



Revista Colombiana de Química  
ISSN: 0120-2804  
ISSN: 2357-3791  
rcolquim\_fcbog@unal.edu.co  
Universidad Nacional de Colombia  
Colombia

# Condiciones para el análisis de proteínas del micelio de *Lentinula edodes* obtenido por fermentación en estado líquido

Vega-Oliveros, Carolina; Chegwin-Angarita, Carolina; Ardila-Barrantes, Harold  
Condiciones para el análisis de proteínas del micelio de *Lentinula edodes* obtenido por fermentación en estado líquido

Revista Colombiana de Química, vol. 48, núm. 3, 2019

Universidad Nacional de Colombia, Colombia

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=309061220004>

## Condiciones para el análisis de proteínas del micelio de *Lentinula edodes* obtenido por fermentación en estado líquido

Conditions for protein analysis of *Lentinula edodes* mycelium obtained from liquid state fermentation

Condições para a análise de proteínas do micélio de *Lentinula edodes* obtidas por fermentação em estado líquido

Carolina Vega-Oliveros

Universidad Nacional de Colombia, Colombia

cvegao@unal.edu.co

Redalyc: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?>

id=309061220004

Carolina Chegwin-Angarita

Universidad Nacional de Colombia, Colombia

cchegwina@unal.edu.co

Harold Ardila-Barrantes

Universidad Nacional de Colombia, Colombia

hdardilab@unal.edu.co

Recepción: 12 Septiembre 2018

Aprobación: 17 Junio 2019

### RESUMEN:

Pocos son los trabajos enfocados en la producción biotecnológica y el desarrollo de herramientas analíticas en torno a la *Lentinula edodes*, seta comestible con potencial para el desarrollo de nutracéuticos. Por esto, en esta investigación, se estudió la producción de biomasa del hongo en el tiempo, mediante fermentación en estado líquido, y se seleccionaron las condiciones que permitieron la obtención de extractos para la aplicación de herramientas para análisis proteómico. Los métodos de extracción de proteínas, ácido tricloroacético (TCA) - acetona y TCA – acetona - fenol, fueron comparados en términos del rendimiento de extracción y los perfiles de separación usando electroforesis en 1D (SDS-PAGE) y 2D (IEF-SDS PAGE). Se determinó que a los 10 días de crecimiento se obtiene la mayor producción de biomasa y proteína total. La extracción con TCA - acetona - fenol presentó un mayor rendimiento, resolución y número de bandas en la electroforesis 1D. En 2DE, los dos métodos permitieron la extracción de proteínas con puntos isoeléctricos en el rango de pH 3-10, pero el método TCA - acetona - fenol llevó a una extracción diferencial, favoreciendo el rango de masa de 33 a 113 kDa. Estos resultados se constituyen en una primera aplicación de técnicas de separación electroforética para futuros estudios proteómicos.

**PALABRAS CLAVE:** ácido tricloroacético, fenol, electroforesis, macromicetos, shiitake.

### ABSTRACT:

Few are the investigations focused on the biotechnological production and the development of analytical tools about *Lentinula edodes*, an edible mushroom which has a potential for being used in the development of nutraceutical products. For this reason, in this research, the production of biomass of the mushroom over time by liquid state fermentation (LSF) was studied. Then, the conditions that allow obtaining protein extracts for the application of tools for proteomic analysis were selected. Trichloroacetic acid (TCA) - acetone and TCA - acetone - phenol were the two protein extraction methods which were compared in terms of extraction yield and separation profiles in 1D (SDS-PAGE) and 2D (IEF-SDS PAGE) electrophoresis. The highest production of biomass and total protein content was obtained after 10 days of LSF. Protein extraction with TCA - acetone - phenol presented the highest yield, resolution and number of bands in 1D electrophoresis. In 2DE the two methods allowed the extraction of proteins with isoelectric points in pH 3-10 range but, the TCA - acetone - phenol method favored a differential extraction of proteins in the range of 33 to 113 kDa. These results constitute a first application of electrophoretic separation techniques for future proteomic studies.

---

### NOTAS DE AUTOR

cvegao@unal.edu.co

**KEYWORDS:** chloroacetic acid, phenol, electrophoresis, mushrooms, shiitake.

**RESUMO:**

*Lentinula edodes* é um cogumelo comestível com potencial para o desenvolvimento de nutracêuticos. Entretanto, os trabalhos voltados para a produção biotecnológica e o desenvolvimento de ferramentas analíticas que permitem aprofundar sua composição são incipientes. Nesta pesquisa, a produção de biomassa do fungo ao longo do tempo por meio de fermentação no estado líquido foi estudada e as condições que permitem obter extratos para a aplicação de ferramentas para análise proteômica foram selecionadas. Os métodos de extração de proteínas usados foram ácido tricloroacético (TCA) - acetona e TCA - acetona - fenol e comparada em termos de rendimento de extração e perfis de separação utilizando electroforese 1D (SDS-PAGE) e 2D (IEF-SDS PAGE). Foi determinado que após 10 dias de crescimento, a maior produção de biomassa e proteína total foi obtida. A extração com TCA - acetona - fenol apresentou maior rendimento, maior resolução e número de bandas em eletroforese 1D. No 2DE os dois métodos permitiram a extração de proteínas com pontos isoelettricos na faixa de pH 3-10, mas o método TCA - acetona - fenol levou a uma extração diferencial, favorecendo a faixa de 33 a 113 kDa. Estes resultados constituem uma primeira aplicação de técnicas de separação eletroforética para futuros estudos proteômicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** ácido tricloroacético, fenol, eletroforese, macromicetos, shiitake.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha presentado un aumento significativo en el consumo de setas a nivel mundial. Este fenómeno se debe no solo al alto valor nutricional sustentado en el contenido de proteína, aminoácidos esenciales, fibra y bajo contenido en grasa [1], sino también a la evidencia científica que corrobora sus propiedades medicinales [2]. Aun cuando, históricamente, los estudios sobre actividad biológica de este grupo de organismos se han concentrado en los polisacáridos [3], actualmente, se ha demostrado, usando diferentes metodologías para aislamiento y análisis, que otros compuestos tienen potencial como fármacos o nutracéuticos. Los efectos medicinales reportados abarcan desde la acción directa anticancerígena hasta su utilidad contra enfermedades del síndrome metabólico (diabetes mellitus, hipercolesterolemia, hipertensión, aterogénesis, hiperglicemia, obesidad), actividad antimicrobiana y antiviral [4-7], entre otras. Así mismo, proteínas o glicoproteínas de muchos macromicetos han permitido ampliar el panorama respecto a sus aplicaciones en diferentes ámbitos [8]. Por ejemplo, a escala industrial es conocido el caso de enzimas como amilasa, celulasas, lacasas, o proteasas, aisladas de los micromicetos *Aspergillus niger*, *A. Oryzae*, *Trichoderma viride* o del macromiceto *Trametes versicolor*, los cuales presentan amplia aplicación en la industria de alimentos, textil, papel, detergentes, producción de biodiesel, entre otros [9].

*L. edodes* es una seta lignolítica [10] que ha sido usada como alimento o ingrediente de alimentos, debido a que se encuentra dentro del grupo de setas GRAS (por sus siglas en inglés “generally regarded as safe”). Por ello, la mayoría de las investigaciones realizadas sobre esta seta se han centrado en el cultivo tradicional o biotecnológico dirigido al aumento de su producción [11], siendo pocos los estudios que han profundizado en su perfil bioactivo. En general, una de las limitantes de la obtención tradicional de setas comerciales son los períodos de tiempo requeridos para la cosecha del cuerpo fructífero; por esto, las alternativas biotecnológicas como la fermentación en estado líquido o FEL presentan una serie de ventajas que incluyen una mayor producción de micelio en un espacio menor, con tiempos más cortos y menos posibilidades de contaminación [12]. Sin embargo, la producción de biomasa bajo dichas condiciones requiere de diferentes estudios que permitan confirmar el mantenimiento de su posible actividad biológica y así, comprobar su uso en la generación de alimentos funcionales.

Estudios recientes han demostrado que las proteínas presentes en hongos macromicetos pueden tener actividad biológica, como es el caso de actividad antiproliferativa contra líneas de cáncer [13-16]. En dichos estudios, se han realizado aproximaciones experimentales, las cuales incluyen el aislamiento de proteínas específicas y la posterior determinación de su actividad biológica [17], o aproximaciones holísticas, las cuales buscan dentro del proteoma completo la posible aplicación terapéutica [18]. Indistintamente del enfoque,

es importante definir los protocolos que permitan una extracción de proteínas libres de contaminantes no proteicos en las etapas iniciales, los cuales puedan interferir en los métodos de análisis posteriores [19]. La importancia del protocolo de extracción en un experimento proteómico se puede resumir en la siguiente declaración: solo si se puede extraer y solubilizar una proteína, se tiene la posibilidad de detectarla e identificarla [20].

Con estas necesidades se han desarrollado un conjunto de metodologías que permiten obtener extractos proteicos con buena calidad para la aplicación de dichas aproximaciones. Dentro de estas se destacan las que incluyen la precipitación con ácido tricloroacético (TCA) y acetona y la de TCA - acetona con un paso adicional de separación con fenol [21-23]. La separación electroforética tanto en 1D (SDS-PAGE) como en 2D (IEF-SDS PAGE) es la técnica de separación más aplicada en estudios proteómicos [24, 25], usándose de manera previa a los análisis de identificación con espectrometría de masas. La aplicación de estas técnicas se ha extendido en diferentes estudios descriptivos o comparativos, siendo la alternativa más extendida para el análisis de perfiles proteicos, debido a su bajo costo [26]. Aunque se ha reportado la aplicación de estos protocolos en *L. edodes* [27] y [28], a la fecha, no se han evaluado algunos parámetros de calidad que permitan definir si dichos métodos experimentales son pertinentes para el análisis proteómico de micelio de este hongo, obtenido mediante FEL. Esto es un requisito cuando se pretende evaluar, mediante aproximaciones holísticas, el potencial del micelio de este organismo para la generación de alimentos funcionales.

En la presente investigación, con el fin de aportar herramientas que permitan el estudio de diferentes especies fúngicas (macro y micromicetos) de interés industrial, farmacológico o en alimentos, se aborda el análisis comparativo de dos métodos de extracción de proteínas tradicionalmente usados en investigaciones proteómicas, aplicado a material fúngico obtenido de fermentación en estado líquido (FEL). Para ello, se estudió inicialmente la cinética de producción de biomasa de una cepa *L. edodes*, obtenida bajo dichas condiciones, y se determinó el rango de tiempo en el cual se presentó la mayor producción de biomasa y proteína total. Posteriormente, se evaluaron en cuanto a su rendimiento total ( $\mu\text{g proteína} / \text{mg micelio seco}$ ), así como en la separación electroforética mediante 1D y 2D los dos métodos de extracción propuestos. Las condiciones experimentales planteadas en este estudio constituyen una herramienta central que permitirá avanzar en el desarrollo guiado de alimentos funcionales a partir de hongos macromicetos, como es el caso de *L. edodes*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepa de *L. edodes* y producción de micelio

Se trabajó con el micelio de una cepa de *Lentinula edodes* obtenida de la empresa Shroom supply, empresa localizada en Estados Unidos, la cual se encontraba en un medio mínimo líquido (formulación de la empresa no disponible). El micelio fue activado por fermentación sumergida en matraces marca Boeco de 100 mL con 50 mL de un medio líquido compuesto por papa (extracto de 250 g de papa sabanera en 1000 mL), glucosa marca Fisher Scientific 20 g/L y extracto de levadura Difco<sup>TM</sup> 1,6 g/L. Se llevó a 150 rpm y  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  [29] en un shaker de agitación orbital marca Electrilab S.A.S. Al término de 15 días, el micelio obtenido se tomó como inóculo para estudiar la cinética de crecimiento para la producción de biomasa y proteína total.

### Evaluación de la cinética de crecimiento

A partir de micelio fresco se adicionaron 300 mg de biomasa a matraces marca Boeco de 250 mL, los cuales contenían 100 mL del medio previamente descrito. Las condiciones de crecimiento (agitación y temperatura) se mantuvieron constantes a las empleadas en la obtención del inóculo. El micelio fue colectado cada 2 o 3

días durante 30 días mediante filtración con papel Whatman No. 4, posteriormente, ultracongelado (-80 °C) y liofilizado en un equipo Labconco Freezone de 2,5 L, para ser finalmente pesado. Se emplearon tres réplicas biológicas, usando matraces para cada día de muestreo, tres matraces independientes. Los resultados se reportaron como g de biomasa seca por L de medio líquido (g/L).

## Determinación del contenido total de proteína

La biomasa seca, obtenida en cada uno de los días de muestreo, fue sometida a análisis elemental (contenido total de C, H, N y O) en un equipo Microanalizador Thermo FLASH 2000 Organic Elemental Analyzer. El contenido total de proteína fue determinado en porcentaje (*p/p*), aplicando el factor de corrección previamente reportado para hongos por Chen *et al.* [30]. Los resultados se reportaron como mg de proteína / g de micelio seco.

## Selección del protocolo de extracción de proteínas

A partir del micelio del día en el cual se presentó la mayor producción de proteína, se evaluaron dos protocolos de extracción y se calculó para cada uno de ellos el rendimiento de la extracción total (μg proteína / g micelio seco), usando triplicados biológicos en cada caso. Así mismo, se determinaron los perfiles proteicos, usando electroforesis en 1D (SDS-PAGE) y 2D (IEF-SDS PAGE). Los protocolos empleados se describen a continuación:

- Precipitación con TCA - acetona: en el primer protocolo se usó la precipitación con ácido tricloroacético (TCA) y acetona reportado por [21, 31] con algunas modificaciones. El micelio liofilizado se maceró con nitrógeno líquido y se tomaron 20 mg del macerado en un tubo eppendorf de 2 mL. Se adicionaron 500 μL de una solución de TCA (J.T. Baker) al 10% (*p/v*) y ditiotreitol Sigma-Aldrich (DTT) al 0,07% (*p/v*) en acetona (J.T. Baker) 80% (*v/v*). Luego, se sometió a ultrasonido (Ultrasonic Liquid Processors Vibra-cell Sonics®) por un de tiempo 10 s, una potencia de 50 W y 60% de amplitud, repetido tres veces a 4 °C, y se dejó reposar durante 1 min en hielo. El contenido se mezcló con vórtex marca Thermo Scientific y se terminó de llenar el tubo con la solución de TCA y DTT en acetona para dejarlo precipitar toda la noche a -20 °C. Seguido de esto, se centrifugó a 16000 g por 5 min a 4 °C en una centrífuga marca HETTICH modelo MIKRO 220R sin rotor, descartándose el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con acetona 80% (*v/v*) y un tercer lavado con acetona al 100%, cada uno intercalado con agitación en vórtex, centrifugación a 16000 g por 5 min a 4 °C y descarte del sobrenadante [32]. El pellet final se dejó secar a temperatura ambiente y se adicionó una solución solubilizadora compuesta por urea 7,0 M Sigma-Aldrich, tiourea 2,0 M Sigma-Aldrich, ácido 3[(3-Cloramidopropil)-dimetilamonio]-propanosulfónico (CHAPS) 4,0% (*p/v*), Triton X-100 0,5% (*p/v*) y DTT 20 mM, dejando en agitación constante a 4 °C [33]. Pasado este tiempo, se centrifugó a 16000 g por 5 min a 4 °C, se trasvasaron los 200 μL en otro tubo de 2 mL y se adicionaron nuevamente 200 μL de la solución solubilizadora, repitiendo la agitación constante por otras 4 h. Nuevamente se centrifugó y el sobrenadante se recuperó y mezcló con el primero. Los extractos se almacenaron a -20 °C para los análisis posteriores.

- Precipitación TCA - acetona y posterior extracción con fenol: en este protocolo, la extracción con TCA - acetona se complementa con un paso posterior de extracción con fenol. El micelio liofilizado se maceró con nitrógeno líquido y se tomaron 20 mg de biomasa en un tubo eppendorf de 2 mL. Se adicionaron 1800 μL de una solución de TCA al 10% (*p/v*) en acetona 80% (*v/v*). Posteriormente, se sometió a ultrasonido por 10 s, una potencia de 50 W y 60% de amplitud por tres veces a 4 °C y se dejó reposar 1 min en hielo. El contenido se mezcló en vórtex y se centrifugó a 16000 g por 5 min a 4 °C, descartándose el sobrenadante. Se aplicaron una serie de lavados con soluciones de acetato de amonio 0,1 M en metanol 80% (*v/v*) y acetona 80% (*v/v*), alternando con agitación en vórtex y centrifugación a 16000 g por 5 min a 4 °C, descartando cada vez el

sobrenadante. Luego, se adicionó una solución de lisis [sucrosa 30% (*p/v*), SDS 2,0% (*p/v*),  $\beta$ -mercaptoetanol 5,0% (*p/v*)] saturada con fenol PanReac (1:1) [22], mezclando manualmente con el pellet, utilizando un tubo capilar de vidrio y después un vórtex hasta observar una emulsión. La mezcla se dejó reposar en hielo por 5 min y se centrifugó en las condiciones ya descritas para permitir la separación de la fase acuosa y la fase fenólica. Esta última mezcla se transfirió a un tubo eppendorf nuevo y se saturó con una solución de acetato de amonio 0,1 M en metanol 100% (*v/v*) para dejarla precipitar toda la noche a -20 °C. Tras este tiempo, se centrifugó y se descartó el sobrenadante. El pellet se lavó con soluciones de metanol 100% (*v/v*) y acetona 80% (*v/v*), descartando el sobrenadante y alternando cada vez con agitación en vórtex y centrifugación. El pellet se dejó a temperatura ambiente, se adicionaron 200  $\mu$ L de la solución solubilizadora mencionada en el primer protocolo y se dejó en agitación a 4 °C por 4 h. Los extractos se almacenaron a -20 °C para posteriores análisis.

## Cuantificación de proteína en extractos proteicos

La determinación del rendimiento de la extracción para los protocolos evaluados se realizó mediante la aplicación del método de Bradford modificado [34], utilizando el reactivo de Bio-Rad®. Para ello, se tomó 1 mL de muestra, 250 mL del reactivo de Bradford y 749 mL de agua ultrapura. Las muestras se procesaron con réplica técnica, midiendo la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S Thermo Scientific, USA, y utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar.

## Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Se determinaron los perfiles proteicos de los diferentes extractos utilizando electroforesis 1D. Para esto, se usaron geles discontinuos de poliacrilamida en formato de 7 cm, empleando 4,8% para el gel concentrador y 12% para el gel separador, bajo condiciones reductoras con b-mercaptoetanol. La electroforesis se desarrolló a corriente constante (13 mA para el gel de concentración y 18 mA para el gel separador), según el protocolo de Bio-Rad®, en un equipo mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, California, USA), usando como buffer de corrido Tris base 25 mM, glicina 0,2 M y SDS 0,1% *p/v* [35]. En cada pozo se colocaron 20  $\mu$ g de proteína provenientes de los extractos obtenidos. La asignación de pesos moleculares se realizó con los marcadores Prestained SDS-PAGE standards, broad range Bio-Rad®. La visualización se realizó mediante tinción con Comassie y con el equipo Gel Doc™ EZ System de Bio-rad® [32]. La calidad de la separación se evaluó mediante el número de bandas obtenido en cada réplica de cada uno de los tratamientos ensayados, utilizando el programa Image lab 5.7.1 de Bio-Rad®.

## Electroforesis en dos dimensiones (IEF-SDS PAGE)

Para el isoelectroenfoque se utilizaron tiras de IPG (Inmovilized pH Gradient) Biorad® de 7 cm, pH 3 a 10, en el equipo PROTEAN IEF cell Biorad®. Se usaron volúmenes de extracto equivalentes a 200  $\mu$ g de proteína para el análisis de los extractos proteicos obtenidos mediante los dos protocolos propuestos. Para todos los ensayos, el volumen total se llevó a 195  $\mu$ L, utilizando buffer de hidratación (urea 7,0 M, tiourea 2,0 M, CHAPS 4,0%, azul de bromofenol 0,1%, 100 mM DTT y 0,2 % de anfolitos rango 3-10 Biorad®). Se realizó un proceso de hidratación activa a 50 V por 16 h. Posteriormente, se usó un programa para la separación a 20 °C y un voltaje final de 8000 V (20 000 V-h). La corriente máxima por tira fue de 50  $\mu$ A. Al finalizar la separación, las tiras se dispusieron para el proceso de equilibrio correspondiente mediante agitación por 15 min, en una solución de Tris-HCl 375 mM, urea 6,0 M, glicerol 20%, SDS 2,0% y DTT 2,0%, pH 8,8.

Posteriormente las tiras se colocan con la solución descrita complementada con iodoacetamida al 2,0% otros 15 min. [32].

Para la segunda dimensión mediante SDS-PAGE se usaron geles de 1 mm de espesor. Se trabajó un gel con SDS 0,1%, y para los geles concentrador y separador, 4,8 y 12% de acrilamida respectivamente. Se adicionó buffer de corrido en la formulación mencionada. La separación se realizó a corriente constante de 17 mA en el gel concentrador y 22 mA del gel separador. La asignación de pesos moleculares se realizó con los marcadores Prestained SDS-PAGE standards, broad range Biorad®. La visualización se realizó mediante tinción con Comassie y con el equipo Gel Doc™ EZ System de Bio-rad®. La calidad de la separación se evaluó mediante la comparación del número total de manchas proteicas presentadas y la resolución de su separación para cada uno de los tratamientos [32], utilizando el software libre Flicker de Peter Lemkin [36].

## Análisis estadísticos

Para el estudio *in vitro* de la producción de biomasa y proteína se siguió un diseño experimental completamente aleatorizado con tres replicas en cada tiempo de muestreo, aplicando para el análisis estadístico un ANOVA unifactorial ( $p < 0.05$ ). Para la selección del método de precipitación de proteínas se usó un diseño de dos variables en un solo nivel. Todos los análisis se realizaron mínimo por triplicado para cada una de las muestras tomadas en cada variable evaluada. Los resultados se reportaron como el promedio más la desviación estándar. Los datos experimentales se sometieron a un análisis descriptivo con el programa Excel 2016. Igualmente, se aplicaron pruebas de comparación de varianzas con la prueba  $t$  ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Cinética de crecimiento

En la presente investigación se evalúo en una primera etapa, usando fermentación en estado líquido (FEL), la cinética de crecimiento del hongo *L. edodes*. El medio de cultivo utilizado contenía principalmente monosacáridos y polisacáridos de fácil absorción para estimular el crecimiento y desarrollo hifal [9, 37], junto con el suplemento de vitaminas y aminoácidos para promover la expresión enzimática que influye tanto en la tasa de crecimiento como en la formación del manto micelial [38]. En esta técnica de cultivo (FEL) se puede hacer seguimiento y control a los diferentes factores que determinan la eficiencia de crecimiento, facilitando el control en la generación del producto biotecnológico [29, 39, 40, 41, 42].

La determinación del día del cultivo, en el cual se da la mayor producción de biomasa y del compuesto o grupo de compuestos de interés, es un paso fundamental en cualquier proceso biotecnológico basado en fermentación. Como se observa del análisis de la figura 1, la FEL se desarrolló a lo largo de 30 días, presentándose un comportamiento diauxico, es decir, una primera fase estacionaria imperceptible entre los días 0 al 3 y posteriormente, entre los días 3 al 10 de la fermentación, acompañadas cada una por las correspondientes fases *log* hasta el día 28 del proceso. Este comportamiento se puede atribuir al empleo de una fuente de carbono combinada entre glucosa y almidón de papa. Esta condición le permitió al hongo tener acceso en la primera parte de la FEL a una fuente de carbono de absorción inmediata, lo cual se ha documentado ampliamente a nivel microbiano [43] y, específicamente, en cepas de macromicetos con fuentes mixtas tanto de carbono como de nitrógeno como consecuencia de una represión catabólica [44]. Al agotarse la glucosa, el hongo se ve enfrentado a un sustrato más complejo: un medio líquido que contiene principalmente almidón, lo cual estaría estimulando la producción de biomasa. Esto concuerda con los reportes en el cultivo de hongos de otros géneros [45], como se observó para esta cepa en el

trabajo de González-Márquez *et al.*, durante el crecimiento de *Lentinula* en sustratos que tenían diferentes concentraciones de Di(2-ethylhexil) ftalato (DEHP), junto con glucosa y extracto de levadura [46].

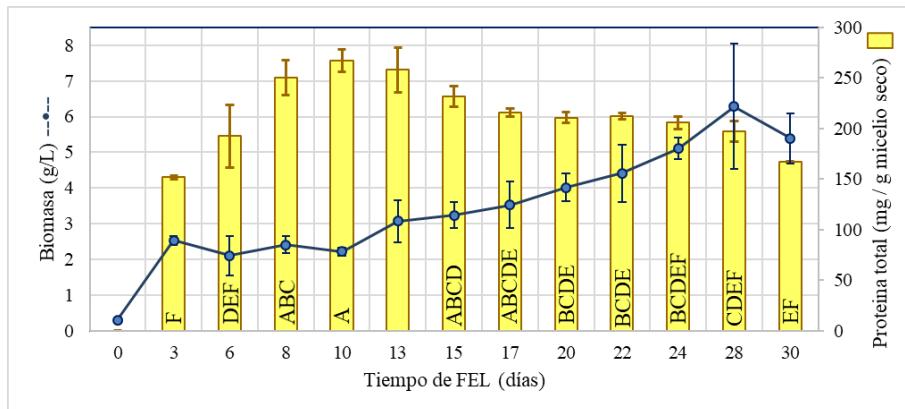


Figura 1. Cinética de crecimiento de *L. edodes* y cuantificación de proteína total. Las letras indican la agrupación de los resultados después de aplicar una ANOVA unifactorial ( $p < 0,05$ ).

La producción de micelio al cabo de los 28 días fue de  $0,628 \pm 0,176$  g, equivalente a un rendimiento de 6,28 g/L. En el trabajo de Osman *et al.* [47] se reportan rendimientos cercanos a 5 g/L con dos especies nativas de *L. edodes*, usando diferentes medios de cultivo. Por ejemplo, para una de las cepas, dichos niveles de producción se obtienen al cabo de 15 días de FEL en un medio de formulación definida (nitrato de sodio - 2 g/L y fructosa - 15 g/L), mientras que para la segunda cepa, dicho rendimiento se logró al cabo de 13 días de FEL en un medio que contenía fructosa (10 g/L) y extracto de levadura (5 g/L). Al realizar la comparación con dicho estudio, el rendimiento encontrado en la presente investigación es mayor, a pesar de que fue necesario un rango de tiempo más largo (28 días).

Otros estudios realizados con *L. edodes* reportan mejores eficiencias en la producción de biomasa, también aplicando FEL. Tal es el caso de la investigación de Feng *et al.* [12], quienes optimizaron las condiciones de pH, fuente de carbono y de nitrógeno, realizando la fermentación en 10 días, obteniendo así rendimientos de hasta 6,88 g/L, al trabajar con glucosa como única fuente de carbono (15,4 g/L), mayor cantidad de extracto de levadura (5,32 g/L) y un pH de 4,61. En el estudio de Ghada [48] se reporta una optimización de cultivo de tres cepas de *L. edodes*, con rendimientos de 6,73, 7,20 y 9,18 g/L, realizando la FEL en 14 días y utilizando 70 g/L de glucosa, 4 g/L de extracto de levadura y un pH de 6,5. Es importante anotar que dichas investigaciones estaban dirigidas al aumento de la biomasa, razón por la cual se hacen formulaciones definidas de los sustratos.

Por otro lado, el presente estudio exploró cómo en un medio de cultivo líquido, elaborado con la decocción de papa como sustrato principal y fuente de nitrógeno no definida, incide la producción de biomasa y de proteínas totales de *L. edodes*. El análisis del contenido de proteína total para cada día de muestreo permitió establecer una relación entre la productividad en biomasa y la proteína total. Se evidenció que el contenido máximo de proteína no tiene diferencias significativas entre las muestras de los días 10 y 13 (ANOVA y Tukey,  $p < 0,05$ ). En la publicación de Wu *et al.* [49] se reporta el análisis del contenido de proteína total en el tiempo en micelio de *L. edodes* obtenida por FEL, usando como medio de cultivo líquido papa dextrosa (PDB). Este medio es similar en formulación al reportado en el presente estudio, aunque sin la adición de extracto de levadura, lo cual indica menor complejidad del mismo. En dicho trabajo se estableció una importante variación del contenido de proteína en el tiempo, después de 15 días había una reducción de su contenido en el micelio del 40 al 36% cuando se superan los 16 días de fermentación, tal y como se presenta en el presente estudio a los 17 días (figura 1). A su vez, entre los días 10 y 15 de la FEL no se presentaron diferencias estadísticas de la proteína total ( $p < 0,05$ ), tal y como se ha reportado en la presente investigación. La reducción de la proteína en micelio vegetativo maduro ya había sido documentada para el estudio de fructificaciones en *Flamulina velutipes* [50], lo cual puede tener relación con lo expuesto en

el presente estudio a partir de los 17 días. Esto evidencia, finalmente, que el tiempo de crecimiento es un factor determinante en la cantidad y, muy probablemente, en el tipo de proteínas presentes en el micelio. Este fenómeno puede ser consecuencia de la formación del aglomerado redondo de hifas, conocido como pellet, el cual promueve la senescencia del micelio hacia el interior, principalmente, por la alta demanda de O<sub>2</sub> y el aumento de concentración de CO<sub>2</sub>. Este comportamiento induce que, en el hongo, las proteínas y el nitrógeno orgánico se desplacen hacia el micelio nuevo para promover su crecimiento y supervivencia, a través del intercambio de nutrientes y oxígeno con el medio [51].

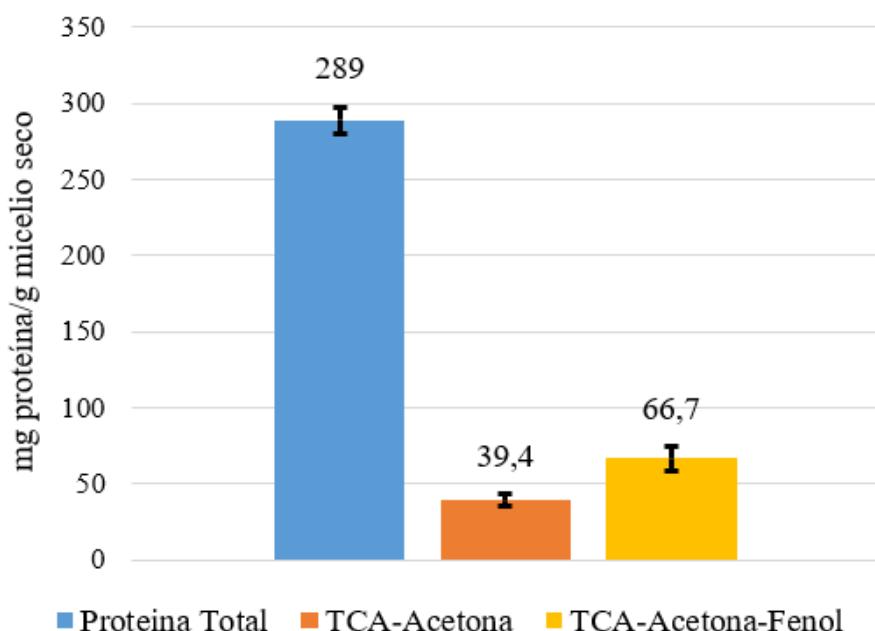
Bajo estas consideraciones y en la búsqueda de la mayor diversidad proteica posible, se seleccionó el día 10 para la obtención del micelio que sería usado en las siguientes fases de la investigación. A los 10 días se tiene un micelio metabólicamente activo, el cual ha superado la fase estacionaria, pero no presenta una variación estadística considerable entre las réplicas. Por otro lado, desde el punto de vista de la bioprospección, no es económicamente rentable llevar un proceso de cultivo hasta los 28 días, tiempo en que se presenta el mayor rendimiento, pero en donde es evidente que la producción de proteína es la menor dentro de los tiempos evaluados.

## Rendimiento de extracción de proteína total

En esta fase de la investigación se evaluaron dos métodos de extracción y precipitación ampliamente empleados en estudios proteómicos, para ello, se usó micelio de *L. edodes* cultivado bajo las condiciones seleccionadas. Se utilizó micelio con un contenido de proteína total cruda de  $289 \pm 9$  mg de proteína / g micelio seco, lo cual corresponde a un porcentaje proteico de  $28,9 \pm 0,9\%$  [30] figura 2). Se ha observado que en el cultivo de macromicetos la presencia o ausencia de una fuente de nitrógeno influye en el contenido de proteínas del micelio [38], así como la naturaleza orgánica o inorgánica de la fuente [10]. Comparado con el contenido reportado en fructificaciones de *L. edodes* de Carneiro *et al.*, con un valor de 12,76 % [52], o de Andrade *et al.*, con valores de 20,7% [53], se observa que el medio de cultivo usado en el presente estudio presenta valores de contenido de proteína superiores. Dado que para la determinación de la cantidad de proteína total reportada en dichos artículos se usaron fructificaciones de *L. edodes*, las cuales tardan en producirse hasta en 100 días [51], se evidencia que el proceso biotecnológico descrito en esta investigación permite una mayor producción de proteína, lo cual es conveniente, considerando los tiempos más bajos de producción en FEL (10 días).

El estudio de Wu *et al.* [49] analiza el contenido de proteína total en micelio de *L. edodes* cultivado por FEL en lactosuero y caldo de papa dextrosa (PDB), reportando concentraciones entre 19 y 40%, respectivamente [49]. Si bien es cierto que estos reportes superan los de la presente investigación, es importante recordar que los resultados obtenidos dependen de la cepa trabajada y de la composición del medio de cultivo. En este estudio, se usó una fuente natural no estandarizada de papa, además del extracto de levadura. Esto sugiere que se requiere profundizar en la búsqueda de sustratos que estimulen una mayor producción de proteínas dentro de un proceso de FEL, para de esta manera, lograr una mayor concentración de estas en el micelio.

Respecto a la proteína total extraída, los resultados obtenidos para los métodos de TCA - acetona y TCA - acetona - fenol se muestran en la figura 2. Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ( $t = 2, p < 0,05$ ). Es así como con el primer método se extrajo el 13,6% de las proteínas presentes en el micelio y con el segundo método el 23,1%.



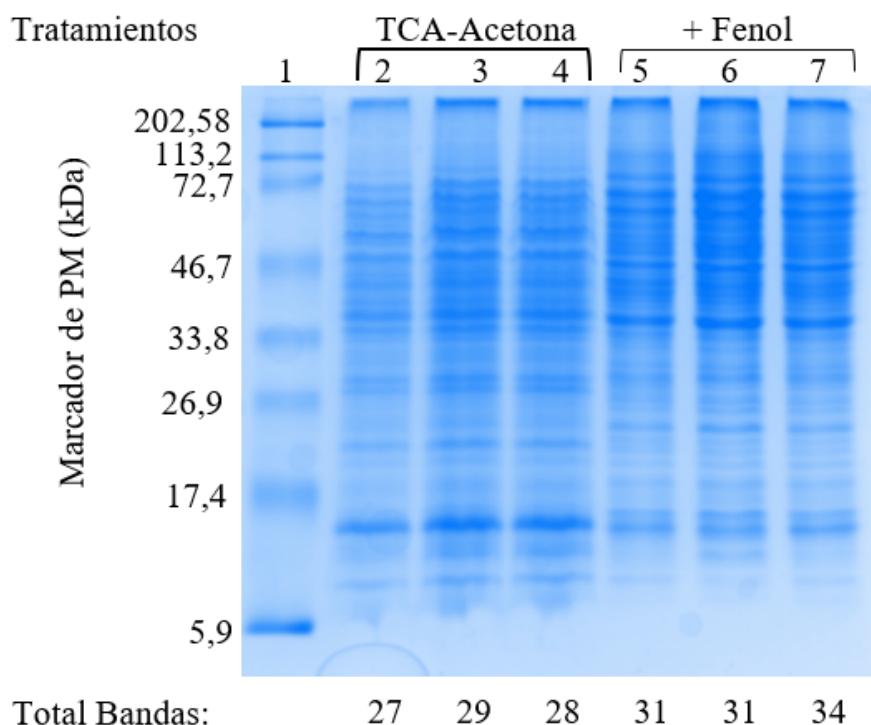
**Figura 2.** Comparación del contenido de proteína total *versus* el rendimiento de los métodos de extracción de proteínas evaluadas.

Se ha reportado para hongos filamentosos que la eficiencia en la precipitación de proteínas está influenciada por la presencia de la pared celular, la cual es uno de los constituyentes más abundantes de la masa celular fúngica [20]. Dicho fenómeno se evidenció en esta investigación durante el paso final de resolubilización de proteínas, ya que fue necesario realizarlo al menos dos veces para el protocolo de TCA - acetona que no incluía fenol. Considerando que esta resolubilización se llevó a cabo en los dos métodos propuestos usando el mismo buffer y que, para el protocolo TCA - acetona - fenol, fue necesario solo un paso de solubilización, se evidenció el efecto positivo del tratamiento previo con fenol en la eliminación de agentes no proteicos y en la extracción total de proteínas (figura 2). Estos resultados son acordes con el trabajo realizado por Rasool *et al.* [54] en palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.), en donde se determinó que entre cinco protocolos evaluados, aquellos que incluían al fenol permitían una mayor solubilización final de proteínas e incrementaban hasta cuatro veces la concentración de las mismas en el extracto. De acuerdo con los resultados del presente estudio, el método TCA - acetona, aplicado en micelio de *L. edodes*, genera un extracto con contaminantes no proteicos que afectan la cantidad final de proteína solubilizada. Esto concuerda con los reportes que recomiendan usar la extracción que incluye fenol para matrices con alto contenido de polisacáridos, como los presentes en la pared celular de hongos macromicetos [22].

### Comparación de los métodos de extracción usando 1 DE y 2DE

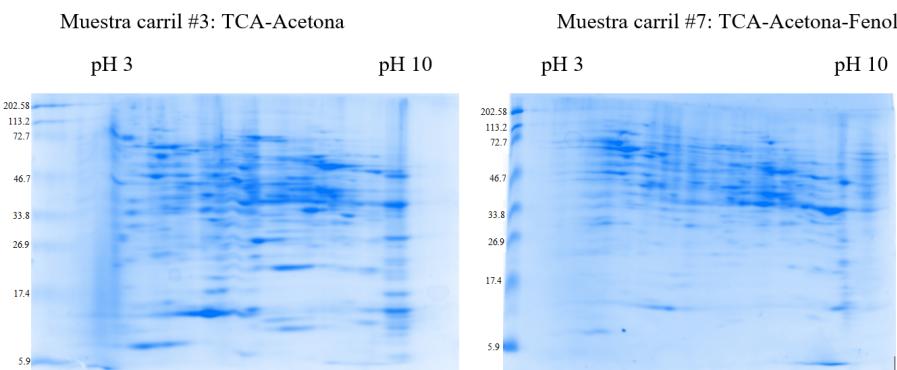
Una vez evaluado el efecto de los diferentes métodos para la extracción de proteínas, se procedió con el análisis de la composición de las mismas. Sin lugar a duda, la electroforesis en 1D (SDS-PAGE) es la técnica más usada para este tipo de análisis en una muestra de origen biológico. En la aplicación de esta técnica para los extractos obtenidos bajo los dos protocolos de extracción se observó una mayor resolución de bandas con aquel que incluye el paso de extracción con fenol, con un promedio de 32 bandas en contraste con el método de TCA - acetona, el cual presentó apenas un promedio de 28 bandas (figura 3). Si bien el protocolo de TCA - acetona concentra una mayor cantidad de proteínas de bajo peso molecular (entre 5 y 18 kDa), si se compara con el protocolo que incluye fenol, este último muestra una mayor intensidad de las bandas

resueltas. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por otros autores, quienes han usado dicho protocolo para análisis electroforéticos en organismos diferentes [22], específicamente, en *L. edodes*, con lo encontrado por Hernandez-Macedo *et al.* [27], quien reporta la separación de un número abundante de bandas entre 5 y 100 kDa, usando el método TCA - acetona - fenol.



**Figura 3.** Electroforesis 1DE para cada réplica biológica y cada tratamiento. Carriles 2, 3 y 4: réplicas biológicas del protocolo 1 de extracción. Carriles 5, 6 y 7: réplicas biológicas del protocolo 2 de extracción.

Considerando que la intensidad de las bandas para proteínas con peso molecular entre 33 y 200 kDa es mayor, usando el método TCA – Acetona – Fenol (carriles 5, 6 y 7), es probable que las diferencias encontradas en términos del rendimiento en la extracción (figura 2) puedan estar relacionadas con una mayor extracción de proteínas en dicho rango de pesos moleculares. Por otro lado, es bien sabido que la presencia de contaminantes no proteicos, como pueden ser oligo y polisacáridos, afectan la movilidad electroforética por obstrucción de los poros del gel de poliacrilamida o por la formación de artefactos con las especies proteicas, causando rayas horizontales en el gel conocidas como *streaking* [33]. En los análisis realizados se evidenció la presencia de este fenómeno en el rango de 5 a 17 kDa para los extractos obtenidos usando el protocolo TCA – Acetona (figura 3), comprobando la presencia de dichos contaminantes no proteicos y, por tanto, la necesidad de aplicar el paso de extracción fenólica para la obtención de extractos proteicos a partir de *L. edodes*.



**Figura 4.** Geles 2DE de 7 cm para muestras obtenidas de los dos métodos de precipitación, TCA - acetona (izquierda) y TCA - acetona - fenol (derecha). Se usaron volúmenes de extracto equivalentes a 200 µg de proteína.

La electroforesis en 2D permite indagar sobre la complejidad de los extractos proteicos y la posible presencia de contaminantes que pueden afectar procesos posteriores de análisis, como es el caso de la espectrometría de masas [55]. Al analizar extractos del hongo *L. edodes*, obtenidos con los dos protocolos propuestos (figura 4), el número de manchas proteicas en geles pequeños de acuerdo con el análisis realizado usando el software Flicker, se encuentran en el rango de 69 a 76 por gel. Aunque los estudios en donde se realizan análisis electroforético de proteínas *Lentinula edodes*, o en setas en general, aplicando electroforesis 2D no son muy comunes, se puede comentar que de acuerdo con las dimensiones de los geles usados en el presente estudio (7 cm x 7 cm), la cantidad de manchas proteicas encontradas están dentro de los rangos esperados. Valores similares en geles de dicho formato han sido reportados para micromicetos como *Penicillium verrucosum* con 85 manchas definidas e identificadas [56], aunque también se encuentran trabajos con recuentos mayores como en *Rhizopus oryzae* con 310 manchas proteicas [57] o en el estudio de *Metarhizium anisopliae* con un recuento de 110 [58].

Las manchas proteicas obtenidas de la muestra precipitada con TCA - acetona, además de presentar menor definición, estaban acompañadas de *streaking* en un 30% de las señales detectadas. Este valor contrasta con lo encontrado con el método TCA - acetona - fenol, en donde apenas el 22% del recuento presentó algún grado de *streaking*. Tal resultado permitió concluir que, como había sido propuesto previamente, el paso adicional de extracción con fenol es fundamental para la obtención de un extracto libre de contaminantes no proteicos. Considerando su naturaleza química, el fenol interactúa con las proteínas a través de puentes de hidrógeno, generando su desnaturalización y facilitando su solubilización en fases orgánicas [22]. Por ello, la extracción final con este compuesto permite una menor contaminación con componentes no proteicos insolubles, como es el caso de polisacáridos altamente abundantes en la pared celular de hongos. Esto concuerda con lo previamente observado en otros estudios con plantas maderosas [59] o en las revisiones publicadas con hongos micromicetos [60].

Respecto a la separación de las proteínas en función de sus puntos isoeléctricos (*pI*), se evidencia que, para los dos protocolos aplicados, esta es homogénea a lo largo del rango de pH de 3 a 10 (figura 4). Al respecto, en el trabajo realizado por Liang *et al.* [61] se estudiaron proteínas con efecto citotóxico y antiproliferativo en el extracto acuoso de la seta Agrocybe aegerita, trabajando con un extracto parcialmente purificado en el que se favorecieron la presencia de proteínas ácidas con *pI* menores a 5. En relación con la seta en estudio, en el trabajo de Tang *et al.* [28], en donde se comparó la expresión de proteínas en micelio de *Lentinula edodes* obtenido en cultivo tradicional pero con incidencia o no de luz directa, se determinó una distribución de las manchas a lo largo del gradiente de pH de 3 a 10, tal como se presentó en esta investigación. El estudio de Hernandez-Macedo, también con *L. edodes*, reportó 16 manchas proteicas definidas con diferencias asociadas al objeto de su investigación [27], evaluando un rango de *pI* entre 4,6 a 8,0. Estos reportes evidencian la

amplia variedad en los *pIs* para las proteínas de interés biológico presentes en hongos intra e interespecie y, por tanto, la necesidad de mantener un rango amplio de pH como el propuesto en el presente estudio para *L. edodes*; más aún si se pretende en próximas investigaciones aplicar aproximaciones holísticas que busquen proteínas con una posible aplicación terapéutica.

Por otro lado, se evidenció que con el método TCA - acetona - fenol, las manchas se concentran principalmente en el rango de pesos moleculares entre 26,9 y 113,2 kDa, lo cual coincide con lo encontrado previamente usando 1DE y confirma la extracción diferencial de proteínas durante la aplicación de los dos métodos evaluados. De acuerdo con los diversos reportes que se tienen hasta la fecha, en estos rangos de pesos moleculares, se presentan proteínas de origen fúngico que pueden presentar actividad biológica de particular interés para la comunidad científica [13, 61-65]. Este es el caso de una lectina con dos subunidades homólogas de 32 kDa aislada de *Pholiota adiposa*, la cual presentó capacidad de hemaglutinación y efecto antiproliferativo de las líneas tumorales HepG2 y MCF, así como inhibición de la transcriptasa reversa de la línea VIH-1 [13]. En la seta *Paxillus involutus* se encontró, igualmente, una lectina tetramérica de 28 kDa con estabilidad de hemaglutinación [62], la cual adicionalmente presenta actividad anti-fitoviral contra el virus del mosaico del tabaco – TMV. También, se han reportado glicoproteínas en *Hypsizygus marmoreus*, conformadas por 10 subunidades cada una de 52 kDa (522 kDa en peso molecular total), las cuales demostraron capacidad para la inhibición del crecimiento de la línea celular de leucemia U937 [63] o la presencia de la glicoproteína GFG-3a de 88 kDa, obtenida de *Grifola frondosa*, la cual induce a la apoptosis en la línea celular de cáncer gástrico SGC-7901 y muestra, además, arresto del ciclo celular en la fase S [64, 65].

## CONCLUSIONES

En la presente investigación se evidenció que la producción de biomasa durante el cultivo del hongo macromiceto *L. edodes*, usando una fermentación en estado líquido o FEL, es un proceso que sigue una cinética de tipo diaúxico, presentando la mayor producción de proteína a los 10 días post inoculación. Se determinó que para la obtención de un extracto con la calidad suficiente para la aplicación de análisis proteómicos, a partir de micelio obtenido bajo dichas condiciones biotecnológicas, se debe recurrir al procedimiento que incluye la precipitación con ácido tricloroacético (TCA) - acetona - fenol, de acuerdo con los resultados obtenidos de rendimiento de extracción y resolución de separación por electroforesis en 1D y 2D. Finalmente, se estableció que, bajo las condiciones de extracción y precipitación seleccionadas, se obtienen extractos, los cuales contienen proteínas que se encuentran en rangos de pesos moleculares, y *pIs* reportados para proteínas con actividad biológica en este tipo de organismos. El desarrollo de herramientas de análisis para proteínas y metabolitos en hongos macromicetos permitirá un avance más rápido en el desarrollo bioguiado de alimentos con propiedades funcionales.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos por la financiación de la Dirección de Investigación y Extensión de la sede Bogotá y a la Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia.

## REFERENCIAS

- [1] T. C. Finimundy, A. J. P. Dillon, J. A. P. Henriques, and M. R. Ely, "A Review on General Nutritional Compounds and Pharmacological Properties of the *Lentinula edodes* Mushroom," *Food Nutr. Sci.*, vol. 05, no. 12, pp. 1095–1105, 2014. DOI: 10.4236/fns.2014.512119.

- [2] J. Majtán, P. Kumar, J. Koller, J. Dragúnová, and J. Gabriz, "Induction of metalloproteinase 9 secretion from human keratinocytes by pleuran ( $\beta$ -glucan from *Pleurotus ostreatus*)," *Zeitschrift für Naturforschung C*, vol. 64, no. 7–8, pp. 597–600, 2009. DOI: 10.1515/znc-2009-7-820.
- [3] M. Rai and G. Kövics, *Progress in Mycology*. 2011. DOI: 10.1073/pnas.0703993104.
- [4] S. Dutta, "Role of mushrooms as nutraceutical an overview," *Int. J. Pharma Bio Sci.*, vol. 4, no. 4, pp. B59–B66, 2013. DOI: ISSN 0975-6299.
- [5] P. K. Perera and Y. Li, "Mushrooms as a functional food mediator in Preventing and ameliorating diabetes," *Funct. Food Heal. Dis.*, vol. 4, no. 4, pp. 161–171, 2011.
- [6] D. D. De Silva, S. Rapior, F. Fons, A. H. Bahkali, and K. D. Hyde, "Medicinal mushrooms in supportive cancer therapies: An approach to anti-cancer effects and putative mechanisms of action," *Fungal Divers.*, vol. 55, no. July 2012, pp. 1–35, 2012. DOI: 10.1007/s13225-012-0151-3.
- [7] S. Prasad, H. Rathore, S. Sharma, and A. S. S. Yadav, "Medicinal Mushrooms as a Source of Novel Functional Food," *Int J Food Sci Nutr Diet*, vol. 4, no. 5, pp. 221–225, 2015. DOI: 10.19070/2326-3350-1500040 .
- [8] J. Erjavec, J. Kos, M. Ravnikar, T. Dreo, and J. Sabotić, "Proteins of higher fungi—from forest to application," *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 5, pp. 259–273, 2012. DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.01.004.
- [9] K. Kavanagh, *Fungi: Biology and Applications*, 3<sup>a</sup> Edición. Wiley Blackwell, 2018.
- [10] Z. C. Pedri, L. M. S. Lozano, K. L. Hermann, C. V. Helm, R. M. Peralta, and L. B. B. Tavares, "Influence of nitrogen sources on the enzymatic activity and growth by *Lentinula edodes* in biomass *Eucalyptus benthamii*," *Brazilian J. Biol.*, vol. 75, no. 4, pp. 940–947, 2015. DOI: 10.1590/1519-6984.03214.
- [11] S. J. A. van Kuijk et al., "Selective ligninolysis of wheat straw and wood chips by the white-rot fungus *Lentinula edodes* and its influence on in vitro rumen degradability," *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, vol. 7, no. 1, p. 55, 2016. DOI: 10.1186/s40104-016-0110-z.
- [12] Y. L. Feng, W. Q. Li, X. Q. Wu, J. W. Cheng, and S. Y. Ma, "Statistical optimization of media for mycelial growth and exo-polysaccharide production by *Lentinus edodes* and a kinetic model study of two growth morphologies," *Biochem. Eng. J.*, vol. 49, pp. 104–112, 2010. DOI: 10.1016/j.bej.2009.12.002.
- [13] G. Q. Zhang, J. Sun, H. X. Wang, and T. B. Ng, "A novel lectin with antiproliferative activity from the medicinal mushroom *Pholiota adiposa*," *Acta Biochim. Pol.*, vol. 56, no. 3, pp. 415–421, 2009. DOI: 10.18388/abp.2009\_2475.
- [14] Y. Li, G. Zhang, T. B. Ng, and H. Wang, "A novel lectin with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from dried fruiting bodies of the monkey head mushroom *hericium erinaceum*," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2010, 2010. DOI: 10.1155/2010/716515.
- [15] G. Chandrasekaran, Y.-C. Lee, H. Park, Y. Wu, and H.-J. Shin, "Antibacterial and antifungal activities of lectin extracted from fruiting bodies of the Korean cauliflower medicinal mushroom, *Sparassis latifolia* (Agaricomycetes)," *Int. J. Med. Mushrooms*, vol. 18, no. 4, pp. 291–299, 2016. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.v18.i4.20.
- [16] E. M. EL-Fakharany, B. M. Haroun, T. B. Ng, and E.-R. M. Redwan, "Oyster mushroom laccase inhibits Hepatitis C virus entry into peripheral blood cells and hepatoma cells," *Protein Pept. Lett.*, vol. 17, pp. 1031–1039, 2010. DOI: 0929-8665/10 \$55.00+.00.
- [17] P. Zhang, S. Roytrakul, and M. Sutheerawattananonda, "Production and purification of glucosamine and angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from mushroom hydrolysates," *J. Funct. Foods*, vol. 36, pp. 72–83, 2017. DOI: 10.1016/j.jff.2017.06.049.
- [18] J. M. P. F. De Oliveira and L. H. De Graaff, "Proteomics of industrial fungi: Trends and insights for biotechnology," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 89, no. 2, pp. 225–237, 2011. DOI: 10.1007/s00253-010-2900-0.
- [19] J. R. Al-Obaidi, "Proteomics of edible mushrooms: A mini-review," *Electrophoresis*, vol. 37, no. 10, pp. 1257–1263, 2016. DOI: 10.1002/elps.201600031.

- [20] R. González-Fernández, E. Prats, and J. V. Jorrín-Novo, "Proteomics of plant pathogenic fungi," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2010, 2010. DOI: 10.1155/2010/932527.
- [21] L. Bianco and G. Perrotta, "Methodologies and perspectives of proteomics applied to filamentous fungi: from sample preparation to secretome analysis," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 3, pp. 5803–5829, 2015. DOI: 10.3390/ijms16035803.
- [22] M. Faurobert, E. Pelpoir, and J. Chaïb, "Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues," *Methods Mol. Biol.*, vol. 355, no. 2, pp. 9–14, 2007. DOI: 10.1385/1-59745-227-0:9.
- [23] D. Fragner, M. Zomorrodi, U. Kües, and A. Majcherczyk, "Optimized protocol for the 2-DE of extracellular proteins from higher basidiomycetes inhabiting lignocellulose," *Electrophoresis*, vol. 30, no. 14, pp. 2431–2441, 2009. DOI: 10.1002/elps.200800770.
- [24] T. Rabilloud and C. Lelong, "Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial," *J. Proteomics*, vol. 74, no. 10, pp. 1829–1841, 2011. DOI: 10.1016/j.jprot.2010.05.016.
- [25] S. Magdeldin *et al.*, "Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis," *Clin. Proteomics*, vol. 11, no. 1, p. 16, 2014. DOI: 10.1186/1559-0275-11-16.
- [26] K. Chandramouli and P.-Y. Qian, "Proteomics: Challenges, Techniques and Possibilities to Overcome Biological Sample Complexity," *Hum. Genomics Proteomics*, vol. 2009, pp. 1–22, 2009. DOI: 10.4061/2009/239204.
- [27] M. L. Hernández Macedo *et al.*, "Iron regulated proteins in Phanerochaete chrysosporium and *Lentinula edodes*: Differential analysis by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and two - dimensional polyacrylamide gel electrophoresis profiles," *Electrophoresis*, vol. 23, no. 4, pp. 655–661, 2002. DOI: 10.1002/1522-2683(200202)23:4<655::AID-ELPS655>3.0.CO;2-S.
- [28] L. H. Tang *et al.*, "Comparative Proteomic Analysis of Light-Induced Mycelial Brown Film Formation in *Lentinula edodes*," *Biomed Res. Int.*, vol. 2016, 2016. DOI: 10.1155/2016/5837293.
- [29] S.-T. Chang, P. G. Miles, and C. R. C. Press, *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*, 2º. 2004.
- [30] F. R. Smiderle *et al.*, "Exopolysaccharides, proteins and lipids in Pleurotus pulmonarius submerged culture using different carbon sources," *Carbohydr. Polym.*, vol. 87, no. 1, pp. 368–376, 2012. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.07.063.
- [31] L. Chen, B.-B. Zhang, and P. C. K. Cheung, "Comparative proteomic analysis of mushroom cell wall proteins among the different developmental stages of Pleurotus tuber-regium," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, no. 24, pp. 6173–6182, 2012. DOI: 10.1021/jf301198b.
- [32] H. D. Ardila, R. González Fernández, B. L. Higuera, I. Redondo, and S. T. Martínez, "Protein Extraction and Gel-Based Separation Methods to Analyze Responses to Pathogens in Carnation (*Dianthus caryophyllus* L)," *Plant Proteomics*, 2007, pp. 573–591 DOI: 10.1002/9780470988879.
- [33] Handbook-GE, *2-D Electrophoresis. Principles and methods*. Suécia: Editora Elanders Tofters., 2005.
- [34] Bio-Rad Laboratories Inc., "QuickStart Bradford Protein Assay - Instruction Manual." 2000. DOI: 10.1080/00173139309428968.
- [35] A. P. Martínez, S. T. Martínez, and H. D. Ardila, "Condiciones para el análisis electroforético de proteínas apoplásticas de tallos y raíces de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) para estudios proteómicos," *Rev. Colomb. Química*, vol. 46, no. 2, pp. 5–16, 2017. DOI: 10.15446/rev.colomb.quim.v46n262958.
- [36] G. Hu, J. Koh, M.-J. Yoo, D. Pathak, S. Chen, and J. F. Wendel, "Proteomics profiling of fiber development and domestication in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.)," *Planta*, vol. 240, pp. 1237–1251, 2014. DOI: 10.1007/s00425-014-2146-7.
- [37] O. Arce-Cervantes, M. Saucedo-García, H. Leal Lara, R. Ramírez-Carrillo, F. Cruz-Sosa, and O. Loera, "Alternative supplements for *Agaricus bisporus* production and the response on lignocellulolytic enzymes," *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, vol. 192, pp. 375–380, 2015. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.06.030.

- [38] M. L. Fazenda, R. Seviour, B. McNeil, and L. M. Harvey, "Submerged culture fermentation of 'Higher Fungi': the Macrofungi," in *Advances in applied microbiology*, vol. 63, 2008, pp. 33–103 DOI: 10.1016/S0065-2164(07)00002-0.
- [39] B. C. Lee *et al.*, "Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 35, no. 5, pp. 369–376, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.12.015>.
- [40] L. W. Yoon, T. N. Ang, G. C. Ngoh, and A. S. M. Chua, "Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production," *Biomass and Bioenergy*, vol. 67, pp. 319–338, 2014. DOI: 10.1016/j.biombioe.2014.05.013.
- [41] M. D. L. T. M. Polizeli and M. Rai, *Fungal Enzymes*. CRC Press, 2014.
- [42] C. S. Arango, I. J. Nieto, C. Suárez Arango, and I. J. Nieto, "Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutracéuticos," *Rev. Iberoam. Micol.*, vol. 30, no. 1, pp. 1–8, 2013. DOI: 10.1016/j.riam.2012.03.011.
- [43] O. Braissant, G. Bonkat, D. Wirz, and A. Bachmann, "Microbial growth and isothermal microcalorimetry#: Growth models and their application to microcalorimetric data," *Thermochim. Acta*, vol. 555, pp. 64–71, 2013. DOI: 10.1016/j.tca.2012.12.005.
- [44] S. M. Porras-Arboleda, N. A. Valdez-Cruz, B. Rojano, C. Aguilar, L. Rocha-Zavaleta, and M. A. Trujillo-Roldán, "Mycelial submerged culture of new medicinal mushroom, *Humphreya coffeata* (Berk.) Stey. (Aphyllophoromycetidae) for the production of valuable bioactive metabolites with cytotoxicity, genotoxicity, and antioxidant activity," *Int. J. Med. Mushrooms*, vol. 11, no. 4, pp. 335–350, 2009. DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v11.i4.10.
- [45] S. T. Chang, "Overview of Mushroom Cultivation and Utilization as Functional Foods," *Mushrooms as Funct. Foods*, pp. 1–33, 2009. DOI: 10.1002/9780470367285.ch1.
- [46] Á. González-Márquez, M. Ahuactzin-Pérez, and C. Sánchez, "*Lentinula edodes* grown on Di(2-ethylhexyl) phthalate-containing media: mycelial growth and enzyme activities," *BioResources*, vol. 10, no. 4, pp. 7898–7906, 2015. DOI: 10.15376/biores.10.4.7898-7906.
- [47] M. E. Osman, F. R. H. Hassan, O. H. Khattab, W. A. Ahmed, and H. E. El-Henawy, "Physiological studies on growth of two different strains of *Lentinus edodes*," *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, vol. 3, no. 4, pp. 4094–4103, 2009. ISSN 1991-8178.
- [48] M. M. Ghada, "Optimization of Submerged Culture Conditions for Mycelial Biomass Production by Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes*)," *Res. J. Agric. Biol. Sci.*, vol. 7, no. 4, pp. 350–356, 2011. ISSN 1816-1561.
- [49] X. J. Wu and C. Hansen, "Antioxidant capacity, phenolic content, and polysaccharide content of *Lentinus edodes* grown in whey permeate-based submerged culture," *J. Food Sci.*, vol. 73, no. 1, pp. 1–8, 2008. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2007.00595.x.
- [50] H. E. Gruen and M. W. Wong, "Distribution of cellular amino acids , protein , and total organic nitrogen during fruitbody development in *Flammulina velutipes*. I. Growth on sawdust medium," *Can. J. Bot.*, vol. 60, 1982. DOI: 10.1139/b82-169.
- [51] H. Lee *et al.*, "Effects of Aeration of Sawdust Cultivation Bags on Hyphal Growth of *Lentinula edodes* Effects of Aeration of Sawdust Cultivation Bags on Hyphal Growth of *Lentinula edodes*," *Mycobiology*, vol. 8093, 2018. DOI: 10.5941/MYCO.2012.40.3.164.
- [52] A. A. J. Carneiro *et al.*, "Chemical composition and antioxidant activity of dried powder formulations of *Agaricus blazei* and *Lentinus edodes*," *Food Chem.*, vol. 138, no. 4, pp. 2168–2173, 2013. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.12.036.
- [53] M. C. N. De Andrade, M. T. D. A. Minhoni, and D. C. Zied, "Caracterização bromatológica de oito linhagens de *Lentinula edodes* (Shiitake) cultivadas em toras de *Eucalyptus grandis*," *Ciência e Tecnol. Aliment.*, vol. 28, no. 4, pp. 793–797, 2008. DOI: 10.1590/S0101-20612008000400005.
- [54] M. Sebastiana *et al.*, "A possible approach for gel-based proteomic studies in recalcitrant woody plants," *Springerplus*, vol. 2, no. 1, p. 210, 2013. DOI: 10.1186/2193-1801-2-210.

- [55] T. Rabilloud, M. Chevallet, S. Luche, and C. Lelong, "Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: past, present and future," *J. Proteomics*, vol. 73, no. 11, pp. 2064–2077, 2010. DOI: 10.1016/j.jprot.2010.05.016.
- [56] D. A. Stoll, S. Link, S. Kulling, R. Geisen, and M. Schmidt-Heydt, "Comparative proteome analysis of *Penicillium verrucosum* grown under light of short wavelength shows an induction of stress-related proteins associated with modified mycotoxin biosynthesis," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 175, pp. 20–29, 2014. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.010.
- [57] G. Sircar, H. S. Chakrabarti, B. Saha, and S. Gupta-Bhattacharya, "Identification of aero-allergens from *Rhizopus oryzae*: An immunoproteomic approach," *J. Proteomics*, vol. 77, pp. 455–468, 2012. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.09.023.
- [58] L. Santi, W. O. B. Silva, A. F. M. Pinto, A. Schrank, and M. H. Vainstein, "Metarhizium anisopliae host-pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods," *Fungal Biol.*, vol. 114, no. 4, pp. 312–319, 2010. DOI: 10.1016/j.funbio.2010.01.006.
- [59] X. Wu, F. Gong, and W. Wang, "Protein extraction from plant tissues for 2DE and its application in proteomic analysis," *Proteomics*, vol. 14, pp. 645–658, 2014. DOI: 10.1002/pmic.201300239.
- [60] R. González Fernández and J. V. Jorrín Novo, "Proteomic Protocols for the Study of Filamentous Fungi," in *Laboratory protocols in fungal biology: current methods in fungal biology*, Springer Science & Business Media., 2012. DOI: 10.1007/978-1-4614-2356-0.
- [61] Y. Liang *et al.*, "The tumor rejection effect of protein components from medicinal fungus," *Biomed. Prev. Nutr.*, vol. 1, no. 4, pp. 245–254, 2011. DOI: 10.1016/j.bionut.2011.06.006.
- [62] S. X. Wang *et al.*, "Purification and Characterization of a Novel Lectin with Antiphytovirus Activities from the wild Mushroom *Paxillus involutus*," *Protein Lett.*, vol. 20, pp. 767–774, 2013. DOI: 10.2174/0929866511320070006.
- [63] P.-F. Tsai, C.-Y. Ma, and J. S.-B. Wu, "A novel glycoprotein from mushroom *Hypsizygus marmoreus* (Peck) Bigelow with growth inhibitory effect against human leukaemic U937 cells," *Food Chem.*, vol. 141, no. 2, pp. 1252–1258, 2013. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.04.024.
- [64] F. Cui, X. Zan, Y. Li, W. Sun, Y. Yang, and L. Ping, "Grifola frondosa Glycoprotein GFG-3a Arrests S phase, Alters Proteome, and Induces Apoptosis in Human Gastric Cancer Cells," *Nutr. Cancer*, vol. 68, no. 2, pp. 267–279, 2016. DOI: 10.1080/01635581.2016.1134599.
- [65] F. Cui, X. Zan, Y. Li, Y. Yang, W. Sun, and Q. Zhou, "Purification and partial characterization of a novel anti-tumor glycoprotein from cultured mycelia of *Grifola frondosa*," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 62, pp. 684–690, 2013. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.10.025.