

<b>INDICE</b>	<b>Página</b>
I. ANTECEDENTES GENERALES	5
II. RESUMEN EJECUTIVO	6
III. TEXTO PRINCIPAL	7
1. RESUMEN DE LA PROPUESTA	7
2. CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS DEL PROYECTO	8
3. ASPECTOS METODOLÓGICOS DEL PROYECTO	9
3.1. Activación de cepas de Gargal de la colección.	9
3.2. Colecta de Gargal.	9
3.3. Cultivo e identificación de cepas de Gargal.	10
3.4. Conservación y criopreservación de cepas.	11
3.5. Efecto de la temperatura en el crecimiento de cepas.	11
3.6. Adaptabilidad de las cepas a distintos sustratos.	12
3.7. Producción de carpóforos experimentales.	13
3.8. Análisis proximal de carpóforos.	13
3.8.1. Respiración.	13
3.9. Diseño y fabricación de máquina llenadora de sustrato.	16
3.10. Adaptación y ambientación de módulo de producción.	16
3.11. Adaptación de sistema de producción comercial de Gargal.	16
3.12. Caracterización física y química.	17
3.13. Estudio de la duración de poscosecha del Gargal.	17
3.14. Estudio de la conservación en atmósfera modificada.	17
3.15. Estudio del sistema de deshidratado de hongos.	17
3.16. Producción de extractos de Gargal y capacidad antioxidante.	17
3.16.1. <i>Producción de extractos.</i>	17
3.16.2. <i>Análisis físico - químico.</i>	19
3.16.3. <i>Capacidad antioxidante.</i>	19
3.17. Producción de aromas de Gargal.	19
3.18. Producción de té de Gargal.	19
3.19. Análisis económico del Gargal.	19
4. DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES Y TAREAS EJECUTADAS	21
4.1. Formación de un banco de cepas nativas de Gargal.	21
4.2. Cultivo y conservación de cepas de Gargal.	21
4.3. Efecto de la temperatura en el crecimiento de Gargal.	21
4.4. Adaptabilidad de las cepas a los sustratos y producción de carpóforos.	21
4.5. Análisis proximal y medición de la respiración del Gargal.	22
4.6. Fabricación de llenadora de sustrato y adaptación de módulo.	22
4.7. Caracterización físico química del Gargal y producción de extractos.	22
4.8. Capacidad antioxidante.	22
5. RESULTADOS DEL PROYECTO	23
5.1. Activación de cepas de Gargal de la colección.	23
5.2. Colecta de Gargal.	23
5.3. Cultivo e identificación de cepas de Gargal.	26
5.4. Conservación y criopreservación de cepas.	26
5.5. Efecto de la temperatura en el crecimiento de cepas.	27
5.6. Adaptabilidad de las cepas a distintos sustratos.	31

5.7. Producción de carpóforos experimentales.	39
5.8. Análisis proximal de carpóforos.	44
5.8.1. Respiración.	44
5.9. Diseño y fabricación de máquina llenadora de sustrato.	47
5.10. Adaptación y ambientación de módulo de producción.	51
5.11 Adaptación de sistema de producción comercial de Gargal.	51
5.12 Caracterización física y química.	51
5.13. Estudio de la duración de poscosecha del Gargal.	52
5.14. Estudio de la conservación en atmósfera modificada.	52
5.15. Estudio del sistema de deshidratado de hongos.	53
5.16. Producción de extractos de Gargal y capacidad antioxidante.	53
6.16.1. <i>Producción de extractos de Gargal.</i>	53
5.16.2. Análisis físico - químico.	57
5.16.3 <i>Capacidad antioxidante.</i>	58
5.17. Producción de aromas de Gargal.	59
5.18. Producción de té de Gargal.	59
5.19. Análisis económico del Gargal.	59
5.19.1. Producción de carpóforos.	59
5.19.2. Producción de extractos.	61
6. FICHAS TÉCNICAS	65
6.1. Criopreservación de micelio de Gargal.	65
6.2. Producción de semilla de Gargal.	66
6.3. Producción artificial de carpóforos de Gargal.	67
7. PROBLEMAS ENFRENTADOS DURANTE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO	68
8. CALENDARIO DE EJECUCIÓN	69
8.1. Ejecución de actividades	69
8.2. Resumen de costos	70
9. DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS	71
10. IMPACTOS DEL PROYECTO	72
11. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	73
12. OTROS ASPECTOS DE INTERÉS	74
13. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA	75
14. ANEXOS	78

**INDICES DE CUADROS**

Página

1. Características del huésped y ubicación de los aislamientos de Gargal	24
2. Características del carpóforo de los aislamientos de Gargal	25
3. Tasas de crecimiento y coeficientes de correlación de cepas de Gargal	31
4. Tasas de crecimiento de cepas de Gargal incubadas en aserrín de Coihue	37
5. Tasas de crecimiento de cepas de Gargal incubadas en aserrín de Eucalipto	37
6. Tasas de crecimiento de cepas de Gargal incubadas en aserrín de Raulí	37
7. Tasas de crecimiento de cepas de Gargal incubadas en aserrín de Roble	38
8. Tiempo de cepas de <i>G. gargal</i> para máximo crecimiento en aserrines	38
9. Tiempo de crecimiento vegetativo hasta fructificación en distintos aserrines	39
10. Análisis proximal de carpóforos de Gargal	44
11. Modelos de punto máximo de respiración para Shiitake, Digueñe y Gargal	45
12. Rendimiento y concentración de extractos de Gargal	52
13. Rendimiento de extracción de Gargal con diferentes tratamientos térmicos	58
14. Composición antioxidante del Gargal con diferentes tratamientos térmicos	58
15. Atributos antioxidantes de Gargal extraídos a diferentes temperaturas	58
16. Costo inversión por ciclo de producción de Gargal, módulo artificial	59
17. Costo inversión por ciclo de producción de Gargal, modalidad natural	60
18. Costo operacional producción de Gargal bajo condición artificial y natural	60
19. Costo producción de Gargal en condiciones artificiales y naturales	61
20. Costo de producción de extracto de gargal	64
21. Comparación entre actividades programadas y ejecutadas	69

**INDICE DE FIGURAS**

Página

1. Esquema de respirómetro	14
2. Curvas de crecimiento para cepas de <i>Gargal</i> incubadas a 16 °C	28
3. Curvas de crecimiento para cepas de <i>Gargal</i> incubadas a 20 °C	29
4. Curvas de crecimiento para cepas de <i>Gargal</i> incubadas a 24 °C	30
5. Crecimiento vegetativo de cepas de <i>Gargal</i> en sustrato de aserrín de Coihue	33
6. Crecimiento vegetativo de cepas de <i>Gargal</i> en sustrato de aserrín de Eucalipto	34
7. Crecimiento vegetativo de cepas de <i>Gargal</i> en sustrato de aserrín de Raulí	35
8. Crecimiento vegetativo de cepas de <i>Gargal</i> en sustrato de aserrín de Roble	36
9. Rendimiento biológico de carpóforos de <i>Gargal</i> desarrollados en Roble	42
10. Rendimiento biológico de carpóforos de <i>Gargal</i> desarrollados en Coihue	42
11. Rendimiento biológico de carpóforos de <i>Gargal</i> desarrollados en Raulí	43
12. Rendimiento biológico de carpóforos de <i>Gargal</i> desarrollados en Eucalipto	43
13. Respiración en función de producción de CO <sub>2</sub> para Digueñe, Shiitake y <i>Gargal</i>	46
14. Vista de la primera estación de trabajo (Llenado)	48
15. Vista de la segunda estación de trabajo (Compactación)	48
16. Vista de la tercera estación de trabajo (Ensacado)	49
17. Fracción másica de solutos en extractos de <i>Gargal</i> en agua como solvente	53
18. Fracción másica de solutos en extractos de <i>Gargal</i> , en etanol como solvente	54
19. Fracción másica de solutos en extractos de <i>Gargal</i> en distintos solventes	54
20. Rendimiento de extracción de solutos de <i>Gargal</i> en agua como solvente	55
21. Rendimiento de extracción de solutos de <i>Gargal</i> , en etanol como solvente	56
22. Rendimiento de extracción de solutos de <i>Gargal</i> en distintos solventes	57
23. Diagrama de flujo de la producción de extracto a partir de <i>Grifola gargal</i>	61

## I. ANTECEDENTES GENERALES

Nombre del Proyecto:

**“Desarrollo del cultivo del hongo silvestre Gargal (*Grifola gargal*) y sus alternativas de procesamiento comercial”.**

Código: **FIA-PI-C-2004-1-A-018**

Región: **VIII**

Fecha de aprobación: **28 de diciembre del 2004.**

Agente Ejecutor: **Instituto de Investigaciones Agropecuarias, CRI Quilamapu.**

Agentes Asociados: **Universidad de Concepción, Facultad de Ingeniería Agrícola.**

Coordinador del Proyecto: **Andrés France Iglesias.**

Costo Total: **\$126.161.438**

Aporte del FIA: **\$70.400.768 (55,8% del costo total)**

Período de Ejecución: **36 meses.**

## II. RESUMEN EJECUTIVO

Se desarrolló el Proyecto titulado “Desarrollo del cultivo del hongo silvestre Gargal (*Grifola garga*) y sus alternativas de procesamiento comercial”, durante 36 meses a partir de enero del 2005. El proyecto tenía como objetivo domesticar una especie nativa de hongo lignívoro (*Grifola garga*), conocido popularmente como Gargal y que crece en árboles muertos de varias especies de *Notophagus*. Las actividades se concentraron en la colecta de material silvestre del hongo, entre las regiones de BioBio y Los Lagos, totalizándose 28 aislamientos, los que posteriormente dieron lugar a 10 cepas puras con las cuales se pudieron completar el resto de actividades. Todos estos aislamientos fueron identificados como *Grifola garga*, en base a sus características morfológicas y mediciones de estructuras macro y microscópicas. El material fue purificado y cultivado hasta asegurar que estaban libres de contaminantes. La colección se encuentra criopreservada y asegurada de que no se altere a través del tiempo.

Las cepas se evaluaron en cuanto a temperaturas óptimas de crecimiento, encontrándose que los rangos óptimos de crecimiento ocurren a temperaturas relativamente bajas y que si ésta se sube se produce muerte de micelio. La adaptabilidad a distintos sustratos madereros indicó que la especie óptima es Coihue, pero que también puede crecer en especies foráneas como el Eucalipto. La habilidad para desarrollar cuerpos fructíferos en condiciones controladas, mostraron que los rendimientos biológico son bajos (12%), lo cual pone una seria restricción para la producción comercial, debido al alto costo que requiere la implementación de un módulo para este tipo de hongo.

Con el material silvestre y de producción artificial, se realizaron análisis proximales, determinación de respiración, caracterización físico química y producción de extractos y su capacidad antioxidante. Otros parámetros, como formas de conservación y modificación de producto, no se pudieron realizar por falta de materia prima. Con toda la información disponible se realizó un análisis económico, para una eventual producción comercial de carpóforos o extractos, tanto en situaciones de módulo con ambientación artificial o un módulo ubicado en un clima que en forma natural permita la producción de Gargal, además se comparó con la cosecha silvestre.

Al final del proyecto, se puede concluir que el Gargal es factible de producirlo en forma artificial, que sus requerimientos de temperatura y humedad son muy exigentes y dentro de un rango estrecho, lo cual incide en el alto costo de producción. Sin embargo, su potencial estaría en la producción de extractos con propiedades antioxidantes, producto que no requiere una forma y tamaño específico de los carpóforos y que, además, tiene un alto valor en el comercio de suplementos alimenticios o medicina alternativa.

## TEXTO PRINCIPAL

### 1. RESUMEN DE LA PROPUESTA

El proyecto se basa en la inexplorada flora nativa chilena de hongos comestibles, la que tiene posibilidades insospechadas de producción de hongos comestibles, medicinales y otros usos por descubrir. Lo anterior ha sido demostrado en el proyecto FIA de “Identificación, domesticación y producción de hongos ostras (*Pleurotus ssp*)”, del cual se identificaron diferentes cepas nativas, algunas de las cuales presentaron niveles de producción similares a las comercializadas en mercados internacionales.

Para este proyecto, se propuso el estudio del Gargal (*Grifola gargal* Singer, Beih.), especie nativa que pertenece al mismo género de los hongos conocidos internacionalmente como Maitake o Hen of the Woods, los cuales tienen una gran aceptación en los mercados europeos y orientales, entre otros. A diferencia de las *Grifolas* conocidas y cultivadas en el mundo (*G. frondosa* y *G. umbellata*), el Gargal se produce sobre troncos muertos en altura, el color del pileo (sombrero) es blanco a cremoso y tiene un agradable olor a anís. En cambio, las especies conocidas como Maitake o Hen of the Woods se producen en madera pero en contacto con el suelo, son de color gris o café oscuro y no tienen un olor distintivo. El valor de la *Grifolas* está en su excelente y delicado sabor, que lo hace atractivo para los gourmet, su valor nutritivo y propiedades medicinales.

El Gargal se comercializa en ferias libres entre las Regiones de BioBío a Los Lagos, durante los periodos de producción (otoño e invierno), no existiendo producción artificial. Para cumplir con los objetivos se realizarán prospecciones en la IX y X regiones, junto con utilizar las cepas que ya posee el INIA Quilamapu y que se han logrado cultivar en medios artificiales. Se establecerán los medios más apropiados para el desarrollo de semilla, y se estudiarán la mejor combinación para establecer cultivos productivos, combinando diferentes maderas y suplementos. Las producciones obtenidas se utilizarán para evaluar distintas formas de procesamiento, tales como fresco, deshidratado, atmósfera modificada, extractos aromáticos, saborizantes, té, junto con analizar las características nutricionales de la producción.

La parte de producción comercial sería asumida por la empresa Full Mushroom, ubicada en Freire, IX región, debido a su experiencia en producción comercial de hongos lignívoros, como es el Shiitake. La parte comercial sería explorada a través de un estudio de mercado. Por consiguiente, los resultados del proyecto permitirán seleccionar, cultivar y procesar la especie Gargal, junto con protegerla de su colecta descontrolada, explorando el mercado y sus cualidades organolépticas. Los resultados abren una posibilidad para desarrollar nuevos cultivos, aprovechando la flora micológica chilena y sentar las bases de un banco de la especie, para futuros proyectos que exploren toda las potencialidades de la *Grifola gargal*, en particular el alto potencial medicinal que posee y que son desconocidos para la especie.

## 2. CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS DEL PROYECTO

El primer objetivo del proyecto se cumplió de acuerdo a lo planificado, partiendo por la activación de cepas y prospección inicial. Se realizaron dos colectas entre las regiones de BioBio y Los Lagos en temporadas separadas, la mas productiva fue la primera, mientras que la segunda solo rescató algunos ejemplares y de mala calidad, debido a problemas climáticos que no permitieron una producción aceptable de hongos. El objetivo se completó con los sistemas de aislamiento en terreno y los métodos de cultivo y almacenamiento en criopreservación.

El siguiente objetivo presentó demoras en su ejecución, debido a que se desconocía los requerimientos de temperatura que tenía el Gargal, para su crecimiento vegetativo. Finalmente se determinaron las temperaturas óptimas y el tipo de sustrato en el cual se realizaron las inoculaciones y cultivos sucesivos, lo cual eran parte del tercer objetivo. Sin duda que la temperatura fue la condición ambiental mas importante para el desarrollo del hongo, sobretodo considerando que el rango de crecimiento es muy estrecho y que pequeñas alzas de temperatura significaron reversión y muerte de la colonia.

El cuarto y quinto objetivos tuvieron el problema del lento crecimiento, bajo rendimiento biológico y falta de forma comercial de los carpóforos artificiales. Esto indudablemente afectó la producción que se esperaba y la falta de material para definir cuales eran los mejores métodos de conservación y procesamiento. Sin embargo, se realizaron otros estudios referentes a contenidos nutricionales, caracterización físico química, capacidad de respiración de los carpóforos y la producción de extractos y sus propiedades antioxidantes.

El objetivo del análisis comercial del Gargal también tubo el problema de la falta de producción artificial, sin embargo, se compensó este estudio a través de un análisis de mercado del hongo en sus condiciones actuales y bajo el sistema artificial que se lograron con el proyecto. Debido a los bajos rendimientos artificiales, el análisis concluye que no es comercial una producción artificial, excepto que está se produzca en condiciones donde el clima no haga necesario enfriar los módulos o, mejor aun, si el producto se destina a utilizar las propiedades antioxidantes del Gargal. No existió una transferencia directa de conocimiento a potenciales productores, debido a que no existieron producciones y rendimientos comerciales que sirvieran como ejemplos, esto se cumplió parcialmente a través de información científica que se entregó a través de presentaciones en congresos y publicaciones.

### 3. ASPECTOS METODOLÓGICOS DEL PROYECTO

#### 3.1. Activación de cepas de Gargal de la colección.

Dos aislamientos de Gargal que se mantenían cultivados y almacenados en tubos Eppendorf de 1,5 ml en nitrógeno líquido, desde antes que se iniciara el proyecto, fueron descongelados mediante inmersión en agua a 37°C por 10 segundos, para posteriormente ser traspasados a placas de Petri con medio de agar malta. Luego se incubaron a 12°C y oscuridad hasta el cubrimiento de placas.

#### 3.2. Colecta de Gargal.

La colecta se realizó de acuerdo a información que se obtuvo a través de recolectores habituales de Gargal, está se concentró en las regiones de La Araucanía, Los Ríos y Los Lagos, lográndose 35 muestras positivas compuestas de uno o varios carpóforos por árbol. Los sitios de colecta se caracterizaron por ser bosques nativos con sectores poco intervenidos o al menos en donde se encontraban los árboles con Gargal (Foto 1). Al momento de la colecta de muestras se tomaron notas de ubicación geográfica (latitud, longitud y altura) mediante el uso de GPS (Foto 2), identificación del huésped (especie, edad aproximada y temperatura), y características intrínsecas del hongo colectado: dimensiones, forma, color, olor y cualquier otra característica que fuera destacable (Foto 3). Con esta información se creó una planilla de cepas colectadas y se trató de extrapolar algún patrón de crecimiento del Gargal.



Foto 1. Lugares de colecta del Gargal.



Foto 2. Gargal *in situ* y medidores de temperatura y GPS.



Foto 3. Detalle del pileo de Gargal.



Foto 4. Envés del pileo de Gargal.

### 3.3. Cultivo e identificación de cepas de Gargal.

Debido a que el Gargal es una especie perteneciente a la Familia Poliporacea, que le da la característica de poseer una estructura esponjosa compuesta de múltiples poros denticulados (Foto 4), lo que le da la posibilidad de adsorber y retener gran cantidad de agua, su aislamiento y cultivo resulta particularmente difícil, ya que se encuentra asociado a una gran cantidad de bacterias y levaduras que crecen en forma natural y que contribuyen a su rápido deterioro una vez que madura el carpóforo. Además, por producir un tejido succulento y de gran tamaño, resulta en un buen sustrato de crecimiento para otros organismos secundarios, tales como larvas de moscas micófagas que llegan atraídas por el olor del hongo. Lo anterior significa que la mayoría de los cultivos que se realizan terminan contaminados con bacterias, las que ahogan el micelio de Gargal. Como una forma de disminuir este problema, se realizaron siembras *in situ* o cercanas a la cosecha de los carpóforos, de manera de evitar el aumento descontrolado de bacterias que se produce durante el transporte, además se debe considerar que los lugares de colecta estaban en zonas apartadas, con lo cual resultaba difícil realizar siembras en laboratorio antes de 2 o 3 días después de la cosecha.

Las siembras se realizaron a partir de trozos pequeños (2-3 mm) colectados desde el centro del estipe (pie) de los carpóforos, mediante técnicas asépticas, a placas de Petri de 6 cm de diámetro y con medios de agar malta. Estos cultivos y el carpóforo que le dio origen fueron trasladados al laboratorio dentro de cajas refrigeradas (10-15 °C), donde nuevamente se repitieron los procedimientos de aislamiento. Todas las placas se incubaron a 12 °C y oscuridad permanente, hasta el desarrollo de micelio. Una vez lograda una colonia se procedió a repicar el cultivo de manera de asegurar un cultivo puro.

Junto con el proceso de siembra y cultivo, se realizó la identificación de las especies de Gargal, mediante preparación y observación microscópica de los basidios y basidiosporas, describiendo su forma y tamaño. También se identificó la huella esporal, dejando pileos (sombrosos) seleccionados sobre cartulina negra por una

noche y cubiertas por una placa. Al día siguiente se removió el carpóforo y se observó el color de las esporas.

### **3.4. Conservación y criopreservación de cepas.**

A medida que se lograban colonias puras de Gargal se procedió a su conservación en dos ambientes diferentes: en tubos de ensayos refrigerados y mediante criopreservación. En el primer caso, se realizaron traspaso de micelio desde colonias puras creciendo en placas de Petri a tubos de ensayo de 10 ml con medio agar malta inclinado, luego de un período de incubación (15 a 20 días) fueron cubiertos con aceite mineral estéril y almacenados en refrigeración (5 °C).

Para el caso de la criopreservación, se procedió a sembrar un trozo pequeño de agar con la colonia del hongo (aprox. 2 mm<sup>2</sup>) en 1 ml de medio líquido de caldo de malta, dentro de criotubos de 1,5 ml y por 7 días. Una vez obtenido una colonia visible dentro del criotubo, el caldo de malta fue reemplazado por 1 ml de solución estéril de dimetil sulfóxido (DMSO) al 5%, luego los criotubos fueron tapados y sumergidos directamente en la fase líquida del nitrógeno líquido (-196 °C). Se prepararon 10 criotubos por aislamiento. Para comprobar la sobrevivencia del hongo, uno de los criotubos fue retirado del nitrógeno líquido después de 48 horas y sumergido de inmediato en un vaso precipitado con agua a 27 °C hasta su descongelamiento, posteriormente el trozo de micelio fue sembrado en agar malta e incubado a 20 °C hasta el desarrollo normal de una colonia.

### **3.5. Efecto de la temperatura en el crecimiento de cepas.**

Los aislamientos de Gargal fueron sometidos a diferentes temperaturas de crecimiento: 12, 16, 20 y 24 °C, no se incluyeron mas tratamientos, como originalmente fue propuesto en el proyecto original, ya que mas allá de estas temperaturas no se produjeron crecimientos medibles. Las pruebas se realizaron en placas de Petri con medio agar papa y levaduras, las evaluaciones se tomaron cada día y por el tiempo que demoró en cubrir una placa de 90 mm de diámetro.

La siembra se realizó mediante traspaso con un sacabocado de 6 mm de diámetro, colectado del margen de un cultivo madre en activo crecimiento. El trozo de agar con micelio fue depositado en el centro de una placa de 90 mm de diámetro, con el micelio en contacto con el agar. En el lado inverso de la placa se dibujaron 4 radios equidistantes a partir del centro, sobre las cuales se midió el crecimiento de la colonia. Las placas fueron incubadas en oscuridad dentro de cámaras de incubación, las cuales llevaron bandejas con agua destilada estéril para lograr una humedad cercana a saturación (99%).

Las mediciones consistieron en crecimiento diario, al término del ensayo los resultados se sometieron a análisis de regresión, de manera de obtener la tasa diaria de crecimiento. El diseño estadístico fue completamente al azar, con cuatro tratamientos (temperaturas), 10 cepas de *G. gargal* y cuatro repeticiones (placas Petri) por cada tratamiento.

### 3.6. Adaptabilidad de las cepas a distintos sustratos.

Las 10 cepas seleccionadas han sido sembradas en sustratos de aserrín de las siguientes maderas: Coihue, Rauli, Roble y Eucalipto. Los sustratos fueron preparados con una mezcla de afrecho al 2% y urea diluida al 1% peso/peso, mientras que la madera fue mezclada en mitad aserrín y mitad viruta.

Para este ensayo se utilizaron frascos de vidrio de 20 cm de alto por 8 cm de diámetro, a los cuales se les agregó 800 g de aserrín húmedo de las especies mencionadas. Estos frascos con el sustrato fueron esterilizados a 120° C por 1 hora en autoclave. Posteriormente, los frascos se dejaron enfriar por 12 horas para luego ser inoculados bajo condiciones de esterilidad, dentro de una cámara de flujo y bioseguridad, con los diferentes aislamientos de *Grifota gargal* (10 cepas en total). Los aislamientos utilizados fueron previamente cultivados en placas de Petri de 100 x 15 mm, como se ha descrito anteriormente.

Los frascos fueron tapados con tela sintética mas un trozo de papel Craft, para permitir el intercambio de aire. Luego fueron incubados en cámara a  $18 \pm 2$  °C, con una humedad relativa de  $70 \pm 2,5\%$  y oscuridad permanente a la espera del proceso de colonización. Una vez iniciado dicha etapa se realizaron las mediciones diarias del avance de crecimiento de micelio, a través de la observación y medición a través del vidrio del frasco (Foto 5).



Foto 5. Frascos de cultivo para la medición del crecimiento miceliar del Gargal.

Los tratamientos fueron 10 cepas de Gargal, por cuatro tipos de aserrín (Coihue, Eucalipto, Raulí y Roble). El diseño experimental fue un completo al azar con tres repeticiones para cada tratamiento. Las evaluaciones correspondieron a la tasa de

crecimiento diario, obtenida a través de la regresión lineal de las curvas de crecimiento diaria. Al término del ensayo se compararon los tiempos totales para cubrir los frascos de cultivo, mediante un análisis de varianza y comparación de medias a través de la prueba de rango múltiple de Fisher.

### **3.7. Producción de carpóforos experimentales.**

Luego que se completó la colonización del micelio dentro de los frascos de cultivo, éstos pasaron a la etapa de inducción de carpóforos, para ello se les agregó 200 ml de agua destilada a cada frasco y se dejaron en una cámara de incubación, acondicionada a 12 °C, una humedad relativa de 80% y oscuridad. La incubación duró hasta la formación de esclerocios (primordios o botones) de los futuros carpóforos de Gargal.

Los frascos con esclerocios fueron trasladados a la sala de fructificación, la cual fue adaptada después de diferentes pruebas de temperatura y humedad, quedando finalmente a temperaturas de  $15 \pm 2$  °C, humedad relativa de 95 a 100% y luminosidad permanente. Bajo estas condiciones se evaluó el tiempo y el desarrollo de carpóforos.

Además, se midieron los rendimientos biológicos de los cultivos artificiales de las 10 cepas con mejor comportamiento y que colonizaron los sustratos de las diferentes maderas, para esto se pesaron los carpóforos que se lograron desarrollar considerando como momento de cosecha cuando no se siguió observando crecimiento del cuerpo frutal. El peso de los carpóforos se promedió y los resultados se sometieron a análisis de varianza, seguido de una separación de medias mediante la prueba de Fisher.

### **3.8. Análisis proximal de carpóforos.**

Se evaluaron los diferentes componentes de los carpóforos de Gargal a través de un análisis proximal, el cual midió los siguientes parámetros y sus respectivas metodologías:

- a) Humedad (% b.h.) y materia seca (%), realizado mediante gravimetría.
- b) Extracto etéreo (%), el cual se realizó por medio de extracción Soxhlet.
- c) Proteínas (%), se utilizó el método Bradford.
- d) Azúcares reductores (%), de acuerdo al método de Feheling.
- e) pH y sólidos solubles (%), medidos directamente con instrumental.
- f) Cenizas (%), a través de gravimetría.

#### **3.8.1. Respiración.**

Como parte del estudio de análisis proximal del Gargal, se evaluó el comportamiento de esta especie durante la post recolección de las setas. Como indicador de comportamiento, se midió la respiración (cinética) mediante la concentración de CO<sub>2</sub> generada.

El objetivo fue desarrollar un modelo matemático que represente el comportamiento de la cinética de respiración en función de la temperatura y el tiempo para el Gargal, y compararlo con los hongos Digüeñe (*Cyttaria espinosae*) y Shiitake (*Lentinus edodes*). Para el estudio se seleccionaron estas tres especies de hongos comestibles, debido a que el Gargal y el Digüeñe pertenecen a la flora nativa chilena, ambos tienen un gran potencial comercial pero no han sido desarrollados, mientras que el Shiitake es una especie cultivada ya conocida y ampliamente consumida en muchas partes del mundo, razón por la cual fue utilizada para poder comparar con las especies nativas.

El origen del material fue el siguiente:

- Gargal: Se recolectaron 15 Kg de setas provenientes de la Región de La Araucanía (Trobolhue), las cuales se seleccionaron de acuerdo a su estado sanitario, textura y aspecto en general.
- Digüeñes: Las setas fueron recolectadas en la Región del Bio Bio (zona cordillerana de Ñuble). Se utilizaron para los ensayos 10 Kg, los cuales fueron seleccionados de acuerdo a color, estado de desarrollo, sanidad y aspecto en general.
- Shiitake: El material fue cultivado en forma artificial y cosechados el día anterior de realizar las mediciones. Se utilizaron 10 Kg de setas de color y tamaño uniforme, con un rango del pileo entre 5 a 7cm.

El sistema constó de una cámara de respiración, denominada cámara respiratoria (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), en la cual se mantuvo las muestras por 2 horas aproximadamente. Esta cámara de respiración, fue alimentada con aire ambiente por medio de una bomba de aire puesta al inicio del circuito.

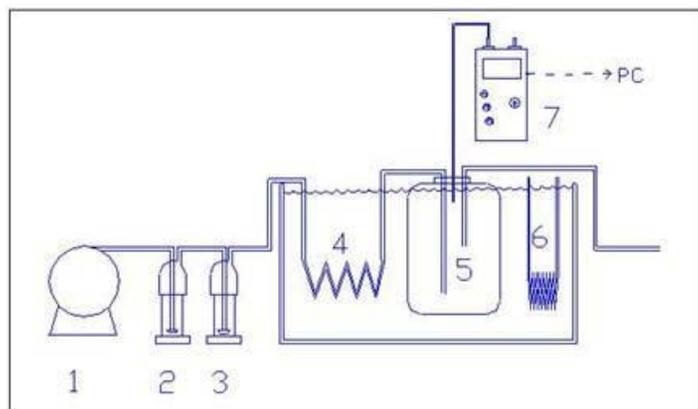


Figura 1. Esquema de respirómetro. 1: Bomba de aire; 2: Frasco dispersor con KOH 25%; 3: Frasco dispersor con H<sub>2</sub>O; 4: Intercambiador de calor para acondicionar aire; 5: Cámara de respiración; 6: Intercambiador de calor para regular temperatura del baño; 7: Equipo medidor de gases.

Para asegurar que el aire alimentado a la cámara respiratoria estuviera exento de dióxido de carbono, se hizo pasar por dos frascos lavadores provistos de difusores, uno con hidróxido de potasio y otro con agua. Para la determinación de la concentración de dióxido de carbono y oxígeno, se utilizó el método de determinación directa con un equipo medidor de gases (BACHARACH 2830, UK) cada un minuto.

Para la mantención de una temperatura constante, durante la realización del ensayo, se utilizó un baño termoregulado, el que trabajó a diferentes temperaturas (10, 15, 20, 25 y 30 °C), para determinar la tasa de respiración de los hongos en cada una de ellas.

La determinación de la ecuación cinética estableció como etapas generales las siguientes:

- Cálculo de la velocidad de reacción.
- Propuesta de uno o más modelos que proporcionen una ecuación algebraica que relacione la velocidad con las variables de concentración y temperatura.
- Cálculo de los parámetros cinéticos de los modelos propuestos por ajuste de los datos experimentales.
- Discriminación del modelo cinético más adecuado.

Se asumió que la generación de dióxido de carbono a partir de la respiración de un vegetal es irreversible y sigue una cinética de orden  $\alpha_A$ , con lo cual se tiene la Ecuación 1:

$$r = kC_A^{\alpha_A} \quad \text{Ecuación 1}$$

Los parámetros cinéticos de este modelo son el orden  $\alpha_A$  y la constante cinética k.

Para determinar el orden de la reacción, de la concentración de dióxido de carbono (%CO<sub>2</sub>) versus el tiempo (min.), los datos fueron expresados como X; siendo este parámetro:

$$X = \frac{(\%CO_{2\max imo} - \%CO_{2C})}{\%CO_{2\max imo}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Si la reacción sigue una cinética de primer orden, la tasa de reacción puede ser obtenida por la gráfica de ln(X) versus tiempo (t), y usando la Ecuación 3. La pendiente es negativa, por lo tanto la constante (-K) es negativa.

$$\ln(x) = -Kt \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde K es la constante de cinética de respiración (min.<sup>-1</sup>) y t es el tiempo (min.).

Sin embargo esta relación no muestra la influencia que tiene la temperatura sobre la reacción, si no que representa la dependencia de la concentración de dióxido de carbono con el tiempo.

La dependencia de la reacción con la temperatura es posible determinarla por medio de la ecuación de Arrhenius (Ecuación 4), la cual al ser expresada en forma lineal con la aplicación de logaritmo natural, en ambos lados de la expresión, queda de la siguiente forma:

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_A}{R} \frac{1}{T} \quad \text{Ecuación 4}$$

De esta manera los parámetros  $\ln k_0$  y  $E_A/R$  pudieron ser determinados por medio del análisis de regresión del logaritmo natural ( $\ln K$ ) a partir de las constantes cinéticas de reacción  $K$  para cada una de las temperaturas en estudio (10, 15, 20, 25 y 30 °C).

### **3.9. Diseño y fabricación de máquina llenadora de sustrato.**

Para el diseño y construcción de la máquina llenadora de sustrato se establecieron primero los criterios de diseños, luego se desarrolló un prototipo que permitiera el máximo de regulaciones, para ajustarse a las condiciones de procesos. El diseño final que se fabricó se probó con aserrín como sustrato y el modelo fue similar al de una “máquina para fabricar de briquetas de aserrín”. Se incluyeron los planos de diseño y una descripción de los componentes y sus funciones.

### **3.10. Adaptación y ambientación de módulo de producción.**

Para lograr la fructificación del Gargal fue necesario acondicionar un módulo de producción, de manera de cumplir con los estrictos requerimientos de ambiente que necesita este hongo. Las modificaciones consideraron la instalación de una unidad de frío con controladores digitales de temperatura, de manera de obtener una temperatura constante de  $11 \pm 1$  °C. La humedad se manejó con un equipo humidificador ULV/Mist Sprayer, el cual permitió mantener una humedad ambiental de 98 a 100%. La luminosidad fue constante (día y noche) y se entregó a través de cuatro tubos fluorescentes de 40 W cada uno.

### **3.11. Adaptación de sistema de producción comercial de Gargal.**

Esta actividad no se efectuó, debido a los problemas que existieron desde el comienzo con el crecimiento reproductivo de esta especie, entre las que se pueden mencionar las siguientes:

- Dificultad para obtener las primeras aislaciones,
- Lento crecimiento del micelio,
- Crecimiento a bajas temperaturas,
- Prolongado tiempo de incubación,
- Bajos requerimientos térmicos para emitir carpóforos,
- Necesidad de equipos complejos para ambientar el módulo, capaces de entregar frío y alta humedad.

### **3.12. Caracterización física y química.**

La literatura internacional menciona la caracterización de otras especies del género *Grifola* en el mundo, tales como *G. frondosa* y *G. umbellata*, las cuales han presentado un gran contenido de metabolitos benéficos para la salud humana. El objetivo entonces fue analizar, en forma general, que propiedades podría tener nuestra especie nativa *Grifota gargal* y, que en parte, es semejante a las especies mencionadas anteriormente. Por consiguiente, en los laboratorios de la Universidad de Concepción se desarrollaron diferentes ensayos que consideraron el efecto del tratamiento térmico en las siguientes variables:

- a) El tipo de solvente;
- b) La razón agua/ etanol (solvente), y
- c) La capacidad anti-oxidante de los diversos extractos (ver punto 3.16), además de la capacidad anti-bacteriana, anti-fúngica y herbicida de estos extractos.

Como primera etapa fue enfrentar como lograr un buen extracto, para lo cual se evaluaron diferentes tipos de solventes: hexano, etanol, acetona, agua y acetato de etilo. Se evaluaron además temperatura de extracción y diferentes proporciones de los solventes y agua, todo lo cual se presenta en la sección de resultados.

### **3.13. Estudio de la duración de poscosecha del Gargal.**

La falta de producción artificial de cuerpos fructíferos de tamaño aceptable no permitieron cumplir con esta actividad.

### **3.14. Estudio de la conservación en atmósfera modificada.**

Actividad sin metodología por las causas anteriores.

### **3.15. Estudio del sistema de deshidratado de hongos.**

La falta de producción artificial de cuerpos fructíferos de tamaño aceptable no permitieron cumplir con esta actividad.

### **3.16. Producción de extractos de Gargal y capacidad antioxidante.**

#### **3.16.1. Producción de extractos.**

El trabajo de los extractos de Gargal se realizó a partir de material colectado en la zona sur de Chile (Regiones de La Araucanía y Los Lagos). Lo primero fue encontrar la mejor metodología y procesamiento de las muestras, que aseguraran extraer la mayor cantidad de extractos y que conserven las características descritas en la bibliografía. Como materia prima se utilizó hongos recolectados de la zona precordillerana de Temuco y Osorno (Foto 6), los que se congelaron a -20 °C durante 4 meses antes de su primera extracción. El hongo descongelado se lavó con agua, se trituró mediante la cortadora Hobart, modelo 84181 D y luego los solutos fueron extraídos con agua destilada y etanol, respectivamente, en el equipo de extracción,

Flocculator SW 6 (Bibby Stuart) a  $27 \pm 1$  °C (Foto 7). Finalmente, se separaron extracto y refinado mediante centrifugación a 9.000 g durante 10 minutos (Centrífuga IEC HN-SII, Damon IEC Division).



Fotos 6 y 7. Proceso de extracción de solutos desde gargales (*Grifota gargal*): Foto 6) materia prima gargal deshidratado, Foto 7) floculador durante el proceso de extracción.

El avance y la eficiencia del proceso de extracción se evaluaron a través de los siguientes parámetros: fracción másica de soluto en el extracto, fracción de solutos extraídos y rendimiento de extracción de solutos. A partir del balance de masa global ( $F + S = R + E$ ), en combinación con el balance de masa de soluto ( $x_F \cdot F + y_s \cdot S = x_R \cdot R + y_E \cdot E$ ), se determinó experimentalmente la fracción másica de solutos en la alimentación ( $X_F$ ), en el extracto ( $Y_E$ ) y se calculó la fracción másica de soluto en el refinado ( $X_R$ ). Luego, la fracción de solutos extraídos se calculó como:

$$1 - f = \frac{y_E \cdot E}{x_F \cdot F}$$

El factor de separación se define como:

$$S^* = \frac{1 - f}{f}$$

Donde  $f$  corresponde a la fracción de solutos no extraídos.

El coeficiente de distribución de solutos entre el extracto y el refinado se define como:

$$\alpha = \frac{y_E}{x_R}$$

Finalmente, el rendimiento de la extracción de solutos se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$R = \left( 1 - \frac{x_R}{x_F} \right) \cdot 100\%$$

### **3.16.2. Análisis físico - químico.**

A partir de las muestras colectadas para la actividad anterior, se midió la luminosidad e intensidad del hongo triturado mediante la tabla Munsell de colores. El pH del hongo triturado y de los extractos se midió mediante el pH-metro Hanna, modelo HI 8521. Los sólidos solubles en el hongo triturado y los extractos se midieron mediante el refractómetro Atago N-1e. Los sólidos totales en el hongo triturado y los extractos se midieron por gravimetría, utilizando una balanza analítica Ainsworth, modelo 1500, a 24 y 48 horas, secando las muestras en el horno Gallenkamp Hotbox Oven a 70 °C hasta peso constante.

### **3.16.3. Capacidad antioxidante**

Se utilizaron muestras de Gargal, las cuales fueron almacenadas a -18 °C por 4 meses. Las muestras fueron descongeladas, lavadas y secadas utilizando papel absorbente, después fueron trituradas utilizando una cortadora Hobart 84181. Las muestras fueron divididas en 15 porciones de 50 g cada una. Tres muestras no recibieron tratamiento térmico, seis fueron calentadas a 100°C, tres por 20 min. y tres por 45 min. Las seis muestras restantes fueron calentadas a 121 °C.

Las muestras fueron homogenizadas con 100 mL de etanol:agua (80:20) por 15 min, sonificadas y centrifugadas. El sobrenadante fue concentrado y guardado a -18 °C. Se determinó rendimiento de la extracción, capacidad antioxidante utilizando ABTS y DPPH, poder reductor, actividad secuestrante y compuestos antioxidantes.

### **3.17. Producción de aromas de Gargal.**

Esta actividad se debía desarrollar a partir de la producción artificial, la falta de carpóforos no permitió cumplir con lo propuesto.

### **3.18. Producción de té de Gargal.**

La actividad también requería de producto artificial, por lo cual no se pudo desarrollar.

### **3.19. Análisis económico del Gargal.**

Esta actividad fue realizada por los economistas Jorge González U. y Roberto Velasco H.; el primero no estaba considerado en el proyecto original. El trabajo realizado consideró los antecedentes de la especie Gargal, dado que es una especie nativa y por pertenecer al mismo género de hongos de otras latitudes conocidos como Maitake o Hen of the Woods, los que presentan buenos nichos de mercado comestible en Europa y Asia. Los atributos de interés comercial del Gargal dicen relación con su sabor suave, alto valor nutritivo y sus propiedades medicinales. En Chile sólo se comercializa por su atributo comestible en forma esporádica desde la VIII Región al sur, sin canales formales de comercialización ni procesos de valor agregado o generación de productos a escala mayor. La fuente de Gargal comercializado es la colecta directa desde bosques nativos, donde hay condiciones óptimas de alta humedad relativa y temperaturas medias no superiores a 12 °C; sin

embargo los volúmenes factibles de coleccionar no permiten proyectar iniciativas de explotación y comercialización de mayor escala.

El proyecto generó un protocolo de producción artificial con ambiente controlado, además generó una metodología de producción de extracto de Gargal el que puede presentar propiedades medicinales y antitumorales, como se ha demostrado con otras especies de *Grifola*. Existen reportes que indican control de cáncer de mamas en ratones de laboratorio, debido a la presencia en el extracto de altos contenidos de polifenoles, flavonoides y proteoglucanos. Los protocolos de producción artificial de Gargal, insumo básico para generar el extracto, requieren un grado de aplicación de tecnología e inversión que, posiblemente, generen un costo no siempre factible de abordar. Por lo anterior se realizó un análisis comparativo de producción de extracto, comparando producción del hongo según las condiciones del módulo original del proyecto versus la alternativa, simulada, de producción artificial de hongos en condiciones climáticas naturales, como podría ser en las regiones de Aysén y Magallanes, adecuadas a los requerimientos ambientales del hongo. El análisis considera la producción de carpóforos y de extractos en forma separada.

La explicación de la metodología, supuestos y las valorizaciones se describen en los resultados, para un mejor seguimiento del análisis.

## **4. DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES Y TAREAS EJECUTADAS**

### **4.1. Formación de un banco de cepas nativas de Gargal.**

Se realizaron dos colectas en temporadas consecutivas de carpóforos de *G. gargal* entre las regiones de BioBio y Los Lagos, mas la incorporación de otras cepas colectadas previamente al proyecto, se logró la formación de un banco de cepas de Gargal con información sobre lugares y sustratos de colonización, antecedentes morfológicos y microscópicos.

### **4.2. Cultivo y conservación de cepas de Gargal.**

Se realizaron cultivos de carpóforos de Gargal en laboratorio e *in situ*, resultando mas efectivo el segundo, y luego de varios trasposos hasta lograr colonias puras. Todas las cepas purificadas fueron conservadas en tubos con medio a base de agar y cubiertas con aceite y, también, se procedió a conservar los aislamientos en nitrógeno líquido (-196 °C), sistema que permite conservar las cualidades inalterables del hongo en forma indefinida.

### **4.3. Efecto de la temperatura en el crecimiento de Gargal.**

Se evaluaron cuatro temperaturas de incubación para medir el crecimiento de micelio en 10 cepas promisorias de *G. gargal*. Las evaluaciones se realizaron en placas de Petri, midiendo diariamente el crecimiento de la colonia de hongo hasta alcanzar el borde de la placa. Los resultados se evaluaron mediante regresiones del crecimiento a través del tiempo, obteniéndose las tasas de crecimiento diaria para distintas cepas. Originalmente se deseaba probar temperaturas de incubación hasta 30 °C, pero esta especie no puede crecer a altas temperaturas, incluso revirtiendo su crecimiento si este factor sube pr sobre un valor crítico.

### **4.4. Adaptabilidad de las cepas a los sustratos y producción de carpóforos.**

La adaptabilidad del crecimiento de las cepas de Gargal se midió haciendo crecer el hongo en sustratos de mitad aserrín y mitad viruta de Coihue, Rauli, Roble y Eucalipto, suplementados con una mezcla de afrecho al 2% y urea al 1% peso/peso. La forma de medir el crecimiento fue visual, observando diariamente la colonización del micelio a través de frascos de vidrio. Si bien esta metodología no es lo ideal, cualquier otro método mas exacto habría sido destructivo impidiendo la medición a través del tiempo.

Luego de finalizado el ensayo de colonización, se utilizaron los mismos frascos para observar la fase reproductiva, para lo cual se indujeron los cultivos a 12 °C y oscuridad hasta la formación de esclerocios. Posteriormente, se pasaron los frascos a la sala de producción, donde existían condiciones de 95 a 100% de humedad relativa y temperaturas de 15 °C. En estas condiciones se midió el tiempo a la cosecha y el rendimiento de carpóforos, junto con algunas características de forma y tamaño de los cuerpos frutales.

#### **4.5. Análisis proximal y medición de la respiración del Gargal.**

Se evaluaron los contenidos de humedad, extracto etéreo, proteínas, azúcares reductoras, pH, sólidos solubles y cenizas de gargales colectados en la región de La Araucanía. Además, se midió la vida de poscosecha de los carpóforos a través de la respiración o generación de CO<sub>2</sub>. Esta última prueba fue comparada con otras dos especies relacionadas, como son el Digueñe y Shiitake. Los resultados se llevaron a fórmulas matemáticas que explican la tasa de respiración de acuerdo a diferentes temperaturas de almacenaje.

#### **4.6. Fabricación de llenadora de sustrato y adaptación de módulo.**

En el proyecto original estaban contempladas la fabricación de una unidad que facilitara el llenado y compactación homogénea de sustratos en bolsas, para la producción comercial de Gargal; aunque el equipo puede ser utilizado a la vez con otras especies similares. El equipo se logró a través del diseño, diagramación y construcción de un prototipo, el cual fue ajustado previo a la construcción final de la máquina.

En forma similar, se trabajó con la adaptación de un módulo de producción de zetas de Gargal, considerando los resultados previos de temperatura de crecimiento, humedad y luminosidad para lograr crecimiento vegetativo, inducción de primordios y crecimiento de carpóforos. Los estrechos márgenes de cada una de estas variables significó que los módulos deben tener un muy buen control para lograr producción, de lo contrario el micelio puede retrotraerse.

#### **4.7. Caracterización físico química del Gargal y producción de extractos.**

Las características físicas y químicas de los carpóforos de Gramal fueron la medición del color por Tablas de Munsell, pH del hongo y extractos que se colectaron posteriormente, comparación de sólidos solubles y totales en el hongo íntegro y en los extractos.

Se realizaron pruebas de distintos solventes para extraer metabolitos secundarios del Gargal, luego los extractos fueron evaluados en sus capacidades antioxidantes, antibacteriales, antifúngicas y de herbicidas, mediante métodos estándares de pruebas biocidas. Los extractos antioxidantes se colectaron con agua, etanol y la ayuda de un equipo extractor y centrifugación, la eficiencia de extracción se midió a partir de la masa total y masa de solutos en los extractos.

#### **4.8. Capacidad antioxidante.**

Se utilizaron hongos provenientes de las regiones de La Araucanía y de Los Lagos, las que fueron trituradas y sometidas a distintos regimenes térmicos, luego homogenizadas con etanol y agua, sonificadas y centrifugadas, para luego evaluar capacidad antioxidante utilizando ABTS y DPPH, poder reductor, actividad secuestrante y compuestos antioxidantes de los extractos.

## 5. RESULTADOS DEL PROYECTO

### 5.1. Activación de cepas de Gargal de la colección.

Los dos aislamientos que se encontraban en la colección de INIA fueron descongelados y cultivados en medios de agar malta, produciendo colonias que fueron repicadas y almacenadas nuevamente en nitrógeno líquido. Se pudo comprobar la viabilidad de estas cepas, las que se juntaron con los nuevos aislamientos colectados durante el proyecto, y que forman parte de la planilla de caracterización de cepas.

### 5.2. Colecta de Gargal.

La colecta de Gargal se describe en el Cuadro 1, donde se señalan el origen geográfico de las cepas y algunas características físicas del huésped del cual fueron colectados los Gargales. En general los aislamientos provinieron de tres especies de árboles: Coihue, Roble y Tineo o Palo Santo, los que se desarrollaban en alturas variables con respecto al nivel del mar (55 a 587 m s.n.m). Los árboles productores de Gargal se presentaban muertos o parte de sus ramas principales tenían tal condición, confirmando la característica de hongo saprófito al crecer sobre ese tipo de tejido (ver Anexo A).

La primera temporada de colecta fue la mas provechosa, ya que se lograron la mayor cantidad de aislamientos y con cultivos exitosos, mientras que la segunda temporada permitió muy pocos aislamientos, por menor producción en forma natural ya que las condiciones climáticas del año se caracterizaron por fuertes lluvias y temporales que inundaron gran parte de la zona centro sur, no permitieron una colecta mayor como la realizada el año anterior. En todo caso, se puede señalar que la presencia de Gargal disminuye en forma notoria hacia la región del Bio Bio, comparado con la región de Los Lagos, debido a la progresiva disminución del bosque nativo, sustrato natural de la especie de hongo bajo estudio. En la medida que se siga explotando el bosque nativo y siga siendo reemplazado por plantaciones de pino y eucaliptos, la especie *Grifola gargal* tenderá a extinguirse. Este proyecto no prospectó mas al sur de la Isla de Chiloé, por lo que es factible que se puedan encontrar nuevos y mejores cepas de la especie en la zona mas austral.

En el Cuadro 2 se indican las observaciones que se hicieron al carpóforo al momento de la colecta, tales como tamaño, color, olor y número de carpóforos por árbol. Posteriormente en laboratorio, se observó el color de la esporada, forma y tamaño de basidios y esporas. Una de las características que mas resalta de los Gargales colectados es su notorio aroma a almendras, lo cual es único entre las especies de *Grifola*, permitiendo una clara diferenciación con otras especies que se cultivan en el mundo.

Cuadro 1. Características del huésped y ubicación de los aislamientos de Gargal colectados.

N° laboratorio	Fecha de colecta	Localidad	Sector	Coordenadas Geográficas (UTM)		Altura (m)	Huésped (especie)	T° sustrato (°C)
Qu-G1	11-05-2005	Chiloe X Región	Linao	621586	5343202	199	<i>Nothofagus nitida</i>	15
Qu-G2	11-05-2005	Chiloe X Región	Linao	621584	5343223	200	<i>Nothofagus nitida</i>	13
Qu-G3	11-05-2005	Chiloe X Región	Linao	621584	5343223	206	<i>Nothofagus nitida</i>	12
Qu-G4	11-05-2005	Chiloe X Región	Linao	619661	5341633	206	<i>Nothofagus nitida</i>	13
Qu-G5	11-05-2005	Chiloe X Región	Linao	-	-	-	<i>Nothofagus nitida</i>	-
Qu-G6	12-05-2005	Osorno X Región	S.Juan de la Costa	-	-	289	<i>Nothofagus nitida</i>	13
Qu-G7	12-05-2005	Osorno X Región	Feria Rahue	-	-	-	<i>Nothofagus nitida</i>	-
Qu-G8	13-05-2005	Los Lagos X Región	Pellinada	707279	5573189	168	<i>Nothofagus obliqua</i>	13
Qu-G9	20-05-2005	Osorno X Región	S.Juan de la Costa	-	-	346	<i>Nothofagus nitida</i>	12
Qu-G10	31-05-2005	Villarrica IX Región	Casahue	615835	5516968	243	<i>Nothofagus obliqua</i>	12
Qu-G11	31-05-2005	Villarrica IX Región	Huiscapi	-	-	216	<i>Nothofagus obliqua</i>	12
Qu-G12	01-06-2006	Osorno X Región	Feria Rahue	-	-	-	<i>Nothofagus nitida</i>	-
Qu-G13	01-05-2006	Osorno X Región	Feria Rahue	-	-	-	<i>Nothofagus nitida</i>	-
Qu-G14	01-05-2006	Los Lagos X Región	La Quinta	707026	559739	283	<i>Nothofagus obliqua</i>	13
Qu-G15	02-06-2006	Osorno X Región	S.Juan de la Costa	634485	5515800	68	<i>Nothofagus obliqua</i>	11
Qu-G16	02-06-2005	Osorno X Región	S.Juan de la Costa	634562	5515785	55	<i>Nothofagus obliqua</i>	12
Qu-G17	15-06-2005	Temuco IX Región	Alto Yupehue	634569	551578	542	<i>Weinmannia trichosperma</i>	11
Qu-G18	15-06-2005	Temuco IX Región	Alto Yupehue	638214	573756	562	<i>Weinmannia trichosperma</i>	11
Qu-G19	15-05-2006	Temuco IX Región	Alto Yupehue	638029	5737179	569	<i>Weinmannia trichosperma</i>	11
Qu-G20	15-06-2005	Temuco IX Región	Alto Yupehue	638052	5737164	587	<i>Weinmannia trichosperma</i>	10
Qu-G21	15-06-2005	Temuco IX Región	Alto Yupehue	638010	5737270	587	<i>Weinmannia trichosperma</i>	10
Qu-G22	15-06-2005	Temuco IX Región	Alto Yupehue	607912	5737470	545	<i>Weinmannia trichosperma</i>	10
Qu-G23	15-06-2005	Temuco IX Región	Alto Yupehue	607930	573782	536	<i>Weinmannia trichosperma</i>	11
Qu-G24	19-05-2006	Chillán (VIII)	Nahueltoro	258687	955579	335	<i>Nothofagus oblicua</i>	12
Qu-G25	24-05-2006	Temuco (IX)	Feria Temuco	-	-	-	<i>Nothofagus oblicua</i>	-
Qu-G26	14-06-2006	Villarrica (VIII)	Los Helechos	763102	5343223	116	<i>Nothofagus oblicua</i>	9
Qu-G27	23-06-2006	Chillán (VIII)	El Carmen	2503719	12138416	688	<i>Nothofagus oblicua</i>	13
Qu-G28	05-07-2006	Chillán (VIII)	Quillón, Cayumanqui	3656546	07203261	2494	<i>Nothofagus oblicua</i>	-

Cuadro 2. Características del carpóforo de los aislamientos de Gargal colectados.

N° laboratorio	Tamaño carpóforo (cm)	Olor	Color	Esporada (color)	Basidio (n=10)	Espora (n=25)	N° carpóforos por árbol	Observaciones
Qu-G1	18	Almendrado suave	Blanco crema	Blanco	26 * 7,5 $\mu$	7,2 * 5,5 $\mu$	7	Arbol en pie parcialmente muerto
Qu-G2	12	Almendrado suave	Amarillo crema	Blanco	26 * 7,5 $\mu$	7,2 * 5,5 $\mu$	1	Arbol en pie parcialmente muerto
Qu-G3	22	Almendrado suave	Blanco crema	Blanco	26 * 7,5 $\mu$	7,2 * 5,5 $\mu$	17	Arbol en pie parcialmente muerto
Qu-G4	12	Almendrado suave	Blanco crema	Blanco	26 * 7,5 $\mu$	7,2 * 5,5 $\mu$	1	Arbol en pie parcialmente muerto
Qu-G5	25	Almendrado intenso	Café pálido	Blanco crema	28 * 7,5 $\mu$	7,5 * 5,5 $\mu$	1	Arbol en pie parcialmente muerto
Qu-G6	33	Almendrado intenso	Blanco	Blanco	28 * 7,5 $\mu$	7,5 * 5,5 $\mu$	1	Comprado en feria local
Qu-G7	23	Almendrado intenso	Blanco	Blanco	28 * 7,5 $\mu$	7,5 * 5,5 $\mu$	1	Comprado en feria local
Qu-G8	12	Almendrado suave	Amarillo crema	No observada	-	-	1	Poliporo muy maduro
Qu-G9	5	Almendrado intenso	Blanco	No observada	-	-	1	Comprado en feria local
Qu-G10	18	Almendrado suave	Blanco crema	Blanco	26 * 7,5 $\mu$	7,2 * 5,5 $\mu$	2	Arbol caído
Qu-G11	primordio	Almendrado suave	Blanco crema	No observada	-	-	1	Comprado en feria local
Qu-G12	15	Almendrado suave	Blanco crema	Blanco	26 * 7,5 $\mu$	7,2 * 5,5 $\mu$	1	Comprado en feria local
Qu-G13	23	Almendrado intenso	Blanco crema	Blanco	26 * 7,5 $\mu$	7,2 * 5,5 $\mu$	1	Comprado en feria local
Qu-G14	18	Almendrado intenso	Blanco	Blanco	27 * 7,5 $\mu$	7,2 * 5,5 $\mu$	1	Arbol caído
Qu-G15	3	Almendrado suave	Blanco	No observada	-	-	1	Arbol en pie parcialmente muerto
Qu-G16	8	Almendrado suave	Blanco	Blanco	26 * 7,2 $\mu$	7,2 * 5,5 $\mu$	1	Arbol en pie parcialmente muerto
Qu-G17	23	Almendrado intenso	Amarillo crema	Blanco crema	28 * 7,5 $\mu$	7,5 * 5,5 $\mu$	1	Arbol muerto en pie
Qu-G18	35	Almendrado suave	Blanco	Blanco	28 * 7,5 $\mu$	7,2 * 5,5 $\mu$	1	Arbol muerto en pie Arbol caído, poliporo en mal estado
Qu-G19	38	Almendrado suave	Blanco	Blanco crema	-	-	1	
Qu-G20	18	Almendrado intenso	Amarillo crema	Blanco crema	28 * 7,5 $\mu$	7,5 * 5,5 $\mu$	1	Arbol en pie parcialmente muerto
Qu-G21	12	Almendrado suave	Blanco	Blanco	26 * 7,5 $\mu$	7,2 * 5,5 $\mu$	3	Arbol muerto en pie
Qu-G22	18	Almendrado suave	Blanco crema	Blanco	26 * 7,5 $\mu$	7,2 * 5,5 $\mu$	2	Arbol muerto en pie
Qu-G23	23	Almendrado intenso	Amarillo crema	Blanco crema	28 * 7,5 $\mu$	7,5 * 5,5 $\mu$	1	Arbol en pie parcialmente muerto

### 5.3. Cultivo e identificación de cepas de Gargal.

Todos los ejemplares colectados correspondieron al género *Grifola*, el cual se caracteriza por formar carpóforos fibrosos, compuestos de numerosos pileos sobrepuestos y traslapados de 2 a 10 cm de diámetro, y que nacen repetidamente desde un estipe central. Los pileos fueron carnosos, planos, con forma de abanico, bordes lisos u ondulados, de coloraciones blancas, crema, ligeramente amarillentas a café pálido a medida que envejecían. La superficie de los pileos fue lisa, seca cuando están nuevos, a húmedas a medida que envejecen, por el haz presentan numerosos poros denticulados decurrentes, de color blanco y de 1 a 3 mm de largo. El estipe fue compacto, relativamente pequeño, liso, fibroso, firme, de coloraciones blancas a amarillo crema y descentrado con respecto a los pileos, ubicados bajo la corteza y firmemente unido a los troncos de los árboles que los producían.

Las huellas de esporas siempre fueron de color blanca, escasas a ausentes en los ejemplares mas viejos. Los basidios fueron lisos, claviformes, tetraesporados, sin cistidios, de tamaños de 26-28 x 7,2-7,5  $\mu\text{m}$ . Las esporas fueron hialinas, lisas, de forma subglobosa y de tamaños de 7,2-7,5 x 5,5  $\mu\text{m}$ .

### 5.4. Conservación y criopreservación de cepas.

En esta etapa se ingresaron 14 cultivos a la colección de cepas de hongos de INIA Quilampu, producto del siguiente resultado de la colecta:

- ✓ 14 cultivos puros
- ✓ 18 cultivos contaminados con bacterias, levaduras u otros hongos filamentosos que no permitieron su purificación.
- ✓ 3 cepas que no se lograron cultivar desde el comienzo.

Las características físicas de las 14 cepas puras se presentan en el Anexo A, incluida su fotografía al momento de su colecta de campo. Respecto de las cepas que no permitieron ser cultivadas, la principal causa fueron los problemas de contaminación y en particular el abundante desarrollo de bacterias originadas de los carpóforos colectados en el campo. A pesar que se trató de eliminar las bacterias de los cultivos, al igual como se realiza con los hongos fitopatógeos, a través de cultivos en agar con antibióticos o siembras de colonias sumergidas en agar, en el caso del Gargal no fue posible eliminar estos procariontes. Estas bacterias que crecen asociadas a otros organismos mediante algún tipo de simbiosis se les denominan fastidiosas, pudiendo utilizar el micelio como sustrato de protección y crecer junto con éste, posiblemente el micelio del hongo le ayuda a detoxificar el antibiótico u otra relación de dependencia que no permite separarlos. Posiblemente sea esta razón por la cual resulta difícil obtener cultivos puros de esta especie, salvo con el método de cultivo *in situ*.

Respecto a los resultados de la criopreservación, se logró un 100% de recuperación de los aislamientos, luego del descongelamiento de uno de los tubos criopreservado por aislamiento, manteniéndose los otros nueve tubos en el nitrógeno líquido. El obtener 100% de prendimiento de los tubos descongelados, no significa que no exista mortalidad de parte de la colonia sembrada, debido a que se trabaja con micelios que

se componen de una gran cantidad de hifas, parte de las cuales mueren por el proceso de enfriamiento y descongelamiento, pero las que sobreviven son suficientes para iniciar una nueva colonia.

Al existir una colección de Gargal criopreservada, se garantiza que permanecerán en el tiempo las cualidades intrínsecas del aislamiento, y no sufrirán modificaciones o adaptaciones genéticas a través de los sucesivos cultivos en medios artificiales, como ocurre con el sistema de conservación en tubo o placa Petri con medios de cultivo.

### 5.5. Efecto de la temperatura en el crecimiento de cepas.

Se produjeron grandes diferencias de crecimiento entre las cepas de Gargal, tanto para una misma temperatura, como para la misma cepa a distintas temperaturas (Foto 8). Registrándose rangos de crecimiento entre tratamientos que duplicaban el tiempo necesario para cubrir una placa.

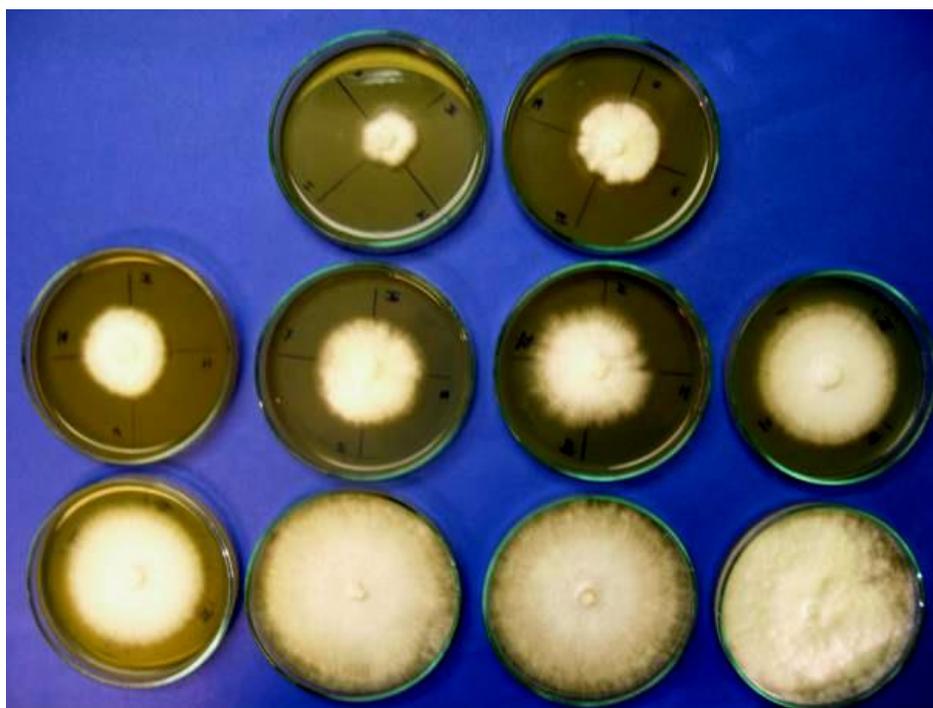


Foto 8. Ejemplo de crecimiento de colonias de 10 cepas nativas de Gargal incubadas a 20 °C y evaluadas a los 35 días de incubación. El orden de las cepas desde arriba hacia abajo y de la izquierda a la derecha es el siguiente: Qu-G3, Qu-G10, Qu-G5, Qu-G6, Qu-G16, Qu-G2, Qu-G4, Qu-G9, Qu-G13 y Qu-G1.

Originalmente se estimaba que el crecimiento del Gargal sería similar al de la mayoría de los hongos, el cual se sitúa alrededor de los 24 °C, sin embargo, las pruebas de crecimiento en placas Petri con medios de cultivo, indicaron que este rango fue relativamente estrecho y se situó alrededor de los 20 °C, donde se observan las mayores tasas de crecimiento. Temperaturas mayores o menores a los 20 °C afectan el crecimiento de todas las cepas de Gargal, en particular si estas se sitúan en los 24

°C, donde se observan crecimientos muy lentos e incluso negativos en ciertos periodos de tiempo.

A temperaturas de 16 °C de incubación, la cepa que presentó mayor tasa de crecimiento fue la Qu-G13, con 1,06 mm/día de crecimiento radial de la colonia (Figura 2). El resto de las cepas creció en menor medida que G13, indicando que ésta es una buena cepa para crecimiento a bajas temperaturas. A la misma temperatura el menor crecimiento se logró con la cepa Qu-G2 con un desarrollo radial de 0,44 mm/día (Cuadro 3).

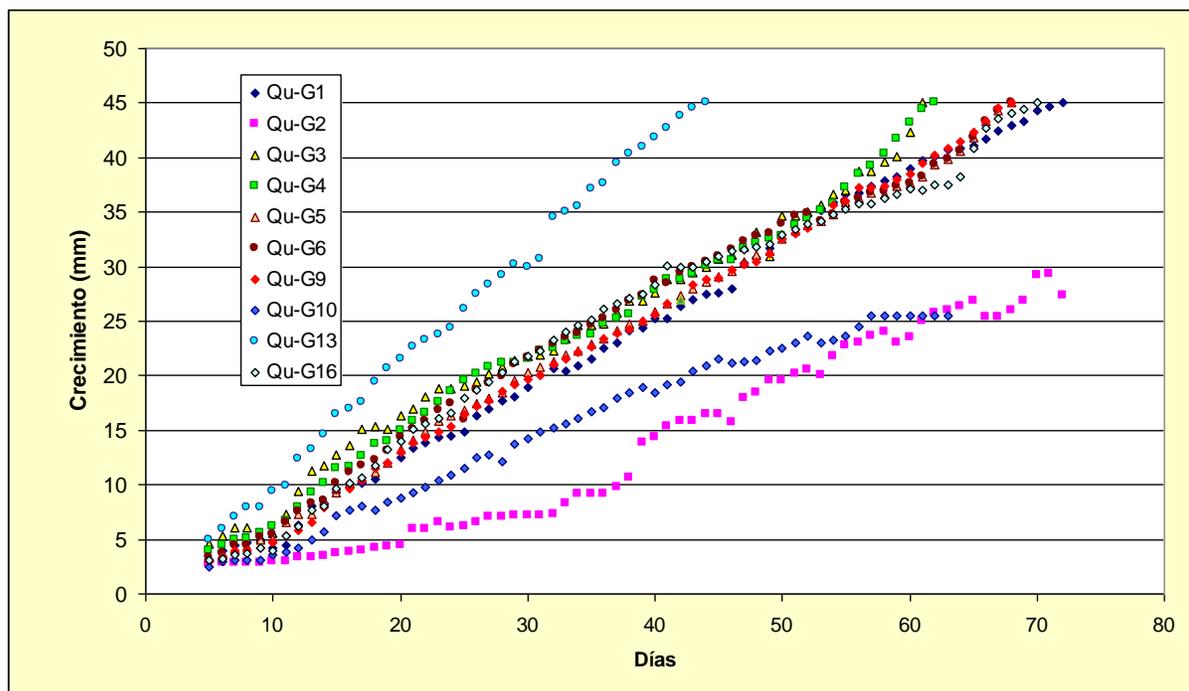


Figura 2. Curvas de crecimiento a través del tiempo para distintas cepas nativas de *Grifola gargaal* cultivadas en placas Petri con medio Agar Papa Levadura e incubadas a 16 °C.

A temperaturas de 20°C el mayor crecimiento de la colonia se produjo con la cepa Qu-G6, con tasas de 1,17 mm/día; la cual fue la mayor tasa que se logró en todas las evaluaciones de temperatura (Figura 3). Mientras que el menor crecimiento fue con la cepa Qu-G3 a tasas de 0,72 mm/día (Cuadro 3).

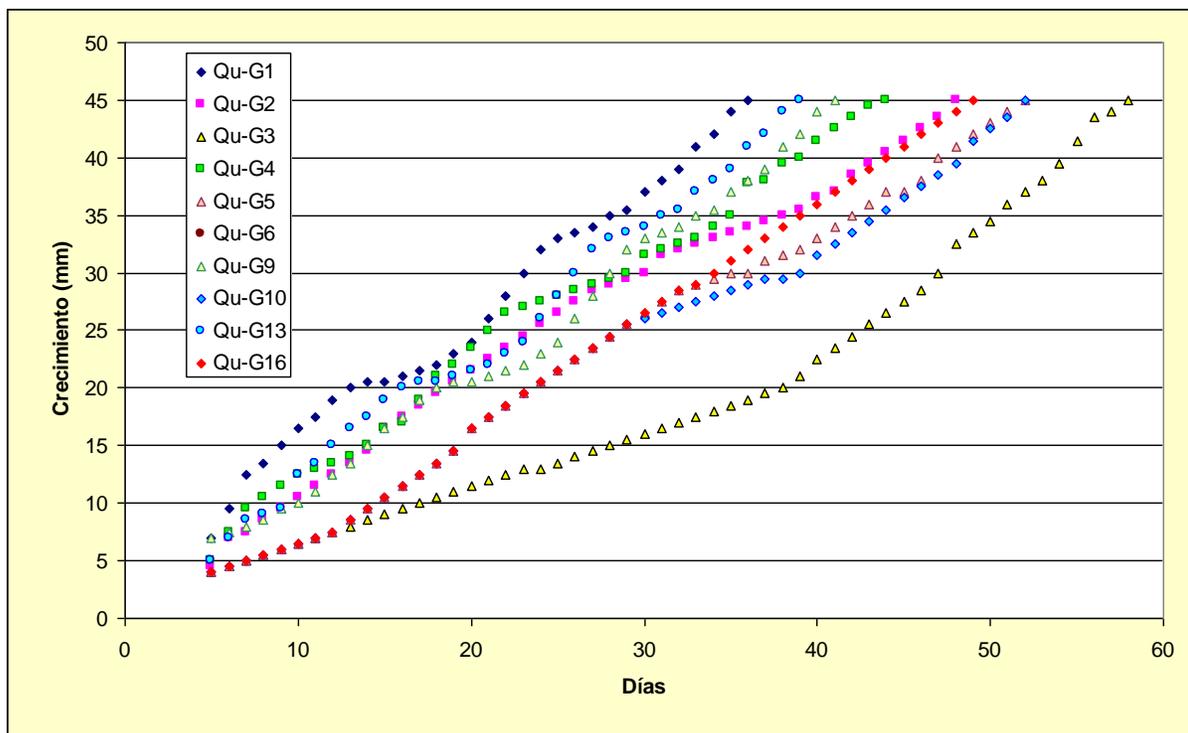


Figura 3. Curvas de crecimiento a través del tiempo para distintas cepas nativas de *Grifola gargal* cultivadas en placas Petri con medio Agar Papa Levadura e incubadas a 20 °C.

Por último, a temperaturas de 24 °C se produjeron tasas de crecimiento menores que a las otras dos temperaturas, indicando que el Gargal no es un organismo mesófilo o poiquilotermo, los cuales se desarrollan mejor a 24-25 °C. A estas temperaturas las cepas presentaron lento crecimiento, la que mayor tasa logró fue la cepa Qu-G13, con 0,41 mm/día de crecimiento de colonia (Figura 4). En general las cepas fluctuaron entre los 0,08 y 0,28 mm/día (Cuadro 3).

Es importante destacar que a 24 °C llegó un momento en que se produjeron crecimientos negativos, lo cual se podría explicar por que el micelio se retrotrae a temperaturas mayores a su óptimo, debido a posible acumulación de toxinas o daño en el ápice de las hifas, las que deben ser reconstituidas antes de iniciar un nuevo crecimiento. Este resultado tendrá importantes repercusiones en el desarrollo del cultivo, como se verá mas adelante, ya que el daño por temperatura significa que el gasto de energía en volver a recuperar el crecimiento perdido influye en la colonización y rendimiento biológico.

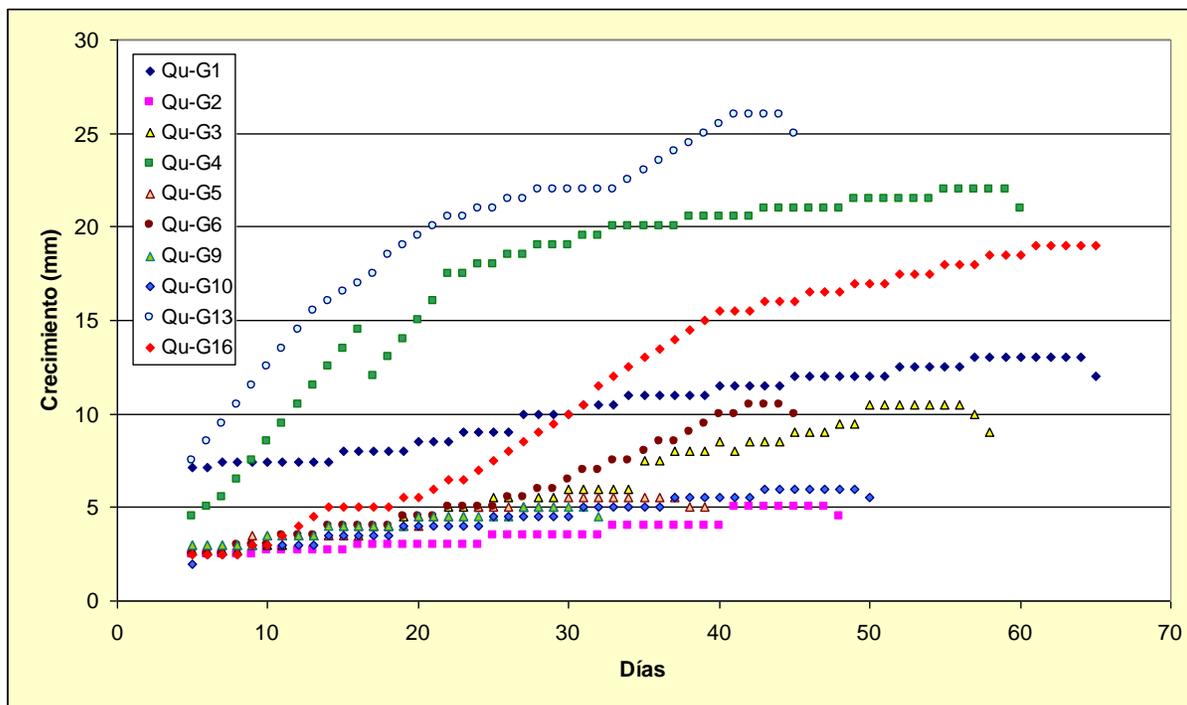


Figura 4. Curvas de crecimiento a través del tiempo para distintas cepas nativas de *Grifola gargal* cultivadas en placas Petri con medio Agar Papa Levadura e incubadas a 24 °C.

A pesar que el óptimo de crecimiento está en alrededor de los 20 °C, las tasas de crecimiento fueron relativamente bajas, hay que recordar que en todas las evaluaciones el máximo fue de solo 1,17 mm/día, para la cepa Qu-G6 a 20 °C. Las otras cepas que alcanzaron mayores crecimientos fueron Qu-G1, Qu-G13 y Qu-G4, con 1,12; 1,11 y 0,98 mm/día respectivamente (Cuadro 3). Estas tasas de crecimiento distan mucho de lo que se observa en otros hongos saprófitos o parásitos de plantas, las que se sitúan en 10 veces lo observado con el Gargal.

Finalmente, las incubaciones de 12 °C no han permitido un desarrollo de las colonias para las 10 cepas evaluadas de Gargal, indicando que a pesar que las bajas temperaturas no matan al hongo si restringen notablemente su crecimiento vegetativo.

Cuadro 3. Tasas de crecimiento (mm/día) y coeficientes de correlación ( $R^2$ ) de distintas cepas de Gargal incubadas a tres temperaturas.

Cepas	16 °C		20 °C		24 °C	
	mm/día	$R^2$	mm/día	$R^2$	mm/día	$R^2$
Qu-G1	0,65	0,99	1,12	0,98	0,11	0,95
Qu-G2	0,44	0,96	0,87	0,98	0,06	0,91
Qu-G3	0,64	0,98	0,72	0,94	0,16	0,96
Qu-G4	0,67	0,99	0,98	0,99	0,28	0,80
Qu-G5	0,65	0,99	0,89	0,99	0,08	0,90
Qu-G6	0,64	0,98	1,17	0,99	0,21	0,95
Qu-G9	0,67	0,99	1,06	0,99	0,08	0,91
Qu-G10	0,44	0,98	0,86	0,99	0,08	0,96
Qu-G13	1,11	0,99	1,06	0,99	0,41	0,91
Qu-G16	0,63	0,90	0,97	0,99	0,32	0,96

Desde el punto de vista fisiológico, las hifas de los hongos crecen a expensas de la fusión de vesículas que contienen las moléculas que forman la pared celular y que son producidas por el retículo endoplasmático y aparato de Golgi. Ambos órganos son dependientes del aporte de energía que recibe la célula y de los procesos fisiológicos que desarrollan de acuerdo a las reservas que dispongan. Aparentemente las hifas de Gargal, ante excesos de temperatura o condiciones adversas de crecimiento, detienen la producción de vesículas e incluso podrían estar utilizando parte de la pared celular de las hifas como fuente de energía, lo cual podría explicar por qué el micelio se retrotrae en lugar de mantenerse en el desarrollo alcanzado.

### 5.6 Adaptabilidad de las cepas a distintos sustratos.

Las mezclas de aserrín y chips de las distintas especies de madera mostraron diferencias de crecimiento vegetativo en forma visual y medible (Foto 9).



Foto 9. Vista general de bolsas y frascos de cultivo de Gargal en distintos sustratos.

Los distintos aserrines de maderas indujeron velocidades de crecimiento vegetativo diferentes para las cepas de Gargal evaluadas. Para el caso del aserrín de Coihue, las respuestas del crecimiento fueron todas lineales (Figura 5), con tasas de crecimiento que variaron entre 0,16 y 0,20 cm/día (Cuadro 4). En el caso del Eucalipto, las respuestas del crecimiento tuvieron una relación matemática (Figura 6), pero con tasas de crecimiento mayores al del Coihue, éstas se produjeron dentro del rango de 0,50 y 0,60 cm/día (Cuadro 5), equivalente a tres veces el crecimiento observado con la primera especie.

Con respecto a los aserrines de Raulí y Roble, se mantuvieron los crecimientos lineales (Figuras 7 y 8), con tasas de crecimientos similares entre ellos e intermedios entre el Coihue y el Eucalipto. Las tasas promedio fluctuaron entre 0,35 y 0,52 cm/día para ambos aserrines (Cuadros 6 y 7).

La respuesta lineal observada en todas las cepas y sustratos es una indicación que los hongos obtienen su fuente de alimentación en forma proporcional a su crecimiento. Debido a la forma de medir este crecimiento, puede que el sustrato esté lejos de agotarse incluso cuando el micelio alcanza el fondo del frasco, de lo contrario se habría observado una disminución del crecimiento diario a medida que se acerca al final del frasco. Las diferencias en crecimiento, por otro lado, estarían explicadas por la facilidad con la cual el micelio logra absorber los nutrientes que soportan su crecimiento vegetativo. Las moléculas más pequeñas, como azúcares simples y aminoácidos, pueden ser absorbidas directamente, pero aquellas más complejas, como proteínas, celulosa y almidón, deben ser hidrolizadas previamente mediante la acción de enzimas que secreta el micelio.

La facilidad con la cual los sustratos más complejos son hidrolizados y absorbidos por las hifas del hongo, serían la causa por la cual algunas cepas pueden crecer más rápido que otras. En el caso del Coihue, aparentemente estos nutrientes se encuentran de manera más compleja que otras especies, por lo cual el Gargal demora más tiempo en crecer. Es interesante indicar que el Eucalipto permite una tasa de crecimiento mayor, lo que podría indicar una buena alternativa de sustrato, sin embargo y como se vera mas adelante, el crecimiento reproductivo es muy lento y en algunas cepas nunca se produjo (ver punto 5.7).

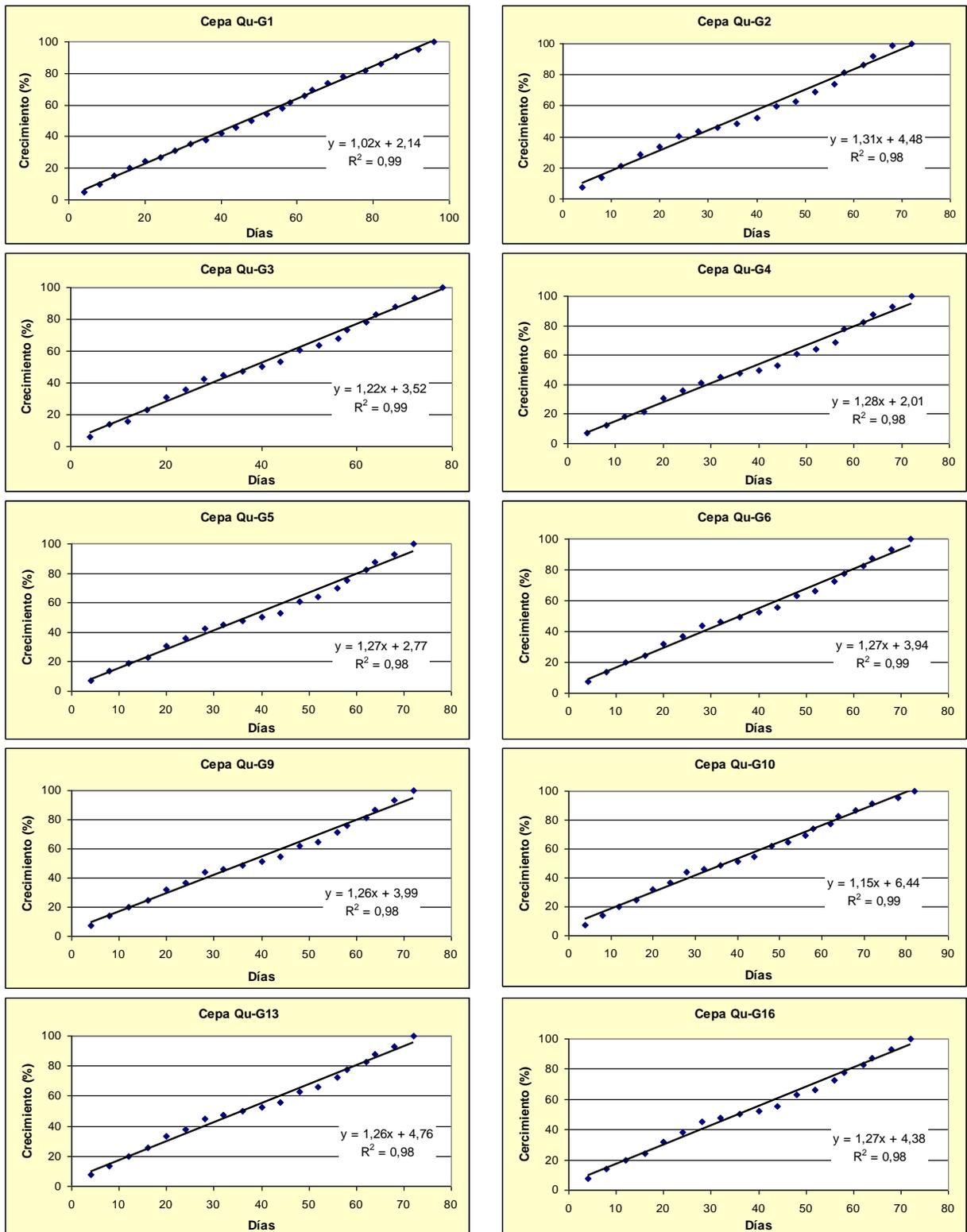


Figura 5. Crecimiento vegetativo de cepas de Gargal en sustrato de aserrín de Coihue.

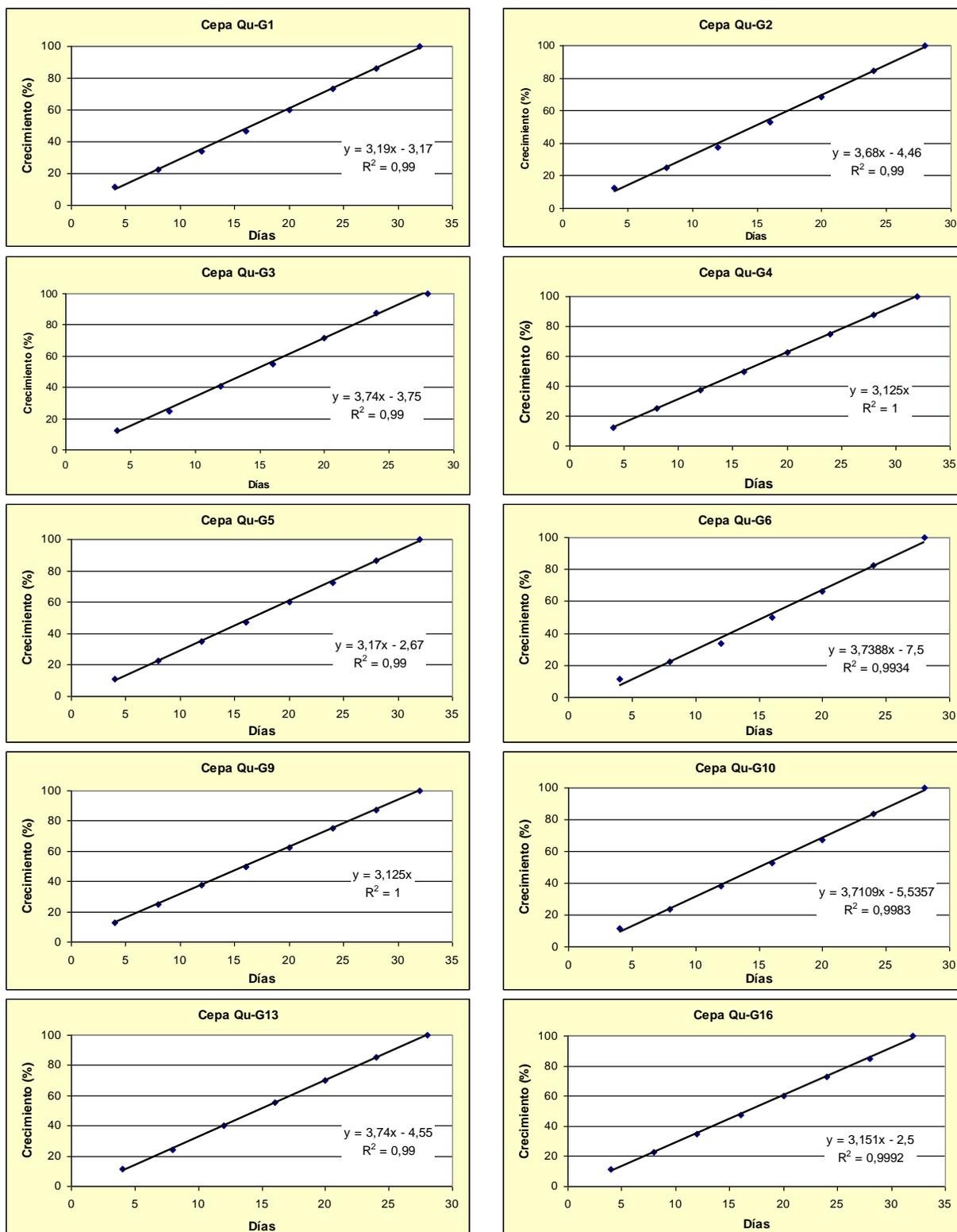


Figura 6. Crecimiento vegetativo de cepas de Gargal en sustrato de aserrín de Eucalipto.

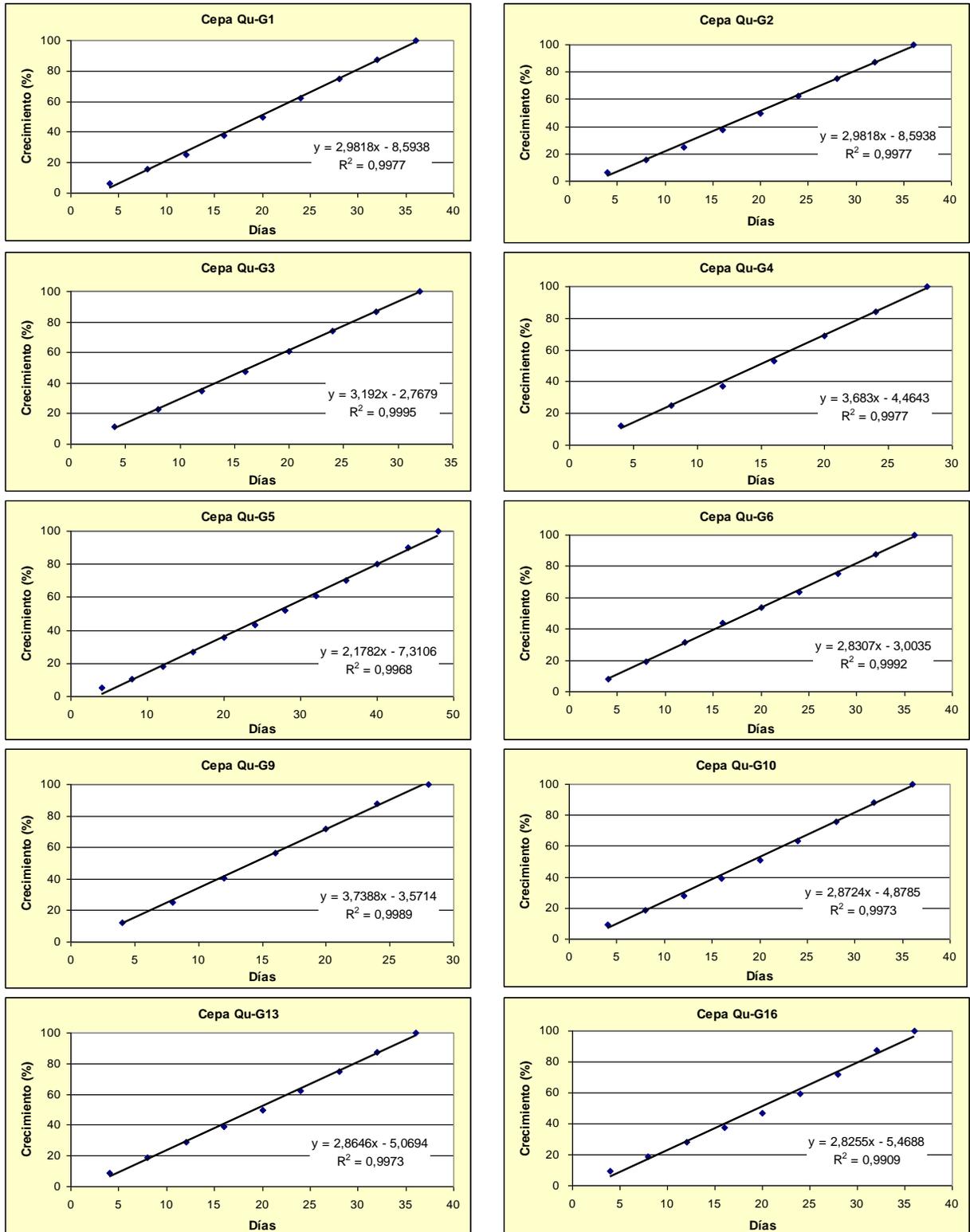


Figura 7. Crecimiento vegetativo de cepas de Gargal en sustrato de aserrín de Raulí.

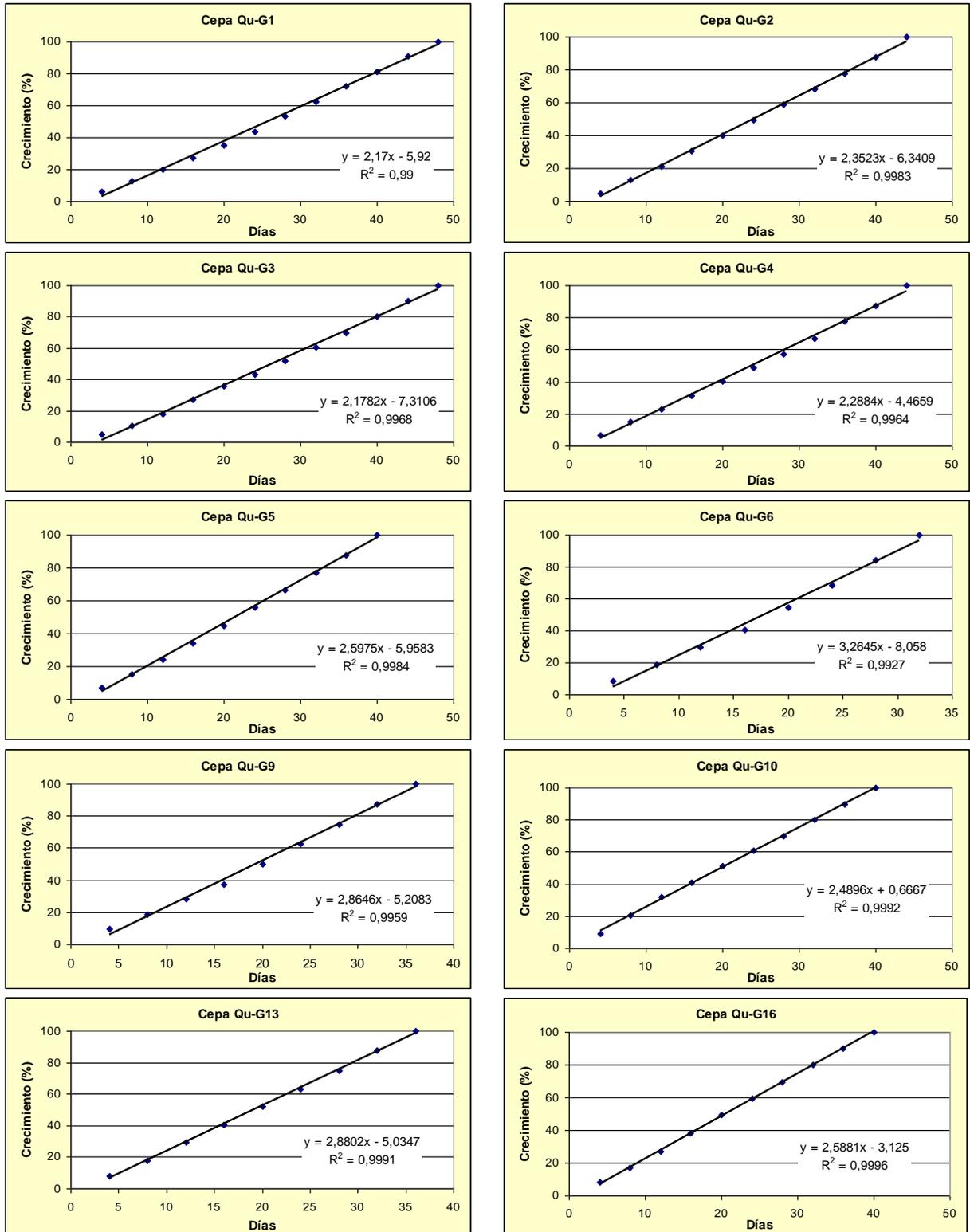


Figura 8. Crecimiento vegetativo de cepas de Gargal en sustrato de aserrín de Roble.

Cuadro 4. Tasas de crecimiento porcentual y diario, y coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de distintas cepas de Gargal incubadas en aserrín de Coihue.

Cepa	Tasa de crecimiento		$R^2$
	(%)	cm/día	
Qu-G1	1,02	0,16	0,99
Qu-G2	1,31	0,21	0,98
Qu-G3	1,22	0,19	0,99
Qu-G4	1,28	0,21	0,98
Qu-G5	1,27	0,20	0,98
Qu-G6	1,27	0,20	0,99
Qu-G9	1,26	0,20	0,98
Qu-G10	1,15	0,18	0,99
Qu-G13	1,26	0,20	0,98
Qu-G16	1,27	0,20	0,98

Cuadro 5. Tasas de crecimiento porcentual y diario, y coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de distintas cepas de Gargal incubadas en aserrín de Eucaliptos.

Cepa	Tasa de crecimiento		$R^2$
	(%)	cm/día	
Qu-G1	3,19	0,51	0,99
Qu-G2	3,68	0,59	0,99
Qu-G3	3,74	0,60	0,99
Qu-G4	3,13	0,50	1,00
Qu-G5	3,17	0,51	0,99
Qu-G6	3,74	0,60	0,99
Qu-G9	3,13	0,50	1,00
Qu-G10	3,71	0,59	0,99
Qu-G13	3,74	0,60	0,99
Qu-G16	3,15	0,50	0,99

Cuadro 6. Tasas de crecimiento porcentual y diario, y coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de distintas cepas de Gargal incubadas en aserrín de Raulí.

Cepa	Tasa de crecimiento		$R^2$
	(%)	cm/día	
Qu-G1	2,98	0,48	0,99
Qu-G2	2,98	0,48	0,99
Qu-G3	3,19	0,51	0,99
Qu-G4	3,68	0,59	0,99
Qu-G5	2,18	0,35	0,99
Qu-G6	2,83	0,45	0,99
Qu-G9	3,74	0,60	0,99
Qu-G10	2,87	0,46	0,99
Qu-G13	2,86	0,46	0,99
Qu-G16	2,83	0,45	0,99

Cuadro 7. Tasas de crecimiento porcentual y diario, y coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de distintas cepas de Gargal incubadas en aserrín de Roble.

Cepa	Tasa de crecimiento		$R^2$
	(%)	cm/día	
Qu-G1	2,17	0,35	0,99
Qu-G2	2,35	0,38	0,99
Qu-G3	2,18	0,35	0,99
Qu-G4	2,29	0,37	0,99
Qu-G5	2,60	0,42	0,99
Qu-G6	3,26	0,52	0,99
Qu-G9	2,87	0,46	0,99
Qu-G10	2,49	0,40	0,99
Qu-G13	2,88	0,46	0,99
Qu-G16	2,59	0,41	0,99

Debido a las diferentes tasas de crecimiento de las distintas cepas, los frascos de cultivos fueron completamente colonizados en distintos tiempos, lo cual es un indicador importante para conocer cuales cepas son más rápidas en su colonización y, en consecuencia, los tiempos de incubación que podría esperarse en un eventual cultivo artificial de Gargal. En promedio, el aserrín de Eucalipto produjo los crecimientos más rápidos, cubriendo en 31,2 días los frascos de cultivo, mientras que el más lento correspondió al aserrín de Coihue, con tiempos promedios de 77,6 días. Esta diferencia significa prácticamente duplicar los tiempos de incubación del Gargal, en caso que se pueda optar entre ambas especies como sustratos (Cuadro 8).

Cuadro 8. Tiempo (días) de distintas cepas de *Grifota gargal* para alcanzar máximo crecimiento en distintos aserrines de cultivo.

Cepa	Sustratos			
	Coihue	Eucalipto	Raulí	Roble
Qu-G1	97 a*	32 ab	37 b	48 a
Qu-G2	73 d	28 c	36 b	44 bc
Qu-G3	78 c	28 c	33 c	48 a
Qu-G4	75 cd	35 ab	29 d	46 ab
Qu-G5	73 d	34 ab	48 a	40 c
Qu-G6	75 cd	31 bc	37 b	32 e
Qu-G9	75 cd	35 a	28 d	36 d
Qu-G10	84 b	29 bc	37 b	40 c
Qu-G13	72 d	28 c	36 b	36 d
Qu-G16	74 cd	32 ab	36 b	41 c
<b>Promedio</b>	<b>77,6</b>	<b>31,2</b>	<b>35,7</b>	<b>41,1</b>

\* Valores seguidos con distintas letras dentro de las columnas, indican diferencias estadísticas de acuerdo a la prueba protegida de Fisher ( $P < 0,05$ ).

Los aserrines de Raulí y Roble mantuvieron comportamientos intermedios, con tiempos promedios de colonización de 35,7 y 41,1 días respectivamente (Cuadro 8). Algunas cepas que tuvieron un comportamiento más acelerado de crecimiento fueron las Qu-G2 y Qu-G13, las cuales fueron diferentes ( $P < 0,001$ ) a las otras cepas en evaluación, cuando se hicieron crecer en aserrines de Coihue, Eucalipto y Raulí (Cuadro 8). Para el sustrato de Roble, la cepa que tubo el menor tiempo de crecimiento fue la Qu-G6, con 32 días para completar su crecimiento en los frascos de cultivo, tiempo diferente ( $P < 0,001$ ) a todas las otras cepas (Cuadro 8). Los análisis estadísticos de las comparaciones entre las distintas cepas para cada sustrato se incluyen en el Anexo B.

### 5.7. Producción de carpóforos experimentales.

Esta etapa tuvo como gran dificultad el lento crecimiento de la fase reproductiva, siendo afectada por cualquier cambio de temperatura y humedad dentro de las salas de inducción y producción, esto se debe en parte a las bajas y estrecho rango de temperaturas y humedad que necesita el hongo para emitir sus cuerpos frutales. El sustrato que demoró menos tiempo fue el Coihue, con 105 días desde el término de colonización vegetativa hasta fructificación, mientras que el mas lento fue el Eucalipto con 240 días (Cuadro 9).

Cuadro 9. Tiempo (días) desde término de crecimiento vegetativo hasta fructificación de *Grifola garga* en distintos aserrines como sustratos.

<b>Especie</b>	<b>Tiempo (días)</b>
Coihue	105
Raulí	120
Roble	120
Eucalipto	240

La colonización de los sustratos fue siempre lenta y muy dependiente de la aireación, para cualquiera de las cuatro especies evaluadas, esto significó que se observara una buena colonización en la superficie, cercano a la abertura superior por donde ingresa aire, pero el crecimiento micelial se detiene en profundidad o se hace muy lento, producto de una menor disponibilidad de aire. Esto puede significar que sea necesario un tipo de bolsa en la cual exista una mejor ventilación en profundidad.

El tiempo que transcurrió desde el inicio de la inducción hasta la formación de los esclerocios fue de aproximadamente tres meses. La formación de esclerocios es una característica morfológica que presentan algunos hongos previo a la producción de sus cuerpos frutales. El esclerocio corresponde a la agregación de micelio del hongo en forma más o menos compacta y que en este caso es visible, de coloración café oscura a negro, aspecto de mórula y que crece en la superficie de las bolsas colonizadas (Foto 10). Aparentemente, la formación de esta estructura es un paso previo para la emisión de los carpóforos, y el hongo los desarrolla para acumular los nutrientes necesarios para la formación del basidiocarpo, el cual es altamente demandante de nutrientes y energía. La emisión de esto primordios fue errática, ya

que no todas las bolsas de una misma cepa produjeron primordios, así como también hubieron cepas que nunca produjeron estas estructuras (Foto 11).



Foto 10. Desarrollo de primordios en la superficie de bolsas de cultivo.



Foto 11. Producción de esclerocios de Gargal, estado previo a la emisión de carpóforos.

Los primordios, luego de permanecer 5 días en las condiciones de la sala de fructificación, comenzaron a elongarse dando origen a los primeros carpóforos de Gargal obtenidos en condiciones artificiales (Foto 12). Esta producción fue errática, al igual que los primordios, la forma de los carpóforos fue distinta a lo que se observa en los crecimientos naturales, con estipes proporcionalmente predominantes, pileos aguzados, deformes y en general pequeños.



Foto 12. Desarrollo de carpóforos bajo condiciones artificiales de cultivo.

Los rendimientos biológicos fueron en general bajos, los máximos que se alcanzaron fue de alrededor de 10%, lo que se considera malo en consideración a otros hongos comestibles que superan el 100% del peso del sustrato. El mayor peso se logró con aserrín de Roble y la cepa N° 3, aunque estadísticamente ( $P \leq 0,05$ ) fue similar a otras seis cepas en estudio (Figura 9). Otro sustrato que produjo el 10% de rendimiento biológico fue el Coihue, pero con la cepa N° 6, resultando estadísticamente ( $P \leq 0,05$ ) similar con otras cuatro cepas, a diferencia del sustrato de Roble en este caso la cepa N° 3 logró solo un 4% de rendimiento (Figura 10).

En el caso del Raulí, el mayor rendimiento se logró con la cepa N° 4 con un 7,8%; resultando estadísticamente diferente ( $P \leq 0,05$ ) solo con las cepas 1 y 10 (Figura 11). Por último, el sustrato a base de Eucalipto solo presentó producción con tres cepas: 2, 4 y 16, y con rendimientos estadísticamente similares ( $P \leq 0,05$ ) en torno al 7% (Figura 12).

Los análisis estadísticos de los cuatro sustratos se pueden ver en el Anexo C.

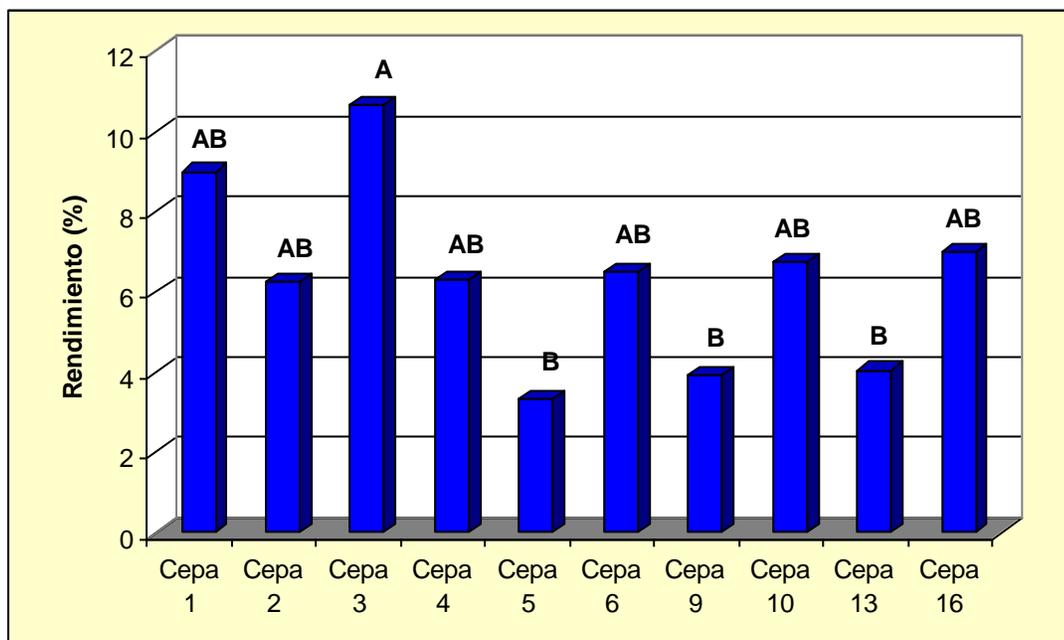


Figura 9. Rendimiento biológico (%) de carpóforos de Gargal desarrollados en sustrato de Roble.

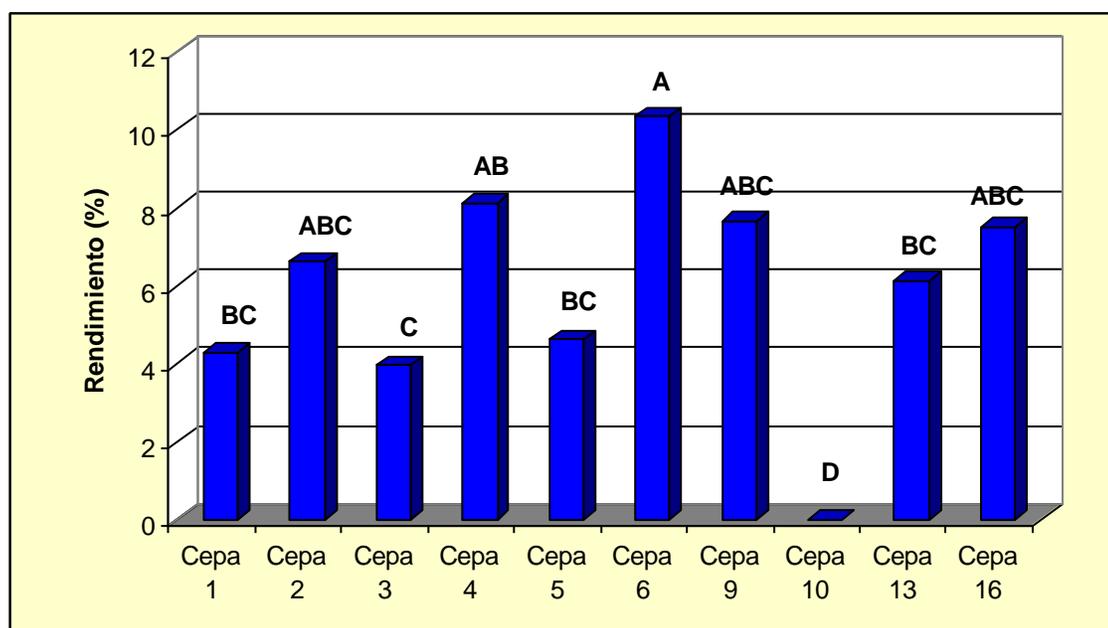


Figura 10. Rendimiento biológico (%) de carpóforos de Gargal desarrollados en sustrato de Coihue.

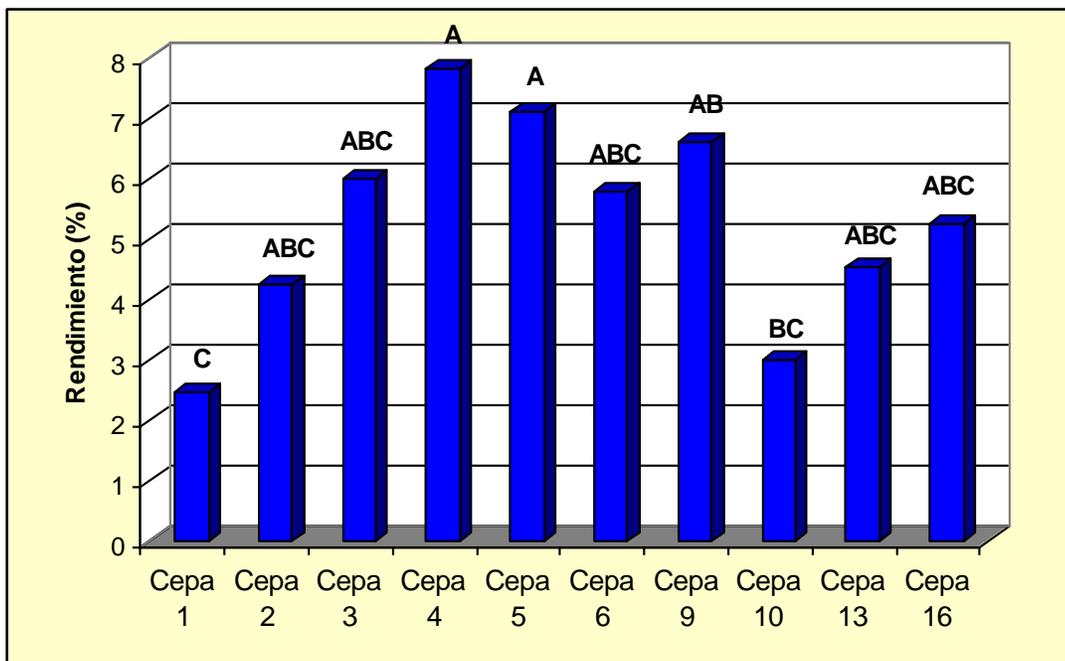


Figura 11. Rendimiento biológico (%) de carpóforos de Gargal desarrollados en sustrato de Raulí.

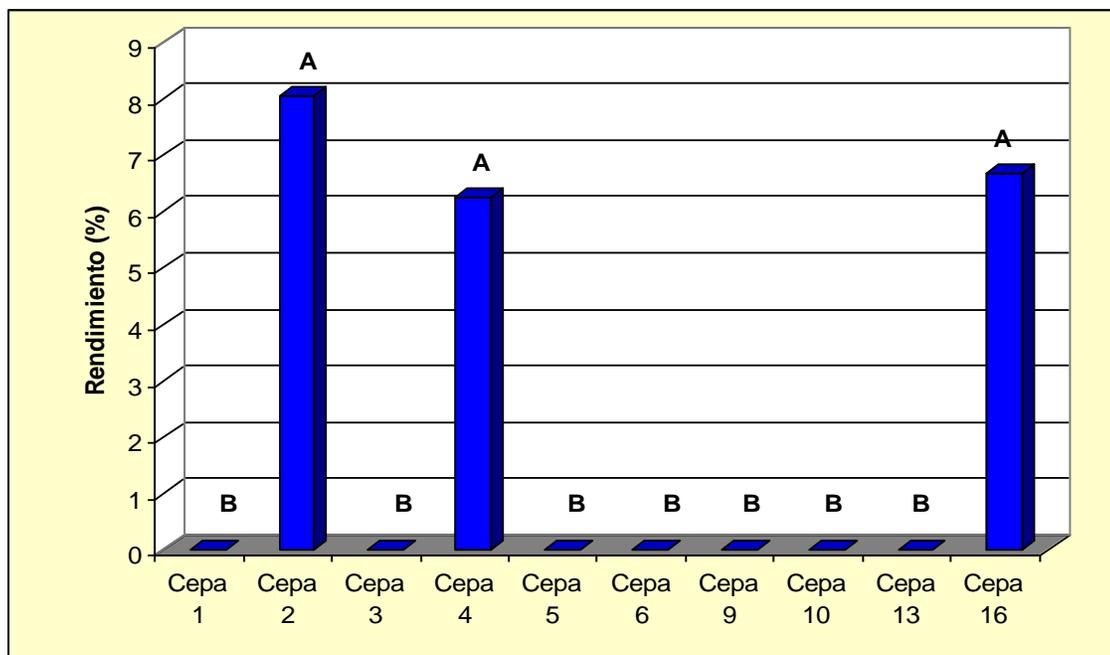


Figura 12. Rendimiento biológico (%) de carpóforos de Gargal desarrollados en sustrato de Eucalipto.

De estos resultados se puede concluir que existe una gran variabilidad en los rendimientos, tanto entre cepas para un mismo sustrato como entre sustratos para una misma cepa. Además, hay diferencias en cuanto a la capacidad productiva de los sustratos con respecto a las cepas utilizadas, en otras palabras no da lo mismo la

cepa y ésta debe ajustarse a la especie para lograr mejores rendimientos. También, es factible utilizar sustratos de especies foráneas, como es el Eucalipto, pero en este caso la mayoría de las cepas fallan en reproducirse, volviéndose más crítica la selección de la cepa. El uso de Eucalipto es una buena alternativa al de las maderas nativas, las cuales cada vez son más escasas y caras.

### 5.8. Análisis proximal de carpóforos.

Los resultados de análisis proximal han demostrado que los carpóforos tienen un porcentaje de fibra bastante alto si se considera solamente la materia sólida, alcanzando porcentajes promedios de 32,5% b.s. (base seca), lo que representa aproximadamente una tercera parte de los componentes sólidos que componen las setas. Sin embargo considerando que los hongos tienen gran cantidad de agua, este porcentaje disminuye a alrededor de 4,36% b.h. (base húmeda).

Respecto al contenido de humedad, este componente varió mucho ya que las ganancias o pérdidas de humedad fue dependiente del ambiente en donde se encuentra, sin embargo el promedio de 86,4% refleja el alto contenido de humedad del hongo, lo cual es propio de los carpóforos de los hongos superiores. Por otro lado, los resultados del nivel de proteína, al contrario que otros hongos comestibles, indicaron que el Gargal no presenta un alto contenido (0,02%), situación que pudiera ser atribuible al método utilizado en la determinación, ya que para hacer la curva de calibración se utiliza una proteína indicadora, la cual no necesariamente refleja el contenido proteico total.

El contenido de fibras fue de 32,5% base peso seco y de 4,36% base peso húmedo. Contenido que se puede considerar alto ya que comprende casi un tercio de todo el peso seco (Cuadro 10)

Cuadro 10. Análisis proximal de carpóforos de Gargal.

Componente	Muestras				Promedio
	R-1537	R-1538	R-1539	R-1540	
Humedad (% b.h.)	87,07	87,72	88,04	82,52	86,34
Materia seca (%)	12,93	12,27	11,96	17,47	13,66
Extracto etéreo (%)	0,51	0,56	0,80	0,77	0,66
Proteínas (%)	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02
Azúcares reductores (%)	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01
pH	4,73	5,74	4,57	4,84	4,97
Sólidos solubles (%)	5,80	6,80	6,40	6,00	6,25
Cenizas (%)	0,50	0,50	0,52	0,69	0,55

#### 5.8.1. Respiración.

En general los resultados mostraron que el Gargal presenta una respiración muy alta, lo que guarda relación con la perecibilidad de este hongo, la que es mayor al ser

comparados con otros productos de consumo agrícola, o similar a otros hongos comestibles; esto se puede observar claramente en la Figura 13. La respiración es mayor a temperaturas por sobre los 15 °C, donde se produjeron niveles entre los 150 a 3.800 mg CO<sub>2</sub>/Kg\*h. Esta tasa de respiración es bastante alta si se compara con productos tales como lentejas (50 mg CO<sub>2</sub>/Kg\*h), espárragos (710 mg CO<sub>2</sub>/Kg\*h), pepino (400 mg CO<sub>2</sub>/Kg\*h), lechuga (250 mg CO<sub>2</sub>/Kg\*h a T<sup>o</sup> 45 °C) o para manzana (280 mg CO<sub>2</sub>/Kg\*h).

La tasa de respiración también ayuda a explicar por que la productividad del hongo o rendimiento biológico fue tan baja, ya que sería un gran consumidor de energía para desarrollar sus procesos metabólicos, incluso a temperaturas bajas como son 15 °C.

En el Cuadro 11, se resumen los parámetros cinéticos obtenidos para los modelos que representan la respiración para los tres tipos de hongos,

Cuadro 11. Modelos que determinan el punto máximo de respiración para los hongos Shiitake, Digueñe y Gargal, dentro de los intervalos de temperatura especificados.

<b>Hongo</b>	<b>Modelo Temp. 10-25°C</b>	<b>Modelo Temp. 25-30°C</b>
<b>Shiitake</b>	$5.067 \times 10^{-3} * \exp(0.136 * T)$	$2.8411 * \exp(-0.1151 * T)$
<b>Digueñe</b>	$1.8753 \times 10^{-2} * \exp(0.1093 * T)$	$1.5823 \times 10^7 * \exp(-0.06 * T)$
<b>Hongo</b>	<b>Modelo Temp. 2-20°C</b>	<b>Modelo Temp. 20-25°C</b>
<b>Gargal</b>	$3.8650 \times 10^{-2} * \exp(0.0514 * T)$	$2.0844 \times 10^{-1} * \exp(-0.0256 * T)$

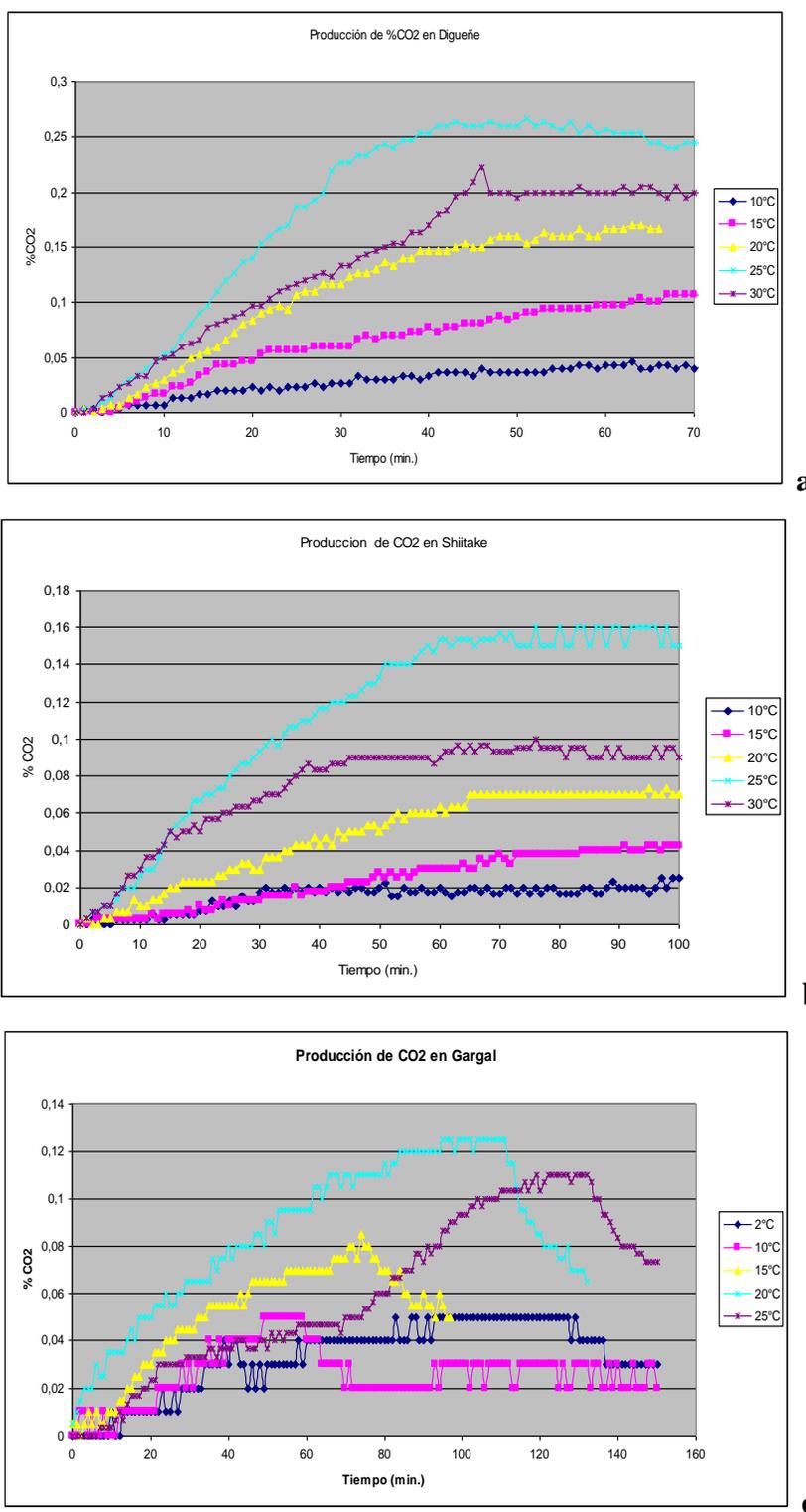


Figura 13. Respiración en función de la producción de dióxido de carbono en el tiempo para los hongos Digueñe (a), Shiitake (b) y Gargal (c).

Estos resultados permiten concluir lo siguiente:

- El Gargal presenta un comportamiento semejante a frutas y verduras en cuanto a su respiración, la cual se ve aumentada por un incremento en la temperatura de almacenamiento.
- La respiración alcanza un valor máximo en el tiempo dependiendo de la temperatura que se aplique, sin embargo, existe una temperatura máxima de alrededor de 20°C para el Gargal, en la cual la respiración decae bruscamente, lo que demuestra el carácter enzimático de la respiración.
- La respiración en función de la temperatura puede ser descrita por la función de Gore.
- La respiración del Gargal sigue una cinética de primer orden, cuyo valor de K aumenta con la temperatura y estaría representado por la ecuación de Arrhenius.
- La energía de activación de Gargal es un 50% menor que la de Digueñe y Shiitake.
- Es posible obtener por medio de un ajuste de curvas, una ecuación capaz de entregar el comportamiento de la respiración a diferentes temperaturas para Gargal, Digueñe y Shiitake.

### **5.9. Diseño y fabricación de máquina llenadora de sustrato.**

La máquina consistente en una plataforma giratoria montada sobre una mesa de acero, consta de tres estaciones de trabajo distribuidas cada 120°, en cada estación hay una perforación sobre la plataforma en la cual calza perfectamente un tubo de acero de 4 pulgadas de diámetro y 50 cm de alto.

La primera estación de trabajo (Figura 14) es para llenar un tubo de acero con aserrín, proveniente de una mezcladora que trabaja con un sistema de tornillo sinfín. La segunda estación de trabajo (Figura 15) consiste en un sistema de pistón mecánico, con el cual se aplica presión sobre el aserrín hasta compactarlo lo suficiente para formar el pan o briqueta. El pistón consiste en una estructura fija y una móvil, la parte móvil es impulsada por un motor eléctrico, el que hace girar una barra con hilo, sobre esta barra se desliza una tuerca fija a la estructura móvil. El recorrido del pistón es de 20 cm, con lo cual se obtiene una briqueta de 30 cm.

La tercera estación de trabajo (Figura 16) consiste en un mecanismo de torniquete para sacar la briqueta de aserrín del tubo de acero, para ello en esta estación hay una perforación en la mesa, la cual permite que la briqueta se deslice hacia abajo, dejando el tubo vacío y listo para entrar a la primera estación nuevamente.

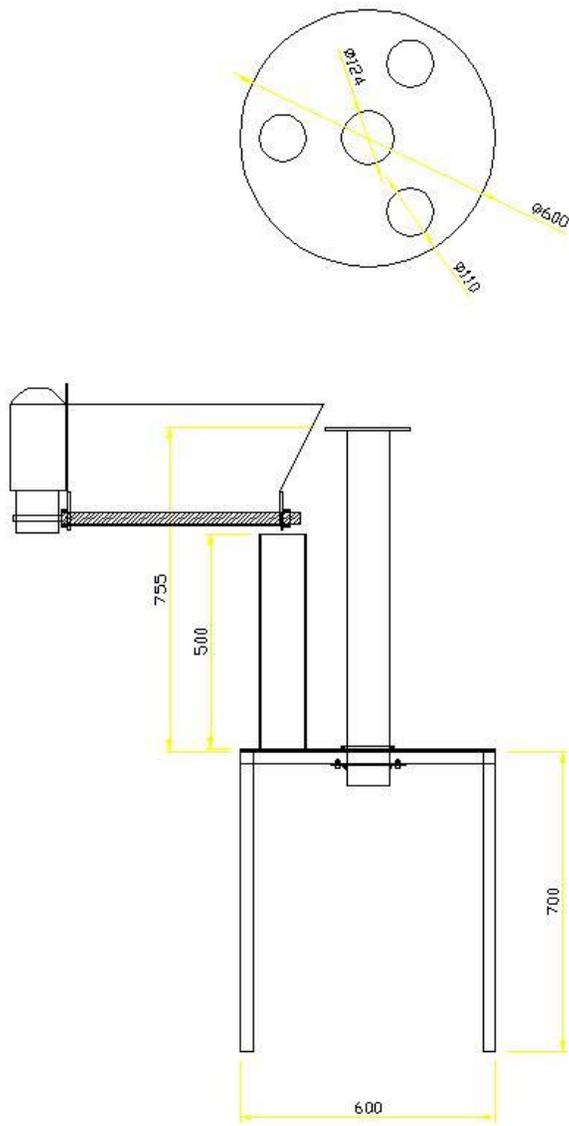


Figura 14. Vista de la primera estación de trabajo (Llenado).

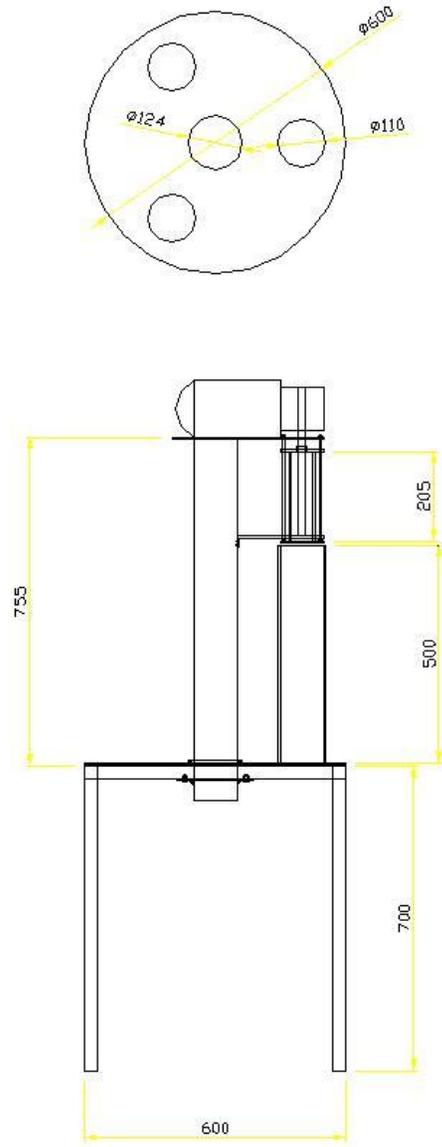


Figura 15. Vista de la segunda estación de trabajo (Compactación).

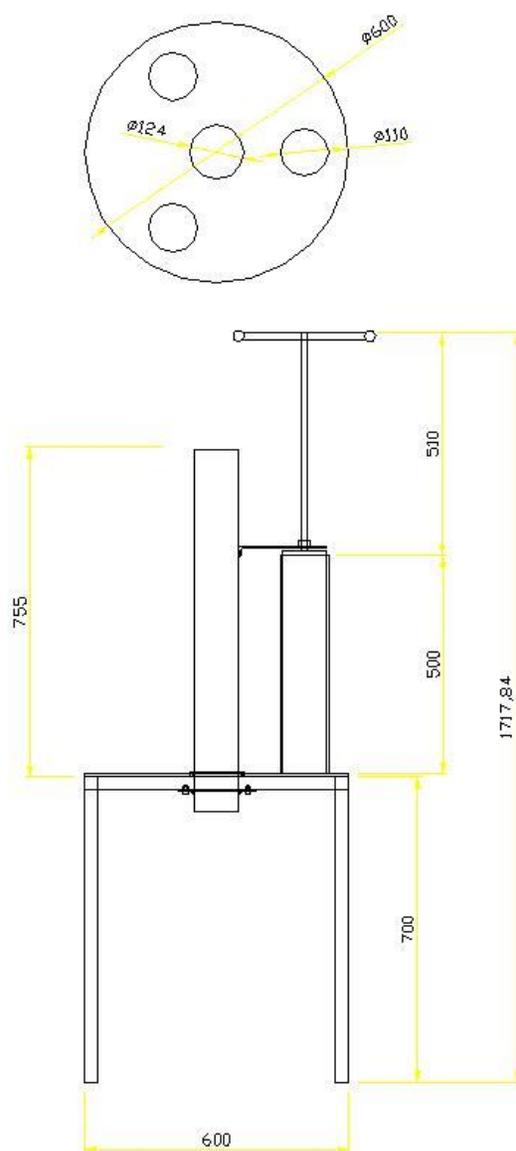


Figura 16. Vista de la tercera estación de trabajo (Ensamado).

La máquina llenadora de sustrato cuenta con un motor (ML 802-4) monofásico de 0,75kW de potencia, con un motoreductor Nord Technik con una relación de 1:20. Esta soportada sobre una estructura metálica, que posee una plataforma para el operario. La tolva de carga como el tornillo sinfín son de acero inoxidable lo que da durabilidad al sistema y cumple con la normativa exigida para equipos usados en la industria de alimentos. En la Foto 13 se pueden apreciar las diferentes partes que componen la máquina y su condición terminada.

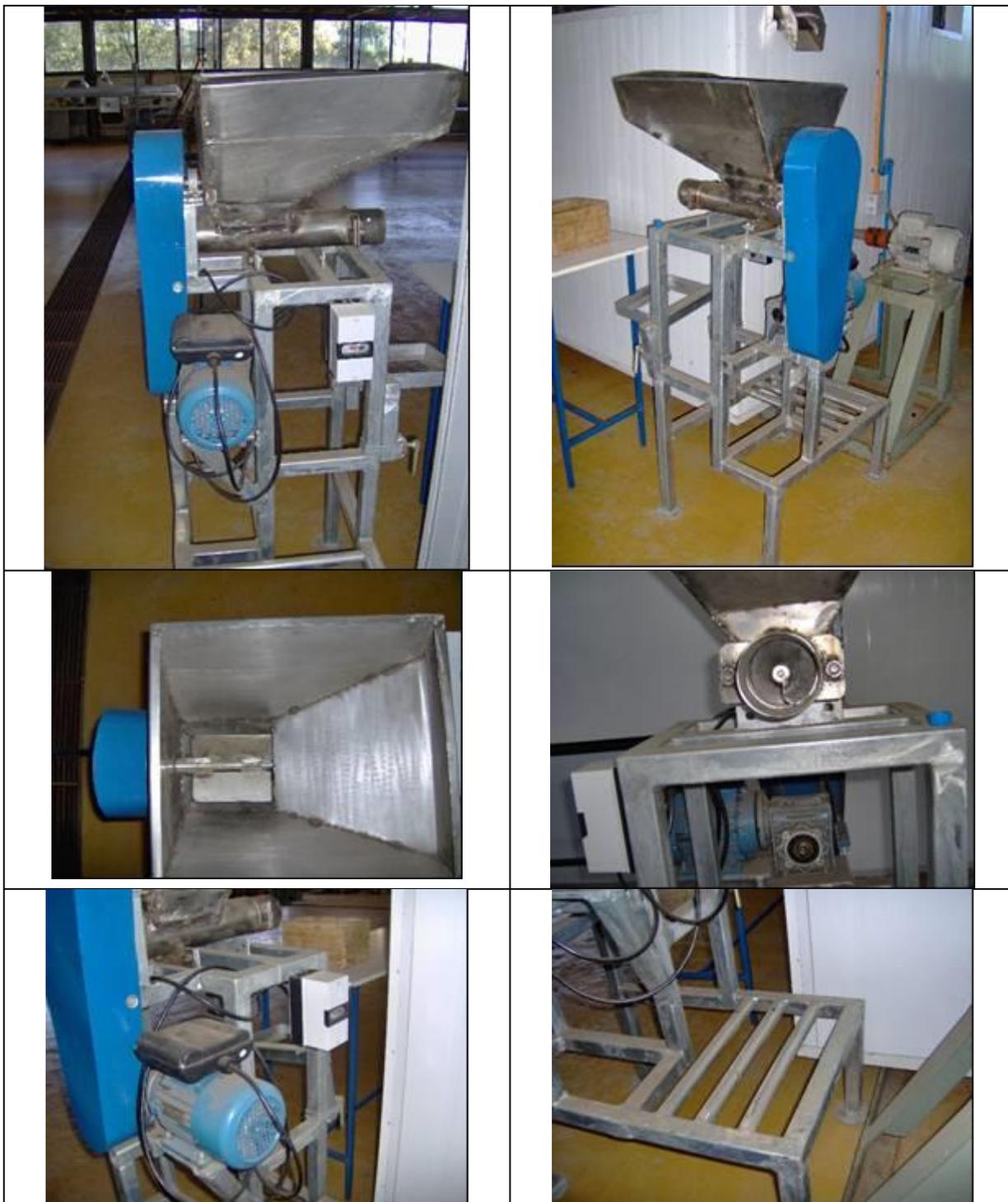


Foto 13: Máquina llenadora de sustrato para la producción de hongos comestibles Gargal desarrollada en el Departamento de Agroindustria, Facultad de Ingeniería Agrícola

### 5.10. Adaptación y ambientación de módulo de producción.

Los requerimientos ambientales del Gargal para una eventual producción artificial se pueden considerar como altos, ya que el micelio puede retrotraerse con facilidad cuando no se les entrega las condiciones ideales. Además, los rangos de temperatura y humedad son muy estrechos y frente a una modificación de las condiciones el hongo deja de crecer de inmediato. Por otro lado, las temperaturas óptimas de producción son relativamente bajas (11 °C), obligando a tener una ambientación similar a la de un frigorífico, con el inconveniente que las bajas temperaturas tienden a deshidratar el ambiente. Por consiguiente, los equipos necesarios para ambientar un módulo de producción deben suministrar frío y humedad al mismo tiempo, esto se solucionó en parte con los equipos descritos en el punto 3.10 y que se visualizan en la Foto 14.



Foto 14. Sistema de ambientación de módulo para la entrega de frío y humedad.

### 5.11 Adaptación de sistema de producción comercial de Gargal.

La falta de resultados en esta etapa es una consecuencia de los factores mencionados en el punto 3.11 de la Metodología, los cuales no solo dificultaron el avance del proyecto, pero además obligaban a inversiones de alto valor para ambientar los eventuales módulos de producción, lo cual no es fácil de cumplir por una empresa particular, sobretodo que el proyecto no pudo garantizar un mínimo de producción y calidad. Con los resultados obtenidos se considera que la producción comercial de carpóforos no está garantizada, debido a bajos rendimientos biológicos y altos requerimientos de inversión, pero si se podría utilizar el sistema para masificar su micelio y eventualmente aprovechar las otras cualidades del Gargal, como son sus propiedad antioxidantes, aromas y actividad biológica de sus metabolitos secundarios.

### 5.12 Caracterización física y química.

De los ensayos se concluyó que el etanol, solo o en combinación con agua, y la acetona presentaron los mejores resultados como solventes, con extracciones de hasta 24%, mientras que los de más bajo rendimientos fueron el hexano y el acetato de etilo, con 3,4 y 2,5%; respectivamente, tal como se muestra en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Rendimiento y concentración de extractos de Gargal sometido a diferentes solventes.

<b>Muestra:</b>	<b>Rendimiento de Extracción (%)</b>	<b>Concentración (mg/ ml)</b>
Sin tratamiento térmico	13,67	17,38
20 minutos a 100 C	14,02	17,81
45 minutos a 100 C	14,67	18,64
20 minutos a 121 C	15,44	19,62
45 minutos a 121 C	17,41	22,12
Agua como solvente	19,57	18,59
Etanol como solvente	20,90	19,85
Acetona como solvente	16,04	15,24
Acetato de etilo como solvente	2,52	2,40
Hexano como solvente	3,42	3,25
50% etanol y 50% agua como solvente	19,02	18,87
60% etanol y 40% agua como solvente	20,24	20,08
70% etanol y 30% agua como solvente	24,11	23,91
80% etanol y 20% agua como solvente	17,99	17,84
90% etanol y 10% agua como solvente	18,35	18,21

Los resultados permiten apreciar que la mejor combinación fue la de etanol con agua en una proporción de 7:3 respectivamente. Finalmente, la temperatura durante la extracción también mostró resultados interesantes, ya que altas temperaturas produjeron mejores resultados.

Por otro lado, los extractos de Gargal poseen una capacidad anti-oxidante interesante, con concentraciones de polifenoles y flavonoides consideradas altas y que los hacen tener una buena actividad antioxidante; debido a la fuerte capacidad reductora de radicales libres y al alto poder reductor (ver 5.16). Otra característica encontrada en los extractos fue su nula capacidad secuestrante de metales, lo que reduce la opción de oxidaciones por metales.

En cuanto al efecto de estos extractos sobre microorganismos, insectos y vegetales, ensayos realizados por el Dr. © P. Aqueveque del Departamento de Agroindustria de la Universidad de Concepción, demostraron que ninguno de los extractos logrados tienen actividad anti-bacteriana, anti-fúngica o herbicida.

### **5.13. Estudio de la duración de poscosecha del Gargal.**

Esta actividad no tiene resultados por no haberse obtenido una producción artificial aceptable de carpóforos.

### **5.14. Estudio de la conservación en atmósfera modificada.**

Las mismas razones anteriores son la causa de no tener resultados en esta actividad.

### 5.15. Estudio del sistema de deshidratado de hongos.

Al igual que las dos etapas anteriores, esta actividad no se pudo realizar por falta de producción artificial.

### 5.16. Producción de extractos de Gargal y capacidad antioxidante.

#### 6.16.1. Producción de extractos de Gargal.

Las Figuras 17, 18 y 19 indican que el equilibrio químico del soluto entre el extracto y el refinado se logra después de 1 hora de agitación, obteniendo una concentración de soluto en el extracto sin gran variación. El coeficiente de distribución  $\alpha$  varía entre 0,020 y 0,036 para etanol y entre 0,028 y 0,045 para agua como solvente.

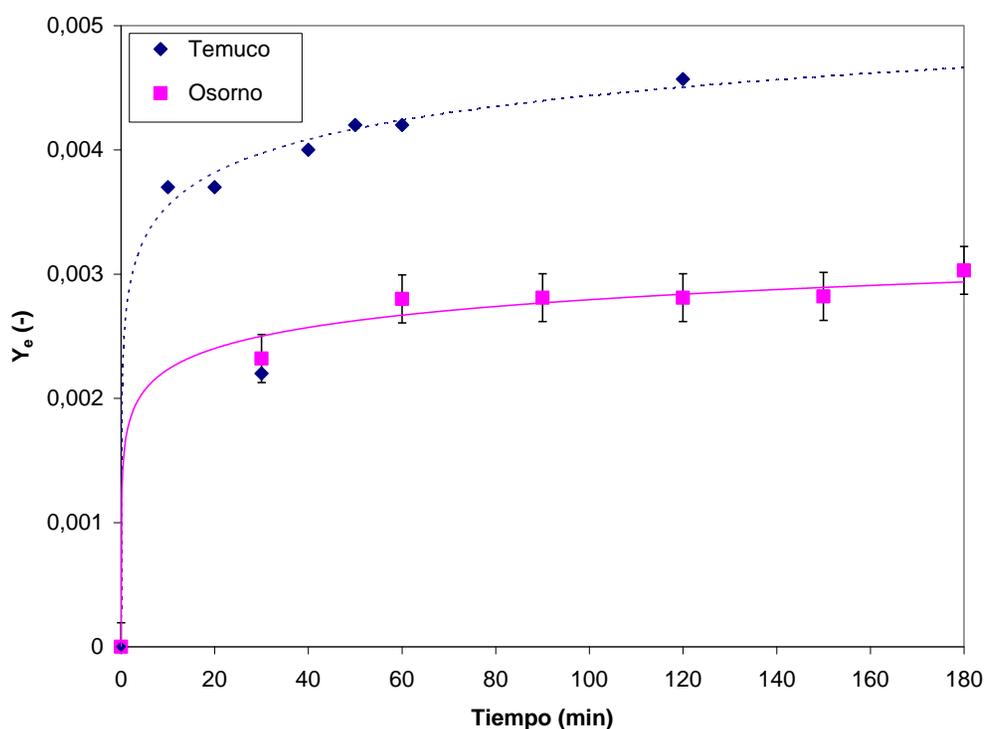


Figura 17. Fracción másica de solutos en extractos de *Grifola gargal* según su procedencia, utilizando agua como solvente (concentración = 250 kg/m<sup>3</sup>; velocidad giratoria = 200 rpm).

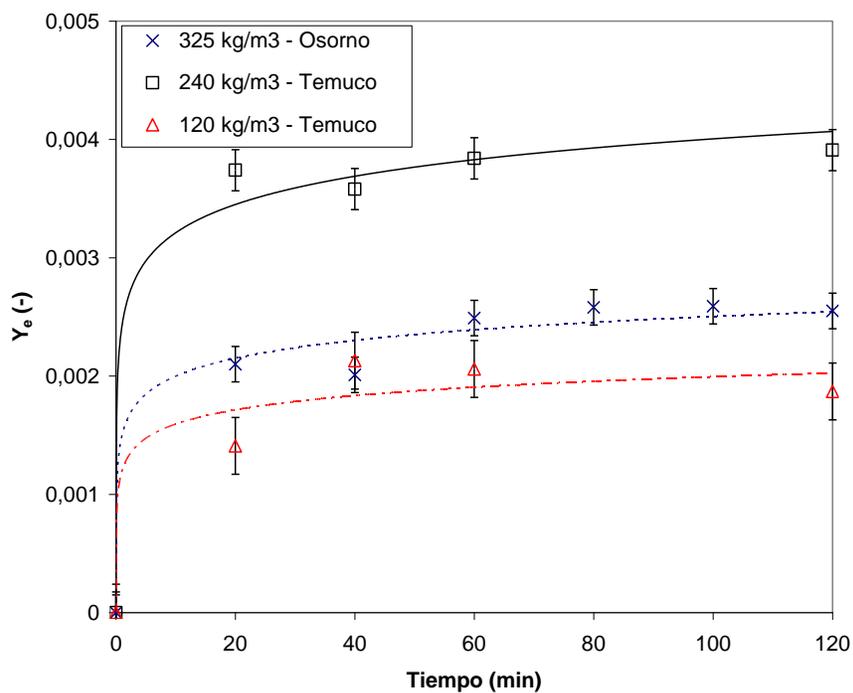


Figura 18. Fracción másica de solutos en extractos de distintas concentraciones de *Grifola gargal*, utilizando etanol como solvente (velocidad giratoria = 20 rpm).

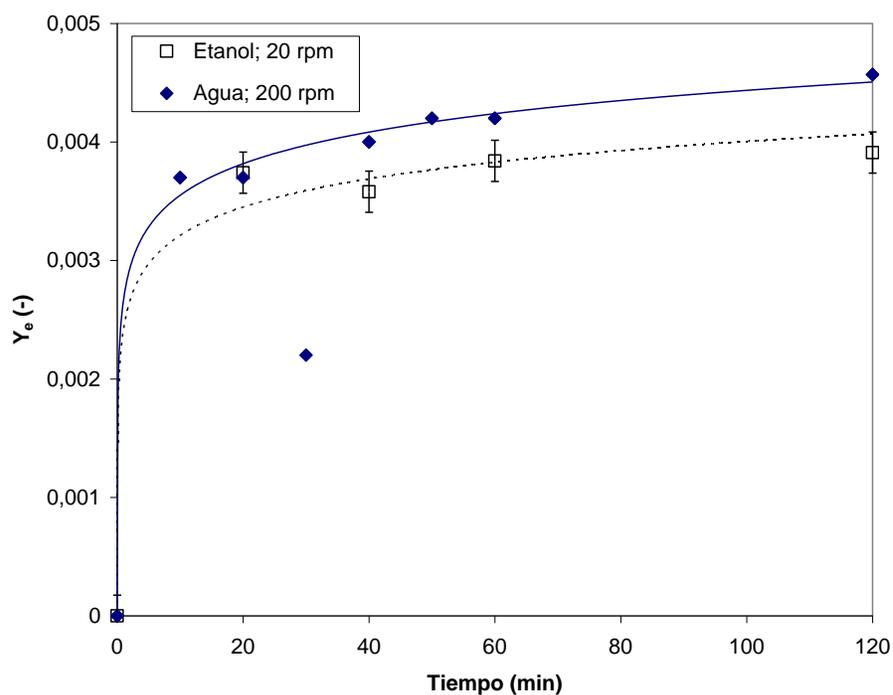


Figura 19. Fracción másica de solutos en extractos de *Grifola gargal* de Temuco (concentración = 250 kg/m<sup>3</sup>), utilizando distintos solventes.

Variaciones en la molienda, previa a la extracción, puede afectar el tamaño de partículas de sólidos y por ende el área interfacial. La transferencia de masa de solutos desde el producto triturado al medio líquido es más favorable a medida que las partículas son más pequeñas y con un mayor área interfacial específica, obteniendo así el equilibrio químico más rápidamente. Por otro lado, la velocidad giratoria del agitador del sistema de agitación es otro parámetro relevante, un aumento en la velocidad giratoria favorece la transferencia de masa de soluto desde el producto triturado hacia el solvente, dado que el espesor de la capa límite alrededor de las partículas disminuye a mayor velocidad, reduciendo la resistencia a la transferencia de masa de solutos por difusión a través de la capa límite.

En la Figura 20 se observa una mayor concentración y rendimiento de soluto extraído de *G. gargal* proveniente de la localidad de Temuco, indicando la procedencia de la materia prima como un factor relevante en este estudio. De acuerdo al análisis estadístico realizado a los datos de concentración de soluto en los extractos, se encontró que hay diferencia significativa ( $P = 0,0093$ ) entre los hongos provenientes de Temuco y Osorno.

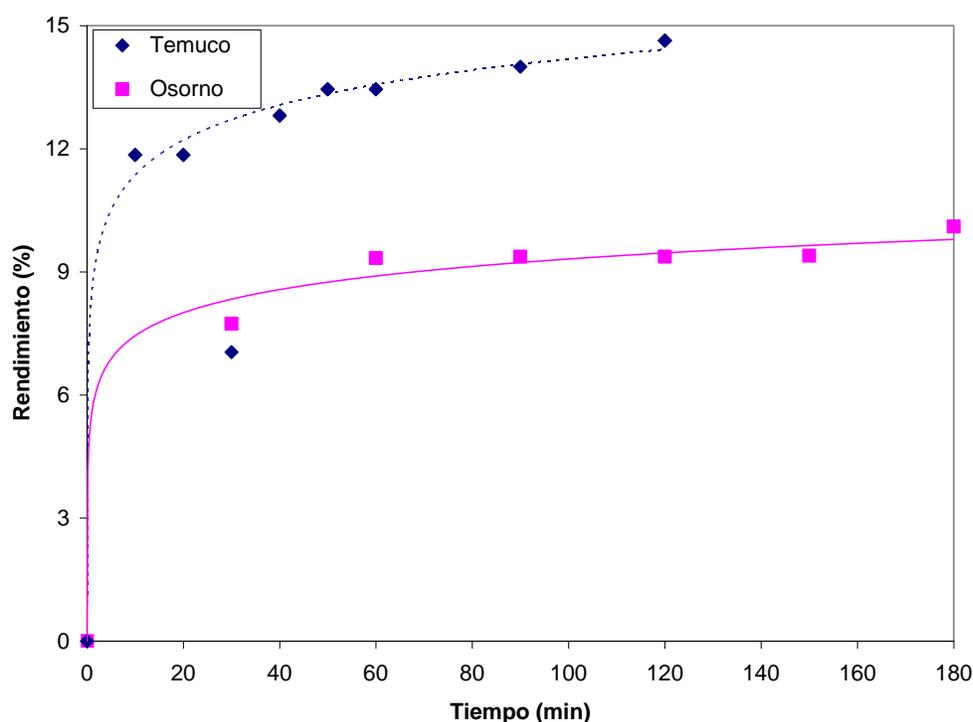


Figura 20. Rendimiento de extracción de solutos de *Grifola gargal* según su procedencia, utilizando agua como solvente (concentración =  $250 \text{ kg/m}^3$ ; velocidad giratoria = 200 rpm).

Cuando se compara el efecto de la cantidad de hongo triturado proveniente del sector de Temuco, en relación a la cantidad de solvente (etanol), se obtiene un extracto más concentrado a mayor razón alimentación / solvente; sin embargo, el rendimiento en ambos casos es muy similar (Figura 21). El coeficiente de distribución aumentó

proporcionalmente con la razón alimentación / solvente, obteniendo un factor de separación, una fracción de solutos extraídos y un rendimiento de extracción similar en ambos casos. De acuerdo al análisis estadístico realizado a los datos de concentración de soluto en los extractos, se encontró que hay diferencia significativa ( $P < 0,0001$ ) entre las distintas dosis de hongo utilizado en la extracción.

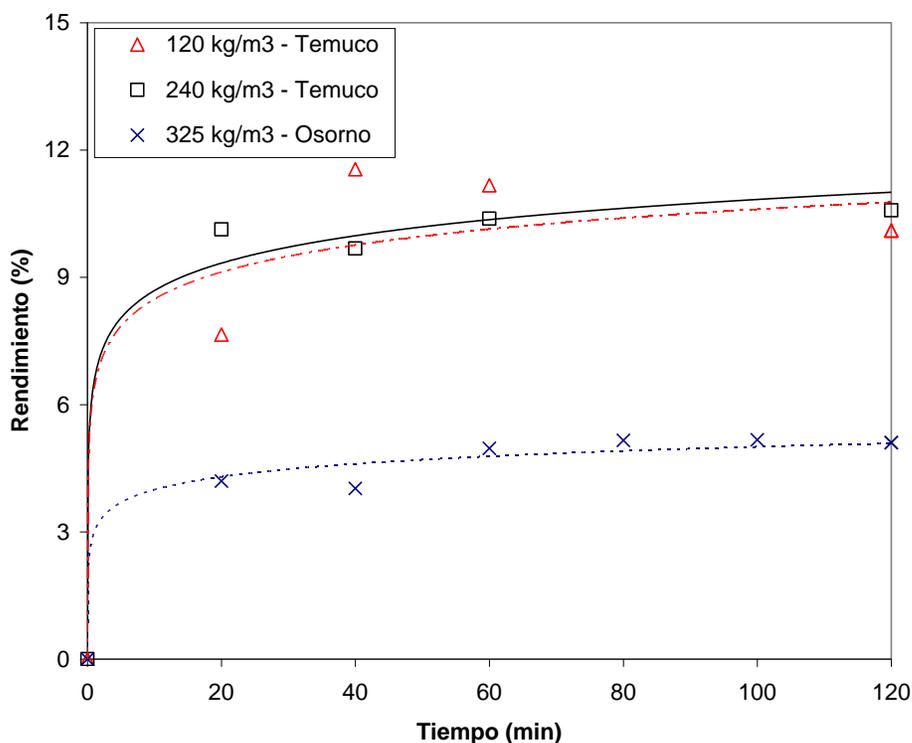


Figura 21. Rendimiento de extracción de solutos con distintas concentraciones de *Grifola gargal*, utilizando etanol como solvente (velocidad giratoria = 20 rpm).

Cuando se comparan los dos tipos de solventes, se observa en las Figura 22 que agua como solvente presenta características más favorables para extraer los solutos de *G. gargal* proveniente de Temuco, logrando una mayor concentración de solutos y mayor rendimiento de extracción. Sin embargo, de acuerdo al análisis estadístico realizado a los datos de concentración de soluto en los extractos, se encontró que no hay diferencia ( $P = 0,9024$ ) entre los distintos solventes utilizados en la extracción.

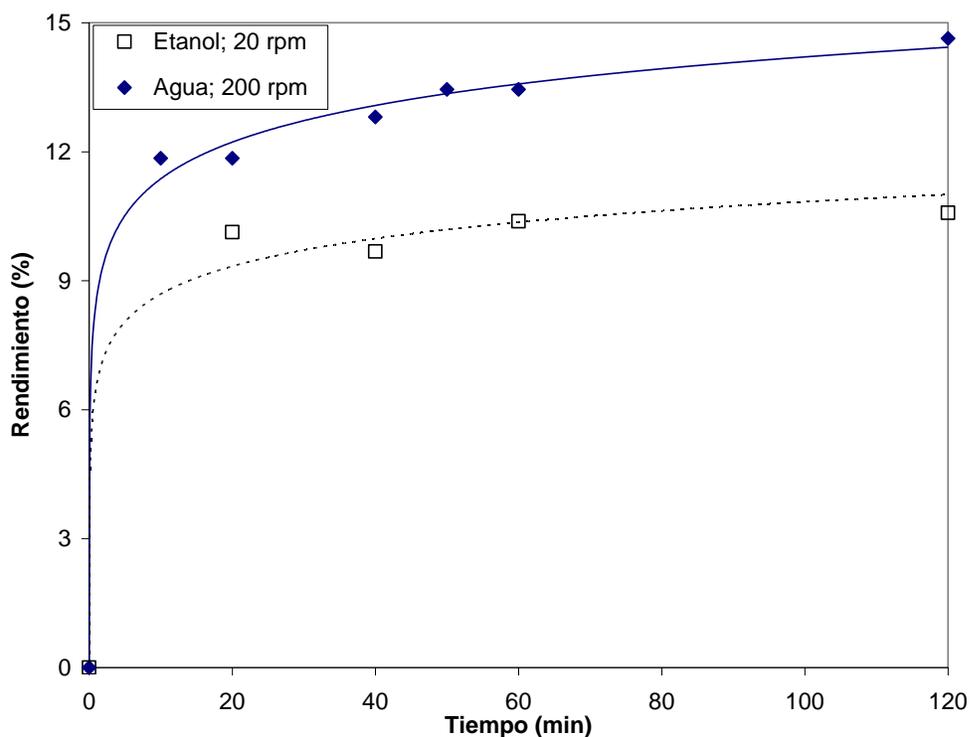


Figura 22. Rendimiento de extracción de solutos de *Grifola gargal* de Temuco (concentración = 250 kg/m<sup>3</sup>), utilizando distintos solventes.

Estos trabajos de extractos permiten concluir lo siguiente:

- La procedencia del hongo *G. gargal*, afecta considerablemente el proceso de extracción de solutos.
- Existe una razón óptima de alimentación / solvente para la extracción solutos de *G. gargal*.
- Tanto el agua, como el etanol presentan características favorables como solvente para extraer solutos de *G. gargal*.

#### 5.16.2. Análisis físico - químico.

El contenido de agua y el porcentaje de sólidos solubles de *G. gargal* fue de un 91,36 ± 0,22% y 1,9°Brix, respectivamente. Por otra parte, la fracción másica de sólidos totales  $x_F$  en el producto triturado, transformado en una pasta (alimentación de la extracción) fue 0,1201 ± 0,0033. Esto indica un cierto grado de deshidratación de la alimentación previamente a la extracción. La luminosidad de la pasta fue de un nivel 9 y la intensidad de un nivel 2 según la Tabla 7.5Y de Munsell, indicando un producto de color blanco invierno – gris claro. No se observaron cambios en el color de la pasta durante los experimentos.

### 5.16.3 Capacidad antioxidante.

La extracción con etanol:agua mostró un alto rendimiento que alcanzó al 17,41% cuando recibieron un tratamiento térmico de 121°C por 45 min. Rendimiento que aumentó a medida que sube la temperatura y el tiempo (Cuadro 13).

Cuadro 13. Rendimiento de extracción de Gargal con diferentes tratamientos térmicos.

Muestras	Rendimiento (% w/w)
Cruda	13.67 ± 0.36 <sup>a</sup>
100°C por 20 min	14.02 ± 0.69 <sup>a, b</sup>
100°C por 45 min	14.67 ± 0.61 <sup>a, b</sup>
121°C por 20 min	15.44 ± 1.03 <sup>b</sup>
121°C por 45 min	17.41 ± 2.57 <sup>c</sup>

Medias con diferentes letras son estadísticamente diferentes (P < 0.05).

Respecto al estudio del efecto de los tratamientos térmicos sobre la composición de los compuestos antioxidantes, en especial polifenoles y flavonoides, los resultados indicaron que el contenido total de polifenoles disminuyó ligeramente, cuando el tiempo aumento para ambas temperaturas (Cuadro 14). Mientras que la concentración de flavonoides decrece con respecto al aumento del tiempo. Finalmente se puede apreciar que a mayor temperatura incrementaría la cantidad de flavonoides extraídos desde la matriz de las células.

Cuadro 14. Composición antioxidante del Gargal con diferentes tratamientos térmicos.

Muestras	Polifenoles (mg / 100 g)	Flavonoides (mg / 100 g)
Cruda	60.5 ± 1.9 <sup>a</sup>	3.2 ± 0.3 <sup>a</sup>
100°C por 20 min	67.7 ± 6.9 <sup>a, b</sup>	3.8 ± 0.3 <sup>b</sup>
100°C por 45 min	66.6 ± 8.2 <sup>a, b</sup>	3.3 ± 0.2 <sup>a</sup>
121°C por 20 min	77.3 ± 9.8 <sup>c</sup>	4.6 ± 0.6 <sup>c</sup>
121°C por 45 min	74.6 ± 7.7 <sup>b, c</sup>	4.3 ± 0.5 <sup>c</sup>

Medias con diferentes letras son estadísticamente diferentes (P < 0.05).

El precalentamiento del Gargal, no incrementó la capacidad de capturar radicales ABTS, DPPH comparado con la muestra sin calentar (Cuadro 15).

Cuadro 15. Atributos antioxidantes de Gargal extraídos a diferentes temperaturas.

Muestras	ABTS radicales (mg vit C / L)	DPPH radicales (%)	Poder reductor (mg vit C / L)	Habilidad Secuestrante (%)
Cruda	93.0 ± 0.5 <sup>a</sup>	90.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	135.6 ± 0 <sup>a</sup>	1.2 ± 1.2 <sup>a</sup>
100°C por 20 min	93.3 ± 0.6 <sup>a</sup>	89.1 ± 0.8 <sup>a</sup>	135.6 ± 0 <sup>a</sup>	1.1 ± 1.2 <sup>a</sup>
100°C por 45 min	92.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	89.2 ± 0.2 <sup>a</sup>	135.6 ± 0 <sup>a</sup>	0.8 ± 1.0 <sup>a, b</sup>
121°C por 20 min	90.9 ± 0.3 <sup>b</sup>	84.0 ± 2.6 <sup>b</sup>	135.6 ± 0 <sup>a</sup>	2.5 ± 0.6 <sup>c</sup>
121°C por 45 min	91.0 ± 1.2 <sup>b</sup>	88.6 ± 1.3 <sup>a</sup>	135.6 ± 0 <sup>a</sup>	0.2 ± 1.1 <sup>b</sup>

Medias con diferentes letras son estadísticamente diferentes (P < 0.05).

El método de extracción estudiado fue altamente efectivo para liberar los compuestos antioxidantes, con una fuerte capacidad de capturar radicales libres.

Resumiendo, en esta investigación los resultados demostraron que con el tratamiento térmico mejoró el rendimiento de extracción (1,33 veces), mientras que en el extracto del hongo aumentó el contenido de flavonoides (1,4 veces), en comparación con la muestra cruda. Sin embargo no se detectó un efecto térmico en la actividad antioxidante, debido probablemente a su gran capacidad de capturar radicales libres. Los resultados indicaron que el hongo *G. gargal* posee un potencial interesante como antioxidante natural para la industria alimentaria.

### 5.17. Producción de aromas de Gargal.

Una de las características sobresalientes de la especie *G. gargal* es su aroma, el cual se parece a las almendras. Esto no está reportado para otras especies de *Gramal*, por lo cual lo hace atractivo como una nueva fuente de aromas o una característica de calidad del producto artificial. A pesar del interés en medir este factor, la actividad no se pudo desarrollar por falta de producción artificial.

### 5.18. Producción de té de Gargal.

Actividad incompleta por falta de producción de carpóforos en forma artificial.

### 5.19. Análisis económico del Gargal.

#### 5.19.1. Producción de carpóforos.

El análisis se inició con los costos de producción de carpóforos de Gargal, los que se identificaron durante el desarrollo del proyecto. En los Cuadros 16 y 17 se resumen las inversiones requeridas para la etapa de producción de carpóforos de Gargal en condiciones de módulo con ambiente artificial y módulo ubicado en lugares con condiciones climáticas naturales. En las inversiones se descuenta la depreciación lineal considerando una vida útil de 8 años. En condiciones artificiales se consideran dos ciclos productivos anuales de 100 toneladas cada uno y en condiciones naturales sólo un ciclo de 100 toneladas.

Cuadro 16. Costo inversión por ciclo de producción de carpóforos de Gargal, módulo de ambiente artificial.

Inversión	Valor inicial (\$)	Vida útil (años)	Ciclo producción (nº/año)	Valor residual (\$)	Depreciación / ciclo (\$)
Llenadora de sustrato	1.716.000	8	2	171.600	96.525
<b>Total</b>					<b>96.525</b>

Cuadro 17. Costo inversión por ciclo de producción de carpóforos de Gargal, modalidad producción natural.

<b>Inversión</b>	<b>Valor inicial (\$)</b>	<b>Vida útil (años)</b>	<b>Ciclo producción (nº/año)</b>	<b>Valor residual (\$)</b>	<b>Depreciación / ciclo (\$)</b>
Llenadora de sustrato	1.716.000	8	1	171.600	193.050
<b>Total</b>					<b>193.050</b>

En el Cuadro 18 se sintetiza el costo de insumos, labores y servicios (contratados en laboratorio establecido en Chillán, Universidad de Concepción) de producción de carpóforos de Gargal en condiciones artificiales y en condiciones naturales, en ambos casos para 100 toneladas de producto.

Cuadro 18. Costo operacional producción 100 toneladas de carpóforos de Gargal bajo condición artificial y natural.

<b>ITEM</b>	<b>Modalidad artificial (\$)</b>	<b>Modalidad Natural (\$)</b>
133 ton. Aserrín (sustrato)	1.463.000	1.463.000
14.400 kilos semilla gargal	47.520.000	47.520.000
24.000 bolsas plásticas	2.256.000	2.256.000
546.000 envases	21.294.000	21.294.000
Pesticidas 3.100 kg.	2.728.000	2.728.000
Energía eléctrica 70.200 KWH	3.861.000	1.158.300
Agua 9.000 m3	250.000	75.000
Gas 2.000 kilos	1.100.000	0
Gasolina/aceite 20.000 comb.	12.000.000	0
Mano de obra	13.640.000	6.820.000
Uso equipo extracción inóculos	296.000	0
Uso sellador al vacío	147.200	0
Uso Módulo producción hongos	132.000	0
Uso equipos varios	27.000	0
Uso Autoclave	14.500	0
Uso agitador e incubadoras	12.940	0
Uso planta piloto	1.122.000	0
Flete a laboratorio	150.000	1.700.000
<b>Total</b>	<b>108.013.640</b>	<b>85.014.000</b>

El Cuadro 19 sintetiza el costo total (inversiones, servicios e insumos) de producción de Gargal, bajo condiciones artificiales de laboratorio y bajo condiciones naturales. Además, el análisis considera corrección del costo unitario de producción por un factor de pérdida de producto comercializable, inherente a los sistemas analizados. En el caso de la producción artificial, el rendimiento se estableció de acuerdo a los

resultados del proyecto, con un rendimiento biológico de 12% del peso del sustrato (aserrín); es decir, 15.960 kilos de carpóforos y en el caso de producción bajo condiciones naturales se estimó un rendimiento del 20% del sustrato utilizado (26.600 kilos); esta corrección se incorpora en la columna derecha del Cuadro 19.

Cuadro 19. Costo producción de 100 toneladas de carpóforos de Gargal en condiciones artificiales y naturales.

Modalidad producción	Costo inversión (\$)	Costo operacional (\$)	Costo total (\$)	Costo kilo Gargal corregido (\$)
Artificial	96.525	108.013.640	108.110.165	6.774
Natural	193.050	85.014.000	85.207.050	3.203
Recolección (referencial)				4.000

### 5.19.2. Producción de extractos.

La producción de extractos hidro-alcohólicos a partir del hongo *Grifola gargal* está basada en la experiencia de laboratorio adquirida a través del proyecto. El extracto de Gargal presenta propiedades farmacéuticas de interés, tal como se mencionó anteriormente, y puede ser una alternativa de agregación de valor a la producción de este hongo. El diagrama de flujo del proceso de obtención del extracto, se encuentra en la Figura 23.

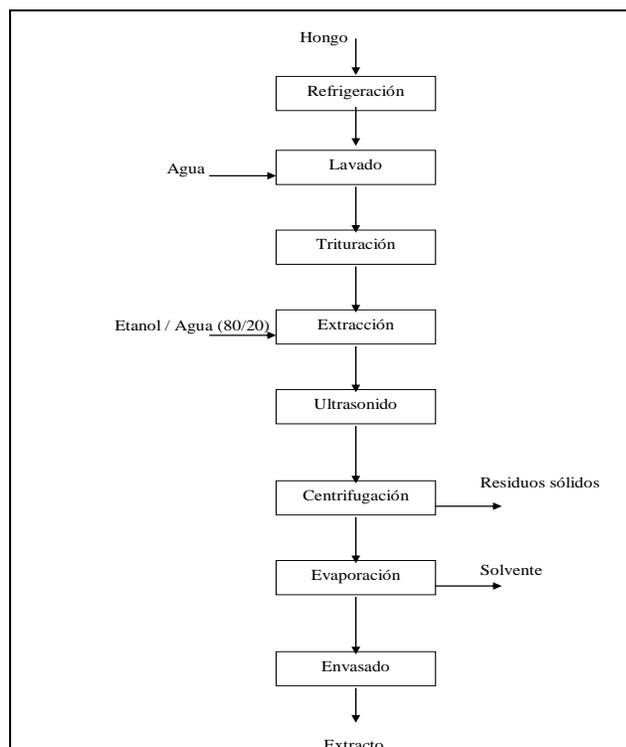


Figura 23. Diagrama de flujo de la producción de extracto a partir de *Grifola gargal*.

El análisis económico de obtención de extracto de Gargal considera tres alternativas, según el método de producción de la materia prima (carpóforos):

- a.- A partir de producción artificial de carpóforos en módulos con ambientación artificial.
- b.- A partir de producción de carpóforos inducida en módulos con ambiente natural.
- c.- A partir de recolección de carpóforos en bosques nativos.

### **Costo de la materia prima (carpóforos de Gargal).**

La materia prima presenta diferentes costos de acuerdo a su fuente de origen:

- Bajo producción en módulos con ambientación artificial, el costo es de \$ 6.774 por kilo de carpóforos.
- Bajo producción inducida en módulos con ambiente natural, su costo llega a \$ 3.203 por kilo de carpóforos.
- Bajo sistema de recolección manual en bosques nativos, el costo queda reflejado por el precio de mercados locales que es de \$ 4.000/kilo de carpóforos.

### **Proceso de obtención de extracto.**

El siguiente análisis económico se realiza según el orden del proceso resumido en la Figura 23 y de acuerdo a los siguientes supuestos:

- **Adquisición de materia prima.** Se estima un período de extracción de 46 semanas al año (230 días hábiles). El rendimiento de la planta industrial es del orden de 100 kilos de hongo Gargal al día (13 horas). De este modo se requieren 23.000 kilos de materia prima para este período. Luego, con el costo unitario de producción de Gargal (Cuadro 19) el Costo Total /año varía de \$155.802.000 a \$73.699.000, según sea la fuente de origen.
- **Refrigeración.** La materia prima, una vez ingresada a planta, requiere ser refrigerada. Este servicio tiene un costo de almacenamiento de \$ 7 kilo/día, y un costo de refrigeración de \$ 110 kilo/día. Por tanto el Costo Total /año es \$2.691.000.
- **Lavado.** Cada lote de 100 kilos de Gargal debe ser lavado en un equipo de duchas, en canastillos o cinta transportadora. Este servicio de lavado tiene un costo de \$ 60 por kilo. Total costo/año \$ 1.380.000.
- **Trituración.** Una vez lavado el gargal, debe ser triturado. Este servicio tiene un costo de \$ 50 por kilo de carpóforos. Total costo/año \$ 1.150.000
- **Extracción.** El servicio de extracción, que considera el uso de 200 litros de solvente (80% etanol + 20% agua) por cada 100 kilos de sólidos de Gargal, mano de obra, energía y un equipo de extracción sólido/líquido, tiene un costo de \$ 74.200/100 kilos a tratar. Total costo/año \$ 17.066.000.

- **Ultrasonido.** A fin de eliminar espumas y burbujas generadas en el proceso de extracción, se realiza una etapa de sonicado. Este servicio tiene un costo de \$160 por kilo de extracto (Gargal + solvente + sólidos). Total costo/año \$11.040.000.
- **Centrifugación.** Para aislar el extracto de Gargal de los residuos sólidos se procede a centrifugar la solución, el sobrenadante es el extracto base. Este servicio tiene un costo de \$165 por kilo de mezcla inicial. Total costo/año \$11.385.000.
- **Evaporación.** Se requiere concentrar el sobrenadante obtenido de la centrífuga para obtener 18,6 mg de sólidos por ml de extracto de Gargal. En este proceso se separa el extracto de Gargal del solvente etanol + agua en una proporción de 1: 1. Se obtienen 100 kilos de solvente (mezcla de etanol y agua) y 100 kilos de extracto por cada 100 kilos de Gargal que entra a proceso. Costo del servicio es de \$103/kilo de sobrenadante (2/3 partes de 300 kilos). Total costo/año \$ 4.738.000.
- **Envasado.** El envasado se realiza en recipientes de 1 litro de extracto. Este servicio tiene un costo de \$ 217/litro. Total costo/año \$ 4.991.000.
- **Limpieza.** Este servicio tiene un costo global de \$ 1.800.000/año.

El Cuadro 20 sintetiza el costo de producción de extracto de Gargal según fuente de origen de la materia prima. La alternativa de mayor costo (MM\$ 212) es la producción de extracto completamente artificial, luego sigue la recolección en bosque (MM\$ 148) y finalmente la más recomendable, desde el punto de vista económico, es la que contempla la producción de carpóforos inducidos en un ambiente natural adecuado (MM\$ 130). El proceso de extracción tiene un costo de MM\$ 56, siendo menos gravitante en términos relativos en la alternativa artificial (26,5%), en otras palabras la producción artificial de carpóforos, con el conocimiento tecnológico actual, es la etapa de mayor significancia en costos, lo que eleva el costo total.

En términos de costo unitario (kilo extracto) el rango va de \$ 5.600 a \$9.200, siendo la diferencia generada por los diferentes costos de producción de carpóforos descritos. Este costo unitario constituye el piso para fijar margen y precio de comercialización de productos farmacéuticos, dependiendo además del proceso de formulación del producto comercializable. A modo de ejemplo, en el mercado local se expenden productos con atributos antioxidantes en cápsulas tales como *Shiitake* y *Maitake* cuyos precios de referencia fluctúan entre \$ 12 mil y \$ 15 mil/envase con 90 dosis. Lo anterior, preliminarmente, dejaría un espacio razonable para generar producto comercializable basado en extracto de Gargal. Estos aspectos se pueden profundizar con información básica de mercados y profesionales del ámbito de la salud.

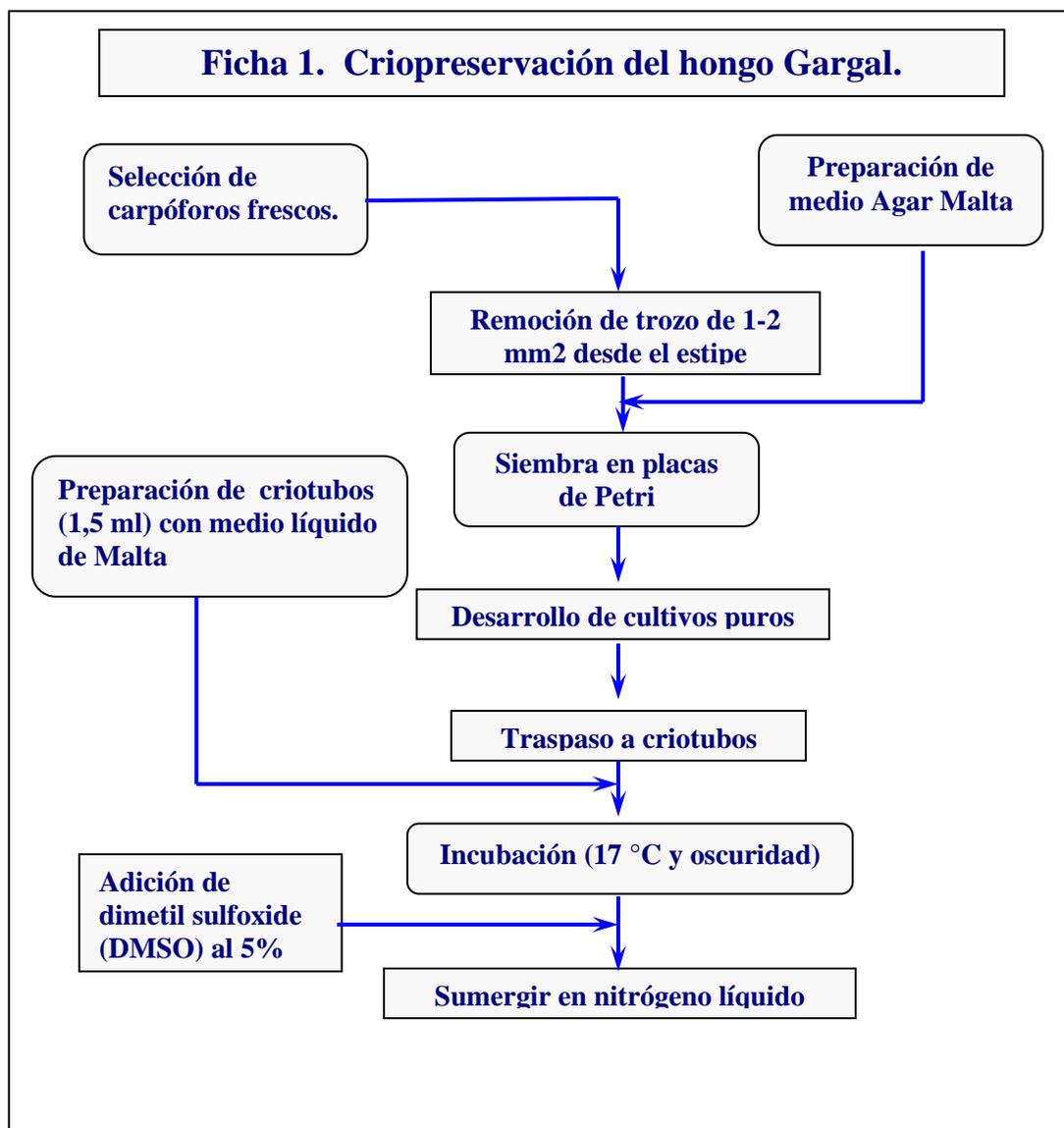
Cuadro 20. Costo de producción de extracto de gargal. Fuente de abastecimiento de materia prima

<b>Etapa o Proceso</b>	<b>Ítem de Costo</b>	<b>Producción artificial en laboratorio (\$)</b>	<b>Producción inducida en ambiente natural (\$)</b>	<b>Recolección en bosque nativo (\$)</b>
Producción Gargal	Materia prima	155.802.000	73.699.000	92.000.000
Extracción	Refrigeración	2.691.000	2.691.000	2.691.000
Extracción	Lavado	1.380.000	1.380.000	1.380.000
Extracción	Trituración	1.150.000	1.150.000	1.150.000
Extracción	Extracción	17.066.000	17.066.000	17.066.000
Extracción	Ultrasonido	11.040.000	11.040.000	11.040.000
Extracción	Centrifugación	11.385.000	11.385.000	11.385.000
Extracción	Evaporación	4.738.000	4.738.000	4.738.000
Extracción	Envasado	4.991.000	4.991.000	4.991.000
Extracción	Limpieza	1.800.000	1.800.000	1.800.000
<b>Subtotal Costo/año Extracción</b>		56.241.000	56.241.000	56.241.000
<b>Costo Producción/ Costo Total, %</b>		<b>73,5</b>	<b>56,7</b>	<b>62,1</b>
<b>Costos Extracción/ Costo Total, %</b>		<b>26,5</b>	<b>43,3</b>	<b>37,9</b>
<b>Costo Total/año (23.000 kilos)</b>		<b>212.043.000</b>	<b>129.940.000</b>	<b>148.241.000</b>
<b>Costo Total / kilo extracto</b>		<b>9.219</b>	<b>5.650</b>	<b>6.445</b>

## 6. FICHAS TÉCNICAS

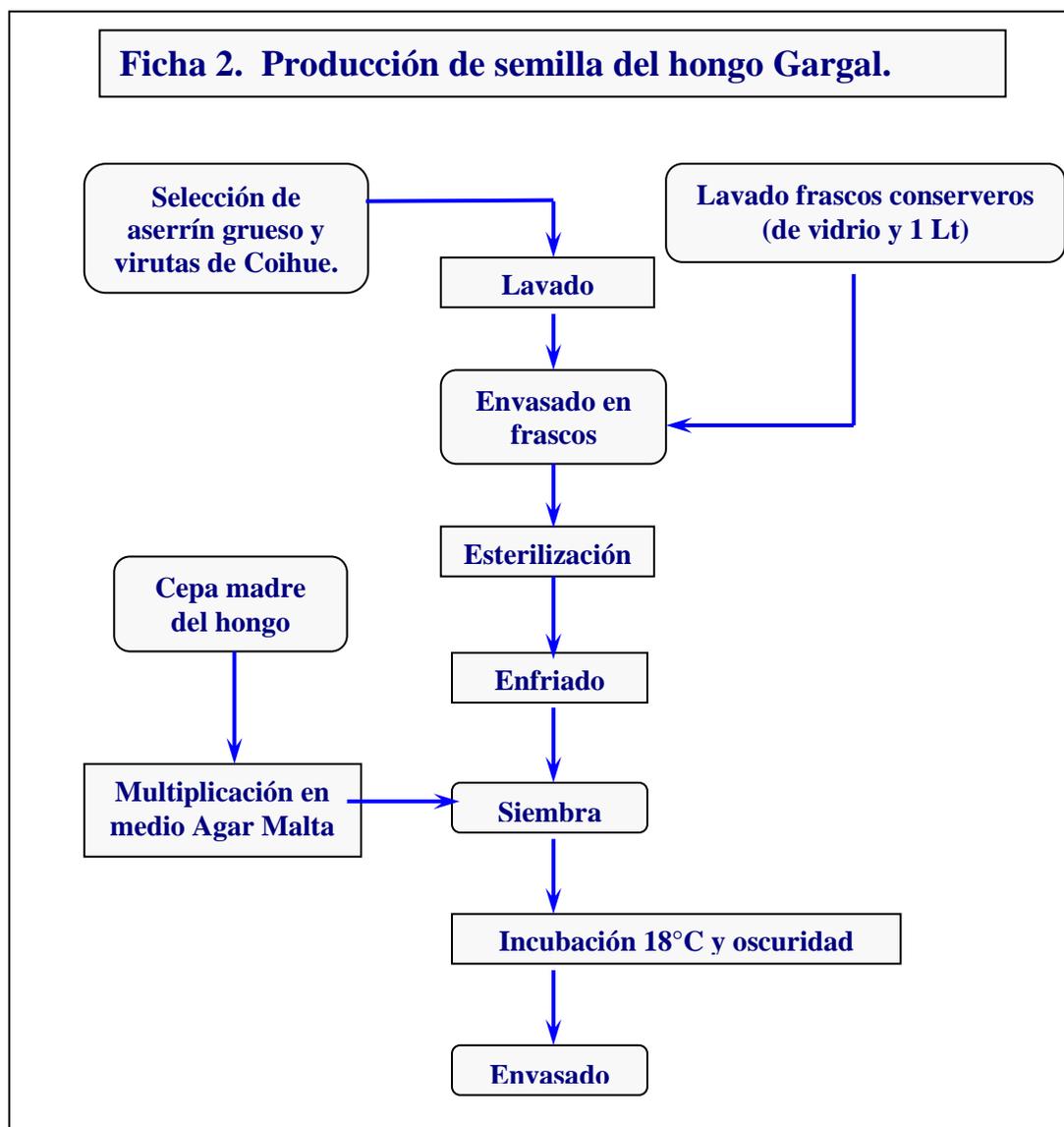
### 6.1. Criopreservación de micelio de Gargal.

La conservación en forma inalterable de las características silvestres de las cepas de Gargal colectadas, pasa necesariamente por la criopreservación del hongo, de lo contrario los cultivos sucesivos o la conservación a mayores temperaturas que el nitrógeno líquido (-196 °C en la fase líquida y -180 °C en la fase gaseosa), puede producir mutaciones o adaptaciones que cambian las características originales del aislamiento.



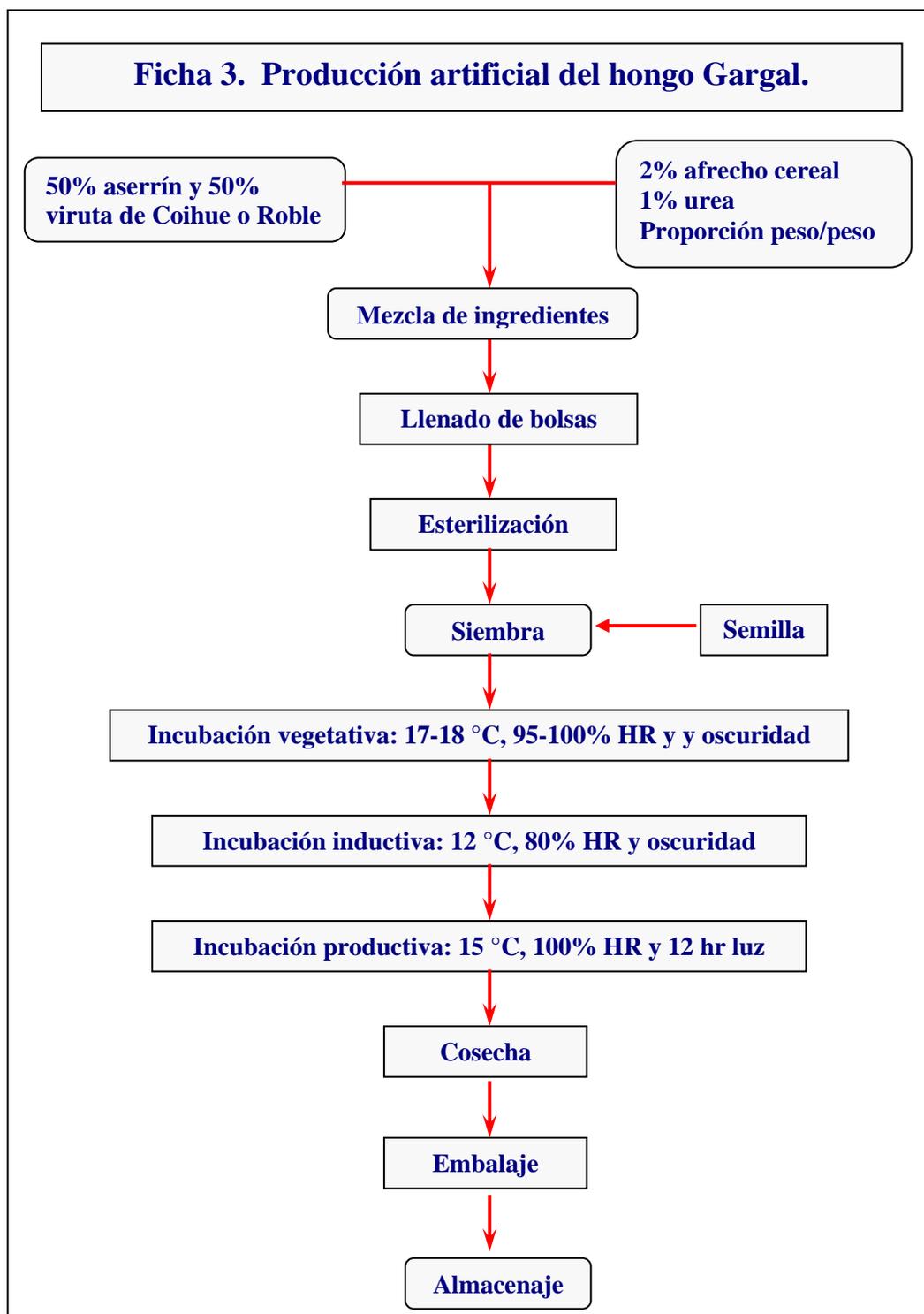
## 6.2. Producción de semilla de Gargal.

La producción de hongos, ya sea en forma de carpóforos o sus posibles metabolitos secundarios, pasa por disponer del inóculo para su cultivo; lo cual se conoce como semilla de hongos. En el caso del Gargal, la semilla se produce mejor en una mezcla de aserrín y viruta estéril, de preferencia la madera debe ser de Coihue, ya que las distintas cepas se adaptan bien a esta especie, mientras que otras especies son más selectivas con respecto a la cepa que permiten crecer.



### 6.3. Producción artificial de carpóforos de Gargal.

La producción artificial de Gargal es compleja, de alta inversión, bajos rendimientos y mayores cuidados que otros hongos cultivados. A pesar de esto, es posible lograr su cultivo de acuerdo al siguiente esquema desarrollado a través del proyecto.



## 7. PROBLEMAS ENFRENTADOS DURANTE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

Al inicio del proyecto el problema fue la dificultad de obtener cultivos puros de Gargal en medios artificiales a base de agar, la fuerte asociación con bacterias que tiene el hongo en condiciones naturales y la facilidad para que éstas se multipliquen a medida que madura el carpóforo, no permitió realizar cultivos cuando los cuerpos frutales se trasladaron desde sus lugares de colecta al laboratorio. Esto se pudo subsanar llevando parte del laboratorio a los lugares de colecta, cultivando *in situ* tan pronto eran colectados los hongos y no esperar varias horas o días para esta labor.

Otro problema fue el completo desconocimiento de los requerimientos de crecimiento vegetativo y reproductivo del Gargal. Un error de concepto fue asimilar esta especie con las otras conocidas y que actualmente se cultivan: *G. frondosa* y *G. umbellata*, las cuales tienen crecimientos óptimos a mayores temperaturas que el Gargal. Además, la especie *G. gargal* presentó un fenómeno poco común que es la reversión del crecimiento vegetativo cuando la temperatura se alzaba mas allá del óptimo, incluso por poco tiempo. Esto llevó a que los estudios de crecimiento se demorarán mas de lo esperado y que incluso se perdieran con facilidad los desarrollos alcanzados.

Por ser el Gargal un organismo adaptado a temperaturas bajas, sus crecimientos vegetativos y reproductivos no se pudieron acelerar a mayores temperaturas. Además, el hongo no soporta baja humedad relativa, siendo necesario mantener un ambiente de saturación permanente para lograr crecimientos de carpóforos. Esto significó una nueva dificultad, ya que al enfriar el ambiente de incubación los condensadores de los equipos de refrigeración disminuyen la humedad ambiente, afectando el crecimiento del hongo. En general, enfriar el ambiente es mas caro que calentarlo, a igual unidad de grados, por consiguiente el costo de tratar de producir este hongo puede llegar a ser prohibitivo en ambientes templados, como el lugar de trabajo en la región del BioBio. Posiblemente, si el cultivo se lleva a zonas australes, como Aysen o Magallanes, es factible de producir sin necesidad de estar enfriando el ambiente, sin embargo esto debe ser validado antes de recomendarlo.

Esta especie no mostró ninguna actividad antimicrobiana, lo cual explica por que se contaminaron con tanta facilidad los cultivos artificiales, en particular con hongos como *Trichoderma*, *Penicillium* y *Aspergillus*. Esto, unido a su lento crecimiento, no facilita las cosas para realizar cultivos artificiales y obliga a tener ambientes extremadamente limpios, lo que agrega un nuevo costo de producción.

La otra dificultad fue el bajo rendimiento biológico que presentó el cultivo artificial, si bien fue importante el que se haya logrado producir el carpóforo en forma artificial, el bajo rendimiento no permite que sea rentable este sistema de producción, al menos como producto de consumo directo. Por esta razón, el futuro del cultivo puede estar ligado a su uso como suplemento alimenticio, explotando sus cualidades de antioxidante o de beneficio para la salud.

Por último, la empresa que originalmente participaba, Full Mushroom Ltda., y que debía escalar la producción, quebró durante el 2006.

## 8. CALENDARIO DE EJECUCIÓN

### 8.1. Ejecución de actividades.

La comparación entre actividades programadas y ejecutadas se presenta en el Cuadro 21, de acuerdo a las actividades propuestas en el proyecto.

Cuadro 21. Comparación entre actividades programadas y ejecutadas.

N°	Actividad	Fecha		Observaciones
		programada	ejecutada	
1	Activación de cepas de Gargal de la colección	01/05	01/05	Sin observaciones.
2	Colecta de Gargal	07/06	07/06	Colecta en dos temporadas, la primera fue la mas exitosa.
3	Cultivo e identificación de cepas de Gargal	08/06	08/06	Sin observaciones.
4	Conservación y criopreservación de cepas	08/06	08/06	Sin observaciones.
5	Efecto de la temperatura en el crecimiento de cepas	10/06	12/06	Se lograron resultados solo con cepas primera temporada.
6	Adaptabilidad de las cepas a distintos substratos	09/06	10/06	Sin observaciones.
7	Producción de carpóforos experimentales	02/06	03/07	Lento crecimiento y bajos requerimientos temperatura.
8	Análisis proximal de carpóforos	02/07	02/07	Sin observaciones.
9	Diseño y fabricación de máquina llenadora de substrato	12/05	09/06	Problemas de diseño y flujo de fondos.
10	Adaptación y ambientación de módulo experimental de producción	10/06	10/06	Sin observaciones.
11	Adaptación de sistema de producción comercial de Gargal	10/07	-	No se realiza por bajo rendimiento biológico y alto costo de producción.
12	Caracterización física y química de los carpóforos	01/07	01/07	Sin observaciones.
13	Estudio de la duración de post cosecha del Gargal	08/07	-	No se realiza por falta de producción artificial.
14	Estudio de la conservación en atmósfera modificada	03/07	-	No se realiza por falta de producción artificial.
15	Estudio del sistema de deshidratado de hongos	05/07	-	No se realiza por falta de producción artificial.
16	Producción de extractos de Gargal	07/07	07/07	Sin observaciones.
17	Producción de aromas de Gargal	09/07	-	No se realiza por falta de producción artificial.

18	Producción de té de Gargal	10/07	-	No se realiza por falta de producción artificial.
19	Determinación del universo para entrevistas	04/07	-	No se realiza por falta de producción artificial.
20	Determinación de Supermercados objetivos	03/07	-	No se realiza por falta de producción artificial.
21	Diseño de encuesta a consumidores	03/07	-	No se realiza por falta de producción artificial.
22	Validación encuesta con informantes calificados	04/07	-	No se realiza por falta de producción artificial.
23	Selección y capacitación de encuestadores	04/07	-	No se realiza por falta de producción artificial.
24	Degustación y aplicación encuesta a consumidores	05/07	-	No se realiza por falta de producción artificial.
25	Procesamiento de la información	06/07	01/08	Se reemplaza por el análisis económico.
26	Informes técnicos y financieros	01/08	01/08	Sin observaciones.
27	Actividades de transferencia	11/07	11/07	Solamente actividades científicas.
28	Manuscrito final del Manual de Producción	11/07	-	No se realiza por considerarse antieconómica la producción artificial de carpóforos.

## 8.2. Resumen de costos.

El costo original del proyecto fue de \$126.161.438, de los cuales FIA aportaría \$70.400.768 (55,8%). Sin embargo, el no cumplimiento de todas las etapas originalmente proyectadas significó un menor uso de los fondos, los cuales deberán ser cuadrados con el término oficial del proyecto

## 9. DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Se desarrolló una tesis de post grado por el alumno Luis Fernando Labraña González titulada "Modelación de la Cinética de Respiración de Gargal (*Grifola gargal* Singer, Beih), Digueñe (*Cyttaria espinosae*) y Shiitake (*Lentinus edodes*). Universidad de Concepción (ver Anexo E).

También, la presentación de dos trabajos científicos titulados (ver Anexo F):

- MODELACIÓN DE LA CINÉTICA DE RESPIRACIÓN EN HONGOS COMESTIBLES, de los autores L. Labraña Gonzalez, J. A. Cañumir Veas, J. de Bruijn y N. Valderrama: en el 56° Congreso Agronómico de Chile, realizado en Chillán. 11 al 14 de octubre del 2005
- ESTUDIO PRELIMINAR DE EXTRACCIÓN DE SOLUTOS A PARTIR DEL HONGO *Grifola gargal* Singer, Beih., de los autores J. de Bruijn, C. Loyola, P. Aqueveque, J. A. Cañumir y A. France., en el Congreso Internacional de Ingeniería Agrícola de Chile (CIIACH), Termas de Chillán. 10 al 12 de mayo del 2006.

Se logró una publicación ISI titulada: "Influence of heat treatment on the antioxidant properties of *Grifola Gargal* hydro-alcoholic extracts", de los autores J. de Bruijn, C. Loyola, P. Aqueveque, J. A. Cañumir, M. Cortez y A. France. En la revista científica *Micología Aplicada Internacional*, volumen 20, número 1, año 2008, pp. 27-34 (ver Anexo G).

## 10. IMPACTOS DEL PROYECTO

El proyecto original esperaba impactar en la producción comercial del Gargal, sin embargo los problemas de adaptación, crecimiento, requerimientos térmicos, rendimiento biológico y alto costo de producción, no permitieron cumplir con estas expectativas. Si bien la producción de carpóforos de *Grifola gargal* en forma artificial no ha sido reportada con anterioridad, los cuerpos frutales que se lograron no estuvieron cerca de lo que se obtiene en forma silvestre, el tamaño y la forma fueron distintos a lo que normalmente se comercializa durante la temporada de producción natural.

Sin embargo, el proyecto permitió determinar que este hongo tiene otras propiedades que pueden ser explotadas, tales como la producción de anti oxidantes, alcanzando niveles importantes y que permiten respaldar su potencial como suplemento alimenticio o medicinal. De hecho las otras especies de *gargal* que se cultivan en el mundo, lo hacen mas por sus propiedades medicinales que por la parte culinaria. En el país se venden productos a base *G. frondosa* como suplemento alimenticio o para mejorar sistema inmunológico y ayudar en la reversión de algunos cánceres. Por consiguiente, es esperable que nuestra *G. gargal* tenga propiedades similares y tal vez mejores que las otras especies cultivadas.

Eventualmente, el cultivo de Gargal puede desarrollarse para fines distintos al culinario, lo cual justificaría la alta inversión que requiere su cultivo y desarrollo. De ser así, los resultados de este proyecto sirven como base para establecer cultivos comerciales, donde el fin no sea obtener carpóforos comerciales, sino que los principios activos que permiten que este hongo tenga propiedades medicinales.

## 11. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El proyecto permitió concluir lo siguiente:

- A través de la colecta de carpóforos de *G. gargal* realizada durante dos temporadas consecutivas y la incorporación de otras cepas colectadas previamente al proyecto, se logró un banco de cepas con información sobre las especies de árboles que utiliza el hongo para colonizar en forma silvestre, algunos antecedentes de distribución y características morfológicas de color, forma, tamaño y olor, y microscópicas como dimensiones y formas de basidiosporas y cistidios.
- Para iniciar cultivos de Gargal o incluir nuevas cepas, es importante realizar el primer cultivo en el lugar de cosecha de los cuerpos frutales, ya que a medida que pasa el tiempo después de la corta de carpóforos, éstos se deterioran con rapidez y la colonización de bacterias alcanza tal nivel que resulta imposible aislar el hongo en cultivo puro.
- La criopreservación es un buen método de conservación de la cepa en forma inalterable a través del tiempo, junto con ahorrar tiempo en trasposos para mantener el hongo vivo en los medios de cultivo.
- El hongo gargal tiene bajos requerimientos térmicos para su crecimiento vegetativo, siendo su óptimo en alrededor 18 °C, si la temperatura baja el crecimiento se vuelve mas lento, pero si sube el micelio se retrotrae o muere, paralizando el desarrollo de la colonia, incluso aunque se vuelva a la temperatura óptima.
- Las cepas de Gargal muestran adaptaciones en el crecimiento de acuerdo al sustrato en el cual se desarrollan, existiendo aislamiento mejor adaptados a crecer en determinadas especies de madera, siendo la especie Coihue la mas versátil para soportar crecimiento vegetativo.
- El Eucalipto permite el crecimiento de Gargal en su etapa vegetativa, incluso con tasas de crecimiento mayores a las especies nativas, sin embargo la mayoría de las cepas fallan en producir cuerpos frutales.
- El rendimiento biológico del cultivo de *Gragea* es bajo (10%), comparado con otros hongos comestibles. Además, los carpóforos obtenidos en producción artificial fueron pequeños, deformes y con estipes dominando por sobre los pileos.
- Los carpóforos de Gramal son ricos en fibra (32,5%), regulares en sólidos solubles (6,3%) y bajos en proteínas (0,2%).
- Su tasa de respiración es alta, lo cual ayuda al rápido deterioro del hongo una vez cosechado. Esta respiración alcanza su máximo a los 20 °C para luego decaer, indicando actividad enzimática dependiente de la temperatura para realizar este proceso.
- La producción artificial de Gargal tendría un costo estimado de \$6.774, lo cual está por sobre los \$3.000 a \$4.000 en que se comercializa en forma silvestre.
- La producción de extractos tendría un costo teórico de \$5.650 a \$9.219 por kilo, de acuerdo al origen de la materia prima. Lo cual es una alternativa interesante de producción, sobretodo que la forma y peso de los carpóforos deja de ser importante.

## **12. OTROS ASPECTOS DE INTERÉS**

A pesar que parte de los objetivos originales no se pudieron cumplir, si resultó interesante el poder demostrar que se puede producir Gargal en forma artificial y que éste puede tener otros usos mas interesantes, como son la extracción de antioxidantes y el poder utilizar estas propiedades como suplementos nutritivos o con fines medicinales, con lo cual la producción de Gargal como alimento pasa a ser secundaria, dado por el alto valor que tienen este tipo de productos en el comercio.

### 13. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

Arora, D. 1986. Mushroom demystified. Ten Speed Press, Berkeley, USA. 959 p.

Borchers, A. T., Stern, J. S., Hackman, R. M., Keen, C. L., y Gershwin, M. E.. 1999. Mushrooms, tumors, and immunity. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 221:4, 281-293.

Cheung, L. M., P. C. K. Cheung and V. C. E. Ooi. 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. Food Chemistry 81: 249-255.

Choi, Y., S. M. Lee, J. Chun, H. B. Lee and J. Lee. 2006. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. Food Chemistry 99: 381-387.

Claro, E. 1998. La influencia del mercado internacional de astillas en la destrucción de los bosques nativos chilenos. Pp. 310-317, in: A. Hoffman (ed.). La tragedia del bosque chileno. Ocho Libros Editores, Santiago. 395 p.

Fang, Y. Z., S. Yang and G. Wu. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition 18: 872-879.

Fujihara, S., A. Kasuga, Y. Aoyagi and T. Sugahara. 1995. Nitrogen-to-protein conversion factors for some common edible mushrooms. Journal of Food Science 60:1045-1047.

Huang, S. J. and J. L. Mau. 2006. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agaricus blazei* with various doses of  $\gamma$ -irradiation. LWT-Food Science and Technology 39: 707-716.

Kubo, K., Aoki, H. y Nanba, H. 1994. Anti-diabetic activity present in the fruit body of *Grifola frondosa* (Maitake). I. Biological and Pharmaceutical Bulletin 17:8, 1106-1110.

Kurtzman, R. H. 2005. Mushrooms: sources for modern western medicine. Micologia Aplicada International 17: 21-33.

Lazo, W. 2001. Hongos de Chile. Atlas micológico. Salesianos, Santiago, Chile. 231 p.

Lee, B., J. Bae, H. Pyo, T. Choe, S. Kim, H. Hwang and J. Yun. 2003. Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. Enzyme and Microbial Technology 32:574-581.

Lee, Y. L., G. W. Huang, Z. C. Liang and J. L. Mau. 2007. Antioxidant properties of three extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. LWT-Food Science and Technology 40: 823-833.

Mau, J., C. Chang, S. Huang and C. Chen. 2003. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia. Food Chemistry 75:1-8.

Mau, J., H. Lin, J. Ma and S. Song. 2001. Non volatile taste components of several speciality mushrooms. Food Chemistry 73:461-466.

- Matsui, K., N. Kodama and H. Nanba. 2001. Effects of Maitake (*Grifola frondosa*) D-fraction on the carcinoma angiogenesis. *Cancer Letters* 172:193-198.
- Mau, J. L., H. C. Lin and S. F. Song. 2002. Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Research International* 35: 519-526.
- Mizuno, M. 2000. Anti-tumor polysaccharides from mushrooms during storage. *BioFactors* 12:1-4, 275-281.
- Nanba, H., N. Kodama, D. Schar and D. Turner. 2000. Effects of maitake (*Grifola frondosa*) glucan in HIV-infected patients. *Mycoscience* 41:293-295.
- Nie, X., B. Shi, Y. Ding and W. Tao. 2006. Preparation of a chemically sulfated polysaccharide derived from *Grifola frondosa* and its potential biological activities. *International Journal of Biological Macromolecules* 39:228-233.
- Postemsky, P., R. González Matute, D. Figlas and N. Curvetto. 2006. Optimizing *Grifola sordulenta* and *Grifola gargal* growth in agar and liquid nutrient media. *Micologia Aplicada International* 18: 7-12.
- Royse, D. 1998. Specialty mushrooms: consumption, production and cultivation. *Revista Mexicana de Micología* 13:1-11.
- Serrano, P. 1998. La leña: un problema para el bosque. Pp. 250-255, in: A. Hoffman (ed.). *La tragedia del bosque chileno*. Ocho Libros Editores, Santiago. 395 p.
- Shen, Q. and D. Royse. 2001. Effects of nutrient supplements on biological efficiency, quality and crop cycle time of maitake (*Grifola frondosa*). *Applied Microbiology and Biotechnology* 57:74-78.
- Shen, Q. and D. Royse. 2002. Effects of genotypes of maitake (*Grifola frondosa*) on biological efficiency, quality and crop cycle time. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58:178-182.
- Stamets, P. 1993. *Growing gourmet and medicinal mushrooms*. Ten Speed Press, Berkeley, USA. 554 p.
- Uriartt, A. 1998. O cultivo do *lentinus edodes* (Shiitake) com jun-cao. In: EMBRAPA. *Curso cultivo de Cogumelo comestíveis e medicinais*. EMBRAPA, Brasil.
- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur and J. Telser. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39:44-84.
- Yamanaka, K. 1997. Production of cultivated edible mushrooms. *Food Reviews International* 13:327-333.
- Yang, J. H., H. C. Lin and J. L. Mau. 2002. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry* 77: 229-235.

Yen, M. T., Y. H. Tseng, R. C. Li and J. L. Mau. 2007. Antioxidant properties of fungal chitosan from shiitake stipes. *LWT-Food Science and Technology* 40: 255-261.

Zhuang, C., T. Mizuno and C. Zhuang. 1999. Biological responses from *Grifola frondosa* (Dick.: Fr.) S. F. Gray - Maitake (Aphyllophoromycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1:317-324.

## 14. ANEXOS

### ANEXO A

#### COLECTA Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DE GARGAL

Nº laboratorio: Qu-G1

Huésped: Coihue

Morfología: Bordes lisos, pileos individuales, estipe ligeramente gruesa de 3 a 5 cm de ancho, color blanco cremoso, carpóforo con pileos frondosos y sueltos.

Fotos:



Nº laboratorio: Qu-G6

Huésped: Coihue

Morfología: Bordes ondulado, pileos unidos entre sí, estipe no diferenciado de 5 a 13 cm de ancho, color blanco cremoso intenso, carpóforo con pileos frondosos dentados y compacto.

Fotos:



Nº laboratorio: Qu-G5

Huésped: Coihue

Morfología: Borde liso, pileos separados de 3 a 7 cm de ancho cada uno, sin diferenciación del estipe, color café claro, carpóforo con pileos frondosos, lisos y sueltos.

Fotos:



Nº laboratorio: Qu-G10

Huésped: Roble - Pellín

Morfología: Esclerosio de color blanco crema, compacto, de 2 a 4 cm de ancho.

Fotos:



Nº laboratorio: Qu-G 3

Huésped: Coihue

Morfología: Borde liso, pileos separados de 10 a 15 cm de ancho cada uno, estipe grueso, ligeramente corto, color blanco crema, carpóforo con pileos frondosos, lisos y sueltos.

Fotos:



Nº laboratorio: Qu-G15

Huésped: Roble

Morfología: Borde liso dentado, pileos separados de 5 a 7 cm de ancho cada uno, estipe diferenciado, corto, ligeramente delgado, color blanco, carpóforo con pileos frondosos, lisos y sueltos.

Fotos:



Nº laboratorio: Qu-G16

Huésped: Coihue

Morfología: Estipe de borde ondulados y dentado, pileos separados de 5 a 10 cm de ancho cada uno, con diferenciación del estipe, color café claro, carpóforo con pileos frondosos y sueltos.

Fotos:



Nº laboratorio: Qu-G9

Huésped: Coihue

Morfología: Borde liso, pilios separados de 3 a 7 cm de ancho cada uno, sin diferenciación del estipe, color café claro, carpóforo con pileos frondosos, lisos y sueltos.

Fotos:



Nº laboratorio:

Huésped: Qu-G4

Morfología: Borde liso, pileos separados de 5 a 15 cm de ancho cada uno, con diferenciación del estipe, color blanco, carpóforo con pileos frondosos, lisos y sueltos.

Fotos:



Nº laboratorio: Qu-G16

Huésped: Roble.

Morfología: Bordes lobulado, pileos compacto, estipe gruesa de 3 a 5 cm de ancho, color amarillo cremoso con tonos café claro, carpóforo con pileos compactos.

Fotos:



Nº laboratorio: Qu-17

Huésped: Roble.

Morfología: Borde liso, pileos separados de 3 a 4 cm de ancho cada uno, estipe claramente diferenciado, color blanco, carpóforo con pileos frondosos, lisos y sueltos.

Fotos:



Nº laboratorio: Qu-18

Huésped: Roble

Morfología: Borde liso, pileos separados de 3 a 7 cm de ancho cada uno, estipe diferenciado color blanco, carpóforo con pileos frondosos, lisos y sueltos.

Fotos:



Nº laboratorio: Qu-19

Huésped: Roble.

Morfología: Bordes dentados, pileos compacto, estipe gruesa de 3 a 5 cm de ancho, color amarillo cremoso con tonos café claro, carpóforo con pileos compactos.

Fotos:



Nº laboratorio: Qu-20

Huésped: Roble

Morfología: Bordes lobulado, pileos compacto, estipe gruesa de 3 a 5 cm de ancho, color amarillo cremoso con tonos café claro, carpóforo con pileos compactos.

Fotos:



## ANEXO B

<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DEL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS EN DISTINTOS SUSTRATOS.</b>
---

**One-way ANOVA: Coihue versus Cepas**

Analysis of Variance for Coihue

Source	DF	SS	MS	F	P
Cepa	9	1534,70	170,52	43,35	0,000
Error	20	78,67	3,93		
Total	29	1613,37			

Individual 95% CIs For Mean  
Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	-----+-----+-----+-----+-----			
Qu-G1	3	96,667	0,577		(--*--)		
Qu-G10	3	84,000	1,732		(--*--)		
Qu-G13	3	72,000	0,000	(--*--)			
Qu-G16	3	74,000	1,732	(-*--)			
Qu-G2	3	73,000	1,732	(--*--)			
Qu-G3	3	78,000	0,000	(-*--)			
Qu-G4	3	75,000	3,000	(--*--)			
Qu-G5	3	73,000	1,732	(--*--)			
Qu-G6	3	75,000	3,000	(--*--)			
Qu-G9	3	75,000	3,000	(--*--)			
Pooled StDev = 1,983				72,0	80,0	88,0	96,0

Fisher's pairwise comparisons

Family error rate = 0,556  
Individual error rate = 0,0500

Critical value = 2,086

Intervals for (column level mean) - (row level mean)

	Qu-G1	Qu-G10	Qu-G13	Qu-G16	Qu-G2	Qu-G3
Qu-G10	9,289 16,045					
Qu-G13	21,289 28,045	8,622 15,378				
Qu-G16	19,289 26,045	6,622 13,378	-5,378 1,378			
Qu-G2	20,289 27,045	7,622 14,378	-4,378 2,378	-2,378 4,378		
Qu-G3	15,289 22,045	2,622 9,378	-9,378 -2,622	-7,378 -0,622	-8,378 -1,622	
Qu-G4	18,289 25,045	5,622 12,378	-6,378 0,378	-4,378 2,378	-5,378 1,378	-0,378 6,378
Qu-G5	20,289 27,045	7,622 14,378	-4,378 2,378	-2,378 4,378	-3,378 3,378	1,622 8,378

Qu-G6	18,289 25,045	5,622 12,378	-6,378 0,378	-4,378 2,378	-5,378 1,378	-0,378 6,378
Qu-G9	18,289 25,045	5,622 12,378	-6,378 0,378	-4,378 2,378	-5,378 1,378	-0,378 6,378
	Qu-G4	Qu-G5	Qu-G6			
Qu-G5	-1,378 5,378					
Qu-G6	-3,378 3,378	-5,378 1,378				
Qu-G9	-3,378 3,378	-5,378 1,378	-3,378 3,378			

### One-way ANOVA: Eucaliptus versus Cepas

Analysis of Variance for Eucalipt

Source	DF	SS	MS	F	P
Cepa	9	220,13	24,46	7,81	0,000
Error	20	62,67	3,13		
Total	29	282,80			

Individual 95% CIs For Mean  
Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	
Qu-G1	3	32,000	0,000	(-----*-----)
Qu-G10	3	28,667	0,577	(-----*-----)
Qu-G13	3	28,000	0,000	(-----*-----)
Qu-G16	3	32,000	0,000	(-----*-----)
Qu-G2	3	28,000	0,000	(-----*-----)
Qu-G3	3	28,333	0,577	(-----*-----)
Qu-G4	3	34,667	2,517	(-----*-----)
Qu-G5	3	34,000	1,732	(-----*-----)
Qu-G6	3	31,000	3,606	(-----*-----)
Qu-G9	3	35,333	2,887	(-----*-----)

Pooled StDev = 1,770

28,0      31,5      35,0

Fisher's pairwise comparisons

Family error rate = 0,556  
Individual error rate = 0,0500

Critical value = 2,086

Intervals for (column level mean) - (row level mean)

	Qu-G1	Qu-G10	Qu-G13	Qu-G16	Qu-G2	Qu-G3
Qu-G10	0,318 6,348					
Qu-G13	0,985 7,015	-2,348 3,682				
Qu-G16	-3,015 3,015	-6,348 -0,318	-7,015 -0,985			

Qu-G2	0,985 7,015	-2,348 3,682	-3,015 3,015	0,985 7,015		
Qu-G3	0,652 6,682	-2,682 3,348	-3,348 2,682	0,652 6,682	-3,348 2,682	
Qu-G4	-5,682 0,348	-9,015 -2,985	-9,682 -3,652	-5,682 0,348	-9,682 -3,652	-9,348 -3,318
Qu-G5	-5,015 1,015	-8,348 -2,318	-9,015 -2,985	-5,015 1,015	-9,015 -2,985	-8,682 -2,652
Qu-G6	-2,015 4,015	-5,348 0,682	-6,015 0,015	-2,015 4,015	-6,015 0,015	-5,682 0,348
Qu-G9	-6,348 -0,318	-9,682 -3,652	-10,348 -4,318	-6,348 -0,318	-10,348 -4,318	-10,015 -3,985
	Qu-G4	Qu-G5	Qu-G6			
Qu-G5	-2,348 3,682					
Qu-G6	0,652 6,682	-0,015 6,015				
Qu-G9	-3,682 2,348	-4,348 1,682	-7,348 -1,318			

### One-way ANOVA: Raulí versus Cepas

Analysis of Variance for Raulí

Source	DF	SS	MS	F	P
Cepa	9	794,70	88,30	71,59	0,000
Error	20	24,67	1,23		
Total	29	819,37			

Individual 95% CIs For Mean  
Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev		
Qu-G1	3	37,333	1,155	(-*-)	
Qu-G10	3	37,333	1,155	(-*-)	
Qu-G13	3	36,000	0,000	(*-)	
Qu-G16	3	36,000	0,000	(*-)	
Qu-G2	3	36,000	0,000	(*-)	
Qu-G3	3	33,000	1,732	(-*-)	
Qu-G4	3	29,333	2,309	(-*-)	
Qu-G5	3	48,000	0,000		(-*)
Qu-G6	3	36,667	1,155	(-*-)	
Qu-G9	3	28,000	0,000	(-*-)	

Pooled StDev = 1,111

28,0      35,0      42,0      49,0

Fisher's pairwise comparisons

Family error rate = 0,556  
Individual error rate = 0,0500

Critical value = 2,086

Intervals for (column level mean) - (row level mean)

	Qu-G1	Qu-G10	Qu-G13	Qu-G16	Qu-G2	Qu-G3
Qu-G10	-1,892 1,892					
Qu-G13	-0,558 3,225	-0,558 3,225				
Qu-G16	-0,558 3,225	-0,558 3,225	-1,892 1,892			
Qu-G2	-0,558 3,225	-0,558 3,225	-1,892 1,892	-1,892 1,892		
Qu-G3	2,442 6,225	2,442 6,225	1,108 4,892	1,108 4,892	1,108 4,892	
Qu-G4	6,108 9,892	6,108 9,892	4,775 8,558	4,775 8,558	4,775 8,558	1,775 5,558
Qu-G5	-12,558 -8,775	-12,558 -8,775	-13,892 -10,108	-13,892 -10,108	-13,892 -10,108	-16,892 -13,108
Qu-G6	-1,225 2,558	-1,225 2,558	-2,558 1,225	-2,558 1,225	-2,558 1,225	-5,558 -1,775
Qu-G9	7,442 11,225	7,442 11,225	6,108 9,892	6,108 9,892	6,108 9,892	3,108 6,892
	Qu-G4	Qu-G5	Qu-G6			
Qu-G5	-20,558 -16,775					
Qu-G6	-9,225 -5,442	9,442 13,225				
Qu-G9	-0,558 3,225	18,108 21,892	6,775 10,558			

### One-way ANOVA: Roble versus Cepas

Analysis of Variance for Roble

Source	DF	SS	MS	F	P
Cepa	9	794,80	88,31	66,23	0,000
Error	20	26,67	1,33		
Total	29	821,47			

Individual 95% CIs For Mean  
Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	-----+-----+-----+-----	
Qu-G1	3	48,000	0,000		(-*-)
Qu-G10	3	40,000	0,000	(---)	
Qu-G13	3	36,000	0,000	(-*-)	
Qu-G16	3	41,333	1,155		(-*-)
Qu-G2	3	44,000	0,000		(-***)
Qu-G3	3	48,000	0,000		(-*-)
Qu-G4	3	46,000	3,464		(---)
Qu-G5	3	40,000	0,000	(---)	
Qu-G6	3	32,000	0,000	(-***)	

Qu-G9            3    36,000    0,000            (-\*-)  
 -----+-----+-----+-----  
 Pooled StDev =    1,155            36,0            42,0            48,0

Fisher's pairwise comparisons

Family error rate = 0,556  
 Individual error rate = 0,0500

Critical value = 2,086

Intervals for (column level mean) - (row level mean)

	Qu-G1	Qu-G10	Qu-G13	Qu-G16	Qu-G2	Qu-G3
Qu-G10	6,033 9,967					
Qu-G13	10,033 13,967	2,033 5,967				
Qu-G16	4,700 8,633	-3,300 0,633	-7,300 -3,367			
Qu-G2	2,033 5,967	-5,967 -2,033	-9,967 -6,033	-4,633 -0,700		
Qu-G3	-1,967 1,967	-9,967 -6,033	-13,967 -10,033	-8,633 -4,700	-5,967 -2,033	
Qu-G4	0,033 3,967	-7,967 -4,033	-11,967 -8,033	-6,633 -2,700	-3,967 -0,033	0,033 3,967
Qu-G5	6,033 9,967	-1,967 1,967	-5,967 -2,033	-0,633 3,300	2,033 5,967	6,033 9,967
Qu-G6	14,033 17,967	6,033 9,967	2,033 5,967	7,367 11,300	10,033 13,967	14,033 17,967
Qu-G9	10,033 13,967	2,033 5,967	-1,967 1,967	3,367 7,300	6,033 9,967	10,033 13,967
	Qu-G4	Qu-G5	Qu-G6			
Qu-G5	4,033 7,967					
Qu-G6	12,033 15,967	6,033 9,967				
Qu-G9	8,033 11,967	2,033 5,967	-5,967 -2,033			

## ANEXO C

<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DEL RENDIMIENTO BIOLÓGICO DE DISTINTAS CEPAS EN CUATRO SUSTRATOS DE MADERA.</b>
--

**One-way ANOVA: Rendimiento (%) en aserrín de Eucaliptus versus Cepa****Analysis of Variance for Rendimie**

Source	DF	SS	MS	F	P
Cepa	9	312,75	34,75	14,93	0,000
Error	20	46,55	2,33		
Total	29	359,30			

Individual 95% CIs For Mean

Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	-----+-----+-----+-----+-----+-----+			
Cepa 1	3	0,000	0,000	(----*----)			
Cepa 10	3	0,000	0,000	(----*----)			
Cepa 13	3	0,000	0,000	(----*----)			
Cepa 16	3	6,667	2,237		(----*----)		
Cepa 2	3	8,042	3,796		(----*----)		
Cepa 3	3	0,000	0,000	(----*----)			
Cepa 4	3	6,250	1,965		(----*----)		
Cepa 5	3	0,000	0,000	(----*----)			
Cepa 6	3	0,000	0,000	(----*----)			
Cepa 9	3	0,000	0,000	(----*----)			
Pooled StDev = 1,526				0,0	3,5	7,0	10,5

Tukey's pairwise comparisons

Family error rate = 0,0500  
 Individual error rate = 0,00204

Critical value = 5,01

**One-way ANOVA: Rendimiento (%) en aserrín de Ulmo versus Cepa****Analysis of Variance for Ulmo**

Source	DF	SS	MS	F	P
Cepa	9	420,71	46,75	28,79	0,000
Error	20	32,48	1,62		
Total	29	453,19			

Individual 95% CIs For Mean

Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	-----+-----+-----+-----+-----+-----+			
Cepa 1	3	6,000	1,718		(---*---)		
Cepa 10	3	0,000	0,000	(---*---)			
Cepa 13	3	10,958	1,465		(--*---)		
Cepa 16	3	11,042	1,665		(---*---)		
Cepa 2	3	0,000	0,000	(---*---)			
Cepa 3	3	7,958	2,376		(---*---)		
Cepa 4	3	4,458	0,938		(---*---)		
Cepa 5	3	3,458	0,382		(---*---)		
Cepa 6	3	2,667	0,711		(---*---)		
Cepa 9	3	4,333	1,092		(---*---)		
Pooled StDev = 1,274				0,0	4,0	8,0	12,0

Tukey's pairwise comparisons

Family error rate = 0,0500  
Individual error rate = 0,00204

Critical value = 5,01

### One-way ANOVA: Rendimiento (%) en aserrín de Coihue versus Cepa

#### Analysis of Variance for Coihue

Source	DF	SS	MS	F	P
Cepa	9	220,95	24,55	4,71	0,002
Error	20	104,35	5,22		
Total	29	325,30			

Individual 95% CIs For Mean  
Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev
Cepa 1	3	4,292	1,588
Cepa 10	3	0,000	0,000
Cepa 13	3	6,125	2,509
Cepa 16	3	7,500	1,392
Cepa 2	3	6,625	2,169
Cepa 3	3	3,958	1,913
Cepa 4	3	8,125	3,034
Cepa 5	3	4,625	0,217
Cepa 6	3	10,333	2,457
Cepa 9	3	7,667	4,216

Pooled StDev = 2,284

Tukey's pairwise comparisons

Family error rate = 0,0500  
Individual error rate = 0,00204

Critical value = 5,01

### One-way ANOVA: Rendimiento (%) en aserrín de Roble versus Cepa

#### Analysis of Variance for Roble

Source	DF	SS	MS	F	P
Cepa	9	139,8	15,5	1,39	0,259
Error	20	224,2	11,2		
Total	29	364,0			

Individual 95% CIs For Mean  
Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev
Cepa 1	3	9,000	1,231
Cepa 10	3	6,750	2,784
Cepa 13	3	4,042	1,502
Cepa 16	3	7,000	6,753
Cepa 2	3	6,292	2,353
Cepa 3	3	10,667	4,727
Cepa 4	3	6,292	1,821
Cepa 5	3	3,333	0,946
Cepa 6	3	6,500	4,547
Cepa 9	3	3,917	1,481

Pooled StDev = 3,348

Tukey's pairwise comparisons

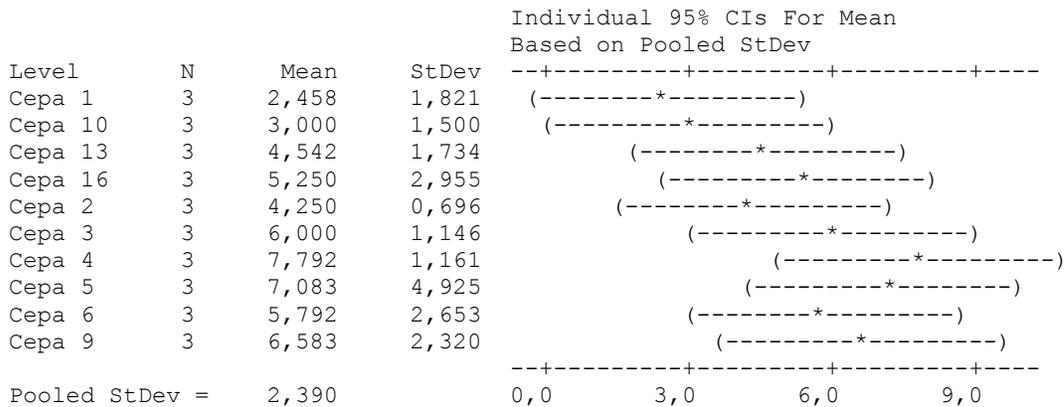
Family error rate = 0,0500  
 Individual error rate = 0,00204

Critical value = 5,01

### One-way ANOVA: Rendimiento (%) en aserrín de Raulí versus Cepa

#### Analysis of Variance for Raulí

Source	DF	SS	MS	F	P
Cepa	9	80,42	8,94	1,56	0,193
Error	20	114,25	5,71		
Total	29	194,67			



Tukey's pairwise comparisons

Family error rate = 0,0500  
 Individual error rate = 0,00204

Critical value = 5,01

## ANEXO D

## SECUENCIA FOTOGRÁFICA DEL PROYECTO



Lugares de colecta.



Gramal silvestre.



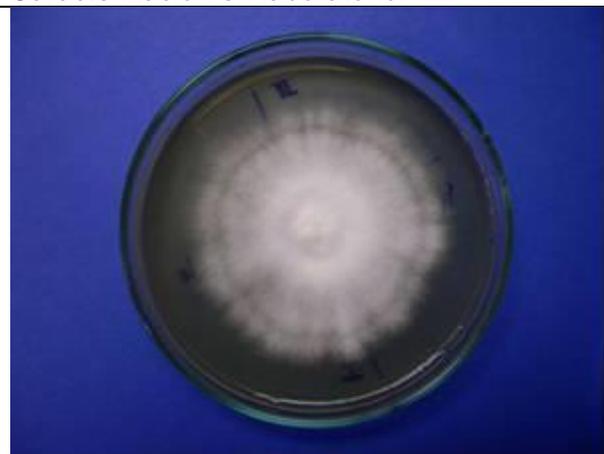
Toma de notas de campo.



Caracterización en laboratorio.



Proceso de aislamiento de cepas.



Desarrollo de colonia pura.



Comparación de crecimientos.



Preparación de semilla.



Emisión de botones de carpóforos.



Cultivo en módulo artificial.



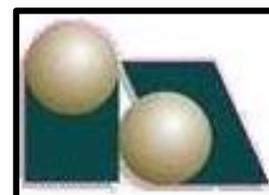
Producción de carpóforos



Detalle de carpóforos artificiales.

**ANEXO E****RESUMEN DE TESIS DE GRADO**

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN**  
FACULTAD DE INGENIERIA AGRICOLA  
PROGRAMA POSTGRADO



**MODELACIÓN DE LA CINÉTICA DE  
RESPIRACIÓN EN HONGOS COMESTIBLES.**

**TESIS DE MAGISTER**

*LUIS FERNANDO LABRAÑA GONZALEZ*  
Ingeniero en Alimentos  
Lic. en Ingeniería en Alimentos

**JUNIO 2006.**

---

## RESUMEN

---

El interés por consumir setas, es cada vez más creciente debido a las propiedades nutritivas y medicinales que ellos tienen. El conservar estas propiedades es un desafío para la investigación científica durante la poscosecha e las setas. La vida comercial de un producto está en directa relación con la tasa de respiración que posea.

Se realizó el estudio del comportamiento de la cinética de respiración de: Digüeño (*Cyttaria espinosae*), Shiitake (*Lentinus edodes*) y Gargal (*Grifola garga*) a diferentes temperaturas de almacenamiento. Las setas fueron recolectadas y almacenadas a 4°C por 12hrs. En la determinación de la tasa de respiración se utilizó el método de flujo de gas constante. Las muestras fueron colocadas dentro de la cámara de respiración en cantidades de  $100 \pm 0.1$ g y expuestas a temperaturas constantes de 10, 15, 20, 25 y 30°C. La toma de datos se realizó a cada minuto por un tiempo aproximado de una hora y media. La respiración presentó una curva de características que representa una reacción de tipo enzimático y también existe una relación directa de la tasa de respiración con la temperatura de almacenaje y la energía de activación para todos los hongos estudiados. La cinética de respiración sigue una tendencia de primer orden cuyo valor de K aumenta con la temperatura. Gargal presentó un aumento menor, lo que influye en una respuesta menos sensible a cambios de temperatura. Existe una relación directa de la tasa de respiración con la temperatura y la energía de activación. La ecuación de Arrhenius es la más indicada para describir la dependencia de la respiración con la temperatura ya que permitió obtener los parámetros cinéticos, energía de activación y la constante cinética K.

## ANEXO F

## RESUMENES DE PRESENTACIONES A CONGRESOS CIENTÍFICOS

**MODELACIÓN DE LA CINÉTICA DE RESPIRACIÓN EN HONGOS COMESTIBLES****L. Labraña Gonzalez<sup>1</sup>, J. A. Cañumir Veas<sup>1</sup>, J. de Bruijn<sup>1</sup> y N. Valderrama<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Universidad de Concepción, Fac. de Ingeniería Agrícola, Dpto. de Agroindustrias, Casilla 537, Chillán. E-mail [jcanumir@udec.cl](mailto:jcanumir@udec.cl)

Se han descrito alrededor de 80.000 especies de hongos, y probablemente solo representan el 10% del total. El conocer la cinética de respiración ha sido utilizada para estudiar la fisiología y comportamiento durante la post cosecha en muchos productos vegetales; una alta tasa de respiración se asocia con una corta vida útil. El objetivo de este estudio, fue desarrollar un modelo matemático que represente el comportamiento de la cinética de respiración en hongos comestibles. La metodología utilizada para la determinación de la cinética de respiración fue la denominada “flujo de gas constante”, midiéndose la concentración de CO<sub>2</sub> generado en cierto período de tiempo a cinco temperaturas (10, 15, 20, 25 y 30°C). Las materias primas fueron muestras de setas del género *Pleurotus*, *Lentinus* y *Grifola*. Los resultados muestran que la cinética de respiración es de orden cero, determinándose también los parámetros cinéticos, tales como la energía de activación (E<sub>a</sub>) y la constante cinética de respiración (k), y finalmente se desarrolló un modelo matemático para estos productos.

## **ESTUDIO PRELIMINAR DE EXTRACCIÓN DE SOLUTOS A PARTIR DEL HONGO *Grifola gargal Singer, Beih.***

**J. de Bruijn<sup>1</sup>, C. Loyola<sup>1</sup>, P. Aqueveque<sup>1</sup>, J. A. Cañumir<sup>1</sup> y A. France<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Universidad de Concepción, Fac. de Ingeniería Agrícola, Dpto. de Agroindustrias, Casilla 537, Chillán. E-mail [jdebruijn@udec.cl](mailto:jdebruijn@udec.cl)

<sup>2</sup> INIA Quilamapu, Casilla 426, Chillán, Chile.

Los hongos comestibles pueden ser una alternativa interesante como producto alimenticio, debido a su gran aporte en proteínas y fibras dietarias. Otro aspecto de gran relevancia es su uso en terapias contra enfermedades como el cáncer y el sida, debido al efecto activador del sistema inmunológico. El objetivo principal del presente trabajo fue estudiar la extracción de solutos a partir del hongo *Grifola gargal*. Como materia prima se utilizaron hongos de dos procedencias: Temuco y Osorno; además, se utilizaron agua y etanol como solventes. La extracción se realizó en un sistema agitado, discontinuo a temperatura ambiente. Se determinaron pH, sólidos solubles y sólidos totales del extracto en función del tiempo. La concentración de sólidos totales en el medio acuoso y en el medio de alcohol varía entre 0,2 y 0,4% con un rendimiento de extracción de sólidos entre 5 y 15%. El hongo procedente de Temuco presentó una mayor concentración de sólidos en el extracto y un mayor rendimiento de extracción en comparación con el hongo procedente de Osorno. Se recomienda utilizar una razón de hongo / solvente de 250 kg/m<sup>3</sup>. Los extractos estudiados no presentaron actividad inhibitoria contra bacterias y hongos, tampoco actividad herbicida. Se concluye finalmente que tanto el agua como el etanol presentan características favorables como solvente para ser aplicados en la extracción de solutos a partir del hongo *G. gargal*; no obstante, las condiciones del proceso requieren ser estudiadas con mayor profundidad para obtener un extracto con actividad biológica.

## ANEXO G

## RESUMEN DE PUBLICACIÓN CIENTÍFICA



*MICOLOGIA APLICADA INTERNATIONAL*, 20(1), 2008, pp. 27-34  
 © 2008, BERKELEY, CA, U.S.A.  
 www.micaplint.com

## INFLUENCE OF HEAT TREATMENT ON THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF *GRIFOLA GARGAL* HYDRO-ALCOHOLIC EXTRACTS

J. DE BRUIJN<sup>1</sup> \*, C. LOYOLA<sup>1</sup>, P. AQUEVEQUE<sup>1</sup>, J. CAÑUMIR<sup>1</sup>, M. CORTÉZ<sup>2</sup> AND A. FRANCE<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Food Engineering Group, Department of Agroindustry, University of Concepcion, Avenida Vicente Méndez 595, Chillan, Chile.

<sup>2</sup> Regional Research Centre INIA Quilamapu, National Institute of Agricultural Research, Avenida Vicente Méndez 515, Chillan, Chile.

Accepted for publication

### ABSTRACT

The effect of heat pretreatment of Gargal mushroom (*Grifola gargal*) on the extraction yield, the antioxidant activity and polyphenolic compounds of mushroom extracts was investigated. Raw Gargal mushroom was heated at 100 C and 121 C for 20 min and 45 min. Capacity was evaluated by four different assays, namely, 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging, reducing power and chelating ability. Heat pretreatment of Gargal mushroom increased the extraction yield (maximum 1.3-fold, heating at 121 C for 45 min), the polyphenol contents (maximum 1.3-fold, heating at 121 C for 20 min), and the flavonoid contents (maximum 1.4-fold, heating at 121 C for 20 min) of the mushroom extract compared to the raw sample. There was no effect of thermal processing of Gargal mushroom on the antioxidant activity, which may be due to the potent free-radical scavenging activity of 90.9-93.3 mg ascorbic acid/L in the 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) assay and 84.0-90.0% in the 1,1-

\* Contact information and mailing address: Dr. Johannes de Bruijn, Department of Agroindustry, University of Concepcion, P.O. Box 537, Chillan, Chile. Tel: +56-42-208891. Fax: +56-42-275303. E-mail: jdebruijn@udec.cl