

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
CAMPUS LOS ÁNGELES  
ESCUELA DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA VEGETAL**



**CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ESPECIES  
DE *Morchella* DEL CENTRO-SUR DE CHILE CULTIVADAS POR FERMENTACIÓN EN  
ESTADO LÍQUIDO**

**MEMORIA DE TÍTULO PRESENTADA  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO  
EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL.**

**Francisco Javier Cuevas Verdugo**

**Los Ángeles – Chile**

**2023**

**Caracterización del crecimiento y actividad biológica de especies de *Morchella* del centro-sur de Chile cultivadas por fermentación en estado líquido.**

Alumno

Francisco Javier Cuevas Verdugo  
Ingeniero en Biotecnología Vegetal

Profesora guía

Dra. Angela Elena Machuca Herrera  
Profesora Asociada  
Bioquímica

Jefe de Carrera

Pedro Lindor Quiroz Hernández  
Profesor Instructor  
Ingeniero en Ejecución Forestal

Directora de Departamento

Dra. Marely Cuba Diaz  
Profesora Titular  
Bióloga



## **AGRADECIMIENTOS**

Conforme a la finalización de mi proceso universitario de pregrado quiero agradecer profundamente a cada una de las personas que formaron parte y me apoyaron durante esta etapa. Iniciando por mi familia quienes han sido mi apoyo incondicional durante estos años de estudio. Gracias por creer en mí y darme la fuerza y motivación para lograr con éxito esta etapa.

También agradezco a mi profesora guía Dra. Ángela Machuca, quien brindó su experiencia y conocimientos para llevar a cabo la presente tesis, entregando un apoyo constante durante todo el proceso de la construcción de la memoria de título, gracias por su dedicación, paciencia y sabias palabras en diferentes situaciones.

A la profesora Yudith Guillen, quien nos entregó un apoyo fundamental en el trabajo en el Laboratorio de biotecnología de Hongos, de la UdeC, Campus Los Ángeles. Al Dr. Daniel Chávez por su apoyo durante este proceso, además de participar en la comisión evaluadora. A mi compañera Gabriela Fernández, quien apoyó continuamente el desarrollo práctico de las actividades.

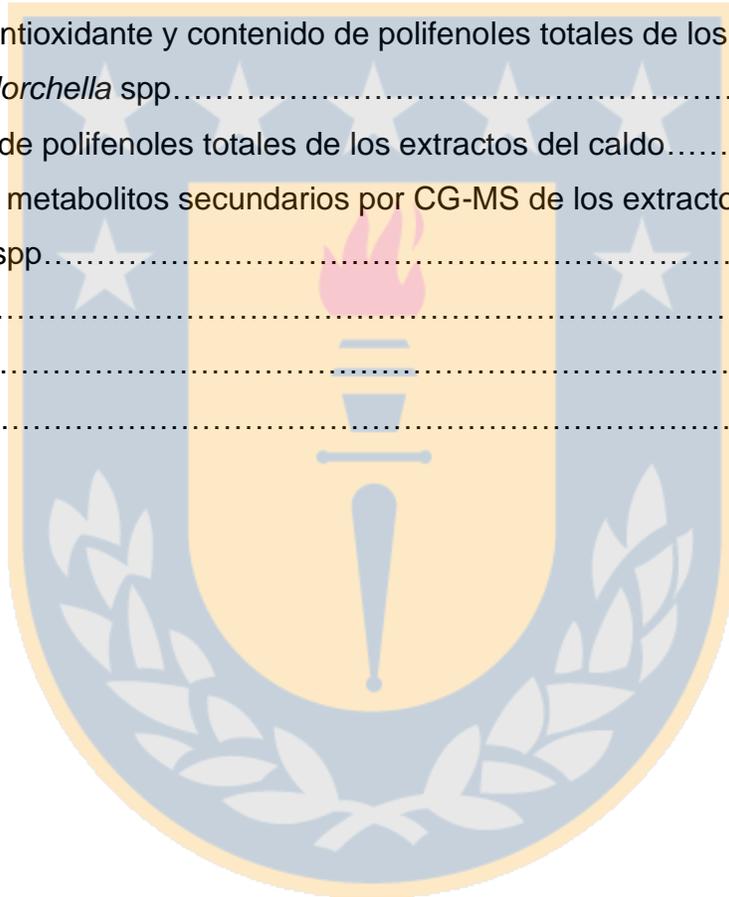
Asimismo, extiendo mi agradecimiento a la Dra. Solange Torres y al Dr. José Becerra pertenecientes al Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la UdeC, Campus Concepción, por brindar su colaboración y facilidades para llevar a cabo esta importante etapa, lo cual contribuye significativamente en los resultados obtenidos.

Finalmente agradezco el financiamiento del Proyecto VRID- 2021000363 MUL por hacer posible la realización de mi tesis.

## Índice de contenidos

Capítulos	Página
I. Resumen.....	07
I.1 Abstract.....	08
II. Introducción.....	09
III. Marco teórico.....	11
1. Clasificación y características del género <i>Morchella</i> .....	11
2. Características nutricionales del género <i>Morchella</i> .....	12
3. Bioactividad en micelios y caldo de fermentación.....	13
4. Actividad antioxidante.....	14
IV. Hipótesis.....	16
V. Objetivos.....	16
1. Objetivo general.....	16
2. Objetivos específicos.....	16
VI. Metodología.....	17
1. Especies de hongos.....	17
2. Condiciones de cultivo y ensayo exploratorio.....	17
2.1 Determinación de biomasa seca.....	18
2.2 Determinación del contenido de proteínas solubles.....	19
2.3 Determinación del contenido de azúcares reductores.....	19
2.4 Actividad antioxidante de los caldos de fermentación.....	19
3. Cinética de crecimiento.....	20
3.1 Detección de Compuestos quelantes de metal (CQM) en los caldos de cultivo.....	20
4. Cultivo para la obtención de extractos orgánicos a partir del caldo fermentación y los micelios.....	21
4.1 Extracción para el análisis de metabolitos secundarios.....	21
4.2 Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS) de los extractos.....	22
5. Actividad antioxidante y determinación de IC50.....	22

<b>Capítulos</b>	<b>Paginas</b>
6. Contenido de fenoles totales de los extractos .....	23
7. Análisis estadístico .....	23
VII. Resultados.....	24
1. Ensayo exploratorio.....	24
2. Cinética de crecimiento.....	33
3. Cultivo de <i>Morchella</i> spp. Para obtención de extractos orgánicos.....	38
4. Actividad antioxidante y contenido de polifenoles totales de los extractos del caldo de <i>Morchella</i> spp.....	40
5. Contenido de polifenoles totales de los extractos del caldo.....	40
6. Análisis de metabolitos secundarios por CG-MS de los extractos de <i>Morchella</i> spp.....	41
VIII. Discusión.....	46
IX. Conclusión.....	53
X. Bibliografía.....	54



## Índice de figuras

Figura 1.....	25
Figura 2.....	27
Figura 3.....	28
Figura 4.....	29
Figura 5.....	31
Figura 6.....	32
Figura 7.....	33
Figura 8.....	34
Figura 9.....	35
Figura 10.....	36
Figura 11.....	37
Figura 12.....	38
Figura 13.....	42
Figura 14.....	43
	
<b>Índice de Tablas</b>	
Tabla 1.....	17
Tabla 2.....	18
Tabla 3.....	39
Tabla 4.....	40
Tabla 5.....	44
<b>Anexos</b>	
Anexo 1.....	66
Anexo 2.....	67
Anexo 3.....	68
Anexo 4.....	70
Anexo 5.....	71

## Nomenclatura y Abreviaciones

cm: centímetro

min: minuto

h: hora

g: gramos

L: litros

mg: miligramos

ml: mililitros

$\mu$ L: microlitro

$\mu$ g: microgramo

kcal: kilo calorías

DPPH: 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo

CUPRAC: Capacidad antioxidante sobre el cobre

ABTS: Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencenosulfónico-6

CQM: Compuestos quelantes de metal

Abs: absorbancia

nm: nanómetro

pH: Potencial de Hidrogeno

IC<sub>50</sub>: Índice de inhibición medio

UV: Ultravioleta

spp: Especies

CG-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

EMA: extracto de malta-agar

°C: grados Celsius

MB: Medio básico

MC: Medio complejo

rpm: revoluciones por minuto

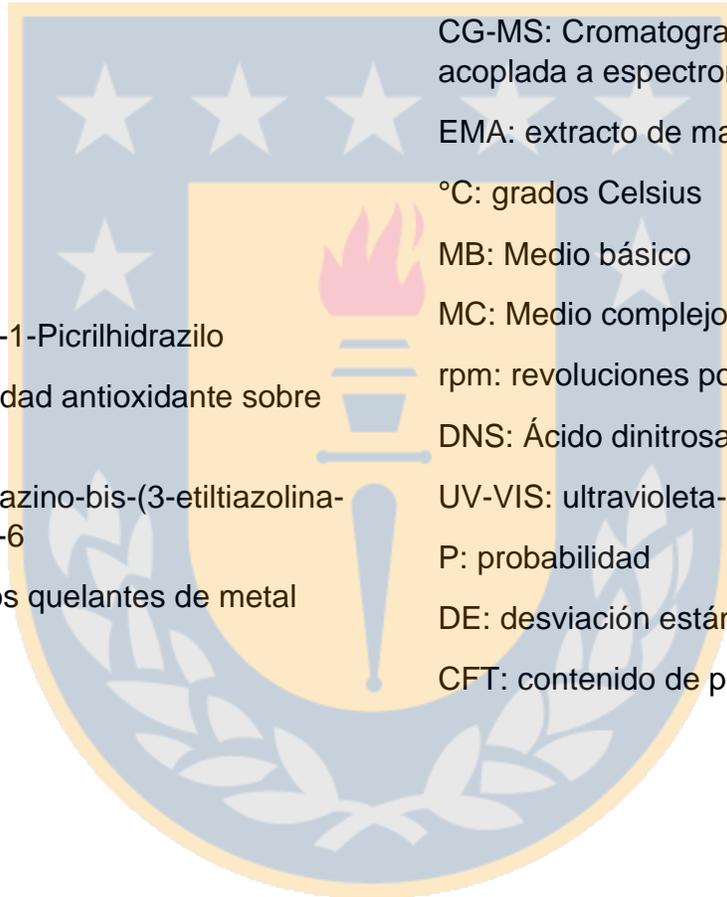
DNS: Ácido dinitrosalicílico

UV-VIS: ultravioleta-visible

P: probabilidad

DE: desviación estándar

CFT: contenido de polifenoles totales



## I. Resumen

Las morchelas son hongos silvestres comestibles cuyos ascocarpos son de alto valor comercial como productos gourmet por su característico aroma y sabor, y también por sus propiedades medicinales. Debido a la dificultad en la obtención de los ascocarpos y al alto valor, existe interés en investigar los cultivos vegetativos de *Morchella* spp. para determinar su bioactividad, lo que permitiría valorizar los micelios y caldos de fermentación. En este trabajo se analizó el crecimiento micelial y los caldos de fermentación de diferentes especies de *Morchella* del centro-sur de Chile, con el objetivo de determinar su potencial bioactivo, como actividad antioxidante (IC<sub>50</sub>) y presencia de metabolitos de interés nutracéutico. Las especies analizadas fueron: *M. eximia* y *M. importuna* provenientes de plantaciones forestales, y *M. tridentina* y *M. andinensis* proveniente de bosques nativos. Inicialmente las especies se cultivaron por 10 días a 24°C en dos tipos de medio líquido (pH 6,0), uno básico (MB) conteniendo glucosa, peptona, extracto de levadura y carbonato de calcio, y uno complejo (MC), al que se le adicionaron macro y microelementos. La incubación se realizó en condiciones agitadas (120 rpm) y estáticas, y se evaluó la producción de biomasa y en los caldos filtrados, la actividad antioxidante, proteínas solubles y azúcares reductores. No se encontraron diferencias significativas entre las especies en el tiempo evaluado, pero sí se detectó un ligero aumento en la actividad antioxidante en MC bajo agitación. Por ello, esta última condición fue seleccionada para un segundo ensayo de cinética de crecimiento que permitió determinar un importante aumento en el contenido de compuestos quelantes de metal y actividad antioxidante al día 20 de cultivo. Posteriormente, las especies se cultivaron en matraz de 1 L con el fin de producir mayores cantidades de biomasa y caldos de fermentación para extraer con solvente orgánico (acetato de etilo), y análisis del perfil de metabolitos secundarios por CG-MS. El extracto de *M. eximia* mostró el menor IC<sub>50</sub> (17,86 mg/mL), y dentro de los principales compuestos detectados por CG-MS en los extractos de *M. eximia* y *M. andinensis* destacan el ácido 9,12 octadecadienoico; 4-hidroxi-benzoetanol; ácido n-hexadecanoico; éster 2-metilpent-3-il ciclopentil del ácido succínico; falcarinol; éster diisooctilo del ácido 1,2-bencenodicarboxílico y el ergosterol. Algunos de estos compuestos fueron especie-específicos y otros estuvieron presentes solo en el extracto del micelio o del caldo. La presencia de estos compuestos revela el potencial biotecnológico para la obtención de un posible producto de valor nutracéutico a partir de los caldos de fermentación o de los micelios de *Morchella* spp..

## I.1 Abstract

*Morchella* are edible wild mushrooms whose ascocarps are of high commercial value as gourmet products for their characteristic aroma, flavor and medicinal properties. Due to the difficulty in obtaining the ascocarps and their high value, there is interest in investigating the vegetative cultures of *Morchella* spp. to determine their bioactivity, which would allow the mycelia and fermentation broths to be valorized. In this work, mycelial growth and fermentation broths of different *Morchella* spp. from central-southern Chile were analyzed to determine their bioactive potential, such as antioxidant activity (IC<sub>50</sub>) and the presence of metabolites of nutraceutical interest. The species analyzed were: *M. eximia* and *M. importuna* from forest plantations, and *M. tridentina* and *M. andinensis* from native forests. Initially, the species were cultured for 10 days at 24°C in two types of liquid medium (pH 6.0), a basic medium (MB) containing glucose, peptone, yeast extract and calcium carbonate, and a complex medium (MC), to which macro and microelements were added. Incubation was carried out under agitated (120 rpm) and static conditions, and biomass production and antioxidant activity, soluble proteins and reducing sugars were evaluated in the filtered broths. No significant differences were found between species in the time evaluated, but a slight increase in antioxidant activity was detected in MC under shaking. Therefore, this last condition was selected for the growth kinetics assay that allowed determining a significant increase in the content of metal chelating compounds and antioxidant activity at day 20 of culture. Subsequently, the species were grown in 1 L flask to produce larger amounts of biomass and fermentation broths to extract with organic solvent (ethyl acetate), and analysis of the secondary metabolite profile by GC-MS. The extract of *M. eximia* showed the lowest IC<sub>50</sub> (17.86 mg/mL), and within the main compounds detected by GC-MS in the extracts of *M. eximia* and *M. andinensis* include were 9,12-octadecadienoic acid; 4-hydroxybenzenoethanol; n-hexadecanoic acid; 2-methylpent-3-yl cyclopentyl ester of succinic acid; falcarinol; 1,2-benzenedicarboxylic acid diisooctyl ester; and ergosterol. Some of these compounds were species-specific and others were present only in the mycelial or broth extract. The presence of these compounds reveals the biotechnological potential for obtaining a possible product of nutraceutical value from the fermentation broths or from the mycelia of *Morchella* spp..

## II. Introducción

Las morchelas son hongos comestibles altamente apreciados por su característico aroma y sabor, además de su valor medicinal (Tu et al. 2021; Sarikurkcu et al. 2022). Los beneficios para la salud de los ascocarpos de morchela se han atribuido a los polisacáridos y varios fitoquímicos, principalmente compuestos fenólicos, terpenoides, tocoferoles, ácido ascórbico, entre otros (Tietel y Masaphy 2018; Wu et al. 2021). Si bien, el género *Morchella* posee una amplia distribución por las zonas templadas del planeta, existen escasos conocimientos sobre su desarrollo y requerimientos para un crecimiento óptimo, lo que dificulta la producción artificial de ascocarpos y crea limitaciones sobre su disponibilidad (Lobos e Icarte 2021). De esta forma, investigar las propiedades de los cultivos vegetativos (micelio y caldo de fermentación) del hongo representa una alternativa de gran interés, debido a las dificultades en la obtención de ascocarpos vía cultivo artificial o recolección en campo.

Existe evidencia que el caldo de fermentación y el micelio de morchela tienen compuestos activos y efectos medicinales similares al de los ascocarpos (Wang et al. 2020). La producción de compuestos bioactivos generados a través de fermentación en estado líquido ha evidenciado tener un importante valor en el campo médico, por lo que su investigación se ha visto potenciada en los últimos años (Wang et al. 2020; Wu et al. 2021; Zhang et al. 2021; Yang et al. 2022). Esto ha permitido la utilización y valorización de las distintas especies de *Morchella*, como *M. conica*, *M. importuna*, *M. sextelata*, junto a otras especies del género, obteniendo compuesto de interés nutricional y medicinal permitiendo desligarse de la producción de ascocarpos para obtener beneficios de este hongo (Tietel and Masaphy 2018; Meng et al. 2019).

En Chile son escasos los estudios entorno al género *Morchella* y sólo recientemente se reportó a la especie transcontinental *M. tridentina* por primera vez en la Patagonia chilena, al mismo tiempo que se describieron dos nuevas especies: *M. andinensis* y *M. aysenina* (Machuca et al. 2021), resultado de una combinación de identificación taxonómica tradicional con análisis moleculares. Sin embargo, estas especies al ser recientemente descritas aún no han sido analizadas en relación con la actividad biológica de sus ascocarpos o de sus cultivos vegetativos.

A pesar de que en la literatura se ha descrito la actividad biológica principalmente de los ascocarpos de *Morchella* spp. (Tietel y Masaphy 2018; Wu et al. 2021) y en menor medida de los cultivos vegetativos (Yang et al. 2019b; Li et al. 2022b), las especies no siempre son correctamente mencionadas o son citadas con nombres binomiales no aceptados por la clasificación actual de especies del género *Morchella*, lo que establece una diferencia con este estudio, donde las especies de *Morchella* que serán caracterizadas por su actividad biológica, han sido previamente identificadas usando combinación de taxonomía tradicional y métodos moleculares (Machuca et al. 2021).



### III. Marco teórico

#### 1. Clasificación y características del género *Morchella*

Actualmente, se estima que la magnitud de la diversidad fúngica puede alcanzar los 6,2 millones de especies, pero de éstos solo se conoce el 5-10% (Baldrian et al. 2021). La división Ascomycota es el filo más grande del Reino Fungi, este contiene ~94.000 de las ~150.000 especies descritas (Wijayawardene et al. 2022), y posee muchas especies económica y ecológicamente importantes, como son las especies de los géneros *Tuber* y *Morchella* (Hill et al. 2021).

Dentro de la división Ascomycota, las morchelas (*Morchella*, Morchellaceae, Pezizales, Pezizomycetes) se encuentran distribuidas en 3 grupos o clados principales: Clado Rufobrunnea (morchelas blancas), Clado Esculenta (morchelas amarillas) y Clado Elata (morchelas negras) (O'Donnell et al. 2011). El género *Morchella* incluye un gran número de especies, con una amplia distribución por el mundo, estando presentes en América, Europa, Asia y Oceanía (Lobos e Icarte 2021). En los bosques de la Patagonia de Chile y Argentina la familia está representada por *M. tridentina*, *M. andinensis*, junto a *M. aysenina*, que hasta la fecha ha sido descrita solo en la Patagonia Chilena (Machuca et al. 2021). *Morchella importuna* es la principal especie que se cultiva en China y su cultivo representa aproximadamente el 80-90% del área cultivada total (Xiong et al. 2017). La presencia de esta especie junto *M. eximia*, ha sido recientemente descrita en el territorio nacional, asociada a ambientes perturbados por incendios forestales o talas de plantaciones (Pfister et al. 2022; Sanz-Rocha et al. 2023). Cabe destacar que, todas las especies de *Morchella* descritas en Chile hasta el momento pertenecen al Clado Elata.

Los cuerpos fructíferos del género *Morchella* se caracterizan por poseer un sombrero o píleo lleno de orificios (alveolos) en forma de panal de abeja, de donde recibe uno de sus nombres comunes "colmenilla" (Lobos e Icarte 2021). La forma, color y tamaño del píleo puede ser muy variada y dependerá del Clado al cual la especie pertenezca, además de diversos factores ambientales como la humedad o la temperatura, logrando alcanzar tamaños de 5 a 25 cm (Lobos e Icarte 2021). Estos hongos son apreciados nutricionalmente por sus altos niveles de proteína y minerales (Zhang et al. 2021). En investigaciones

recientes se ha descrito el valor nutricional de los ascocarpos de algunas variedades de *Morchella* presentes en Chile (Jacinto-Azevedo et al. 2021; Lobos e Icarte 2021).

Las especies del género *Morchella* se distinguen por su sabor especial por lo que la alta gastronomía las destaca como producto gourmet, además de ser reconocidas por su valor nutricional y medicinal debido a diversas sustancias como proteínas, polisacáridos, oligoelementos, minerales, fibras dietéticas, vitaminas, lípidos, aminoácidos, fenoles, terpenos, entre otros compuestos que es posible encontrar tanto en sus cuerpos fructíferos como en sus micelios (Wang et al. 2020; Tu et al. 2021; Sarikurkcu et al. 2022; Ullah et al. 2022). En China y otros países asiáticos, las morchelas se han utilizado en la medicina tradicional durante miles de años (Yang et al. 2020). Se ha demostrado que tienen diversas actividades biológicas, como reducción de los lípidos en la sangre, protección del hígado, actividad antiviral, inhibición de tumores, antifatiga, regulación de la inmunidad, actividad antioxidante e inhibición enzimática, lo que convierte a las morchelas en un alimento funcional altamente valorizado por los humanos (Wu et al. 2021; Yang et al. 2022).

## **2. Características nutricionales del género *Morchella***

Los cuerpos fructíferos y el micelio de diferentes especies fúngicas proporcionan proteínas, lípidos y ácidos grasos, vitaminas, fibra y sabor a la dieta, y pueden mejorar las propiedades organolépticas de los alimentos procesados (Strong et al. 2022). Por este motivo, en los últimos tiempos los hongos comestibles se han convertido en una opción atractiva como alimentos funcionales o como materia prima para el desarrollo de productos farmacéuticos y nutracéuticos (Zhang et al. 2021).

El micelio de los hongos comestibles es rico en proteínas, por lo que es un material biológico ideal para la alimentación animal (Zhang et al. 2021). La investigación nutricional del micelio de hongos es considerada deficiente respecto a la investigación de los cuerpos fructíferos, pero pese a esto el micelio fúngico cultivado de algunas especies, se cosecha actualmente como un producto primario para la alimentación humana (Strong et al. 2022).

Los ascocarpos de *M. conica*, recolectados en la Región del Bio-Bio de Chile, presentan alrededor de 20,6 g proteínas, 1,5 g de grasas, 21,6 g de fibras, 9,9 g cenizas, 68,1 g carbohidratos y 368,1 kcal por cada 100 g de peso seco (Jacinto-Azevedo et al. 2021). Del total de 61 muestras de morchelas recolectadas en 3 localidades del territorio Patagonia

Verde (TPV) en la Región de Los Lagos de Chile, se determinó un contenido medio de 2,4 g de proteína, 1,73 g de fibra cruda, 0,2 g de grasas, 2,6 g de carbohidratos y 28,7 kcal de energía por cada 100 g de morchela fresca. Además, al comparar las morchellas provenientes de bosque quemado con las de bosque nativo se observaron diferencias significativas en las concentraciones de cenizas, calcio, magnesio, zinc, hierro, manganeso y aluminio, siendo los valores más elevados en las morchellas de bosques quemados (Lobos e Icarte 2021). En otro estudio ha sido reportado que por cada 100 g de ascocarpos secos de *M. elata* existen 7,9 g de cenizas 28,2 g de proteínas, 36,3 g de carbohidratos, 7,0 g de fibra y 2,2 g de grasa, de los cuales 42,1 % corresponden a grasas saturadas y 57,9 % a grasas insaturada, además se reporta la presencia de vitamina C (13 mg), hierro (19,5 mg), zinc (9,9 mg), magnesio (181 mg) y cobre (6,3 mg) (Dimopoulou et al. 2022).

Recientemente se ha analizado por primera vez el perfil nutricional del micelio de *M. esculenta*, donde se encontró que éste poseía 17,2 % de lípidos crudos, 39,0 % de proteína, 38,9 % de carbohidratos y 0,3 % de cenizas totales, con 467,8 kcal por cada 100 g de micelio. Además, a través de un ensayo de toxicidad en ratas se demostró que la administración oral de micelio de *M. esculenta* no presenta toxicidad y puede ser utilizado de forma segura como un alimento novedoso (Li et al. 2022b).

### **3. Bioactividad en micelios y caldos de fermentación**

Los hongos comestibles no solo se utilizan en su forma más común, el cuerpo de fructificación, sino que también se pueden utilizar como cultivo vegetativo, en su forma de micelio o de caldo de cultivo (Zhang et al. 2021). Obtener compuestos de alto valor nutricional o medicinal a partir de los cultivos vegetativos de los hongos comestibles resuelve una de las problemáticas importantes para la aplicación de los hongos como fuente de nutraceuticos, ya que permitiría desligarse de la obtención de cuerpos fructíferos estacionales (en el caso de hongos silvestres), para la obtención de los compuestos de interés (Li et al. 2022b). En el caso de morchela, además, existe la limitación de la producción de cuerpos de fructificación bajo condiciones controladas. La fermentación en estado líquido de los hongos comestibles posee algunas ventajas frente a la producción de cuerpos de fructificación, como el diseño y tecnología bien establecidas, rápido crecimiento micelial y tiempo de cosecha, mayor control del proceso (temperatura, pH, agitación),

facilidad de separación de los productos (biomasa y productos solubles), además de ser independiente de las condiciones climáticas o estaciones del año, por lo que se puede mantener una producción constante en el tiempo (Strong et al. 2022). Por otro lado, el medio de cultivo después de la fermentación del micelio contiene una variedad de componentes nutritivos como proteína micelial, aminoácidos, ácidos grasos, azúcares y elementos minerales (Zhang et al. 2021).

Se ha informado que el caldo de fermentación de distintas especies de *Morchella* tiene cualidades bioactivas similares a los ascocarpos por lo que poseen valor en el campo médico y alimenticio, pero éste ha sido poco investigado (Meyer et al. 2020; Wang et al. 2020). Recientemente se aislaron nueve compuestos del micelio de *M. esculenta* después de la fermentación líquida, incluidos dos ácidos grasos insaturados y ésteres, tres esteroides, un ácido carboxílico aromático y sus derivados, una base y ésteres aromáticos clorados (Yang et al. 2019a). Además, se han descrito 6 nuevos sesqui-terpenoides, dos compuestos aromáticos y dos esteroides del extracto con acetato de etilo del caldo de cultivo de *M. importuna* (Yang et al. 2020). La fermentación líquida estimula a *M. esculenta* a producir varios metabolitos primarios y secundarios que dependen de las condiciones de fermentación y pueden ser diferentes de los obtenidos de los cuerpos fructíferos (Wu et al. 2021). Se han aislado triterpenoides de la fermentación del micelio de *Morchella* sp., los que poseían una buena actividad antitumoral y antioxidante (Wang et al. 2020).

#### **4. Actividad antioxidante del género *Morchella***

Durante los últimos años, se han desarrollado numerosos procedimientos para determinar la actividad antioxidante de extractos de origen natural (plantas y hongos) entre ellos, los ensayos DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), CUPRAC (capacidad antioxidante sobre el cobre), ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencenosulfónico-6)), ensayos de poder reductor y de quelación de metales, entre los métodos, más utilizados (Munteanu y Apetrei 2021). Estos métodos han permitido posicionar a los hongos comestibles como un alimento funcional atractivo debido a sus propiedades antioxidantes, siendo capaces de combatir el daño oxidativo en los lípidos de membrana, proteínas y ácidos nucleicos, junto a otras características farmacológicas importantes (Zhang et al. 2021).

En especies del género *Morchella*, se han encontrado triterpenoides con actividad antioxidante y antitumoral en el micelio del hongo (Wang et al. 2020), también se han identificado polisacáridos con actividad antioxidante en los ascocarpos de *M. sextelata* (Li et al. 2022a). En diversos estudios se ha demostrado que los polisacáridos de micelio y ascocarpos de especies del Clado Esculenta presentan una importante actividad inmunomoduladora, inmunopotenciadora y antioxidante (Cui et al. 2011; Fu et al. 2013; Meng et al. 2019; Wen et al. 2019). Se ha informado, además, una importante actividad antioxidante y antitumoral de los polifenoles de extractos fúngicos de ascocarpos de *M. conica* (Liao et al. 2017). En Chile, se ha descrito la actividad antioxidante de los cuerpos fructíferos de una serie de hongos comestibles silvestres y de cultivo, entre ellos se ha informado actividad antioxidante moderada (40 mg/mL) en ascocarpos de *M. conica*, (Jacinto-Azevedo et al. 2021).

Los compuestos quelantes de metal, como los sideróforos, con alta afinidad por hierro férrico, producidos por diversos microorganismos, presentan una actividad antioxidante secundaria al reducir el potencial redox y estabilizar una serie de iones metálicos (Amsri et al. 2022), por lo que tienen varias aplicaciones en diversos campos como la medicina, microbiología, ecología, biosensores, biorremediación y agricultura (Soares 2022). En *M. tridentina* de la Patagonia aysenina, se ha reportado la producción (81%) de este tipo de compuestos quelantes en los caldos de cultivo en medio papa-dextrosa, y en el mismo estudio se encontró un peak de actividad antioxidante de 32 % del caldo de cultivo, además de un IC<sub>50</sub> del caldo liofilizado de 14,1 mg/mL (Fuentes, 2015).

Con los antecedentes planteados, en este trabajo se realizará una caracterización de los cultivos vegetativos y de la actividad biológica del caldo de fermentación y de los micelios de las especies de *Morchella* presentes en el centro sur de Chile, buscando valorizar los cultivos vegetativo (micelios y caldos extracelulares) del hongo, como una alternativa al uso de los ascocarpos, los cuales además de ser de alto valor comercial, no son fáciles de conseguir a través de recolección ni de producir a través de cultivo artificial. Serán estudiadas especies/ecotipos de *Morchella* procedentes de bosque nativo y de ambientes con perturbación antropogénica (plantaciones forestales quemadas y cosechadas), con la finalidad de evaluar posibles diferencias en las propiedades biológicas relacionadas con la procedencia de las cepas.

#### IV. Hipótesis de trabajo

El crecimiento vegetativo y la actividad biológica de *Morchella* spp. cultivada por fermentación líquida, dependerá de las condiciones de incubación y de la especie en estudio, obteniéndose una actividad antioxidante y un perfil de metabolitos especie-específico y diferenciado entre caldos de cultivo y micelio.

#### V. Objetivos

##### V.1 Objetivo general:

Analizar el crecimiento vegetativo y la actividad biológica de las diferentes especies de *Morchella* provenientes del centro-sur de Chile, evaluando el perfil de metabolitos secundarios en los caldos de cultivo y micelios, bajo condiciones de fermentación en estado líquido.

##### V.2 Objetivos específicos:

- Evaluar el efecto de la composición del medio de cultivo y las condiciones de incubación en el crecimiento vegetativo y la actividad biológica de las diferentes especies de *Morchella*.
- Analizar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos con solvente orgánico (acetato de etilo) a partir del caldo de fermentación de las diferentes especies de *Morchella*.
- Determinar el perfil de metabolitos secundarios de los extractos de los caldos de fermentación y de los micelios de las diferentes especies de *Morchella*, por cromatografía gaseosa acoplada a espectroscopia de masas (CG-MS).

## VI. Materiales y métodos

### 1. Especies de hongos

Las diferentes cepas de *Morchella* previamente aisladas de ascocarpos e identificadas molecularmente (Machuca et al. 2021; Sanz-Rocha et al. 2023) fueron obtenidas de la colección de cultivos del Laboratorio de Biotecnología de Hongos de la Universidad de Concepción, Campus Los Ángeles, las cuales se detallan en la Tabla 1. Éstas fueron reactivadas utilizando medio extracto de malta-agar (EMA) al 2% en placas Petri, cultivadas por 10 días a 24°C.

**Tabla 1:** Especies de *Morchella* utilizadas en el presente estudio.

Espece	Cepa	Localización de origen	Entorno
<i>Morchella importuna</i>	237	Sector Santa Fe, comuna de Los Ángeles, Región del Biobío, Chile.	Plantación de pino cosechado
<i>Morchella eximia</i>	153	Comuna de Hualqui, Región del Biobío Chile.	Plantación de pino quemado
<i>Morchella tridentina</i>	226	Comuna de Palena, Región de Los Lagos, Chile.	Bosque nativo con dominancia de <i>Nothofagus</i>
<i>Morchella andinensis</i>	223	Comuna de Palena, Región de Los Lagos, Chile.	Bosque nativo con dominancia de <i>Nothofagus</i>
<i>Morchella andinensis</i>	110	Cochrane, Región de Aysén, Chile.	Bosque nativo con dominancia de <i>Nothofagus</i>

### 2. Condiciones de cultivo y ensayo exploratorio

En una primera etapa se realizó un ensayo exploratorio con todas las cepas de *Morchella* utilizando dos tipos de medio de cultivo: un medio definido como complejo (MC) y otro como básico (MB) (Tabla 2) y además se evaluaron dos condiciones de incubación: estática y agitada (120 rpm). Estos medios de cultivo fueron diseñados basado en la metodología de dos estudios descritos en la literatura (Diamantopoulou et al. 2012; Wang et al. 2020). Ambos medios contenían glucosa como fuente de carbono, peptona y extracto de levadura como principal fuente de nitrógeno y carbonato de calcio. El MC contenía además macro y

microelementos. El pH de los medios de cultivo (MC y MB) se ajustó a 6,0 y luego se dispensaron 50 mL en matraces Erlenmeyer de 100 mL, los que fueron esterilizados en autoclave durante 15 min a  $121 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , para luego ser inoculados con dos discos de agar-micelio de 5 mm de diámetro de la especie correspondiente (Tabla 1) tomados desde placas stock con crecimiento activo. Los matraces se incubaron durante 10 días a  $24^{\circ}\text{C}$  y al final del cultivo se determinó la producción de biomasa y en los caldos filtrados, la actividad antioxidante, el pH final y la concentración de proteínas y de azúcares reductores. Cada tratamiento se realizó en triplicado. A partir de estos resultados se escogieron las mejores condiciones para los ensayos posteriores.

**Tabla 2:** Componentes y concentraciones de los medios de cultivo utilizados.

Componentes	Concentración (g/L)	
	Medio Complejo	Medio Básico
Glucosa	30,0	30,0
Extracto de levadura	3,0	3,0
Peptona	3,0	3,0
Carbonato de Calcio ( $\text{CaCO}_3$ )	1,0	1,0
Fosfato de Potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,0	-
Sulfato de Magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0,5	-
Sulfato de Amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )	1,0	-
Cloruro de Calcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0,30	-
Sulfato de Manganeso ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	0,04	-
Sulfato de Zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0,02	-
Cloruro de Hierro ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0,08	-

## 2.1 Determinación de biomasa seca

Los matraces se filtraron el día 11 de incubación utilizando un sistema de filtración al vacío con un matraz Kitasato y un embudo Buchner, donde se colocó un papel filtro seco y pesado para luego vaciar el contenido de cada matraz. La biomasa retenida en el papel filtro se dispuso en estufa por 48 h a  $60^{\circ}\text{C}$ , transcurrido el tiempo, los papeles se pesaron en la balanza analítica. La biomasa seca se obtuvo de la sustracción del peso seco del papel con

micelio menos el peso seco inicial del papel. Los resultados se expresaron en g de biomasa por L de caldo de cultivo (g/L).

## **2.2 Determinación del contenido de proteínas solubles**

El contenido de proteínas solubles se determinó por el método Bradford (Bradford 1976) con algunas modificaciones. En un tubo de ensayo, se agregó 0,1 mL del caldo de fermentación filtrado con 1 mL del reactivo Bradford. La mezcla se incubó por 15 min a temperatura ambiente para luego leer la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (Tu-1810 Split Beam UV-VIS). El blanco de medición se realizó utilizando un 0,1 mL de agua destilada en vez de caldo. Los valores de absorbancia se transformaron en concentración de proteínas solubles (mg/mL) utilizando una curva de calibración preparada con diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (0 a 0,3 mg/mL) (Anexo 1).

## **2.3 Determinación del contenido de azúcares reductores**

La concentración de azúcares reductores en los caldos de fermentación se evaluó utilizando el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller 1959), con algunas modificaciones. En un tubo de ensayo se agregó 1 mL de caldo de fermentación filtrado y 1,5 mL del reactivo DNS. Los tubos se llevaron a baño maría a 100°C por 5 min para luego enfriar y leer la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro (Tu-1810 Split Beam UV-VIS). En algunos casos fue necesario diluir con agua destilada los caldos debido a la alta concentración de azúcares reductores presente en las muestras. El blanco se preparó utilizando un 1 mL de agua destilada en vez de caldo. Los valores de absorbancia se transformaron en concentración de azúcares reductores (g/L) utilizando una curva de calibración preparada con diferentes concentraciones de glucosa (0 a 1 g/L) (Anexo 2).

## **2.4 Actividad antioxidante de los caldos de fermentación**

El ensayo de captación de radicales libres se realizó con el reactivo 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH). Para este análisis se siguió la metodología de Badshah et al. (2021) con algunas modificaciones. Se preparó una solución metanólica de DPPH 0,028 mg/mL, la cual se mantuvo protegida de la luz, y cuya absorbancia fue ajustada para obtener un valor cercano a  $0,9 \pm 0,1$  a una longitud de onda de 517 nm.

Para la determinación de la actividad antioxidante, en un tubo de ensayo se añadieron 175 µL del caldo de fermentación y 2 mL de la solución de DPPH, para luego agitar suavemente durante 1 min. Después de 30 min de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, la absorbancia se midió a 517 nm en el espectrofotómetro (Tu-1810 Split Beam UV-VIS). El blanco empleado para las mediciones fue metanol, y el control negativo una mezcla de 1 mL de DPPH y 175 µL de metanol. La actividad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición (%), lo que corresponde a la cantidad del radical DPPH que logró ser neutralizado por los compuestos antioxidantes presentes en el caldo de fermentación, obtenido con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

Donde A0 es la absorbancia del control negativo y A1 es la absorbancia de la muestra.

### 3. Cinética de crecimiento

Para determinar el periodo de tiempo donde el caldo de cultivo muestre su mayor actividad antioxidante, las cepas de *Morchella* con los mejores resultados en el ensayo exploratorio (cepas 153, 223, 226 y 237) se volvieron a cultivar durante 20 días en medio MC bajo agitación, realizando mediciones en diferentes tiempos de incubación. Se dispensaron 50 mL de MC (pH 6) en matraces Erlenmeyer de 100 mL, los que fueron esterilizados en autoclave durante 15 min a  $121 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , para luego ser inoculados con dos discos de agar-micelio de 5 mm tomados de placas stock, con crecimiento activo de cada especie. Al finalizar cada periodo de cultivo, se retiraron 3 matraces de cada especie en forma completamente aleatoria para realizar las mediciones de biomasa, y en los caldos de cultivo determinar la variación del pH, actividad antioxidante, contenido de proteínas y de azúcares reductores. Adicionalmente, se determinó la presencia de compuestos quelantes de metal en los caldos de fermentación.

#### 3.1 Detección de compuestos quelantes de metal (CQM) en los caldos de cultivo

Para la detección de los CQM del tipo sideróforos en los caldos de fermentación de las distintas especies de *Morchella*, se siguió una metodología clásica (Schwyn and Neilands

1987). En un tubo de ensayo se mezcló 1 mL del caldo filtrado con 1 mL del reactivo Cromo Azurol S (CAS) que contiene Fe (III). Los tubos de ensayo se incubaron por 1 h a temperatura ambiente para luego leer la absorbancia a 630 nm en el espectrofotómetro (Tu-1810 Split Beam UV-VIS). Como control, se utilizó el medio de cultivo sin inocular más 1 mL del reactivo (CAS). Los valores de absorbancia se expresaron como porcentaje (%) de CQM producidos por cada especie, utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ compuestos quelantes} = \frac{A - A1}{A} \times 100$$

Donde A es la absorbancia del control y A1 es la absorbancia de la muestra. Los valores de CQM superiores al 10% se consideraron significativos (Machuca et al. 2007).

#### **4. Cultivo para la obtención de extractos orgánicos a partir del caldo de fermentación y los micelios**

Con el fin de producir caldo de cultivo y micelio en cantidades suficientes para realizar extracciones con solvente orgánico para posteriores análisis, las especies seleccionadas de los ensayos anteriores se cultivaron por 20 días a 24°C en condiciones de agitación (120 rpm). Se dispensaron 700 mL de MC (pH 6) en matraces Erlenmeyer de 1000 mL, los que fueron esterilizados en autoclave durante 15 min a 121 ± 0,5°C, para luego ser inoculados con 20 discos de agar-micelio de 6 mm tomados desde placas stock con crecimiento activo. Al finalizar el periodo de cultivo, se realizaron los mismos análisis anteriores de biomasa, variación del pH, actividad antioxidante, contenido de proteínas solubles y de azúcares reductores. Posteriormente los caldos y los micelios fueron sometidos a una extracción con solvente orgánico.

##### **4.1 Extracción para análisis del perfil de metabolitos secundarios**

La biomasa micelial cosechada de los cultivos de cada especie se sometió a una extracción sólido-líquido con acetato de etilo. En un matraz Erlenmeyer de 100 mL se añadieron 7 g de micelio seco pulverizado y 70 mL de acetato de etilo. La mezcla se agitó a 120 rpm por 5 h y 24°C, para luego filtrar el extracto a través de un papel filtro. El filtrado se transfirió a un matraz de fondo redondo, para luego llevar a un rotavapor a 40°C, donde

se evaporó el solvente hasta sequedad. El extracto se almacenó a 4°C para su posterior análisis.

Los caldos de fermentación filtrados de cada especie se sometieron a una extracción con acetato de etilo (2 x 100 mL). Para esto, los caldos se acidificaron a pH 3 utilizando HCl 6 M, y luego se transfirieron a un embudo de decantación con acetato de etilo en proporción 4:1. La mezcla se agitó vigorosamente y se dejó separar la fase acuosa y orgánica en un soporte bajo campana de extracción. Una vez separadas las fases, se repitió este proceso. Las fases orgánicas de cada especie se juntaron en un matraz de fondo redondo y se concentró luego se concentraron en un rotavapor a 40 °C, hasta sequedad. Los extractos se almacenaron a 4°C para su posterior análisis.

#### **4.2 Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS) de los extractos**

Los extractos orgánicos obtenidos con acetato de etilo de los caldos de fermentación y micelios fueron analizados por Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas (CG-MS) en un cromatógrafo de gases (Agilent 7890A, California, EE.UU) equipado con un detector de masas (Agilent 5975C), utilizando una columna capilar de sílice HP-5MS de 30m x 0,25 mm de diámetro interno y una película de 0,25 µm de espesor, bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial de 100 °C durante 3 min, aumentando en 10 °C/min hasta 280 °C y manteniéndose durante 20 min. El flujo de gas portador (He) fue de 1 mL/min. La caracterización de los compuestos se realizó mediante la comparación con la base de datos NIST2017®. Estos análisis fueron realizados en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, de la Universidad de Concepción.

#### **5. Actividad antioxidante y determinación de IC<sub>50</sub>**

A los extractos obtenidos con acetato de etilo desde los caldos de cultivo se les determinó la actividad antioxidante, siguiendo la metodología descrita en 2.4, excepto porque aquí se utilizaron diferentes concentraciones de los extractos para determinar la concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) que corresponde a la concentración que logra inhibir el 50% del radical libre DPPH. Para ello, 175 µL de diferentes concentraciones (2,5-25 mg/mL) del extracto resuspendidos en agua desionizada se mezclaron con el DPPH. El IC<sub>50</sub> de cada extracto se

obtuvo a partir del análisis de regresión lineal de la curva de inhibición de los extractos frente al DPPH (Anexo 3). Los resultados se compararon con una curva de calibración utilizando ácido gálico (2-20 µg/mL) (Anexo 4) y se expresaron en µg equivalentes de ácido gálico por mg de extracto del caldo de cultivo.

## 6. Contenido de fenoles totales de los extractos

El contenido de fenoles totales (CFT) de los extractos se determinó de acuerdo con Magalhães et al. (2010) con algunas modificaciones. Para ello, 250 µL de una solución de 2,5 mg/mL de los extractos obtenidos del caldo de cultivo se mezclaron con 250 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (10% v/v). La mezcla se agitó y dejó reaccionar por 2 min, para luego adicionar 250 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10 %). Después de 1 h de reposo en la oscuridad y a temperatura ambiente, las absorbancias se leyeron a 750 nm utilizando un espectrofotómetro (Tu-1810 Split Beam UV-VIS). La concentración total de fenoles se expresó como µg de equivalentes de ácido gálico por mg de extracto, utilizando la siguiente ecuación obtenida a partir de la curva de calibración de ácido gálico (R = 0,9938) (Anexo 5).

$$\text{Fenoles totales} = \frac{\text{Absorbancia (750 nm)} + 0,0067}{0,034}$$

## 7. Análisis Estadístico

Todos los análisis se realizaron en triplicado bajo un diseño completamente aleatorio. Los resultados se expresaron como valor medio ± desviación estándar (DE). Para todos los conjuntos de datos, los supuestos de normalidad y homocedasticidad de varianza se verificaron utilizando las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. La comparación de medias se llevó a cabo mediante análisis de varianza factorial (Factorial ANOVA). La significancia estadística se determinó usando la prueba de Tukey (p < 0,05). Todos los análisis se realizaron utilizando el software Statistica v13.0.

## VII. Resultados

### 1. Ensayo exploratorio

El crecimiento vegetativo micelial de las diferentes cepas de *Morchella* fue distinto entre los tratamientos. En condición de agitación el micelio de todas las cepas formó pellets esféricos, mientras que en la condición estática las cepas crecieron formando una película de micelio en la superficie del medio de cultivo que en algunos casos ascendía en forma de micelio aéreo por las paredes del matraz (**Figura 1**). Las especies con mayor crecimiento aéreo en el medio MB y en condición estática fueron *M. eximia*, *M. tridentina* y *M. andinensis* (223). Fue posible observar cambios notorios en la pigmentación de los micelios entre las especies en los diferentes tratamientos. *M. importuna* bajo agitación en MB generó un color café amarillento, mientras que en MC tuvo un crecimiento moderado y el micelio tenía una pigmentación café oscuro. Los cultivos de *M. importuna* tenían un aroma dulce penetrante semejante al de los ascocarpos frescos de *Morchella spp.* En MB hubo una menor pigmentación, generando colores más amarillentos en los caldos y micelio en todas las especies, mientras que en MC se presentaron los cultivos más pigmentados, con diferentes colores dependiendo de la especie y condición de incubación.

*M. eximia* y *M. tridentina* presentaron una pigmentación similar en los caldos y micelios de los distintos tratamientos. En agitación en MB ambas especies generaron un micelio de color amarillo pálido, mientras que en MC generaron un micelio color gris y marrón oliva respectivamente. En la condición estática estas especies presentaron un color amarillento en MB y café oscuro en MC. *M. tridentina*, tuvo un abundante crecimiento de biomasa por las paredes del matraz, principalmente en MB (**Figura 1**), el aroma de los cultivos de esta especie fue intenso y fresco.

*M. andinensis* (223) en la condición de agitación y en MB tuvo un crecimiento micelial abundante que ascendió por las paredes del matraz, acompañado de un color amarillo, mientras que en MC solo mostró un leve crecimiento micelial de un color gris amarillento. El otro ecotipo de *M. andinensis* (110) presentó el menor crecimiento, pero su micelio en agitación tomó una coloración café oscura en MC, mientras que en MB era levemente amarillo (**Figura 1**). El aroma más penetrante fue el del cultivo de la cepa 223.

Condicion	Agitación		Estático	
Cepa	MB	MC	MB	MC
<i>M. importuna</i> 237				
<i>M. eximia</i> 153				
<i>M. tridentina</i> 226				
<i>M. andinensis</i> 223				
<i>M. andinensis</i> 110				

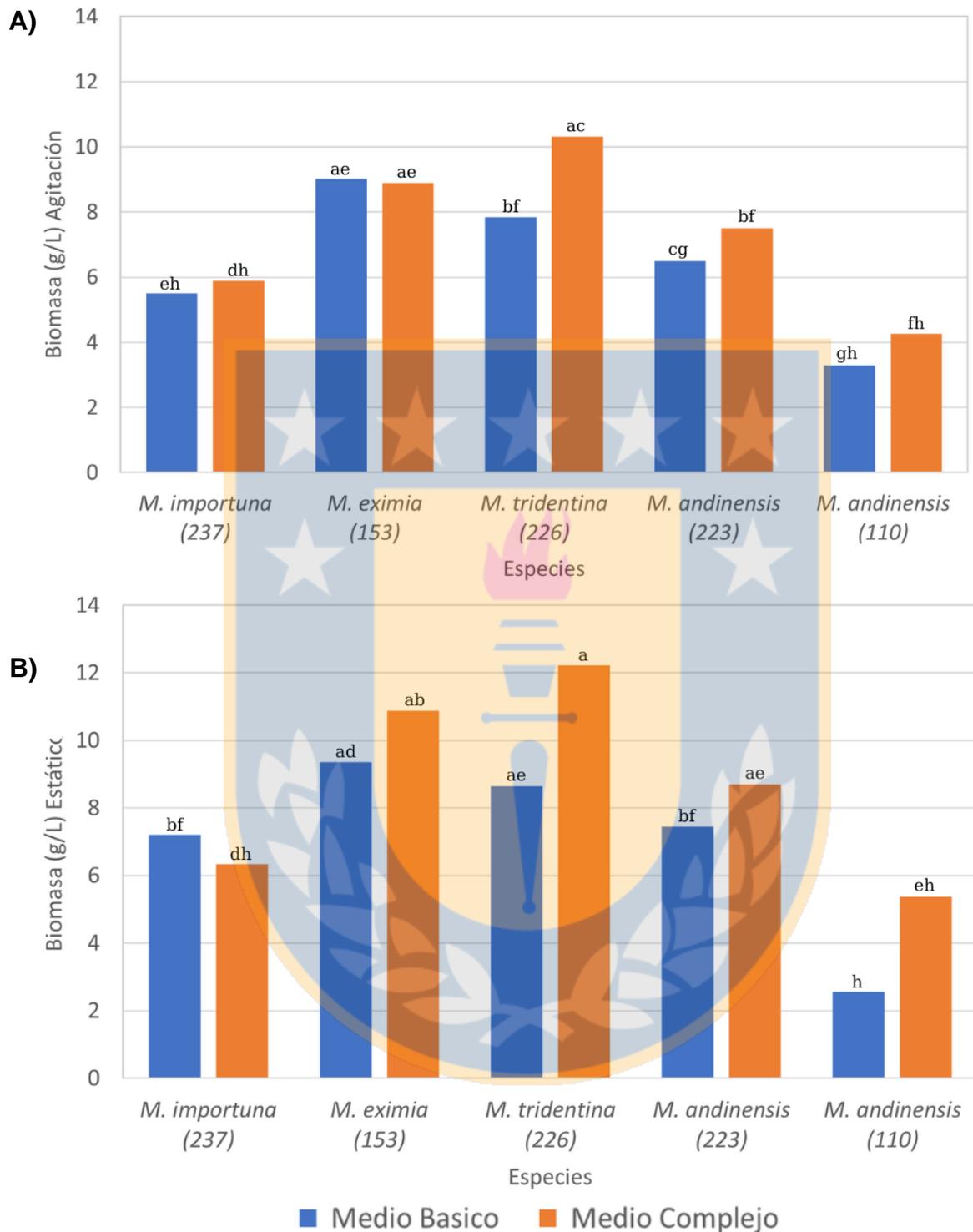
**Figura 1:** Cultivos miceliales de las diferentes especies de *Morchella* a los 10 días de incubación en medio MC y MB bajo la condición de agitación (120 rpm) y estática.

La producción de biomasa total en ambos medios de cultivo fue abundante, en todas las especies (**Figura 2**), excepto la cepa 110 de *M. andinensis*, quien tuvo un crecimiento muy limitado en todos los tratamientos, alcanzando la menor producción de biomasa ( $2,56 \pm 0,47$  g/L) en MC en condición estática (**Figura 2 B**). Por otro lado *M. tridentina*, logró la mayor producción de biomasa ( $12,21 \pm 0,4$  g/L) en MC en condición estática, pero sin

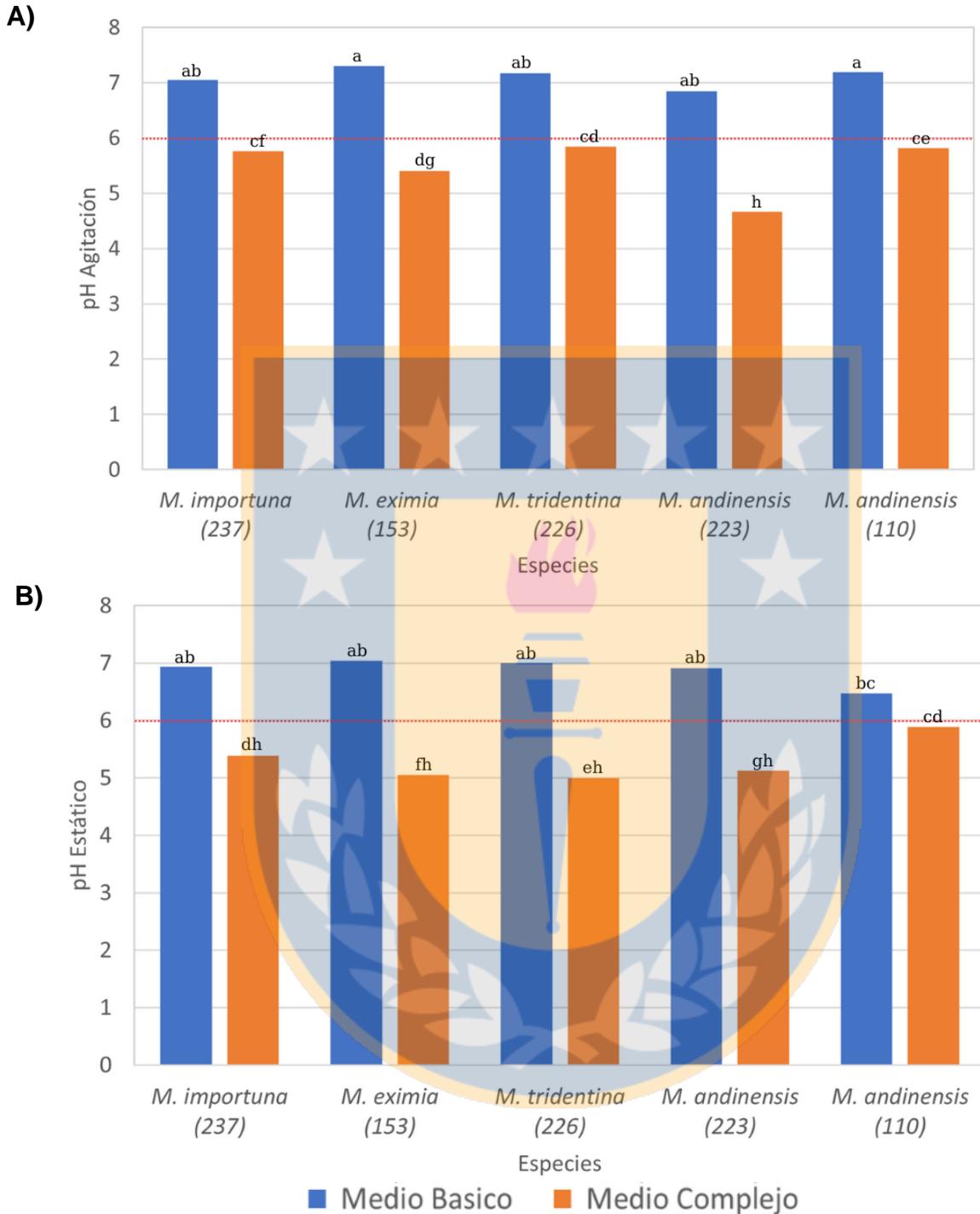
diferencias significativas con *M. eximia* y *M. andinensis* (223) bajo las mismas condiciones. En la mayoría de los tratamientos la producción de biomasa fue ligeramente mayor en MC que en MB bajo la misma condición de incubación (**Figura 2**).

Tanto en la condición de agitación como en la condición estática (**Figura 3**), las especies de *Morchella* tendieron a aumentar el pH del medio en MB respecto al pH inicial (6,0), llevando el caldo a un pH cercano a 7, sin diferencias significativas entre las especies. Mientras que en MC la tendencia de las especies fue a acidificar el medio, obteniéndose el pH significativamente más bajo en los caldos de *M. andinensis* (223) en MC bajo agitación ( $\text{pH } 4,66 \pm 0,27$ ). En estas mismas condiciones, las otras especies mantuvieron el medio en un rango de pH de 5,40 - 5,84, mientras que, en MC estático, el rango fue levemente más bajo (4,99 – 5,40). El caldo de *M. andinensis* (110) tuvo un pH cercano al inicial en todos los tratamientos, excepto MB bajo agitación ( $\text{pH } 7,19 \pm 0,11$ ) (**Figura 3A**).

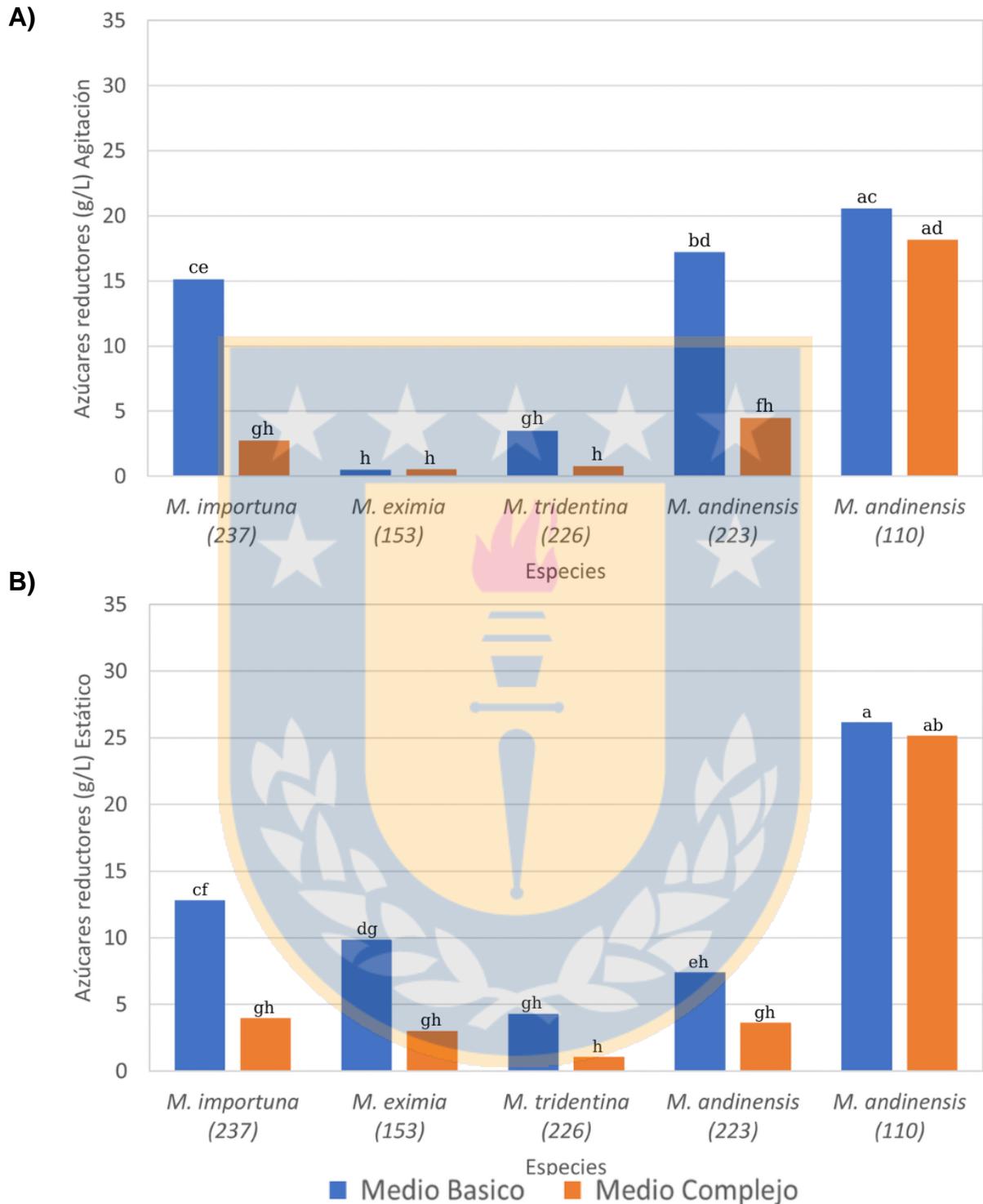
La concentración mínima de azúcares reductores en los caldos de cultivo luego de 10 días de incubación (**Figura 4**) se alcanzó con *M. tridentina* en MC, junto con *M. eximia* en MC y MB, en la condición de agitación con valores inferiores a 1 g/L. Por otro lado, los menores consumos fueron detectados en los caldos de *M. andinensis* (110) en MB y MC (26,18 y 25,16 g/L, respectivamente), en condición estática (**Figura 4B**), relacionándose directamente con el bajo desarrollo micelial de esta especie. En la mayoría de las especies, en la condición de agitación y en MC se detectaron los mayores consumos de azúcares reductores.



**Figura 2:** Biomasa micelial producida por las diferentes especies de *Morchella* en el ensayo exploratorio al día 10 de cultivo, en MB y MC. A) Cultivo incubado bajo agitación (120 rpm). B) Cultivo incubado en condición estática. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas por test de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3:** pH de los caldos de cultivo de las diferentes especies de *Morchella* en el ensayo exploratorio al día 10 de incubación, en MB y MC. La línea segmentada roja en los gráficos indica el pH inicial (6,0). A) Cultivo incubado bajo agitación B) Cultivo incubado en condición estática. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas por test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

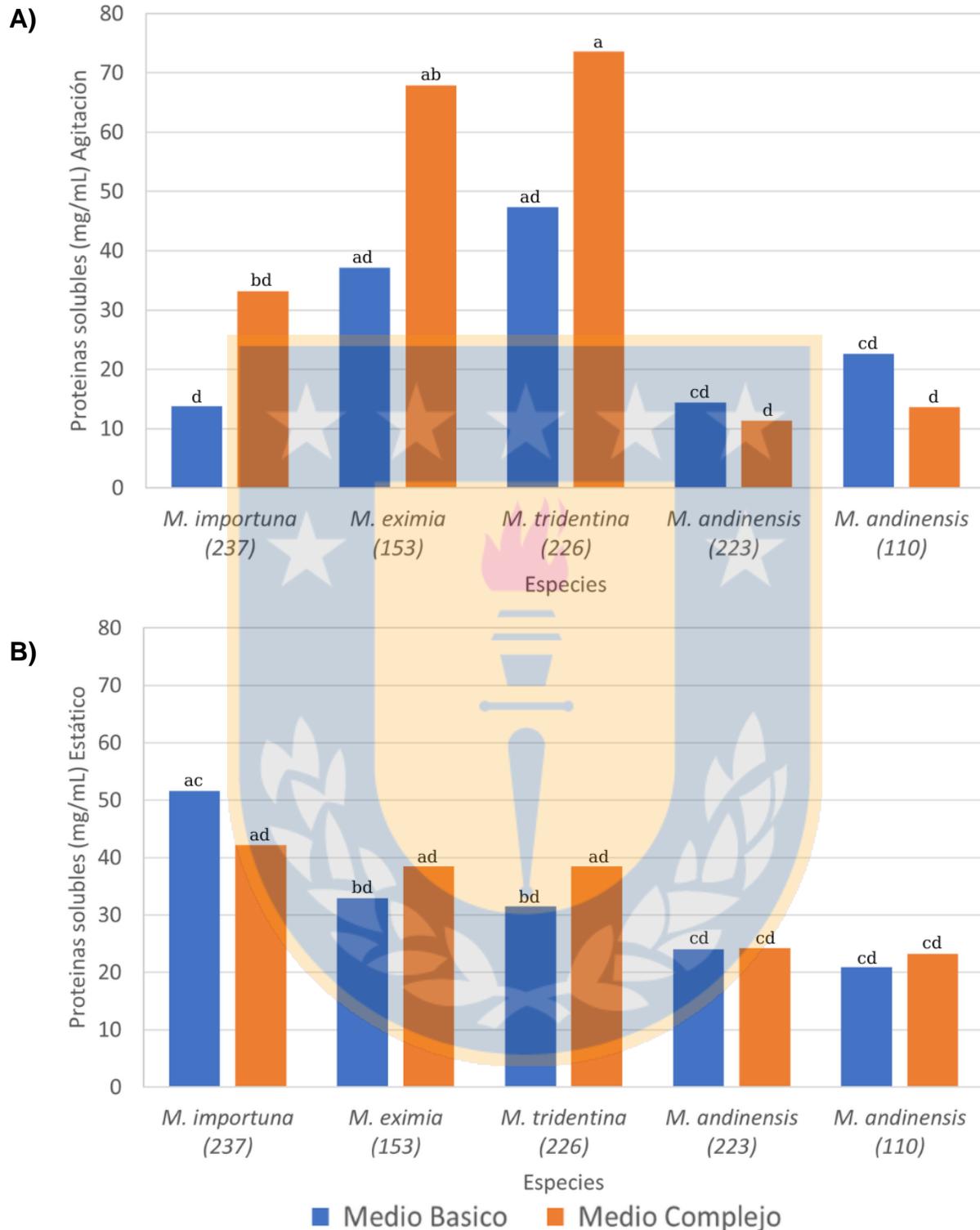


**Figura 4:** Contenido de azúcares reductores en los caldos de fermentación de las diferentes especies de *Morchella* en el ensayo exploratorio al día 10 de incubación, en MB y MC, con una concentración inicial de glucosa en el medio de cultivo de 30 g/L. A) Cultivo incubado bajo agitación (120 rpm). B) Cultivo incubado en condición estática. Letras diferentes sobre las cajas indican diferencias significativas por test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

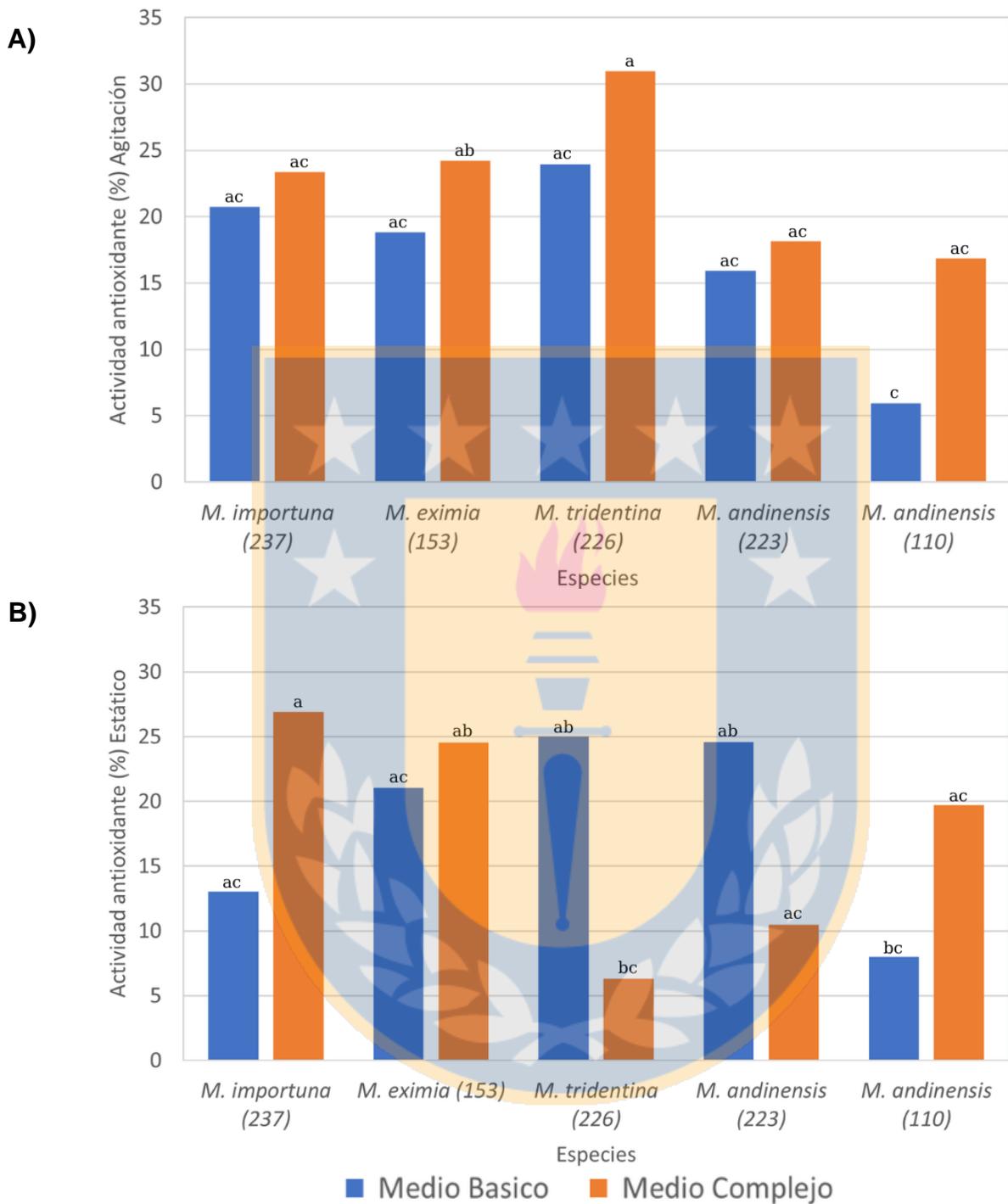
La concentración más alta de proteínas solubles ( $73,6 \pm 15,7$  mg/mL) fue detectada en los caldos de *M. tridentina*, seguida de *M. eximia* ( $67,9 \pm 24,3$  mg/mL), ambas en MC bajo agitación (**Figura 5A**). En tanto que los menores valores fueron detectados en los caldos de ambas cepas de *M. andinensis*, con valores entre 11 – 14 mg/mL en ambos medios (MC y MB), bajo agitación. En condición estática, no hubo diferencias significativas entre MC y MB, mientras que, bajo agitación, hubo algunas especies que tuvieron mayor concentración de proteínas solubles en MC (**Figura 5A,B**).

La actividad antioxidante determinada como inhibición (%) del radical DPPH en los caldos de cultivo de las especies de *Morchella* (**Figura 6**), fue máxima en los caldos de *M. tridentina*, alcanzándose  $30,9 \pm 8,6\%$  de inhibición del radical DPPH en MC bajo agitación. Por otro lado, la menor actividad antioxidante fue de  $5,6 \pm 5,8\%$  en los caldos de *M. andinensis* (110) en MB bajo agitación (**Figura 6A**). En ambas condiciones de cultivo, la mayoría de las especies de *Morchella* mostró una actividad antioxidante ligeramente mayor en MC.

De acuerdo con estos resultados, para los próximos ensayos se escogió el medio de cultivo complejo (MC) bajo la condición de agitación (120 rpm), para los ensayos de cinética y cultivo para extracción con solvente orgánico. En estos ensayos se continuarán utilizando las mismas especies de *Morchella*, excepto la cepa 110 de *M. andinensis*, que no se utilizará debido a su bajo rendimiento y desarrollo.



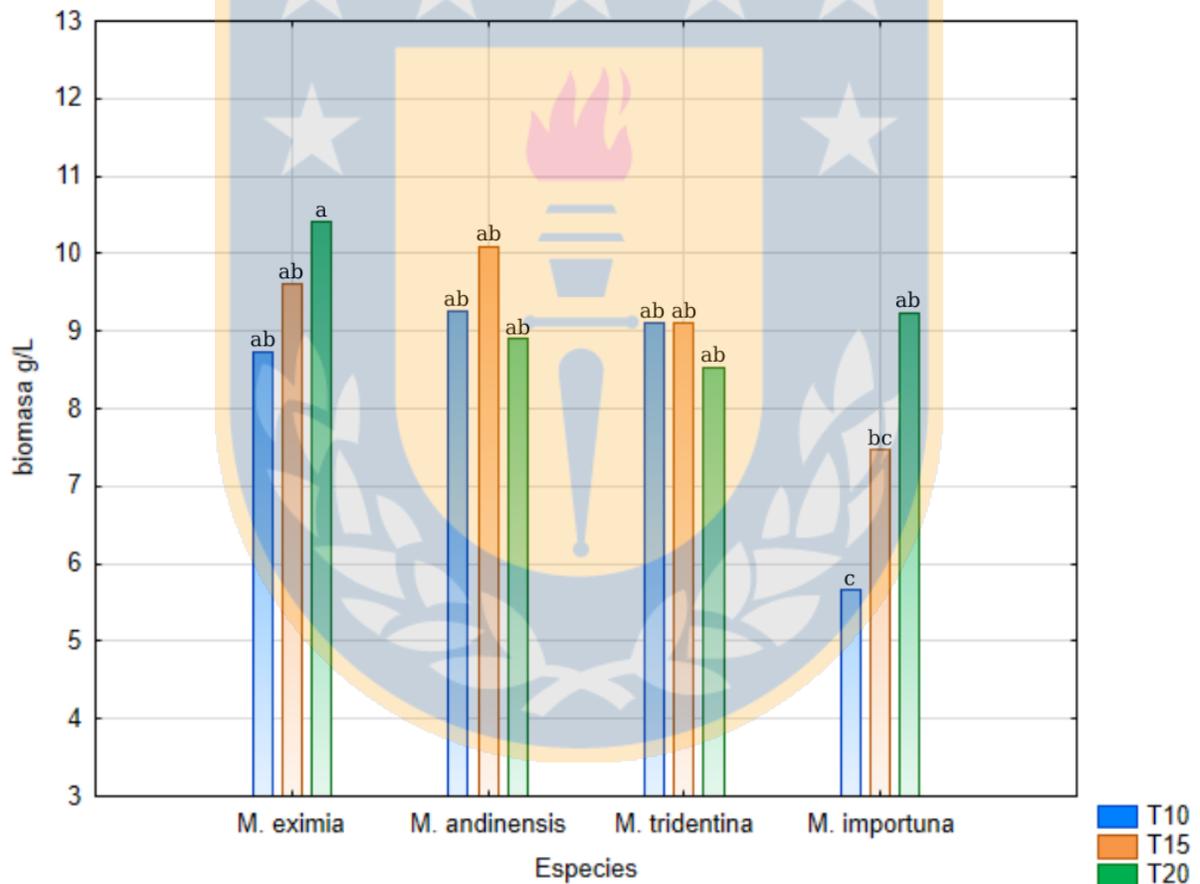
**Figura 5:** Contenido de proteínas solubles en los caldos de cultivo de las diferentes especies de *Morchella* en el ensayo exploratorio al día 10 de incubación, en MB y MC. A) Cultivo incubado bajo agitación (120 rpm). B) Cultivo incubado en condición estática. Letras diferentes sobre las cajas indican diferencias significativas por test de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 6:** Actividad antioxidante de los caldos de cultivo de las diferentes especies de *Morchellas* determinada como la inhibición (%) del radical libre DPPH en el ensayo exploratorio al día 10 incubación, en MB y MC. A) Cultivo incubado bajo agitación (120 rpm). B) Cultivo incubado en condición estática. Letras diferentes sobre las cajas indican diferencias significativas por test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

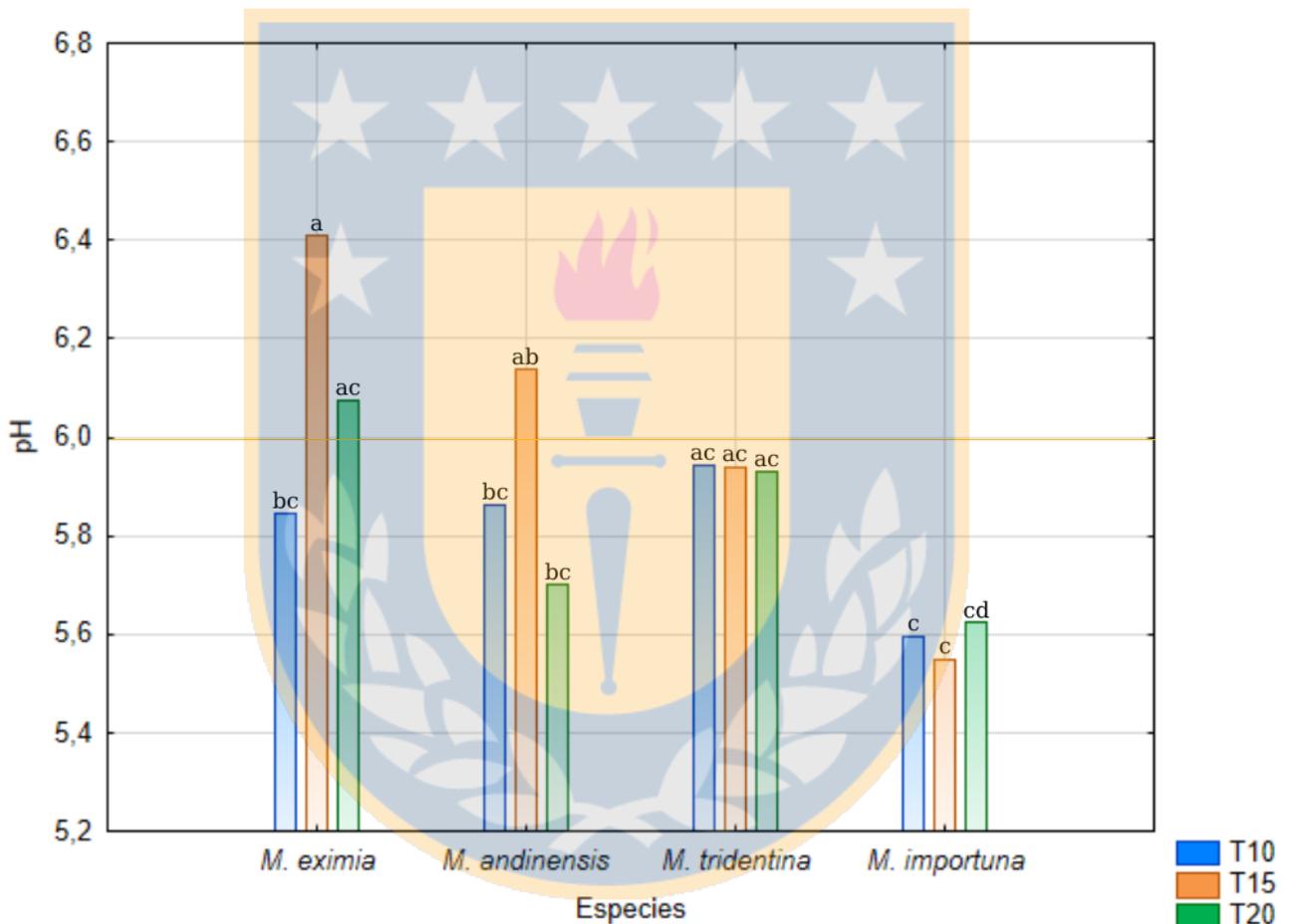
## 2. Cinética de crecimiento

Al evaluar el crecimiento vegetativo a través de la producción de biomasa de las especies de *Morchella* durante los diferentes periodos de incubación en fermentación líquida, se observó que las especies mantuvieron un rendimiento similar entre sí, sin diferencias significativas. Una excepción fue el caso de *M. importuna*, única especie donde se observó un aumento significativo de biomasa con el aumento del tiempo de incubación (**Figura 7**). Las mayores producciones de biomasa fueron detectadas en *M. eximia* al día 20 ( $10,4 \pm 0,4$  g/L) y *M. andinensis* al día 15 ( $10,1 \pm 0,3$  g/L), aunque sin diferencias significativas entre las especies.



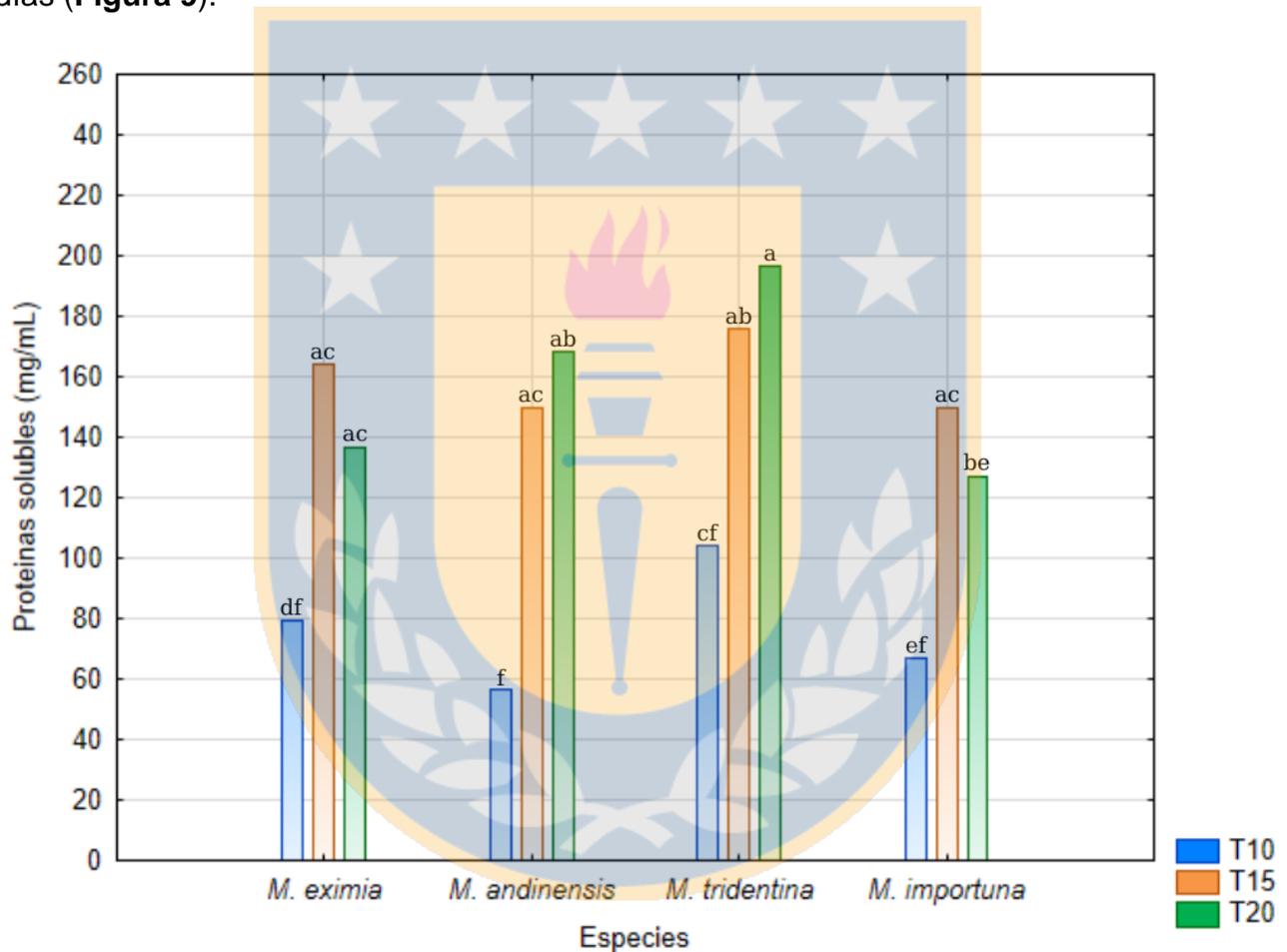
**Figura 7:** Producción de biomasa micelial (g/L) durante diferentes periodos de crecimiento (T10-T20) de *Morchella* spp. en MC, bajo agitación (120 rpm). Letras distintas sobre las columnas indican diferencias significativas por test de Tukey ( $p < 0,05$ ) comparando entre todas las especies y los tiempos de incubación.

Respecto a los cambios en el pH de los caldos de fermentación, las especies de *Morchella* (**Figura 8**), los valores se mantuvieron alrededor del pH inicial (6,0). El máximo valor fue alcanzado por *M. eximia* y *M. andinensis* en el día 15, teniendo ambas un aumento en el pH desde el día 10 al 15, para luego volver a bajar en el día 20 de cultivo, aunque sin diferencias significativas. *M. importuna* fue la especie que más acidificó el medio de cultivo (5,6) respecto al pH inicial, pero se mantuvo constante en los tiempos evaluados.



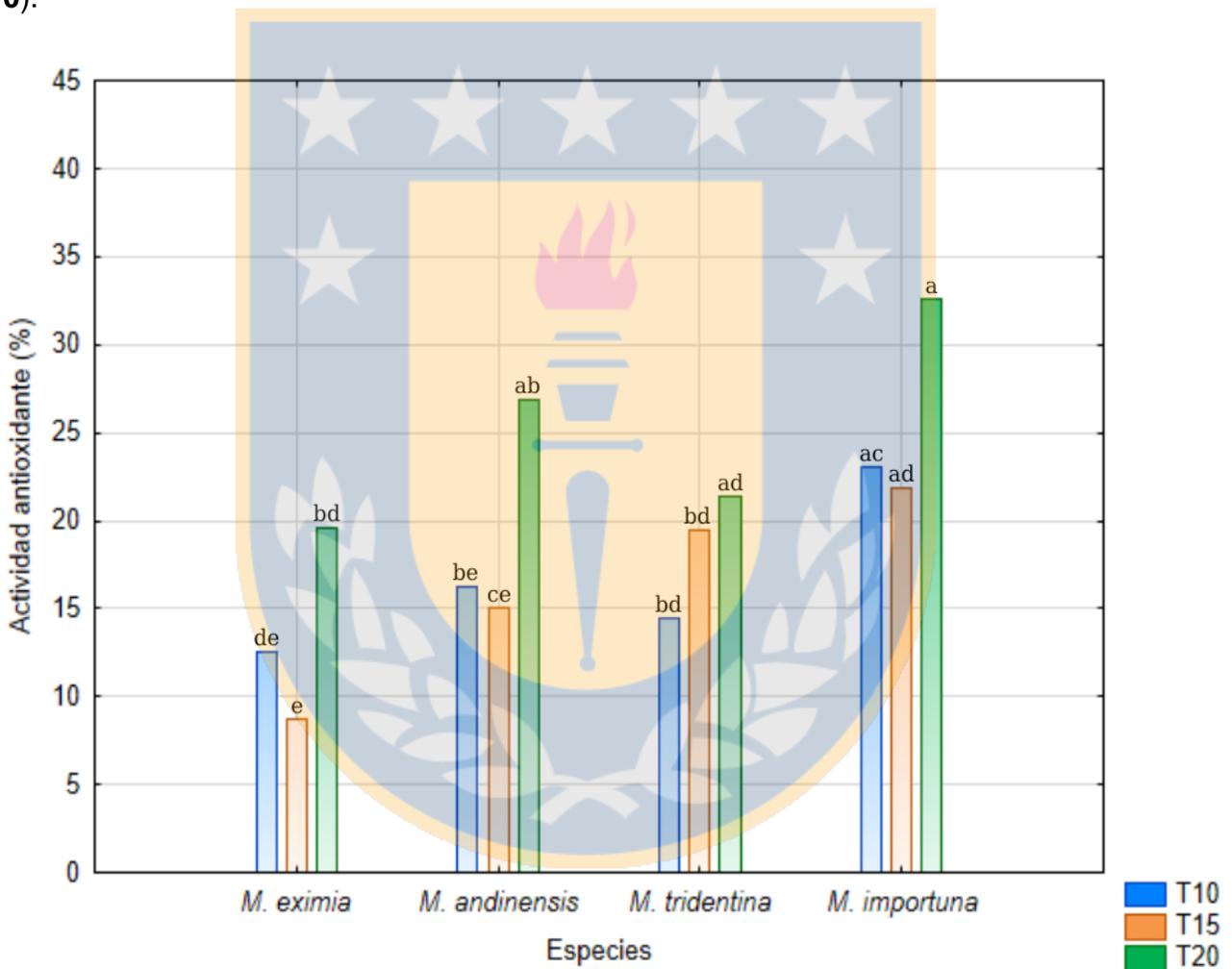
**Figura 8:** Cambios en el pH de los caldos de cultivo *Morchella* spp. creciendo en MC durante diferentes periodos de tiempo (T10-T20) bajo agitación (120 rpm). Letras distintas sobre las columnas indican diferencias significativas por test de Tukey ( $p < 0,05$ ), comparando entre todas las especies y los tiempos de incubación.

La concentración de proteínas solubles fue semejante entre las distintas especies, a través de los diferentes periodos de incubación, alcanzándose las máximas producciones entre los 15 y 20 días (entre 170 - 196 mg/mL) (**Figura 9**). Se observó una tendencia *M. tridentina* > *M. andinensis* ≈ *M. eximia* > *M. importuna* en la concentración de proteínas solubles, aunque sin diferencias significativas entre las especies. En relación con la producción en función del tiempo de incubación, *M. importuna* mostró un comportamiento diferenciado, con la mayor producción de proteínas en el día 15 de incubación y una disminución significativa a los 20 días (**Figura 9**).



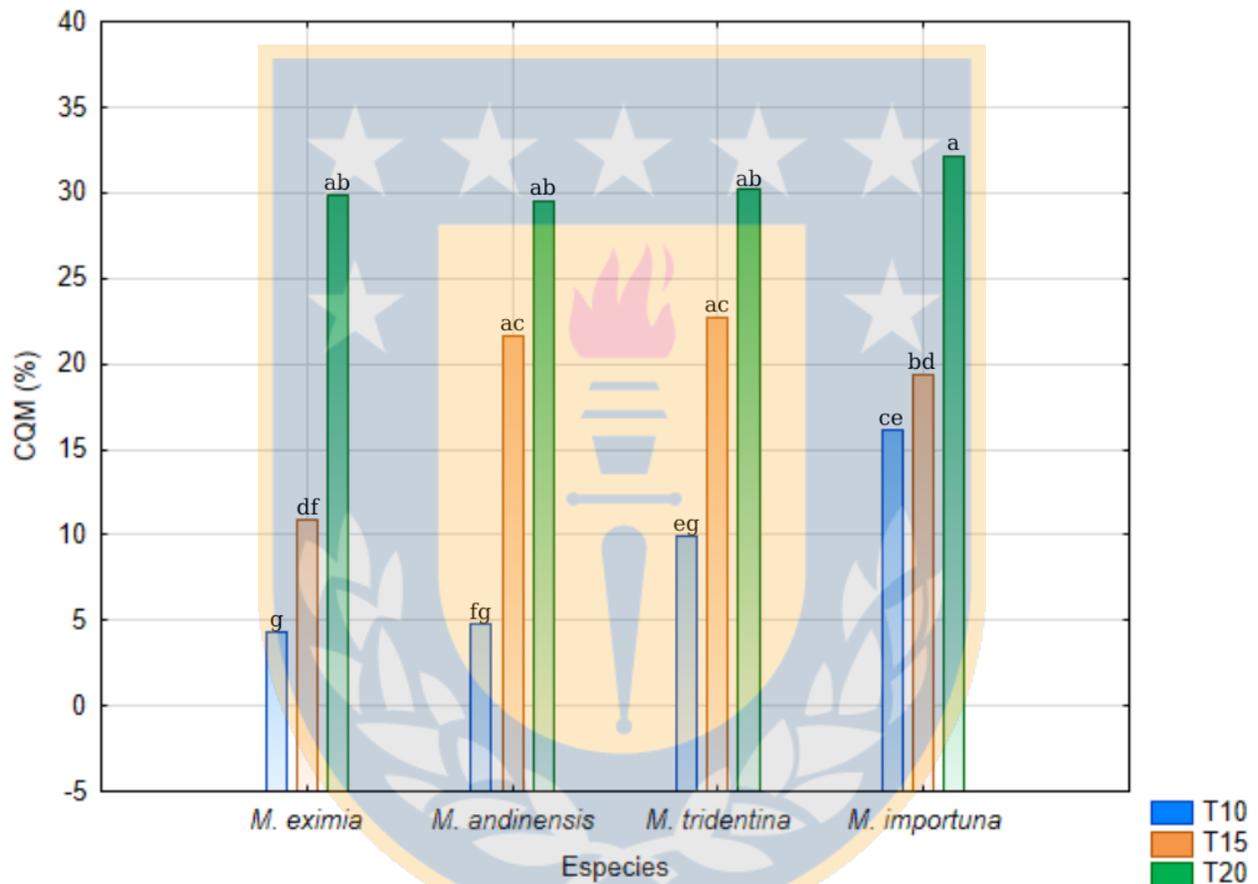
**Figura 9:** Producción de proteínas solubles (mg/mL) en el caldo de cultivo *Morchella* spp. creciendo en MC durante diferentes periodos de tiempo (T10-T20) bajo agitación (120 rpm). Letras distintas sobre las columnas indican diferencias significativas por test de Tukey ( $p < 0,05$ ), comparando entre todas las especies y los tiempos de incubación.

La actividad antioxidante, determinada como el porcentaje de inhibición del radical DPPH por el caldo de fermentación aumentó de manera significativa en función del tiempo de incubación, para la mayoría de las especies de *Morchella* (**Figura 10**). Todas las especies alcanzaron su máximo de actividad antioxidante en el día 20, excepto en los caso de *M. tridentina* y *M. importuna* que no mostraron diferencias significativas entre los diferentes tiempo de incubación. La actividad antioxidante más alta fue detectada en los caldos de cultivo de *M. importuna* ( $32,58 \pm 1,58 \%$ ), seguida de *M. andinensis* ( $26,81 \pm 2,7 \%$ ) (**Figura 10**).



**Figura 10:** Actividad antioxidante (%) de los caldos de cultivo de *Morchella* spp. en medio MC, durante diferentes periodos de tiempo (T10-T20), bajo agitación (120 rpm). Letras distintas sobre las columnas indican diferencias significativas por test de Tukey ( $p < 0,05$ ), comparando entre todas las especies y los tiempos de incubación.

La producción de compuestos quelantes de metal (CQM) del tipo sideróforos, siguió una tendencia similar a la actividad antioxidante de aumento significativo en función del tiempo de incubación, para la mayoría de las especies de *Morchella*, alcanzándose los mayores porcentajes de CQM en el día 20 de incubación (**Figura 11**). Los valores más altos fueron detectados en los caldos de *M. importuna* ( $32,08 \pm 0,98$  %), aunque sin diferencias significativas entre las especies.

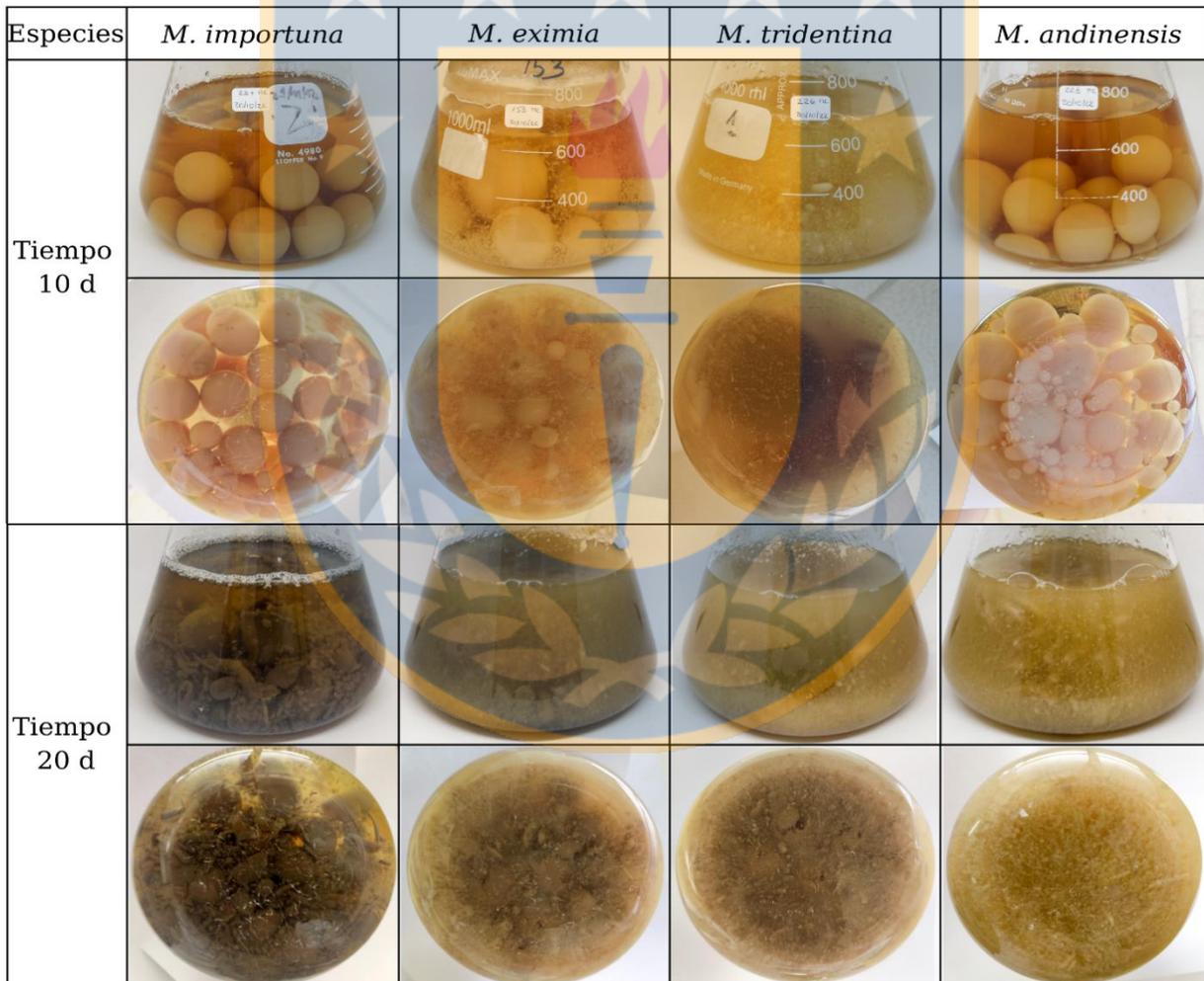


**Figura 11:** Producción de compuestos quelantes de metal (%) por los caldos de cultivo de *Morchella* spp. en medio MC, durante diferentes periodos de tiempo (T10-T20), bajo agitación (120 rpm). Letras distintas sobre las columnas indican diferencias significativas por test de Tukey ( $p < 0,05$ ), comparando entre todas las especies y los tiempos de incubación.

Basado en los resultados de estos ensayos, se escogió el tiempo de incubación de 20 días para los cultivos de las especies de *Morchella* destinadas a la extracción con solvente orgánico (acetato de etilo) de sus caldos y micelios.

### 3. Cultivo de *Morchella* spp. para obtención de extractos orgánicos

El cultivo en los matraces de 1 L en medio MC y agitación (120 rpm) mostró un abundante crecimiento de todas las especies (**Figura 12**), las que formaron rápidamente abundantes pellets esféricos de micelio, los cuales con el pasar del tiempo (20 días) se fueron fragmentando. Al día 10 de cultivo las especies clarificaron los caldos de fermentación, pero al día 20 estaban más turbios. Hubo un cambio notorio en el color del caldo y el micelio desde el día 10 al 20 en todas las especies, y entre ellas *M. importuna* generó una pigmentación café oscura, mientras que las otras especies tuvieron una pigmentación café más clara (**Figura 12**).



**Figura 12:** Cultivo de *Morchella* spp. en matraces de 1 L a los 10 y 20 días de crecimiento en medio MC (pH 6), bajo agitación (120 rpm). Las imágenes corresponden a fotografías frontales e inferiores.

El resumen de las propiedades de los diferentes cultivos se muestra en la **Tabla 3**. Las especies mostraron una alta producción de biomasa micelial que siguió la tendencia *M. eximia* = *M. tridentina* > *M. andinensis* > *M. importuna*. En lo que respecta al pH, todas las especies tendieron a la acidificación del medio, con *M. andinensis* mostrando la mayor acidificación en relación con el pH inicial (6,0). Todas las especies consumieron los azúcares de manera importante en los caldos de cultivo a los 20 días de incubación, donde se detectaron concentraciones inferiores a 1 g/L. La actividad antioxidante en estos caldos no mostró diferencias significativas entre las especies y se mantuvo en un rango 23-31 % (**Tabla 3**).

**Tabla 3:** Resumen de las propiedades del caldo de fermentación de *Morchella* spp.

Especie	Biomasa (g/L)	pH	Azúcares reductores (g/L)	Proteínas solubles (mg/mL)	Actividad antioxidante (%)
<i>M. eximia</i>	6,74 ± 0,3a	5,80 ± 0,2a	0,74 ± 0,1a	182,79 ± 32,4a	23,23 ± 1,4a
<i>M. importuna</i>	4,45 ± 0,1c	5,34 ± 0,1ab	0,54 ± 0,1b	178,23 ± 18,9a	31,48 ± 2,6a
<i>M. andinensis</i>	5,72 ± 0,2b	4,93 ± 0,5b	0,72 ± 0,1ab	151,64 ± 14,3a	28,86 ± 5,3a
<i>M. tridentina</i>	6,84 ± 0,3a	5,56 ± 0,2b	0,81 ± 0,1a	180,81 ± 14,9a	24,87 ± 2,4a

Los valores en las columnas corresponden a los promedios ± SD y las letras diferentes dentro de una columna indican diferencias significativas por test de Tukey (p<0,05).

A la biomasa micelial seca y al caldo de fermentación cosechado de ese ensayo se le sometió a una extracción con solvente orgánico (acetato de etilo), para luego realizar un análisis del perfil de metabolitos secundarios por CG-MS. Además, al extracto del caldo se le evaluó la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles totales.

#### 4. Actividad antioxidante y contenido de polifenoles totales de los extractos del caldo de *Morchella* spp.

El menor IC<sub>50</sub> fue detectado en el extracto de los caldos de fermentación de *M. eximia* (**Tabla 4**), en tanto que los extractos de las otras especies presentaron valores mayores y similares de IC<sub>50</sub>. En cuanto al contenido de polifenoles totales, la tendencia detectada en los extractos de los caldos de fermentación fue *M. tridentina* > *M. eximia* ≈ *M. importuna* > *M. andinensis* (Tabla 4).

**Tabla 4:** Concentración inhibitoria del 50% del radical DPPH (IC<sub>50</sub>) y contenido de polifenoles totales (CFT) de los extractos de los caldos de fermentación de *Morchella* spp.

Muestra	<i>M. eximia</i>	<i>M. importuna</i>	<i>M. andinensis</i>	<i>M. tridentina</i>
IC <sub>50</sub> (mg/mL)	17,86	29,13	29,29	24,18
CFT (µg/mL)	13,79 ± 0,90b	14,14 ± 0,50b	10,08 ± 0,38c	16,37 ± 0,43a

Letras distintas en las filas indican diferencias significativas por test de Tukey (p<0,05).

#### 5. Análisis de metabolitos secundarios por CG-MS de los extractos de *Morchella* spp.

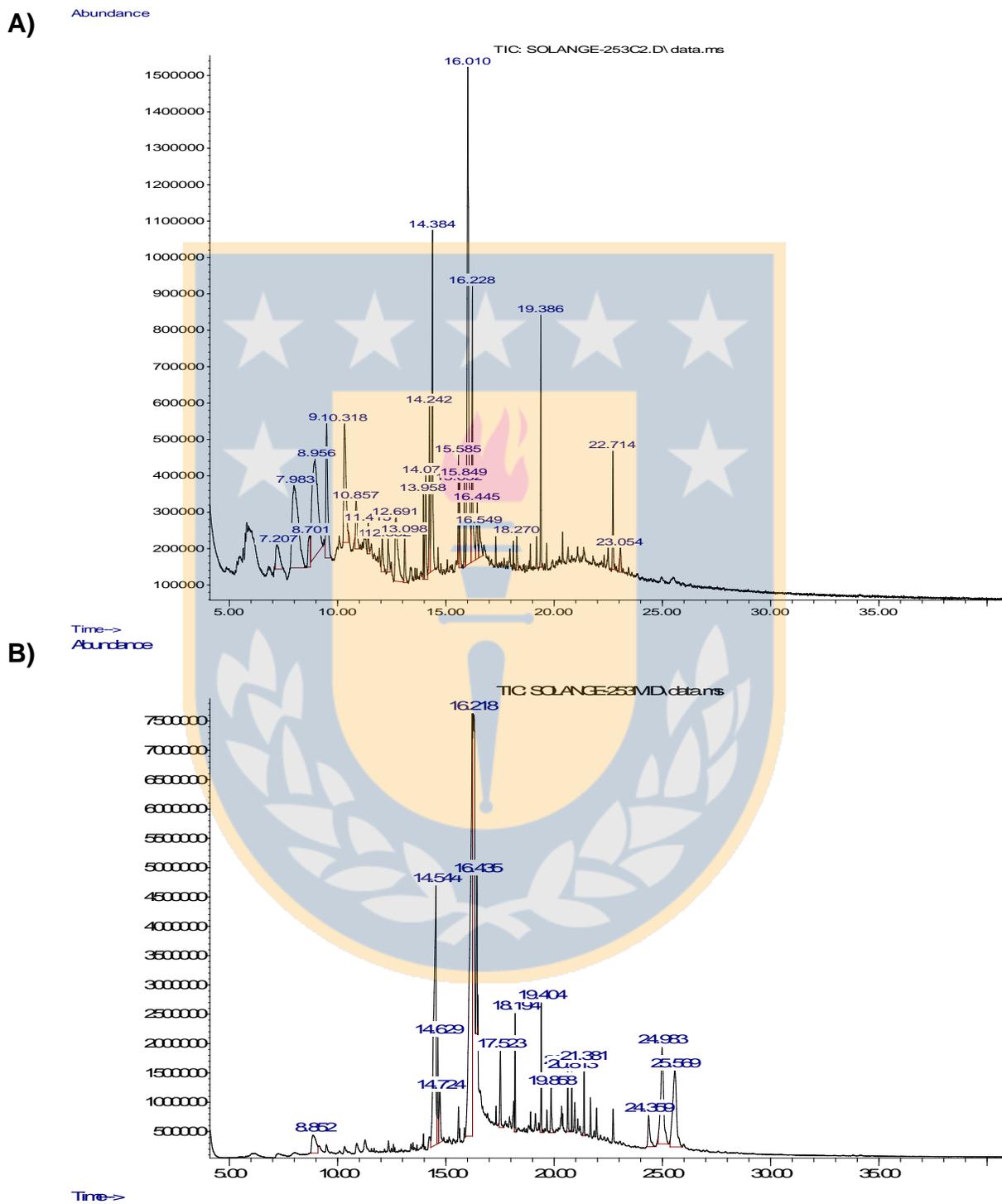
Los extractos fúngicos con acetato de etilo obtenidos de los caldos de fermentación y micelio fueron analizados mediante CG-MS, y para ello se escogieron las especies *M. eximia* (de ambiente de bosque perturbado) y *M. andinensis* (de bosque nativo). Los cromatogramas de los compuestos detectados en los extractos de *M. eximia* y *M. andinensis* se muestran en las **Figuras 13** y **14**, respectivamente. Existen claras diferencias entre los cromatogramas del extracto del caldo de fermentación y micelios. En el caso de *M. eximia* se observan peaks similares alrededor de los 15 min de retención, por otra parte, el cromatograma del extracto del caldo de fermentación posee un rango de tiempo de retención más amplio que el del extracto de micelio (**Figura 13**).

En el caso de *M. andinensis*, el cromatograma del caldo de fermentación presenta un importante aumento en los peaks, mostrando compuestos en un rango más amplio respecto al tiempo de retención, en cambio en el extracto del micelio se registraron tiempos de retención menores al del caldo, distribuyéndose en rangos más cortos (**Figura 14**). Esto sugiere una menor cantidad de compuestos en los extractos de micelio que en los caldos de esta especie.

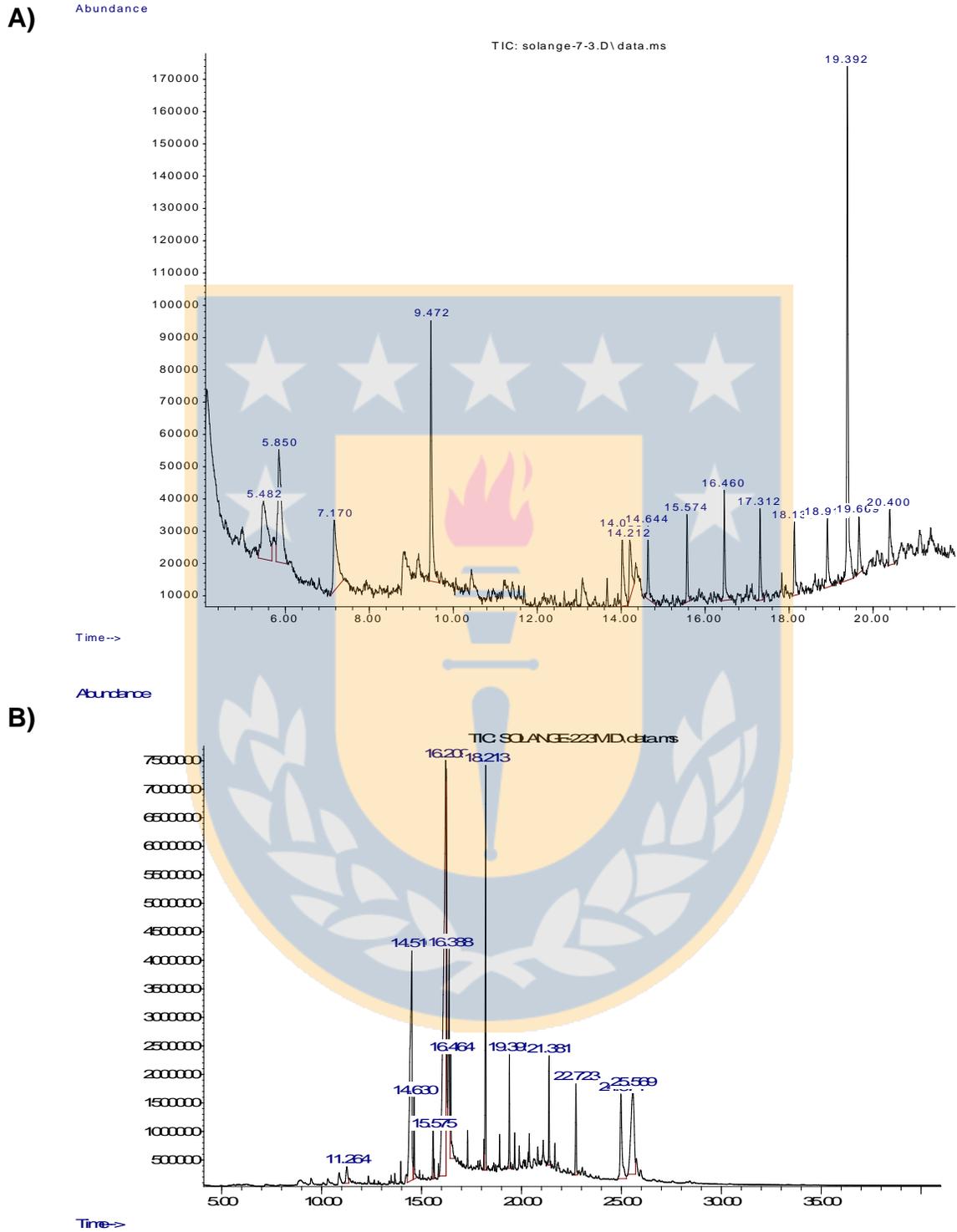
Dentro de los 38 compuestos detectados en las muestras de los extractos (**Tabla 5**), la mayor cantidad (25) se encontró en los caldos de fermentación de *M. eximia*, y solo 9 compuestos se encontraron en el extracto del micelio de esta especie, y de éstos 4 compuestos estaban presentes tanto en los caldos como en el micelio, aunque en diferentes proporciones. En cuanto a los extractos de *M. andinensis*, la cantidad de compuestos en los caldos fue menor que en *M. eximia*, encontrándose solo 9 compuestos, por el contrario, se encontró mayor cantidad (13) en el micelio, y sólo 2 de estos compuestos estaban presentes tanto en los caldos como en el micelio (**Tabla 5**). Entre los compuestos se pudo detectar ácidos grasos, un fitoesterol, esteres cíclicos de ácidos grasos, péptidos cíclicos, un poliacetileno y compuestos fenólicos.

Los metabolitos con mayor proporción en los extractos fueron: el ácido 9,12-octadecadienoico presente en el micelio (38,3 %) y caldo (17,9 %) de *M. eximia* y solo en el micelio (36,7 %) de *M. andinensis*. Por su parte, el ácido octadecanoico estuvo presente en el caldo (5,9%) y micelio (4,83 %) de *M. eximia* y solo en el micelio (5,57 %) de *M. andinensis*, en tanto, el ácido n-hexadecanoico estuvo presente en el micelio (21,3 %) y caldo (7,9 %) de *M. eximia*, lo mismo que en el micelio y caldo de *M. andinensis*, pero en menor proporción (17,2 % y 5,8 % respectivamente). El compuesto benzeno-etanol-4-hydroxi estuvo presente solo en el extracto del caldo (26,1 %) de *M. andinensis*, al igual que el ciclopentil éster del ácido succínico 2-metilpent-3-y (14,5 %) y el 10-chlorotriciclo [4.2.1.1(2,5)]deca-3,7-dien-9-ol (7,4 %). El ergosterol fue un compuesto exclusivo de los extractos de micelio de *M. eximia* (10,7 %) y *M. andinensis* (10,2 %) y el faltarinol, estuvo presente solo en el caldo (12,5 %) de *M. eximia*, al igual que el éster metílico 2,5-ácido octadecadienoico (6 %), junto a otros compuestos presentes en menor abundancia. El compuesto 2-[Di(tert-butyl)silyloxymethyl]tetrahydrofurane estuvo presente solo en el caldo (11,6 %) y micelio (2,9 %) de *M. eximia*, por otro lado, el compuesto fenol, 2,4-bis(1,1-

dimetiletilo). estuvo presente solo en los extractos del caldo de *M. eximia* (5,5 %) y *M. andinensis* (7,4 %).



**Figura 13:** Cromatogramas de los extractos con acetato de etilo de los caldos de fermentación (A) y de micelios (B) de *M. eximia* obtenidos de los análisis por CG-MS.



**Figura 14:** Cromatogramas de los extractos con acetato de etilo de los caldos de fermentación (A) y micelios (B) de *M. andinensis* obtenidos de los análisis por CG-MS.

**Tabla 6:** Caracterización y comparaciones de los compuestos identificados por CG-MS en los extractos del caldo de fermentación y micelios de *M. eximia* y *M. andinensis*.

N° CO	Tiempo retención (min)	Masa (Da)	Nombre compuesto	<i>M. eximia</i>		<i>M. andinensis</i>	
				Caldo	Micelio	Caldo	Micelio
1	5.931	190	Succinic acid, 2-methylpent-3-yl cyclopentyl ester			14.53%	
2	7.158	182	10-Chlorotricyclo [4.2.1.1(2,5)]deca-3,7-dien-9-ol			7.36%	
3	7.207	290	2,5-Octadecadiynoic acid, methyl ester	2.09%			
4	7.935	230	Formyl glutamine			5.64%	
5	7.983	244	2-[Di(tert-butyl)silyloxymethyl]tetrahydrofurane	11.55%	2.88%		
6	8.597	138	Benzeneethanol, 4-hydroxy-			26.07%	
7	8.701	328	Acethydrazide, 2-(4-fluorophenoxy)-N2-(4-allyloxybenzylideno)-	1.53%			
8	8.956	244	Falcarinol	12.52%			
9	9.486	206	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	5.49%		7.36%	
10	10.318	290	2,5-Octadecadiynoic acid, methyl ester	6.04%			
11	10.857	331	à-D-Glucopyranoside, methyl 2-(acetylamino)-2-deoxy-3-O-(trimethylsilyl)-,cyclic methylboronate	1.93%			
12	11.415	484	2-Myristynoyl pantetheine	0.69%			
13	12.067	242	2-Hexadecanol	1.02%			
14	12.332	496	D-Fructose, diethyl mercaptal, pentaacetate	0.91%			
15	12.691	154	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-	4.28%		8.48%	
16	13.098	154	Benzenemethanol, 3-hydroxy-5-methoxy-	1.10%			
17	13.958	270	Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester	1.03%			
18	14.242	210	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)-	2.76%		5.06%	
19	14.384	256	n-Hexadecanoic acid	7.78%	21.25%	5.80%	17.19%
20	14.630	284	Hexanoic acid ethyl ester		2.76%		2.19%
21	14.724	370	Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester		2.67%		
22	15.575	294	8,11-Octadecadienoic acid, methyl ester				1.36%
23	15.585	294	9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester, (E,E)-	1.53%			
24	15.632	296	10-Octadecenoic acid, methyl ester	1.35%			
25	15.849	298	Heptadecanoic acid, 16-methyl-, methyl ester	1.06%			

**Continuación Tabla 5:**

N° CO	Tiempo retención	Masa	Nombre compuesto	<i>M. eximia</i>		<i>M. andinensis</i>	
				Caldo	Micelio	Caldo	Micelio
26	16.010	280	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	17.93%	38.34%		36.68%
27	16.228	284	Octadecanoic acid	5.87%	4.83%		5.57%
28	16.445	268	7-Methyl-Z-tetradecen-1-ol acetate	1.63%			
29	16.464	312	Octadecanoic acid, ethyl ester				3.07%
30	16.549	436	Ethyl iso-allocholate	1.14%			
31	18.213	370	Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester				9.62%
32	18.270	430	Cholestan-3-one, cyclic 1,2-ethanediyl aetal, (5á)-	0.64%			
33	19.386	390	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester	3.10%		10.29%	2.24%
34	21.381	410	Squalene				2.28%
35	22.714	498	9(11)-Dehydroergosteryl benzoate	2.04%			2.63%
36	22.713	394	Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol, (3β,22E)-		0.51%		
37	24.974	398	Ergosta-5,22-dien-3-ol, (3á,22E,24S)-		1.22%		5.81%
38	25.569	396	Ergosterol		10.67%		10.24%

Se indica el tiempo de retención, la masa molecular (Da) y la abundancia (%) de cada compuesto (N° CO: número de compuesto).

## VIII. Discusión

En el presente estudio y en un ensayo exploratorio inicial se evaluaron 2 tipos de medio de cultivo líquido (MC y MB) y dos condiciones de incubación (agitada y estática) para seleccionar la mejor condición para el crecimiento micelial de diferentes cepas o ecotipos de *Morchella*, evaluándose la producción de biomasa, y caracterización del caldo de fermentación, incluida la actividad biológica. Ambos medios contenían glucosa como fuente de C, extracto de levadura y peptona como fuente de N, y calcio en forma de  $\text{CaCO}_3$  (MC y MB), pero además uno el medio MC contenía una gran cantidad de sales minerales.

Durante el ensayo exploratorio se observó un ligero aumento en la producción de biomasa micelial (g/L) bajo la condición estática, aunque sin diferencias significativas al compararlo con el cultivo agitado, por lo menos en los 10 días de duración del ensayo, No obstante, las formas de crecimiento fueron diferentes ya que en condición estática todas las especies de *Morchella* formaron una capa de micelio en la superficie del caldo de cultivo, en tanto en la condición de agitación se observó la formación de pellets esféricos y huecos. De igual forma, en MC se observó un ligero aumento en la producción de biomasa micelial frente a MD, pero sin diferencias significativas entre ambos medios. Una gran diferencia se observó en relación con la pigmentación marrón de los medios que fue mucho más intensa en MC que en MD, en ambas condiciones de incubación (estática y agitada) sugiriendo que la adición de sales minerales al caldo de cultivo estimula la producción de pigmentos en las especies de *Morchella* (Akilandeswari y Pradeep 2016).

Al evaluar la variación de pH en los caldos de fermentación se observaron notables diferencias entre los medios de cultivo MC y MB, tanto en la condición estática como la agitada. En MB la todas las especies tendieron a aumentar el pH inicial (pH 6) hasta un valor sobre 7, mientras que en MC la especies tendieron a acidificar los caldos hasta valores aproximados de pH 4,5, principalmente en la condición de agitación, lo que podría estar relacionado a la producción de ácidos orgánicos para la solubilización de los compuestos que contiene MC, ausentes en MB (Liaud et al. 2014). Se ha descrito que las especies del género *Morchella* crecen eficientemente en valores de pH desde 5 a 7, aumentado su velocidad de crecimiento mientras el pH alcanza valores cercanos al neutro (Diamantopoulou et al. 2012; Papadaki et al. 2019).

En ambas condiciones de cultivo hubo un rápido consumo de azúcares solubles, pero en MC la mayoría de las especies mostró un consumo significativamente mayor que en MB. Por otro lado, en las especies *M. eximia* y *M. tridentina*, bajo la condición de agitación en MC, hubo un aumento significativo en la producción de proteínas solubles, lo que sugiere que esta condición (agitación a 120 rpm) permite una mayor producción de proteínas solubles en el caldo de cultivo, lo que estuvo acompañado de cambios de pigmentación más notorios en los micelios y caldos de cultivo. En cuanto a la actividad antioxidante se mantuvo más estable en la condición de agitación con valores entre 15 a 35 % de inhibición del radical DPPH, exceptuando *M. andinensis* (cepa 110), quien tuvo un bajo desarrollo en MB bajo esta condición de incubación. Por otro lado, en la condición estática, *M. importuna*, *M. eximia* y *M. andinensis* (cepa 110) tuvieron un ligero aumento en la actividad antioxidante en MC alcanzando valores de 26% pero sin diferencias significativas con MB.

Pese a que no hubo diferencias significativas importantes, hubo una leve tendencia de mejor desempeño, se escogió la condición de agitación (120 rpm) y el medio de cultivo complejo (MC) para los ensayos posteriores.

En el ensayo de cinética de crecimiento micelial, las especies de *Morchella* no mostraron diferencias significativas a través del tiempo de incubación, excepto *M. importuna* que alcanzó su máximo crecimiento al día 20 de cultivo ( $8,5 \pm 0,2$  g/L). En general, la producción de biomasa micelial estuvo en el rango de 8,5 a 10,5 g/L. Especies de *Morchella* representantes del Clado Elata y Esculenta cultivadas en medio líquido similar a MC, pero en condición estática, produjeron biomasa en un rango de 9 a 13 g/L a los 14 días de cultivo (Papadaki et al. 2019), levemente superior a lo alcanzando por las especies analizadas en este estudio.

La mayoría de las especies de *Morchella* alcanzaron el máximo consumo de azúcares (> 95 %) al día 10 de cultivo, disminuyendo de una cantidad inicial en el medio de cultivo cercana a los 33 g/L de azúcares hasta valores inferiores a los 1 g/L. excepto, *M. importuna* que tuvo un consumo más lento de azúcares, presentando diferencias significativas con todas las otras especies al día 10 y 15. En el estudio de Papadaki et al. (2019) se registró que las especies de *Morchella* lograron un consumo de más del 90% de la concentración de azúcares antes del día 14 de cultivo.

La actividad antioxidante del caldo de fermentación de las especies de *Morchella* fue determinada con el radical DPPH. Los tiempos de reacción con este reactivo son variables, dependiendo de la naturaleza, pureza y concentración de los compuestos antioxidantes, y pueden variar desde los 2 a los 30 min, siendo el último rango de tiempo donde se obtiene una mayor estabilidad de la reacción en ensayos con caldos de cultivo de hongos (Ionita 2021). Los caldos de cultivo analizados alcanzaron sus valores máximos de 19,5 a 32,6% a los 20 días de incubación, presentando el máximo valor *M. importuna*. Esto difiere de los resultados de Fuentes (2015) quien trabajando con DPPH registró la máxima actividad antioxidante al día 15 de cultivo (32%) en medio líquido en base a extracto de malta y peptona (EM-P) en condición estática, con la especie *M. tridentina*. El efecto antioxidante directo del caldo de fermentación de *Morchella* spp. no ha sido investigado por lo que no se puede comparar con otros estudios. Esto principalmente debido a que la atención de los investigadores se ha centrado en la bioactividad de los ascocarpos (Wu et al. 2021). Sin embargo, si se han aislado compuestos antioxidantes importantes desde el caldo de fermentación, como polisacáridos extracelulares (Fu et al. 2013). Un comportamiento similar presentó los caldos de fermentación de especies del género *Ganoderma*, donde un ecotipo de *G. lucidum* logró el mejor desempeño alcanzando el 40% de actividad antioxidante, pero las otras especies estuvieron en rangos inferiores a 25% (Ćilerdžić et al. 2016).

Con el objetivo de determinar cuantitativamente la producción de compuestos quelantes de  $Fe^{3+}$  del tipo sideróforos por las distintas especies de *Morchella* fue utilizado el ensayo CAS líquido, (Machuca et al. 2007). Los caldos de cultivo tuvieron un importante aumento reacción CAS al día 20 de cultivo en todas las especies, logrando valores cercanos al 30% de CQM, pero sin diferencias significativas entre las especies. La reacción CAS positiva del caldo de fermentación fue acompañada de un cambio de coloración a un azul más claro, lo que se considera una reacción poco significativa. Es posible que la presencia de Fe en el medio de cultivo utilizado (MC) haya interferido en la producción de CQM por las especies de *Morchella*, de la misma forma observada en otros hongos (Mabel Merlen et al. 2019), por lo que se recomienda repetir este ensayo utilizando otro medio de cultivo sin Fe para la incubación de las distintas especies. En otro estudio han sido detectados valores de 83 % de CQM en los caldos de fermentación de *M. tridentina*, en medio EM-P, pero estos valores disminuyen notablemente al cambiar el medio de cultivo a papa-dextrosa (50%) (Fuentes, 2015).

Con estos resultados se concluyó que el mejor tiempo de cosecha del cultivo en matraces de 1 L en medio MC y agitación (120 rpm) de las especies de *Morchella* era el día 20 de incubación, ya que en este tiempo se presentó la más alta actividad antioxidante y CQM. A estos cultivos se les realizó la extracción con acetato de etilo de sus caldos de cultivos y micelios con el fin de realizar el análisis de metabolitos secundarios a través de CG-MS. La biomasa micelial de este ensayo siguió la tendencia *M. eximia* = *M. tridentina* > *M. andinensis* > *M. importuna*. Además, al extracto del caldo de cultivo se le evaluó la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles totales, esto no se evaluó en los micelios ya que la cantidad de extracto fue muy baja y se priorizó el análisis de metabolitos secundarios por CG-MS.

Al evaluar la actividad antioxidante de los extractos con acetato de etilo del caldo de fermentación, el menor IC<sub>50</sub> fue detectado en *M. eximia* (17,86 mg/mL), mientras que las otras especies mostraron valores en un rango más alto, de 24 a 29 mg/mL. Este alto valor podría deberse a que no todos los compuestos antioxidantes de *Morchella* spp. fueron extraídos con este solvente debido a su polaridad. Se recomienda aislar los compuestos para evaluarlos de forma individual como se ha realizado en trabajos recientes, donde cada compuesto aislado del extracto con acetato de etilo del caldo de fermentación de *Morchella* sp. fue separado y se le evaluó de forma independiente la actividad antioxidante por el método DPPH (Yang et al. 2019b). En otros trabajos se ha registrado que el IC<sub>50</sub> del caldo de fermentación liofilizado de *M. tridentina* fue de 14,1 mg/mL (Fuentes, 2015), diferencia que puede ser debido a que en este trabajo se utilizó el caldo liofilizado sin extracción previa. Al comparar con la actividad antioxidante de extracto de ascocarpos de *M. esculenta*, se ha registrado un IC<sub>50</sub> de 1500 ± 12,6 µg/mg con DPPH, valores que disminuyen al evaluar con otros solventes orgánicos como etanol, metanol y butanol (Shameem et al. 2017). Por otro lado, en extractos con etanol desde micelio de *Morchella* sp. cultivado en fermentación líquida en agitación (140 rpm), se han registrado valores de IC<sub>50</sub> de 1,54 mg/mL, menor a los valores obtenidos en este estudio con los caldos de cultivo (Wang et al. 2020).

En cuanto al contenido de polifenoles totales (CFT), recientemente se ha registrado que el extracto metanólico de ascocarpos de *M. conica* contiene 3,50 µg AGE/mg del extracto (Jacinto-Azevedo et al. 2021), inferior los valores de los extractos con acetato de etilo de los caldos de fermentación, de las especies de *Morchella* analizadas aquí, que estuvieron en un rango de 10-16 µg AGE/mg de extracto. Los resultados sugieren que el

CFT de los extractos de *Morchella spp.* no tendría relación directa con la actividad antioxidante de los mismos, ya que en el caso de *M. tridentina* en cuyos extractos se detectó el valor más alto de CFT (16,37  $\mu\text{g AGE/mg}$ ) no presentó la mayor actividad antioxidante ( $\text{IC}_{50}$  24,18 mg/mL).

El análisis CG-MS reveló la presencia de compuestos bioactivos en los extractos de los caldos de cultivo y de los micelios de las especies *M. eximia* (cepa 153) y *M. andinensis* (cepa 223). De los 38 metabolitos identificados desde los extractos del caldo de fermentación y el micelio, el ácido palmítico (ácido n-hexadecanoico) fue el único presente en las muestras (caldo y micelio) de ambas especies, en mayor proporción en los micelios. En hongos es uno de los principales ácidos grasos que normalmente se encuentran en los fosfolípidos de las membranas y los triacilgliceroles del almacenamiento junto con el ácido esteárico (Smith et al. 2023). En los extractos de caldo (7,78%) y del micelio (21,25%) de *M. eximia* este metabolito fue levemente mayor que en los extractos de caldo (5,80%) y micelio (17,19%) de *M. andinensis*. Este compuesto inhibe el crecimiento y metástasis en el cáncer gástrico en humanos (Yu et al. 2023), y también ha demostrado tener potencial antiinflamatorio al inhibir la fosfolipasa A2, enzima responsable de la liberación de ácidos grasos en los pasos iniciales del proceso inflamatorio (Aparna et al. 2012).

Uno de los ácidos grasos detectados en mayor proporción (> 35 %) en los extractos de micelio de *M. andinensis* y *M. eximia*, y en menos porcentaje (17,93 %) en el extracto del caldo de esta última especie, fue el ácido 9,12-octadecadienoico (Z,Z) o ácido linoleico, Este compuesto ha demostrado actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante y anticancerígena en ensayos *in vitro* (Jayaraman et al. 2022). Este compuesto se ha detectado en extractos etanólicos de carpóforos de *Lentinus squarrosulus* (11,88 %) (Adeoye-Isijola et al. 2018), y también se ha señalado en extractos con acetato de etilo del caldo de fermentación de *Trichoderma pseudokoningii* (23,48 %) (Khan y Javaid 2020). Bruno et al. (2019) identificaron este compuesto como un agente antimicrobiano contra patógenos bacterianos y fúngicos con resultados prometedores.

Un compuesto fenólico encontrado en alta proporción (27,07 %), exclusivamente en el caldo de *M. andinensis*, fue el 4-hydroxy-benzoetanol o tirosol. Este compuesto se ha detectado en diversos extractos de hongos endófitos, como *Phyllosticta sp.* (Tan et al. 2015), *Phialocephala fortinii* (Cui et al. 2016), entre otras especies. Este compuesto ha demostrado una amplia gama de bioactividades, que incluyen promoción del crecimiento en plantas,

efecto antibacteriano y antifúngico, además de ser un potente antioxidante (Anisha y Radhakrishnan 2017). Otro compuesto exclusivo del caldo de *M. andinensis* fue el éster del 2-metilpent-3-il ciclopentil del ácido succínico, este tuvo un tiempo de retención de 5,931 min, el menor de todos los compuestos analizados, con una masa de 190 Da. Al realizar una búsqueda no se encontró referencia sobre la presencia de este compuesto en otros hongos o plantas, tampoco se ha evaluado su bioactividad. Este sería su primer registro en el caldo de fermentación de *M. andinensis*.

El ergosterol fue encontrado en los extractos del micelio de *M. eximia* y *M. andinensis* en proporciones similares (~10%). Este compuesto es un fitoesterol que cumple una función estructural, siendo el componente principal de las membranas fúngicas, desempeñando una variedad de funciones biológicas que incluyen permeabilidad, fluidez, regulación y control del ciclo celular, por lo que es un compuesto esencial para la integridad de la membrana celular (Nowak et al. 2022). Pero, además, el ergosterol posee un amplio espectro de propiedades biológicas con efecto promotor de la salud humana, como actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena y regulación del colesterol, entre otros (Rousta et al. 2023). El otro papel importante del ergosterol en la salud humana está relacionado con la síntesis de vitamina D, ya que el ergosterol mediante la fotólisis generada por la exposición a la radiación UV natural o artificial (280 – 320 nm) se puede convertir en vitamina D (Jiang et al. 2020). Un nivel bajo de vitamina D en humanos se ha relacionado con el avance de numerosas enfermedades metabólicas, como diabetes, hipertensión, enfermedades autoinmunes e inflamatorias, cáncer, trastornos inmunológicos y enfermedades infecciosas (Wang et al. 2017). Debido a que la principal fuente dietética de vitamina D son los productos de origen animal, los hongos se convierten en la principal alternativa para la obtención de este compuesto (Rousta et al. 2023). Esto sugiere que, al exponer el micelio de las especies de *Morchella* a radiación UV, se podría obtener un contenido importante de vitamina D como suplemento alimenticio para las personas.

Otro compuesto aromático de interés encontrado en los extractos del caldo de *M. eximia* (3,1%) y en el caldo (10,3) y micelio (2,24) de *M. andinensis* fue el éster diisooctilo del ácido 1,2-bencenodicarboxílico. Este compuesto se ha encontrado en proporciones similares (10,73 %) en el extracto con acetato de etilo del caldo de fermentación del hongo *Nigrospora oryzae* (Suradkar y Hande 2020) y de *Trichoderma longibrachiatum*, donde demostró actividad antibacteriana y antifúngica moderada (Abdelmoteleb et al. 2023).

También ha estado presente en la fracción clorofórmica de *Sonchus oleraceus*, una planta herbácea cuyo extracto demostró un potencial antifúngico importante contra *Macrophomina phaseolina* (Banaras et al. 2020). Los diversos estudios de actividad antifúngica que reportan la presencia de este compuesto en los extractos evaluados pueden indicar un potencial antifúngico importante en las especies de *Morchella*.

El falcarinol fue detectado sólo en el caldo de *M. eximia* en un 12,52%, correspondiendo a una oxilipina o poliacetileno con capacidad antifúngica e insecticida (Mousavi y Karami 2022; Goodwin 2022). Este compuesto ha sido aislado desde los extractos con acetato de etilo de carpóforos de *Fistulina hepatica* (Lee et al. 2020), y por otro lado, es el compuesto más bioactivo de los poliacetilenos de la zanahoria, demostrando actividad anticancerígena y antitumoral (da Silva Días 2014).

Los resultados preliminares de los análisis por CG-MS muestran la presencia de una variedad de compuestos de interés ya sea para la medicina o la industria en general, en los extractos de las especies de *M. eximia* y *M. andinensis*, siendo algunos de estos compuestos compartidos por ambas especies, pero otros son particulares de cada una de ellas. También se han detectado algunos compuestos pertenecientes a los componentes del medio de cultivo, pero en muy baja proporción. Se recomienda aislar los compuestos de interés para análisis de caracterización en profundidad y para evaluar un posible uso como agente terapéutico. Los resultados de CG-MS de *M. importuna* y *M. tridentina* aún están pendientes de análisis por lo que aún no es posible comparar con estas especies.

Las especies de *Morchella* presentan complicaciones con su disponibilidad en la forma de cuerpos de fructificación, ya que está actualmente depende principalmente de la recolección estacional en la mayoría de las especies, incluidas las presentes en Chile. Con estos resultados se refuerza el beneficio de trabajar con los caldos de fermentación y micelios de las diferentes especies de *Morchella* provenientes del centro-sur de Chile, ya que todas han demostrado ser posibles de cultivar bajo condiciones de fermentación líquida y, además todas han demostrado algún tipo de bioactividad. Con esto se proporciona un valor agregado a la fermentación líquida de las especies de *Morchella* presentes en los bosques chilenos, por lo que se podría llegar a generar un producto innovador a partir de esta forma de cultivo, independizándose de la recolección silvestre con beneficios para la protección del propio recurso.

## IX. Conclusiones

- En el tiempo de cultivo evaluado (10 días) no se detectaron diferencias relacionadas con la composición de los medios (MB y MC) entre las diferentes especies de *Morchella*, bajo la condición estática y de agitación (120 rpm), aunque si se detectó un ligero aumento en la producción de proteínas solubles y en la actividad antioxidante en MC bajo agitación.
- En los ensayos de cinética de crecimiento, se detectó un importante aumento en la actividad antioxidante y el contenido de CQM hacia el final del cultivo (20 días), en el caldo de fermentación de todas las especies de *Morchella*.
- La actividad antioxidante más alta del caldo de fermentación fue detectada en *M. importuna* (32,5 %) en MC, bajo agitación, aunque sin diferencias significativas con las otras especies en las mismas condiciones de cultivo.
- Al analizar la actividad antioxidante en los extractos con acetato de etilo de los caldos de fermentación se detectaron valores elevados de IC<sub>50</sub> (>24 mg/mL) excepto *M. eximia* quien presentó el menor valor de IC<sub>50</sub> (17,86 mg/mL), con la consiguiente mayor actividad antioxidante.
- En los extractos de los micelios y caldos de fermentación de *M. eximia* y *M. andinensis* se encontraron compuestos con actividad biológica de interés y comunes de ambas especies, pero otros fueron especie-específicos y que variaron según la naturaleza del extracto (caldo de fermentación o micelio).
- La detección de compuestos bioactivos (CQM del tipo sideróforos, compuestos fenólicos y otros metabolitos secundarios) en los caldos de fermentación de las especies de *Morchella* revelan el potencial biotecnológico para la obtención de un posible producto de valor nutracéutico a partir de los caldos de fermentación o de los micelios.

## X. Bibliografía

- Abdelmoteleb A, Gonzalez-Mendoza D, Zayed O (2023) Cell-free culture filtrate of *Trichoderma longibrachiatum* AD-1 as alternative approach to control *Fusarium solani* and induce defense response *Phaseolus vulgaris* L. plants. *Rhizosphere* 25. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100648>
- Adeoye-Isijola MO, Olusola Olajuyigbe O, Jonathan SG, Coopoosamy RM (2018) bioactive compounds in ethanol extract of *lentinus squarrosulus* mont - a nigerian medicinal macrofungus. *AJTcam* 15:42–50. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v15i2.6>
- Akilandeswari P, Pradeep B v. (2016) Exploration of industrially important pigments from soil fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:1631–1643
- Amsri A, Srichairatanakool S, Teerawutgulrag A, Youngchim S, Pongpom M (2022) Genetic Engineering of *Talaromyces marneffeii* to Enhance Siderophore Production and Preliminary Testing for Medical Application Potential. *JoF* 8:1183. <https://doi.org/10.3390/jof8111183>
- Anisha C, Radhakrishnan EK (2017) Metabolite analysis of endophytic fungi from cultivars of *Zingiber officinale* Rosc. identifies myriad of bioactive compounds including tyrosol. *3 Biotech* 7. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0768-8>
- Aparna V, Dileep K v., Mandal PK, Karthe P, Sadasivan C, Haridas M (2012) Anti-Inflammatory Property of n-Hexadecanoic Acid: Structural Evidence and Kinetic Assessment. *Chem Biol Drug Des* 80:434–439. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2012.01418.x>
- Badshah SL, Riaz A, Muhammad A, Çayan GT, Çayan F, Duru ME, Ahmad N, Emwas AH, Jaremko M (2021) Isolation, characterization, and medicinal potential of polysaccharides of *Morchella esculenta*. *Molecules* 26:1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules26051459>
- Baldrian P, Tomáš Větrovský ·, Lepinay · Clémentine, Kohout · Petr (2021) High-throughput sequencing view on the magnitude of global fungal diversity. 1:3. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00472-y>

- Banaras S, Javaid A, Khan IH (2020) Potential antifungal constituents of *Sonchus oleraceus* against *Macrophomina phaseolina*. *Int J Agric Biol* 24:1376–1382. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.1573>
- Bradford M (1976) Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenensis* Celak. *Analytical Biochemistry* 5:407–415. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003>
- Bruno M, Modica A, Catinella G, Canlı C, Arasoglu T, Çelik S (2019) Chemical composition of the essential oils of *Centaurea tomentella* Hand.-Mazz. and *C. haussknechtii* Boiss. (Asteraceae) collected wild in Turkey and their activity on microorganisms affecting historical art craft. *Nat Prod Res* 33:1092–1100. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1463531>
- Ćilerdžić J, Kosanić M, Stajić M, Vukojević J, Ranković B (2016) Species of Genus *Ganoderma* (Agaricomycetes) Fermentation Broth: A Novel Antioxidant and Antimicrobial Agent. *Int. J. Med. Mushrooms* 18(5): 397-404. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v18.i5.30>
- Cui HL, Chen Y, Wang SS, Kai GQ, Fang YM (2011) Isolation, partial characterization and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Morchella esculenta*. *J Sci Food Agric* 91:2180–2185. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4436>
- Cui J, Guo T, Chao J, Wang M, Wang J (2016) Potential of the Endophytic Fungus *Phialocephala fortinii* Rac56 Found in *Rhodiola* Plants to Produce Salidroside and p-Tyrosol. *Molecules* 21. <https://doi.org/10.3390/molecules21040502>
- da Silva Dias JC (2014) Nutritional and Health Benefits of Carrots and Their Seed Extracts. *Food Nutr Sci* 05:2147–2156. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.522227>
- Diamantopoulou P, Papanikolaou S, Kapoti M, Komaitis M, Aggelis G, Philippoussis A (2012) Mushroom polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part I: Screening various mushroom species. *Appl Biochem Biotechnol* 167:536–551. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9713-9>

- Dimopoulou M, Kolonas A, Mourtakos S, Androutsos O, Gortzi O (2022) Nutritional Composition and Biological Properties of Sixteen Edible Mushroom Species. *Applied Sciences (Switzerland)* 12. <https://doi.org/10.3390/app12168074>
- Fu L, Wang Y, Wang J, Yang Y, Hao L (2013) Evaluation of the antioxidant activity of extracellular polysaccharides from *Morchella esculenta*. *Food Funct* 4:871–879. <https://doi.org/10.1039/c3fo60033e>
- Fuentes A (2015) Producción de compuestos quelantes de metal y evaluación de la capacidad antioxidante en *Morchella frustrata* M. Kuo de la Patagonia chilena. Tesis de pregrado, Universidad de Concepción.
- Goodwin PH (2022) The Endosphere Microbiome of Ginseng. *Plants* 11(3), 415 <https://doi.org/10.3390/plants11030415>
- Grace OM-A, Kolawole IA, Cajethan (2020) GC-MS analysis of bioactive compounds and evaluation of antimicrobial activity of the extracts of *Daedalea elegans*: A Nigerian mushroom. *Afr J Microbiol Res* 14:204–210. <https://doi.org/10.5897/ajmr2019.9120>
- Hill R, Leitch IJ, Gaya E (2021) Targeting Ascomycota genomes: what and how big? *Fungal Biol Rev* 36:52–59. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.03.003>
- Ionita P (2021) The chemistry of dpph· free radical and congeners. *Int J Mol Sci* 22:1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms22041545>
- Jacinto-Azevedo B, Valderrama N, Henríquez K, Aranda M, Aqueveque P (2021) Nutritional value and biological properties of Chilean wild and commercial edible mushrooms. *Food Chem* 356:129651. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129651>
- Jayaraman L, Shivaji S, Anandakumar S (2022) phytochemical screening, cytotoxic activity and molecular docking studies of *Eclipta alba* leaves extract against oral cancer. *Rasayan J Chem* 15:676–685. <https://doi.org/10.31788/RJC.2022.1516754>
- Jiang Q, Zhang M, Mujumdar AS (2020) UV induced conversion during drying of ergosterol to vitamin D in various mushrooms: Effect of different drying conditions. *Trends Food Sci Technol* 105:200–210

- Khan IH, Javaid A (2020) In vitro biocontrol potential of *Trichoderma pseudokoningii* against *Macrophomina phaseolina*. Int J Agric Biol 24:730–736. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.1494>
- Lee J, Shi YM, Grün P, Gube M, Feldbrügge M, Bode H, Hennicke F (2020) Identification of feldin, an antifungal polyne from the beefsteak fungus *Fistulina hepatica*. Biomolecules 10:1–15. <https://doi.org/10.3390/biom10111502>
- Li F, Jin Y, Wang J, Xu H (2022a) Structure Identification of Two Polysaccharides from *Morchella sextelata* with Antioxidant Activity. Foods 11:8–10. <https://doi.org/10.3390/foods11070982>
- Li I-C, Chiang L-H, Wu S-Y, Shih Y-C, Chen C-C (2022b) Nutrition Profile and Animal-Tested Safety of *Morchella esculenta* Mycelia Produced by Fermentation in Bioreactors. Foods 11:1385. <https://doi.org/10.3390/foods11101385>
- Liao X, Li F, Tan Y, Lu K, Wu S, Yin R, Ming J (2017) Cellular Antioxidant and Antiproliferative Activities of *Morchella conica* Pers. Polyphenols in vitro. Food Nutr. Res 5:742–749. <https://doi.org/10.12691/jfnr-5-10-4>
- Liaud N, Giniés C, Navarro D, Fabre N, Crapart S, Gimbert IH-, Levasseur A, Raouche S, Sigoillot J-C (2014) Exploring fungal biodiversity: organic acid production by 66 strains of filamentous fungi. Fungal Biol Biotechnol 1. <https://doi.org/10.1186/s40694-014-0001-z>
- Lobos I, Icarte Juan (2021) Agregación de valor del hongo *Morchella* que fructifica en el Territorio Patagonia Verde , región de Los Lagos. Osorno, Chile. Boletín INIA N° 443.
- Mabel Merlen J, Ansia A, Hidayat Ummar U (2019) Study on the prevalence of siderophore production in selected bacterial and fungal isolates. Xaverian Research Journal 7:29–40
- Machuca A, Gerding M, Chávez D, Palfner G, Oyarzúa P, Guillén Y, Córdova C (2021) Two new species of *Morchella* from *Nothofagus* forests in Northwestern Patagonia (Chile). Mycol Prog 20:781–795. <https://doi.org/10.1007/s11557-021-01703-x>
- Machuca A, Pereira G, Aguiar A, Milagres AMF (2007) Metal-chelating compounds produced by ectomycorrhizal fungi collected from pine plantations. Lett Appl Microbiol 44:7–12

- Magalhães LM, Santos F, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC (2010) Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta* 83:441–447. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.09.042>
- Meng X, Che C, Zhang J, Gong Z, Si M, Yang G, Cao L, Liu J (2019) Structural characterization and immunomodulating activities of polysaccharides from a newly collected wild *Morchella sextelata*. *Int J Biol Macromol* 129:608–614. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.226>
- Mensah-Agyei GO, Enitan SS, Omolara AE (2021) Medicinal Properties of Bioactive Compounds Identified in the acetone extract of *Daedalea elegans* using Gas Chromatography – Mass Spectrometry. *IJNMPD* 5:01–10. <https://doi.org/10.22161/ijmpd.5.5.1>
- Meyer V, Basenko EY, Benz JP, Braus GH, Caddick MX, Csukai M, De Vries RP, Endy D, Frisvad JC, Gunde-Cimerman N, Haarmann T, Hadar Y, Hansen K, Johnson RI, Keller NP, Kraševac N, Mortensen UH, Perez R, Ram AFJ, Record E, Ross P, Shapaval V, Steiniger C, Van Den Brink H, Van Munster J, Yarden O, Wösten HAB (2020) Growing a circular economy with fungal biotechnology: A white paper. *Fungal Biol Biotechnol* 7:1–23. <https://doi.org/10.1186/s40694-020-00095-z>
- Miller GL (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem* 31:426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mousavi SS, Karami A (2022) Application of Endophyte Microbes for Production of Secondary Metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* pp 1–37
- Munteanu IG, Apetrei C (2021) Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *Int J Mol Sci* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Nowak R, Nowacka-Jechalke N, Pietrzak W, Gawlik-Dziki U (2022) A new look at edible and medicinal mushrooms as a source of ergosterol and ergosterol peroxide - UHPLC-MS/MS analysis. *Food Chem* 369. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130927>
- O'Donnell K, Rooney AP, Mills GL, Kuo M, Weber NS, Rehner SA (2011) Phylogeny and historical biogeography of true morels (*Morchella*) reveals an early Cretaceous origin

and high continental endemism and provincialism in the Holarctic. FGB 48:252–265. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.09.006>

Papadaki A, Diamantopoulou P, Papanikolaou S, Philippoussis A (2019) Evaluation of biomass and chitin production of *Morchella* mushrooms grown on starch-based substrates. Foods 8. <https://doi.org/10.3390/foods8070239>

Pfister DH, Healy R, LoBuglio KF, Furci G, Mitchell J, Smith ME (2022) South American morels in the Elata group: mitosporic states, distributions, and commentary. Mycol Prog 21. <https://doi.org/10.1007/s11557-022-01846-5>

Ren J, Wang J, Karthikeyan S, Liu H, Cai J (2019) Natural anti-phytopathogenic fungi compound phenol, 2, 4-bis (1, 1-dimethylethyl) from *Pseudomonas fluorescens* TL-1. Indian J. Biochem. Biophys Vol. 56, pp. 162-168.

Rousta N, Aslan M, Yesilcimen Akbas M, Ozcan F, Sar T, Taherzadeh MJ (2023) Effects of fungal based bioactive compounds on human health: Review paper. Crit Rev Food Sci Nutr 1–24. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2178379>

Sanz-Rocha M, Gerding M, Quezada T, Vargas M, Chávez D, Machuca A. (2023) Molecular and cultural characterization of *Morchella* spp. from disturbed environments of Central-Southern Chile. Fungal Biol, in press. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2023.01.009>

Sarikurkcu C, Halil Solak M, Tarkowski P, Čavar Zeljković S (2022) Minerals, phenolics, and biological activity of wild edible mushroom, *Morchella steppicola* Zerova. Nat Prod Res. <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2050910>

Schwyn B, Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal Biochem 160:47–56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)

Shameem N, Kamili AN, Ahmad M, Masoodi FA, Parray JA (2017) Radical scavenging potential and DNA damage protection of wild edible mushrooms of Kashmir Himalaya. J. Saudi Soc. Agric. Sci. 16:314–321. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.10.005>

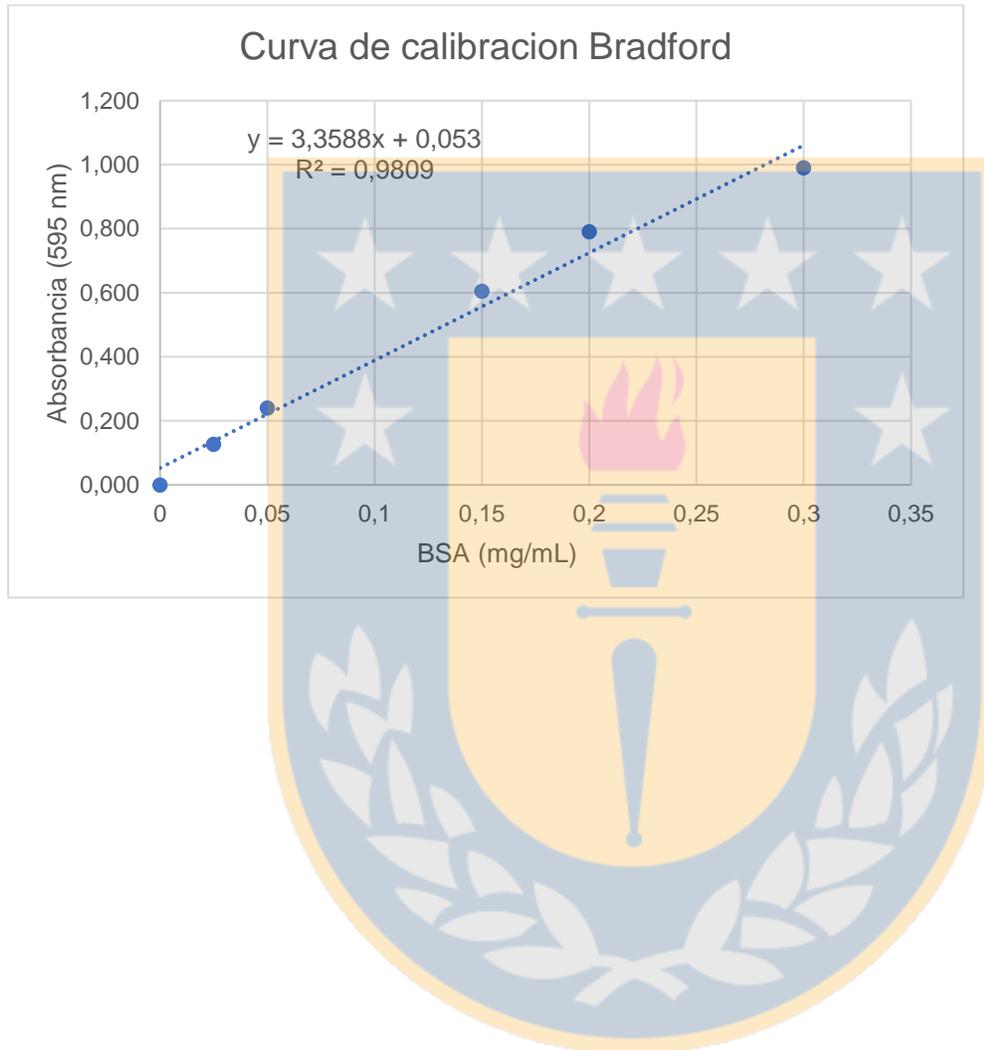
- Smith H, Doyle S, Murphy R (2023) Target directed identification of natural bioactive compounds from filamentous fungi. *Food Chem* 405. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134743>
- Soares E v. (2022) Perspective on the biotechnological production of bacterial siderophores and their use. *Appl Microbiol Biotechnol* 106:3985–4004
- Strong PJ, Self R, Allikian K, Szewczyk E, Speight R, O'Hara I, Harrison MD (2022) Filamentous fungi for future functional food and feed. *Curr Opin Biotechnol* 76:102729. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102729>
- Suradkar K, Hande D (2020) Characterization of bioactive secondary metabolites of fungal endophytes from Melghat forest in Maharashtra, India. In: *Bioactive Natural Products in Drug Discovery*. Springer Singapore, pp 599–607
- Tan MA, Cruz TE dela, Chris C, Apurillo S, dela Cruz TEE, Apurillo S, Proksch P (2015) Chemical constituents from a Philippine mangrove endophytic fungi *Phyllosticta* sp. *Der Pharma Chem*, 7 (2):43-45
- Tietel Z, Masaphy S (2018) True morels (*Morchella*)—nutritional and phytochemical composition, health benefits and flavor: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 58:1888–1901. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1285269>
- Tu X, Tang L, Xie G, Deng K, Xie L (2021) Chemical Composition of Aromas and Lipophilic Extracts from Black Morel (*Morchella importuna*) Grown in China. *Mycobiology* 49:78–85. <https://doi.org/10.1080/12298093.2020.1862473>
- Ullah TS, Firdous SS, Mehmood A, Swati JQ, Usman M, Khalid AN (2022) Detection of bioactive compounds and amino acids from fruiting bodies of *Morchella tridentina*. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* 21:103–114. <https://doi.org/10.24326/asphc.2022.1.9>
- Wang H, Chen W, Li D, Yin X, Zhang X, Olsen N, Zheng SG (2017) Vitamin D and chronic diseases. *Aging Dis* 8:346–353. <https://doi.org/10.14336/AD.2016.1021>
- Wang Z, Wang H, Kang Z, Wu Y, Xing Y, Yang Y (2020) Antioxidant and anti-tumour activity of triterpenoid compounds isolated from *Morchella* mycelium. *Arch Microbiol* 202:1677–1685. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01876-1>

- Wen Y, Peng D, Li C, Hu X, Bi S, Song L, Peng B, Zhu J, Chen Y, Yu R (2019) A new polysaccharide isolated from *Morchella importuna* fruiting bodies and its immunoregulatory mechanism. *Int J Biol Macromol* 137:8–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.171>
- Wijayawardene NN, Hyde K, Dai D, Goto BT, Saxena R, Erdoğdu M, Selçuk F, Rajeshkumar KC, Aptroot A, Błaszczowski J, Boonyuen N, da Silva GA, de Souza FA, Dong W, Ertz D, Haelewaters D, Jones E, Karunarathna S, Kirk P, Kukwa M, Kumla J, Leontyev D, Lumbsch H, Maharachchikumbura S, Marguno F, Martínez-Rodríguez P, Mešić A, Monteiro J, Oehl F, Pawłowska J, Pem D, Pfliegler W, Phillips A, Pošta A, He M, Li J, Raza M, Sruthi O, Suetrong S, Suwannarach N, Tedersoo L, Thiyagaraja V, Tibpromma S, Tkalčec Z, Tokarev Y, Wanasinghe D, Wijesundara D, Wimalaseana S, Madrid H, Zhang G, Gao Y, Sánchez-Castro I, Tang L, Stadler M, Yurkov A, Thines M (2022) Outline of Fungi and fungus-like taxa – 2021. 13:53–453. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/13/1/2>
- Wu H, Chen J, Li J, Liu Y, Park HJ, Yang L (2021) Recent Advances on Bioactive Ingredients of *Morchella esculenta*. *Appl Biochem Biotechnol* 193:4197–4213. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03670-1>
- Xiong C, Luo Q, Huang WL, Li Q, Chen C, Chen ZQ, Yang ZR (2017) The potential neurotogenic activity of aqueous extracts from *Morchella importuna* in rat pheochromocytoma cells. *Food Sci Biotechnol* 26:1685–1692. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0224-x>
- Yang C, Meng Q, Zhang Y, Hu Y, Xiao S, Zhang Y, Ju J, Fu S (2020) Morelsins A–F, six sesquiterpenoids from the liquid culture of *Morchella importuna*. *Tetrahedron* 76:131356. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2020.131356>
- Yang C, Meng Q, Zhou X, Cui Y, Fu S (2019a) Separation and identification of chemical constituents of *Morchella conica* isolated from Guizhou Province China. *Biochem Syst Ecol* 86:103919. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2019.103919>

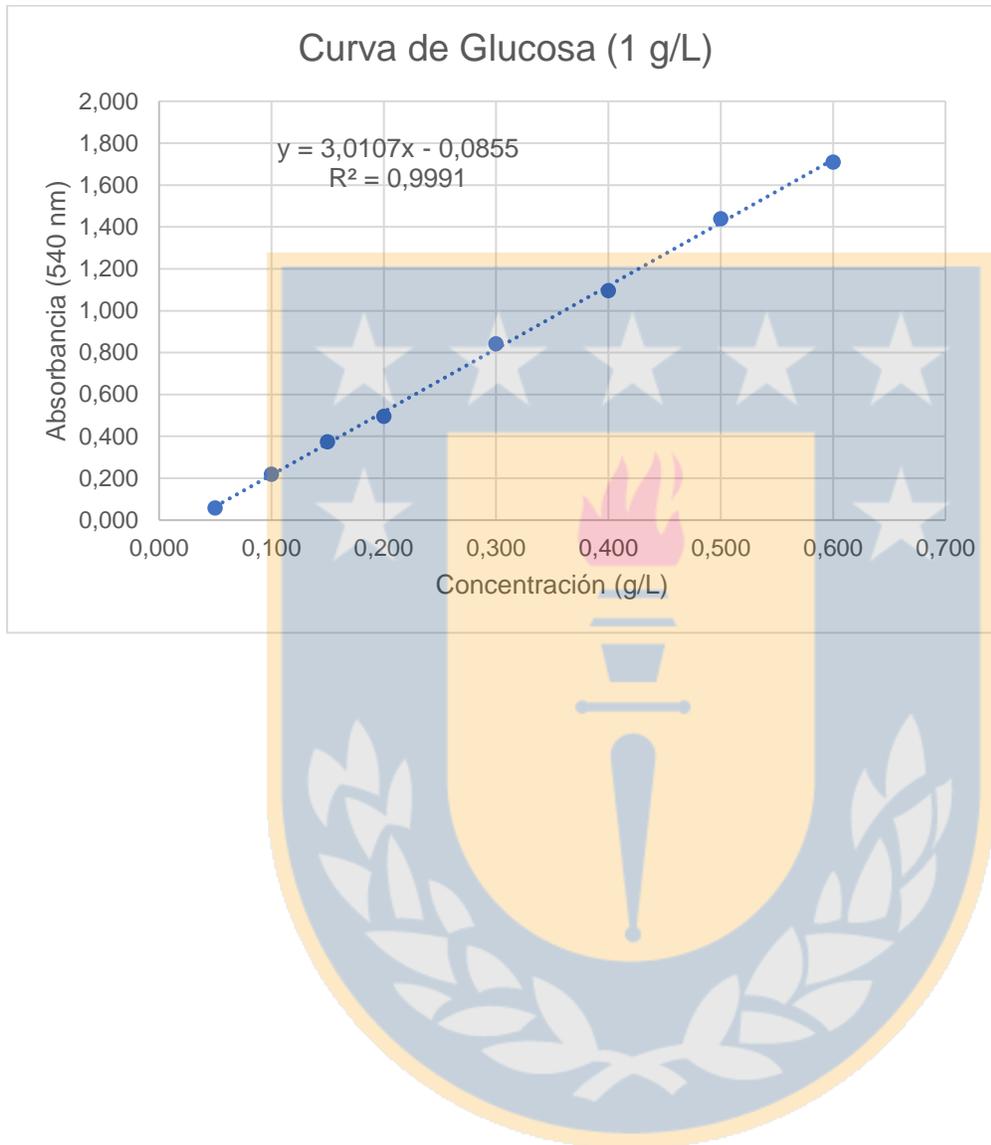
- Yang C, Zhou X, Meng Q, Wang M, Zhang Y, Fu S (2019b) Secondary metabolites and antiradical activity of liquid fermentation of *Morchella* sp. isolated from southwest China. *Molecules* 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24091706>
- Yang Y, Yang J, Wang H, Jin Y, Liu J, Jia R, Wang Z, Kang Z (2022) Analysis of primary metabolites of *Morchella* fruit bodies and mycelium based on widely targeted metabolomics. *Arch Microbiol* 204:1–9. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02612-z>
- Yu X, Peng W, Wang Y, Xu W, Chen W, Huang L, Xu H, He X, Wang S, Sun Q, Lu W, Xu Y (2023) Palmitic Acid Inhibits the Growth and Metastasis of Gastric Cancer by Blocking the STAT3 Signaling Pathway. *Cancers (Basel)* 15:388. <https://doi.org/10.3390/cancers15020388>
- Zhang G, Xie M, Kang X, Wei M, Zhang Y, Li Q, Wu X, Chen Y (2022) Optimization of ethyl hexanoate production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering. *LWT* 170. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114061>
- Zhang Y, Wang D, Chen Y, Liu T, Zhang S, Fan H, Liu H, Li Y (2021) Healthy function and high valued utilization of edible fungi. *FSHW* 10:408–420. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2021.04.003>

## Anexos

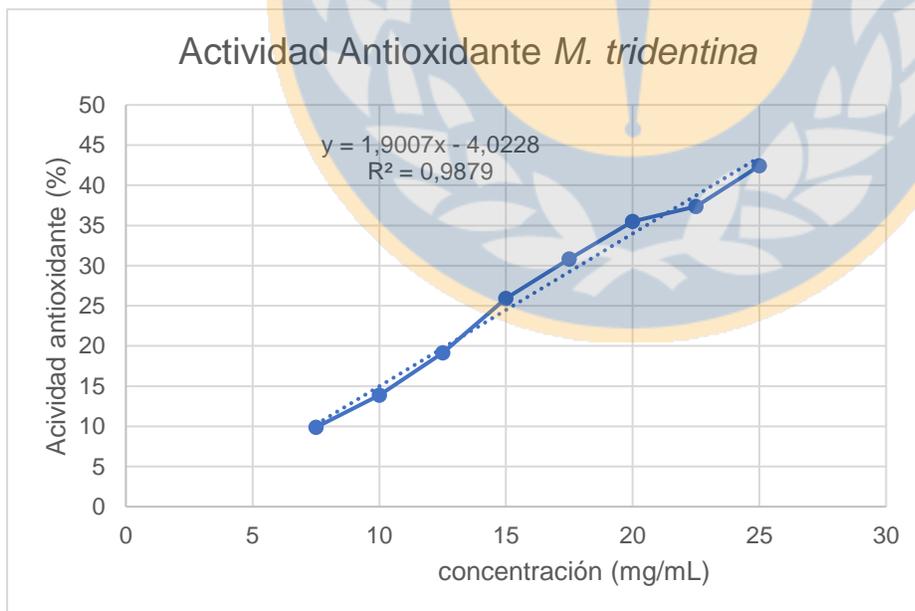
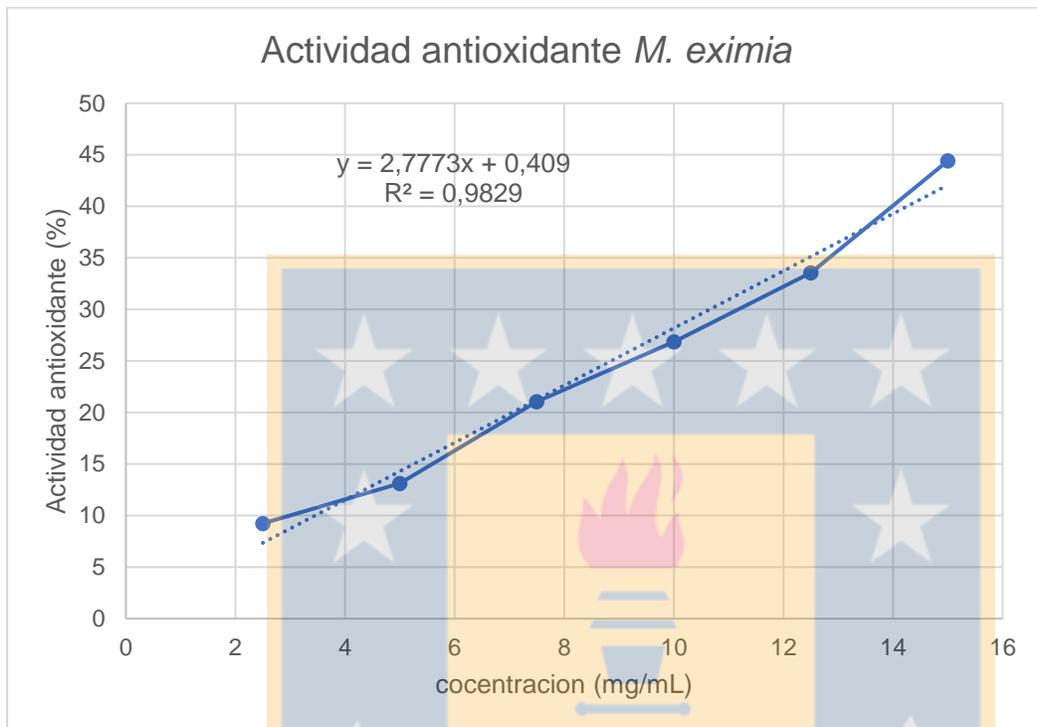
**Anexo 1:** Curva de calibración con proteína de suero bovino (BSA) para el ensayo de proteínas solubles por el método Bradford.



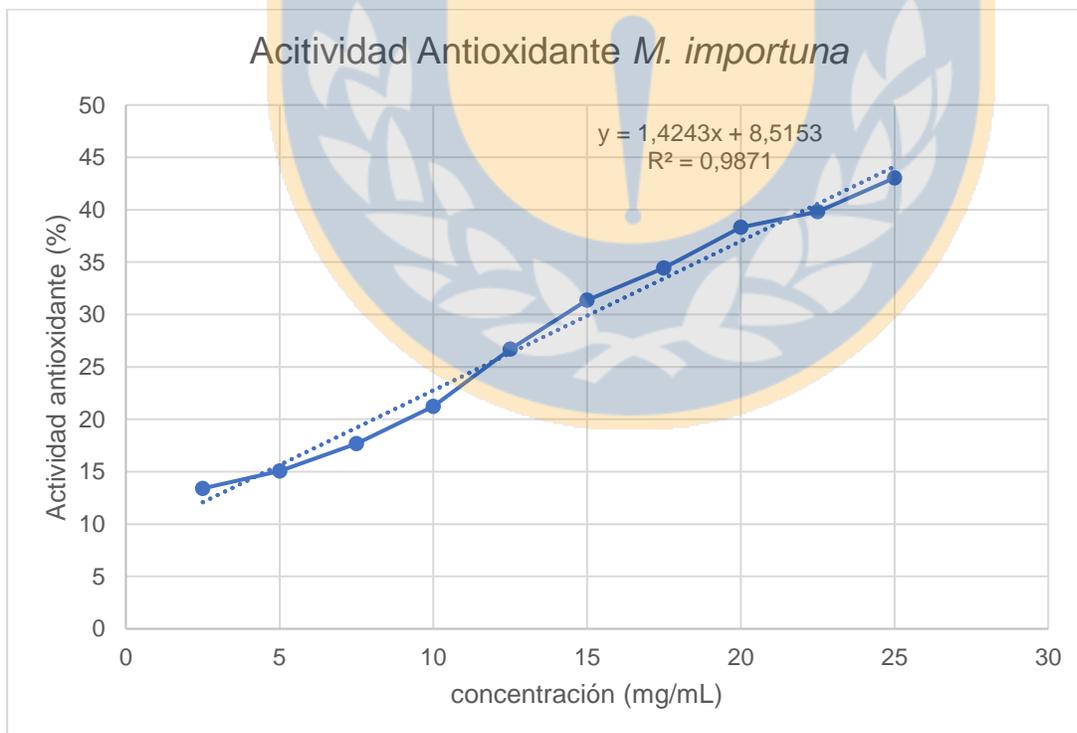
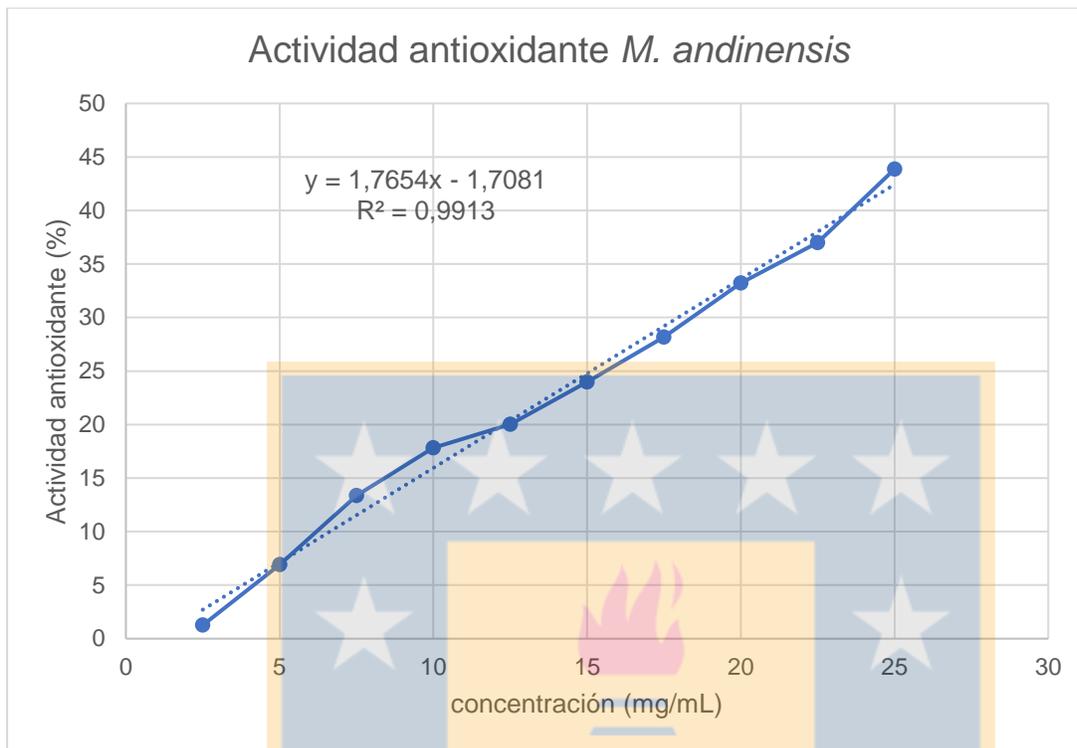
**Anexo 2:** Curva de calibración con glucosa para el ensayo de azúcares reductores por el método DNS.



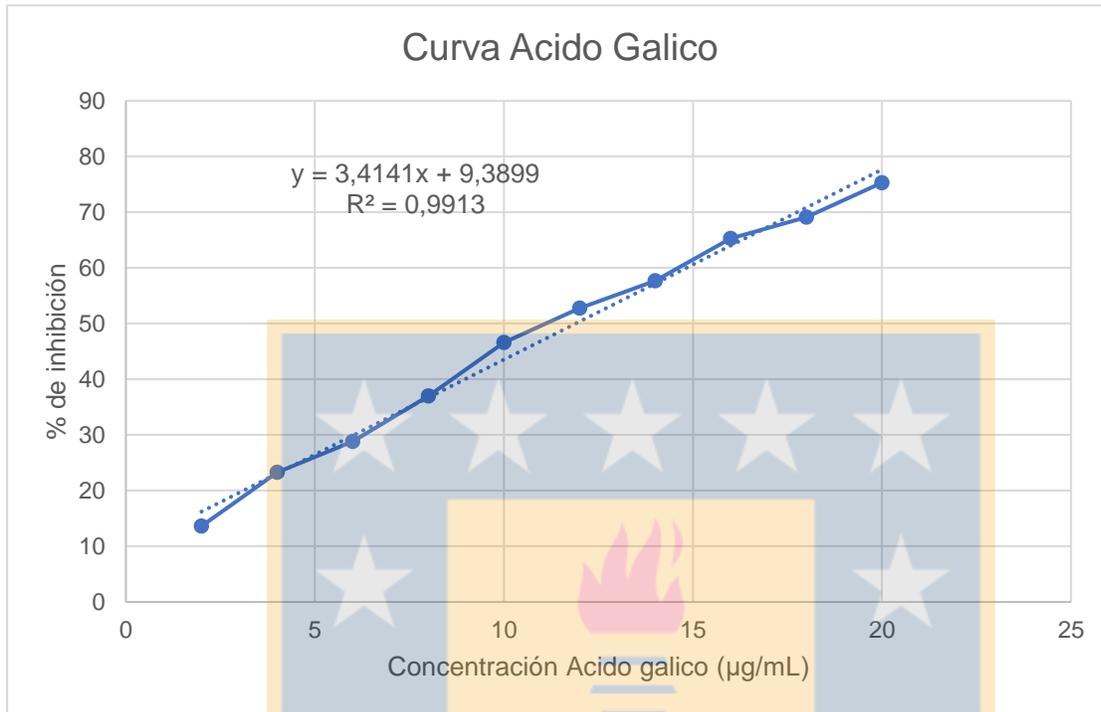
**Anexo 3:** Regresión lineal de los extractos del caldo de fermentación para el ensayo de actividad antioxidante por el método DPPH.



Continuación anexo 3:



**Anexo 4:** Curva de calibración con ácido gálico para el ensayo de actividad antioxidante con el método DPPH.



**Anexo 5:** Curva estándar de ácido gálico para el ensayo de polifenoles con el método Folin-Ciocalteu

