





# UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

## INSTITUTO DE POSTGRADO

### MAESTRIA EN GESTIÓN SUSTENTABLE DE RECURSOS

#### NATURALES

**Desarrollo de un proceso a escala de laboratorio para la conservación y producción de cepas nativas de hongos (*Auricularia spp.*) a partir de la biodiversidad fúngica ecuatoriana.**

**Plan de investigación para aspirar a la obtención del título de Máster en Gestión  
Sustentable de Recursos Naturales**

**Autor:** Ortiz Rodríguez, Edwin Jesús

**Director:** Pineda Insuasti, Julio Amilcar (Ph.D.)

**Ibarra, 2017**

## **APROBACION DEL TUTOR**

En calidad de tutor del Trabajo de Grado, presentado por el Ingeniero Edwin Jesús Ortiz Rodríguez, para optar por el grado de Magíster en Gestión Sustentable de los Recursos Naturales, doy fe de que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a presentación (pública o privada) y evaluación por parte del jurado examinador que se designe.

En la ciudad de Ibarra, a 11 días del mes de Julio del 2017.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Julio Pineda Insuasti', is centered on a light blue rectangular background.

Ing. Julio Pineda Insuasti, PhD

**Desarrollo de un proceso a escala de laboratorio para la conservación y producción de cepas nativas de hongos (*Auricularia spp.*) a partir de la biodiversidad fúngica ecuatoriana**

Por: Edwin Jesús Ortiz Rodríguez

Trabajo de Grado de Maestría aprobado en nombre de la Universidad Técnica del Norte, por el siguiente jurado, a los 04 días del mes de agosto del 2017.

Doctor. José Manuel País Chanflau



---

Magister Jimmy Núñez Pérez



---

Magister Lennys Berutti



---

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mi familia, a mi esposa Margarita y a mis queridos hijos: Nicolás, Lady y Ana Camila, quienes son el motor de mi vida y día a día me inspiran a superarme.

A mi madre Zolita y a mi padre Carlitos (+), quienes con su perseverancia, amor y paciencia inculcaron en mí el ejemplo de lucha constante.

## **AGRADECIMIENTOS**

A las instituciones que aportaron para llevar a cabo esta investigación de manera especial al Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA), Ingenio Azucarero del Norte (IANCEM) y a la Universidad técnica del norte (UTN).

A representantes de la comunidad la Joya en donde se realizó el trabajo de campo y recolección de la muestra, a los profesionales con quienes apoyaron en el desarrollo de la investigación hasta obtener los resultados esperados. De manera especial al Dr. Julio Pineda, tutor de la presente investigación, por toda la ayuda, guía y asesoramiento profesional.

# UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

## INSTITUTO DE POSTGRADO

### BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

#### AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

##### 1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

La Universidad Técnica del Norte dentro del proyecto Repositorio Digital Institucional, determinó la necesidad de disponer de textos completos en formato digital con la finalidad de apoyar los procesos de investigación, docencia y extensión de la Universidad.

Por medio del presente documento dejo sentada mi voluntad de participar en este proyecto, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

<b>DATOS DE CONTACTO</b>	
CÉDULA DE IDENTIDAD:	0401166749
APELLIDOS Y NOMBRES:	Ortiz Rodríguez Edwin Jesús
DIRECCIÓN:	La Dolorosa de San José, Atuntaqui
EMAIL:	<a href="mailto:edwinortizrod@gmail.com">edwinortizrod@gmail.com</a>

TELÉFONO FIJO:	062902 117 Ext 120	TELÉFONO MÓVIL:	0993084829
----------------	--------------------	--------------------	------------

<b>DATOS DE LA OBRA</b>	
<b>TÍTULO:</b>	“Desarrollo de un proceso a escala de laboratorio para la conservación y producción de cepas nativas de hongos ( <i>Auricularia spp.</i> ) a partir de la biodiversidad fúngica ecuatoriana”.
<b>AUTOR (ES):</b>	Ortiz Rodríguez Edwin Jesús
<b>FECHA:</b>	11 de julio del 2017
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
<b>PROGRAMA:</b>	<input type="checkbox"/> <b>PREGRADO</b> <input type="checkbox"/> <b>POSGRADO</b>
<b>TÍTULO POR EL QUE OPTA:</b>	Magíster en Gestión Sustentable de los Recursos Naturales
<b>ASESOR /DIRECTOR:</b>	Ing. Julio Amilcar Pineda Insuasti, ((PhD)

## 2. AUTORIZACIÓN DE USO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD

Yo, Edwin Jesús Ortiz Rodríguez, con cédula de ciudadanía Nro. 0401166749, en calidad de autor (a) (es) y titular (es) de los derechos patrimoniales de la obra o trabajo de grado descrito anteriormente, hago entrega del ejemplar respectivo en formato digital y autorizo a la Universidad Técnica del Norte, la publicación de la obra en el Repositorio Digital Institucional

y uso del archivo digital en la Biblioteca de la Universidad con fines académicos, para ampliar la disponibilidad del material y como apoyo a la educación, investigación y extensión; en concordancia con la Ley de Educación Superior Artículo 144.

### **3. CONSTANCIAS**

El (La) autor (a) (es) manifiesta (n) que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es (son) el (los) titular (es) de los derechos patrimoniales, por lo que asume (n) la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá (n) en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 11 días del mes de julio de 2017

**EL AUTOR:**



.....

Edwin Jesús Ortiz Rodríguez

C.C.: 0401166749

**CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE GRADO A FAVOR DE LA  
UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

Yo, Ortiz Rodríguez Edwin Jesús, con cédula de ciudadanía Nro. 0401166749 manifiesto mi voluntad de ceder a la Universidad Técnica del Norte los derechos patrimoniales consagrados en la Ley de Propiedad Intelectual del Ecuador, artículos 4, 5 y 6, en calidad de autor del trabajo de grado denominado: “Desarrollo de un proceso a escala de laboratorio para la conservación y producción de cepas nativas de hongos (*Auricularia spp.*) a partir de la biodiversidad fúngica ecuatoriana”, que ha sido desarrollado para optar por el título de Magíster en Gestión Sustentable de los Recursos Naturales, en la Universidad Técnica del Norte, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Técnica del Norte.



Ortiz Rodríguez Edwin Jesús

0401166749

## RESUMEN

*Auricularia spp.* es un hongo que presenta amplio potencial industrial debido a sus propiedades nutricionales y medicinales. La obtención de cepas viables y puras de este género se ha visto limitada por una identificación de especies meramente macroscópica y la utilización tanto de medios como técnicas de conservación inadecuados. El poco conocimiento y la falta de tecnologías apropiadas para el uso y conservación de estos hongos silvestres ha limitado el aprovechamiento de su potencial industrial. Por ello, el objetivo de este trabajo es desarrollar un proceso a escala de laboratorio para la propagación de cepas nativas del hongo *Auricularia spp.*, a escala laboratorio. En consecuencia, se aislaron e identificaron cepas nativas del hongo, se estableció un protocolo para su conservación por liofilización, se seleccionó el medio de cultivo que permitiera la mayor velocidad de crecimiento y se formuló una propuesta para el establecimiento de un Banco de Recursos Genéticos Microbianos (BRGM). Las cepas aisladas corresponden a *A. fuscosuccinea*, con una identidad genética del 99% y una velocidad de crecimiento óptima de 7,2 mm/día en medio Agar Extracto de Malta (MEA). El protocolo de conservación de este hongo sugiere una liofilización a presiones de 200 y 300 atm (para el congelado y secado, respectivamente), y una temperatura entre -50 °C y 30 °C, dependiendo de la etapa. Para la conformación de un BRGM se debe seguir el siguiente procedimiento: Solicitud de licencias conforme a la normatividad vigente, recolección de muestras, aislamiento e identificación de cepas, caracterización, codificación e ingreso al cepario, registro y control de cepas, aprovechamiento científico y económico.

**Palabras clave:** BRGM, conservación de cepas, identidad genética, potencial industrial, protocolo de liofilización, velocidad de crecimiento.

## SUMMARY

*Auricularia spp.* is a mushroom that has ample industrial potential for its nutritional and medicinal properties. The production of viable and pure strains of this genus has been limited by an identification of purely macroscopic species, and the use of both inadequate conservation media and techniques. The lack of knowledge and lack of appropriate technologies for the use and conservation of these wild mushrooms has limited the use of their industrial potential. Therefore, the objective of this work is the development of a laboratory scale process for the propagation of native strains of the fungus *Auricularia spp.* As a consequence, native strains of the fungus were isolated and identified, a protocol was established for its conservation by lyophilization, the culture medium was selected that allowed the greatest speed of growth and a proposal was made for the establishment of a Microbial Gene Bank. The isolated strains corresponding to *A. fuscosuccinea*, with 99% genetic identity and an optimum growth rate of 7,2 mm / day in Malta Extract Agar (MEA) medium. The conservation protocol of this fungus suggests freeze-drying at pressures of 200 and 300 atmospheres (for the frozen and dried, respectively), and a temperature between -50 ° C and 30 ° C, depending on the stage. For the formation of the Gene Bank, the following procedure must be followed: Application for licenses according to current regulations, collection of samples, isolation and identification of strains, characterization, codification and entry into the ceparium, Control of strains, scientific and economic exploitation.

**Key words:** Gene Bank, conservation of strains, genetic identity, industrial potential, lyophilization protocol, activation rate.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN .....	x
SUMARY .....	xi
ABREVIATURAS .....	xvii
INTRODUCCIÓN.....	vii
Situación problemática .....	x
Problema científico.....	xiii
Objeto de estudio .....	xiv
Objetivos.....	xiv
Campo de estudio .....	xv
Hipótesis .....	xv
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1 Alimentación: un desafío global .....	1
1.2 La alimentación: un desafío local .....	4
1.2.1 Latinoamérica. ....	4
1.2.2 Ecuador.....	4
1.2.3 Imbabura.....	7
1.3 Los Hongos comestibles: una alternativa para afrontar la crisis alimentaria.....	7
1.3.1 Hongo oreja de palo ( <i>Auricularia spp</i> ).....	9
1.3.2 Aislamiento.....	9

1.3.3	Identificación .....	10
1.3.4	Caracterización .....	12
1.4	Conservación y almacenamiento de cepas puras .....	15
1.4.1	Transferencia periódica .....	15
1.4.2	Liofilización.....	16
1.4.3	Congelación .....	16
1.4.4	Inmersión en aceite mineral.....	16
1.4.5	Inmersión en agua destilada estéril.....	17
1.5	Métodos de selección de cepas .....	17
1.6	Banco de recursos genéticos .....	18
1.7	Producción por fermentación en estado sólido (FES) .....	19
1.7.1	Diseño y formulación de medios .....	20
1.7.2	Parámetros de operación.....	24
1.7.3	Pretratamientos de la materia prima .....	29
1.7.4	Biorreactores.....	30
1.7.5	Incubación .....	31
1.7.6	Cosecha.....	31
1.7.7	Indicadores de eficiencia .....	32
1.7.8	Productos biotecnológicos obtenidos por FES .....	33
1.8	Producción Por Fermentación En Estado Líquido (FEL) .....	34

2.	DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	37
2.1	Aislamiento, identificación, caracterización y conservación de la cepa nativa <i>Auricularia spp.</i> .....	37
2.1.1	Materiales y métodos.....	37
2.1.2	Resultados y discusiones .....	41
2.2	Protocolo para la conservación de la especie nativa <i>Auricularia fuscosuccinea.</i> .....	46
2.2.1	Materiales y métodos.....	46
2.2.2	Resultados y discusiones .....	47
2.3	Determinación de la velocidad de crecimiento de la cepa nativa de <i>Auricularia fuscosuccinea.</i> .....	51
2.3.1	Materiales y métodos.....	52
2.3.2	Resultados y discusiones .....	53
2.4	Diseño de un catálogo de cepas microbianas puras de <i>Auricularia spp.</i> Para su conservación en el banco de recursos genéticos microbianos (BRGM) .....	59
2.4.1	Registro para banco de recursos genéticos .....	59
2.4.2	Propuesta de catálogo para el establecimiento de un BRGM para <i>Auricularia spp.</i>	
	60	
	CONCLUSIONES.....	63
	RECOMENDACIONES .....	64
	REFERENCIAS .....	65
	ANEXOS .....	94

Anexo 1. Ficha Técnica Del Liofilizador .....	94
Anexo 2. Protocolo de secuenciación del ADN total genómico proveniente de tejido fúngico de <i>Auricularia sp.</i> .....	95
Anexo 3. Participación en evento científico.....	101
Anexo 4. Diseño de un catálogo de cepas microbianas puras de <i>Auricularia spp.</i> Para su conservación en el banco de recursos genéticos microbianos (BRGM) .....	102

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Principales actividades biológicas de <i>Auricularia spp.</i> .....	12
Tabla 1.2. Sustratos y suplementos reportados como medio de cultivo para algunas especies de <i>Auricularia spp.</i> .....	22
Tabla 1.3. Principales parámetros de operación reportados en la fermentación de <i>Auricularia spp.</i> .....	26
<i>Tabla 1.4. Tiempos de incubación y fructificación según cada tipo de bioreactor/biocelda ...</i>	<i>31</i>
Tabla 1.5. Principales metabolitos y condiciones de cultivo para <i>Auricularia spp.</i> mediante Fermentación Sumergida.....	34
Tabla 2.1. Clasificación científica de la cepa en estudio.....	44
Tabla 2.2. Condiciones de liofilización de la cepa de <i>Auricularia spp.</i> .....	48
Tabla 2.3. Velocidad de crecimiento de la cepa liofilizada en diferentes medios de cultivo...53	
Tabla 2.4 Resumen estadístico para la velocidad de crecimiento . .....	55
Tabla 2.5 ANOVA para la Velocidad de crecimiento .....	56
Tabla 2.6. Medias para Velocidad por Medio con intervalos de confianza del 95,0% 57	

Tabla 2.7. Prueba de rangos múltiples Método: 95,0 porcentaje LSD .....	58
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Proceso de producción de <i>Auricularia</i> spp.....	19
Figura 2.1. Georreferenciación del sitio de muestreo.....	37
Figura 2.2. Carpóforos de <i>Auricularia</i> sp. sobre el sustrato. ....	37
Figura 2.3. Badisiocarpos de <i>Auricularia</i> sp. sobre sustrato natural. ....	41
Figura 2.4. Cepa de <i>Auricularia</i> sp. purificada.....	42
Figura 2.5. Amplicón del fragmento ITS visualizados en un gel de Agarosa 2%.....	44
Figura 2.6 Cepas de <i>A. fuscosuccinea</i> liofilizadas .....	48
Figura 2.7. Menú de entrada (a) y panel de procesos (b) del Wizard 2.0 en el computador. ....	50
Figura 2.8 Panel de visualización del controlador en el liofilizador. ....	51
Figura 2.9 Medición del halo de crecimiento a la colonia.....	53
Figura 2.10 Gráfico de medias para velocidad.....	58
Figura 2.11. Formato para el registro y control de cepas ingresadas al BRGM.....	60
Figura 2.12. Protocolo para el establecimiento de un BRGM para <i>Auricularia</i> spp. ....	61

## ABREVIATURAS

AAFB	Melanina de <i>Auricula spp.</i>
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
ANOVA	Análisis de Varianzas
APB	Protocolo de Nagoya
ARN	Ácido Ribonucleico
BRG	Banco de Recursos Genéticos
BRGM	Banco de Recursos Genéticos Microbianos
CAN	Comunidad Andina de Naciones
CDB	Convenio sobre la Diversidad Biológica
CEBA	Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente
CNA	Autoridades Nacionales Competentes
DENAREF	Depto Nacional de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología del Ecuador
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FEL	Fermentación Estado Líquido
FES	Fermentación Estado Sólido
FIDA	Fondo Internacional de Desarrollo Agrícola
HEPA	Aire Particulado de Alta Eficiencia
INIAP	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador
ITS	Espaciador Interno Transcrito
Kp	Kilobases
LSD	Diferencia Mínima Significativa

MAE	Ministerio del Ambiente Ecuador
MEA	Agar Extracto de Malta
ODM	Objetivo de Desarrollo del Milenio
ONU	Organización de las Naciones Unidas
PAM	Plan de Acción Mundial
Pb	Pares de Bases
PCR	Reacción en Cadena de Polimerasa
PDA	Agar Papa Dextrosa
PFN	Puntos Focales Nacionales
PFNM	Productos Forestales No Maderables
PMA	Programa Mundial de Alimentos
RAPD	Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico
RFLP	Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción
SCP	Proteína Unicelular
SENPLADES	Secretaria Nacional de Planificación y Desarrollo del Ecuador
<i>spp.</i>	Especies individuales dentro de un género
<i>sp.</i>	Especie concreta cuyo epíteto específico es desconocido

## INTRODUCCIÓN

Ecuador es uno de los países más ricos del planeta en términos de diversidad biológica y posee además una importante diversidad cultural. Su privilegiada ubicación geográfica en el neotrópico, su variado relieve e influencia de corrientes marinas, confluyen para construir el escenario de las más variadas formas de vida de flora, fauna y microorganismos, en su diversidad genética y de ecosistemas.

El país es considerado como uno de los 17 países megadiversos. Si se considera las cifras reportadas de especies registradas por unidad de área, en comparación con otros países, se concluye que el país es el más biodiverso del mundo (Mittermeier et al, 1997, 1998).

Entre los atributos más relevantes de los hongos están sus propiedades alimentarias, medicinales y alucinógenas, estos han propiciado que tengan gran relevancia en algunas culturas como productos forestales no maderables. La FAO (2007), define a los Productos Forestales No Maderables (PFNM) como bienes de origen biológico, distintos de la madera, derivados del bosque, de otras áreas forestales y de los árboles fuera de los bosques. Estos productos en su gran mayoría de origen vegetal son empleados como alimentos y aditivos alimentarios (semillas comestibles, hongos, frutos, condimentos, aromatizantes), fibras, instrumentos o utensilios, resinas y otros usados con fines medicinales, cosméticos o culturales.

Varios millones de hogares en el mundo dependen de la recolección de hongos, como un soporte en su alimentación e ingresos. La FAO calcula que el 80% de la población en países en desarrollo utiliza los PFNM (Boa, 2005), actualmente constituyen un mercado en potencia,

el cual ya se ha desarrollado en otros países como Alemania, Chile, EE.UU., Italia y Suiza.(Molina, Vance, Weigand, Pilz, & Amaranthus, 1997).

Los hongos son organismos diferentes a los del reino vegetal y animal. Pertenecen al reino Fungi, poseen células eucarióticas y pared celular con quitina, son heterótrofos y carecen de clorofila. Estos organismos incluyen desde formas microscópicas, como los mohos y las levaduras, hasta formas macroscópicas, el cuerpo fructífero, que la gente identifica normalmente como hongo. Dependiendo de la forma como obtienen sus nutrientes, los hongos se clasifican en parásitos, saprófitos y micorrícicos. Los primeros consumen plantas o animales vivos, los segundos digieren células y tejidos muertos, conocidos también con el nombre de hongos lignocelulósicos o de pudrición blanca. El tercer grupo de hongos, menos numerosos que los anteriores, son los que establecen relaciones simbióticas con las raíces de las plantas llamadas micorrizas, en la cual, tanto el hongo como la planta se benefician. (López, 2007).

Las técnicas de cultivo de hongos son en su mayoría empíricos y muchos de los métodos permanecen inéditos o están protegidos por varias patentes. Por lo tanto, los enfoques mecanísticos se exigen para desarrollar procesos biológicos más eficientes para ese propósito [15]. (Julio A Pineda-Insuasti, Claudia P Soto-Arroyave, Luis Beltrán, & 3, 2014).

La composición de *A. auricula* es: 8-10% de proteína en base húmeda; 0.8-1.2% de grasa; 84-87% de carbohidratos (base seca); 9-14% de fibra y 4-7% de cenizas. El contenido de humedad de las setas frescas es de aproximadamente 90%. También se le atribuyen propiedades antitumorales, regula la presión sanguínea y desordenes cardiovasculares, así como efectos contra bronquitis crónica. (Urrea, 2003).

La producción de hongos representa una alternativa para el desarrollo de nuevas áreas de producción, con un impacto benéfico en el crecimiento económico.

Entre los productos forestales no leñosos, los hongos silvestres comestibles constituyen un buen ejemplo de lo expuesto precedentemente. Deben ser considerados como productos forestales, por su íntima relación con los árboles (micorrizas), y su dependencia ecológica del bosque. Son utilizados como fuente de ingresos, alimentos, medicina o fármacos, en diferentes regiones del mundo desde épocas inmemoriales. Se caracterizan por ser un recurso sustentable, abundante y de libre disposición, por lo cual constituyen un ejemplo ideal de producto forestal no leñoso, para ser utilizado en el desarrollo económico de sectores rurales. (JUAN, 1989).

De acuerdo a la empresa Farmadina e investigaciones realizadas, Auricularia es rico en proteínas, contiene una gran cantidad de calcio (357 mg / 100 g), fósforo, hierro (en cantidades iguales en su contenido de hierro es 7 veces mayor que el de hígado de cerdo), vitaminas del grupo B (B1 y B2, en particular), banano, ácido glucurónico, lecitina y cefalina. El componente principal de éste producto, el hongo Auricularia, es particularmente rico en sustancia que inhibe la coagulación de la sangre y tiene acción antiinflamatoria, además, este hongo reduce los niveles de colesterol total, estimula el sistema inmunológico, neutraliza los radicales libres e inhibe la formación de tumores malignos del tejido conectivo, Farmadina dispone de un producto medicinal a base de Auricularia, en la presentación Auricularia 450 mg 90 cápsulas Fairvital extracto a un costo de 36 euros..

La constitución del estado ecuatoriano construida para dar una nueva forma de convivencia ciudadana, en diversidad y armonía con la naturaleza, para alcanzar el buen vivir, el *sumak kawsay*, establece en diferentes articulados la importancia de la conservación de la

biodiversidad, siendo los principales los establece en el Art. 400.- El Estado ejercerá la soberanía sobre la biodiversidad, cuya administración y gestión se realizará con responsabilidad intergeneracional. Se declara de interés público la conservación de la biodiversidad y todos sus componentes, en particular la biodiversidad agrícola y silvestre y el patrimonio genético del país y el Art. 14.- Se reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, *sumak kawsay*. Se declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados. (Ecuador, 2008).

## **Situación problemática**

Existen muchos prejuicios, mitos y creencias singulares, aunque también realidades acerca de estos organismos. Lo anterior les ha ganado aceptación, pasión culinaria, pero también suspicacia, indiferencia, miedo e incluso repugnancia entre algunos sectores de la población en distintas partes de México y el mundo (Fuentes, 2013).

La recolección y venta de hongos silvestres comestibles, junto con la de otros productos forestales no maderables, constituyen una estrategia alimentaria y de subsistencia para los productores rurales. A pesar de la importancia social, económica, ecológica y cultural, dichas actividades todavía son de las más aisladas y poco conocidas del sector primario nacional. Esto trae como consecuencia la ausencia de políticas, esquemas de apoyo y estrategias de

desarrollo para tales actividades. (Benítez-Badillo, Alvarado-Castillo, Nava-Tablada, E., & Arturo, 2013)

Durante milenios, los hongos han presentado un inestimable valor en muchas culturas debido a sus propiedades tanto nutricionales como medicinales, constituyéndose desde siempre en el alimento funcional por excelencia. Con la popularización mundial del consumo de los hongos se presume que más de 10 millones de toneladas métricas de hongos comestibles o medicinales se producen en varios países (Jeannette & Carolina, 2010).

Una característica que hace tan atractivo el cultivo de setas, especialmente en los países en vía de desarrollo, es que ellas producen cantidades relativamente grandes de proteínas de alta calidad, que si bien no se equipara totalmente con la proteína animal, su producción es más eficiente debido al hecho de que puede ser producida directamente desde materiales de desechos lignocelulósicos (paja, aserrín, bagazo, residuos de café, cascara de semilla de algodón, etc.), mientras que los animales deben ser alimentados con grandes cantidades de forraje por largos periodos de tiempo. (Jeannette & Carolina, 2010).

Los hongos silvestres comestibles junto con otros Productos Forestales No Maderables (PFNM) (alimento, medicina, materiales de construcción, leña, etc.), constituyen un elemento relevante en la alimentación e ingresos de varios millones de hogares en todo el mundo, por lo que gobiernos e instituciones han comenzado a valorar su importancia dentro de las comunidades rurales (Gerardo, Gerardo, & Griselda, 2015).

*Auricularia auricula-judae* (Bull.) tiene una distribución mundial en la región tropical, subtropical y templado, ha sido primer cultivada en China hace más de mil años. Es un

importante hongo comestible y médica, y la producción anual es la cuarta del mundo, después de *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes*.

Para proteger los derechos de los criadores de setas, que es muy importante para discriminar entre los principales cultivares de *A. auricula-judae*. Sin embargo, la clasificación y la diversidad análisis de hongos comestibles, han sido ambiguas, debido a la similitud de la morfología del cuerpo fructífero y su susceptibilidad a las influencias ambientales. Por lo tanto, los problemas surgen frecuentemente si el análisis se basa por completo en características morfológicas. Afortunadamente, las técnicas de biología molecular proporcionan una metodología útil para el análisis sistemático de polimorfismo genético. (Li, Zhong, & Bian, 2014)

*Auricularia auricula* (*A. aurícula*) es un macro-hongo precioso distribuido en las provincias del Nordeste de China y se ha utilizado como alimento y medicamento en China desde hace mucho tiempo. Los cuerpos fructíferos de *A. aurícula*, una especie de seta comestible negro-marrón, son ricos en melanina no tóxicos y son cada vez más popular como un "alimento negro" en China (Zou et al., 2010). La melanina se considera que es uno de los componentes funcionales más importantes de estos "alimentos negros". Sin embargo, la mayor parte de este producto macro-hongo precioso sólo se utiliza como materiales de cocina, y muchos de sus componentes funcionales no están completamente desarrollados y empleados.

En investigaciones anteriores, melanina fue extraída con éxito a partir de cuerpos fructíferos de *Auricularia auricula* (AAFB), utilizando tecnología de extracción asistida por ultrasonido (Zou et al., 2010). Sin embargo, hasta ahora, ninguna investigación se ha realizado sobre las propiedades fisicoquímicas y la actividad biológica de la melanina AAFB. En este estudio, se analizó la composición química de la melanina AAFB. Mientras tanto, la actividad

de captación de melanina AAFB contra los radicales fue investigado por la búsqueda de nuevo principio de funcionamiento biológico utilizado en la industria alimentaria.(Yu, Yue, & Wenzhong, 2015)

El oxígeno activo y los radicales libres son cada vez más reconocidos como responsables de la patogénesis de ciertas enfermedades humanas, incluyendo el cáncer, el envejecimiento y la enfermedad arterial crónica (Moskovitz et al., 2002). Con el fin de reducir el daño oxidativo de oxígeno y los radicales libres activos, algunos antioxidantes sintéticos tales como hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA) son ampliamente utilizados en la industria alimentaria. Hoy en día, los antioxidantes naturales se han vuelto cada vez más popular entre los consumidores debido a los antioxidantes sintéticos son a menudo percibidos como indeseables o perjudiciales (Tu et al, 2009). Por lo tanto, hay un creciente interés en el estudio de los antioxidantes naturales que se pueden utilizar en el procesamiento de alimentos para mejorar las defensas antioxidantes del cuerpo y reducir el estrés oxidativo para el cuerpo humano.(Yu, Aili, & Mixia, 2015)

## **Problema científico**

Los hongos silvestres comestibles tienen enorme potencial comercial, pero presentan también retos en su gestión y producción sostenible como parte integral de boques de uso múltiple, algunas preocupaciones sobre el impacto de una recolección excesiva sugieren enormes retos y mejores datos en el rendimiento y productividad.

Del análisis anterior se evidencia la falta de conocimiento y desarrollo de tecnologías apropiadas para el uso y supervivencia de los hongos silvestres comestibles, hace que todavía

haya enormes vacíos en la información que permitan su aprovechamiento adecuado como alternativa alimentaria y de salud.

## **Objeto de estudio**

Proceso de conservación y producción de cepas nativas fúngicas lignívoras de *Auricularia spp.* por fermentación sólida.

## **Objetivos**

### **Objetivo general.**

Desarrollar un proceso a escala de laboratorio para la producción de cepas nativas del hongo *Auricularia spp.*, a partir de la biodiversidad ecuatoriana, mediante bioprocesos, que permita la conservación del recurso natural y su aprovechamiento de manera sustentable.

### **Objetivos específicos.**

- Aislar, especies fúngicas de *Auricularia* nativa de la biodiversidad de la comunidad la Joya de la parroquia Jacinto Jijón y Caamaño.
- Seleccionar el mejor medio de cultivo para el crecimiento radial de la cepa aislada de *Auricularia spp.* través de la velocidad de crecimiento radial.
- Establecer un protocolo para la conservación y almacenamiento de la cepa pura de *Auricularia spp.*

- Diseñar un catálogo de cepas microbianas puras de *Auricularia spp* para su conservación en el Banco de Recursos Genéticos Microbianos (BRGM).

## **Campo de estudio**

Conservación de los recursos genéticos microbianos del Ecuador.

## **Hipótesis**

Si se desarrolla un proceso biotecnológico para la producción de células fúngicas de *Auricularia spp*. Aisladas de la biodiversidad ecuatoriana, entonces será posible su conservación y aprovechamiento sustentable del recurso ecuatoriano.

# **1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## **1.1 Alimentación: un desafío global**

La Declaración de Roma sobre la seguridad alimentaria mundial y el Plan de Acción de la Cumbre Mundial sobre la Alimentación establecen que “existe seguridad alimentaria cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias en cuanto a los alimentos a fin de llevar una vida activa y sana” (Organización de las Naciones Unidas [ONU], 1996). La definición plantea cuatro dimensiones primordiales que son: Disponibilidad física de los alimentos, acceso económico y físico, utilización (diversificación de la dieta y consumo calórico), y estabilidad en el tiempo de las tres dimensiones mencionadas.

La FAO define el hambre como sinónimo de desnutrición crónica (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2015a). La reducción del número de personas hambrientas (ODM1) es uno de los Objetivos De Desarrollo Del Milenio (ODM) de la ONU; no obstante, los conflictos socio-económicos y las catástrofes naturales conducen cada día a una mayor inseguridad alimentaria. En el periodo de 1990-2015 se logró reducir el número de personas con hambre de un 23 % a un 12,9 % a nivel mundial, sin embargo, pese al enorme esfuerzo, una de cada nueve personas viven en pobreza extrema y sufren de hambre, lo que representa en la actualidad unas 800 millones de personas, de las cuales alrededor del 97 % pertenecen a países en desarrollo. Asimismo, existen más de 160 millones de niños menores de 5 años que para su edad tienen una altura inadecuada, debido a una alimentación insuficiente (FAO, Fondo Internacional de Desarrollo Agrícola [FIDA], y Programa Mundial de Alimentos [PMA], 2015; ONU, 2015). A este problema de subalimentación se suma el

aumento progresivo de la proporción de personas con obesidad, que está alrededor del 6,5 % (FAO, 2015b).

La humanidad ha vivido bajo la profecía Maltusiana de que la población va a aumentar exponencialmente, mientras la producción de los alimentos lo hará linealmente. Sin embargo, políticas alimentarias y demográficas, así como avances tecnológicos han permitido hacer frente a esta problemática. Pese a estos logros, se estima que para mediados del siglo XXI la población mundial alcance los 9 200 millones de habitantes, la población urbana represente el 70 % del total, frente al 49% actual y la demanda de alimentos aumente un 50 %. Dicho aumento poblacional repercutirá en la superficie agraria per cápita, que pasará de 2,6 en 2010 a 1,5 en 2050; por lo que se hace necesario el aumento de la producción por área. Lo malo, es que se prevé que el aumento de la productividad pase del 1,4 % en la primera década del siglo al 1 % a mediados de este. La forma de hacer frente a ésta problemática es mediante la adopción de tecnologías que aumenten productividades sin comprometer negativamente el medio ambiente. En éste sentido, hay que reconocer la importancia de la biotecnología y la ingeniería genética (Viñas, 2011; 2012). La implementación de la biotecnología se plantea como una solución viable para confrontar la crisis alimentaria en el mundo puesto que no solo aumenta la productividad de los cultivos sino que también mejora las propiedades nutricionales de los alimentos (Ramón y col., 2005), aumenta su vida útil y su calidad higiénico-sanitaria a través de procesos de bioconservación, y aporta herramientas para el control de su trazabilidad (Marín, 2016).

Uno de los retos de alimentar al mundo es proveer a las personas la proteína y micronutrientes necesarios en su dieta (Godfray y col., 2010). No obstante, la producción de carne cada vez es más insostenible ambiental y económicamente; por tanto la modificación de

hábitos de consumo hacia fuentes de proteína alternativa es una opción viable (Capone, El Bilali, Debs, Cardone, y Driouech, 2014; Hoogland, de Boer, y Boersema, 2005). Las aplicaciones biotecnológicas en el campo agroalimentario permiten mejorar la calidad nutricional y funcional de las materias primas, obteniendo proteínas de mayor digestibilidad en mayor proporción que con la utilización de prácticas convencionales (Oliveira, Gonzáles, Costal, y Castro, 2013; Suárez y Nieto, 2016). La producción de proteína de origen microbiano es otra aplicación biotecnológica, muy antigua y conocida, que permite convertir los residuos agroindustriales en productos biotecnológicos útiles desde un punto de vista económico, nutricional e industrial (Pineda, Ramos y Soto, 2014); se conoce como Proteína Unicelular (SCP, por sus siglas en inglés), y es producida mediante procesos de fermentación controlados (Olsen y Allermann, 2001); su producción constituye una alternativa biotecnológica para afrontar el reto de la seguridad alimentaria contemplado en el objetivo número uno de la Declaración del Milenio (Anupama y Ravindra, 2000; FAO, FIDA, y PMA, 2015). No obstante, el consumo de proteínas de bacterias, levaduras y algas se ha visto limitado debido a problemas de toxicidad y otras reacciones adversas (García-Garibay, Gómez-Ruiz, Cruz-Guerrero, y Bárzana, 2014; Zepka, Jacob-Lopes, Goldbeck, Souza-Soares, y Queiroz, 2010) por lo que la producción de proteína obtenida de hongos filamentosos se plantea como una opción más viable para la obtención de aminoácidos esenciales y proteínas de alta digestibilidad (Nigam y Singh, 2014; Román Corrochano, 2013). En este sentido, el patrimonio genético de la biodiversidad es uno de los recursos más importantes con los que cuenta la humanidad para enfrentar el reto de alimentar al mundo, por lo que es necesario invertir en la recuperación de las capacidades técnicas de los países en desarrollo para recolectar, preservar y explotar los recursos genéticos (Viñas, 2012).

## **1.2 La alimentación: un desafío local**

### **1.2.1 Latinoamérica.**

Latinoamérica y el Caribe cuentan con recursos más que suficientes para alimentar a toda la población, el problema radica en el desempeño productivo y la diversidad de políticas que garanticen el acceso de los más vulnerables. Gracias al aumento del Producto Interno Bruto (PIB) se logró reducir el porcentaje de personas con hambre de 14,7 a 5,5 %, dando cumplimiento al ODM1. No obstante, a pesar de reducir a menos de la mitad el número de personas subalimentadas desde 1990, todavía existen más de 34 millones de individuos en estado de desnutrición crónica.

Otra consecuencia de una mala alimentación es el aumento progresivo de la proporción de personas con obesidad, que está en un 7 %, medio punto porcentual mayor que la media mundial. Actualmente, mediante la Iniciativa “América Latina y el Caribe sin Hambre”, se ha propuesto erradicar el hambre por completo antes del 2025. Este objetivo fue ratificado y adoptado en 2015 por la Comunidad de Estados Latinoamericanos y Caribeños (CELAC) mediante su Plan de Seguridad Alimentaria, Nutrición y Erradicación del Hambre. A nivel Latinoamérica, existen alrededor de 16 millones de personas subalimentadas, siendo Colombia (4,4 millones), Perú (2,3 millones), Bolivia (1,8 millones) y Ecuador (1,8 millones) los países más afectados (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2015b).

### **1.2.2 Ecuador**

El Ecuador al igual que el resto de países en desarrollo lucha contra la crisis de la inseguridad alimentaria y el cambio climático (Pineda, 2014). Pese al logro mundial de la disminución del número de personas hambrientas en casi un 50 %, este país muestra un progreso lento en el cumplimiento del ODM1 (ONU, 2015), puesto que el cumplimiento del Reglamento Sanitario

Internacional de la Organización Mundial de la salud (OMS) en términos de seguridad alimentaria es de tan sólo el 50-60 % (Global Economy and Development, 2015). Se reportaron para el año 2014 alrededor de 1,8 millones de personas en estado de desnutrición, lo que corresponde al 10,9% de la población (FAO, 2015). Además, el 25 % de la población infantil presentó retraso en el crecimiento por desnutrición crónica y el 2,3 % murió de hambre. La más afectada es la población rural, ya que el 70 % presentó desnutrición por alimentación hipocalórica y el 67 % por alimentación hipoproteica (Global Economy and Development, 2015). El índice GIH (Global Index Hunger, 2015), da al Ecuador una puntuación de 14, lo que lo cataloga como un país con un moderado problema de desnutrición en su población (Von Grebmer y col., 2015). Para el año 2016, la situación se ha agravado por terremoto que sacudió la costa norte ecuatoriana; pues existen alrededor de 150 000 personas necesitadas de alimentos; así como por el aumento de refugiados colombianos que comparten las mismas necesidades; se calcula que alrededor del 84 % de los refugiados no tienen planeado volver a su país (World Food Programme [WFP], 2015). Falta ver las cifras que éstos índices del hambre arrojen el año venidero, con respecto al actual.

Los pilares de la seguridad alimentaria en el Ecuador, no se han adecuadamente: el acceso y el consumo de los alimentos medido según la Encuesta de Condiciones de Vida (ECV) 2014 ha sido incumplido por el 25,8 % de la población; y la disponibilidad de los alimentos se ha visto estancada por el ascenso estático de la productividad, los fenómenos climáticos y la disputa por el agua de riego entre los cultivos de consumo nacional y los de exportación (como las flores en Pichincha); (Carrasco y Manosalvas, 2015; Instituto Nacional de Estadísticas y Censos [INEC], 2015; Mena-Vásconez, Boelens, y Vos, 2016). Un análisis de la accesibilidad de los alimentos en el Ecuador mostró que “el principal problema para lograr seguridad

alimentaria está dado por la incapacidad de los hogares para acceder a una canasta alimenticia básica”, lo que desencadena en dietas hipocalóricas. Según la ECV 2006, alrededor del 8,7 % de los hogares del país no puede acceder a una canasta de alimentos que cubra con los requerimientos calóricos mínimos, y aproximadamente 3 de cada 10 familias presentan dificultades para pagar sus gastos de alimentación. Además, existen problemas distributivos, ya que el 10 % de las familias más ricas consume cinco veces más que el 10 % de las familias más pobres (Calero, 2011). Las provincias del Ecuador más afectadas por la inseguridad alimentaria son Morona Santiago y Napo, que presentan desnutrición en un 50-60 % de la población (INEC, 2015).

En este contexto, la Constitución Política de la República del Ecuador (2008) en su artículo 48 establece que la soberanía alimentaria constituye un objetivo estratégico y una obligación del estado; y en el artículo 262 establece que es competencia de los Gobiernos Regionales Autónomos fomentar la seguridad alimentaria. También dicta, que una de las formas de lograrlo es impulsando la producción, transformación agroalimentaria y el desarrollo de biotecnología bajo normas de bioseguridad. Los sectores de alimentos y biotecnología son sectores priorizados por el Plan de Desarrollo para el Buen Vivir 2013-2017 mediante el aprovechamiento sustentable de la biodiversidad, que constituye una ventaja comparativa en el desarrollo científico y el biocomercio nacional (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo (SENPLADES), 2013). Teniendo en cuenta el Ecuador, junto con el resto de países de la Comunidad Andina; Colombia, Perú, Bolivia y Venezuela, concentran alrededor del 25 % de la biodiversidad mundial y presentan el mayor número de especies endémicas (Corporación Andina de Fomento, 2007). El uso sostenible de la biodiversidad constituye un

motor de desarrollo, no sólo en términos económicos, sino también en sociales, porque contribuye a la lucha contra el hambre.

### **1.2.3 Imbabura**

La provincia de Imbabura presenta el 32,4 % de su población en estado de desnutrición (INEC, 2015); lo cual se ha mitigado un poco gracias a la alta producción y consumo de fréjol. El consumo promedio de esta leguminosa es superior a 40 kg/ (persona\*año), aproximadamente 10 mayor que la media nacional (FAO, n.d.). Actualmente, ha sido implementado un Programa de Seguridad Alimentaria y Nutricional denominado SAN Imbabura 2015 – 2017, destinado al fortalecimiento de los sistemas alimentarios locales, principalmente de las familias más vulnerables de los cantones de Ibarra, Cotacachi y Pimampiro (Unicef, 2015).

## **1.3 Los Hongos comestibles: una alternativa para afrontar la crisis alimentaria**

Se estima que existen en la naturaleza más de 1,5 millones de especies de hongos, de las cuales sólo se han descrito alrededor de 69 000 (Hawksworth, 1991). Tan sólo en el Ecuador se han estimado más de 100 000 especies de hongos (Hawksworth, 2001) y descrito tan solo 5 000 (Freire Fierro, 2004). Aproximadamente 14 000 especies de hongos producen cuerpo fructífero, pero solo 7 000 tienen algún grado de comestibilidad y tan solo 3 000 pueden ser consideradas completamente comestibles. Cerca 200 de estas especies han sido cultivadas experimentalmente, 60 cultivadas comercialmente y apenas 10 producidas a escala industrial (Chang y Miles, 2004).

Los hongos comestibles presentan buen contenido de proteína (20-30 % en base seca), pared quitinosa que actúa como fibra dietética, alto contenido de vitaminas del complejo B, bajo contenido de grasa y todos los aminoácidos esenciales, por lo que se pueden consumir como sustitutos de la carne animal. Adicionalmente, presentan excelentes propiedades medicinales, directamente relacionadas con su contenido de biocompuestos con actividad biológica; dentro de los cuales se identifican beta-glucanos, enzimas, policétidos, ácidos grasos, lectinas, polifenoles, flavonoides y terpenoides, entre otros; que pueden ser aislados del micelio, del cuerpo fructífero y del medio de cultivo agotado. El cultivo de los hongos comestibles es muy rentable debido a su bajo costo de producción, gracias a que pueden crecer sobre residuos agroindustriales, que de otro modo no tendrían valor agregado (Ghorai y col., 2009; Suárez y Nieto, 2016). Se estima que se producen alrededor de  $1 \times 10^{10}$  TM de residuos lignocelulósicos cada año, por lo que su potencial de bioconversión en biomasa fúngica está subaprovechado (H. Li, Kim, Jiang, Won, y Nam, 2009).

La bioconversión ocurre por Fermentación en Estado Sólido (FES), que es un bioproceso en el cual el microorganismo se desarrolla sobre un sustrato sólido, en este caso, los residuos lignocelulósicos, que utiliza como fuente principal de nutrientes y medio físico para su crecimiento (Belur y Mugeraya, 2011). Según Pineda, Ramos y Soto (2014), la FES presenta grandes ventajas con respecto a la Fermentación Sumergida (FEL), otro método para la obtención de biomasa fúngica. Estas son: Menor costo de inversión, mayor productividad, bajo consumo de energía, mayor simplicidad del proceso, menos uso de agua y una mejor eficiencia de recuperación de productos (Khalil, Hoque, Basunia, Alam, y Khan, 2011; Kumar, Jain, Shanker, y Srivastava, 2003).

### **1.3.1 Hongo oreja de palo (*Auricularia spp*)**

*Auricularia spp.* es una de las 10 setas producidas a escala industrial, pertenece a la familia Auriculariaceae, y es ampliamente conocida como hongo oreja u oreja gelatinosa de palo. Se han descrito alrededor de quince especies (Ainsworth, 2008; Guzmán, Mata, Dulce, Soto-Velazco, & Guzmán-Dávalos, 1993; Oei, 1996); entre ellas se encuentran: *A. aurícula*, *A. polytricha*, *A. delicata*, *A. mesentérica*, *A. cornea*, *A. peltata*, *A. fuscossuccinea*, y *A. auriculariadae*; siendo las dos primeras las más producidas y estudiadas a nivel mundial (Cheng y Tu, 2013). Crece de forma natural en los tallos y las raíces de algunos árboles, así como en materiales de madera en descomposición (Guzmán, y col., 1993; Oei, 1996), lo que se debe al sistema enzimático que tiene para degradarlo; principalmente celulasas, hemicelulasas y ligninasas (Adejumo, 2015; Worrall, Anagnost, y Zabel, 1997).

Según Chang y Miles (1987), este *Auricularia* fue el primero en cultivarse a nivel mundial, en China, hace 2 600 años. Actualmente, es el cuarto hongo más consumido a nivel mundial después de *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes* (Yan, Luo, y Zhou, 2004). Su producción a escala industrial representa una excelente alternativa para el reciclaje de residuos agroindustriales y la generación de SCP. Este hongo presenta una larga vida de anaquel (Sánchez-Vázquez, J. E. Huerta y Calvo, 1995), aunque su palatabilidad se ha visto limitada por su textura correosa (Guzmán, y col., 1993).

### **1.3.2 Aislamiento**

Los hongos se aíslan del medio natural con el fin de obtener cepas puras para emplearlas como semilla o inóculo sobre el sustrato (Carreño-Ruiz, Cappello-García, Gaitán-Hernández, y Edmundo, 2014). El aislamiento de la cepa puede hacerse a partir de las esporas del cuerpo fructífero o de la carne del mismo (Guzmán, y col., 1993). El uso de medios de cultivo

selectivos para el desarrollo de distintos hongos es una técnica que permite aislar especies fúngicas de otros microorganismos, gracias a que la mayoría de especies como *Auricularia* se desarrollan en un pH ácido, la acidificación del medio de cultivo es una estrategia para la inhibición de bacterias, además el uso de antibióticos garantizan el no crecimiento de estos agentes contaminantes (Ames de Icochea, 2004). Según Quimio (1982) los medios de cultivo más eficientes para el aislamiento de especies del género *Auricularia spp.* son, en orden descendente: glucosa-extracto de levadura, extracto de malta y extracto de papa.

Una vez aislado el hongo en cajas de Petri o tubos de ensayo, debe mantenerse en refrigeración y repicarse periódicamente para evitar el envejecimiento de la cepa (Guzmán, y col., 1993).

### **1.3.3 Identificación**

Las especies del género *Auricularia spp.* se caracterizan por poseer cuerpos fructíferos cerosos y cartilaginoso que varían el color marrón a negro violáceo (Lowy, 1951). Por tanto, es fácil reconocer los hongos que pertenecen a este género; sin embargo, la identificación a nivel de especie es una tarea difícil, dada la gran diversidad morfológica que poseen los distintos cuerpos fructíferos. Los procesos de identificación de una especie fúngica, se basan en la realización de una revisión concienzuda tanto de las características macroscópicas, por lo general antes del aislamiento; como de las microscópicas, posterior a este. Las características morfológicas macroscópicas comprender el color, la textura, y el tamaño de las colonias; mientras las características microscópicas se basan en la observación del micelio y sus estructuras reproductivas utilizando lactofenol o azul de algodón como reveladores de microscopía. Las características taxonómicas encontradas son comparadas con la literatura

existente (Hoog, Guarro, Gené, y Figueras, 2000). Existe una base de datos virtual de claves taxonómicas llamada Fungipedia, que es muy útil en la identificación de especies.

Kobayashi (1981) propuso como base para la identificación de las distintas especies de este género las características morfológicas de los cuerpos fructíferos, la estructura del tejido, los filamentos en la superficie superior, el color del himenóforo, la zona pilosa y el tamaño de la capa medular. Una de las formas para diferenciar algunas de las especies del género *Auricularia* según Lowy (1952), se basa en la existencia o carencia de una capa medular intermedia en las hifas. Especies como *A. córnea*, *A. fuscosuccinea*, *A. tenuis*, *A. Emini* y *A. polytricha* poseen capa medular, mientras que especies como *A. auricula-judae*, *A. delicata*, *A. mesentérica*, *A. ornata*, y *A. peltata* no poseen esta estructura (Montoya-Alvarez y col., 2011). No obstante, todas las características físicas mencionadas pueden verse afectadas por las condiciones de cultivo, como la temperatura, la humedad, la luz y la ubicación de la seta sobre el sustrato (Kobayashi, 1981).

Actualmente, la identificación de especies o cepas fúngicas puede realizarse mediante estudios filogenéticos moleculares que secuencian el ADN nuclear presente en las estructuras fúngicas, lo que permite establecer grados de emparentamiento entre hongos e identificar infinidad de especies con una mayor exactitud (Montoya-Alvarez y col., 2011). La Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD, por sus siglas en inglés), es una tecnología filogénica que ha sido empleada para la diferenciación de cepas individuales de *A. aurícula* y *A. polytricha*, que no pueden ser discriminadas por Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) (Yan y col., 2004).

### 1.3.4 Caracterización

Nutricionalmente, *Auricularia spp.* contienen altos niveles de proteína (aproximadamente el 30 % en base seca) y de elementos esenciales como vitaminas (Ca, P, Fe), minerales y polisacáridos (Chang y Miles, 2004). Según Stamets (2000) la composición nutricional de *A. aurícula* en base seca es: 8-10 % de proteína; 0,8-1,2 % de grasa; 84-87 % de carbohidratos; 9-14 % de fibra y 4-7 % de cenizas. Teniendo en cuenta que su contenido de agua es de aproximadamente el 90 %. Su cuerpo fructífero de *A. aurícula* es rico en hetero-polisacáridos, que están conformados por una cadena principal de residuos de D -glucosa con varias cadenas laterales de residuos  $\beta$ -1,3 como manosa, glucosa, xilosa y ácido glucurónico (H. Zhang y col., 2011).

Adicional a sus propiedades nutricionales, cuenta con propiedades medicinales debido a su contenido de una gama de compuestos bioactivos favorables para la salud, lo que le convierte en un alimento nutracéutico o funcional de alta calidad. En la tabla 1.1 se resumen las principales bioactividades de *Auricularia spp.*

Tabla 1.1. Principales actividades biológicas de *Auricularia spp.*

Bioactividad	Variedad	Compuesto bioactivo	Referencia
Antibacterial	<i>A. auricular</i> , <i>A. polytricha</i>	Melanina, eumelanina, feomelanina, compuestos solubles en etanol.	(B. Li y Dong, 2010; Lu y Tang, 1986; Zhu, He, y Chu, 2011)
Antiviral	<i>A. aurícula - judae</i>	Malondialdehído, ácido ascórbico, glutatión	(H. Ma, Xu, y Feng, 2014)

Bioactividad	Variedad	Compuesto bioactivo	Referencia
		reducido, superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa.	
Antioxidante	<i>A. aurícula</i> , <i>A. polytricha</i> , <i>A. fuscusuccinea</i>	Ácido ascórbico, tocoferoles, fenoles totales, polisacáridos, polisacáridos sulfatados y polisacáridos carboximetilados (los dos últimos tienen mayor actividad biológica)	(Mau, Chao, y Wu, 2001; Nguyen, Chen, y col., 2012; Y. Sun, Li, y Liu, 2010; Yang y col., 2011; W.-C. Zeng, Zhang, Gao, Jia, y Chen, 2012; H. Zhang y col., 2011)
Antiinflamatoria	<i>A. aurícula - judae</i>	Glucuronoxilomananos, glucuronoxilglucomanan os, glucanos	(Sigeo Ukai, Hara, Kuruma, y Tanaka, 1983)
Immuno-moduladora	<i>A. aurícula</i> , <i>A. polytricha</i>	Polisacáridos sulfatados, proteínas simples sin hidratos de carbono	(Nguyen, Wang, y col., 2012; Sheu, Chien, Chien, Chen, y Chin, 2004; Yu, Sun, Zhao, y Wang, 2014)

<b>Bioactividad</b>	<b>Variedad</b>	<b>Compuesto bioactivo</b>	<b>Referencia</b>
Antitumoral	<i>A. aurícula - judae, A. polytricha</i>	Diazane, heteroglicanos ácidos, betaglucanos ( $\alpha$ -1,3; $\alpha$ -1,4; $\beta$ -1,3), D-glucopiranosil (1,4)	(Z. Ma, Wang, Zhang, Zhang, y Ding, 2010; Reza y col., 2014; Song y Du, 2012; Shigeo Ukai y col., 1983)
Cardioprotectora	<i>A. aurícula</i>	Polisacáridos	(Q. Wu y col., 2010)
Hipolipemiente	<i>A. aurícula, A. polytricha</i>	Polisacáridos solubles en agua	(Cheung, 1996; Y. Luo y col., 2009; F. Zeng y col., 2013)
Hipoglicémico	<i>A. aurícula-judae</i>	Polisacáridos solubles en agua	(Yuan, He, Cui, y Takeuchi, 1998)
Anticoagulante, antiplaquetario	<i>A. aurícula</i>	Polisacáridos ácidos	(Yoon y col., 2003)

Las propiedades medicinales de *Auricularia spp.* otorgan ciertas aplicaciones potenciales a sus compuestos bioactivos. Los polisacáridos de *Auricularia Aurea* con carga negativa han sido empleados para formar polielectrolitos catiónicos en medio ácido de bajo peso molecular tras unión con quitosano, con el fin de servir como biopelícula y vehículo para fármacos proteicos hacia el intestino, donde se biodegrada y los libera (Xiong y col., 2016). La melanina

se aplica industrialmente como pigmento natural, antioxidante y agente antibacterial en el campo de los alimentos, cosméticos, farmacología, medicamentos, entre otros (Zhu y col., 2011). Así mismo, los polisacáridos de *A. aurícula* han sido empleados por su actividad antioxidante como conservantes de enlatados, principalmente escabeche (Khaskheli y col., 2015), y como suplementos de la harina de trigo para la elaboración de panes enriquecidos (Fan, Zhang, Yu, y Ma, 2007).

## **1.4 Conservación y almacenamiento de cepas puras**

En la actualidad existentes métodos comúnmente utilizados para el mantenimiento y la preservación de especies fúngicas, que aseguran la estabilidad genética de las cepas y sus particularidades fenotípicas. La elección del método adecuado dependerá del tipo de hongo a preservar, la cantidad de especies o cepas, la finalidad del espécimen y los recursos humanos y financieros disponibles (M. D. García y Uruburu, 2000). Algunos de los métodos para la conservación y almacenamiento de cepas fúngicas son:

### **1.4.1 Transferencia periódica**

Este método consiste en repicar periódicamente el microorganismo en un medio de cultivo fresco cada vez que el organismos consuma los nutrientes del cultivo predecesor, brindándole las condiciones óptimas para su desarrollo (Leal, Sánchez, y Corrales Ramírez, 2005). Este método es poco recomendable ya que las células se siguen multiplicando obteniendo como resultado descendientes lejanos de las células iniciales, lo que puede ocasionar la pérdida de características propias del hongo y la modificación de su información genética consecuencia de la alternancia generacional (Gutiérrez, 2009).

#### **1.4.2 Liofilización**

La liofilización se basa en la restricción de la actividad metabólica causada por la eliminación de agua del tejido fúngico almacenado, a través de un proceso de congelación y sublimación. Este proceso al igual que el de congelación requiere el uso de sustancias criopreservantes, pero de menor punto de evaporación en el que se suspende el material a liofilizar (Moraes-Borba y Rodrigues, 2000a). Una de las ventajas de la aplicación de este método es que permite almacenar los liófilos a temperatura ambiente, facilitando las labores de envío de cepas y disminuyendo costos causados por el uso de sistemas de refrigeración (Arun y Azeez, 2004).

#### **1.4.3 Congelación**

La congelación o criopreservación es un método ampliamente utilizado actualmente para la conservación de hongos. (Carmichael, 1956; Moraes-Borba y Rodrigues, 2000). Este consiste en almacenar el tejido fúngico en suspensión en un agente crioprotector líquido a temperaturas menores a cero grados centígrados, congelando el agua en el tejido, lo que limita la disponibilidad de agua líquida para las células, disminuyendo además las funciones metabólicas de las mismas. Es importante tener en cuenta el uso de sustancias criopreservantes como el glicerol para evitar una posible lisis celular causada por la formación de cristales de hielo en el interior de la célula, además este método requiere del uso especial de equipos que mantengan la temperatura de almacenamiento para evitar la reactivación de las células, por tanto demanda un mayor consumo energético ocasionando un incremento en los costos (Bosmans, 1974).

#### **1.4.4 Inmersión en aceite mineral**

Este método consiste en almacenar trozos de hongos desarrollados, en tubos de ensayo que contienen agar distribuido en la superficie interna del mismo, el cual posteriormente se recubre

con una capa de aceite mineral estéril (Buell y Weston, 1947; Ferreti-de-Lima y De-Moraes-Borba, 2001). A través de la conservación de cepas por este método se reportan tiempos de almacenamiento de hongos filamentosos que van de los 3 a los 47 años, logrando un gran porcentaje de material puro y viable (Panizo, Reviákina, Montes, y González, 2005).

#### **1.4.5 Inmersión en agua destilada estéril**

El método de preservación en agua destilada estéril es reconocido por ser un método sencillo y económico, que asegura la preservación exitosa de cultivos fúngicos por tiempo prolongado sin que disminuya la viabilidad de las cepas. Consiste en seleccionar muestras de tejido desarrollado (esporas o hifas) depositándolas en recipientes con agua destilada estéril para ser almacenados (Bueno y Gallardo, 1998; Panizo y col., 2005; Qiangqiang y Jiajun, 1998).

### **1.5 Métodos de selección de cepas**

La selección de determinadas cepas fúngicas para la producción de biomasa se realiza a través de una serie de análisis o ensayos que relacionen los aspectos de mayor relevancia para su producción industrial en pro de la obtención de características de interés. Pruebas de crecimiento micelial (Adenipekun, Lawal, y Isikhuemhen, 2015; Zervakis, Philippoussis, Ioannidou, y Diamantopoulou, 2001), evaluación de la aparición de primodios, características morfológicas de las carpóforos, tasas de bioconversión (Mane, Patil, Syed, y Baig, 2007), propiedades organolépticas de la seta (Onyango, Palapala, Arama, Wagai, y Gichimu, 2011) e índices de rendimiento (Qiang, 2015a), son algunos de los aspectos a tener en cuenta para la selección de la cepa que se desee producir. Una vez establecida la cepa se procede a realizar labores de aislamiento e identificación que ratifiquen la correcta escogencia del material

fúngico a reproducir. Ensayos de reproductibilidad en placas de Petri y la realización de cultivos a pequeña escala son métodos de selección que permiten evidenciar los factores anteriormente mencionados.

## **1.6 Banco de recursos genéticos**

El éxito para el establecimiento de un banco de recursos genéticos de cualquier cepa fúngica se basa en la conservación de la pureza, preservación de la viabilidad y la estabilidad genética de los tejidos almacenados (María Dolores García y Uruburu, 2000). El uso del micelio como estructura reproductiva presenta ventajas frente a las esporas, siempre y cuando se garanticen las condiciones de almacenamiento adecuadas para la obtención de cuerpos fructíferos con las mismas propiedades de la cepa aislada, ya que las esporas son células reproductoras que requieren de una compatibilidad genética apropiada para que se produzca la reproducción sexual y la fructificación (Pichel, 2012).

Un banco de recursos genéticos de *Auricularia spp.* puede establecerse realizando en primera medida el aislamiento y la posterior identificación de la especie o cepa que se desea preservar, posterior a ello se escoge el método de almacenamiento pertinente, pudiendo ser uno o varios de los anteriormente mencionados, evaluando la efectividad del mismo a través de pruebas de viabilidad y pureza del material genético.

## 1.7 Producción por fermentación en estado sólido (FES)

El proceso productivo está formado por tres etapas fundamentales. Primeramente, la preparación de la materia prima, que incluye la compra o producción del inóculo y el pretratamiento de los sustratos. Seguido de la FES, que abarca la inoculación del sustrato, la incubación para que el micelio invada el sustrato. Finalmente, se cosechan los cuerpos fructíferos, se empacan y almacenan para su posterior distribución en el mercado. Con los resultados obtenidos se proceden a calcular los indicadores de eficiencia económica del proceso. En la figura 1.1 se ilustra de forma generalizada el proceso productivo del hongo *Auricularia spp.*

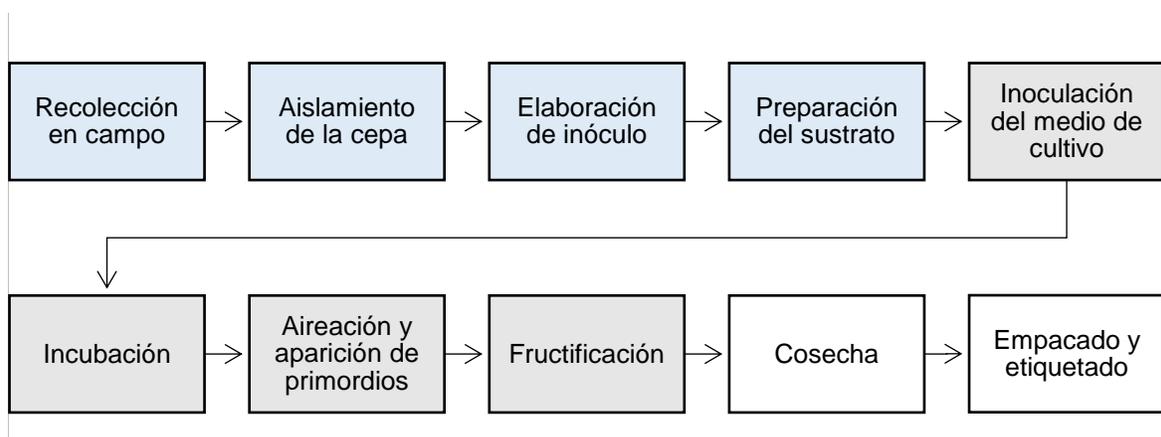


Figura 1.1 Proceso de producción de *Auricularia spp.*

De acuerdo a la coloración, las actividades se dividen en tres etapas previamente enunciadas. Estas son: preparación de materia prima, FES y poscosecha.

La FES es un bioproceso en el cual el microorganismo se desarrolla sobre un sustrato sólido que utiliza como fuente principal de nutrientes y medio físico para su crecimiento (Belur y Mugeraya, 2011). Según Pineda, Ramos y Soto (2014), la FES presenta grandes

ventajas con respecto a la Fermentación Sumergida (FEL). Estas son: Menor costo de inversión, mayor productividad, bajo consumo de energía, mayor simplicidad del proceso, menos uso de agua y una mejor eficiencia de recuperación de productos (Khalil, Hoque, Basunia, Alam, y Khan, 2011; Kumar, Jain, Shanker, y Srivastava, 2003).

### **1.7.1 Diseño y formulación de medios**

**1.7.1.1 Sustratos lignocelulósicos.** Los residuos agroindustriales se conforman de una matriz lignocelulósica, son generados en actividades agrícolas y silvopastoriles y constituyen una fuente abundante, pero poco utilizada de biomasa renovable (Lynch, 1987). Una amplia gama de sustratos lignocelulósicos se han utilizado para el cultivo de este género, destacándose el aserrín de madera, cascarilla de arroz, tusa, bagazo de caña, paja de trigo y paja de sorgo (Chang y Miles, 2004). Residuos menos convencionales como pulpa de café (Sharma y Jandaik, 1992a), residuos del prensado de la oliva (Reina, Liers, Ocampo, García-Romera, y Aranda, 2013), hojas de plátano, fibra de coco, cáscaras de cacao (Carreño-Ruiz y col., 2014), hojas y raquis de palma de aceite (Abd Razak, Abdullah, Khir Johari, y Sabaratnam, 2013) y demás residuos de poscosecha (Qiang, 2015b) también han mostrado ser aptos para la producción de *Auricularia spp.*

Otros autores han mezclado diferentes sustratos lignocelulósicos para formular medios que cumplan los requerimientos nutricionales del hongo y aumenten sus rendimientos (Abd Razak y col., 2013; Morales, Huerta-Palacios, y Sánchez-Vázquez, 2000). En la tabla 1.2 se relacionan los sustratos reportados en la literatura para el cultivo de *Auricularia spp.*

**1.7.1.2 Suplementos del medio.** Los materiales lignocelulósicos presentan generalmente niveles de proteínas insuficientes para el desarrollo de hongos; los cuales requieren nitrógeno, potasio, fosforo, calcio y vitaminas (Emilsa y Castillo, 2007). La relación C: N es de suma

importancia en el desarrollo micelial y el crecimiento del cuerpo fructífero; es por esto, que la adición de suplementos orgánicos que compensen la escasez de Nitrógeno es de vital importancia para la obtención de altos rendimientos de producción (Isikhuemhen, Okhuoya, Ogboe, y Akpaja, 1999; Mane, Patil, Syed, y Baig, 2007). Los suplementos ricos en nitrógeno generalmente utilizados incluyen sales de amonio, urea, levadura en polvo, salvado de trigo, harina de soja, sésamo, maní, asparagina y alanina (Lou, 1982), siendo el nitrato de calcio el que ha mostrado mejores resultados (Quimio, 1982). Mientras que los hidratos de carbono añadidos a los diferentes sustratos incluyen melaza, miel, paja de maíz, salvado de arroz, harina de avena, sucrosa y azúcar blanco, los cuales han demostrado acelerar el crecimiento del micelio de las cepas. (Quimio, Chang, y Royse, 1990). El salvado de trigo es uno de los mejores suplementos utilizados para la obtención de setas de *Auricularia spp* (Adenipekun, Lawal, y Isikhuemhen, 2015; Mpulusu, Luyeye, de Kesel, y Degreeef, 2010; Onyango, Palapala, Arama, Wangai, y Gichimu, 2011; Zou, Hu, Liu, Chen, y Gu, 2013). Algunos autores recomiendan la adición de vitaminas como biotina, tiamina y piridoxina al sustrato para acelerar las reacciones bioquímicas necesarias para el crecimiento del hongo (Chung y Tzeng, 2009; Luo, 1993). El carbonato de calcio también es comúnmente empleado como suplemento con el fin de regular el pH del sustrato y aportar calcio (Irawati y *col.*, 2012; Nair, 2011; Rühl y Kües, 2006). La suplementación con sustrato agotado del cultivo de otros hongos como *Agaricus bisporus* aumenta significativamente la bioconversión (Sharma y Jandaik, 1994, 1992a; Sripheuk, 2007) debido a que tiene mayor digestibilidad proteica, sólidos solubles y aminoácidos biodisponibles, en comparación al sustrato sin agotar (Zadrazil, 1997). Estudios realizados por Adenipekun y colaboradores (2015) demostraron que la adición de suplementos al sustrato aumenta significativamente la extensión de los micelios, la densidad de los carpóforos y los rendimientos de producción de *A. aurícula*.

Tabla 1.2. Sustratos y suplementos reportados como medio de cultivo para algunas especies de *Auricularia* spp.

Especie	Sustratos lignocelulósicos	Suplementos	Eficiencia	
			biológica (%)	Referencias
<i>A. polytricha</i>	Pulpa de café y aserrín compostado.	-----	75	(Sharma y Jandaik, 1992b)
	Aserrín mezclado con hojas de palma de aceite (90:10)	Bagazo de caña (15 % )	289	(Abd Razak y <i>col.</i> , 2013)
	Ramas de zufaifo (70 %)	Semilla de algodón (19 %), salvado de trigo (10 %) y cal viva (1 %)	94 – 100	(Qiang, 2015b)
<i>A.</i>	Salvia y Salvado de trigo o mazorca de maíz	Maíz, harina de maíz, sacarosa, polvo de yeso	----	(X. C. Luo, y <i>col.</i> , 2012)
	Mazorcas de maíz	Pulpa de café y aserrín de  <i>Leucaena</i> spp.	94-133	(Morales y <i>col.</i> , 2000)

Especie	Sustratos lignocelulósicos	Suplementos	Eficiencia	
			biológica (%)	Referencias
<i>A. auricula- judea</i>	Bagazo de caña	Salvado de arroz, piel de trigo, soja desgrasada, anhidro sólido	70	(Furukawa, 2014)
	Paja de fréjol	Salvado de trigo, urea, azúcar, cal	-----	(Zhao et al., 2015)
<i>Auricularia spp.</i>	Aserrín compostado (50- 98 %)	Cascarilla de arroz, pulpa de café, azúcar y carbonato de calcio	75	(Guzmán, y col., 1993)
	Pulpa de café	Aserrín de <i>Inga</i> <i>Jinicuil</i>	15-47	(Pérez y Martínez- Carrera, 1988)
	Aserrín	Salvado de arroz, azúcar blanco y carbonato de calcio	----	(Vilela y Silverio, 1982)

## 1.7.2 Parámetros de operación

Las condiciones ambientales son de gran importancia para el crecimiento de las cepas de *Auricularia spp.* La luz, la temperatura y el pH son usualmente considerados los factores de mayor importancia en los estudios de fructificación (Lou, 1982). En la tabla 1.3, se presentan los parámetros más importantes para la producción a escala industrial de *Auricularia spp.*

**1.7.2.1 pH.** Las condiciones de pH para el crecimiento de *Auricularia spp.* oscilan dentro de un rango ligeramente amplio, desde el ácido al neutro. La adición de urea y carbonato de calcio al medio de cultivo ayuda a estabilizar el pH gracias al efecto tampón que estos generan (X. C. Luo, 1993).

**1.7.2.2 Temperatura.** La temperatura afecta la germinación de las esporas de *Auricularia spp.*, que se inhiben fuera del rango de los 10 a 40 °C, siendo 30 °C la temperatura óptima de germinación (Quimio, 1982). El color y la estructura del hongo también se ven afectados, pues a temperaturas bajas el carpóforo se torna más oscuro y grueso (X. C. Luo, 1993). Estudios realizados en *Auricularia auricula-judae* muestran que su crecimiento micelial se ve ampliamente influenciado por la temperatura del sustrato, siendo el rango óptimo entre 25 a 30 °C (Zervakis, Philippoussis, Ioannidou, y Diamantopoulou, 2001).

**1.7.2.3 Humedad del sustrato.** Está relacionada con la cantidad de agua existente en el medio. Un bajo nivel de agua afecta la capacidad del micelio para absorber y transportar nutrientes, por lo que el micelio se seca; mientras un alto nivel de agua dificulta la circulación del oxígeno y del CO<sub>2</sub> en el sustrato (X. C. Luo, 1993).

**1.7.2.4 Humedad relativa.** Una humedad relativa menor al 80 % puede causar la deshidratación del cuerpo fructífero deteniendo el desarrollo de la seta. Una humedad relativa

alta puede ocasionar la condensación del agua en la superficie del medio de cultivo creando un ambiente propicio para el crecimiento de microorganismos no deseados (Chang y Quimio, 1982).

**1.7.2.5 Aireación.** La aireación con oxígeno es un requerimiento para la formación de los primordios, los cuales se forman solo cuando el sustrato invadido por el micelio es expuesto al aire (Quimio, 1982). Atmosferas muy cargadas de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y la condensación de la humedad sobre los cuerpos fructíferos pueden causar deformaciones, haciendo que el hongo no se expanda y se enrolle sobre sí, obteniendo setas con la apariencia similar a la de un coral (X. C. Luo, 1993).

**1.7.2.6 Intensidad de luz.** La luz estimula la fructificación de *Auricularia spp.* (Borromeo, 1967). Según Sánchez Vásquez (1994), cuando la intensidad de luz es superior a 500 lux durante el periodo de incubación, puede dar lugar a la formación prematura de primordios. Este factor no solo se relaciona con la formación del cuerpo fructífero, sino con el color y la estructura del hongo, pues una mayor exposición a la luz promueve la formación de carpóforos más oscuros.

Tabla 1.3. Principales parámetros de operación reportados en la fermentación de *Auricularia* spp.

Especie	pH	Humedad del sustrato (%)	Temperatura (°C)		Humedad relativa (%)		Luz (lux)		Referencia
			Incubación	Fructificación	Incubación	Fructificación	Incubación	Fructificación	
A. auricula	3.5–8.5 (4.5–7.5)	--	15–34 (28)	15–28 (22–25)	--	--	--	--	(Chang y Miles, 2004)
A. polytricha	2.8–9.0 (5.0–5.4)	--	10–36 (20–34)	15–28 (24–27)	--	--	--	--	(Chang y Miles, 2004)
	--	70	10-27 (25-28)	23-28	80	85	0	500	(Guzmán, y col., 1993)
	7	--	25-28	25-30	80-90	90	0	500	(Qiang, 2015b)
Auricularia	4,5-7,5	60	10-36	12-30°	--	85	0	500	(Sánchez

Especie	pH	Humedad del sustrato (%)	Temperatura (°C)		Humedad relativa (%)		Luz (lux)		Referencia
			Incubación	Fructificación	Incubación	Fructificación	Incubación	Fructificación	
ia spp			(25)						Vásquez, 1994)
	--	70	22-34 (25-28)	23-28	80	75-90 (85)	0	500	(Guzmán, y col., 1993)
	6.5-7.0.	--	24-30	21-30	90-100	85-90	0	500-2000	(Sánchez Vásquez, 1994)
	5,5-6,5	60-65	6-36 (22-30)	15-27 (20-24)	90-95	90-95	0	500	(X. C. Luo, 1993)
	--	65-70	25-28	25-28	75-90	65-70	0	500	(Vilela y Silverio, 1982)
	--	--	10-36	12-30 (23-	85	85	--	--	(Cheng y Tu,

Especie	pH	Humedad del sustrato (%)	Temperatura (°C)		Humedad relativa (%)		Luz (lux)		Referencia
			Incubación	Fructificación	Incubación	Fructificación	Incubación	Fructificación	
			(20-34)	28)					2013)
	--	55- 80 (65)	25-28	20-30	60-70	65-95	50	200-8000	(Furukawa, 2014)

*\*Los valores entre paréntesis indican las condiciones óptimas.*

### 1.7.3 Pretratamientos de la materia prima

**1.7.3.1 Inóculo.** Se extraen tacos de agar con micelio de 1 cm<sup>2</sup> a partir de las cajas de Petri con la cepa aislada y se depositan sobre el sustrato suplementado (previamente esterilizado). Se deja incubando a 28 °C hasta que el micelio invada completamente el medio. El inóculo puede ser directamente el aserrín o taquetes de un 1 cm de diámetro por dos de largo rellenos con el mismo (Guzmán, y col., 1993).

**1.7.3.2 Sustrato.** Muchos sustratos tienen que reducirse de tamaño. Por ejemplo, los troncos de madera y las pajas se deben volver viruta. Zhao (2015) establece un tamaño de partícula de 3-5 mm. Algunos sustratos como la pulpa de café y la viruta deben someterse adicionalmente a procesos de fermentación aerobia en condiciones de oscuridad durante cinco días, con volteo cada dos días (Guzmán, y col., 1993; Vilela y Silverio, 1982). Mientras que otros sustratos se emplean tal cual (sin pretratamiento) debido a su estructura favorable; tal es el caso del salvado, la cascarilla, la pulpa, la harina, la torta, entre otros, cuyo pequeño tamaño permite una mayor área de contacto con el micelio del hongo; la tusa que es un material adsorbente de agua y el bagazo de caña, cuyas fibras ya han sido separadas por las fuerzas mecánicas del trapiche. Pero sea cual sea el pretratamiento realizado, debe someterse el sustrato a pasteurización controlada en agua caliente a 80 °C durante 30-45 minutos para eliminar los microorganismos presentes que puedan contaminar el sustrato, y dejar enfriar hasta menos de 30 °C (Guzmán, y col., 1993). No obstante, problemas de contaminación por esporas de *Bacillus spp.* han desencadenado patentes donde se propone doble tratamiento térmico para el sustrato. El primero tratamiento consta de un calentamiento y posterior enfriado de los granos para estimular la germinación de las esporas y el segundo de una pasteurización a vapor para eliminarlas por completo (Hiromoto, 1992).

#### 1.7.4 Biorreactores

Casamente, este hongo se ha cultivado sobre troncos de madera con perforaciones laterales (Steineck, 1981) provenientes de árboles o arbustos como la acacia, aguacate, achiote, cacao, café, encino, gardenia, guayabo, hule, limón, naranjo, mango, marañón, tamarindo, entre otros. Las dimensiones de los troncos pueden variar entre 5 a 15 cm de diámetro por un metro de alto. Algunos autores reportan que es necesario estimular los medios para inducir la fructificación; para el caso de los troncos se deben sumergir en agua fría (10-16 °C) durante 12 a 24 horas (Guzmán, y *col.*, 1993).

Actualmente, las bioceldas más empleadas para llevar a cabo la FES son las bolsas de plástico; los primeros en reportarlo fueron Quimio y colaboradores (1990). Guzmán y colaboradores (1993) describen bioceldas de bolsas de polipapel con una capacidad de 1 a 1,2 kg, y unas dimensiones de 25x35 cm. Por su parte, Furukawa (2014) patentó un tipo de bolsa poliédrica transpirable como biocelda para la producción de *Auricularia auricula-judae* por FES. Este método consiste en llenar la bolsa tan sólo un 20 % con bagazo de caña, y retardar la aparición de los cuerpos fructíferos mediante aireación controlada e iluminación constante, de modo que el micelio se desarrolle lo suficiente, crezca uniformemente y sin residuos. Las botellas de plástico como bioceldas también se han reportado (Vilela y Silverio, 1982), sin embargo son poco usadas por lo costoso y poco ecológico que resulta.

Moren (1989), plantea como una alternativa de mejora en los sistemas de producción de hongos, un vaso cilíndrico cerrado como bioreactor, el cual contiene el grano hidratado con el inóculo de *A. Polytricha*. El vaso está parcialmente sumergido en agua y tiene una tela recubriéndole, la cual le permite absorber humedad.

### 1.7.5 Incubación

Para el caso de los troncos se inocula el medio directamente en la perforación con los taquetes o con un inoculador metálico que deposite el aserrín invadido por el micelio. Para el caso de las bolsas, el sustrato pretratado se inocula con un taquete o aserrín con micelio. Se incuba tres días anaerobiamente y luego se hacen perforaciones para permitir la aireación e inducción de la aparición de los primordios tres semanas después. Ahí se retira completamente la bolsa (Guzmán, y *col.*, 1993). Qiang (2015b) propone emplear entre un 5 a 10 % de inóculo, mientras Guzmán y colaboradores (1993) proponen un 2,8 %. Los tiempos de incubación y fructificación hasta cosecha se mencionan en la tabla 1.4.

*Tabla 1.4. Tiempos de incubación y fructificación según cada tipo de bioreactor/biocelda*

<b>Bioreactor/Biocelda</b>	<b>Tiempo de incubación (días)</b>	<b>Tiempo de fructificación (días)</b>	<b>Referencias</b>
Troncos	60-70	10-15	(Guzmán, y <i>col.</i> , 1993)
	30-40	7	(Cheng y Tu, 2013)
Bolsas de polipapel	49-56	7-10	(Guzmán, y <i>col.</i> , 1993)
Bolsas poliédricas transpirables	30	70	(Furukawa, 2014)

### 1.7.6 Cosecha

Se cortan los carpóforos desde su base con una navaja cuando alcancen un tamaño de 4-6 cm de diámetro, consistencia gelatinosa-compacta, y un color que varía entre el café rojizo a púrpura oscuro (Guzmán, y *col.*, 1993).

### **1.7.7 Indicadores de eficiencia**

La pérdida de peso del sustrato sólido es proporcional al rendimiento del cuerpo fructífero y la conversión biológica del mismo en biomasa fúngica y CO<sub>2</sub> producido mediante respiración (Irawati y col., 2012; Reina y col., 2013). Según Naraian y colaboradores (2009), altas tasas de colonización del micelio se pueden atribuir a una relación adecuada de los componentes nutricionales del sustrato (carbono, nitrógeno, lípidos y minerales) y a una gran disposición energética en el mismo (Zervakis y col., 2001). Sustratos fuertemente colonizados por el micelio durante el periodo de incubación reducen el tiempo de formación de primordios y permiten que el micelio supere posibles competidores en el sustrato (Royse, 1997). Los resultados obtenidos por Irawati y colaboradores (2012) indican también que la densidad de los cuerpos fructíferos y la obtención de altas tasas de conversión biológica están relacionadas con una mayor cantidad de micelio en el sustrato (Onyango, Palapala, Arama, Wangai, y Gichimu, 2011b).

Varios autores han estudiado métodos indirectos de cuantificación de biomasa fúngica producida en los procesos de FES, en parámetros de contenido proteico (Matcham, Jordan, y Wood, 1984), ergosterol (Aidoo, Hendry, y Wood, 1981), quitina (Roche, Venague, Desgranges, y Durand, 1993), glucosamina (Scotti, Vergoignan, Feron, y Durand, 2001) y tasas de respiración (Sakurai, Misawa, y Shiota, 1985); con el fin de optimizar los procesos de producción y normalizar las características del sustrato.

La bioconversión del sustrato por parte del hongo es una medida que indica la capacidad que tiene la seta de convertir el medio de crecimiento en cuerpos fructíferos, el cual en algunos casos puede ser mayor al 100 %. Esta se define como el cociente entre la masa fresca

del hongo cosechado y la masa seca del sustrato, expresados en kg (Pineda, 2014). En la tabla 1.2 se muestran algunas eficiencias biológicas reportadas en la literatura para cada sustrato.

### **1.7.8 Productos biotecnológicos obtenidos por FES**

La FES no sólo es utilizada para la producción de setas comestibles, también es efectiva en la producción compuestos biotecnológicos de interés (Suryanarayan, 2003; Xie y col., 2010). Se ha reportado la producción de tirosinasa a partir *A. auricula* (Zou y col., 2013), enzimas peroxidadas a partir de *A. auricula-judae* (Reina y col., 2013) y polisacáridos con poder antioxidante a partir de *A. auricula* (Zou, Jiang, y Tian, 2015). La FES también ha sido útil en la producción de alimentos funcionales. Nair (2011) produjo soja con curcuminoides y arroz o harina de arroz, fermentados con bacterias probióticas y *A. Polytricha* en estado micelial con el fin de aumentar su contenido nutricional.

Adicionalmente, la FES permite pretratar las materias primas para mejorar sus propiedades o acrecentar la productividad del proceso. Residuos agrícolas fermentados por *Auricularia polytricha* presentan un aumento de la proteína cruda (Songkammali, 2005), disminución de compuestos fenólicos (Reina y col., 2013) y una degradación parcial de la matriz lignocelulósica dada la actividad enzimática de *Auricularia spp.*. Estudios han demostrado que el rendimiento de producción y/o extracción de productos biotecnológicos se ve favorecida cuando los residuos agroindustriales son pretratados con estos hongos (Álvarez-gutiérrez y col., 2014).

## 1.8 Producción Por Fermentación En Estado Líquido (FEL)

La FEL es aquella en la cual hay por lo menos la misma concentración de agua y de sustrato sólido en el proceso, es decir, que hay nutrientes en solución; los microorganismos se desarrollan flotando y de una forma típica, es decir, que es predecible mediante la curva de crecimiento bacteriano. Es el tipo de fermentación más empleado a nivel industrial porque los metabolitos secundarios son más fáciles de recuperar que en la FES (Crueger y Crueger, 1993; Fazenda, Seviour, McNeil, y Harvey, 2008), es más rápido el crecimiento microbiano por la mayor Actividad del Agua (AW, por sus siglas en inglés), y la homogeneidad del proceso es muy superior, lo que garantiza su fácil reproducibilidad y monitoreo. En lo que respecta a las setas comestibles, solo hasta hace unos años se ha empezado a desarrollar esta tecnología. (Suárez y Nieto, 2016). Ji, Li, y Zheng (2010), cultivaron *Auricularia polytricha* por FEL y encontraron que las condiciones óptimas de producción de biomasa correspondían a una temperatura de 26 °C, una la velocidad de agitación de 182 rpm y un tiempo de fermentación de 145,7 horas. En la tabla 1.5 se pueden observar algunos metabolitos de *Auricularia spp.* producidos mediante Fermentación Sumergida.

*Tabla 1.5. Principales metabolitos y condiciones de cultivo para Auricularia spp. mediante Fermentación Sumergida*

<b>Metabolito producido</b>	<b>Especie</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>Referencia</b>
Exopolisacáridos	<i>A. aurícula</i>	Glucosa, polvo de soja, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(J. Wu, Ding, y Zhang, 2006)

<b>Metabolito producido</b>	<b>Especie</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>Referencia</b>
		Extracto de levadura y glucosa	(Tang, Yu, y Chen, 2002)
	<i>A. polytricha</i>	Altos niveles de sacarosa, extracto de levadura y KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(Xu y Yun, 2003)
Melanina	<i>A. aurícula</i>	Extracto de levadura, tirosina, peptona y CaCO <sub>3</sub>	(S. Sun y col., 2016)
		Bajo nivel de glucosa, peptona, tirosina y CaCO <sub>3</sub>	(M. Zhang y col., 2015)
Exo-biopolímeros	<i>A. polytricha</i>	Sacarosa, extracto de levadura, y KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(Xu y Yun, 2003)
Biomasa fúngica (proteína)	<i>A. polytricha</i>	Glucosa en altas proporciones, extracto de levadura, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> y MgSO <sub>4</sub>	(Ji y col., 2010)

Mediante fermentación sumergida se pueden producir altas cantidades de melanina en muy poco tiempo. Las condiciones del medio más favorables constan de bajas o nulas

concentraciones de carbono, y altas concentraciones de nitrógeno, tirosina, peptona y carbonato de calcio (S. Sun y *col.*, 2016; M. Zhang y *col.*, 2015). Para la optimización de la producción de exopolisacáridos, está demostrado que niveles de pH mayores a 5,0 inducen una mayor producción; por el contrario, niveles de pH menores favorecen el crecimiento del micelio (Tang y *col.*, 2002; J. Wu y *col.*, 2006). También está reportado en la literatura el potencial de *Auricularia spp.* en la bioremediación de efluentes mediante biodegradación de compuestos fenólicos recalcitrantes (Antoniou, T., Ehaliotis, C., Panopoulos, N., y Zervakis, 2002) y biosorción de metales pesados (Chai y *col.*, 2012; Pan, Cao, Huang, Zhang, y Mo, 2010).

## 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 2.1 Aislamiento, identificación, caracterización y conservación de la cepa nativa *Auricularia spp.*

El objetivo de este experimento es aislar e identificar y caracterizar la cepa nativa ecuatoriana del hongo *Auricularia sp.*, para su conservación en un Banco de Recursos Genéticos Microbianos (BRGM) con fines industriales.

#### 2.1.1 Materiales y métodos

**2.1.1.1 Material biológico.** El aislamiento se realizó en la comunidad La Joya, Parroquia Jacinto Jijón y Camaño, Cantón Mira, Provincia del Carchi, en un bosque subtropical con coordenadas: UTM WGS84: 17N 806475 Este 10088020 Norte, según figura 2.1. Los basidiocarpos de *Auricularia sp.* se encontraban sobre troncos caídos y restos de madera aserrada de pendo; para su recolección se tomaron los carpóforos adheridos al sustrato y se transportaron en cavas de icopor, como indica la figura 2.2.

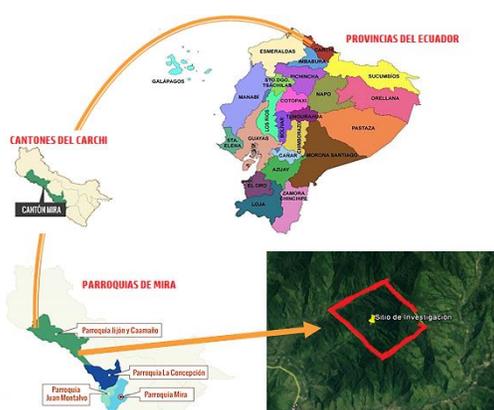


Figura 2.1. Georreferenciación del sitio de muestreo.



Figura 2.2. Carpóforos de *Auricularia sp.* sobre el sustrato.

**2.1.1.2 Reactivos.** Se empleó como medio de cultivo Agar antibiótico de la marca FUNGI PERFECTI®, y se preparó siguiendo la técnica descrita por Stamets (2000).

**2.1.1.3 Equipos.** Se empleó una cámara de flujo laminar diseñada por el CEBA a partir de un filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air) H14 EN-1822-1.

**2.1.1.4 Aislamiento de la cepa.** Se tomó un bisturí estéril y se hizo un corte longitudinal sobre el carpóforo del hongo, luego con unas pinzas metálicas asépticas se tomaron trozos de tejido interno de aproximadamente 2mm de longitud (Ortiz et al., 2016). Los trozos de tejido se depositaron en cajas de Petri que contenían el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) con antibiótico y se incubaron durante 6 días a 22 °C. Se consideraron como aislamientos positivos, todos aquellos con crecimientos y características miceliares uniformes, sin contaminaciones ni estados conidiales.

Las cepas se purificaron mediante el método de repiques sucesivos, se rotularon con la siguiente nomenclatura: cepa AP1-1810, cepa AP2-1810 y cepa AP3-1810. Luego, se almacenaron a 4 °C en el BRGM del Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA).

**2.1.1.5 Identificación morfológica.** Se realizó siguiendo la metodología descrita por Ortiz y colaboradores (2016), que consiste en observar las características morfológicas de los cuerpos fructíferos, la estructura del tejido y del micelio, la forma de las hifas, el color del himenóforo, el tipo de zona pilosa y el tamaño de la capa medular. Luego se compararon con las claves taxonómicas reportadas por Montoya-Alvarez y colaboradores (2011):

1. Himenio reticulado.....	<i>A. Delicada</i>
1. Himenio suave.....	2
2. Sección transversal con capa medular.....	3
2. Sección transversal sin capa medular... ..	4
3. Zona pilosa inferior a 100 $\mu\text{m}$ , capa medular inferior a 150 $\mu\text{m}$ ...	<i>A. Fuscosuccinea</i>
3. Zona pilosa de más de 100 $\mu\text{m}$ , capa medular superior a 150 $\mu\text{m}$ .....	<i>A. Polytricha</i>
4. Zona pilosa inferior a 150 $\mu\text{m}$ .....	<i>A. Auricula judae</i>
4. Zona pilosa cerca de 500 $\mu\text{m}$ .....	<i>A. Mesenterica</i>

**2.1.1.6 Identificación molecular.** Los carpóforos de *Auricularia sp.* se transportaron en cadena de frío hasta la empresa IDGEN (<http://idgen-ecuador.com/>) en la ciudad de Quito (Ecuador), la cual codificó el hongo como Auri1 y realizó la respectiva identificación molecular.

El protocolo de identificación fue verificado y estandarizado por los responsables técnicos y científicos del laboratorio de diagnóstico e identificación molecular IDgen, y sus principales etapas se listan a continuación (para más detalles, remitirse al anexo 2).

- Toma de muestra del tejido fúngico.
- Rompimiento celular mecánico (bead beating) y químico (buffer de lisis).
- Extracción de ADN por duplicado, mediante el método de Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989) modificado con la adición de ARNasa, para eliminar el ARN residual (X. Z. Fan, Zhou, Xiao, Xu, & Bian, 2014).
- Verificación de la calidad del ADN mediante electroforesis en gel de Agarosa al 1% y utilización de un marcador de bajo peso molecular para determinar la concentración de ADN de la muestra. Los resultados se confirmaron con un nanodrop.

- Amplificación del ADN mediante la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), empleando los cebadores (primers) ITS4 y ITS5, y el siguiente protocolo de termociclado: 95 °C por 3 min; 31 ciclos de 94 °C por 30 s, 50 °C por 45 s y 72 °C por 1 min 30 s; 72 °C por 7 min; y 4 °C en espera. La PCR fue ensamblada bajo cabina de bioseguridad con un flujo positivo, y en un termo bloque a -5 °C.
- Observación de amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y comparación con marcadores de 1 Kb (1 000 pb).
- Secuenciación de amplicones por el Método de Sanger, Nicklen y Coulson (1977).
- Ensamblaje y depuración de las secuencias obtenidas con el programa bioinformático GENEIOUS.
- Comparación de las secuencias ensambladas con la base de datos de nucleótidos de GenBank.

#### **2.1.1.7 Caracterización**

Para determinar la composición del hongo, se realizó la caracterización y análisis proximal bajo el METODO MO-LSAIA-01, METODO REFERENCIAL U.FLORIDA 1970, análisis de los minerales micro y macro elementos bajo el método MO-LSAIA-03, METODO REFERENCIAL U. FLORIDA 1980, análisis de laboratorio que fueron desarrollados en el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Santa Catalina, de acuerdo a los siguientes parámetro: humedad, cenizas o materia orgánica, extracto etéreo o grasa, proteína o nitrógeno total, fibra cruda, ELN , calcio (Ca), magnesio (Mg), sodio (Na), potasio (k), fósforo (P), azufre (S), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn).

## 2.1.2 Resultados y discusiones

**2.1.2.1 Aislamiento de la cepa.** El aislamiento de *Auricularia sp.* se hace a partir del tejido del hongo y no de esporas debido a que los cultivos de tejidos son esencialmente clones del hongo, en contraste con los cultivos de esporas, que presentan variabilidad genética (Ardón López, 2007).

El medio de cultivo empleado, agar PDA, coincide con el empleado por varios investigadores para el aislamiento de especies del género, tales como *A. auricula* (X. Z. Fan et al., 2014; Tao, Liu, & Xu, 2011).

**2.1.2.2 Identificación morfológica.** El hongo recolectado presenta basidiocarpos en forma de oreja, solitarios, glabros, sub-estipitados y de color rosado pálido, unidos lateralmente al sustrato, consistencia cerosa y gelatinosa cuando frescos mientras que coriácea cuando secos, un tamaño que varía de 2 a 10 cm de largo por 5 a 12 cm de ancho, un himenio suave con pliegues leves, y una zona pilosa inferior a 100  $\mu\text{m}$  con capa medular inferior a 150  $\mu\text{m}$ , según figura 2.3. Estas características macroscópicas coinciden con las reportadas por Lowy (1951), y por Bolaños y Soto (2011).



Figura 2.3. Basidiocarpos de *Auricularia sp.* sobre sustrato natural.

Por otro lado, las colonias fúngicas presentan micelio blanco de aspecto sedoso a plumoso y mediana densidad, como se muestra en la figura 2.4.

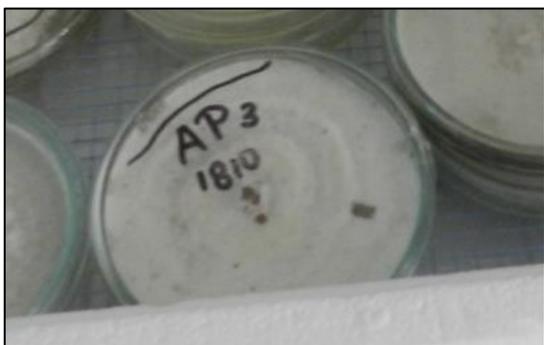


Figura 2.4. Cepa de *Auricularia sp.* purificada

Contrastando con las claves taxonómicas descritas en la metodología se deduce que el hongo pertenece a la especie *A. Fuscosuccinea*; no obstante, es necesario un estudio filogenético molecular para identificar la especie con mayor exactitud (Montoya-Alvarez et al., 2011).

**2.1.2.3 Identificación molecular.** Los enfoques moleculares se consideran herramientas poderosas para investigar la relación inter e intragenética de especies de basidiomicetos, apoyando los resultados obtenidos a partir de métodos convencionales tales como los morfológicos, fisiológicos y bioquímicos (Tao et al., 2011).

En este trabajo se emplearon los cuerpos fructíferos del *Auricularia sp.* (Auri1) como muestra para la extracción de ADN, a diferencia de otros trabajos donde se emplea el micelio seco luego de Fermentación en Estado Líquido (FEL) (X. Z. Fan et al., 2014; L. Li et al., 2007; Tao et al., 2011).

La extracción de ADN se realizó en este trabajo por el método de barcoding, a diferencia de Tao y Colaboradores (2011), que emplearon el método de Doyle y Doyle (1987) modificado, y

de Yan y colaboradores (2004), que emplearon el método de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, por sus siglas en inglés). Adicionalmente, para la extracción se requirió de tratamiento enzimático, que permitieran la obtención de ADN de alta calidad, debido a que el cuerpo fructífero de *Auri1* posee una elevada concentración de proteínas y polisacáridos.

El ADN de *Auri1* se extrajo por duplicado con el fin de obtener una concentración y calidad de ADN que permitiera la correcta amplificación del Fragmento de Espaciadores Transcritos Internos (ITS, por sus siglas en inglés) mediante PCR. Adicionalmente, las muestras se trataron con ARNasa y se diluyeron hasta una concentración en un rango de 15 a 30 ng/ $\mu$ L, para descartar procesos inhibitorios de la PCR debido a una elevada concentración de ADN, previo a su utilización en el ensamblaje de la PCR. Este rango de concentración de ADN es semejante al rango reportado por Tao y Colaboradores (2011) para la identificación de cepas nativas de *A. auricula*, 20 a 40 ng/ $\mu$ L.

El análisis de secuencias de Espaciadores Transcritos Internos (ITS, por sus siglas en inglés) juega un papel importante en los estudios de filogenia en o por debajo del nivel de género y en la identificación de hongos (Dunham, O'dell, & Molina, 2003).

Los resultados del ensamblaje se visualizan en la figura 2.5, donde “C -” es el control negativo y el Ladder tiene una longitud de 1Kb.

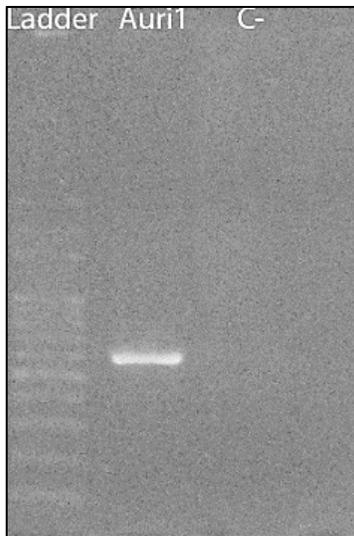


Figura 2.5. Amplicón del fragmento ITS visualizados en un gel de Agarosa 2%.

El ADN lineal de Auri1 presenta longitud de 636 pb, calidad del 71,5 % y al contrastarse con la accesión [JX065150.1](#) de la base de datos de nucleótidos de GenBank muestra identidad del 99 % con *A. fuscosuccinea* (GenBank, 2013), conforme con la publicación de Looney, Birkebak y Matheny (2013). Este porcentaje de identidad genética es positivo, ya que otros estudios evidencian que las cepas nativas presentan una alta diversidad genética. Cepas nativas de *A. auricula-judae* presentaron una identidad genética promedio de tan sólo el 41% (Du, Cui, & Dai, 2011), mientras que las cepas de *A. auricular* presentaron el 50-63% (L. Li et al., 2007; Yan et al., 2004) y las de *A. polytricha* el 58-65 % (Du, Cui, Zhang, & Dai, 2013; Yan et al., 2004).

En efecto, la cepa en estudio presenta la siguiente clasificación científica descrita en la tabla 2.1:

Tabla 2.1. Clasificación científica de la cepa en estudio

**Clasificación científica**

---

Reino: Fungi

División: Basidiomycota

Clase: Agaricomycetes

Orden: Auriculariales

Familia: Auriculariaceae

Género: *Auricularia*

Especies: *A. fuscosuccinea*

---

#### 2.1.2.4 Caracterización

Tipo de análisis	Tratamiento	Unidad	Valor	Método de referencia
	HUMEDAD	%	39,09	U. FLORIDA 1970
	CENIZAS	%	2,07	U. FLORIDA 1970
	EXTRACTO ETÉREO O GRASA	%	1,90	U. FLORIDA 1970
	PROTEÍNA	%	21,46	U. FLORIDA 1970
	FIBRA	%	6,23	U. FLORIDA 1970
	E.L.N	%	68,33	U. FLORIDA 1970
	CALCIO (Ca)	%	0,08	U. FLORIDA 1980

FÓSFORO (P)	%	0,45	U. FLORIDA 1980
MAGNESIO (Mg)	%	0,16	U. FLORIDA 1980
POTASIO (K)	%	0,01	U. FLORIDA 1980
SODIO (Na)	%	0,86	U. FLORIDA 1980
COBRE (Cu)	ppm	4	U. FLORIDA 1980
HIERRO (Fe)	ppm	137	U. FLORIDA 1980
MANGANESO (Mn)	ppm	22	U. FLORIDA 1980
ZINC (Zn)	ppm	20	U. FLORIDA 1980

---

Los resultados de la caracterización se obtuvieron del micelio crecido sobre el sustrato de trigo

## **2.2 Protocolo para la conservación de la especie nativa *Auricularia fuscosuccinea*.**

El objetivo de este experimento es desarrollar un protocolo para la conservación de la cepa nativa del hongo *A. fuscosuccinea*.

### **2.2.1 Materiales y métodos**

**2.2.1.1 Cepa.** Se empleó la cepa ceba-ap1-1810 de *Auricularia fuscosuccinea*, perteneciente al Banco de Recursos Genéticos Microbianos (BRGM) del Centro Ecuatoriano

de Biotecnología y Ambiente (CEBA); la cual fue aislada, caracterizada e identificada en el acápite anterior.

**2.2.1.2. Medio de cultivo.** Se emplearon los medios de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) y Agar Extracto de Malta (MEA, por sus siglas en inglés) de la marca FUNGI PERFECTI®.

**2.2.1.3 Equipos.** Se empleó una cámara de flujo laminar diseñada por el CEBA a partir de un filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air) H14 EN-1822-1, y un equipo liofilizador de bandejas marca VirTis wizard 2.0 adVantaje Plus (ver anexo 1), perteneciente a la Universidad Técnica del Norte (UTN).

**2.2.1.4 Preparación de cepas de trabajo.** Los medios de cultivo se prepararon siguiendo la técnica descrita por Stamets (2000), se vertieron en tubos de ensayo (picos de flauta) de 5 ml y se dejaron solidificar a temperatura ambiente en posición inclinada. Luego se inocularon con plugs o tacos de la cepa de reserva Ceba AP1-1810 y se incubaron durante 7 días a 22 °C.

**2.2.1.5 Liofilización.** Las cepas de trabajo fueron congeladas a 200 atm de presión, mediante un descenso de temperatura de a 10 °C hasta llegar -50 °C; y posteriormente secadas a 300 atm de presión, mediante un ascenso de temperatura de a 10°C, hasta llegar 30 °C.

## **2.2.2 Resultados y discusiones**

**2.2.2.1 Liofilización.** Los cultivos fúngicos son congelados mediante la caída de la temperatura hasta - 50 °C y una baja presión. Debe evitarse la cristalización intracelular, por lo que se regula la velocidad de enfriamiento, la cual depende del tamaño de la célula y del grosor de la pared celular (Homolka, 2014).

Posteriormente, los cultivos son deshidratados por la sublimación del hielo, hasta que el contenido de agua se reduzca a menos del 5%, mediante un aumento leve de la temperatura y de la presión, evitándose la fase líquida (Homolka, 2014). En la figura 2.6 se observa cómo quedan las muestras luego de la liofilización.



Figura 2.6 Cepas de *A. fuscosuccinea* liofilizadas

Durante la liofilización, los componentes celulares del hongo juegan un papel clave, verbigracia: las proteínas de la membrana protegen a la célula contra la desnaturalización durante el enfriamiento lento, y los sacáridos celulares previenen la transición del citoplasma al estado líquido (Homolka, 2014).

Los parámetros de operación utilizados para la liofilización de las muestras fúngicas en este experimento, se muestran en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Condiciones de liofilización de la cepa de *Auricularia spp.*

Paso	Tratamiento térmico			Secado primario		
	T (°C)	t (min)	P (atm)	T (°C)	t (min)	P (atm)
1	15	60	200	-40	120	300

Paso	Tratamiento térmico			Secado primario		
	T (°C)	t (min)	P (atm)	T (°C)	t (min)	P (atm)
2	0	60	200	-30	120	300
3	-10	60	200	-20	120	300
4	-15	60	200	-10	120	300
5	-20	60	200	0	120	300
6	-30	60	200	10	120	300
7	-40	60	200	20	120	300
8	-50	60	200	30	120	300

Donde;

T = Temperatura

t = tiempo

P = Presión

La liofilización es un método de preservación altamente exitoso para cultivos fúngicos esporulados, por lo que no es normalmente un candidato para la conservación de basidiomicetes de la madera, como *Auricularia spp.*, ya que estos hongos no forman propágulos resistentes. Por ello, se recomienda adicionar un crioprotector al medio; se reporta que la trehalosa muestra resultados eficaces en la preservación de la viabilidad de los cultivos no esporulados (Homolka, 2014).

Pese a la necesidad de adicionar crioprotectores en algunos casos, la liofilización es junto con la criopreservación a -80 °C, un método de conservación permanente de cepas fúngicas

muy exitoso, escogido por defecto en las colecciones microbianas. Es preferido por encima de los métodos convencionales de conservación de cultivos no esporulados, tales como la transferencia periódica o subcultivo, ya que tales métodos presentan el riesgo de provocar variación o pérdida de propiedades fisiológicas y/o características morfológicas del hongo (Voyron et al., 2009). No obstante, la liofilización requiere de equipo especializado y costoso, consume tiempo y es complicado (Homolka, 2014; Hu et al., 2014).

**2.2.2.2 Control de parámetros de operación.** Los parámetros de operación se controlan con un controlador específico para el equipo liofilizador, el Wizard 2.0, visualizado en las figuras 2.7 y 2.8.

El controlador Wizard 2.0 está diseñado para satisfacer los requisitos de liofilización de una amplia gama de usuarios finales. El sistema de control utiliza un programa de software PICBASIC, un paquete de hardware personalizado y un microprocesador integrado para proporcionar una automatización completa del proceso, gestión de receta y alarma.

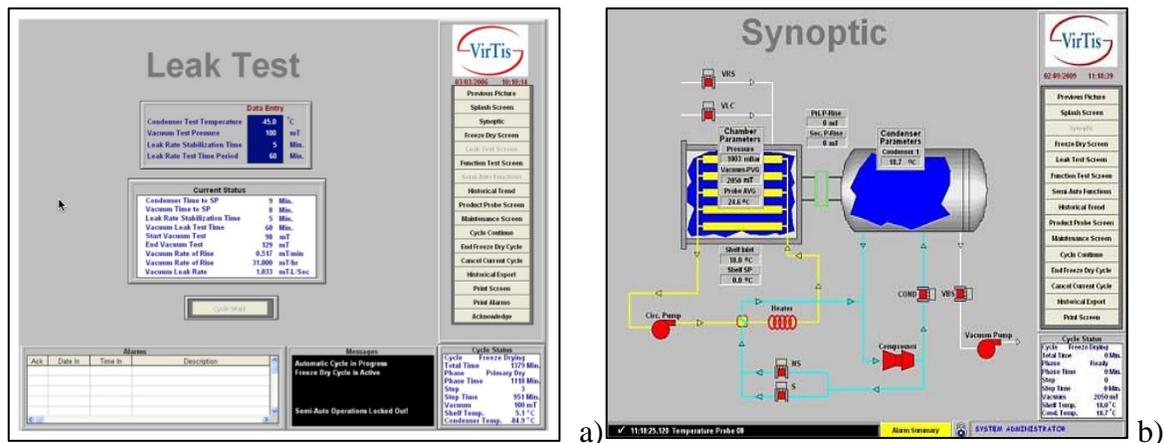


Figura 2.7. Menú de entrada (a) y panel de procesos (b) del Wizard 2.0 en el computador.



Figura 2.8 Panel de visualización del controlador en el liofilizador.

**2.2.2.3 Conservación de cepas.** Los picos de flauta o ampollitas, que contienen los cultivos liofilizados, deben sellarse al vacío, porque el oxígeno en el sistema causará pérdida de viabilidad; posteriormente deben almacenarse, lo cual puede darse a temperatura ambiente, aunque se considera preferible almacenar a 4 °C (Homolka, 2014).

Algunas ventajas de las cepas fúngicas liofilizadas es que pueden almacenarse en un lugar pequeño, no requieren mantenimiento y puede enviarse sin requisitos especiales. Además, los aislamientos están protegidos contra la infección y la infestación (Voyron et al., 2009).

## 2.3 Determinación de la velocidad de crecimiento de la cepa nativa de *Auricularia fuscosuccinea*

El objetivo de este experimento es seleccionar el mejor medio de cultivo para la producción de la cepa nativa del hongo *Auricularia fuscosuccinea* a partir de cepa liofilizada.

### **2.3.1 Materiales y métodos**

**2.3.1.1 Cepa.** Se empleó la cepa liofilizada de *Auricularia fuscosuccinea* ceba-iiemp-010116, perteneciente al Banco de Recursos Genéticos Microbianos (BRGM) del Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA); la cual fue aislada, caracterizada e identificada en experimentos anteriores.

**2.3.1.2. Medio de cultivo.** Se emplearon los medios de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) y Agar Extracto de Malta (MEA, por sus siglas en inglés) de la marca FUNGI PERFECTI®.

**2.3.1.3 Equipos.** Se empleó una cámara de flujo laminar diseñada por el CEBA a partir de un filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air) H14 EN-1822-1.

**2.3.1.4 Diseño experimental.** Se realizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), con cinco réplicas por tratamiento para un total de 10 corridas. Como factor de estudio se seleccionó el medio de cultivo (MEA y PDA), como variable de respuesta la velocidad de crecimiento de la cepa liofilizada y como factor de ruido el nivel de luz. Los parámetros de operación fueron: la temperatura a 22°C, el tiempo de incubación de 6 , que se mantuvieron constantes durante el desarrollo del experimento. El experimento fue realizado en un solo bloque, con un nivel de confianza del 95 % y 9 grados de libertad. Se realizó un Análisis De Varianza (ANOVA), empleando el paquete estadístico STATGRAPHIS®, Centurion XV, versión 15.2.05.

**2.3.1.5 Preparación de cepas de trabajo.** Se prepararon los medios de cultivo MEA y PDA siguiendo la técnica descrita por Pineda, Soto, Santiago, Ponce y Reyes (2015); se esterilizaron y se sirvieron en cajas Petri. Luego de enfriarse fueron inoculados con la cepa liofilizada de *A. fuscosuccinea* e incubados a 22 °C durante 6 días.

**2.3.1.6 Velocidad de crecimiento.** Las medidas del radio de la colonia se tomaron con un metro, como muestra la figura 2.9.



Figura 2.9 Medición del halo de crecimiento a la colonia.

La ecuación 1 permitió calcular la velocidad de crecimiento radial de la cepa liofilizada en los diferentes medios de cultivo, la cual se expresó como milímetros por día (mm/día).

$$V \left( \frac{\text{mm}}{\text{día}} \right) = \frac{\text{radio promedio de la colonia (mm)}}{6 \text{ días}} \quad (1)$$

## 2.3.2 Resultados y discusiones

**2.3.2.1 Velocidad de crecimiento.** En la tabla 2.3 se presenta la matriz de resultados experimentales, que relaciona la velocidad de crecimiento de la cepa liofilizada de *A. fuscosuccinea* en los respectivos medios de cultivo.

Tabla 2.3. Velocidad de crecimiento de la cepa liofilizada en diferentes medios de cultivo.

Tratamiento	Medio	Crecimiento radial (mm)	Velocidad radial (mm/día)
1	MEA	43	7,1
2	PDA	37	6,2

3	PDA	37	6,2
4	PDA	38	6,4
5	PDA	38	6,4
6	MEA	44	7,3
7	PDA	37	6,2
8	MEA	42	7,0
9	MEA	44	7,3
10	MEA	44	7,3

---

Los resultados experimentales sobre el crecimiento radial, se calculó a partir del crecimiento radial promedio medido en mm.

Según estos resultados, los tratamientos 6, 9 y 10 presentan la mayor velocidad de crecimiento de la cepa liofilizada, con 7,3 mm/día en cada caso. Por tanto, el medio de cultivo que favorece el crecimiento de la cepa *ceba-iie-mp-010116* bajo las condiciones experimentales de este trabajo es el MEA; se desconoce si es porque presenta mejores condiciones nutricionales que el PDA o induce el crecimiento del micelio. Sin embargo, estos datos no son concluyentes como para afirmar que el MEA es el medio óptimo para el crecimiento micelial de *A. fuscusuccinea*, ya que la dispersión, entendida como la variación de los datos con respecto a la media aritmética, es mayor en MEA que en PDA, según la tabla 2.4.

Tabla 2.4 *Resumen estadístico para la velocidad de crecimiento.*

	<b>Medio</b>	<b>Recuento</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación</b>	<b>Coefficiente de</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Rango</b>
			<b>Estándar</b>	<b>Variación</b>				
MEA	5	7,2	0,14	1,96%	7,0	7,3	0,3	
PDA	5	6,28	0,11	1,74%	6,2	6,4	0,2	

Carreño-Ruiz y colaboradores (2014) cultivaron *A. Fuscosuccinea* en diferentes medios de agar para su caracterización morfológica luego del aislamiento y obtuvieron velocidades de crecimiento superiores en PDA que en MEA; aunque las cepas no habían sido sometidas a liofilización, a diferencia de este trabajo, lo que probablemente causó las discrepancias. Aunque, algunos autores sostienen que la influencia de la liofilización en la supervivencia de los hongos no es estadísticamente significativa, siempre y cuando se sigan los protocolos adecuados (Singh, Upadhyay, Yadav, & Tiwari, 2004; Singh, Yadav, & Rai, 2007).

En el trabajo de Carreño-Ruiz y colaboradores (2014), las velocidades de crecimiento en PDA son similares a las de este trabajo, alrededor de 6 mm/ día, caso contrario a las velocidades de crecimiento en MEA que corresponden a aproximadamente 4 mm/ día, a una temperatura de

26°C, casi tres unidades inferiores a las de este trabajo. Por otra parte Niño, Peña, Enoa (2017) el obtuvieron crecimiento micelial a 22°C de 6,2 de diámetro en EME y 5,7 cm en EM, PDAE (4,1 cm) y PDA (1,3 cm), condiciones similares al del presente trabajo a la misma temperatura pero a una evaluación a 18 días de incubación, teniendo como resultado que en MEA presenta mayor crecimiento micelial que en PDA.

**2.3.2.2 Análisis De Varianzas.** Los ANOVA evalúan la importancia de uno o más factores al comparar las medias de la variable de respuesta en los diferentes niveles de los factores. Se plantearon las siguientes hipótesis: nula ( $H_0$ ):  $\mu_{\text{medio 1}} = \mu_{\text{medio 2}}$  y alternativa ( $H_A$ ):  $\mu_{\text{medio 1}} \neq \mu_{\text{medio 2}}$ . En la tabla 2.5 se muestra el Análisis De Varianzas, que compara las medias de la velocidad de crecimiento en los diferentes medios de cultivo.

*Tabla 2.5 ANOVA para la Velocidad de crecimiento.*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	2,16	1	2,16	132,25	0,0000
Intra grupos	0,18	8	0,06		

Como el valor-p (nivel de significación del estadístico F) es menor que 0,05 se acepta la hipótesis nula, según la cual las medias de la variable de respuesta entre los dos grupos son iguales; lo que implica que los distintos niveles del factor producen efectos diferentes en la variable de respuesta. Se puede decir con un nivel de confianza del 95 % que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la velocidad de crecimiento de la cepa ceiba-iie-mp-010116 en los medios de cultivo estudiados (MEA y PDA).

Por otro lado, la razón-F es igual a 132,25 y manifiesta que la variación de las medias de la velocidad de crecimiento entre los grupos es grande, en contraste con la variación de dichas medias *dentro* de los grupos.

**2.3.2.3 Prueba de medias.** En la tabla 2.6 se presenta la tabla de medias, que muestra la media de Velocidad para cada nivel del Medio de cultivo, lo que se representa a su vez en la figura 2.10. También muestra el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad de su muestreo. El error estándar es el cociente entre la Desviación Estándar (S) agrupada y el número de observaciones en cada nivel. La tabla también muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la Diferencia Mínima Significativa (LSD) de Fisher; están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95,0% de las veces. En las Pruebas de Rangos Múltiples, estos intervalos se usan para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

*Tabla 2.6. Medias para Velocidad por Medio con intervalos de confianza del 95,0%*

<b>Medio</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>(s agrupada)</b>	<b>Límite Inferior</b>	<b>Límite Superior</b>
MEA	5	7,2	0,057	7,11	7,29
PDA	5	6,28	0,057	6,19	6,37

En el siguiente grafico se presenta las medias y se puede determinar que no existe solapamiento entre los intervalos de las medias, lo que significa que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la velocidad de crecimiento de la cepa en los medios de cultivo estudiados (MEA y PDA). Se establece las barras de error, mismas que se refieren a medidas de dispersión o la incertidumbre de un valor.

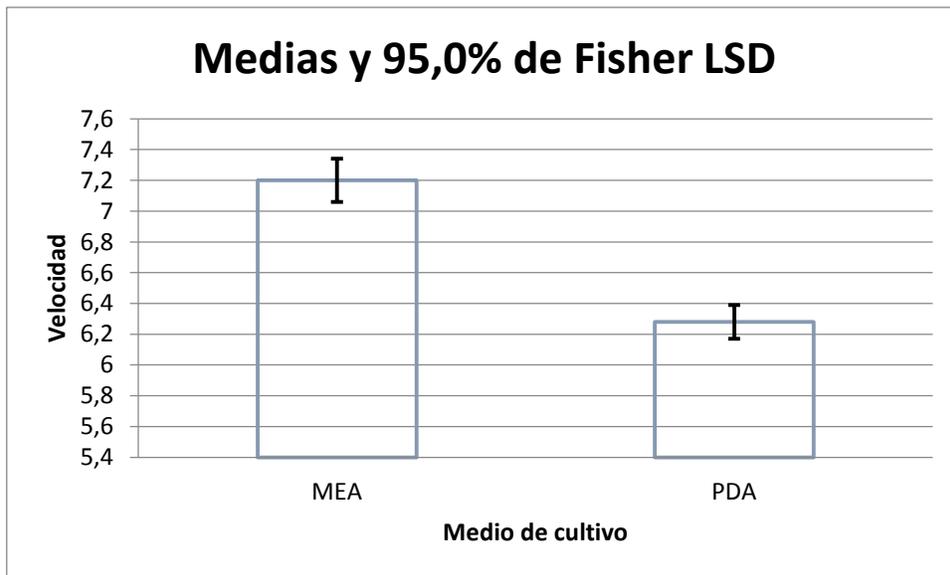


Figura 2.10 Gráfico de medias para velocidad

**2.3.2.4 Pruebas de Rangos Múltiple para Velocidad por Medio (95,0 % LSD).** En la tabla 2.7 se presenta la prueba de rangos múltiples, que aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

Tabla 2.7. Prueba de rangos múltiples Método: 95,0 porcentaje LSD

Medio	Casos	Media	Grupos Homogéneos
PDA	5	6,28	X
MEA	5	7,2	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
MEA - PDA	*	0,92	0,184481

\* indica una diferencia significativa.

En la parte superior de la salida, se evidencian dos grupos homogéneos que, según la alineación de las X's en columnas, presentan diferencias estadísticamente significativas, con un riesgo del 5,0%. En la parte inferior de la salida se muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco colocado junto al par indica con un nivel del 95,0% de confianza, que existen diferencias estadísticamente significativas.

## **2.4 Diseño de un catálogo de cepas microbianas puras de *Auricularia spp.***

### **Para su conservación en el banco de recursos genéticos microbianos (BRGM)**

El objetivo de este acápite es realizar un catálogo de cepas microbianas puras de *Auricularia spp* para conservar la riqueza genética del país y contribuir a la investigación de diferentes organismos microbiológicos. En un Banco de Recursos Genéticos Microbianos especializado para el hongo *Auricularia fuscosuccinea*.

#### **2.4.1 Registro para banco de recursos genéticos**

Para garantizar la trazabilidad y conservación de las cepas en el BRGM, se propone el formato mostrado en la figura 2.9:



Figura 2.12. Protocolo para el establecimiento de un BRGM para *Auricularia spp.*

**Recolección.** Si bien se mencionó en el capítulo 1, los carpóforos se colectan de acuerdo con las características macroscópicas propias del género, y se transportan hasta el laboratorio de propagación in vitro, evitando la contaminación cruzada con esporas de otros géneros de hongos.

**Aislamiento.** Un trozo de tejido interno del hongo se deposita en una caja de Petri con agar antibiótico y se purifican tras repiques sucesivo.

**Identificación.** Los hongos se identifican en primera medida taxonómicamente y en segunda instancia genéticamente, debido al diferencial de precios entre un método y otro.

**Caracterización.** Una vez identificada la especie, se pueden asignar usos potenciales a la cepa, conforme a sus características fisicoquímicas y bioquímicas, ello incluye desde el análisis bromatológico para conocer el contenido nutricional del cuerpo fructífero, hasta el de actividad biológica y/o enzimática.

**Codificación y liofilización.** Un código para el almacenamiento de las cepas en un BRG, permite controlar existencias, clasificar cepas de acuerdo a sus características y facilitar su trazabilidad. Por su parte, la liofilización es un método de conservación de cepas adecuado para su almacenamiento en el BRG.

**Registro y control de cepas.** Cada uno de los tratamientos realizados a las cepas ha de ser reportado en los respectivos registros, para controlar el estado de las cepas. Se recomienda seguir el registro mostrado en la figura 2.9

**Aprovechamiento.** Las cepas probadas a nivel laboratorio tienen alto potencial para su uso a escala piloto e industrial. Sólo resta realizar pruebas de escalado para mantener los rendimientos.

## CONCLUSIONES

- El aislamiento, identificación y caracterización del hongo nativo *Auricularia fuscosuccinea*. es un paso importante para el proceso de cultivo, producción, uso y supervivencia de los hongos silvestres de esta especie, que son recursos fúngicos importantes para la comunidad la Joya, parroquia Jacinto Jijón y Caamaño, cantón Mira, provincia del Carchi, con lo que se puede generar formas de aprovechamiento sostenible de residuos lignocelulosos del sector como parte integral de los bosques, *Auricularia fuscosuccinea*. es una especie de gran importancia a nivel local. En este trabajo se identificó condiciones de desarrollo de la cepa en medios de cultivo in vitro. lo cual representa un aporte al desarrollo científico y tecnológico en el campo de la conservación de los recursos genéticos microbianos del Ecuador.
- Se diseñó un catálogo específico de las cepas puras de *Auricularia fuscosuccinea* nativa ecuatorina, que permite incrementar el conocimiento sobre la biodiversidad fúngica del país

## RECOMENDACIONES

- Aislar, identificar y caracterizar nuevas especies nativas del género *Auricularia spp.* que permita incrementar el patrimonio del banco de recursos genéticos microbianos (BRGM).
- Realizar el escalado de la tecnología a los niveles de banco y piloto, para consolidar el Know How.

## REFERENCIAS

- Abd Razak, D. L., Abdullah, N., Khir Johari, N. M., & Sabaratnam, V. (2013). Comparative study of mycelia growth and sporophore yield of *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc on selected palm oil wastes as fruiting substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(7), 3207–3213. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4135-8>
- Acción Ecológica. (2013). El Protocolo de Nagoya, la mercantilización de la biodiversidad y los conocimientos tradicionales. Retrieved from <http://www.accionecologica.org/editoriales/1708-el-protocolo-de-nagoya-la-mercantilizacion-de-la-biodiversidad-y-los-conocimientos-tradicionales>
- Adejumo, T. O. (2015). Qualitative Determination of Lignocellulolytic Enzymes in Eight Wood-Decomposing Fungi. *Journal of Natural Sciences Research*, 5(14), 1–8. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/283438797\\_Qualitative\\_Determination\\_of\\_Lignocellulolytic\\_Enzymes\\_in\\_Eight\\_Wood-Decomposing\\_Fungi](https://www.researchgate.net/publication/283438797_Qualitative_Determination_of_Lignocellulolytic_Enzymes_in_Eight_Wood-Decomposing_Fungi)
- Adenipekun, C. ., Lawal, R., & Isikhuemhen, O. . . (2015). Effect of growth supporting additives on the performance of *Auricularia auricula* on *Mansonia altissima* A . chev sawdust. *International Food Research Journal*, 22(5), 2167–2173.
- Aidoo, K. E., Hendry, R., & Wood, B. J. B. (1981). Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 12(1), 6–9. <https://doi.org/10.1007/BF00508111>
- Ainsworth, G. C. (2008). *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi* (10th ed.). UK: Cabi.

- Álvarez-gutiérrez, P. E., Corzo-gonzález, Z., Yolanda, Y., Chiapas, P. De, Eduardo, C., & Col, J. S. S. N. (2014). Actividades Enzimáticas de Hongos para el Pre-tratamiento de Residuos Lignocelulósicos. *BioTecnología*, 18(3), 11–29.
- Ames de Icochea, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. Lima, Perú: International Potato Center.
- Antoniou, T., Ehaliotis, C., Panopoulos, N., & Zervakis, G. (2002). Comparative evaluation of white-rot fungi as bioremediation agents of olive-mill waste waters. In A. N. Angelakis, K. P. Tsagarakis, N. V. Paranychiakis, & T. Asano (Eds.), *Regional Symposium on Water Recycling in Mediterranean Region* (pp. 417–424). Heraklion, Greece: NAGREF. Retrieved from <http://library.certh.gr/libfiles/PDF/GEN-PAPYR-5841-COMPARATIVE-by-ANTONIOU-in-IWA-RSWRMR-HERAKLEIO-CRE-SEP-26-29-V-1-PP-417-424-Y-2002.pdf>
- Anupama, & Ravindra, P. (2000). Value-added food: Single cell protein. *Biotechnology Advances*, 18(6), 459–479. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00045-8](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00045-8)
- Ardón López, C. E. (2007). *La producción de los hongos comestibles*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Arun, P. R., & Azeez, P. A. (2004). Development of a novel lyophilization protocol for preservation of mushroom mycelial cultures. *Current Science*, 87(5), 568–570.
- Asamblea Nacional. Constitución de la República del Ecuador, Pub. L. No. Registro Oficial 449, 218 (2008). Quito-Ecuador. Retrieved from [http://www.asambleanacional.gov.ec/documentos/constitucion\\_de\\_bolsillo.pdf](http://www.asambleanacional.gov.ec/documentos/constitucion_de_bolsillo.pdf)
- Asamblea Nacional. República de Ecuador. Código Orgánico de la Economía Social de los

Conocimientos, Creatividad e Innovación (2016).

Asociación Micológica Fungipedia. (n.d.). Fungipedia. Retrieved from <https://www.fungipedia.org/>

Belur, P., & Mugeraya, G. (2011). Microbial Production of Gibberellins : State of the Art. *Research Journal of Microbiology*, 6(1), 25–40. <https://doi.org/10.3923/jm.2011.25.40>

Blackburn, H. D., & Boettcher, P. J. (2010). Options and legal requirements for national and regional animal genetic resource collections. *Animal Genetic Resources*, 47, 91–100. <https://doi.org/10.1017/S2078633610000998>

Bolaños, A. C., & Soto, E. (2011). Macrohongos Comestibles Y Medicinales Comunes En La Vegetación De La Universidad Del Valle, Colombia. *Revista De Ciencias*, 15, 31–38.

Borromeo, J. D. (1967). Some physiological responses and characteristics of *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc. in laboratory culture. *Phil. Agric*, 51(6), 486–500. Retrieved from <http://eurekamag.com/research/014/675/014675575.php>

Bosmans, J. (1974). Ten years lyophilization of pathogenic fungi. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 3, 13–23.

Buell, C. B., & Weston, W. H. (1947). Application of the Mineral Oil Conservation Method to Maintaining Collections of Fungous Cultures. *American Journal of Botany*, 34(10), 555–561. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/2437337>

Bueno, L., & Gallardo, R. (1998). Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Revista Iberoamericana de Micología*, 5, 166–168.

Calero, C. J. (2011). *Seguridad Alimentaria en Ecuador Desde un Enforque de Acceso a*

- Alimentos*. Quito: Flacso-Sede Ecuador, Abya - Yala. Retrieved from <http://www.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/52065.pdf>
- Capone, R., El Bilali, H., Debs, P., Cardone, G., & Driouech, N. (2014). Food System Sustainability and Food Security: Connecting the Dots. *Journal of Food Security*, 2(1), 13–22. <https://doi.org/10.12691/jfs-2-1-2>
- Carmichael, J. W. (1956). Frozen Storage for Stock Cultures of Fungi. *Mycologia*, 48(3), 378–81. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/3755355>
- Carrasco, F., & Manosalvas, M. (2015). *Informe de la revisión estratégica (IRE) de la seguridad alimentaria y nutricional en Ecuador*. Quito.
- Carreño-Ruiz, S. D., Cappello-García, S., Gaitán-Hernández, R., & Edmundo, J. C.-B. (2014). Crecimiento de tres hongos comestibles tropicales en medios de cultivo y residuos agrícolas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(8), 1447–1458.
- Chai, H., Wang, L., He, L., Zhao, J., Li, Q., & Zhao, Y. (2012). Research on the Bioaccumulation Characteristics to Cd of Mycelia and Fruiting Bodies of *Auricularia auricularia-judae* Strains. *Edible Fungi in China*. Retrieved from [http://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTOTAL-ZSYJ201205022.htm](http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-ZSYJ201205022.htm)
- Chang, S.-T., & Miles, P. G. (1987). Historical record of the early cultivation of *Lentinus* in China. *Mushroom Journal of the Tropics*, 7, 31–37.
- Chang, S.-T., & Miles, P. G. (2004). *Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*. (Eds., Ed.) (2nd ed.). Florida: CRC Press.
- Chang, S.-T., & Quimio, T. H. (1982). *Tropical mushrooms: biological nature and cultivation*

- methods*. (Eds., Ed.) (1st ed.). Hong Kong: Chinese University Press.
- Cheng, S., & Tu, C. C. (2013). *Auricularia* spp. In S. Chang & W. A. Hayes (Eds.), *The biology and cultivation of edible mushrooms* (pp. 605–624). New York: Academic Press.
- Cheung, P. C. K. (1996). The hypocholesterolemic effect of two edible mushrooms: *Auricularia auricula* (tree-ear) and *Tremella fuciformis* (white jelly-leaf) in hypercholesterolemic rats. *Nutrition Research*, *16*(10), 1721–1725.  
[https://doi.org/10.1016/0271-5317\(96\)00191-1](https://doi.org/10.1016/0271-5317(96)00191-1)
- Chung, K.-R., & Tzeng, D. D. (2009). Thiamine (Vitamin B1) plays a critical role on sugar utilisation by the phytopathogenic fungus, *Ustilago esculenta*. *Research Journal of Microbiology*, *4*(4), 178–185.
- Comisión de recursos genéticos para la alimentación y la agricultura, & Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura -FAO-. (2011). *Segundo plan de acción mundial para los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura*.
- Comunidad de Estados Latinoamericanos y Caribeños [CELAC]. (2015). *Plan para la seguridad alimentaria, nutrición y erradicación del hambre 2025*. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-i4493s.pdf>
- Corporación Andina de Fomento. (2007). *Biocomercio en la subregión andino: oportunidad para el desarrollo*. Corporación Andina de Fomento. Retrieved from <http://site.ebrary.com/lib/utnortesp/detail.action?docID=10174166>
- Crueger, W., & Crueger, A. (1993). *Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial*. Zaragoza: ACRIBIA S.A.

- DENAREF. (2011). Departamento Nacional de Recursos fitogenéticos: misión, visión, objetivos, actividades. Documento de difusión. Retrieved from <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2660>
- Doyle, J., & Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material. *Phytochemical Bulletin*, *19*, 8–15.
- Du, P., Cui, B.-K., & Dai, Y.-C. (2011). High genetic diversity in wild culinary-medicinal wood ear mushroom, *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc., in tropical China revealed by ISSR analysis. *Int J Med Mushrooms*, *13*(3), 289–297.
- Du, P., Cui, B. K., Zhang, C. F., & Dai, Y. C. (2013). Genetic diversity of wild *Auricularia auricula-judae* revealed by ISSR analysis. *Biochemical Systematics and Ecology*, *48*, 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.11.011>
- Dunham, S. M., O'dell, T. E., & Molina, R. (2003). Analysis of nrDNA sequences and microsatellite allele frequencies reveals a cryptic chanterelle species *Cantharellus cascadensis* sp. nov. from the American Pacific Northwest. *Mycological Research*, *107*(10), 1163–1177. <https://doi.org/10.1017/S0953756203008475>
- Ecuador. Reglamento Nacional de Aplicación de la Decisión 391 sobre Acceso a los Recursos Genéticos. Registro Oficial 553 de 11 de octubre de 2011. (2011).
- Fan, L., Zhang, S., Yu, L., & Ma, L. (2007). Evaluation of antioxidant property and quality of breads containing *Auricularia auricula* polysaccharide flour. *Food Chemistry*, *101*(3), 1158–1163. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.017>
- Fan, X. Z., Zhou, Y., Xiao, Y., Xu, Z. Y., & Bian, Y. B. (2014). Cloning, expression and phylogenetic analysis of a divergent laccase multigene family in *Auricularia auricula-*

judae. *Microbiological Research*, 169(5–6), 453–462.  
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.08.004>

Fazenda, M. L., Seviour, R., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2008). Submerged Culture Fermentation of “Higher Fungi”: The Macrofungi. *Advances in Applied Microbiology*, 63, 33–103. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(07\)00002-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(07)00002-0)

Ferreti-de-Lima, R., & De-Moraes-Borba, C. (2001). Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserved by different methods. *Revista Iberoamericana de Micología*, 18(4), 191–196.

Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. (n.d.). Perfil de fréjol en el Ecuador. Citado por Carvajal, A. (2012) Rentabilidad de cuatro variedades y cinco líneas promisorias de fréjol voluble en dos sistemas de cultivo (espaldera y asocio con maíz), bajo manejo orgánico [Tesis de grado]. Escuela Superior. Retrieved from <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2202/1/13T0747> CARVAJAL ADELA.pdf

Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. (2015a). Mapa del hambre 2015 de la FAO. Retrieved from <http://www.fao.org/hunger/es/>

Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. (2015b). *Panorama de la Inseguridad Alimentaria en América Latina y el Caribe*.

Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], Fondo Internacional de Desarrollo Agrícola [FIDA], & Programa Mundial de Alimentos [PMA]. (2015). *El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo 2015. Cumplimiento de los objetivos internacionales para 2015 en relación con el hambre: balance de los desiguales*

*progresos*. Roma. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-i4646s.pdf>

Freire Fierro, A. (2004). *Botánica Sistemática Ecuatoriana*. St. Louis: Missouri Botanical Garden Press ix.

Furukawa, T. (2014). Method for producing auricularia auricula-judae. Japon. Retrieved from <https://patents.google.com/patent/JP2014140309A/en?q=auricularia&q=culture&q=substrate&q=bagasse>

García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L., Cruz-Guerrero, A. E., & Bárzana, E. (2014). Single Cell Protein | Yeasts and Bacteria. In *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 431–438). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00310-4>

García, M. D., & Uruburu, F. (2000). La conservación de cepas microbianas. *Actualidad SEM*, 30(1), 12–16. Retrieved from [https://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/SEM30\\_12.pdf](https://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/SEM30_12.pdf)

GenBank. (2013). Auricularia fuscusuccinea isolate TFB11532 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 25S ribosomal RNA gene, partial sequence. Accesoión JX065. Retrieved from [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/408832090?report=genbank&log\\$=nucltop&blast\\_rank=1&RID=B0ATP8CA014](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/408832090?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=B0ATP8CA014)

Ghorai, S., Banik, S. P., Verma, D., Chowdhury, S., Mukherjee, S., & Khowala, S. (2009). Fungal biotechnology in food and feed processing. *Food Research International*, 42(5–6), 577–587. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.019>

Global Economy and Development. (2015). Ending Rural Hunger [ERH]: Mapping needs and

actions for food and nutrition security. Retrieved from <https://endingruralhunger.org/data/map/>

Global Index Hunger [GIH]. (2015). GIH scores 2015. Retrieved from <http://ghi.ifpri.org/>

Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., ... Toulmin, C. (2010). Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science*, 327(5967), 812–818.

Guzmán, G., Mata, G., Dulce, S., Soto-Velazco, C., & Guzmán-Dávalos, L. (1993). *El Cultivo De Los Hongos Comestibles: con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agroindustriales* (1st ed.). Xalapa, Veracruz: Instituto Politécnico Nacional. Retrieved from <http://mushroomtime.org/wp-content/uploads/2014/06/07-El-cultivo-de-los-hongos-comestibles-GUZMAN-G-INECOL-.pdf>

Guzmán, G., Mata, G., Dulce, S., Soto-Velazco, C., Guzmán-Dávalos, L., & Guzmán Gastón, Mata Gerardo, Salmones Dulce Soto Velazco Conrado Guzmán Davalos, L. (1993). *El cultivo de los hongos comestibles: con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agroindustriales*. (I. P. Nacional, Ed.) (1st ed.). México: Instituto Politécnico Nacional. Retrieved from <http://mushroomtime.org/wp-content/uploads/2014/06/07-El-cultivo-de-los-hongos-comestibles-GUZMAN-G-INECOL-.pdf>

Hawksworth, D. L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, 95(6), 641–655. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80810-1](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80810-1)

- Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1· 5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105(12), 1422–1432. <https://doi.org/10.1017/S0953756201004725>
- Hiromoto, B. T. (1992). Substrate and method for culture of fungi, including shiitake (*lentinus edodes*). Francia. Retrieved from <https://patents.google.com/patent/EP0504142A1/en?q=auricularia&q=culture&q=substrate>
- Homolka, L. (2014). Preservation of live cultures of basidiomycetes - Recent methods. *Fungal Biology*, 118(2), 107–125. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.12.002>
- Hoog, de G. S., Guarro, J., Gené, J., & Figueras, M. J. (2000). *Atlas of Clinical Fungi* (2nd ed.). Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).
- Hoogland, C. T., de Boer, J., & Boersema, J. J. (2005). Transparency of the meat chain in the light of food culture and history. *Appetite*, 45(1), 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2005.01.010>
- Hu, X., Webster, G., Xie, L., Yu, C., Li, Y., & Liao, X. (2014). A new method for the preservation of axenic fungal cultures. *Journal of Microbiological Methods*, 99(1), 81–83. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.02.009>
- INIA. (2017). Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos (CChRGM). Retrieved from <http://www.cchrgm.cl/>
- Instituto Ecuatoriano de la Propiedad Intelectual. (2016). *Primer Informe sobre Biopiratería en el Ecuador*. Quito.

- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos [INEC]. (2015). *Informe de resultados ECV 2013-2014*. Quito.
- Irawati, D., Hayashi, C., Takashima, Y., WEDATAMA, S., ISHIGURI, F., IIZUKA, ... YOKOTA., S. (2012). Cultivation of the edible mushroom *Auricularia polytricha* using sawdustbased substrate made of three Indonesian commercial plantation species, *Falcataria moluccana*, *Shorea sp.*, and *Tectona grandis*. *Micología Aplicada International*, 24(2), 33–41.
- Isikhuemhen, O. S., Okhuoya, J. A., Ogboe, E. M., & Akpaja, E. (1999). Effect of substrate supplementation with nitrogen, phosphorus, potassium (NPK) fertilizer on sporophore yield in *Pleurotus tuber-regium*. *Micología Neotropical Aplicada*, 12, 9–21.
- Ji, H., Li, Z., & Zheng, L.-X. (2010). Optimization of Submerged-fermentation Processing of Mycelia from *Auricularia polytricha*. *Food Science*, 31(23), 204–209. Retrieved from [http://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTOTAL-SPKX201023047.htm](http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-SPKX201023047.htm)
- Khalil, M. I., Hoque, M. M. M. M., Basunia, M. A., Alam, N., & Khan, M. A. M. A. (2011). Production of cellulase by *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* in solid state fermentation of lignocellulosic biomass. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35(4), 333–341. <https://doi.org/10.3906/tar-1002-684>
- Khaskheli, S. G., Zheng, W., Sheikh, S. A., Khaskheli, A. A., Liu, Y., Soomro, A. H., ... Huang, W. (2015). Characterization of *Auricularia auricula* polysaccharides and its antioxidant properties in fresh and pickled product. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 387–395. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.020>
- Kobayashi, Y. (1981). The genus *Auricularia*. *Bull. Natl. Sci. Mus. Tokyo B*, 7, 41–67.

- Kumar, D., Jain, V. K., Shanker, G., & Srivastava, A. (2003). Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. *Process Biochemistry*, 38(12), 1731–1738. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00252-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00252-2)
- Leal, Sánchez, L. C., & Corrales Ramírez, L. C. (2005). Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. *Nova*, 3(3).
- Li, B., & Dong, M. (2010). Inhibition effect of extract from *Auricularia auricular* on quorum sensing and biofilm formation of bacteria. *Food Science*, 31, 140–143. Retrieved from [http://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTotal-SPKX201009035.htm](http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotal-SPKX201009035.htm)
- Li, H., Kim, N., Jiang, M., Won, J., & Nam, H. (2009). Bioresource Technology Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic residues pretreated with phosphoric acid – acetone for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 100(13), 3245–3251. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.021>
- Li, L., Li, J., Zou, L., Bai, S. Y., Niu, L. M., & Ma, Y. K. (2007). RAPD analysis of genetic diversity of nine strains of *Auricularia auricular* cultivated in Heilongjiang Province. *Journal of Forestry Research*, 18(2), 136–138. <https://doi.org/10.1007/s11676-007-0027-7>
- Looney, B. P., Birkebak, J. M., & Matheny, P. B. (2013). Systematics of the genus *Auricularia* with an emphasis on species from the southeastern United States. *North American Fungi*, 8(6), 1–25. <https://doi.org/10.2509/naf2013.008.006>
- Lou, L. H. (1982). Cultivation of *Auricularia* on logs in China. In S. T. Chang & T. H. Quimio (Eds.), *Tropical mushrooms-biological nature and cultivation methods* (1st ed., pp. 437–441). Hong Kong: Chinese University. Retrieved from

<https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=0luzyrBPARgC&oi=fnd&pg=PR19&dq=+Tropical+mushrooms.+Biological>

Lowy, B. (1951). A morphological basis for classifying the species of Auricularia. *Mycologia*, 43(3), 351–8. <https://doi.org/10.2307/3755598>

Lowy, B. (1952). The Genus Auricularia. *Mycologia*, 44(5), 656–692. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/4547639>

Lu, J. V., & Tang, A. V. (1986). Cellulolytic Enzymes and Antibacterial Activity of Auricularia polytricha. *Journal of Food Science*, 51(3), 668–669. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1986.tb13907.x>

Luo, X. C. (1993). Biology of Artificial log cultivation of Auricularia mushroom. In *Mushroom Biology and Mushroom Cultivation* (Chinese Un, Vol. 370, pp. 129–132). Hong Kong. Retrieved from [http://wsmbmp.org/proceedings/2nd\\_international\\_conference/Mushroom\\_Biology\\_and\\_Mushroom\\_Products\\_\(Green\\_book\)/13\\_Biology\\_of\\_Artificial\\_Log\\_Cultivation\\_of\\_Auricularia\\_Mushrooms.pdf](http://wsmbmp.org/proceedings/2nd_international_conference/Mushroom_Biology_and_Mushroom_Products_(Green_book)/13_Biology_of_Artificial_Log_Cultivation_of_Auricularia_Mushrooms.pdf)

Luo, X. C., Ye, L., Xu, X. F., Fee, W. W., Wei, Z., Lin, X., & Tasa, L. (2012). Auricularia Polytricha(Mont)Sacl fermentation product, oral preparation containing same, preparation method and application. China. Retrieved from <https://patents.google.com/patent/CN101524374B/en?q=auricularia&q=culture&q=substrate>

Luo, Y., Chen, G., Li, B., Ji, B., Guo, Y., & Tian, F. (2009). Evaluation of antioxidative and hypolipidemic properties of a novel functional diet formulation of Auricularia auricula and Hawthorn. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2), 215–221.

<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.06.004>

Lynch, J. (1987). Utilization of lignocellulosic wastes. *Journal of Applied Bacteriology*.

Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.1987.tb03613.x/abstract>

Ma, H., Xu, X., & Feng, L. (2014). Responses of antioxidant defenses and membrane damage to drought stress in fruit bodies of *Auricularia auricula-judae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(1), 119–124. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1416-z>

Ma, Z., Wang, J., Zhang, L., Zhang, Y., & Ding, K. (2010). Evaluation of water soluble  $\beta$ -d-glucan from *Auricularia auricular-judae* as potential anti-tumor agent. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 977–983. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.01.015>

Mane, V. P., Patil, S. S., Syed, A. A., & Baig, M. M. V. (2007). Bioconversion of low quality lignocellulosic agricultural waste into edible protein by *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. *Journal of Zhejiang University. Science B*, 8(10), 745–751. <https://doi.org/10.1631/jzus.2007.B0745>

Marín, P. (2016). Pruebas Microbiológicas Y Físico - Químicas Para El Control De Calidad De Hongos Entomopatógenos. *Control*, (March 2002), 1–18.

Matcham, S. E., Jordan, B. R., & Wood, D. A. (1984). Methods for assessment of fungal growth on solid substrates. *Technical Series-Society for Applied Bacteriology*. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301475638>

Mau, J.-L., Chao, G.-R., & Wu, K.-T. (2001). Antioxidant Properties of Methanolic Extracts from Several Ear Mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11),

5461–5467. <https://doi.org/10.1021/jf010637h>

Mena-Vásconez, P., Boelens, R., & Vos, J. (2016). Food or flowers? Contested transformations of community food security and water use priorities under new legal and market regimes in Ecuador's highlands. *Journal of Rural Studies*, *44*, 227–238. <https://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2016.02.011>

Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible. Decreto Número 3016 (27 de Diciembre) de 2013 (2013). Ecuador.

Montoya-Alvarez, A., Hayakama, H., Minamya, Y., Fukuda, T., López-Quintero, C., & Franco-Molano, A. (2011). Phylogenetic Relationships and Review of the Species of *Auricularia* ( Fungi : Basidiomycetes ) in Colombia. *Caldasia*, *33*(1), 55–66.

Moraes-Borba, de C., & Rodrigues, D. F. (2000). Viability and sporulating capability of Coelomycetes preserved under a range of different storage regimes. *Revista Iberoamericana de Micología*, *17*(4), 142–5.

Morales, G. E., Huerta-Palacios, G., & Sánchez-Vázquez, J. E. (2000). Production technology optimization for *Auricularia fuscusuccinea*. In L. J. L. D. (Van. . Griensven (Ed.), *Science and cultivation of edible fungi. Proceedings of the 15th International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi, Maastricht, Netherlands, 15-19 May, 2000*. (pp. 943–948). A.A. Balkema Publishers.

Moren, D. L. (1989). Method and article of manufacture for producing mushrooms from self contained vessels. Unuted States, Unuted States.

Mpulusu, S. D., Luyeye, F. L., de Kesel, A., & Degreef, J. (2010). Essais de culture de quelques champignons lignicoles comestibles de la région de kinshasa (R.D. Congo) sur

divers substrats lignocellulosiques. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, 14(3), 417–422.

Nair, V. (2011). Fermented soy nutritional supplements including mushroom components. United States. Retrieved from <https://patents.google.com/patent/US20110206721A1/en?q=auricularia&q=culture&q=agroindustrial>

Naraian, R., Sahu, R. K., Kumar, S., Garg, S. K., Singh, C. S., & Kanaujia, R. S. (2009). Influence of different nitrogen rich supplements during cultivation of *Pleurotus florida* on corn cob substrate. *Environmentalist*, 29(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s10669-008-9174-4>

Nguyen, T. L., Chen, J., Hu, Y., Wang, D., Fan, Y., Wang, J., ... Dang, B. K. (2012). In vitro antiviral activity of sulfated *Auricularia auricula* polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 90(3), 1254–1258. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.06.060>

Nguyen, T. L., Wang, D., Hu, Y., Fan, Y., Wang, J., Abula, S., ... Dang, B. K. (2012). Immuno-enhancing activity of sulfated *Auricularia auricula* polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 89(4), 1117–1122. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.082>

Nigam, P. S., & Singh, A. (2014). Single Cell Protein | Mycelial Fungi. In C. Batt & M. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 415–424). Reino Unido: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00311-6>

Oei, P. (1996). Environmental care: an integrated approach. *Mushroom Cultivation*, 38Y43.

Oliveira, J. A., Gonzáles, E., Costal, L., & Castro, P. (2013). ERSISTENCIA, PRODUCCIÓN

DE MATERIA SECA Y CALIDAD NUTRITIVA DEL RAIGRÁS INGLÉS INFECTADO CON UNA CEPA DE HONGO ENDOFITO EN EL CUARTO AÑO DE ENSAYO EN GALICIA. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Olsen, J., & Allermann, K. (2001). *La biomasa microbiana como fuente de proteína. Biotecnología básica*. (Biotecnolo). ACRIBIA S.A.

Onyango, B. ., Palapala, V. ., Arama, P. ., Wangai, S. ., & Gichimu, B. . (2011). Morphological characterization of Kenyan native wood ear mushroom [*Auricularia auricula* (L. ex Hook.) Underw.] and the effect of supplemented millet and sorghum grains in spawn production. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 2(3), 407–414. <https://doi.org/10.5251/abjna.2011.2.3.407.414>

Onyango, B. O., Palapala, V. A., Arama, P. F., Wagai, S. O., & Gichimu, B. M. (2011). Suitability of selected supplemented substrates for cultivation of kenyan native wood ear mushrooms (*Auricularia auricula*). *American Journal of Food Technology*, 6(5), 395–403. <https://doi.org/10.3923/ajft.2011.395.403>

Organización de las Naciones Unidas [ONU]. (1996). *Declaración de Roma sobre la seguridad alimentaria mundial y plan de acción de la cumbre mundial de la alimentación* (No. 338.19 C969d). Roma. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/003/w3613s/w3613s00.htm>

Organización de las Naciones Unidas [ONU]. (2015). *Objetivos de Desarrollo del Milenio: informe de 2015*. (C. Way, Ed.). Retrieved from [http://www.un.org/es/millenniumgoals/pdf/2015/mdg-report-2015\\_spanish.pdf](http://www.un.org/es/millenniumgoals/pdf/2015/mdg-report-2015_spanish.pdf)

- Organización de las Naciones Unidas [ONU]. (2017). Convenio sobre la diversidad biológica. Retrieved from <http://www.un.org/es/events/biodiversityday/convention.shtml>
- Ortiz, E., Saransi, C., Ayala, K., Faz, L., Benavides, N., Vela, P., ... Pineda, C. A. (2016). Banco de recursos genéticos de *Auricularia* spp. con fines industriales: Una revisión. *Revista Bionatura*, 3(1), 139–145.
- Pan, R., Cao, L., Huang, H., Zhang, R., & Mo, Y. (2010). Biosorption of Cd, Cu, Pb, and Zn from aqueous solutions by the fruiting bodies of jelly fungi (*Tremella fuciformis* and *Auricularia polytricha*). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(4), 997–1005. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2821-y>
- Panizo, M. M., Reviákina, V., Montes, W., & González, G. (2005). Mantenimiento y Preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. *Rev.Soc.Ven.Microbiol*, 25(1), 1–9.
- Parlamento Latinoamericano. Comisión Permanente de Medio Ambiente y Turismo. Ley Marco sobre Recursos Genéticos (2015).
- Pérez y Martínez-Carrera. (1988). Citado por Morales, Op. cit.
- Pichel, J. A. (2012, February). El Banco de Germoplasma de Salamanca, pionero en el estudio y conservación de hongos. *Agencia Iberoamericana Para La Difusión de La Ciencia Y La Tecnología Conservación Y Almacenamiento de Cepas Puras*. Salamanca, España.
- Pineda-insuasti, J. A. (2016). Banco ecuatoriano de recursos genético microbianos para la industria enzimática. Retrieved from <https://www.researchgate.net/project/Banco-ecuatoriano-de-recursos-genetico-microbianos-para-la-industria-enzimatica>

- Pineda, J. A. (2014). *Desarrollo de una tecnología para la producción a pequeña escala de la biomasa del hongo ostra (Pleurotus ostreatus)*. Universidad de Camagüey Ignacio Agramonte Loynaz.
- Pineda, J. A., Ramos, L. B., & Soto, C. P. (2014). Producción de *Pleurotus ostreatus* por fermentación en estado sólido: una revisión. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 48(2), 13–23. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223131465002>
- Pineda, J. A., Soto, C. P., Santiago, N. F., Ponce, C. A., & Reyes, G. (2015). Selección de cepas nativas ecuatorianas del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) con fines industriales. *Revista Bionatura*, 1(1), 29–32.
- Qiang, W. (2015a). Method for cultivating *auricularia polytricha* through thorn scraps. China, China.
- Qiang, W. (2015b). Method for cultivating *auricularia polytricha* through wild jujube branch sawdust. China. Retrieved from <https://patents.google.com/patent/CN104956924A/en?q=auricularia&q=culture&q=subst rate>
- Qiangqiang, Z., & Jiajun, W. (1998). Fungi Using Sterile Distilled, 257, 255–257.
- Quimio, T. H. (1982). Physiological considerations on *Auricularia* spp. In S.-T. Chang & T. H. Quimio (Eds.), *Tropical Mushroom-Biological Nature and Cultivation Methods* (1st ed., pp. 397–408). Hong Kong: The Chinese University Press. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=0luzyrBPARgC&oi=fnd&pg=PR19&dq=+Tropical+mushrooms.+Biológical>

- Quimio, T. H., Chang, S.-T., & Royse, D. J. (1990). *Technical guidelines for mushroom growing in the tropics*. Citado por Morales, Op. cit.
- Ramón, D., Morán, M., Costa, J., López, F., Arriola, A., Martín, A., ... Rodríguez, F. (2005). Biotecnología en el Sector Alimentario. *Genoma España*, 5(2), 1–81. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Reina, R., Liers, C., Ocampo, J. A., García-Romera, I., & Aranda, E. (2013). Solid state fermentation of olive mill residues by wood- and dung-dwelling Agaricomycetes: Effects on peroxidase production, biomass development and phenol phytotoxicity. *Chemosphere*, 93(7), 1406–1412. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.006>
- Reza, M. A., Hossain, M. A., Lee, S. J., Yohannes, S. B., Damte, D., Rhee, M. H., & Park, S. C. (2014). Dichlormethane extract of the jelly ear mushroom *Auricularia auricula-judae* (higher Basidiomycetes) inhibits tumor cell growth in vitro. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 16(1), 37–47. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v16.i1.40>
- Roche, N., Venague, A., Desgranges, C., & Durand, A. (1993). Use of chitin measurement to estimate fungal biomass in solid state fermentation. *Biotechnology Advances*, 11(3), 677–683. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(93\)90036-M](https://doi.org/10.1016/0734-9750(93)90036-M)
- Román Corrochano, A. (2013). *Facultad de Medicina Departamento de Biología Celular , Histología y Farmacología comestibles , Agaricus bisporus , Pleurotus eryngii y Sarcodon imbricatum ”*. Universidad de Valladolid. Retrieved from <https://uvadoc.uva.es/bitstream/10324/3639/1/TFM M 40.pdf>
- Rühl, M., & Kües, U. (2006). 22 . Mushroom Production. In U. Göttingen (Ed.), *Molecular Wood Biotechnology* (pp. 555–586). Retrieved from

[https://www.researchgate.net/profile/Ursula\\_Kuees/publication/262179448\\_Mushroom\\_Production/links/004635378d94f8b981000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Ursula_Kuees/publication/262179448_Mushroom_Production/links/004635378d94f8b981000000.pdf)

Sakurai, Y., Misawa, S., & Shiota, H. (1985). Growth and Respiratory Activity of *Aspergillus oryzae* Grown on Solid State Medium. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(3), 745–750. <https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10866800>

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sánchez-Vázquez, J. E. Huerta, G., & Calvo, L. (1995). Potential of *Auricularia* sp. in the recycling of agroindustrial waste products in the tropics. *Mushroom Science*, 14, 877–883.

Sánchez, L. E. (2002). Impactos sobre los ecosistemas. In F. L. Repetto & C. S. Karez (Eds.), *ii Curso Internacional De Aspectos Geológicos De Protección Ambiental* (pp. 322–331). Montevideo, Uruguay: UNESCO. Retrieved from <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd29/impacto-ecosis.pdf>

Sánchez Vázquez, J. (1994). Producción de hongos comestibles. San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México.

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>

Scotti, C. T., Vergoignan, C., Feron, G., & Durand, A. (2001). Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in solid state cultivation conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 7(1), 1–5.

[https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(00\)00090-5](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00090-5)

Secretaría Del Convenio Sobre la Diversidad. (2011). *Protocolo de Nagoya sobre Acceso a los Recursos Genéticos y Participación Justa y Equitativa en los Beneficios que se deriven de su Utilización al Convenio sobre la Diversidad Biológica*. Montreal, Canadá.

Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo (SENPLADES). (2013). *Plan Nacional para el Buen Vivir 2013-2017* (1st ed.). Quito: Gobierno Nacional de la República del Ecuador.

Sharma, V. P., & Jandaik, C. (1994). Recycling of spent compost for growing *Auricularia polytricha* and *Pleurotus* species. *Mushroom Information*, *10*, 15–20.

Sharma, V. P., & Jandaik, C. L. (1992a). Recycling of mushroom industry waste for growing *Pleurotus sajor-caju* and *Auricularia polytricha*. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, *22*, 182–186.

Sharma, V. P., & Jandaik, C. L. (1992b). Supplementation of wheat straw for the improved yields of black ear mushroom (*Auricularia polytricha*). *Mushroom Research*, *1*(1).

Sheu, F., Chien, P.-J., Chien, A.-L., Chen, Y.-F., & Chin, K.-L. (2004). Isolation and characterization of an immunomodulatory protein (APP) from the Jew's Ear mushroom *Auricularia polytricha*. *Food Chemistry*, *87*(4), 593–600.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.015>

Singh, S. K., Upadhyay, R. C., Yadav, M. C., & Tiwari, M. (2004). Development of a novel lyophilization protocol for preservation of mushroom mycelial cultures. *Current Science*, *87*(5), 568–570.

- Singh, S. K., Yadav, M. C., & Rai, R. D. (2007). Molecular characterization and crypreservation of germoplasm of the edible mushrooms. In R. D. Rai, S. K. Singh, M. C. Yadav, & R. P. Tewari (Eds.), *Mushroom Biology and Biotechnology* (pp. 63–78). Chambaghat, Solan: Mushroom Society of India.
- Song, G., & Du, Q. (2012). Structure characterization and antitumor activity of an  $\alpha$   $\beta$ -glucan polysaccharide from *Auricularia polytricha*. *Food Research International*, 45(1), 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.035>
- Songkammali, P. (2005). *Increasing of Protein and Nutritive Value of Rice Straw for Animal Feed by Microbial Fermentation*. Universidad de Kasetsart. Retrieved from [http://www.cab.kps.ku.ac.th/complete\\_thesis/?start=330&page=23](http://www.cab.kps.ku.ac.th/complete_thesis/?start=330&page=23)
- Sripheuk, P. (2007). Use of spent mushroom compost in a cultivation of abalone mushroom (*Pleurotus abalonus* Han, Chen et Cheng) and jew's ear mushroom (*Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc.) in plastic bags. *Khon Kaen Agriculture Journal*, 35, 356–363. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=TH2007000420>
- Stamets, P. (2000). *Growing Gourment ang Medicinal Mushrooms*. Ten Speed Press (3rd ed., Vol. 2). Berkeley, California: Ten Speed Press. Retrieved from <https://goo.gl/5QzDMb>
- Steineck, H. (1981). *Mushroom in the garden*. Euereka Printing Co., Eureka. Citado por Guzmán, Op. cit.
- Suárez, C., & Nieto, J. (2016). Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles : una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2012.03.011>
- Sun, S., Zhang, X., Sun, S., Zhang, L., Shan, S., & Zhu, H. (2016). Production of natural

- melanin by *Auricularia auricula* and study on its molecular structure. *Food Chemistry*, 190, 801–807. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.042>
- Sun, Y., Li, T., & Liu, J. (2010). Structural characterization and hydroxyl radicals scavenging capacity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Auricularia polytricha*. *Carbohydrate Polymers*, 80(2), 377–380. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.11.033>
- Suryanarayan, S. (2003). Current industrial practice in solid state fermentations for secondary metabolite production: The Biocon India experience. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2–3), 189–195. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00131-6](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00131-6)
- Tang, Q.-T., Yu, R.-Q., & Chen, F.-S. (2002). Studies on Extracellular Polysaccharide Production by Submerged Fermentation of *Auricularia Auricula*. *Food Science*, 23(3), 46–49.
- Tao, P., Liu, H., & Xu, X. (2011). ITS sequence analysis of wild *auricularia auricularia* strains from Heilongjiang Province. *Procedia Environmental Sciences*, 8(18), 569–574. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2011.10.088>
- Tapia, C., Zambrano, E., & Montero, A. (2008). *Estado de los Recursos Filogenéticos para la Agricultura y Alimentación en el Ecuador. Publicación Miscelánea No. 114*. Quito.
- Ukai, S., Hara, C., Kuruma, I., & Tanaka, Y. (1983). Polysaccharides in fungi. XIV. Anti-inflammatory effect of the polysaccharides from the fruit bodies of several fungi. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, 6(12), 983–990. <https://doi.org/10.1248/bpb1978.6.983>
- Ukai, S., Kiho, T., Hara, C., Morita, M., Goto, A., Imaizumi, N., & Hasegawa, Y. (1983). Antitumor Activity of various Polysaccharides isolated from *Dictyophora indusiata*, *Ganoderma japonicum*, *Cordyceps cicadae*, *Auricularia auricula-judae*, and *Auricularia*

Species. *Chem Pharm Bull*, 31, 741–4.

Unicef. (2015, June 17). Programa de Seguridad Alimentaria y Nutricional “SAN Imbabura” fue inaugurado en Ibarra, p. 3. Ibarra. Retrieved from [http://www.unicef.org/ecuador/018\\_Comunicado\\_Lanzamiento\\_Proyecto\\_SAN\\_Imbabura\\_2.pdf](http://www.unicef.org/ecuador/018_Comunicado_Lanzamiento_Proyecto_SAN_Imbabura_2.pdf)

United Nations. (2017). General information. Retrieved from <http://www.un.org/esa/earthsummit/>

Vilela, L. C., & Silverio, C. M. (1982). Cultivation of Auricularia on composted sawdust in the Philippines. In S.-T. Chang & T. H. Quimio (Eds.), *Tropical mushrooms-biological nature and cultivation methods* (1st ed., pp. 427–435). Hong Kong: The Chinese University Press.

Viñas, J. M. S. (2011). y crisis alimentaria. *Revista Española de Estudios Agrosociales Y Pesqueros*, (229), 11–35. Retrieved from [http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf\\_REEAP/r229\\_11\\_35.pdf](http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_REEAP/r229_11_35.pdf)

Viñas, J. M. S. (2012). Los retos de la agricultura para alimentar al mundo en 2050. *Tiempo de Paz*, 106, 37–48. Retrieved from <http://www.iesa.csic.es/eventos/071120110.pdf>

Von Grebmer, K., Bernstein, J., Prasai, N., Yin, S., Yohannes, Y., Towey, O., ... Waal, A. (2015). *Global Hunger Index: Armed Conflict and The Challenge of Hunger*. Bonn/Washington, DC/ Dublin: International Food Policy Research Institute. Retrieved from [http://www.welthungerhilfe.de/fileadmin/user\\_upload/Mediathek/Welthunger-Index/WHI\\_2015/global-hunger-index\\_2015\\_english.pdf](http://www.welthungerhilfe.de/fileadmin/user_upload/Mediathek/Welthunger-Index/WHI_2015/global-hunger-index_2015_english.pdf)

- Voyron, S., Roussel, S., Munaut, F., Varese, G. C., Ginepro, M., Declerck, S., & Filipello Marchisio, V. (2009). Vitality and genetic fidelity of white-rot fungi mycelia following different methods of preservation. *Mycological Research*, 113(10), 1027–1038. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.06.006>
- World Food Programme [WFP]. (2015). Food Security Analysis. Retrieved from <http://www.wfp.org/food-security>
- Worrall, J. J., Anagnost, S. E., & Zabel, R. A. (1997). Comparison of Wood Decay among Diverse Lignicolous Fungi. *Mycologia*, 89(2), 199–219. <https://doi.org/10.2307/3761073>
- Wu, J., Ding, Z.-Y., & Zhang, K.-C. (2006). Improvement of exopolysaccharide production by macro-fungus *Auricularia auricula* in submerged culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 743–749. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.12.012>
- Wu, Q., Tan, Z., Liu, H., Gao, L., Wu, S., Luo, J., ... Xu, X. (2010). Chemical characterization of *Auricularia auricula* polysaccharides and its pharmacological effect on heart antioxidant enzyme activities and left ventricular function in aged mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46(3), 284–288. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.01.016>
- Xie, C. yan, Gu, Z. xin, You, X., Liu, G., Tan, Y., & Zhang, H. (2010). Screening of edible mushrooms for release of ferulic acid from wheat bran by fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(2), 125–128. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.10.005>
- Xiong, W., Zhang, Q., Yin, F., Yu, S., Ye, T., Pan, W., & Yang, X. (2016). *Auricularia auricular* polysaccharide-low molecular weight chitosan polyelectrolyte complex nanoparticles: Preparation and characterization. *Asian Journal of Pharmaceutical*

*Sciences*, 11(3), 439–448. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2015.10.064>

Xu, C. P., & Yun, J. W. (2003). Optimization of submerged-culture conditions for mycelial growth and exo-biopolymer production by *Auricularia polytricha* (wood ears fungus) using the methods of uniform design and regression analysis. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 38, 193–199. <https://doi.org/10.1042/BA20030020>

Yan, P.-S., Luo, X.-C., & Zhou, Q. (2004). RAPD molecular differentiation of the cultivated strains of the jelly mushrooms, *Auricularia auricula* and *A. polytricha*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(8), 795–799. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-5840-y>

Yang, L., Zhao, T., Wei, H., Zhang, M., Zou, Y., Mao, G., & Wu, X. (2011). Carboxymethylation of polysaccharides from *Auricularia auricula* and their antioxidant activities in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(5), 1124–1130. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.09.011>

Yoon, S.-J., Yu, M.-A., Pyun, Y.-R., Hwang, J.-K., Chu, D.-C., Juneja, L. R., & Mourão, P. A. S. (2003). The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin. *Thrombosis Research*, 112(3), 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2003.10.022>

Yu, J., Sun, R., Zhao, Z., & Wang, Y. (2014). *Auricularia polytricha* polysaccharides induce cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer A549 cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 68, 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.04.018>

Yuan, Z., He, P., Cui, J., & Takeuchi, H. (1998). Hypoglycemic effect of water-soluble polysaccharide from *Auricularia auricula-judae* Quel. on genetically diabetic KK-Ay

mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(June 2016), 1898–1903.  
<https://doi.org/10.3177/jnsv.44.829>

Zadražil, F. (1997). Changes in In vitro Digestibility of Wheat Straw During Fungal Growth and after Harvest of Oyster Mushrooms (*Pleurotus* spp.) on Laboratory and Industrial Scale. *Journal of Applied Animal Research*, 11(1), 37–48.  
<https://doi.org/10.1080/09712119.1997.9706159>

Zeng, F., Zhao, C., Pang, J., Lin, Z., Huang, Y., & Liu, B. (2013). Chemical properties of a polysaccharide purified from solid-state fermentation of *Auricularia auricular* and its biological activity as a hypolipidemic agent. *Journal of Food Science*, 78(9).  
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.12226>

Zeng, W.-C., Zhang, Z., Gao, H., Jia, L.-R., & Chen, W.-Y. (2012). Characterization of antioxidant polysaccharides from *Auricularia auricular* using microwave-assisted extraction. *Carbohydrate Polymers*, 89(2), 694–700.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.078>

Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E., Goldbeck, R., Souza-Soares, L. A., & Queiroz, M. I. (2010). Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. *Bioresource Technology*, 101(18), 7107–7111.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.001>

Zervakis, G., Philippoussis, a, Ioannidou, S., & Diamantopoulou, P. (2001). Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. *Folia Microbiologica*, 46(3), 231–4.  
<https://doi.org/10.1007/BF02818539>

- Zhang, H., Wang, Z.-Y., Yang, L., Yang, X., Wang, X., & Zhang, Z. (2011). In Vitro Antioxidant Activities of Sulfated Derivatives of Polysaccharides Extracted from *Auricularia auricular*. *Int. J. Mol. Sci.*, *12*(5), 3288–3302. <https://doi.org/doi:10.3390/ijms12053288>
- Zhang, M., Xiao, G., Thring, R. W., Chen, W., Zhou, H., & Yang, H. (2015). Production and Characterization of Melanin by Submerged Culture of Culinary and Medicinal Fungi *Auricularia auricula*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *176*(1), 253–266. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1571-9>
- Zhao, J., Fangzheng, Xu, H.-J., Hu, T., Zhang, H., Zhang, Y., & Hu, H. (2015). Production method of *auricularia auricular* mycelium for *auricularia auricular* polysaccharide extraction. China. Retrieved from <http://documents.allpatents.com/1/7020193/CN104480026A>
- Zhu, H., He, C.-C., & Chu, Q.-H. (2011). Inhibition of quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* by pigments extracted from *Auricularia auricular*. *Letters in Applied Microbiology*, *52*(3), 269–274. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02993.x>
- Zou, Y., Hu, W., Liu, C., Chen, C., & Gu, Z. (2013). Production of tyrosinase by *Auricularia auricula* using low cost fermentation medium. *Annals of Microbiology*, *63*(2), 699–705. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0522-8>
- Zou, Y., Jiang, A., & Tian, M. (2015). Extraction optimization of antioxidant polysaccharides from *Auricularia auricula* fruiting bodies. *Food Sci. Technol (Campinas)*, *35*(3), 1–6. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6712>

# ANEXOS

## Anexo 1. Ficha Técnica Del Liofilizador

### Liofilizadoras AdVantage Plus y AdVantage Bench Top con charola

#### Liofilizadora de charola y de conector múltiple en un paquete excepcional

Características del modelo AdVantage Plus:

- Potencialmente similar a la liofilizadora piloto más grande de investigación y desarrollo en un sistema de mesa más chico
- Flexibilidad en el proceso por medio de un paquete de control integrado
- Capacidad de tratar el producto por medio de recocido/térmicamente para mejorar los resultados de la liofilización
- Hasta 12 segmentos programables en la etapa de liofilización
- Flexibilidad para personalizar ciclos hasta con 16 segmentos programables de liofilización
- Fácil acceso a programas usados con frecuencia los cuales pueden tener hasta 16 ciclos almacenados
- Control de presión ajustable a través del ciclo y disponible en unidades de medida seleccionadas por el usuario en mT, uB y Pa
- Monitoreo del progreso de liofilización más eficiente por medio de cuatro termopares en el producto
- Capacidad del condensador: 6L. Temperatura del condensador: -85°C
- Capacidad para tener hasta tres entrepaños de acero inoxidable
- Entrepaño diseñado para ser cubierto por agua logrando una temperatura tan baja como -65°C; uniformidad de +/-1°C
- Control de temperatura de -55 a 60°C
- Disponible en su versión a granel o selladora
- Comparación rápida en cuanto a la capacidad del entrepaño: hasta 1197 viales de 2ml (14.75mm de diámetro externo x 40mm de altura con tapón parcialmente colocado) utilizando los tres entrepaños

Control: Tipo Wizard

Características del modelo AdVantage

- Un gran avance a partir de una liofilizadora de conector múltiple en los casos en que se requiera procesar una mayor cantidad de producto a la vez o que se requiera un control de temperatura en el entrepaño
- Entrepaños sólidos con cubierta de teflón
- Sistema formado por un solo entrepaño
- Desempeño del controlador similar al del modelo AdVantage Plus
- Capacidad del condensador: 3.5L con un máximo de temperatura baja de -85°C
- Temperatura del entrepaño tan baja como -70°C con control de -55 a 60°C
- Comparación rápida en cuanto a la capacidad del entrepaño: hasta 399 viales de 2ml (14.75mm de diámetro externo x 40mm de altura con el tapón parcialmente colocado)

Control: Tipo Wizard



25 <sup>3</sup> / <sub>4</sub> "	W	65.4cm
28"	D	71.1cm
28 <sup>3</sup> / <sub>4</sub> "	H	73.0cm

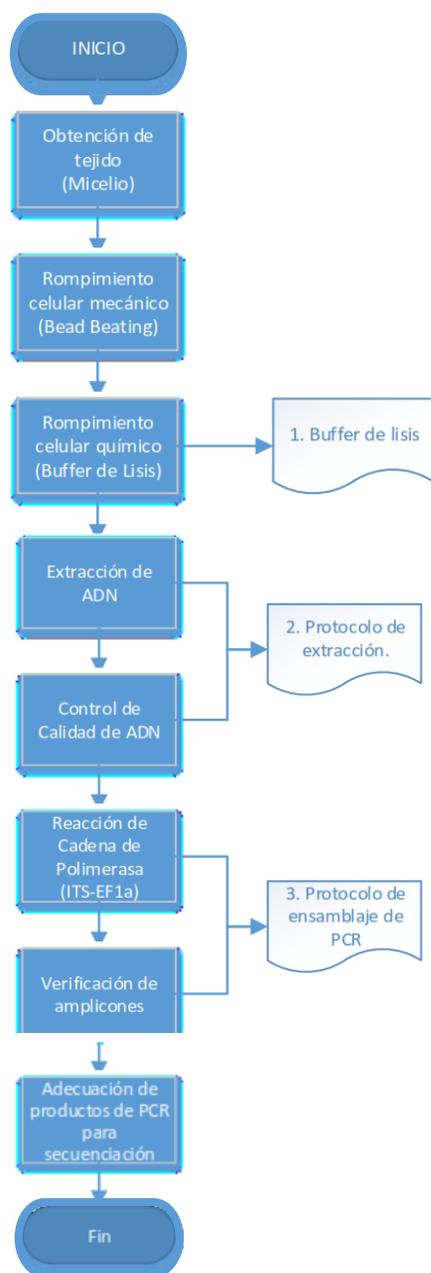
#### APLICACIONES TÍPICAS

- Liofilización en laboratorios de investigación y desarrollo
- Placas de 96 pozos
- Botellas de suero o viales
- Productos a granel para su análisis material vegetal, tejido orgánico, productos de desecho

AdVantage Plus (además de las características del modelo Advantage):

- Liofilización a pequeña escala de investigación y desarrollo

## Anexo 2. Protocolo de secuenciación del ADN total genómico proveniente de tejido fúngico de *Auricularia sp.*



A continuación, se entra en detalle en algunos ítems listados en el diagrama de flujo:



Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro  
Teléfono: 0998982450  
e-mail: [idgen.ecuador@gmail.com](mailto:idgen.ecuador@gmail.com)  
R.U.C. 1713443479001

#### Informe de Resultados

**Nombre del Proyecto:** Edwin Ortiz

**Informe No.:** A-015

**Técnico Responsable:** Ing. Alexis Vela

**Fecha:** 03/03/2017

**Resultados.**

Codificación	Longitud	% de Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	Nº Accesión
Auri1	636	71.5	<i>Auricularia fuscosuccinea</i>	ITS	99	<a href="#">JX065150.1</a>

**Firma autorizada**



Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro  
Teléfono: 0998982450  
e-mail: [idgen.ecuador@gmail.com](mailto:idgen.ecuador@gmail.com)  
R.U.C. 1713443479001

### Detalle de Resultados

**Nombre del Proyecto:** Edwin Ortiz

**Técnico Responsable:** Ing. Alexis Vela

**Fecha:** 03/03/2017

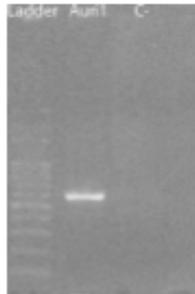
1. **Estudio:** Identificación molecular de microorganismos (Extracción de ADN, Amplificación de barcode, secuenciación estándar, ensamblaje de productos de PCR y búsqueda en base de datos).

#### Detalles técnicos:

- **Muestras usadas:** Cuerpo fructífero de macrosetas.
- **Método de determinación:** Identificación molecular por barcoding.
- **Procedimiento:**
  - o Los procesos de extracción y amplificación de ADN se describen en el detalle de protocolos.
  - o Los productos de PCR fueron depurados previo a su secuenciación. El producto de amplificación limpio y los primers ITS5, ITS4 fueron utilizados para la secuenciación con el método SANGER.
  - o Se limpiaron y ensamblaron las secuencias obtenidas con el programa bioinformático GENEIOUS.
  - o Se compararon las secuencias ensambladas con la base de datos de nucleótidos de GenBank

#### Resultados:

El ADN de las macrosetas se extrajo por duplicado con el fin de obtener una concentración y calidad de ADN capaz de permitir una correcta amplificación del Fragmento ITS mediante PCR. Adicionalmente, se diluyeron las muestras hasta una concentración en un rango de 15 a 30ng/uL, para descartar procesos inhibitorios de la PCR debido a una elevada concentración de ADN, previo a su utilización en el ensamblaje de la PCR, posterior a esto se ensamblo la reacción de PCR visualizándose los resultados en la figura 1.



**Figura 1.** Amplicón del fragmento ITS visualizados en un gel de Agarosa 2%. C-: Control negativo, Ladder: Ladder 1Kb.

#### **Conclusiones:**

1. El cuerpo fructífero de esta macroseta posee una elevada concentración de proteínas y polisacáridos, por lo que es necesario el uso de tratamientos enzimáticos, adicionales al obtención de ADN por métodos convencionales, que permitan mejorar la calidad de ADN.
2. La búsqueda en la base de datos Genbank, de la secuencia obtenida permitió identificar a la muestra analizada (Auri1) como *Auricularia fuscosuccinea*.

## **1. Composición del Buffer de Lisis optimizado para micelio.**

A continuación, se listan los componentes del buffer de lisis.

- Manitol
- Tris HCl
- EDTA
- NaCl
- CTAB 0.8%
- Salrkosyl
- $\beta$ -mercaptoethanol 0,2% (v/v)

## **2. Protocolo de extracción de ADN de micelio.**

- Mediante raspado en placa, tomar 0,1 gramos de micelio y colocarlo en tubos libres de DNAsa y RNAsa, previamente adecuados con esferas de rompimiento.
- Agitar la muestra en el bead beater a su máxima potencia durante 0,5 minutos.
- Adicionar 500  $\mu$ l de tampón de extracción con Proteinasa K.
- Incubar en baño María por 120 minutos a 65 °C.
- Añadir 500  $\mu$ l de Fenol:Cloroformo:Isoamilalcohol (25:24:1) y homogenizar la muestra.
- Centrifugar las muestras durante 5 minutos a 14500 gravedades.
- Depositar el sobrenadante obtenido en un nuevo tubo estéril de 1,5 mL (libre de DNAsa y RNAsa).
- Añadir al extracto un volumen igual de etanol absoluto frío, 150  $\mu$ l de acetato de sodio 3M y 300  $\mu$ l de etanol al 70% para precipitar el ADN, y dejar enfriar a -20 °C durante toda la noche.

- Centrifugar durante 10 minutos a 14500 gravedades y eliminar el sobrenadante.
- Secar los tubos en la cámara de flujo laminar durante media hora.
- Resuspender el pellet obtenido con 100 µl de agua estéril y libre de nucleasas, adicionar 1.5 unidades de ARNsa e incubar durante 20 minutos a 37 °C.
- Para verificar la calidad del ADN, realizar una electroforesis en gel de Agarosa al 1%, utilizando un low mass ladder para determinar la concentración de ADN de la muestra. Adicionalmente, confirmar estos resultados con el nanodrop.
- Almacenar las muestras a -20 °C, hasta su uso.

### 3. Reactivos que deben usarse durante el ensamble de la PCR por reacción.

Reactivo	Volumen (uL)	Concentración final (25uL volumen final)
GreenGo Taq 2X	12,5	1X
Primer Forward (5uM)	2,5	500nM
Primer Reverse (5uM)	2,5	500nM
Agua PCR	4,5	-----
ADN (150 ng – 70 ng)	3	5 ng – 20 ng

## Anexo 3. Participación en evento científico



**Anexo 4. Diseño de un catálogo de cepas microbianas puras de *Auricularia* spp. Para su conservación en el banco de recursos genéticos microbianos (BRGM)**