

Memòria de resultats del projecte

Projecte pilot innovador per part de Grups Operatius de l'Associació Europea per a la Innovació (AEI) en matèria de productivitat i sostenibilitat agrícoles.

Projecte finançat a través de l'Operació 16.01.01 (cooperació per a la innovació) del PDR de Catalunya 2014-2020.



Fons Europeu Agrícola
de Desenvolupament Rural:
Europa inverteix en les zones rurals



Generalitat de Catalunya
**Departament d'Acció Climàtica,
Alimentació i Agenda Rural**

Diversificació del cultiu de bolets comestibles amb noves espècies autòctones.

RESUM

El projecte ha estat liderat per Bolet Ben Fet (TEB Verd SCCL). Formen part del grup operatiu: [Bolets de Soca](#) (Tresseras Multimèdia SL), la Societat Catalana de Micologia, el Gremi Fusta i Moble i l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA). L'IRTA ha actuat com a centre tecnològic o d'investigació, i al seu equip d'investigadors es van incorporar dos professors de la Universitat de Barcelona (UB).

A partir dels exemplars recol·lectats a camp, s'ha establert un banc de cultius de 120 soques pertanyents a 14 espècies fúngiques comestibles autòctones de Catalunya. S'ha dissenyat una barreja de gra de blat, sègol i melca, a parts iguals, amb un contingut d'aigua ajustat al 50-60% i esterilitzada a l'autoclau, que s'ha provat amb èxit per a la producció d'inòcul (llavor) amb 87 soques diferents d'11 de les espècies fúngiques. Els assajos a petita escala es varen dur a terme emprant un substrat a base de serradures de frondoses ajustat a un 60-65% d'humitat. Per a totes les espècies una temperatura d'incubació de 20-25 °C resultava adient.

El desenvolupament del projecte ha permès posar a punt els mètodes i protocols per al cultiu de vuit espècies fúngiques comestibles. Els protocols de cultiu es poden considerar posats a punt per a: *Agrocybe aegerita*, *Fistulina hepatica*, *Lyophyllum decastes*, *Meripilus giganteus*, *Pleurotus eryngii* i *Polyporus squamosus*. També per a altres espècies ja cultivades, com: *Ganoderma lucidum* i *Grifola frondosa*, però, en tots els casos, emprant soques autòctones.

Objectius del projecte.

Des de fa molt de temps, els bolets han format part de l'alimentació humana i han estat apreciats pel seu gust i aroma, les seves propietats medicinals, i el seu valor econòmic i ecològic. S'estima que hi ha unes 12000 espècies de fongs que es poden considerar bolets, i que a el menys unes 2000 d'aquestes espècies son comestibles.

S'han cultivat de l'ordre de 35 espècies de bolets, i d'elles unes 20 a escala comercial o industrial. Les espècies més conreades a tot el món són: *Agaricus bisporus* (Xampinyó), *Auricularia aurícula* (Orella de judes), *Flamulina velutipes* (Enoki), *Grifola frondosa* (Gírgola de castanyer o Maitake), *Hericium erinaceus* (Bolet carner), *Lentinula edodes* (Xiitake), *Pleurotus* sp. (gírgoles) i *Volvariella volvacea* (Bolet de la palla) (Sánchez 2010; Srikrum & Supapvanich 2016; Carrasco-González et al., 2017; He et al., 2017). La majoria d'aquestes espècies provenen de la tradició asiàtica, pionera en aquest tipus de cultiu.

Els beneficis d'arribar a un cultiu controlat d'aquests bolets son múltiples en comparació a la seva recol·lecció directa al bosc. En primer lloc, el cultiu garanteix l'aprovisionament regular de bolets en qualsevol moment, independentment de l'estació de l'any o les condicions meteorològiques. En segon lloc, la producció de bolets cultivats redueix la pressió sobre les poblacions naturals d'aquests fongs, ajudant a la conservació de la biodiversitat dels ecosistemes naturals, on aquestes especies fúngiques juguen un paper primordial com a descomponedors de matèria orgànica difícil de degradar. I en tercer lloc, el bolet cultivat permet una millor traçabilitat i bioseguretat del producte comercialitzat (per exemple, absència de metalls pesants o altres contaminants).

Catalunya és un país amb una gran diversitat micològica i una arrelada tradició en el món dels bolets. L'objectiu principal d'aquest projecte ha estat incorporar al cultiu de bolets comestibles noves espècies de fongs, majoritàriament lignícoles i autòctons de Catalunya, per a diversificar la producció i millorar la oferta comercial dels nostres productors.

El desenvolupament del projecte es va planificar i executar en diferents fases i tasques, que s'han anat abordant al llarg de dos anys i d'acord amb el cronograma proposat en el projecte:

- **Prospeccions de camp en diferents ecosistemes i recol·lecció d'exemplars de diferents espècies de bolets lignícoles**
- **Aïllament en cultiu pur i manteniment d'una col·lecció de cultius de les espècies fúngiques recol·lectades**
- **Posta a punt de mètodes de producció de llavor (inòcul fúngic)**
- **Determinació de les condicions òptimes de cultiu per a cada fong**
- **Proves pilot de producció en condicions industrials**
- **Avaluació de les característiques nutricionals i organolèptiques dels bolets cultivats. Valorització dels nous productes.**
- **Transferència i accions divulgatives dels resultats per a millorar la productivitat i competitivitat del sector.**

Prospeccions de camp en diferents ecosistemes i recol·lecció d'exemplars de diferents espècies de bolets lignícoles.

S'han realitzat quatre campanyes de recol·lecció en camp, a tardor i primavera dels dos darrers anys, en les que han intervingut directament membres i col·laboradors de la Societat Catalana de Micologia, Bolets de Soca i Bolet Ben Fet. Al llarg del projecte s'han fet arribar, als laboratoris de l'IRTA, **43** enviaments amb exemplars recollits a camp de fins a **13** espècies fúngiques del llistat inicial de candidates.

Les espècies recollides es detallen a la taula 1, i representen aproximadament el 50% de les espècies inicialment candidates en la proposta de projecte.

Taula 1. Llistat de les espècies fúngiques recollides a camp durant el projecte.

Nom científic	Nom comú
<i>Agrocybe aegerita</i> (1)	Pollancró
<i>Albatrellus pes-caprae</i>	Sabatera
<i>Auricularia sp.</i>	
<i>Calocybe gambosa</i>	Moixernó
<i>Fistulina hepatica</i>	Fetge de vaca
<i>Grifola frondosa</i>	Gírgola de castanyer
<i>Laetiporus sulphureus</i>	Gírgola de garrofer
<i>Lyophyllum decastes</i>	Gírgola de bruc
<i>Meripilus giganteus</i>	Sabatera de faig
<i>Pleurotus eryngii</i>	Gírgola de panical
<i>Polyporus squamosus</i> (2)	Bolet de noguer
<i>Sparassis crispa</i>	Greixa, Peu de rata reina
<i>Volvariella sp.</i>	

(1) La nomenclatura més actual és ***Cyclocybe aegerita***, en la memòria utilitzem *Agrocybe aegerita* per mantenir la congruència amb anteriors documents del projecte.

(2) La nomenclatura més actual és ***Cerioporus squamosus***, en la memòria utilitzem *Polyporus squamosus* per mantenir la congruència amb anteriors documents del projecte.

A més d'aquestes espècies, també s'han recol·lectat alguns exemplars de *Ganoderma lucidum* (Pipa) *G. resinaceum* i *Infundibulicybe geotropa* (Candela de bruc), no incloses en la llista inicial d'espècies lignícoles candidates, però que, per les seves característiques, s'han considerat interessants des d'altres punts de vista o per a altres aplicacions (propietats medicinals per exemple). També es varen recol·lectar (i aïllar) d'altres espècies finalment rebutjades per manca d'interès dins dels objectius del projecte, com: *Pleurotus dryinus* (Alzinoia) o *Lentinellus ursinus*.

Aïllament en cultiu pur i manteniment d'una col·lecció de cultius de les espècies fúngiques recol·lectades.

A partir dels exemplars recollits a camp es va procedir a l'aïllament en cultiu pur en medis de laboratori, utilitzant principalment agar extracte de malta (MEA) al 3% suplementat amb antibiòtics.

Composició del medi de cultiu

MEA:

30 g d'extracte de malta
15 g d'agar
1 litre d' H₂O (destil·lada)

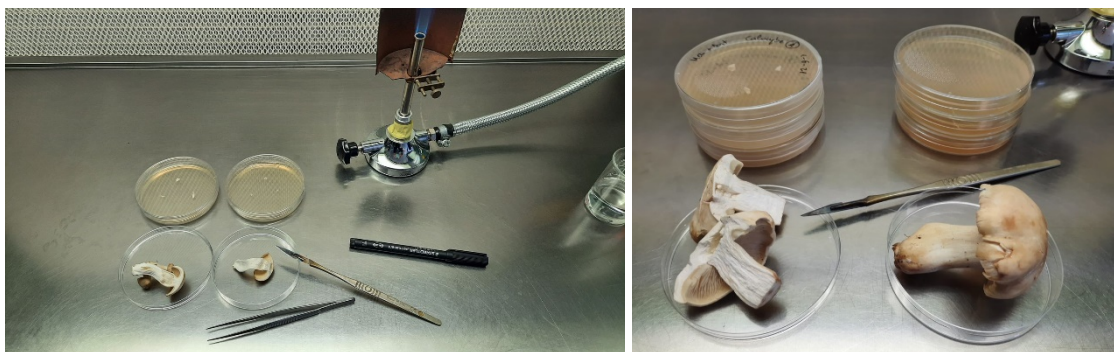
Esterilització a l'autoclau: 20 minuts a 120°C

MEA + antibiòtics:

A l'anterior medi, i en condicions estèrils (per filtració a 0,22µm) s'afegeix :
50 mg de sulfat d'estreptomicina
50 mg de cloramfenicol
50 mg de clortetraciclina

Els aïllaments es feien a partir dels teixits interns dels esporocarpis recol·lectats en camp de les diferents espècies fúngiques, sembrant-los en plaques Petri amb medi de cultiu (fig. 1), i s'incubaven a 23°C durant el temps necessari (de 7 a 28 dies segons l'espècie fúngica). Les colònies obtingudes en ressemblaven en MEA fins a garantir l'absència de contaminants.

Figura 1. Fragments de la part interna d'un esporocarp fúngic sembrats, en condicions asèptiques, en plaques Petri amb medi de cultiu agar extracte de malta suplementat amb antibiòtics.



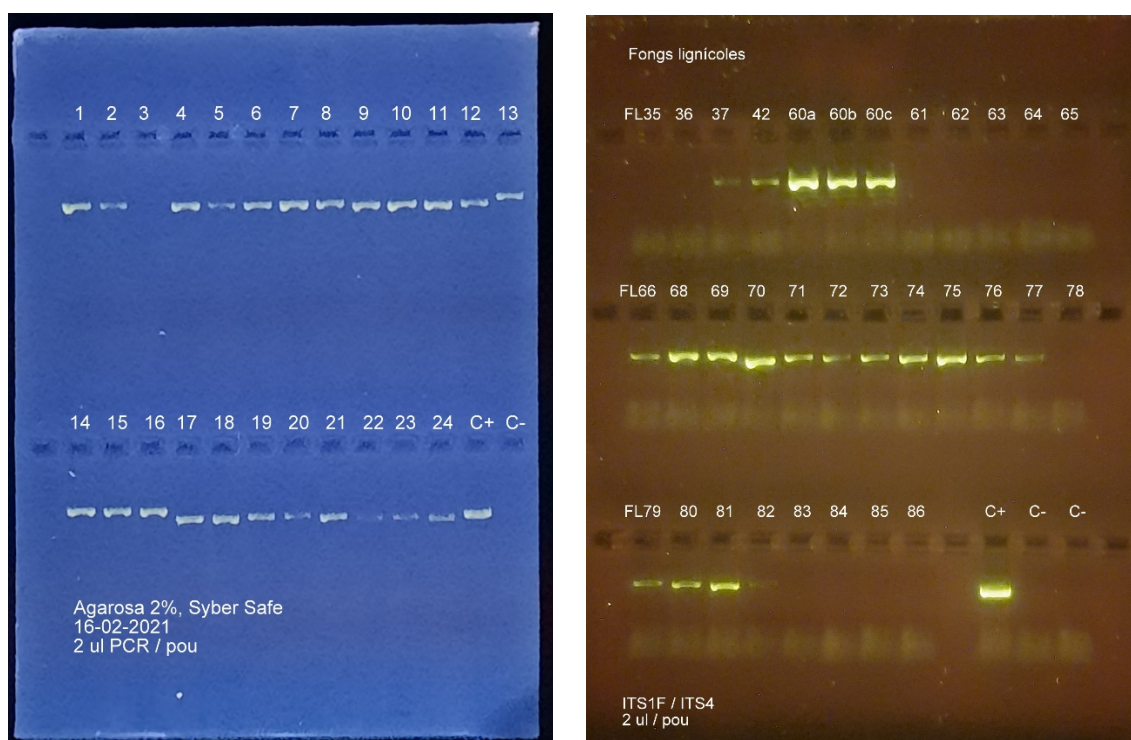
Dels micelis obtinguts en aquests aïllaments es feia una extracció d'ADN (emprant *DNeasy Plant Mini Kit* de QIAGEN) i s'amplificava per PCR utilitzant els encebadors ITS1F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) i ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Gardes i Bruns 1993; White et al. 1990). La PCR es va realitzar amb *DNA AmpliTools Master Mix* (2x) (BIOTOOLS B&M Labs, S.A.) en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®).

Els paràmetres de la reacció foren: una desnaturalització inicial a 95°C durant 3 min, seguida de 35 cicles de desnaturalització a 95°C durant 20 segons, anellament a 55°C durant 30 segons i elongació a 72°C durant 40 segons. Finalment es sotmetia a una elongació a 72°C durant 5 min, i refredament a 4°C.

La detecció dels productes de PCR obtinguts es va fer per electroforesi en gel d'agarosa (2%) amb Syber-Safe (1 µl/ml). Es va aplicar un voltatge de 90V durant 25-30 min, i un cop finalitzada la migració els gels s'examinaven en un transil·luminador de llum ultraviolada (DigiDoc-It™ Darkroom) per visualitzar els resultats (fig 2).

Els *amplicons* obtinguts es van purificar amb el QIAquick® PCR Purification Kit de QIAGEN, i es van seqüenciar al Servei Científic Tècnic de la Universitat de Barcelona. Les seqüències obtingudes es comparaven amb les dipositades a la base de dades UNITE (<https://unite.ut.ee/>) per a corroborar l'espècie fúngica a la que pertanyia el miceli obtingut i descartar contaminants no desitjats.

Figura 2. Gels d'agarosa dels productes de PCR obtinguts a partir del DNA extret de les colònies aïllades en cultiu pur dels exemplars recollits a camp.



En els dos anys de projecte s'han obtingut més d'un centenar de soques fúngiques (taula 2) pertanyents a 11 espècies comestibles d'entre les candidates proposades a l'inici del projecte, i a 3 espècies més no incloses en aquella llista inicial. El número de soques per espècie es desigual, i depèn de la facilitat amb la que s'han trobat exemplars de camp i la facilitat d'obtenir el seu creixement en cultiu pur amb els medis de laboratori emprats. Així, d'algunes espècies com *Agrocybe aegerita* o *Lyophyllum decastes* disposem d'un bon nombre d'aïllaments, mentre que en d'altres, com *Polyporus squamosus* o *Meripilus giganteus* és més reduït (taula 2).

Malgrat els diversos intents realitzats, no es varen aconseguir aïllaments en cultiu pur d'*Albatrellus pes-caprae* ni d'*Auricularia* sp.

Adicionalment a les soques obtingudes a partir d'exemplars de camp també s'han fet aïllaments a partir de bolets cultivats en els assajos realitzats al llarg del projecte (taula 3). La investigació i l'experiència científica en el camp de la micologia han demostrat que és aconsellable regenerar el miceli periòdicament per evitar que les soques es degenerin. La degeneració de la soca és probablement el pitjor problema del productor. A causa de la replicació constant de la mateixa soca comencen a acumular-se petits defectes a l'ADN (mutacions, modificacions epigenètiques...). Durant un període de temps més llarg es pot produir una degeneració sobtada i causar problemes com: deformacions, manca de fructificació, manca de creixement, etc. Aquesta és la raó per la qual el mètode de subcultiu no es pot utilitzar indefinidament. Les soques degeneren i perden propietats i viabilitat amb el temps.

Per tal d'evitar-ho, s'ha seleccionat una petita part del bolets produïts de cada una de les espècies fúngiques que han estat cultivades amb èxit, i s'ha procedit al seu re-aïllament en cultiu pur a partir dels teixit interns d'aquests esporocarps. L'aïllament es va realitzar en condicions axèniques i emprant medis de cultiu adients (MEA 3% suplementat amb antibiòtics per evitar contaminacions bacterianes). Aquests nous aïllaments es poden convertir en la nova soca parental de la qual derivaran els nous cultius mare i inòculs.

Les soques obtingudes en cultiu pur es mantenen en la col·lecció d'aïllaments de l'IRTA per ressebra periòdica (cada tres mesos) en plaques de medi de cultiu fresc. Un cop crescudes a 23°C es conserven a 4°C fins a la següent ressebra. Aquest banc de soques fúngiques, obtingut i mantingut a l'IRTA, és el que s'ha utilitzat per a la producció d'inòculs i la realització de totes les proves del projecte.

Taula 2. Soques de fongs lignícoles disponibles en la col·lecció de cultius.

Espècie fúngica	Nº total d'aïllaments disponibles	Nº d'aïllaments confirmats (seqüenciació ITS)
<i>Agrocybe aegerita</i>	14	14
<i>Calocybe gambosa</i>	10	
<i>Fistulina hepatica</i>	15	13
<i>Ganoderma lucidum</i>	9	7
<i>Ganoderma resinaceum</i>	1	1
<i>Grifola frondosa</i>	7	7
<i>Infundibulicybe geotropa</i>	3	3
<i>Laetiporus sulphureus</i>	16	13
<i>Lyophyllum decastes</i>	20	10
<i>Meripilus giganteus</i>	6	4
<i>Pleurotus eryngii</i>	9	9
<i>Polyporus squamosus</i>	2	2
<i>Sparassis crispa</i>	7	7
<i>Volvariella caesiotincta</i>	1	1
Total	120	

Taula 3. Soques de fongs lignícoles obtingudes per re-aïllament a partir de bolets cultivats. També disponibles en la col·lecció de cultius.

Espècie fúngica	Nº total d'aïllaments obtinguts de bolets cultivats
<i>Agrocybe aegerita</i>	6
<i>Fistulina hepatica</i>	3
<i>Grifola frondosa</i>	3
<i>Lyophyllum decastes</i>	3
<i>Meripilus giganteus</i>	5
<i>Polyporus squamosus</i>	5
Total	25

Posta a punt de mètodes de producció de llavor (inòcul fúngic)

Per al cultiu dels bolets es parteix d'un inòcul inicial que consisteix en miceli del fong crescut en una matriu que li proporciona els nutrients necessaris. Generalment s'utilitza gra de cereals per a construir aquesta matriu, ja que aporten els nutrients pel creixement del miceli i son adients des del punt de vista econòmic i de manipulació.

Es va realitzar un assaig previ per a determinar la capacitat de creixement de diferents aïllats de fongs lignícoles en diferents tipus de cereals. Es va dissenyar un experiment factorial en el que es va comparar el creixement del miceli, mesurant l'avanç en longitud de les hifes del fong en un tub d'assaig omplert amb gra de cada un dels cereals, per separat, prèviament rehidratats i esterilitzats (120°C, 20 min). Es van comparar quatre espècies fúngiques: *Agrocybe aegerita*, *Fistulina hepatica*, *Laetiporus sulphureus* i *Polyporus squamosus*, i cinc tipus diferents de cereals.

Els resultats d'aquests assajos preliminars van permetre dissenyar una barreja de gra de blat, sègol i melca, a parts iguals (1:1:1 en volum) amb un contingut d'aigua ajustat al 50-60% i esterilitzada a l'autoclau (120°C, 60-90 min, en funció del volum total), i sense necessitat de pretractament d'ebullició. Aquesta matriu resultava idònia al permetre el creixement de pràcticament totes les soques testades, i oferir la facilitat de manipulació necessària per a utilitzar-la en la inoculació (o sembra) del substrats de cultiu.

La temperatura òptima d'incubació es va establir en 23°C (amb un interval de ± 2 °C). El mètode de producció de llavor desenvolupat s'ha provat amb èxit amb 87 soques diferents d'11 espècies fúngiques (fig. 3, taula 4). S'ha testat la viabilitat de la llavor produïda iniciant amb ella assajos de cultiu de bolets a petita escala. El creixement visible de miceli en el substrat de cultiu, i l'absència de contaminants, verificava la viabilitat i qualitat de la llavor.

Amb aquelles espècies que presentaven un lent creixement en la matriu de llavors, es va assajar un segon mètode de producció d'inòcul. Es va emprà un substrat compost per torba i vermiculita suplementat amb medi nutritiu. La composició exacte del substrat era: 1100 ml de vermiculita (> 2mm Ø), 100 ml torba (*Sphagnum*, Floratorf) (< 2mm Ø),

i 600 ml de medi líquid Melin Norkrans modificat (MMN), pH 5,5. El substrat, barrejat i repartit en ampolles de 2L, s'atoclavava a 120°C 60 min.

Composició del medi MMN

Glucosa	10	g/l
Extracte de Malta	3	g/l
KH_2PO_4	0,5	g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,15	g/l
Fetrilon (13% Fe)	0,02	g/l
CaCl_2	0,05	g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,25	g/l
NaCl	0,025	g/l
Thiamina HCl	0,1	mg/l
Agar	15	g/l

Les espècies fúngiques provades en aquests substrat foren: *Infundibulicybe geotropa* i *Lyophyllum decastes*, tres soques de cada una d'elles. Coincidien també amb les espècies de caràcter menys lignícola d'entre les espècies amb les que s'ha treballat. Ambdues espècies creixien en el substrat de torba i vermiculita, encara que a un ritme no significativament superior a l'obtingut en la matriu de llavors. Calien també incubacions perllongades, de 4-5 mesos, per a obtenir un bon desenvolupament. Es va concloure, doncs, que aquest mètode de producció d'inòcul no comportava cap millora respecta a l'anterior en el que utilitzàvem una matriu de llavors.

Figura 3. Ampolles i bosses de llavor (inòcul fúngic) creixent a la incubadora a 23°C, a diferents temps i estadis de desenvolupament.



Determinació de les condicions òptimes de cultiu de cada fong

Amb totes les soques amb les que es va aconseguir una producció de llavor viable (taula 4) s'han establert assajos a petita escala, entre 6 i 8 unitats de cultiu, per determinar les possibilitats de conrear aquests fongs en condicions estàndard (fig. 4).

Taula 4. Espècies fúngiques, i nombre de soques de cada espècie, amb les que s'ha aconseguit produir inòcul (llavor) viable amb el mètode desenvolupat.

ESPÈCIE FÚNGICA	Nº de SOQUES
<i>Agrocybe aegerita</i>	14
<i>Fistulina hepatica</i>	15
<i>Ganoderma lucidum</i>	4
<i>Ganoderma resinaceum</i>	1
<i>Grifola frondosa</i>	10
<i>Laetiporus sulphureus</i>	10
<i>Lyophyllum decastes</i>	9
<i>Meripilus giganteus</i>	4
<i>Pleurotus eryngii</i>	9
<i>Polyporus squamosus</i>	2
<i>Sparassis crispa</i>	9

Els assajos inicials a petita escala es varen dur a terme emprant un substrat a base de serradures de frondoses (en particular castanyer) suplementats amb cereals. El substrat, la formulació estàndard emprada més freqüentment per l'empresa Bolet Ben Fet, va ser proporcionat per la mateixa en tots els assajos.

Composició del substrat de cultiu estàndard

<u>Residus de fusta</u>	<u>%</u>
floc de castanyer gran	25
floc de castanyer petit	25
serradures de castanyer	20
serradures d'alzina / roure	15
serradures de faig	15

A la barreja de fustes s'incorpora:

Cereals	23
Guix	1

S'afegeix H₂O fins a una humitat del: 63

Les proporcions entre floc i serradures de castanyer poden variar entre espècies fúngiques segons les seves característiques d'adaptació a la densitat del substrat, mantenint en general el 70% de residus de castanyer.

Els cereals afegits es componen de: segó de blat, farina d'ordi i farina de blat de moro en proporció 1:1:1 (en pes fresc).

Per al cultiu es van utilitzar bosses de Polipropilè (resistents a altes temperatures), amb finestres de ventilació proveïdes de filtres que permeten l'intercanvi de gasos, però que impedeixen la pèrdua d'humitat o la contaminació externa (Sac O2®). Totes les bosses de cultiu s'omplien amb una quantitat final de 4 litres de substrat, o barreges de substrats i es desinfectaven a l'autoclau a 100°C durant 2 hores.

Els substrats de cultiu s'inoculaven amb llavor produïda segons el mètode establert (veure apartat anterior) i aplicant una dosi d'inoculació de 1/12 (v:v). Molt elevada en comparació a l'emprada industrialment, però que garantia el desenvolupament dels assajos.

S'han provat diferents condicions, especialment temperatura i durada de la incubació, en càmeres de cultiu a l'IRTA (Centre de Cabriels) (figura 4), amb temperatura i il·luminació controlades. El desenvolupament del miceli de les diferents espècies i soques en aquets assajos s'ha valorat visualment.

Figura 4. Bosses de cultiu en les càmeres d'incubació amb temperatura i il·luminació controlades. Els cultius es mantenien en incubació diferents temps en funció de la velocitat de creixement de cada espècie.



S'han fet assajos de creixement en substrat de cultiu estàndard amb diferents soques de 9 espècies fúngiques (taula 4). Amb la majoria d'elles s'han aconseguit bons creixements de miceli, especialment amb espècies com *Agrocybe aegerita*, *Fistulina hepatica*, *Grifola frondosa*, *Laetiporus sulphureus*, *Meripilus giganteus*, *Pleurotus eryngii* o *Polyporus squamosus*.

Altres espècies, com *Sparassis crispa*, presenten menor desenvolupament micelial en el substrat assajat. Amb *Lyophyllum decastes*, malgrat presentar en bon creixement en la matriu de llavors, i aconseguir un inòcul ben desenvolupat, no va arribar a créixer en el substrat estàndard de cultiu.

Un cop assolit el creixement del miceli en tot el volum del substrat de la bossa, les unitats de cultiu es traslladaven a les instal·lacions de Bolet ben Fet i Bolets de Soca per a prosseguir el procés en les càmeres de floració (Fig. 5).

Taula 4. Espècies fúngiques, i número de soques de cada espècie, amb les que s'han fet assajos de creixement en substrat de cultiu a petita escala a les instal·lacions de l'IRTA.

ESPÈCIE FÚNGICA	Nº de SOQUES provades
<i>Agrocybe aegerita</i>	14
<i>Fistulina hepatica</i>	11
<i>Grifola frondosa</i>	6
<i>Laetiporus sulphureus</i>	6
<i>Lyophyllum decastes</i>	3
<i>Meripilus giganteus</i>	4
<i>Pleurotus eryngii</i>	7
<i>Polyporus squamosus</i>	2
<i>Sparassis crispa</i>	4

Figura 5. Càmeres de floració a l'empresa Teb Verd / Bolet ben Fet. El canvi de condicions, disminució de la temperatura i augment de la humitat ambiental, indueixen la formació de primordis i el desenvolupament dels bolets.



En aquestes càmeres es sotmetien a un canvi de condicions de cultiu, bàsicament disminuint la temperatura i augmentant la humitat ambiental, per a induir la producció d'esporecips (estructures reproductives dels fongs) i completar així el cicle del cultiu obtenint els bolets comestibles. Les càmeres de floració comptaven amb un sistema de control de la humitat ambiental que la podia mantenir entre un 70 i un 95% d'humitat relativa. En general s'arribava a humitats del 95% per induir la fructificació, i quan apareixien els bolets es baixava al 80% per a que tinguessin el grau d'humitat òptim en el moment de la collita. Es controlava el nivell de CO₂, per a regular la ventilació de la sala, i es proporcionava un fotoperíode de 10h (fluorescents de leds). El control de temperatura es mantenia amb un sistema de calefacció amb aigua calenta, escalfada per una caldera de biomassa, i un circuit d'aigua freda. La temperatura de cultiu va molt lligada a l'espècie fúngica cultivada. En funció de l'espècie, les sales es podien mantenir entre 16 i 21°C en qualsevol època de l'any.

Figura 6. Floració (producció de bolets) en bosses de cultiu d'*Agrocybe aegerita* (A), *Fistulina hepatica* (B), *Grifola frondosa* (C), *Meripilus giganteus* (D), *Pleurotus eryngii* (E), i *Polyporus squamosus* (F) a les instal·lacions de Bolet ben Fet.



En el assajos de floració es quantificava el nombre d'unitats experimentals que produïen bolets plenament desenvolupats i la biomassa total (en pes fresc) d'esporecarps produïda.

En aquests assajos pilot a petita escala preteníem determinar: l'adaptació de les diferents espècies al sistema estàndard de cultiu, seleccionar les millors soques de cada espècie, i definir aquelles espècies per a les que caldria introduir modificacions en els protocols de cultiu de cara a assolir o optimitzar la producció.

Sis de les espècies fúngiques assajades varen donar resultats positius, en major o menor mesura, en les condicions estàndard de cultiu: *Agrocybe aegerita* (taula 5), *Fistulina hepatica* (taula 6), *Grifola frondosa* (taula 7), *Meripilus giganteus* (taula 8), *Pleurotus eryngii* (taula 9) i *Polyporus squamosus* (taula 10).

Taula 5. Produccions de diferents soques d'*Agrocybe aegerita*

Soca	inici del cultiu	final de floració	% de bosses amb fructificacions	gr de bolets obtinguts
504	maig-20	jul-20	20	206,2
505	set-20	nov-20	88	1360,4
506	ag-20	nov-20	29	85,5
523	jul-20	oct-20	38	774,0
525	jul-20	set-20	0	0,0
526	ag-20	oct-20	0	0,0
559	set-20	des-20	75	489,9
560	set-20	des-20	100	1570,2
561	ag-20	nov-20	14	33,0
562	set-20	des-20	100	1105,9
563	ag-20	nov-20	63	284,2
565	ag-20	nov-20	0	0,0

Taula 6. Produccions de diferents soques de *Fistulina hepatica*

Soca	inici del cultiu	final de floració	% de bosses amb fructificacions	gr de bolets obtinguts
496	set-20	oct-20	0	0,0
497	maig-20	jul-20	0	0,0
541	ag-20	oct-20	38	196,4
542	set-20	oct-20	0	0,0
543	maig-20	jul-20	0	0,0
544	set-20	oct-20	0	0,0
545	ag-20	oct-20	63	301,8
612	març-21	juny-21	33	352,0
614	març-21	juny-21	100	1288,4

Taula 7. Produccions de diferents soques de *Grifola frondosa*

Soca	inici del cultiu	final de floració	% de bosses amb fructificacions	gr de bolets obtinguts
538	set-20	nov-20	0	0,0
539	abr-20	oct-20	20	236,9
540	jul-20	nov-20	25	496,6
602	març-21	maig-21	0	0,0
653	març-21	maig-21	0	0,0

Taula 8. Produccions de diferents soques de *Meripilus giganteus*

Soca	inici del cultiu	final de floració	% de bosses amb fructificacions	gr de bolets obtinguts
512	jul-20	oct-20	50	391,6
513	jul-20	set-20	100	1818,6
514	set-20	nov-20	100	1813,9
515	abr-20	jul-20	90	1415,6

Taula 9. Produccions de diferents soques de *Pleurotus eryngii*

Soca	inici del cultiu	final de floració	% de bosses amb fructificacions	gr de bolets obtinguts
638	abr-21	ag-21	67	333,0
639	març-21	maig-21	100	933,6
641	març-21	maig-21	100	1424,0
642	abr-21	ag-21	67	878,5
644	abr-21	jul-21	0	0,0
645	abr-21	ag-21	83	1092,5
646	abr-21	ag-21	83	501,0

Taula 10. Produccions de diferents soques de *Polyporus squamosus*

Soca	inici del cultiu	final de floració	% de bosses amb fructificacions	gr de bolets obtinguts
501	jul-20	set-20	88	1034,1
502	abr-20	juny-20	100	1383,0

Pel que fa a *Fistulina hepatica*, tot i aconseguir l'aparició d'esperocarps en les condicions estàndard de cultiu, la biomassa total produïda era generalment baixa. Es va hipotetitzar que aquesta baixa producció es devia principalment a que la ràpida inducció de primordis, fins i tot abans de que el miceli colonitzés el total dels substrat disponible, provocava una manca en les reserves imprescindibles per al desenvolupament del cos fructífer, i per tant l'avortament de bona part d'aquests primordis. A més s'intuïa que la disponibilitat de substrat sense colonitzar, per part del fong que es cultiva, deixava molts nutrients disponibles i afavoria la presència de contaminants (*Trichoderma* spp. principalment) que afectaven negativament al miceli i les fructificacions de *F. hepatica*. La incubació en condicions estrictes de fosc, tant de la llavor de *F. hepatica* com en especial la dels propis cultius, va alentir l'aparició de primordis i va millorar la productivitat del cultiu (veure soca 614 a la taula 6).

Entre les espècies que representen una aportació més nova al cultiu de bolets comestibles, i amb les que no s'havien obtingut resultats totalment concloents en aquesta fase d'experimentació, destaquen *Fistulina hepatica* i *Laetiporus sulphureus*. L'interès d'ambdues espècies ha portat a continuar els treballs més enllà del present projecte, i ha generat un treball final de grau, desenvolupat per Magí Catasús, estudiant de la Universitat de Barcelona, sota la direcció del Prof. Dr. Antonio Gómez (Departament de Biologia Evolutiva, Ecologia i Ciències Ambientals, Secció de Botànica i Micologia, Institut de Recerca de Biodiversitat (IRBio), Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona). En aquest treball final de grau, que s'està desenvolupant actualment, amb especial incidència en *Laetiporus sulphureus*, s'estudien aspecte micològics amb un enfocament més científic, com la descripció de la fase anamòrfica d'ambdues espècies, i aspectes culturals més aplicats, en concret l'efecte de la composició del substrat (tipus de fusta de la que provenen serradures i flocs, granulometria del substrat, humitat del substrat) sobre el creixement del miceli i la producció d'esporeïcarps.

En el cas d'*Sparassis crispa* s'estan assajant diferents substrats a base de fusta de coníferes (seguint la bibliografia consultada). Vist també que, a camp, les fructificacions apareixen a la base (arrels) dels arbres, s'ha pensat combinar la fusta amb compost d'escorça de coníferes per simular les característiques de l'entorn on prosperen els carpòfors d'aquesta espècie. Per aproximar-nos a la formulació definitiva, es planteja assajar 4 combinacions de substrats utilitzant com a components: serradures i floc de fusta de conífera, i compost d'escorça de pi. Els substrats s'inoculen amb tres soques diferents d'*Sparassis crispa*: 495 (exemplar recollit per Bolets de Soca el novembre de 2018); 557 (exemplar recollit per Sr Valverde Soc. Cat. Micol., a Castella, el novembre de 2019) i 586 (recollit al Montseny per bolets de Soca el gener del 2020).

En el cas de *Lyophyllum decastes*, s'ha obtingut la fructificació i formació de bolets en un substrat al que s'havia utilitzat compost de bruc com a component (veure apartat posterior: *Proves pilot de producció en condicions i escala industrials*). Per acabar de perfilar les proporcions dels dos components principals: compost de bruc i fusta de castanyer (100% ó 50-50), s'ha instal·lat un assaig amb tres soques diferents de *Lyophyllum decastes*: 569, 576 i 584. Procedeixen de dos recol·leccions diferents i totes tres han demostrat que poden arribar a produir bolets en compost de bruc. En aquest assaig s'ha afegit un tercer component (segons la bibliografia consultada), restes de substrat de cultiu de *Grifola frondosa* o *Lentinula edodes* compostat.

Lyophyllum decastes és una de les espècies entre les que s'ha treballat en aquest projecte, que ha generat més interès i expectatives. Desenvolupar totalment un sistema de cultiu eficient és un objectiu primordial. Si a més podem integrar un sistema de reaprofitament de residus d'altres cultius de bolets orientaríem la producció a criteris d'economia circular.

Proves pilot de producció en condicions i escala industrials.

Un cop establerts els sistemes de producció de llavor viable i les condicions de cultiu, es va passar a la fase de producció de bolets amb les espècies que havien donat els millors resultats i en condicions properes a les industrials. Per a cada una de les espècies es van triar les soques que havia donat una millor producció (en quant a biomassa obtinguda i característiques dels bolets) i facilitat de maneig.

Al llarg del projecte es va preparar, inoculada i incubada a les instal·lacions de l'IRTA, llavor de cada una de les espècies i soques fúngiques prèviament seleccionades (taula 11, fig. 7), i es van enviar a les empreses productores per a que iniciessin els cultius, seguint els seus mètodes propis d'incubació i floració, en condicions i escala industrials.

De les 11 espècies assajades en les condicions d'inoculació de substrats, incubació de cultius i floració de les empreses productores (fig. 8), es van obtenir resultats positius amb 7 : *Agrocybe aegerita* (taula 12), *Fistulina hepatica* (taula 13), *Ganoderma lucidum* (taula 14), *Lyophyllum decastes* (fig 8), *Meripilus giganteus* (taula 15), *Pleurotus eryngii* (taula 16) i *Polyporus squamosus* (taula 17).

Taula 11. Llavor subministrada a les empreses productores per a la producció de bolets comestibles en condicions de cultiu a escala industrial.

Especie fúngica	nº enviaments de llavor	nº soques enviades	total de llavor (kg)
<i>Agrocybe aegerita</i>	18	13	90
<i>Fistulina hepatica</i>	12	12	60
<i>Ganoderma lucidum</i>	4	4	20
<i>Grifola frondosa</i>	7	7	35
<i>Infundibulicybe geotropa</i>	3	3	15
<i>Laetiporus sulphureus</i>	11	6	55
<i>Lyophyllum decastes</i>	11	6	55
<i>Meripilus giganteus</i>	3	3	15
<i>Pleurotus eryngii</i>	9	9	45
<i>Polyporus squamosus</i>	5	2	25
<i>Sparassis crispa</i>	4	4	20
Total	87	69	435

Figura 7.- Inoculació i incubació de llavor per al cultiu de bolets en condicions industrials.



Figura 8.- Sala d'incubació de cultius (esquerra) i de floració (dreta) a Teb Verd / Bolet Ben Fet.



Taula 12. Produccions obtingudes amb diferents soques d'*Agrocybe aegerita* cultivades en condicions quasi industrials (cultius inoculats, incubats i fructificats a l'empresa productora).

Soca	codi de cultiu	inici del cultiu	final de floració	bosses en fructificació	gr de bolets obtinguts
504	20203029	-	ago-20	20	1648,0
523	C20161	oct-20	nov-20	7	27,4
524	20203030	-	ago-20	20	973,2
524	C20158	oct-20	nov-20	7	1301,7
562	20203031	-	jul-20	40	2011,7
562	C20170	Oct-20	des-20	40	2708,7
565	C20181	nov-20	nov-20	20	86,4
562	C21025	feb-21	abr-21	50	5190,2
562	C21013	gen-21	abr-21	40	7189,9
560	C21127	ago-21	ago-21	25	2600,0
560	C21131	ago-21	set-21	20	1360,0
4101 (Mycelia)	C21111	jul-21	ago-21	80	4579,6
4102 (Mycelia)	C21121	jul-21	set-21	40	2060,1

Taula 13. Produccions de diferents soques de *Fistulina hepatica* a nivell quasi comercial (cultius inoculats, incubats i fructificats a l'empresa productora).

Soca	codi de cultiu	inici del cultiu	final de floració	bosses en fructificació	gr de bolets obtinguts
497	2022M028	maig-20	jul-20	20	284,3
541	-	ag-20	oct-20	20	432,9
542	2035M018	ag-20	oct-20	20	657,1

Taula 14. Produccions de diferents soques de *Ganoderma lucidum* a nivell quasi comercial (cultius inoculats, incubats i fructificats a l'empresa productora).

Soca	lot nº	inici del cultiu	final de floració	bosses en fructificació	gr de bolets obtinguts
517	21189034	maig-21	ag-21	19	2575,0
521	21189032 / 33	maig-21	ag-21	20	2785,0
630	21159034	abr-21	ag-21	26	5285,0
631	21129001	març-21	ag-21	16	1325,0
631	21189035	maig-21	ag-21	19	3860,0
9720 Mycelia	21139023	març-21	ag-21	15	2045,0

Taula 15. Produccions obtingudes de les dues soques de *Meripilus giganteus* (cultius inoculats, incubats i fructificats a l'empresa productora).

Soca	codi de cultiu	inici del cultiu	final de floració	bosses en fructificació	gr de bolets obtinguts
512	2035N008	ag-20	oct-20	5	684,0
513	2028N032	jul-20	oct-20	6	987,2

Taula 16. Produccions de diferents soques de *Pleurotus eryngii* a nivell pre-comercial (cultius inoculats, incubats i fructificats a l'empresa productora).

Soca	lot nº	inici del cultiu	final de floració	bosses en fructificació	gr de bolets obtinguts
639	21106032	març-21	maig-21	25	9610,0
640	21106035	març-21	maig-21	23	9720,0
641	21106034	març-21	maig-21	24	8100,0
643	21116030	març-21	maig-21	25	6640,0
644	21116031	març-21	maig-21	24	7850,0
645	21116032	març-21	maig-21	23	6350,0

Taula 17. Produccions de diferents soques de *Polyporus squamosus* a nivell pre-comercial (cultius inoculats, incubats i fructificats a BbF).

Soca	lot nº	inici del cultiu	final de floració	bosses en fructificació	gr de bolets obtinguts
501	-	ag-20	set-20	6	995,0
502	1.0 C20112	maig-20	ag-20	12	2641,3
502	2038E015	jul-20	nov-20	12	2785,8

En funció dels resultats obtinguts, els protocols de cultiu es poden considerar plenament posat a punt per a : *A. aegerita*, *G. lucidum*, *M. giganteus*, *P. eryngii* i *P. squamosus*.

Per a *Lyophyllum decastes* es va aconseguir la fructificació (fig 9) al incorporar, al substrat de cultiu, residus de bruc compostat com a un dels components principals. Fins al maig de 2020, es va cultivar *L. decastes* en substrat estàndard (80 % serradures de castanyer, roure, alzina i faig i 20 % de cereals). El fong es va desenvolupar amb dificultat i no va arribar a fructificar. Colonitzava un 50% aproximadament del sac de substrat (25 sacs per cada soca de llavor proporcionada per IRTA) i apareixien senyals de contaminació bacteriana després de 4 mesos d'incubació. El novembre de 2020, es va modificar la composició del substrat, substituint la meitat de la fusta de frondoses per un triturat de fusta de bruc compostada. Es van inocular les soques: 576, 580 i 582 de *L. decastes* (15 sacs de substrat per a cada soca) i es varen mantenir en incubació fins el febrer de 2021 (13 setmanes). Els sacs mostraven una colonització del 100% del substrat. Un cop a la sala de fructificació, les soques 576 i 580 van iniciar la formació de primordis, extremadament abundant (fig 9), en 9 dies; i es va fer la collita, 2450 g de les dues soques, entre el març i l'abril. La soca 582 va anar endarrerida respecte les altres dues, i la majoria de sacs de cultiu es van contaminar amb *Trichoderma* sp. Els dos sacs que no es van contaminar van acabar fructificant (maig 2021) i van donar 576 g i 464 g respectivament. Caldrien alguns assajos addicionals per acabar de perfilar totalment la composició del substrat pel cultiu d'aquesta espècie.

Figura 9.- Fructificacions de *Lyophyllum decastes* (gírgola de bruc).



En el cas de *Fistulina hepatica*, la incubació en condicions de foscor va millorar significativament la obtenció de bolets. Quedarien encara alguns detalls a millorar pel que fa a l'obertura de les bosses de cultiu i l'exposició a l'ambient en les càmeres de floració.

Avaluació de les característiques nutricionals i organolèptiques dels bolets cultivats. Valorització dels nous productes.

Macrocomponents dels fongs cultivats.

Els fongs tenen una composició química que els fa atractius des del punt de vista nutricional (Reis et al., 2012; Kalac 2009, 2013; Wang et al., 2014), a l'hora que aporten antioxidants, triterpens i β -glucans específics amb elevat interès nutracèutic (de Roman et al. 2006; Carrasco-González et al. 2017; Rathore et al., 2017).

En general, els bolets estan constituïts per un 90% d'aigua i un 10% de matèria seca. El contingut en proteïnes varia entre el 20% i el 48%, amb una proporció d'aminoàcids essencials nutricionalment favorable, els carbohidrats representen al menys el 50% (típicament: quitina, glucogen, manitol i trehalosa), i els lípids oscil·len entre el 2 i el 8%, amb prevalença dels àcids oleic i linoleic.

El valor energètic de la majoria dels bolets és baix, està entre 1,05 i 1,50 J / kg (en pes fresc). Els fongs són una bona font de vitamines com: tiamina (vitamina B), riboflavina (vitamina B2), àcid ascòrbic (vitamina C) i àcid fòlic. També contenen quantitats significatives de potassi, fòsfor, sodi, calci, magnesi, ferro i zinc.

Els fongs són rics en carbohidrats com quitina, hemicel·lulosa, glucans, mannans, xylans i galactans, la qual cosa els fa interessants com a prebiòtics (Liaqat et al., 2018) que estimulen la microbiota intestinal, conferint beneficis per a la salut (Jayachandran et al., 2017). *Grifola frondosa*, per exemple, conté midó, oligofructoses, fructooligosacàrids (FOS), lactulosa, galactomanà i polidextrosa no digerible, així com beta-glucans. En particular, la seva fracció rica en proteoglicans s'ha relacionat amb la capacitat immunomoduladora d'aquest fong (Jayachandran et al., 2017). Recentment s'ha demostrat la potencial funcionalitat d'aquesta espècie en la prevenció dels desordres relacionats amb la obesitat (Aranaz et al., 2021).

Diversos estudis han mostrat que els polisacàrids obtinguts de diferents fongs, principalment beta-glucans de cadena llarga, tenen activitat prebiòtica (Dalonso et al., 2015, Lam et al., 2013). Els beta-glucans són polímers de glucosa units per enllaços glicosídics i es troben a la paret cel·lular de bolets, llevats i cereals. Els derivats de bolets presenten enllaços 1-3 i 1-6, a diferència dels beta-glucans de cereals que es caracteritzen pels enllaços 1-3 i 1-4. Això fa que, com a compostos bioactius, presentin propietats lleugerament diferents: els beta-D-glucans de bolets com *Lentinula edodes*, *Grifola frondosa* o *Pleurotus* spp. tenen propietats immunomoduladores i anticancerígenes (Rop et al., 2009; Smith et al., 2002). Al mateix temps, també s'ha descrit que poden disminuir els nivells de lípids en sang perquè augmenten la viscositat dels aliments i disminueix la seva absorció (Rop et al., 2009; Schneider et al., 2011). Els micelis fúngics tenen un contingut important de beta-glucans (Bak et al., 2014; Chang and Wasser, 2012) i representen una font interessant per obtenir aquests compostos i aprofitar les seves propietats. L'ergosterol és característic del metabolisme dels fongs i està present a la part insaponificable de l'extracte gras. És un precursor de la vitamina D, indicada per a la salut òssia.

Diverses espècies de bolets han demostrat activitats antivirals, que semblen relacionades amb la presència de diferents components (pèptids, polisacàrids, lectines) amb un efecte d'inhibició sobre les primeres fases de replicació dels virus, incloent els

virus de l'HIV-1, de l'hepatitis B i de l'herpes simple (Roncero-Ramos & Delgado-Andrade, 2017)

Recentment s'ha incrementat la utilització de bolets en aliments processats (Moon i Lo 2014). Utilitzant la terminologia actual, es poden considerar “aliments funcionals” que aporten beneficis per a la salut, amb propietats, entre d'altres: anticancerígenes i antitumorals, hipocolesterolémicas, antivirals, antibacterianes, antiinflamatòries o immunomoduladores (El Enshasy i Hatti-Kaul, 2013; Meng et al 2016; Carrasco-González et al 2017; Gargano et al 2017; Reis et al 2017; Shen et al 2017; Muszyńska 2018).

S'ha determinat la composició nutricional dels bolets que es van arribar a cultivar al llarg del projecte. Aquestes determinacions s'estan duen a terme als laboratoris del Programa d'Indústries Alimentàries de l'IRTA. El nostre agraïment a Narcís Sais i al Dr. Massimo Castellari per la seva col·laboració en aquesta part del projecte.

Les mostres de bolets es van homogeneïtzar en fred fent servir un blender-mixer (R401; Robot Coupe, Isleworth - UK) en presència de neu carbònica. Posteriorment es varen liofilitzar (Lyomicron 55, Coolvacuum Technologies, Barcelona-Spain), es van envasar al buit en bosses d'alumini termosegellables i es van guardar a -25 °C.

La humitat (%) es va determinar per pèrdua de pes en estufa a 104 °C. El contingut en proteïna total es va determinar mitjançant el mètode Kjeldahl.

El greix total es va quantificar emprant el mètode gravimètric per extracció amb solvent mitjançant Soxhlet.

El contingut en fibra alimentària total s'ha determinat per gravimetria.

Les cendres s'han determinat per gravimetria després de l'eliminació de la matèria orgànica en mufla a 550 °C.

Per a l'obtenció de l'extracte etanòlic, 1,25 g de mostra liofilitzada es van barrejar amb 15 ml d'una solució etanol: aigua (80:20 v / v), es van homogeneïtzar en vòrtex durant 1 minut i posteriorment en bany d'ultrasons durant 15 minuts a 20 °C. Un cop separat el sobrenedant per centrifugació a 4500 g durant 5 minuts, es va repetir 2 vegades més l'extracció. Les tres alíquotes de sobrenedant es van unificar i es van dur a un volum final de 50 ml amb la mateixa solució etanol: aigua (80:20 v / v).

El contingut en polifenols totals (PFT) es va determinar mitjançant reacció colorimètrica amb el reactiu de Folin-Ciocalteu, lectura espectrofotomètrica i quantificació en equivalents d'àcid cafèic (Ribas-Agustí et al., 2012).

La determinació del contingut total de vitamina C es va dur a terme adaptant el protocol HPLC descrit per Ribas-Agustí et al. (2013).

El perfil d'àcids grassos (AGs) es va realitzar segons el protocol descrit per Mach et al. (2006), emprant per a l'extracció una barreja de cloroform: metanol (2:1, v/v). Inicialment es va utilitzar una derivatització en medi alcalí, emprant trifluorur de bor en metanol i KOH 2N a 80 °C. Posteriorment es va utilitzar una derivatització amb trifluorur de bor en metanol i HCl 3N en metanol a 80 °C. Els èsters metílics dels àcids grassos es van separar per cromatografia de gasos emprant un equip GC Agilent 6890 Series II (Hewlett Packard SA, Barcelona, Spain) equipat amb una columna de sílice capil·lar BPX70 de 30 cm de longitud, 0,25 mm de diàmetre i 0,25 micres de gruix de la fase estacionària (SGE, Milton Keynes - UK), injector split-splitless i detector FID. La identificació dels

àcids grassos es va realitzar per comparació dels temps de retenció amb els de patrons purs, i la quantificació es va determinar mitjançant el mètode del patró intern (Tripentadecanoin, Sigma-Aldrich).

Els resultats obtinguts en els anàlisis, fins el moment actual, es detallen en la taula 18. En línies generals, els valors obtinguts estan dins dels esperables en aquests tipus de fongs.

Taula 18.- Composició d'alguns dels principals nutrients en els nous bolets cultivats.

		<i>Agrocybe aegerita</i>		<i>Fistulina hepatica</i>		<i>Lyophyllum decastes</i>		<i>Polyporus squamosus</i>	
		Mitjana	DevStd	Mitjana	DevStd	Mitjana	DevStd	Mitjana	DevStd
Humitat	%	91,23	1,16	89,09	0,08	84,67	0,09	91,73	1,11
Proteïna total	%	31,70	3,87	15,50	0,14	20,83	0,84	39,37	2,24
Grassa total	%	2,39	0,29	1,50	0,14	0,67	0,07	1,46	0,28
Polifenols totals	mg/kg	6,94	0,51	6,86	0,31	4,16	0,20	5,73	0,58
Fibra	%	2,22	0,02	nd	nd	nd	nd	1,70	
Vitamina C	mg/kg	30,77	12,59	82,26	2,32	37,21	11,58	129,68	8,76
Àcids Grassos									
[C16:0] à. palmític	%	15,14	1,01	14,71	0,01	12,64	0,07	23,94	3,09
[C18:1 (n-9c)] à. oleic	%	4,71	0,55	30,96	0,05	9,75	2,67	24,78	6,19
[C18:2(n-6c)] à. linoleic	%	68,18	2,15	44,40	0,04	72,03	2,30	39,12	3,43
Saturats	%	22,11	1,58	22,26	0,04	16,61	0,29	32,86	3,10
MUFA	%	8,76	0,64	31,88	0,06	10,14	2,69	26,73	6,29
PUFA	%	68,93	2,24	45,73	0,11	73,07	2,48	39,98	3,47
ω6	%	68,82	2,23	45,67	0,11	72,95	2,46	39,60	3,36
ω3	%	0,12	0,01	0,06	0,01	0,13	0,02	0,26	0,04
ω6/ω3	%	606,32	14,87	820,01	17,30	586,24	50,85	155,29	21,26
ΣAG trans	%	0,00	0,00	0,02	0,02	0,11	0,02	0,11	0,03
Insaturats	%	77,70	1,59	77,60	0,04	83,21	0,27	66,71	3,13
Saturats/Insaturats	%	0,29	0,03	0,29	0,00	0,20	0,00	0,49	0,06
MUFA/PUFA	%	0,13	0,02	0,70	0,00	0,14	0,04	0,68	0,22

Mitjana i desviació estàndard de tres repeticions (bolets cultivats de tres soques diferents de la mateixa espècie)
nd = no determinat (per manca de suficient mostra)

El contingut en aigua és lleugerament inferior a *Lyophyllum decastes* al comparar-lo amb la resta. Pel que fa al contingut en proteïna total destacarien els valors més elevats a *Agrocybe aegerita* i *Polyporus squamosus*. Els continguts en lípids totals són baixos, com era d'esperar, mentre que els valors en polifenols extraïbles són relativament elevats. Els polifenols presenten un efecte antioxidant que aporta beneficis per a la salut, sent molt actius en la millora de les malalties neurodegeneratives i cardiovasculars, en la diabetis i en el control del pes. El contingut en vitamina C és variable segons l'espècie, però en un rang dins del que podem trobar a la literatura.

Pel que fa als àcids grassos, totes les espècies presenten, en general, un perfil caracteritzat per percentatges molt elevats d'àcid linoleic, oleic i, en menor mesura, d'àcid palmític. Oleic i linoleic són àcids grassos essencials per als humans i han de ser ingerits en la dieta. L'àcid linoleic, precursor de l'aroma a fong, s'obté a partir d'àcids grassos omega-6. Es tracta, per tant, de perfils amb un elevat contingut d'àcid grassos insaturats, que presenten una ràtio entre saturats i insaturats molt inferior a 1, indicant que els greixos d'aquestes espècies són bons candidats per ser utilitzats en alimentació humana i/o animal. Els àcids grassos insaturats són precursors d'ericosanoides que actuen com a molècules senyal en la regulació de processos cel·lulars en músculs, vasos sanguinis, neurones i sistema immune (Muszynska et al., 2018).

En el cas d'*Agrocybe aegerita* i de *Lyophyllum decastes* es tracta d'un perfil caracteritzat a més per una presència relativament baixa d'àcids grassos monoinsaturats, com l'oleic. *Agrocybe aegerita* es diferencia de les altres espècies per la presència de nivells significatius de l'àcid vaccínic ($3,41 \pm 0,30$ %), un àcid gras trans- natural que es troba normalment en productes lactis i en alguns fruits secs com les ametlles. Un estudi recent associa nivells elevats d'àcid vaccínic a la sang amb un menor risc de diabetis (Pranger et al., 2019).

Taula 19.- Comparació, en alguns dels principals nutrients, entre bolets de *Fistulina hepatica* recollits a camp (silvestre) o obtinguts en cultiu (cultivada).

		<i>Fistulina hepatica</i>			
		<i>silvestre</i>		<i>cultivada</i>	
		Mitjana	DevStd	Mitjana	DevStd
Humitat	%	88,82	1,09	89,09	0,08
Proteïna total	%	13,93	0,06	15,50	0,14
Grassa total	%	1,63	0,40	1,50	0,14
Polifenols totals	mg/kg	4,89	0,69	6,86	0,31
Vitamina C	mg/kg	82,26	2,32	82,26	2,32
Àcids Grassos					
[C16:0] à. palmític	%	15,14	1,12	14,71	0,01
[C18:1 (n-9c)] à. oleic	%	34,57	1,57	30,96	0,05
[C18:2(n-6c)] à. linoleic	%	42,66	2,07	44,40	0,04
Saturats	%	21,04	1,91	22,26	0,04
MUFA	%	35,26	1,51	31,88	0,06
PUFA	%	43,50	2,18	45,73	0,11
ω6	%	43,47	2,17	45,67	0,11
ω3	%	0,03	0,02	0,06	0,01
ω6/ω3	%	1487,50	526,54	820,01	17,30
ΣAG trans	%	0,05	0,06	0,02	0,02
Insaturats	%	78,76	1,90	77,60	0,04
Saturats/Insaturats	%	0,27	0,03	0,29	0,00
MUFA/PUFA	%	0,81	0,07	0,70	0,00

Mitjana i desviació estàndard de tres repeticions

Un altre aspecte interessant a determinar és si la composició química dels bolets cultivats és similar a la que podem trobar en espècimens silvestres recollits en ecosistemes naturals. Les diferències en el substrat sobre el que creixen, i les condicions ambientals de creixement, podrien comportar que els continguts en nutrients, o en algun compost en concret, no foren exactament comparables. Fins el moment actual aquestes comparacions s'han pogut fer per a *Fistulina hepatica*, ja que era una de les poques espècies de les que disposàvem de suficient quantitat d'exemplars silvestres com per poder realitzar els anàlisis. Els resultats obtinguts per a aquesta espècie es detallen en la taula 19. Entre la *Fistulina hepatica* silvestre i la cultivada no havia diferències significatives en el contingut de proteïnes o grasses totals. Tampoc en el contingut en vitamina C ni en les proporcions relatives dels diferents àcids grassos. Només es detectava un contingut lleugerament superior de polifenols en els bolets cultivats.

Segons les dades de que disposem fins aquests moment, no es detecten diferències significatives en la composició de nutrients entre els bolets cultivats i els silvestres per una mateixa espècie fúngica. Els resultats, però, són encara molt parcials i caldrà continuar aquests anàlisis amb la resta d'espècies cultivades per a establir conclusions definitives.

Assajos de citotoxicitat.

Per als assajos de citotoxicitat dels bolets cultivats es va seguir, amb modificacions, la metodologia descrita per Dorskocil et al. 2016. Es varen utilitzar cèl·lules Caco-2, que és una línia provinent de cèl·lules epitelials d'adenocarcinoma colonorectal humà. Aquesta línia cel·lular ha estat extensament usada durant els darrers vint anys, com a model en assajos preliminars i en diferents tipus de recerca per avaluar l'activitat de diferents composts a nivell cel·lular. Les cèl·lules Caco-2 es mantenen en DMEM suplementat amb 10% sèrum fetal boví, 1% penicil·lina-estreptomicina, 1% de bicarbonat de sodi, 1% de piruvat de sodi i 1% d'aminoàcids no essencials. S'incubaven a 37°C / 5% CO₂.

Per a l'obtenció de l'extracte etanòlic de cada un dels fongs a determinar, 1,25 g de mostra liofilitzada es van barrejar amb 15 ml d'una solució etanol: aigua (80:20 v / v), es van homogeneïtzar en vòrtex durant 1 minut i posteriorment en bany d'ultrasons durant 15 minuts a 20 °C. Un cop separat el sobrenedant per centrifugació a 4500 g durant 5 minuts, es va repetir 2 vegades més l'extracció. Les tres al·lòtotes de sobrenedant es van unificar i es van dur a un volum final de 50 ml amb la mateixa solució etanol: aigua (80:20 v / v).

S'han preparat extractes etanòlics per a totes les espècies comestibles que s'han arribat a cultivar: *Agrocybe aegerita*, *Fistulina hepatica*, *Grifola frondosa*, *Lyophyllum decastes*, *Meripilus giganteus*, *Pleurotus eryngii* i *Polyporus squamosus*. Per a la majoria d'espècies es van emprar extractes de tres soques diferents, excepte en el cas de *F. hepatica* i *G. frondosa*, en les que s'utilitzaren extractes de només dues soques. Com a controls es varen utilitzar extractes de *Lentinula edodes* i *Amanita phalloides*.

La viabilitat cel·lular es va mesurar mitjançant l'assaig MTT desenvolupat originalment per Mosman (1983). Aquests assaig es basa en la reducció metabòlica del bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) catalitzada per l'enzim mitocondrial succinat-deshidrogenasa en un compost de color blau (formazan), la qual cosa permet determinar la funcionalitat mitocondrial de les cèl·lules tractades i mesurar la supervivència de les cèl·lules (viabilitat).

Les cèl·lules Caco-2 es van cultivar en una placa de 96 pous (fig. 10). En cada pou es sembraven 100µl d'una suspensió cel·lular de 1x10⁵ cèl·lules/ml i s'incubaven durant 24 h a 37°C/5% CO₂ per a facilitar l'adhesió cel·lular. A continuació, es tractaven les cèl·lules amb dilucions seriades (4, 20, 100, 500 µg/ml) dels diferents extractes etanòlics dels bolets i soques a assajar durant 24-72 h. Es varen sembrar 6 repeticions (pous) per a cada extracte i dilució. En tots els experiments s'inclouïen pous amb cèl·lules sense tractar com a control negatiu, i cèl·lules tractades amb metotrexat com a control positiu. Passat el temps d'incubació, s'aspirava el medi i s'afegien 20µl de solució MTT (estoc filtrat i mantingut a 4°C, 2.5 mg/ml en PBS), més 80µl de medi de cultiu DMEM. Les plaques es van incubar durant 2 h addicionals a 37°C. Transcorregut aquest temps, el

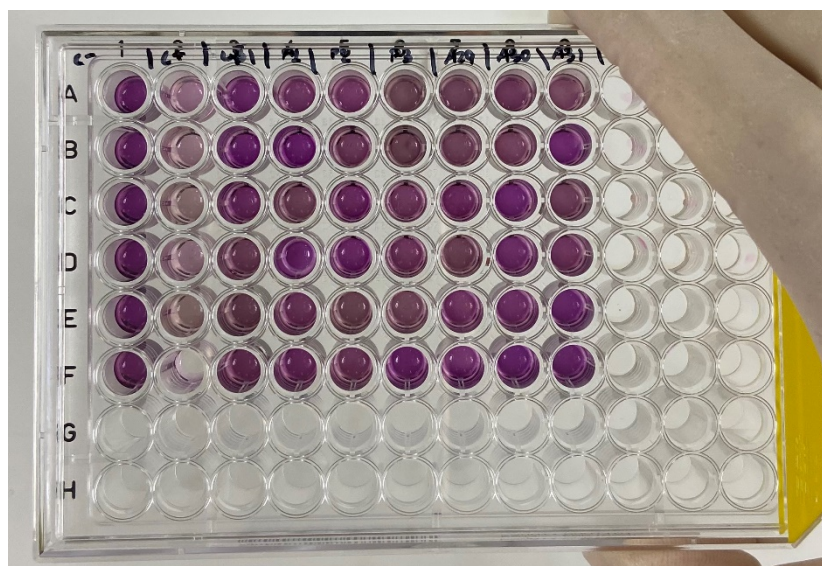
sobrenedant del cultiu es va aspirar i es van afegir 100 µl de DMSO a cada pou. A continuació, es va mesurar l'absorbància a 565 nm.

Amb les lectures obtingudes es determina el percentatge de viabilitat cel·lular :

$$\% \text{ de viabilitat} = (\text{absorbància de les cèl·lules tractades} / \text{absorbància de les cèl·lules control}) \times 100$$

Els efectes dels extractes en la viabilitat de les cèl·lules Caco-2 es recullen en la taula 20. Fins el moment de presentar aquesta memòria es disposava dels resultats per a quatre de les espècies cultivades: *Agrocybe aegerita*, *Fistulina hepatica*, *Lyophyllum decastes* i *Polyporus squamosus*. Cap de les quatre ha mostrat efectes citotòxics a les concentracions provades.

Figura 10.- Placa de 96 pous en les que es realitzaven els assajos MTT. La primera columna és un control negatiu i la segona un control positiu (amb efecte citotòxic sobre les cèl·lules). La resta son diferents soques de diferents espècies fúngiques



Taula 20.- Propietats citotòxiques dels extractes fúngics sobre cèl·lules Caco-2.

Espècie fúngica	Citotoxicitat IC ₅₀ (µg/ml)
<i>Agrocybe aegerita</i>	> 500
<i>Fistulina hepatica</i>	> 500
<i>Lyophyllum decastes</i>	> 500
<i>Polyporus squamosus</i>	> 500

Per a cada espècie fúngica s'han assajat extractes obtinguts de bolets de tres soques diferents, excepte en el cas de *F. hepatica* en el que vàrem utilitzar dues soques.

Els assajos de citotoxicitat s'estan realitzant per Sergio Martínez, estudiant de doctorat, sota la direcció de la Prof. Dra. Laura Baldomà, del Departament de Bioquímica i Fisiologia, de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació de la Universitat de Barcelona. S'estan continuant els estudis amb la resta d'espècies comestibles cultivades (*Pleurotus eryngii*, *Grifola frondosa*, i *Meripilus giganteus*).

Valoració per part dels professionals de la restauració.

Tal i com estava previst en la proposta de projecte, es van fer enviaments a una dotzena de restaurants amb exemplars d'algunes de les espècies cultivades: *Meripilus giganteus*, *Pleurotus eryngii* (proves amb cinc soques: 639, 640, 641, 643 i 644) i *Polyporus squamosus* (*Cerioporus squamosus*).

Se'ls oferia un "link" on contestar unes preguntes breus per a que poguessin valorar els diferents aspectes organolèptics de cada espècie. Només es va obtenir resposta de 3 dels 12 restaurants. Malgrat que la resposta obtinguda no permetia un anàlisi extens, es varen poder extreure algunes conclusions preliminars, com per exemple que:

- *Meripilus giganteus* és molt fibrós, tot i que els exemplars joves poden consumir-se.
- Les diferents soques de *Pleurotus eryngii* presenten diferents aspectes fenotípics, i que les de coloració més bruna mostraven més aromes que les de coloracions més blanques.
- *Polyporus* (*Cerioporus*) *squamosus* és un bolet interessant a la cuina.

Donades les dificultats de participació que vam trobar enviant mostres als cuiners, vam optar per organitzar un tast en dos esdeveniments en que es reunien una bona quantitat de cuiners i professionals de la cuina:

- Trobada Slow Food Catalunya 2021. Celebrada a la Seu d'Urgell el 4 d'octubre.
- Fira Fòrum Gastronòmic. Celebrada a Barcelona els dies 18, 19 i 20 d'octubre.

En ambdós casos vam organitzar una xerrada per divulgar el projecte i en acabar aquesta un tast de bolets. Teníem disponibles a tal efecte tres espècies:

- *Cyclocybe aegerita* "pollancró"
- *Fistulina hepatica* "Fetge de vaca"
- *Polyporus* (*Cerioporus*) *squamosus* "Bolet de noguer"

Vam aconseguir recollir gran nombre de valoracions fetes per molts professionals (Restaurants: Follia, Terra, Masia Can Sunyer, Can Candelich, Ca l'Esteve, l'Antic Forn, El Cellar dels Joglars, Me Time, Entre Dos Mons, Vinòmic, Integral, La Calma - El Bellver, Masia Can Campanyà, Cafè Pessets, Tresors del Cadí, El Jardí de Parets, Somorrostro, Tarambana, Capicua, Ca la Maria, El Ginjoler, Nambú, La Font Can Moreu, Padel Club, i 12 persones més que provenen de diferents sectors).

Els resultats obtinguts s'exposen, conjuntament per als dos esdeveniments, a les taules 21, 22 i 23, i per a les espècies: *Agrocybe* (*Cyclocybe*) *aegerita*, *Fistulina hepatica* i *Polyporus* (*Cerioporus*) *squamosus*, respectivament.

Taula 21.- Valoracions professionals sobre les característiques organolèptiques d' *Agrocybe (Cyclocybe) aegerita* (Pollancrò). (0=cap interès, 5=molt interessant)

Freqüència de les valoracions (%)						
	0	1	2	3	4	5
Aspecte	0	0	4	19	30	48
Aroma	0	0	4	15	41	41
Textura	0	0	3	7	41	48
Sabor	0	0	3	3	24	69

Taula 22.- Valoracions professionals sobre les característiques organolèptiques de *Fistulina hepatica* (Fetge de Vaca). (0=cap interès, 5=molt interessant)

Freqüència de les valoracions (%)						
	0	1	2	3	4	5
Aspecte	0	0	17	17	20	47
Aroma	0	0	0	30	30	40
Textura	0	0	3	3	30	63
Sabor	0	0	10	14	24	52

Taula 23.- Valoracions professionals sobre les característiques organolèptiques de *Polyporus (Cerioporus) squamosus* (Bolet de Noguera). (0=cap interès, 5=molt interessant)

Freqüència de les valoracions (%)						
	0	1	2	3	4	5
Aspecte	0	0	0	17	38	46
Aroma	0	0	12	27	31	31
Textura	0	0	12	20	16	52
Sabor	0	0	4	8	44	44

En resum, pel que fa a *Agrocybe aegerita*, quasi el 80% dels enquestats la qualificaven d'interessant o molt interessant pel que fa al seu aspecte, i aquests percentatges pujaven encara més, fins arribar a més del 90%, al valorar el seu aroma, textura o sabor.

En el cas de *Fistulina hepatica*, el seu aspecte i aroma no superava el 70% de valoracions com a interessant o molt interessant, però la textura i el sabor si obtenien valoracions més freqüents com a interessants o molt interessants, i assolien nivells superiors al 75% dels enquestats.

Finalment, *Polyporus squamosus* va resultar molt ben valorat pel seu aspecte i sabor, considerant-lo interessant o molt interessant més del 80% d'enquestats. La seva aroma i textura eren menys valorades, i els percentatges d'enquestats que el consideraven interessant o molt interessant oscil·laven entre el 60 i el 70%.

En conclusió, totes les espècies resulten clarament interessants per al cultiu comercial.

Valorització dels nous productes.

Tal i com es va plantejar al sol·licitar el projecte, bona part dels nous bolets cultivats no estan inclosos en els annex de bolets comercialitzables (com a silvestres i/o cultivats) en el RD 30/2009.

Els tràmits per poder incloure les noves espècies cultivades en l'annex d'espècies comercialitzables del RD 30/2009 es van iniciar a principis de 2021 i continuen actualment (les accions realitzades es poden consultar en les actes de les reunions de coordinació <https://www.bolets.net/recursos/>).

Els esforços es centraran en les tres espècies, no incloses en l'annex com a cultivades, que es consideren amb millors expectatives comercials: *Cerioporus* (*Polyporus*) *squamosus*, *Fistulina hepatica* i *Lyophyllum decastes*. Les gestions les està portant a terme Laia Ribas, de la Societat Catalana de Micologia, per via de l'Agència Catalana de Seguretat Alimentària.

Descripció de la contribució a l'objectiu de l'AEI de potenciar la productivitat i la gestió sostenible dels recursos.

Aquest projecte es va plantejar des d'un inici per incorporar noves espècies fúngiques, autòctones de Catalunya, al conjunt de bolets comestibles cultivats. Els resultats obtinguts han permès assolir l'objectiu del projecte, incrementar i diversificar l'actual oferta en el mercat cap a nous productes amb més arrelament local.

El desenvolupament del projecte ha permès disposar de noves espècies fúngiques: *Agrocybe aegerita*, *Fistulina hepatica*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Lyophyllum decastes*, *Meripilus giganteus*, *Pleurotus eryngii* i *Polyporus squamosus*, reconegudes com a comestibles o amb interessants propietats medicinals en diverses parts del territori català, i que fins avui, o no eren cultivades i només s'obtenien de la recol·lecció a bosc, o, com en el cas d'*A. aegerita*, *G. frondosa* o *P. eryngii*, les soques cultivades provenien d'altres països. Aquestes noves espècies i soques autòctones diferenciarien i potenciaran la productivitat dels agricultors locals.

A més d'aquestes espècies, de les que amb tres d'elles ja s'està fent producció a escala comercial, amb d'altres, com: *Laetiporus sulphureus* o *Sparassis crispa*, tot i haver superat les primeres fases de cultiu, estem encara en el punt de determinar quines modificacions cal introduir en els protocols de cultiu per aconseguir la formació de bolets. Donat l'interès d'ambdues espècies, caldria continuar amb els treballs de recerca i desenvolupament.

La incorporació d'aquestes espècies fúngiques, productores de bolets comestibles, a un sistema de cultiu agronòmic reduirà la pressió recol·lectora sobre les seves poblacions naturals, disminuint l'impacte ambiental d'aquesta recol·lecció, i contribuint a la gestió sostenible d'aquests recurs. D'aquesta manera es contribuirà a preservar la biodiversitat i el paper que juguen aquests fongs en els cicles biogeoquímics dels ecosistemes naturals.

Els substrats que s'utilitzen per al cultiu d'aquests bolets s'obtenen dels residus no alimentaris produïts per l'activitat forestal i agrícola, afavorint el seu aprofitament i reciclatge. La majoria d'espècies es cultiven en substrats en els que s'utilitzen, com a component principal, residus de fusta de frondoses (castanyer, alzina, roure). Algunes de les espècies que estem incorporant necessitaran la modificació d'aquests substrats, utilitzant residus d'altres fustes, com les serradures de coníferes en el cas d' *Sparassis crispa*, o el compost de bruc per al cultiu de *Lyophyllum decastes*. L'aprofitament i reciclatge d'aquests residus es podrà ampliar a altres materials i orígens de fusta fins ara menys utilitzats.

Transferència dels resultats i accions divulgatives del projecte.

- 1- S'ha creat una **Web** pròpia on recollir, específicament, les activitats realitzades i difondre els resultats del projecte:

[Diversificació del cultiu de bolets comestibles - bolets.net](http://bolets.net)

2- Divulgació en altres Webs:

- [Bolet Ben Fet participa en la investigació i divulgació de nous bolets \(teb.org\)](http://teb.org)
<https://www.teb.org/carles-diaz-participa-a-la-xerrada-telematica-diversificacio-del-cultiu-de-bolets/>
- [El cultiu dels bolets de soca autòctons, camí de ser una realitat \(irta.cat\)](http://irta.cat) <https://www.irta.cat/ca/el-cultiu-dels-bolets-de-soca-autoctons-cami-de-ser-una-realitat/>

3- Divulgació del projecte en mitjans de comunicació, tant professionals com socials:

- TECNOLOGÍA HORTÍCOLA, 4 de novembre de 2020.
[El cultivo de hongos lignícolas autóctonos-Tecnología Hortícola \(tecnologiahorticola.com\)](http://tecnologiahorticola.com)
- AGRONOTICIAS.ES, 04 de novembre de 2020 13:46
<http://www.agronoticias.es/index.php/143-general/21798-el-cultivo-de-hongos-lignicolas-autoctonos-camino-de-ser-una-realidad>
- EL MUNDO AGROPECUARIO, novembre de 2020.
<https://mundoagropecuario.com/el-cultivo-de-hongos-lignicolas-autoctonos-camino-de-ser-una-realidad/>
- EL BLOG DE AGROBANK, 10 de novembre de 2020.
[El cultivo de hongos lignícolas autóctonos, camino de ser una realidad \(agrobankcaixabank.com\)](http://agrobankcaixabank.com)
- NACIÓ DIGITAL. LA GARROTXA INFO, 16 de novembre de 2020.
[El cultiu dels bolets de soca autòctons serà aviat una realitat | NacióGarrotxa \(naciogarrotxa.naciodigital.cat\)](http://naciogarrotxa.naciodigital.cat)
- EL ÁGORA. DIARIO DEL AGUA. 11 de desembre de 2020.
<https://www.elagoradiario.com/ciencia-e-innovacion/innovacion-cultivo-setas-lignicolas-espana/>
- AGRONEWS CASTILLA Y LEÓN, 12 de desembre de 2020
[El cultivo de hongos lignícolas autóctonos, camino de ser una realidad | Agronews Castilla y León \(agronewscastillayleon.com\)](http://agronewscastillayleon.com)
- REVISTA DEL VALLÈS, 1 d'octubre de 2021
<https://revistadelvalles.es/2021/10/01/una-empresa-de-vilamajor-lidera-a-nivel-mundial-el-cultivo-de-nuevas-setas-comestibles-en-granja/>
- CRÓNICA GLOBAL, 1 d'octubre de 2021

https://cronicaglobal.elespanol.com/business/bolet-ben-fet-granja-ecologica-cultivo-setas-pionero-mundo_543516_102.html

- CCMA . CAT, 4 d'octubre de 2021
[La Seu d'Urgell reuneix els cuiners Slow Food de Catalunya, en un moment on el moviment viu una etapa d'expansió \(ccma.cat\)](#)
- PUNT VALLÈS, 8 d'octubre de 2021
<https://www.puntvalles.com/noticia/bolet-ben-fet-lidera-el-cultiu-de-bolets-frescos-comestibles-autoctons-a-catalunya>
- EL 9 NOU DEL VALLÈS ORIENTAL, 8 d'octubre de 2021.
<https://www.bolets.net/sortim-a-el9nou-edicio-valles/>
- EL 9 NOU. CAT, 13 d'octubre de 2021
<https://el9nou.cat/valles-oriental/actualitat/bolet-ben-fet-de-vilamajor-participa-en-un-estudi-sobre-el-cultiu-de-nous-fongs/>
- CUINA . CAT, 15 d'octubre de 2021. Bolet Ben Fet encapçala el cultiu de bolets comestibles autòctons a Catalunya.
https://www.cuina.cat/noticies/bolet-ben-fet-encapcala-cultiu-bolets-comestibles-autoctons-catalunya_205073_102.html
- NACIO DIGITAL Baix Montseny, 20 d'octubre del 2021
[Bolet Ben Fet presenta els primers bolets comestibles frescos autòctons cultivats a Catalunya | NacióBaixMontseny \(naciodigital.cat\)](#)

4- Activitats de divulgació dins del Pla Anual de Transferència Tecnològica (PATT) del DACC.

- **Diversificació del cultiu de bolets comestibles amb noves espècies autòctones. Jornada tècnica en línia. Dijous 8 d'abril de 2021.**
 - https://ruralcat.gencat.cat/c/document_library/get_file?uuid=daff4292-06ec-4abd-9c14-e8117df354ed&groupId=20181
 - <https://youtu.be/H-WxV6-A89c>
 - <https://transferencia.irta.cat/activitats/diversificacio-del-cultiu-de-bolets-comestibles-amb-noves-especies-autoctones/>
- **Noves espècies autòctones en el cultiu de bolets comestibles. Jornada tècnica en línia. Dijous, 11 de novembre de 2021.**
 - <https://transferencia.irta.cat/activitats/noves-especies-autoctones-en-el-cultiu-de-bolets-comestibles/>

5- Xarxes socials.

www.instagram.com/boletbenfet

www.facebook.com/boletbenfet

Bibliografia citada.

Aranaz, P.; Peña, A.; Vettorazzi, A.; Fabra, M.J.; Martínez- Abad, A.; López-Rubio, A.; Pera, J.; Parladé, J.; Castellari, M.; Milagro, F.I. *Grifola frondosa* (Maitake) Extract Reduces Fat Accumulation and Improves Health Span in *C. elegans* through the DAF-16/FOXO and SKN-1/NRF2 Signalling Pathways. *Nutrients* 2021, 13, 3968. <https://doi.org/10.3390/nu13113968>

Bak WC, Park J H, Park Y A & Ka KH (2014) Determination of glucan contents in the fruiting bodies and mycelia of *Lentinula edodes* cultivars. *Mycobiology* 42, 301-304.

Carrasco-González JA, Serna-Saldívar SO, Gutiérrez-Urbe JA, 2017. Nutritional composition and nutraceutical properties of the *Pleurotus* fruiting bodies: Potential use as food ingredient. *Journal of Food Composition and Analysis* 58: 69-81.

Chang, ST & Wasser SP (2012) The Role of Culinary-Medicinal Mushrooms on Human Welfare with a Pyramid Model for Human Health. *Int J Med Mushr*, 14, 95-134.

Dalonso N., Goldman G.H., Gern R.M.M., 2015. β -(1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-Glucans: medicinal activities, characterization, biosynthesis and new horizons. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99 (19), 7893-7906.

De Roman M, Boa E, Woodward S, 2006. Wild-gathered fungi for health and rural livelihoods. *Proceedings of the Nutrition Society* 65: 190-197.

Doskocil I, Havlik J, Verlotta R, Tauchen J, Vesela L, Macakova K, Opletal L, Kokoska L, Rada V. (2016) Invitro immunomodulatory activity, cytotoxicity and chemistry of some central European polypores, *Pharmaceutical Biology*, 54:11, 2369-2376, DOI: 10.3109/13880209.2016.1156708

El Enshasy H.A., Hatti-Kaul R., 2013. Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. *Trends in Biotechnology*, 31, 668-677.

Gardes M, Bruns TD (1993). ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.

Gargano M.L., Van Griensven L.J.L.D., Isikhuemhen O.S., Lindequist U., Venturella G., Wasser S.P., Zervakis G.I., 2017. Medicinal mushrooms: Valuable biological resources of high exploitation potential. *Plant Biosystems*, 151, 548-565.

He X., Wang X., Fang J., Chang Y., Ning N., Guo H., ... Zhao Z., 2017. Polysaccharides in *Grifola frondosa* mushroom and their health promoting properties: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 101: 910-921.

Jayachandran M., Xiao J., Xu B., 2017. A critical review on health promoting benefits of edible mushrooms through gut microbiota. *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (9), art. no. 1934,

Kalac P, 2009. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry* 113: 9-16.

Kalac P, 2013. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *J Sci Food Agric* 93: 209-218.

Lam K.-L., Chi-Keung Cheung P., 2013. Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2 (1), 45-64.

Liaqat F., Eltem R., 2018. Chitooligosaccharides and their biological activities: A comprehensive review, *Carbohydrate Polymers*, 184, 243-259.

Mach N., Devant M., Díaz I., Font-Furnols M., Oliver M.A., García-Regueiro J.A. et al. 2006. Increasing the amount of n-3 fatty acid in meat from young Holstein bulls through nutrition. J. Anim. Sci. 84:3039–3048.

Meng X., Liang H., Luo L., 2016. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. Carbohydrate Research, 424, 30–41.

Moon B., Lo Y.M., 2014. Conventional and novel applications of edible mushrooms in today's food industry. Journal of Food Processing and Preservation, 38, 2146-2153.

Mosman T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods, 65: 55-63.

Muszyńska B., Grzywacz-Kisiełewska A., Kała K., Gdula-Argasińska J., 2018. Anti-inflammatory properties of edible mushrooms: A review. Food Chemistry, 243, 373–381.

Pranger IG, Muskiet FAJ, Kema IP, Singh-Povel C, Bakker SJL. 2019. Potential biomarkers for fat from dairy and fish and their association with cardiovascular risk factors: Cross-sectional data from the LifeLines Biobank and Cohort Study. Nutrients 11(5): 1099.

Rathore H, Prasad S, Sharma S, 2017. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. PharmaNutrition 5: 35-46.

Ribas Agustí, R. Cáceres, M. Gratacós-Cubarsí, C. Sárraga, M. Castellari. 2012. A validated HPLC-DAD method for routine determination of ten phenolic compounds in tomato fruits. Food Anal. Methods, 5: 1137–1144.

Ribas-Agustí A., Bouchagier P., Skotti E., Erba D., Casiraghi C., Sarraga C., Castellari M. 2013. Effects of different organic anti-fungal treatments on tomato plant productivity and selected nutritional components of tomato fruit. The Journal of Horticultural Science & Biotechnology. 88 (1), 67-72.

Reis FS, Barros L, Martins A, Ferreira I, 2012. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study. Food and Chemical Toxicology 50: 191-197.

Reis FS, Martins A, Vasconcelos MH, Morales P, Ferreira I, 2017. Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. Trends in Food Science & Technology 66: 48-62.

Rop O, Mlcek J, Jurikova T (2009) Beta-glucans in higher fungi and their health effects. Nutr Reviews 67, 624-631.

Sánchez C., 2010. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. Appl. Microbiol. Biotechnol., 85, 1321-1337.

Schneider I, Kresse G, Meyer A, Krings U, Berger RG, Hahn A. (2011) Lipid lowering effect of Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in humans. J Functional Foods 3, 17-24.

Shen H.S., Shao S., Chen J.C., Zhou T., 2017. Antimicrobials from mushrooms for assuring food safety. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 16, 316-329.

Smith, JE, Rowan, NJ & Sullivan R (2002) Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current Medical usage with special emphasis on cancer treatments. Monograph. http://sci.cancerresearchuk.org/labs/med_mush/med_mush.ht.

Srikram A., Supapvanich S., 2016. Proximate compositions and bioactive compounds of edible wild and cultivated mushrooms from Northeast Thailand. *Agriculture and Natural Resources*, 50, 432-436

Wang XM, Zhang J, Wu LH, Zhao YL, Li T, Li JQ, Wang YZ, Liu HG, 2014. A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China. *Food Chemistry* 151: 279-285.

White T, Bruns T, Lee S, Taylor J, Innis M, Gelfand D, Shisky J (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, pp: 315-322.