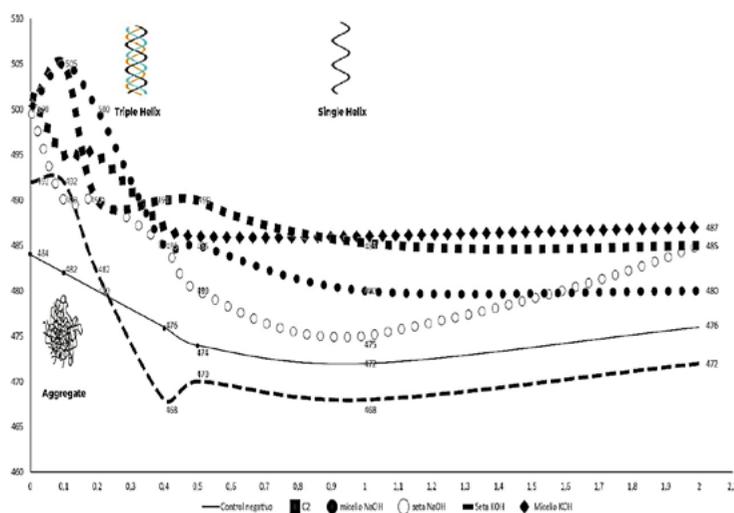
Se encontró que la absorción máxima disminuyó después de la adición de NaOH 0,5 M y KOH 0,4 M a la reacción de rojo Congo y 1,3- $\beta$ -glucanos. Estos resultados son comparables a los obtenidos por otros investigadores (Palacios *et al.*, 2012; Semedo *et al.*, 2014). Mediante este método de reacción con el rojo Congo se comprobó que los  $\beta$ -1,3-glucanos triple helicoidales son la forma dominante de los  $\beta$ -glucanos presentes en el micelio y el hongo *P. pulmonarius*.

**Concentración de  $\beta$ -1,3-D-glucano del extracto crudo - fracción NaOH de *P. pulmonarius* según el método de rojo Congo.** La cantidad de  $\beta$ -1,3-D-glucano con triple hélice presente en el extracto crudo - fracción NaOH lograda con este método



**Figura 2.** Región del espectro de absorción UV-vis del complejo rojo Congo- $\beta$ -1,3-1,6-D-glucano del hongo *P. pulmonarius* a la longitud de onda de máxima absorción. Efecto batocrómico entre el rojo Congo y las soluciones neutralizadas de  $\beta$ -1,3-1,6-D-glucano de micelio-fracción-NaOH y de cuerpo fructífero - fracción NaOH de la seta comestible *Pleurotus pulmonarius* \*Control negativo: sin  $\beta$ -Glucano; se reemplazó el volumen de la muestra-fracción NaOH por agua Millipore de tipo I más rojo Congo y se completó con NaOH 1M. \*\*Control positivo: estándar de  $\beta$ -1,3-D-glucano, 80 % de pureza, 150  $\mu$ g/mL (Megazyme, Ireland) en solución de NaOH 1 M con pH neutro

Fuente: Datos propios

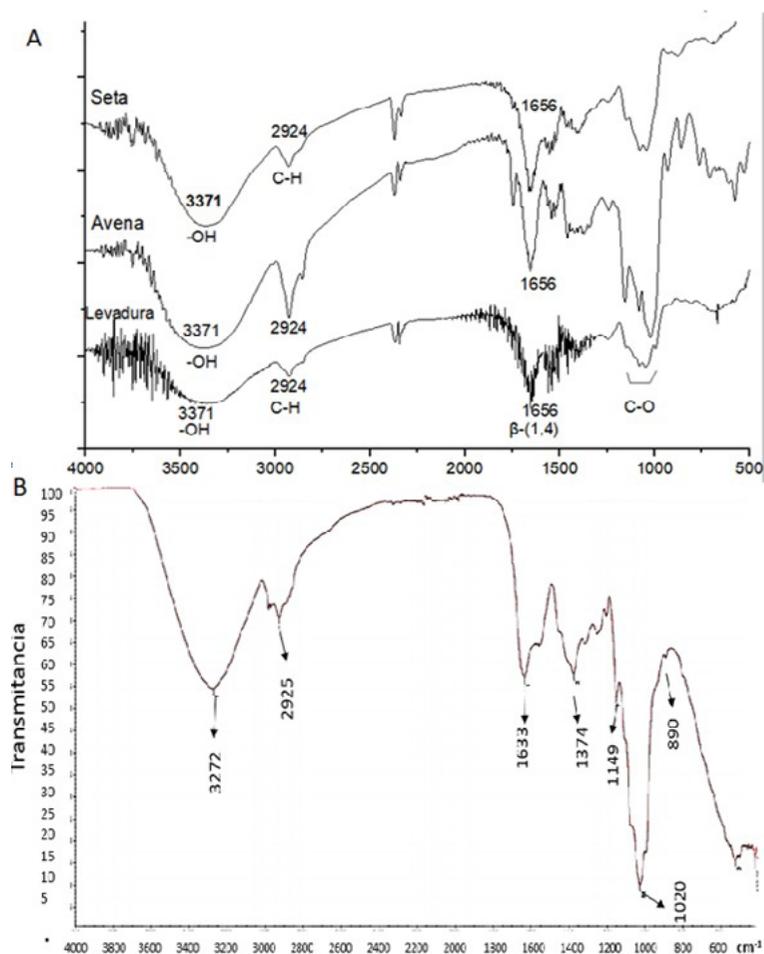


**Figura 3.** Demostración de la conformación de la triple hélice de los  $\beta$ -1,3-D-glucanos del hongo *Pleurotus pulmonarius* con rojo Congo. Acción de la concentración de NaOH y KOH sobre el máximo de absorción del complejo rojo Congo-1,3- $\beta$ -glucanos. Control negativo: solución de NaOH más rojo Congo sin  $\beta$ -glucano. Control positivo: 1,3- $\beta$ -glucano extraído de levaduras (Megazyme, Ireland: 80,0 % p/p de pureza; impurezas < 1 % de  $\alpha$ -glucano).

de extracción y aplicando diálisis para el proceso de purificación, fue de 6,3  $\mu\text{g}$  en el liofilizado (peso=7100  $\mu\text{g}$ ) y 6,3 mg/100 g de la mezcla de micelio y cuerpo fructífero (peso seco) del hongo molido. Con este método colorimétrico del rojo Congo, **Nitschke *et al.*** (2011) determinaron la cantidad de  $\beta$ -1,3-D-glucano en diferentes hongos comestibles y reportaron que variaba de 0,41 a 3,28 g/100 g en micelios y de 1,92 a 12,91 g/100 g en cuerpos fructíferos (peso seco); entre los hongos se hallaba *P. pulmonarius*, con 0,25 g en la fracción NaOH de un total de 0,41 g/100 g (peso seco). También **Semedo *et al.*** (2015) informaron en su estudio una biomasa de  $7,44 \times 10^{-1} \pm 4,67 \times 10^{-2}$  mg/100 g del contenido de la fracción NaOH extraída de la seta *P. ostreatus*. No obstante, debe tenerse en cuenta que el contenido de  $\beta$ -1,3-D-glucano puede variar dependiendo del método de extracción utilizado, la forma y los nutrientes empleados en el cultivo y la etapa de crecimiento de la seta durante su recolección. Asimismo, estas propiedades químicas pueden influir en la biodisponibilidad y, por lo tanto, en la actividad biológica (**Palacios *et al.***, 2012).

*Confirmación de la estructura del  $\beta$ -glucano por transformada de Fourier.* Los espectros infrarrojos por FTIR de las fracciones obtenidas se muestran en la **figura 4**. Se observan los picos 1.662; 1.409; 1.317; 1.246; 1.078; 1.043; 929 y 879  $\text{cm}^{-1}$ , característicos de hongos estudiados por otros autores (**Synytsya *et al.***, 2014). Además, se reconocen otros compuestos presentes en la muestra como los grupos amida de proteínas en la banda comprendida entre el pico 1.662,64 y 1.246  $\text{cm}^{-1}$  y los  $\alpha$ -D-glucanos en los picos 930; 879; 771 y 532,3  $\text{cm}^{-1}$  (**Synytsya *et al.***, 2014).

En la **figura 4A** se observa en el espectro de la muestra molida (micelio y cuerpo fructífero) de *P. pulmonarius* una banda entre los 2250 y los 2375  $\text{cm}^{-1}$ , característica de la presencia de los enlaces amida (N-H) de las proteínas (**Yang *et al.***, 2012), lo que contrasta con lo observado en la **figura 4B**, donde esta no aparece debido al proceso de purificación del extracto crudo - fracción NaOH. En la **figura 4A** también se observan varios picos en la región entre los 700 y los 1200  $\text{cm}^{-1}$  en los tres espectrogramas de FTIR (hongo molido, avena y levadura): las bandas intensas superpuestas de las vibraciones de estiramiento de CO y CC, entre los 950 y los 1200  $\text{cm}^{-1}$ , corresponden a enlaces betaglicosídicos y la configuración piranoide de los polisacáridos; además, entre los 500 y los 950  $\text{cm}^{-1}$  se observan otros picos (no señalados aquí) de diferentes grupos funcionales, como el grupo



**Figura 4. A.** Espectro IR de tres fuentes de  $\beta$ -glucanos: seta molida (micelio más cuerpo fructífero) de *P. pulmonarius*, avena (*Avena sativa*) y levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). **B.** Espectro IR del extracto crudo - fracción NaOH de la seta *P. pulmonarius* (micelio más cuerpo fructífero)

hidroxilo del carbono C1 anomérico de la glucosa (los diastereoisómeros  $\alpha$  y  $\beta$ ), que confirman la complejidad de la estructura química de los polisacáridos de la levadura, la avena y la seta (Gutiérrez *et al.*, 1996; Baeva *et al.*, 2019).

En la figura 4B, se observa en el extracto crudo - fracción NaOH de *P. pulmonarius* (micelio + cuerpo fructífero) un pico débil alrededor de los 890  $\text{cm}^{-1}$  asignado a los enlaces anoméricos específicos para  $\beta$ -glucanos, característicos de la estructura de estos polisacáridos (Ramírez, 2016; Zhou *et al.*, 2019). Según Synytsya *et al.* (2009) y Gutiérrez *et al.* (1996), el espectro FTIR muestra varios picos en la región entre los 890 y los 1400  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a enlaces glicosídicos  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3), siendo los de 1020, 1149 y 1374  $\text{cm}^{-1}$  producto de residuos de glucosa (1,3)-di-O- sustituida típicos de los  $\beta$ -glucanos.

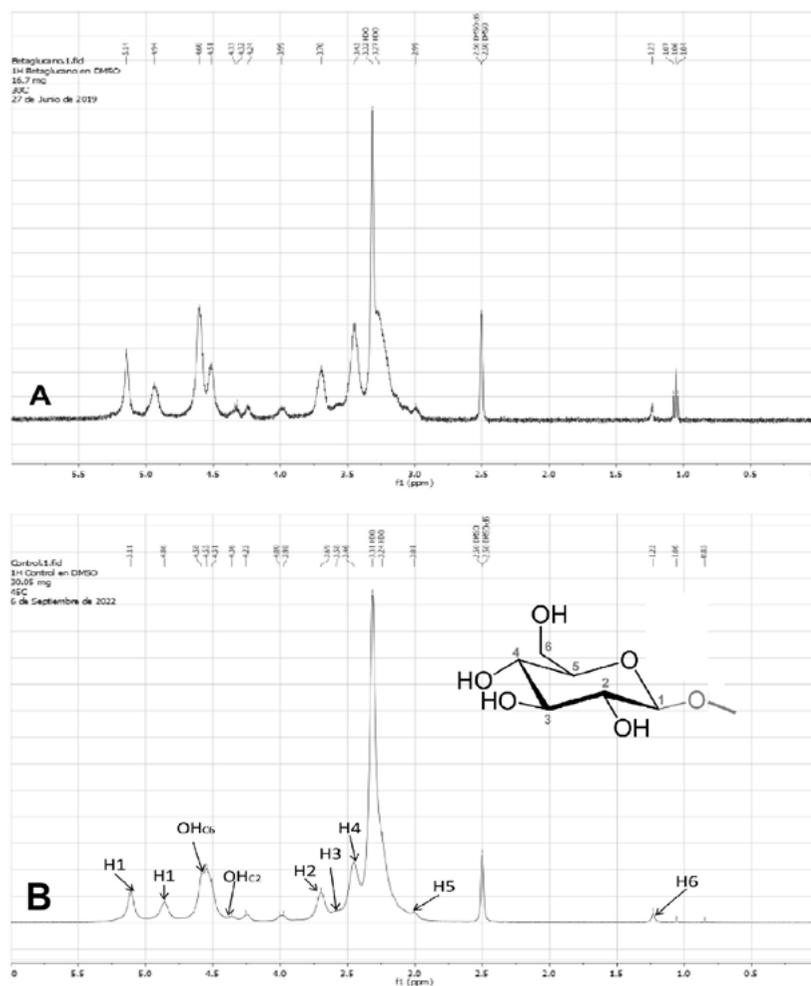
En las figuras 4 A y B, se observa entre los 1630 y los 1660  $\text{cm}^{-1}$  un pico fuerte, característico del enlace O-glicosídico  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) (Amaya & Ardila, 2016). Los grupos hidroxilos (OH) de los carbohidratos se encuentran a los 3000 a 3500  $\text{cm}^{-1}$  del enlace  $\beta$ -O-glicosídico (Wade, 2011; Ramírez, 2016; Du *et al.*, 2017).

Liu *et al.* (2011) consideraron que la amplia banda alrededor de los 3.401,32  $\text{cm}^{-1}$  era un estiramiento debido al hidroxilo de los polisacáridos, y que la banda débil a los 2.921,86  $\text{cm}^{-1}$  mostraba la vibración de estiramiento de C-H. La absorbancia a los 1.642,09  $\text{cm}^{-1}$  indicaba presencia de  $\text{H}_2\text{O}$  unida. Asimismo, los autores asignaron a los  $\alpha$ -glucanos la banda cercana a los 843,11  $\text{cm}^{-1}$ .

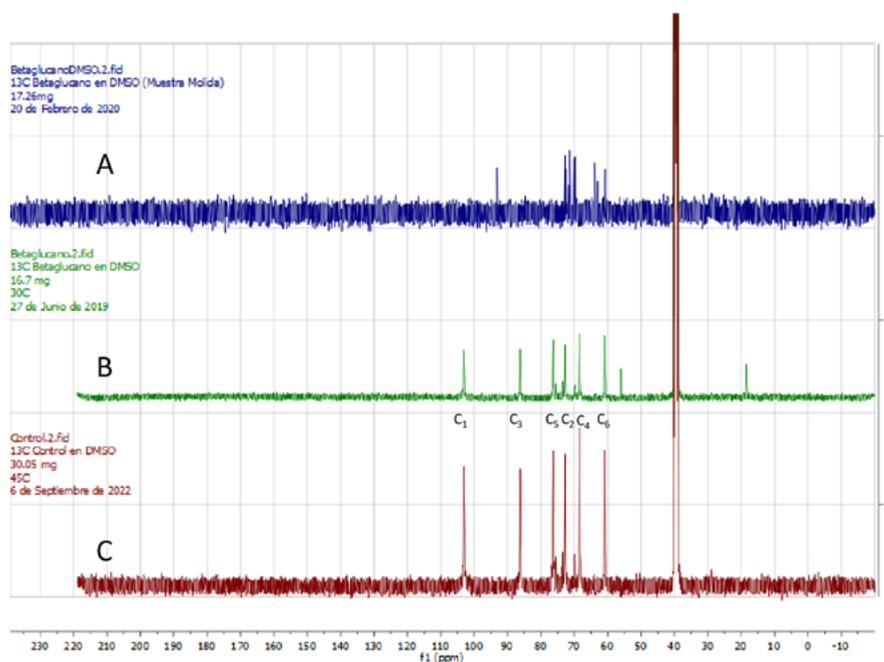
Los datos obtenidos en el espectro FTIR de la muestra original de polvo molido de seta y micelio de *P. pulmonarius* (**Figura 4 A**) son semejantes a los publicados en otros estudios del  $\beta$ -1,3-1,6-D-glucano de hongos (Synytsya *et al.*, 2009); Liu *et al.*, 2011; Vetvicka *et al.*, 2013; Semedo *et al.*, 2014; López *et al.*, 2021).

**Análisis de la resonancia magnética nuclear.** En la **figura 5** se observan los dos espectros RMN  $^1\text{H}$  del polisacárido, tanto del control como el del extracto crudo dializado – fracción alcalina de la seta *P. pulmonarius*, con picos de carbono anomérico a 5,1 y 4,51, característicos de los enlaces  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente.

Según Palacios *et al.* (2012), los picos representativos de carbohidratos correspondían a las señales de protones anoméricos (H1), entre 4,5 y 5,1 ppm de glucósidos, y las H2, H3, H4, H5 y H6 correspondían a 3,01 - 4,36 ppm del anillo glicosídico. Las señales de desplazamiento del carbono anomérico (C1) del glucósido se atribuyeron a las 100 – 104 ppm. Los carbonos C2, C4 y C5 del anillo glicosídico se expresaron entre las 70 y las 80 ppm. Por otro lado, se observa una máxima señal en el carbono C3 a 87 ppm, lo que puede atribuirse a la presencia de residuos con enlaces 1,3 (Chenghua *et al.*, 2000); el C6 se observó entre las 60 y 62 ppm. Así, las relaciones entre protones y carbonos respaldan las asignaciones propuestas de los átomos H1/C1 (4,51/103,1),



**Figura 5.** Resonancia Magnética-RMN $^1\text{H}$  (400MHz) del Extracto Crudo de polisacáridos del hongo *Pleurotus pulmonarius*. **A.** Extracto crudo de  $\beta$  glucano – fracción NaOH obtenido de *P. pulmonarius* purificado por diálisis. **B.** Control de 1,3- $\beta$ -D- glucano, 80 % de pureza (Megazyme, Ireland). Los desplazamientos químicos se expresan en ppm.



**Figura 6.** Espectro de RMN $^{13}\text{C}$  de polisacáridos disueltos en sulfóxido de dimetilo-D6 con TMS 0,03 % a 100 MHz y 45 °C de temperatura. **A.** Hongo *P. pulmonarius* molido (mezcla de micelio y cuerpo fructífero). **B.** Extracto crudo de  $\beta$  glucano – fracción alcalina obtenido de *P. pulmonarius*. **C.** Control de 1,3- $\beta$ -D-glucano, 80 % de pureza (Megazyme, Ireland). Los desplazamientos químicos se expresan en ppm.

H2/C2 (3,46/73,03), H3/C3 (3,69/87), H4/C4 (3,01/69,8), H5/C5 (3,01/76,32), que confirman la presencia de la configuración de los residuos de  $\beta$ -D- glucopiranosilo en el polisacárido (Ojha *et al.*, 2010). La señal de desplazamiento de H6/C6 se observó a 3,58/60,87.

Según los resultados de la RMN del extracto crudo dializado – fracción alcalina, el espectro se correlacionó adecuadamente con los espectros conocidos para glucanos de estructura similar (Gorin, 1981; Ruthes *et al.*, 2013). La cadena  $\beta(1\rightarrow3)$  glicosídica quedó evidenciada por la aparición de la señal correspondiente al C-anomérico a 103,8 ppm, característica de uniones  $\beta$ , y la señal a 87,9 y 87,2 ppm característica de C-3, O-sustituido (Figura 6). La señal alrededor de las 61 ppm corresponde al C-6 no sustituido tanto en la cadena central como en el extremo no reductor de las ramificaciones, y la señal a 72 ppm corresponde, en cambio, al C-6, O-sustituido, del punto de ramificación. En la muestra de hongo molido (mezcla de micelio y cuerpo fructífero) también se evidencian señales similares de desplazamiento H2/C2, H6/C6 de los residuos de  $\beta$ -D-gucopiranosilo y H6/C6 (3,01/69,8), correspondiente al enlace  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6).

## Conclusiones

En el estudio se utilizaron métodos de extracción discontinua, aislamiento, purificación y caracterización de un extracto crudo de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6)- D-glucano de *P. pulmonarius*. Entre los métodos se incluyó el tratamiento con proteinasa K para el mejoramiento de la pureza del polisacárido, evitando la presencia de proteínas y logrando un  $\beta$ -D-glucano con su conformación nativa de triple hélice, la cual es crucial para la actividad inmunomoduladora.

La metodología utilizada para la extracción no es novedosa, ya que los recursos tecnológicos fueron limitados, pero sí fue fundamental y eficaz porque permitió confirmar la presencia de  $\beta$ -D-glucano con un elevado porcentaje en el hongo *P. pulmonarius*.

La información obtenida sobre la implementación de métodos de cultivos artesanales con recursos propios de la región y las pruebas para la detección y cuantificación de betaglucanos pueden servir de base en líneas de investigación futuras con impacto en la salud, la nutrición y la economía.

## Agradecimientos

A la Universidad Libre por el soporte financiero del proyecto, a las Universidades del Norte, Industrial de Santander y del Atlántico por su apoyo técnico y por facilitar la infraestructura.

## Conflicto de intereses

Ninguno declarado.

## Referencias

- Amaya, L. & Ardila, J.** (2016). Evaluación del proceso de obtención de polisacáridos tipo glucano presentes en la *Ganoderma lucidum* a nivel laboratorio para nutrisetas s.a.s. Tesis para optar al grado de Ingeniería Química, Facultad de Ingenierías, Fundación Universidad de América Facultad, Bogotá, D.C.
- Baeva E., Bleha R., Lavrova E., Sushytskyi L., Copiková J., Jablonsky I., Kloucek P., Synytsya A.** (2019). Polysaccharides from Basidiocarps of Cultivating Mushroom *Pleurotus ostreatus*: Isolation and Structural Characterization. *Molecules*, 24, 2740. <https://doi.org/10.3390/molecules24152740>
- Bao XF, Liu CP, Fang JN, Li XY.** (2001). Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. *Carbohydrate Research*, 332, 67-74.
- Chenghua, D, Xiangliang, Y, Xiaoman, G, Yan, W, Jingyan, Z, Huibi, X.** (2000). A  $\beta$ -D-glucan from the sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. *Carbohydrate Research*, 328, 629-633.
- Choong, Y.-K, Ellan, K, Chen, X.-D., Azuar-Mohamad, S.** (2019). Extraction and Fractionation of Polysaccharides from a Selected Mushroom Species, *Ganoderma lucidum*: A Critical Review. *Fractionation*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.78047>
- Cohen, R.L, Persky, L., Hadar, Y.** (2002). Biotechnological applications and potential of Wood-degrading mushroom of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 58, 582-594.
- Das, N. & Mukherjee, M.** (2007). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* on weed plants. *Bioresource Technology*, 98(14), 2723-2726.
- Du, B., Yang, Y., Bian, Z., Xu, B.** (2017). Characterization and Anti-Inflammatory Potential of an Exopolysaccharide from Submerged Mycelial Culture of *Schizophyllum commune*. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 252. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00252>
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., Smith, F.** (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
- Fernández, F.** (2004). *Guía de producción de setas (Pleurotus spp.)*. Fungitec Asesorías. México.
- García, M.** (2003). Cultivo de setas y trufas. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Gorin, P. A. J.** (1981). Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Polysaccharides. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 13, 104. [https://doi.org/10.1016/s0065-2318\(08\)60309-1](https://doi.org/10.1016/s0065-2318(08)60309-1)
- Gutiérrez, A., Prieto, A., Martínez, A.T.** (1996). Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. *Carbohydrate Research*, 281, 143-154.
- Iturbe, F. & Sandoval, J.** (2011). Análisis de Alimentos. Fundamentos y Técnicas. Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Química, México. [https://amyd.quimica.unam.mx/pluginfile.php/14545/mod\\_resource](https://amyd.quimica.unam.mx/pluginfile.php/14545/mod_resource)
- Li, K., Yu, M., Hu, Y., Ren, G., Zang, T., Xu, X., Qu, J.** (2016). Three kinds of *Ganoderma lucidum* polysaccharides attenuate DDC-induced chronic pancreatitis in mice. *Chemico-Biological Interactions*, 247, 30-38.
- Li, X., Zhao, R., Zhou, H.L., Wu, D.H.** (2012). Deproteinization of polysaccharide from the stigma maydis by sevag method. *Advanced Materials Research*, 340, 416-420.
- 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- $\beta$ -glucan from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*, 101(30), 968-974.

- Liu, J., Zhang, Ch., Wang, Y., Yu, H., Liu, H., Wang, L., Yang, X., Liu, Z., Wen, X., Sun, Y., Yu, Ch., Liu, L. (2011) Structural elucidation of a heteroglycan from the fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murill. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49, 716-720.
- López, C. & Hernández, R. (2006). Evaluación de crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.
- McCleary B.V. & Draga, A. (2016). Measurement of  $\beta$ -Glucan in Mushrooms and Mycelial Products. *Journal of AOAC International*, 99(2), 364-373.
- Megazyme International. (2014). Enzymatic yeast beta-glucan assay procedure (K-EBHLG), Ireland. [https://secure.megazyme.com/files/Booklet/K-EBHLG\\_DATA.pdf](https://secure.megazyme.com/files/Booklet/K-EBHLG_DATA.pdf)
- Nitschke, J., Modick, H., Busch, E., Wantoch, X., von Rekowski, R., Altenbach, HJ, Mölleken H. (2011). A new colorimetric method to quantify  $\beta$ -1,3-1,6-glucans in comparison with total  $\beta$ -1,3-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 127, 791-796.
- Ojha, A.K., Cnandra, K., Ghosh, K., Islam, S. (2010). Glucans from the alkaline extract of an edible mushroom, *Pleurotus florida*, cv *Assam Florida*: isolation, purification, and characterization. *Carbohydrate Research*, 345, 2157-2163. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.06.015>
- Palacios, I., García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A. (2012). Novel isolation of water-soluble polysaccharides from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *Carbohydrate Research* 358, 72-77.
- Pizarro, C. S., Ronco M, A. M., Gotteland R, M. (2014).  $\beta$ -Glucanos: ¿Qué tipos existen y cuáles son sus beneficios en la Salud? *Revista Chilena de Nutrición*, 41 (4), 439-446. <http://doi.org/10.4067/S0717-75182014000400014>
- Rajalingam, D., Loftis, C., Jiashou, J.X., Kumar, T.K.S. (2009). Trichloroacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured intermediate. *Protein Science*, 18(5), 980-993.
- Ramirez-Jilly, M.A. (2016). Characterization and Safety Evaluation of Exopolysaccharide Produced by *Rhodotorula minuta* BIOTECH 2178. *International Journal of Food Engineering*, 2(1), 31-35. <https://doi.org/10.18178/ijfe.2.1.31-35>.
- Romero, J., Rodríguez, M., Pérez, R. (2000). *Pleurotus ostreatus*. Importancia y tecnología del cultivo. Grupo de Nutrición, Departamento de Física-Química, Facultad de Mecánica, Universidad de Cienfuegos Carlos Rafael Rodríguez.
- Ruthes, A.C., Carbonero, E.R., Córdovac, M.M., Baggio, C.H., Soares-Santos, A.R., Sasaki, G.L., Cipriani, T.R., Gorina, P.A., Iacomini, M. (2013). *Lactarius rufus* (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -d-glucans: Structure, antinociceptive and anti-inflammatory effects. *Carbohydrate Polymers*, 94, 129-136.
- Ruthes, A. C, Rattamann, Y. D, Malquevicz-Paiva, S. M., Carbonero, E. R, Córdova, M. M, Baggio, C. H, Santos, A. R. S., Gorin, P. A. J., Iacomini, M. (2013). *Agaricus bisporus* fucogalactan: Structural characterization and pharmacological approaches. *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 184-191.
- Ruthes, A., Fhernanda, R., Iacomini, M. (2015). D-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. *Carbohydrate Polymers*, 117, 753-761. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.051>
- Satitmanwivat, S., Ratanakhanokchai, K., Laohakunjit, N., Kuoping-Chao, L., Chen, S., Pason, P., Tachaapaikoon, Ch., Lay-Kyu, K. (2012). Improved purity and immunostimulatory activity of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6)-Glucan from *Pleurotus sajor-caju* Using Cell Wall-Degrading Enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 5423-5430. <https://doi.org/10.1021/jf300354x>
- Semedo, M.C., Karmali, A., Fonseca, L. (2014). A high throughput colorimetric assay of  $\beta$ -1,3-D-glucans by Congo red dye. *Journal Microbiological Methods*, 109, 104-108. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.12.020>.
- Sietsma, J. H. & Wessels, J. G. H. (1977). Chemical analysis of the hyphal wall of *Schizophyllum commune*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 496, 225-239.
- Smiderle, F.R., Olsen, L.M., Ruthes, A.C., Czelusniak, P.A., Santana-Filho, A.P., Sasaki, G.L., Gorin, P.A.J., Iacomini, M. (2012). Exopolysaccharides, proteins and lipids in *Pleurotus pulmonarius* submerged culture using different carbon sources *Carbohydrate Polymers*, 87, 368-37.
- Smiderle, F. R., Olsen, L. M., Carbonero, E. R., Marcon, R., Baggio, C.H., Freitas, C. S., Santos, A. R. S., Torri, G., Gorin, P. A. J., Iacomini, M. (2008). A 3-O-methylated manno-galactan from *Pleurotus pulmonarius*: Structure and antinociceptive effect. *Phytochemistry*, 69, 2731-2736.

- Synytsya, A., Mícková, K., Synytsya A, Jablonsky, I., Speváček, J., Erban, V., Kováříková, E., Copíková, J.** (2009). Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers* 76, 548-556. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.021>
- Synytsya, A. & Novak, M.** (2014). Structural analysis of glucans. *Annal of Translational Medicine*, 2(2) 17.
- Vetvicka, V. & Novak, M.** (2013). Beta- Glucan, Biology and Chemistry of Beta Glucan and Specific Application. Benthan Books, Science Publishers.
- Wade, L.** (2011). Química orgánica, Volumen I, séptima edición, *Espectroscopia infrarroja*. Pearson educación, México.
- Watanabe, N., Kamel, S., Ohkubo, A., Makino, K., Tokuda, K.** (1986). Urinary proteins measured with a Pyrogallol Red-MolybdateComplex, Manually and in a Hitachi 726 Automated Analyzer. *Clinical Chemistry*, 32(8), 1551-1544.
- Wood, P.J.** (1980). Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 85, 271-287. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)84676-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)84676-5)
- Xu, S., Dou, Y., Ye, B., Wu, Q., Wang, Y., Hu, M., Ma, F., Rong, X., Guo, J.** (2017). *Ganoderma lucidum* polysaccharides improve insulin sensitivity by regulating inflammatory cytokines and gut microbiota composition in mice. *Journal of Functional Foods*, 38, 545-552.
- Yang, W., Pei, F., Shi, Y., Zhao, L., Fang, Y., Hua, Q.** (2012). Purification, characterization and anti-proliferation activity of polysaccharides from *Flammulina velutipes*. *Carbohydrates Polymers*, 88, 474-480.
- Zhou, F.F., Zhang, Y.D., Zhang, Q., Lu, J., Liu, Y., Wang, JH.** (2019). Structure characterization and immunological activity of a  $\beta$ -glucan from *White H. marmoreus* and its silver nanoparticle derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 210, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.057>