



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE
POLISACÁRIDOS DE *Ganoderma curtisii*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE PLANTAS
MEDICINALES**

AREA: BIOINGENIERIA

P R E S E N T A

BIOL. MARIO OSCAR CHÁVEZ SÁNCHEZ

DIRECTOR

Dr. ISAAC TELLO SALGADO

CUERNAVACA, MORELOS.

ENERO, 2020.



La presente investigación se desarrolló en el **Laboratorio de Micología** del Centro de Investigaciones Biológicas (**CIB**) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (**UAEM**), bajo la asesoría del **Dr. Isaac Tello Salgado**, con el apoyo de la beca de Posgrado (Nº 880930) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**).

Dedicado a:

Aquellas personas que siempre han estado en mi vida, quienes han pasado todo lo bueno y malo de la vida conmigo mi madre María Ignacia Sánchez Onofre y mi padre Juan Chávez Zapotitla, como también a mis abuelos Mayola Zapotitla Coria y Alberto Chávez Saldaña, han sido una parte importante en mi vida, gracias por todo.

Mi familia en general, mis hermanos, mis tíos, mis primos y mis sobrinos todos forma una parte esencial y única en mi vida. Gracias por todo.

“Ez nekeak, ezta bide txarrak”

Agradecimientos

Al creador por permitirme vivir la esencia de la realidad que nos rodea, por la vida y por todas las cosas buenas que hay en ella.

Por el grato apoyo y dirección en el presente trabajo, así como su gran amistad y su consejo hacia la mejora en el ámbito académico al Dr. Isaac Tello Salgado.

Al M.B. Caleb Castillo Lormendez por su amistad y enseñanza en el área biotecnológica y académica como también sus conocimientos en múltiples áreas de la ciencia.

Al M.C. Elizur Montiel Arcos por ser un ejemplo en mi formación académica, por su amistad y apoyo en el laboratorio de Micología y el haberme inculcado la pasión por el basto reino fungi.

Al comité revisor de mi tesis conformado por el Dr. Ismael León Rivera, el Dr. Porfirio Juárez, La Dra. Irene Perea y la M.C.C. Ana Ligia Espinosa, gracias por todo el apoyo recibido durante este tiempo.

A mis amigos de Maestría Chris Domínguez, Leo Andrés, Itzel Román, Sofy, Paty, Silvia, Ángel y Gloria (†), por todo gracias.

A mis amigos y colegas de laboratorio Luis Suarez, David Hernández, Ruth Aguirre, Juan Rodríguez, Valeria Reyes, Maleny Muñoz, Jessy Garrido, Jesús Olvera, Fanny Albavera y todos en el laboratorio.

A Stephanie Albavera por la ayuda en interpretación de datos y realización de las cinéticas en matraz al comienzo de este proyecto, gracias.

Al centro de investigaciones biológicas por permitirme usar sus instalaciones y al laboratorio de micología por todo el apoyo.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
3. MARCO TEÓRICO	7
3.1. ASPECTOS GENERALES DE <i>GANODERMA CURTISII</i>	7
3.1.1. El género <i>Ganoderma</i> como grupo taxonómico.....	7
3.1.2. Descripción taxonómica.....	8
3.1.3. Clasificación taxonómica.....	8
3.1.4. Hábitat.....	9
3.1.5. Distribución mundial.....	9
3.1.6. Distribución de <i>Ganoderma curtisii</i> en México	10
3.1.7. Estudios pre-clínicos sobre <i>Ganoderma</i> spp.	12
3.2. ASPECTOS BIOTECNOLÓGICOS PARA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS	14
3.2.1. Producción de metabolitos secundarios en la industria	14
3.2.2. La fermentación como proceso industrial.....	15
3.2.3. El cultivo diáuxico	17
3.2.4. El biorreactor	18
3.2.5. Estudios enfocados en la obtención de metabolitos en biorreactor	20
3.2.6. La innovación tecnológica como fuente de la industria moderna	21
3.3. ASPECTOS INTEGRALES PARA EL DESARROLLO DEL PRODUCTO A BASE DE METABOLITOS DE <i>G. CURTISII</i>	23
3.3.1. Los suplementos alimenticios en México	23
3.3.2. Preservación del producto mediante adición de conservadores.....	25
3.3.3. Los glucanos como metabolitos con propiedades farmacológicas	29
3.3.4. Los polifenoles como agentes antioxidativos.....	31
3.3.5. Adición de suplementos vitamínicos (Complejo B y Zinc)	32
4. JUSTIFICACIÓN.....	33
5. HIPÓTESIS.....	34
6. OBJETIVOS.....	34
6.1. Objetivo general:	34
6.2. Objetivos específicos:	34

7. MATERIALES Y METODOS	35
7.1. Material Biológico y activación de la cepa	35
7.2. Preparación de preinóculo	35
7.3. Medio de cultivo modificado y factores determinantes	35
7.4. Cinética de crecimiento	36
7.5. Cuantificación de la biomasa en el medio modificado	36
7.6. Cuantificación de los polisacáridos en el medio modificado	37
7.7. Cuantificación de α y β beta glucanos	37
7.7.1 Técnica de Solubilización e hidrólisis parcial de glucanos totales (α-glucano + β-glucano) + D-glucosa en oligosacáridos, sacarosa y libre de D-glucosa	38
7.7.2. Soluciones del Kit Megazyme K-YGBL	39
7.7.3. Preparación de los reactivos soluciones/suspensiones	40
7.7.4. Reactivos requeridos (no incluidos en el kit)	41
7.8. Extrapolación en biorreactor tanque agitado	42
7.9. Cuantificación de polifenoles por método Folin-Ciocalteu	42
7.9.1 Reactivos para la determinación de polifenoles totales	43
7.9.2. Curva estándar de calibración de ácido gálico	43
7.9.3. Cálculo para la cuantificación de polifenoles totales	44
7.10. Los parámetros cinéticos y estequiométricos con un modelo logístico de crecimiento ..	45
8. RESULTADOS	46
8.1. Análisis de la producción de biomasa y polisacáridos	46
8.1.1. Biomasa producida en matraz (medio modificado), cuantificación por peso	46
8.1.2. Polisacáridos producidos en matraz (medio modificado), cuantificados por peso	47
8.1.3. Determinación de α-glucanos producidos en matraz, (cuantificación por método enzimático)	48
8.1.4. Determinación de β-glucanos producidos en matraz, (cuantificación por método enzimático)	49
8.1.5. Cuantificación del porcentaje glucanos totales (exopolisacáridos)	50
8.2. Análisis de producción en tres condiciones de temperatura y modificación de la fuente de carbono	51
8.2.1. Caracterización de la producción de biomasa, exopolisacáridos y rendimiento a nivel matraz a 25°C	51

8.2.2. Caracterización de la producción de biomasa, exopolisacáridos y rendimiento a nivel matraz a 30°C.	53
8.2.3. Caracterización de la producción de biomasa, exopolisacáridos y rendimiento a nivel matraz 35°C.	55
8.3. Caracterización del crecimiento de biomasa y polisacáridos a nivel biorreactor tanque agitado en medio sin modificar a 30°C.	56
8.4. Análisis de producción en diferentes condiciones de temperatura y medio modificado a nivel biorreactor tanque agitado	58
8.4.1. Caracterización del crecimiento de biomasa y polisacáridos a 25°C (primer bioensayo).	58
8.4.2 Rendimiento con respecto a la biomasa, (primer bioensayo).	60
8.4.3. Caracterización del crecimiento de biomasa y polisacáridos 25°C, (segundo bioensayo).	61
8.4.4. Rendimiento con respecto a la biomasa, (segundo bioensayo).	63
8.4.5. Análisis estadístico de los bioensayos del cultivo de <i>G. curtisii</i> en biorreactor tanque agitado a 25°C	64
8.4.6. Caracterización del crecimiento de biomasa y polisacáridos a 30°C, (primer bioensayo).	65
8.4.7. Rendimiento con respecto a la biomasa, (primer bioensayo).	67
8.4.8. Caracterización del crecimiento de biomasa y polisacáridos modificado a 30°C, (segundo bioensayo).	68
8.4.9. Rendimiento con respecto a la biomasa, (segundo bioensayo).	70
8.4.10. Análisis estadístico de los bioensayos del cultivo de <i>G. curtisii</i> en biorreactor tanque agitado a 30°C.	71
8.5. Cuantificación del porcentaje glucanos totales por método enzimático en biorreactor tanque agitado a 30°C	72
8.5.1. Determinación de α -glucanos en biorreactor a 30°C.....	74
8.5.2. Determinación de β -glucanos en biorreactor a 30°C.....	75
8.6. Análisis por RMN del cultivo de <i>Ganoderma curtisii</i> a nivel biorreactor tanque agitado a 30 °C.....	76
8.7. Cuantificación de los polifenoles totales en el cultivo de <i>Ganoderma curtisii</i> a nivel biorreactor tanque agitado a 30 °C	79

9. DISCUSIÓN	80
10. CONCLUSIONES	89
11. LITERATURA CITADA	90

Índice de Figuras

FIGURA 1. ESPECIE CORRESPONDIENTE AL GÉNERO <i>GANODERMA</i> , CONCRETAMENTE <i>G. CURTISII</i> , HONGO CON MÚLTIPLES METABOLITOS SECUNDARIOS.....	7
FIGURA 2. DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DE LA ESPECIE <i>GANODERMA CURTISII</i>	9
FIGURA 3. DISTRIBUCIÓN A NIVEL NACIONAL DE <i>GANODERMA CURTISII</i> , PUEDEN OBSERVARSE EN GUINDA LOS ESTADOS CON REPORTES DE ESTA ESPECIE.	11
FIGURA 4. ESQUEMA DE UNA GRÁFICA DEL CULTIVO TIPO DIÁUXICO. ESTE TIPO DE MODELO CINÉTICO SE DEBE A DOS FUENTES DE CARBONO, DONDE, EL CRECIMIENTO CELULAR SE DESARROLLA EN DOS MOMENTOS.	17
FIGURA 5. IMAGEN DE UN BIORREACTOR TIPO TANQUE AGITADO POR EL CUAL SE PRODUJERON LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE <i>GANODERMA CURTISII</i>	18
FIGURA 6. ESTRUCTURA ESQUEMATIZADA PARA LA CREACIÓN DE UN <i>START-UP</i> DEL PRODUCTO.....	22
FIGURA 7. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS α -GLUCANOS PRESENTES EN EL EXTRACTO DE <i>GANODERMA CURTI</i>	29
FIGURA 8. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS β -GLUCANOS (1,3) Y (1,6) PRESENTES EN EL EXTRACTO DE <i>GANODERMA CURTISII</i>	30
FIGURA 9. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS DISTINTOS GRUPOS DE POLIFENOLES	31

FIGURA 10. EVALUACIÓN VISUAL DE LOS PELLETS PRODUCIDOS POR <i>GANODERMA CURTISII</i> . A) PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN MATRAZ, B) APARIENCIA DE BIOMASA FRESCA Y C) PESO SECO DE LA BIOMASA.....	46
FIGURA 11. APARIENCIA VISUAL DE LOS POLISACÁRIDOS PRECIPITADOS CON ALCOHOL AL 97%. A) PRECIPITACIÓN DE POLISACÁRIDOS EXTRACELULARES DEL CULTIVO AGOTADO POR EL CRECIMIENTO MICELIAR DE <i>G. CURTISII</i> , B) APARIENCIA DE POLISACÁRIDOS EN BASE HÚMEDA Y C) APARIENCIA DE POLISACÁRIDOS EN BASE SECA.	47
FIGURA 12. α -GLUCANOS PRODUCIDOS EN MATRAZ, CUANTIFICACIÓN POR MÉTODO ENZIMÁTICO EN CULTIVO DE <i>G. CURTISII</i>	48
FIGURA 13. β -GLUCANOS PRODUCIDOS EN MATRAZ, CUANTIFICACIÓN POR MÉTODO ENZIMÁTICO EN CULTIVO DE <i>G. CURTISII</i>	49
FIGURA 14. PORCENTAJE DE LOS GLUCANOS PRESENTES EN EL EXTRACTO DE <i>G. CURTISII</i>	50
FIGURA 15. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LA BIOMASA Y EXOPOLISACÁRIDOS A 25°C DE LA CEPA <i>G. CURTISII</i> EN MATRAZ DE 1,000 ML AL 50% DE CAPACIDAD CON MEDIO MODIFICADO.	51
FIGURA 16. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DEL RENDIMIENTO DE POLISACÁRIDOS A 25°C DE LA CEPA <i>G. CURTISII</i> EN MATRAZ DE 1,000 ML AL 50% DE CAPACIDAD CON MEDIO MODIFICADO.....	52
FIGURA 17. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE BIOMASA Y POLISACÁRIDOS A 30°C DE LA CEPA <i>G. CURTISII</i> EN MATRAZ DE 1,000 ML AL 50% DE CAPACIDAD CON MEDIO MODIFICADO	53
FIGURA 18. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DEL RENDIMIENTO DE LOS POLISACÁRIDOS A 30°C DE LA CEPA <i>G. CURTISII</i> EN MATRAZ DE 1,000 AL 50% DE CAPACIDAD CON MEDIO MODIFICADO	54

FIGURA 19. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LA BIOMASA Y POLISACÁRIDOS A 30°C DE LA CEPA <i>G. CURTISII</i> EN BIORREACTOR TANQUE AGITADO DE 7L CON 50% DE MEDIO SIN MODIFICAR.	56
FIGURA 20. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DEL RENDIMIENTO DE LOS POLISACÁRIDOS A 30°C DE LA CEPA <i>G. CURTISII</i> EN BIORREACTOR TANQUE AGITADO DE 7L CON 50% DE MEDIO SIN MODIFICAR.	57
FIGURA 21. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE BIOMASA, EXOPOLISACÁRIDOS Y PH DE LA CEPA <i>G. CURTISII</i> EN BIORREACTOR TANQUE AGITADO DE 7L CON 50% DE MEDIO MODIFICADO A 25°C.	58
FIGURA 22. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DEL RENDIMIENTO DE LOS POLISACÁRIDOS DE LA CEPA <i>G. CURTISII</i> EN BIORREACTOR TANQUE AGITADO DE 7L C CON 50% DE MEDIO MODIFICADO A 25°C.	60
FIGURA 23. SEGUNDA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE BIOMASA, EXOPOLISACÁRIDOS Y PH DE LA CEPA <i>G. CURTISII</i> EN BIORREACTOR TANQUE AGITADO DE 7L CON 50% DE MEDIO MODIFICADO A 25°C.	61
FIGURA 24. SEGUNDA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DEL RENDIMIENTO DE LOS POLISACÁRIDOS DE LA CEPA <i>G. CURTISII</i> EN BIORREACTOR TANQUE AGITADO DE 7L CON 50% DE MEDIO MODIFICADO A 25°C.	63
FIGURA 25. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS BIOENSAYOS ELABORADOS A 25°C DEL CULTIVO DE <i>G. CURTISII</i> , SE OBSERVA ERROR ESTÁNDAR Y MEDIA DE AMBOS EXPERIMENTOS.	64
FIGURA 26. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE BIOMASA, EXOPOLISACÁRIDOS Y PH DE LA CEPA <i>G. CURTISII</i> EN BIORREACTOR TANQUE AGITADO DE 7L CON 50% DE MEDIO MODIFICADO A 30°C.	65
FIGURA 27. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DEL RENDIMIENTO CON RESPECTO A LA BIOMASA DE LA CEPA <i>G. CURTISII</i> EN BIORREACTOR TANQUE AGITADO DE 7L CON 50% DE MEDIO MODIFICADO A 30°C.	67

FIGURA 28. SEGUNDA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE BIOMASA, EXOPOLISACÁRIDOS Y PH DE LA CEPA <i>G. CURTISII</i> EN BIORREACTOR TANQUE AGITADO DE 7L CON 50% DE MEDIO MODIFICADO A 30°C.	68
FIGURA 29. SEGUNDA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DEL RENDIMIENTO CON RESPECTO A LA BIOMASA DE LA CEPA <i>G. CURTISII</i> EN BIORREACTOR TANQUE AGITADO DE 7L CON 50% DE MEDIO MODIFICADO A 30°C.	70
FIGURA 30. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS BIOENSAYOS ELABORADOS A 30°C DEL CULTIVO DE <i>G. CURTISII</i> , SE OBSERVA ERROR ESTÁNDAR Y MEDIA DE AMBOS EXPERIMENTOS.	71
FIGURA 31. GLUCANOS TOTALES PRESENTES EN BIOENSAYOS ELABORADOS EN BIORREACTOR A 30°C DEL CULTIVO DE <i>G. CURTISII</i> , SE OBSERVAN TRES MUESTRAS CORRESPONDIENTES AL EXTRACTO, CUERPO FRUCTÍFERO Y CONTROL.	73
FIGURA 32. α -GLUCANOS EN BIOENSAYOS ELABORADOS A 30°C DEL CULTIVO DE <i>G. CURTISII</i> , SE OBSERVAN TRES MUESTRAS CORRESPONDIENTES AL EXTRACTO, CUERPO FRUCTÍFERO Y CONTROL.	74
FIGURA 33. β -GLUCANOS EN BIOENSAYOS ELABORADOS A 30°C DEL CULTIVO DE <i>G. CURTISII</i> , SE OBSERVAN TRES MUESTRAS CORRESPONDIENTES AL EXTRACTO, CUERPO FRUCTÍFERO Y CONTROL.....	75
FIGURA 34. ESPECTRO RMN 1H DE LA FRACCIÓN DE POLISACÁRIDOS SOLUBLE DEL CULTIVO EN BIORREACTOR TANQUE AGITADO DE <i>GANODERMA CURTISII</i>	76
FIGURA 35. ESPECTRO RMN 1H PRE-SATURADO DE LA FRACCIÓN DE POLISACÁRIDOS SOLUBLE DEL CULTIVO EN BIORREACTOR TANQUE AGITADO DE <i>GANODERMA CURTISII</i>	77
FIGURA 36. ESPECTRO RMN DEPTQ DE LA FRACCIÓN DE POLISACÁRIDOS SOLUBLE DEL CULTIVO EN BIORREACTOR TANQUE AGITADO DE <i>GANODERMA CURTISII</i>	78

FIGURA 37. CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO PARA CUANTIFICAR LOS POLIFENOLES TOTALES DEL CULTIVO DE *GANODERMA CURTISII* EN BIORREACTOR A 30°C.....79

Índice de tablas

TABLA 1. DISTRIBUCIÓN NACIONAL DE LA ESPECIE *GANODERMA CURTISII*, DIVIDIDO EN ZONAS DE ACUERDO A LOS ESTADOS ES LA REPUBLICA.....10

TABLA 2. REPRESENTACIÓN DE LOS FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.....15

TABLA 3. VALORES DE CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO Y SU ABSORBANCIA PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN.....43

TABLA 4. PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *GANODERMA CURTISII* EN MATRAZ.
.....44

TABLA 5. PRODUCCIÓN DE POLISACÁRIDOS DE *GANODERMA CURTISII* EN MATRAZ.....45

TABLA 6. RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS CINÉTICAS NIVEL MATRAZ A 25⁰C DEL PRESENTE TRABAJO.....82

TABLA 7. RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS CINÉTICAS NIVEL MATRAZ A 30⁰C DEL PRESENTE TRABAJO.....82

TABLA 8. RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS CINÉTICAS NIVEL BIORREACTOR A 25⁰C DEL PRESENTE TRABAJO.....84

TABLA 9. RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS CINÉTICAS NIVEL BIORREACTOR A 30⁰C DEL PRESENTE TRABAJO.....85

RESUMEN

Los hongos han formado parte importante en la existencia de diversas culturas o sociedades, este es el caso de especies correspondientes al género *Ganoderma*, las cuales se destacan por sus múltiples metabolitos secundarios que han sido objeto de estudio en los últimos años. La especie *Ganoderma curtisii*, es considerada por algunos investigadores como una especie equivalente con *Ganoderma lucidum*, esto, en gran medida se debe a las propiedades farmacológicas que posee. En el presente trabajo, se propuso desarrollar un esquema de producción de los metabolitos secundarios de dicho hongo, específicamente, polisacáridos extracelulares.

Por consiguiente, se optó por desarrollar cinéticas de crecimiento bajo dos diferentes planteamientos, uno de ellos fue realizar los bioensayos a nivel matraz con determinadas condiciones de cultivo, mientras que, la otra a nivel biorreactor tipo tanque agitado. Las condiciones de cultivo para el desarrollo de estos bioensayos fueron temperatura 25°C, 30°C y 35°C, dos fuentes de carbono (malta 3% y cereal 2%), y una agitación orbital de 200 rpm. Tanto para matraz como biorreactor se cuantifico la cantidad de biomasa producida como también los exopolisacáridos excretados al medio.

Los resultados obtenidos bajo estas condiciones a nivel matraz a 25°C fueron, biomasa (X_{max})= 4.7 g/L, exopolisacáridos (P_{max})= 6.09 g/L cuyo rendimiento fue 1.29 mg P/g B. En el bioensayo a nivel matraz a 30°C se obtuvo, biomasa (X_{max})= 5.9 g/L y exopolisacáridos (P_{max})= 6.1 g/L cuyo rendimiento fue 1.03 mg P/g B. En contraparte, los resultados que se obtuvieron a nivel biorreactor tanque agitado, fueron los siguientes, biorreactor 25°C, biomasa (X_{max})= 12.76 g/L y exopolisacáridos (P_{max})= 2.72 g/L cuyo rendimiento fue 0.21 mg P/g B. En la segunda caracterización del cultivo, se obtuvo, biomasa (X_{max})= 9.22 g/L y (P_{max})= 2.9 g/L cuyo rendimiento fue 0.31 mg P/g B. Los bioensayos a 30°C tuvieron una biomasa (X_{max})= 10.2 g/L y exopolisacáridos (P_{max})= 6.4 g/L cuyo rendimiento fue 0.62 mg P/g B. En la segunda caracterización a 30°C se obtuvo, biomasa (X_{max})= 12.38 g/L y exopolisacáridos (P_{max})= 5.8 g/L cuyo rendimiento fue 0.46 mg P/g B.

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, los problemas de salud pública representan un serio inconveniente para el erario de cualquier nación, de entre esos destacan las enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y el cáncer, las cuales juntas alcanzan los 15 millones de casos, es decir equivalen al 26.5% de defunciones, de un total de 56.6 millones de fallecimientos registradas a nivel mundial en este año. Tal problema ha sido constante durante los últimos 15 años. (OMS, 2017).

En México, al igual que en el mundo, las enfermedades que principalmente predisponen mortalidad son las enfermedades cardiovasculares con valores de 60,670; diabetes mellitus 50,882; tumores malignos 40,612 (de mama 6, 273, del cuello del útero 4,009, del hígado y de las vías biliares 3,245) y las enfermedades neurodegenerativas con 17,595 decesos de un total de 291, 637 muertes registradas este año. (INEGI, 2017).

Existen incontables tratamientos convencionales por vía de medios farmacológicos o en algunos casos quirúrgicos cuyo propósito sea la curación o el alivio de tales enfermedades, sin embargo, en ocasiones no siempre se logra obtener buenos resultados bajo estos esquemas habituales y es necesario recurrir a nuevas opciones.

La medicina tradicional ha estado íntimamente relacionada con el crecimiento cultural a lo largo de la historia de muchas sociedades, en gran parte, esto se debe a los múltiples conocimientos ancestrales que se han resguardado generación tras generación con gran trascendencia en sabiduría. En la medicina tradicional china, se tienen reportes de una múltiple cantidad de técnicas y sustancias orgánicas para contrarrestar, curar o prevenir enfermedades de numerosas etiologías. Los hongos de un sinfín de especies, conforman una parte importante de ese universo de conocimientos.

En el mundo existen innumerables especies del género *Ganoderma*, pero la especie *Ganoderma curtisii* es sin duda, una potencial especie de estudio debido a los diferentes

metabolitos secundarios que se han encontrado que es equiparable con la especie *Ganoderma lucidum* (Cao, Y., *et al.*, 2012).

El género *Ganoderma* constituye un grupo de hongos basidiomicetes del orden *aphyllophorales*, saprofitos, habitantes de los bosques y selvas (creciendo sobre troncos muertos), con múltiples metabolitos de interés medicinal y con más de 200 especies descritas. (López-Peña *et al.*, 2016).

Este género posee múltiples metabolitos bioactivos de interés, de entre los cuales, destacan los ácidos ganodericos (AGs), proteínas, triterpenos, múltiples polisacáridos y otros compuestos activos. Dichos componentes tienen diversos principios farmacológicos como son antimicrobiano, antiviral, antitumoral, antialérgico, antiinflamatorio y como inmunomodulador (Hu *et al.*, 2017). El uso de hongos del género *Ganoderma* y su aplicación medicinal ha sido reportado por años dentro de la medicina tradicional china, entre ellas, sobresalen las infusiones de este hongo que se realizan con partes del cuerpo fructífero. Tales infusiones representan una, -si bien no la única-, técnica de obtención de los metabolitos bioactivos, pues a causa de esto, la naturaleza de dichos metabolitos se mantienen estables y con amplia disposición para el adecuado uso.

La obtención de metabolitos bioactivos de interés con enfoque medicinal, a partir de técnicas con el uso de biotecnología, otorga una alternativa sustancial dentro del ámbito tanto científico como socioeconómico, puesto que, tanto la industria (como proveedora del recurso) como la sociedad (consumidora del recurso) se ven beneficiadas con la explotación adecuada de estos derivados fúngicos.

En la actualidad, existen incalculables productos en el mercado que aseveran tener la cura para un sinnúmero de enfermedades, la realidad es, que tales productos no siempre resultan ser lo que predisponen sus etiquetas, y en muchas ocasiones pueden resultar más dañinos que benéficos. Para ello, es necesario plantear estrategias de eficiencia para la producción,

distribución y adecuado medicación de un producto, que además garantice certeza mediante el aval científico, y se encuentre al alcance de cualquier sector de la sociedad.

La forma más convencional de cultivar esta especie es por medio el uso de sustratos solidos que son producto de derivados agroforestales. Se tienen reportes de este tipo de técnicas que básicamente consisten en la inoculación de la cepa en bolsas de cultivo para la proliferación de los cuerpos fructíferos.

Recientemente, otro tipo de técnica que se está empleando es el uso de sistemas de cultivo en medio sumergido, este consiste en la proliferación de fases miceliales en medios enriquecidos de nutrientes, los metabolitos bioactivos se obtienen en el propio medio. Ambas técnicas representan formas de producción, sin embargo, se propone mejorar los rendimientos obtenidos a través el uso de herramienta biotecnológica para alcanzar rendimientos óptimos y estandarizados en el proceso de producción de los metabolitos de esta especie por medio de biorreactor (tanque agitado).

El propósito de este proyecto está encaminado a la obtención de mejores rendimientos en el proceso de producción de metabolitos bioactivos, del cultivo de micelio del hongo *Ganoderma curtisii*.

2. ANTECEDENTES

En la actualidad, existen innumerables hongos con fines de uso medicinal y/o comestible que han sido sometidos al cultivo artificial de gran escala, uno de estos, es *Ganoderma lucidum*. Sin embargo, en México la producción e industrialización de este hongo, como de especies afines aun es limitada y escasa. En contraste, al grupo de hongos medicinales, se debe en gran medida sus propiedades terapéuticas a múltiples componentes celulares y metabolitos secundarios, dichos productos se han encontrado e identificado tanto en cuerpo fructífero como en cultivo de fases miceliales de los hongos. (Núñez-Urquiza, 2017)

El cultivo líquido de fases miceliales a partir de biorreactor, representa una de las más óptimas alternativas de producción de hongos medicinales, esto en gran medida se debe a las facilidades que ofrece en cuanto al rendimiento, tiempo y costos de una producción estandarizada. De acuerdo a Feng, Nagal e Ikekawa (2001), entre el 80 al 85% de los derivados fúngicos de hongos medicinales se obtienen a partir de cuerpos fructíferos (basidiomas), los cuales han sido producidos artificialmente o recolectados en el medio silvestre. Solamente el 15% se obtiene a partir del micelio y del medio de cultivo.

Los trabajos existentes de cultivos sumergidos como ejemplos tenemos a Papinutti (2010) quien demostró que con 6% de malta y 4% glucosa se podían obtener grandes cantidades de biomasa en una fermentación. La biomasa producida fue de 15 g/L al día 21. Papinutti (2010), de igual forma, demostró que las condiciones regulares de la fuente de carbono podían ser de glucosa 1% y malta 1% cuyos resultados de biomasa y exopolisacáridos producidos fueron 4.32 g/L y 2.2 g/L, respectivamente. Ambos trabajos fueron realizados a nivel matraz.

Huang *et al.*, (2009), utilizaron como fuente de carbono alterna aceite de maíz al 2%, los resultados que obtuvieron de biomasa fue de 12.9 g/L, mientras que, de exopolisacáridos fue de 1.03 g/L. La investigación fue llevada a cabo en matraz Erlenmeyer con 50% de capacidad volumétrica.

La eficacia del uso de biorreactor para la producción de exopolisacáridos a partir de micelio de *Ganoderma lucidum* se observa claramente manifestado en el trabajo de Min-Lee, Young-lee y Yong-lee, esto llevado a cabo en 1999. Como una referencia importante se considera a dicho trabajo dentro del presente proyecto, a causa que, Min-Lee concluyeron que las condiciones óptimas ofrecidas por el biorreactor magnificaban la eficacia productiva de los metabolitos activos (exopolisacáridos).

Otro ejemplo, encontrado dentro de la literatura lo reportan Choi, Maeng, Ding y Cha (2007), quienes estudiaron al hongo *Fomiptosis pinicola* a partir de sus fases miceliales mediante el uso de biorreactor *air-lift*, donde de igual forma comprobaron la eficacia de producción de metabolitos activos (exopolisacáridos) a partir del crecimiento micelial. La producción de exopolisacáridos fue 2.6 g/L con una biomasa de 7.9 g/L. Ellos al igual que Min-Lee *et al.*, (1999) definen acertadamente que las condiciones óptimas del biorreactor *air-lift* magnifican considerablemente la producción de masa micelial y, por ende, metabolitos biológicamente activos.

Berovic *et al.*, (2015) obtuvieron de la cepa *Ganoderma lucidum* 1.7 g/L de exopolisacáridos con una alta producción de biomasa (17 g/L), dichos autores, igualmente lograron obtener resultados reveladores de la especie *Grifola frondosa* pues demostraron que esta especie, particularmente, era capaz de producir una mayor cantidad de exopolisacáridos. Los resultados fueron biomasa 15.2 g/L y 3.6 g/L de exopolisacáridos. El trabajo se realizó en un biorreactor tipo tanque agitado (50% capacidad), lo cual agrega una reseña importante para la presente investigación.

Legarda, X. L. *et al.*, (2015) demostraron que al utilizar fuentes de carbono altas durante los primeros días de la fermentación, se logra obtener cantidades grandes de biomasa, esto puede estar correlacionado con la producción de polisacáridos (cultivos diáuxicos), dependiendo del comportamiento del cultivo con respecto a la fuente de carbono. De igual forma, la investigación se llevó a cabo en biorreactor tanque agitado con un 50% de volumen de capacidad.

Por otra parte, uno de los más recientes trabajos enfocados al cultivo sumergido de hongos medicinales lo corrobora Núñez-Urquiza (2017) quien comprobó la eficacia de ciertos polisacáridos del hongo *G. lucidum* como neuroprotectores, dicho autor utilizó como metodología el cultivo sumergido de fases miceliales tanto en matraz como en biorreactor. Sin embargo, debido a las atenuantes del enfoque de dicho trabajo sobre investigación y no en producción, solamente se concluye en los efectos neurológicos de dicho extracto obtenido.

Dados estos antecedentes, se puede concluir que, la metodología planteada con biorreactores impactaría de manera positiva al enfoque productivo del presente trabajo, *per se*, se podría decir que el impacto positivo se traduciría en producciones tanto de biomasa como polisacáridos considerablemente idóneas para un cultivo estandarizado.

Con respecto a términos cuantitativos de producción de metabolitos bioactivos, Núñez-Urquiza (2017), logro obtener resultados de producción de polisacáridos en matraz de 1.1 g/L con una biomasa de 5.5 g/L. En tanto al biorreactor, obtuvo 4.07 g/L en biomasa y 2.5 g/L de polisacáridos. Esto, de relevante importancia dentro del presente trabajo, pues dada las características del enfoque del proyecto (términos productivos) se marca como referencia impórtate a dicho autor y sus resultados obtenidos en cultivo sumergido.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. ASPECTOS GENERALES DE *GANODERMA CURTISII*

3.1.1. El género *Ganoderma* como grupo taxonómico

El género *Ganoderma* sección –*Ganoderma*- constituye un grupo de hongos basidiomicetes del orden Aphyllophorales, saprofitos, habitantes de los bosques y selvas (creciendo sobre troncos muertos), con múltiples metabolitos de interés medicinal y con más de 200 especies descritas. Compuesto de los subgéneros más representativos que son, *Ganoderma* y *Elfvigia* (P. Karst) Imaz, diferenciados a partir de la presencia y ausencia de laca en su píleo. De acuerdo a Guzmán-Dávalos, *et al.*, (2015), la característica principal del primero (*Ganoderma*) es su brillante superficie del píleo y la presencia de pileipellis himenodermica, con respecto, a *Elfvigia* que presenta un píleo opaco sin presencia de células cuticuladas. (Figura 1).



Figura 1. Especie correspondiente al género *Ganoderma*, concretamente *G. curtisii*, hongo con múltiples metabolitos secundarios.

3.1.2. Descripción taxonómica

Ganoderma curtisii, posee un píleo de 8 a 20 cm de diámetro, cuyo margen es regularmente delgado y la superficie semejante al color del estípite. Posee un estípite delgado, menor a 5 cm de ancho, forma lateral, laqueado, con un color café-rojizo, café-guinda o inclusive café-anaranjado. No obstante, al final queda en tono blanquecino o amarillo debido al descascaramiento de la costra laqueada. La superficie del píleo a nivel microscópico la presencia de pileipellis himenodermica, es una característica sobresaliente del género *Ganoderma*.

En aspectos microscópicos, *G. curtisii* posee un sistema hifal trimitico, posee hifas generativas ramificadas, cuyas paredes son delgadas, septadas y fibuladas de color amarillo. Sus hifas vegetativas carecen de septos, con paredes muy sólidas formadas por un tramo hifal no ramificado y por otro tramo muy ramificado, de color café. Las hifas envolventes tienen un amarillo-pardo (Mushroomexpert, 2019). (Bhosle, S, *et al.*, 2010).

Basidios: hialinos, elipsoidales, tetraspóricos, con fíbula basal, con medidas de 10-20 x 8-11 μm .

Basidiosporas: con regularidad en forma elipsoidal, color pardo claro a marrón con medidas de 6-7.5 x 5-5.8 μm .

3.1.3. Clasificación taxonómica

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase: Holobasidiomycetes

Orden: Aphylophorales

Familia: *Ganodermataceae*

Género: *Ganoderma*

Especie: *Ganoderma curtisii*

De acuerdo a Herrera y Ulloa, (2013)

3.1.4. Hábitat

El hábitat de crecimiento de esta especie es lignícola, es decir, se nutre a partir de residuos lignocelulósicos. Se encuentra en bosques asociada a árboles talados y/o dañados por patógenos, debido a su nutrición saprofita. De igual manera, se han encontrado especies distribuidas en selva baja caducifolia (SBC), como también en especies vegetales de zonas urbanas. Además de ser una especie medicinal, *Ganoderma curtisii* (en general hongos saprofitos aphylophorales), es una especie que tiene un valor importante como bioindicador de ecosistemas fragmentados (Chávez, 2017).

3.1.5. Distribución mundial

Esta especie posee una distribución cosmopolita, en otras palabras, se encuentra en todas partes del mundo (a reserva de regiones árticas), **Figura 2**. Países como Japón y China han tenido una gran tradición en el uso y cultivo de los hongos medicinales.

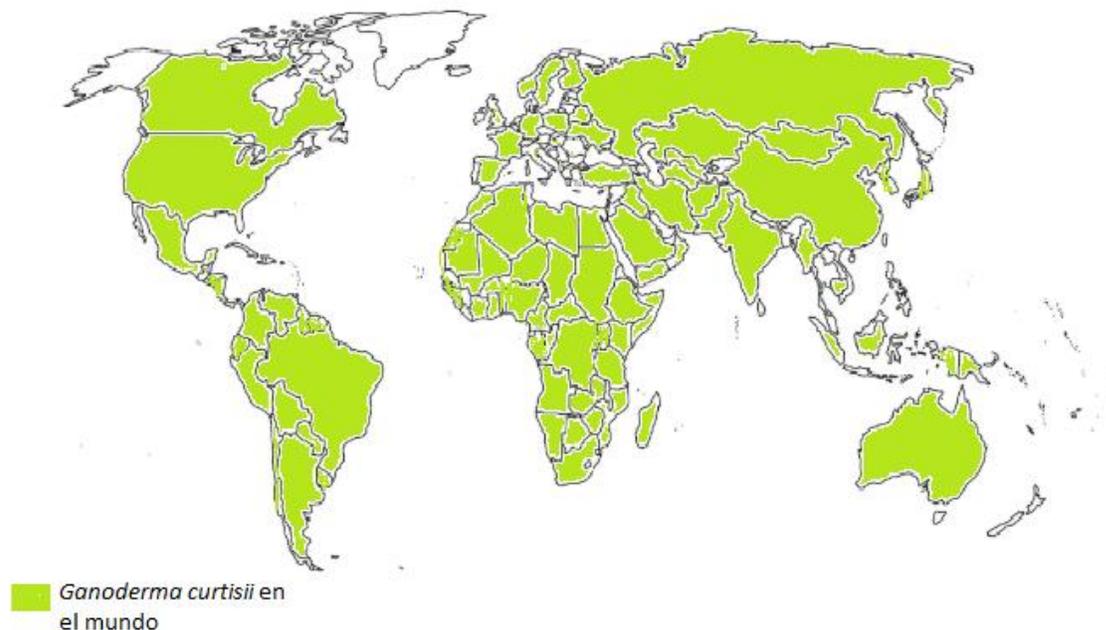


Figura 2. Distribución mundial de la especie *Ganoderma curtisii*.

3.1.6. Distribución de *Ganoderma curtisii* en México

Existen innumerables especies del género *Ganoderma* distribuidas de amplia manera por el territorio mexicano, tanto silvestre como en zonas urbanas. En la parte central de la república se pueden encontrar de manera silvestre, en dicha zona, la existencia de endemismos y diversidad de especies conllevan a demostrar la importancia de esta zona.

Por las características propias de la región como la altitud, el clima, la vegetación o el suelo cuya variación de estos factores abióticos han dado resultado a una gran cantidad de recursos biológicos, que a su vez, dan origen a la riqueza de especies. (Núñez-Urquiza, 2017)

Figura 3. En la **tabla 1** se muestra la distribución de *Ganoderma curtisii* en el territorio nacional, no sin antes mencionar que existen reportes de nueve especies del género *Ganoderma* en México.

Tabla 1. Distribución nacional de la especie *Ganoderma curtisii*, dividido en zonas de acuerdo a los estados es la republica.

Especie	Autores	Estados por zonas
<i>Ganoderma curtisii</i>	Frías (1851)	Zona Norte: Baja California Sur y Nuevo León
	Murill (1908) y Tello (2010)	Zona centro: Distrito Federal, Morelos, Jalisco, y Veracruz.
	Jhonson (1924)	
	Guzmán (1963) y Tello (2010)	Zona Sur: Oaxaca y Guerrero
	Castillo y Guzmán (1970)	



Figura 3. Distribución a nivel nacional de *Ganoderma curtisii*, pueden observarse en guinda los estados con reportes de esta especie.

3.1.7. Estudios pre-clínicos sobre *Ganoderma* spp.

De acuerdo con la literatura científica, *Ganoderma lucidum* es un hongo macroscópico con principios activos con efectos antineoplásicos presentes en extractos. Los reportes indican que dichos principios tienen una gama amplia sobre diversos cánceres, tanto *in vitro* como también en ensayos en seres humanos.

El efecto antitumoral presente en extractos de *Ganoderma lucidum* está reportado dentro del accionar mediadora de las citosinas, que inhiben la angiogénesis (formación de vasos capilares que a su vez portan nutrientes a la célula cancerígena), de esta manera se induce apoptosis de las células tumorales. (Núñez-Urquiza, 2017).

Otra de las propiedades de este hongo radica en su efecto neuroprotector, esto basado en el hecho que esporas de esta especie aliviaban el estrés oxidativo, protegiendo a las neuronas de la apoptosis que por consiguiente mejoraba la disfunción cognitiva. Otra de las formas en cómo se reportan dichos efectos neuroprotectores, está descrito en el estudio de los polisacáridos presentes en el extracto, para este caso se trataba la isquemia.

De igual forma, Ma, H. T., Hiseh, J. F., y Chen reportan en 2015, el efecto de los extractos de *Ganoderma* spp., como antiglicémicos esto debido a los metabolitos secundarios, principalmente polisacáridos, por lo cual dicho extracto puede ser utilizado en el tratamiento de la diabetes mellitus.

En 2017, Liu, Y., *et al.*, demostraron que los extractos de *Ganoderma lucidum* poseen un efecto hepatoprotector (protección a nivel de hígado), debido a los polisacáridos presentes que actúan contra el daño hepático. Dichos autores, utilizaron carbo-tetraclorado (CCl₄) para inducir daño *in vitro* a células hepáticas, posteriormente fueron aplicados tratamientos con extractos de dicho hongo, cuyos resultados obtenidos demostraron la eficacia protectora.

Tales son los reportes de la evidencia científica lo que avala la totipotencialidad de *Ganoderma* spp, por tal motivo, el enfoque biotecnológico para la producción de metabolitos biológicamente activos magnifica el enfoque de un trabajo dirigido a los aspectos industriales. En estos términos, el desarrollo de metodologías con enfoque productivos enriquece la estandarización de procesos alimenticios u/o relacionados con el desarrollo farmacológico.

3.2. ASPECTOS BIOTECNOLÓGICOS PARA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

3.2.1. Producción de metabolitos secundarios en la industria

A lo largo de la historia el hombre ha buscado la manipulación de la naturaleza para el beneficio propio, a veces, inconmensurablemente. Tal argumento puede ser observado en el hecho de la producción industrial de productos secundarios derivados de microorganismos u otros organismos y/o derivados biológicos. Por citar un ejemplo, en la figura de Alexander Fleming (descubridor de la penicilina) se respalda lo anterior, con tal hecho Fleming dio un paso importante a la era de la ingeniería bioquímica.

En la actualidad, cultivar microorganismos, tanto de manera experimental en ciencia como en la industria misma, ha sido desarrollado más como arte que como ciencia, teniendo a la intuición más como virtud que la lógica (Quintero-Ramírez, 1990).

Desde que el hombre ha ido avanzando en la vida, ha sido capaz de utilizar y perfeccionar diferentes métodos biológicos para producir o conservar alimentos, textiles o productos para salvaguardar su salud (por ej. antibióticos, vitaminas entre otros).

Otra de las figuras ilustres que determinó los pasos pioneros al desarrollo de esta ciencia (ing, bioquímica), recae en la persona de Louis Pasteur quien demostró de manera indiscutible, que el proceso de fermentación alcohólica era producida por microorganismos. (Quintero-Ramírez, 1990).

Con tales argumentos, se han forjado las bases más importantes de la producción industrial actual, pues gracias a ello, se han aplicado tecnologías con amplia gama en distintos rubros de la industria moderna, como se mencionó con anterioridad tanto en producción de alimentos como de fármacos mismos. Es por tal motivo que el estudio de los principios de la fermentación y de la bioquímica misma, ofrecen un grato panorama hacia la producción de metabolitos secundarios derivados de organismos fúngicos (enfoque del presente trabajo) cuyo impacto radica en la simplificación del trabajo elaborado (tiempo y rendimiento).

3.2.2. La fermentación como proceso industrial

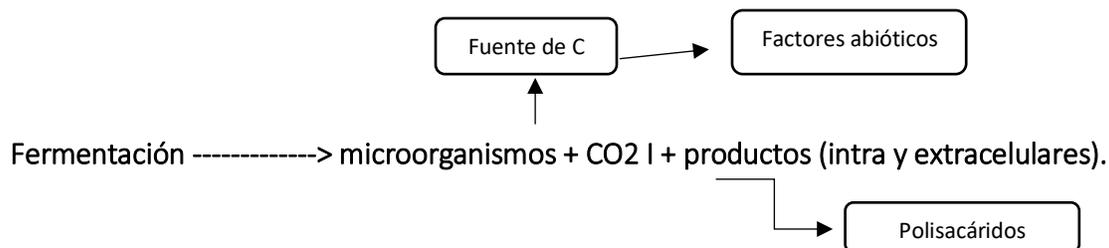
En palabras de Quintero-Ramírez, 1990, la industria moderna tiene como fin aprovechar los procesos bioquímicos, bajo ciertas condiciones controladas, los materiales biológicos tales como microorganismos, tejido celular, productos microbianos y enzimas., cuyos productos finales sean aprovechados comercialmente. Con el enfoque netamente industrial del presente, cabe resaltar la importancia de axiomas industriales para el correcto desempeño de las metodologías (biorreactor) a desarrollar.

Por tal circunstancia, es preciso tomar en cuenta al proceso industrial con mayor influencia dentro del amplio panorama de la industria moderna, la fermentación alcohólica. Aunado a que los procesos desarrollados en un biorreactor, son procesos puramente relacionados con la fermentación alcohólica. A continuación se muestra la tabla del proceso de fermentación alcohólica y sus elementos (**Tabla 2**).

Tabla 2. Representación de los factores que intervienen en el proceso de fermentación alcohólica

Microorganismos	Elementos nutrimentales	Condiciones ambientales
Bacterias	C,H,O,N,S,P	pH
Levaduras	Metales	Temperatura
Hongos	Vitaminas	Viscosidad
Tejido Celular, etc.	Etc.	Oxígeno disuelto, etc.

Como se muestra en la anterior tabla, la fermentación alcohólica conlleva una serie de requisitos específicos para poder llevarse a cabo, por consiguiente, el resultado de una fermentación adecuada da como resultado productos secundarios (metabolitos biológicamente activos). Para que estos productos secundarios puedan obtenerse de manera eficaz se plantea el siguiente esquema general.



Cuando en una fermentación existen moléculas de oxígeno (agregadas al sistema) se le conoce como fermentación aeróbica y hay desprendimiento de CO₂, pero cuando el oxígeno no está presente, se le denomina anaerobia. Es de suma importancia conocer las bases fundamentales de este proceso bioquímico, debido a, son las atenuantes significativas a tomar en cuenta en el biorreactor.

3.2.3. El cultivo diáuxico

El cultivo diáuxico es el tipo de crecimiento celular en el cual existen dos sustratos limitantes, bajo estos alicientes, la cinética se lleva a cabo. Primeramente, el aprovechamiento de la fuente de carbono que posea una mayor facilidad de metabolización, será consumida. En un segundo término, esta aquella fuente de carbono que sea un poco más difícil metabolizar para el organismo en cuestión. (Quintero-Ramírez, 1998). **Figura 4.**

Generalmente, se observa este tipo de crecimientos en organismos microscópicos (bacterias, hongos, levaduras, etc.) donde existen diferentes variables que determinan el comportamiento cinético (K_s , $Y = X/P$, t_d) (Quintero-Ramírez, 1998).

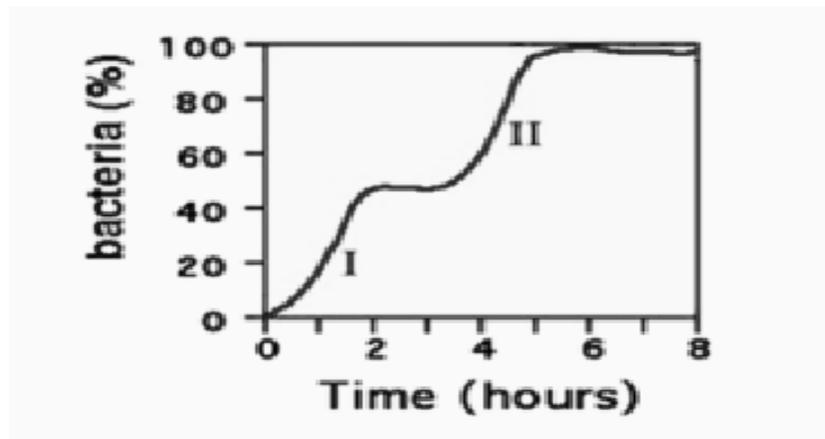


Figura 4. Esquema de una gráfica del cultivo tipo diáuxico. Este tipo de modelo cinético se debe a dos fuentes de carbono, donde, el crecimiento celular se desarrolla en dos momentos.

En el presente, el uso de este tipo de modelo cinético fue la elección a realizar a lo largo del proyecto, pensando, que la aplicación de dos diferentes fuentes de carbono con diferente biodisponibilidad, beneficiaría en determinado momento la producción de polisacáridos extracelulares.

3.2.4. El biorreactor

Un biorreactor, es un dispositivo que permite aprovechar al máximo los diferentes tipos de cultivos que él se viertan como son: tejidos vegetales, hongos, bacterias entre otros. Es esta gran ventaja lo que permite generar estrategias productivas de índole industrial.

Para el caso del presente trabajo, la utilización del biorreactor (tanque agitado) representa una estrategia eficaz para la producción de metabolitos secundarios extraídos o excretados al medio, *per se*, comparado con el cultivo tradicional (sólidos agroindustriales) representa una forma más viable en cuanto a tiempo y rendimiento esperado.

Los biorreactores pueden dividirse en: tanque agitado, por columna de burbujeo o reactores de lecho, cada uno con su respectiva especificidad de acuerdo al uso a emplearse. El biorreactor a tanque agitado cuenta con características acorde al aprovechamiento del uso de este, sus cualidades físicas son las siguientes, recipiente cilíndricas alargadas acorde a la altura y anchura, una base redondeada, agitador mecánico, reflectores que mantienen la turbulencia y agitadores en la parte superior que sirven como mediadores de la espuma (Castillo, 2006). (Figura 5).

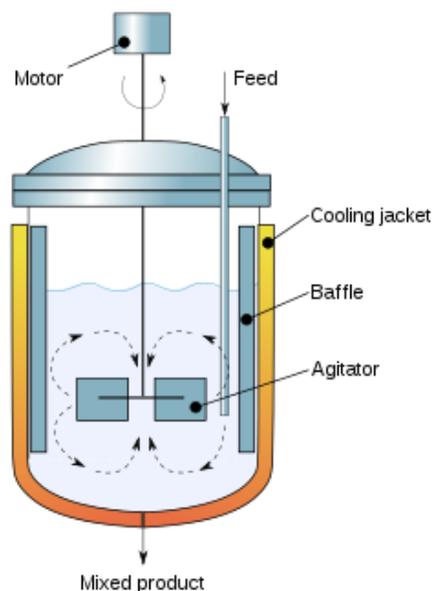


Figura 5. Imagen de un biorreactor tipo tanque agitado por el cual se produjeron los metabolitos secundarios de *Ganoderma curtisii*.

En la actualidad, este tipo de dispositivos son ampliamente utilizados dentro de la industria, una de las ventajas radica en que su agitación es mecánica a través del eje provisto de turbinas en función de un motor. La entrada de aire se sitúa en la parte inferior del tanque que a su vez es distribuido por pequeños orificios, estos, golpean las aspas de la turbina generando así burbujas que reparten el oxígeno disuelto hacia el interior del líquido. (Núñez-Urquiza, 2017).

La agitación, es complementada con los deflectores dispuestos en el sistema, generalmente constan de 4 a 6 cuya finalidad es romper el movimiento circular que generan las turbinas al medio líquido, esto genera un mejor mezclado. (Núñez-Urquiza, 2017). Finalmente, en la parte externa, está rodeado por una camisa en la cual el agua puede circular, esto permite tener un control de la temperatura.

3.2.5. Estudios enfocados en la obtención de metabolitos en biorreactor

Es basta la literatura científica que califica con notoriedad positiva la eficacia del biorreactor de tanque agitado, empero, los numerosos trabajos abarcan aspectos con un enfoque industrial de diferentes índoles como: alimenticio (principalmente) o agroecológico. Son estas vicisitudes, lo que avala en términos cuantitativos la eficacia del biorreactor de tanque agitado como modelo de trabajo para el presente.

Por citar un ejemplo, el trabajo de Min-Lee, Young-lee y Yong-lee (1999) fue realizado con la intención de obtener metabolitos secundarios expulsados al medio (exopolisacáridos), esto resultado gratificante pues, demostraron que manteniendo condiciones óptimas en el biorreactor los resultados pueden ser buenos.

Existen otros casos, tal argumento recae en Choi, Maeng, Ding y Cha (2007), quienes de igual manera tuvieron como fin obtener exopolisacáridos, sin en cambio, se enfocaron en la producción de otro hongo aphylophoral: *Fomiptosis pinicola*, al igual que Min-Lee, Young-lee y Yong-lee (1999) concluyen que las condiciones adecuadas de un biorreactor magnifican considerablemente la producción metabolitos.

Bajo estos esquemas, se plantea tener el respaldo adecuado para ampliar con certeza el uso del biorreactor, pues como lo muestra la literatura, es remunerable su aplicación en términos productivos. Por este hecho, adecuar de manera precisa todos los alicientes entorno a las variables existentes en el biorreactor contribuiría positivamente en el momento de la producción de metabolitos secundarios.

3.2.6. La innovación tecnológica como fuente de la industria moderna

En la actualidad, la sociedad cada vez demanda más y mejores tecnologías, productos o servicios que satisfagan las necesidades del ente social. Ante el hecho innegable de tal tendencia, se dice que las sociedades modernas, dentro del nicho del tejido industrial, tienen mejores oportunidades de crecimiento económico aquellas que incorporan el conocimiento técnico-científico que producen.

Dado que, la tecnología y el conocimiento son conceptos que van de la mano, es indispensable que tales axiomas estén en constante innovación. En palabras de Sancho, (2007) cita que el concepto de innovación se entiende por la habilidad para convertir de manera creativa el conocimiento fresco en novedosos o mejores productos y servicios como respuesta al demandante mercado, como a otras necesidades del ente social.

Ante este aliciente, se suscita el crecimiento económico de un país, así como, la competitividad internacional en los mercados que se refleja en el propio nivel de vida de la sociedad. En otras palabras, el ranking económico de los mercados de un país, como sus rentas, están íntimamente ligados con su capacidad de innovación (Sancho, 2007).

Por tal razón, la empresa ACyPROVEMI, empresa líder en productos de origen fúngico en México, busca impactar de manera positiva en el rubro del desarrollo biotecnológico de productos a base de hongos macroscópicos. Para tal situación, dentro de la propuesta productiva se generaron los pasos acertados del desarrollo del proyecto a partir del *Start-up* empresarial. **(Figura 6).**



Figura 6. Estructura esquematizada para la creación de un *Start-up* del producto.

De acuerdo a Steve Blank, (2012) el *Start-up* es la organización temporal en busca de un modelo de negocios escalable y replicable. Con respecto a esto, Cornejo-Martínez nos dice que en general esto es la organización (temporal en primer paso) que constantemente busca un modelo de negocio rentable, por lo tanto, es muy cambiante.

Son por estos motivos por lo que se considera un punto importante hacia el desarrollo futuro del presente trabajo, pues el vínculo que se pretende establecer con la industria, nos implica ofrecer productos innovadores, objetivo que ACyPROVEMI tiene claro en la búsqueda del desarrollo tecnológico.

3.3. ASPECTOS INTEGRALES PARA EL DESARROLLO DEL PRODUCTO A BASE DE METABOLITOS DE *G. CURTISII*

3.3.1. Los suplementos alimenticios en México

En la actualidad, existe un vasto número de productos que afirman poseer múltiples propiedades para el beneficio en la salud. No obstante, muchos de esos productos no garantizan un grado de fidelidad.

En México, la ley general de salud en su artículo 221, dentro de los insumos a la salud, explica detalladamente cada una de las definiciones para determinados productos distribuidos en el mercado nacional (Fármacos, Fitofármacos, Medicamento homeopático, Remedio herbolario o Suplemento alimenticio). (COFEPRIS, 2018).

Dentro de la amplia gama de suplementos, se encuentran aquellos que por determinadas propiedades nutricionales pueden contribuir a la mejora del estado de salud en algunos pacientes (vitamínicos, hierro, zinc, calcio). (Riveros y Baquero, 2004).

Para Riveros y Baquero (2004), la mejor definición de suplemento, radica en la palabra nutracéutico, debido a que la composición de estos, determinan puntualmente en aspectos preventivos de enfermedades o mantenimiento de la salud. Además que su administración está dada en diferentes etapas de la vida así como, se desarrollan con las mismas normativas que los fármacos.

Martínez-Carrera (2007), menciona que la creciente demanda de productos naturales, está encaminada por la gran globalización de los mercados, aunado a, el crecimiento comercial que ha tenido México en determinados nichos. De acuerdo a datos, hoy en día la actividad económica mundial relacionada con los hongos, representa un valor económico de 30 billones de dólares, y una producción de 7 millones de toneladas anuales (Hongos comestibles, funcionales). (Martínez-Carrera, 2007).

En México, esta actividad económica aun es parte de una limitada industria dentro del sector primario, esto, en gran parte se debe a la falta de investigación en torno al uso funcional de los diferentes hongos silvestres de la nación, (Martínez-Carrera, 2007).

Por tal motivo, la explotación de un nicho económico aun poco explorado, agregando que, las herramientas biotecnológicas de hoy en día, pueden resultar una combinación idónea hacia la búsqueda del desarrollo de nuevos productos naturales comerciales a partir de especies fúngicas nativas.

Para el caso del presente, *Ganoderma curtisii* ofrece una amplia gama de aplicaciones en giro a sus diferentes propiedades farmacológicas que posee. Añadiendo, que se parte del estudio de una especie nativa, que ya está en explotación industrial y de investigación,

3.3.2. Preservación del producto mediante adición de conservadores

Con el paso del tiempo, la historia de la producción de alimentos se ha ido implementando con la duración de estos en periodos prolongados. A esto, la existencia de los aditivos o conservadores han establecido un papel importante, Schmidt-Hebbel (1990), los define como sustancias agregadas voluntariamente a los alimentos, justificando, por ende su preservación.

En los últimos años, diferentes organismos mundiales (ej. FAO, FDA u OMS), han moderado el término a sustancias que en general carecen de valores nutricionales, composición bien conocida y que al agregarse a los alimentos debe ser controlada y en cantidades moderadas. (Schmidt-Hebbel, 1990).

Como todo agente externo, se necesitan regular con normas específicas que avalen su correcta función, es por eso, que el permiso para ciertos aditivos alimentarios requiere de ciertos *conceptos fundamentales*.

1. Que el aditivo cumpla con **finestecnológicos**: generan apoyo eficiente en producción, procesamiento, acondicionamiento, envase, transporte o almacenamiento del alimento. Un ejemplo de esta índole es el ácido ascórbico cuyo potencial radica en ser un excelente antioxidante en lípidos, contra oxidación corrosiva de enlatados, como clarificante y estabilizador del potencial de óxido-reducción en vinos y cervezas.
2. Que el aditivo **preserve la calidad nutricional**: contribuyen a la no desintegración de componentes valiosos de los alimentos. Ejemplo, la adición de antioxidantes para proteger los carotenos.
3. Que el aditivo conserve o **mejore los caracteres organolépticos**: ayudan a conservar la estabilidad del alimento. Como ejemplos se tienen a los antisépticos, antioxidantes, texturizantes.

(Tomado de la FAO en Schmidt-Hebbel, 1990).

Dentro de las normativas específicas, se mencionan diferentes definiciones para cada uno de los aditivos, cuya función también está redactada.

1- Estabilizadores

A. **Preservadores o Antisépticos:** Ácidos: benzoico, sórbico, propiónico, ésteres del ácido para-hidroxibenzoico y sus respectivas sales; todos hasta 1 g/kg; nitratos: hasta 500 mg/kg; nitritos hasta 125 mg/kg (sorbatos: hasta 2 g/kg).

B. **Antioxidantes y sus sinergistas:** Ácido L-ascórbico, sus sales y ésteres; Tocoferoles, lecitina, galatos (100 mg/kg), butilhidroxianisol: BHA (200 mg/kg, butilhidroxi-tolueno: BHT (200 mg/kg), butilhidroquinona terciaria: (BHTQ) (200 mg/ kg); citrato de mono-isopropilo (100 mg/kg); etilendiamino-tetraacetato (EDTA), sal disódica (250 mg/kg).

C. **Gases protectores:** Anhídrido carbónico, nitrógeno para envases impermeables.

2-Texturizantes

A. **Emulsionantes:** Lecitina, mono y di-glicéridos y sus ésteres con los ácidos comestibles (acético, cítrico, tartárico, láctico); ésteres del poliglicerol, del propilenglicol y de la sacarosa con ácidos grasos comestibles (5 g/kg), estearil-lactilato de sodio y calcio (5 g/kg). Fosfatos diversos y Polifosfatos (5 g/kg).

B. **Higrostaticos:** (estabilizadores de humedad): Sorbitol, Manitol, Glicerol.

C. **Espesantes y Cohesionantes:** (usados generalmente, hasta 5 g/kg): - Ej. Espesantes químicos, gomas vegetales y gelificantes.

3- Sustancias de recubrimiento

Protegen la superficie por la posible pérdida de humedad, principal mente usados en cárnicos, quesos, frutos cítricos entre otros. Algunos ejemplos destacan los siguientes productos, pectina, gelatina, parafina, goma laca.

4-. Sustancias antiglomerantes, deslizantes y antihumectantes

Se utilizan en partículas finas como la sal, alimentos en polvo. Algunos ejemplos son los estearatos de calcio y de magnesio, silicatos de calcio y de magnesio, sílice coloidal (hasta 15 g/kg).

5-. Agentes antiespumantes

Principalmente utilizados en bebidas y mermeladas cuyas proporciones son (10- 100 ppm); Ej. Dimetilpolisiloxano (silicona) o aceites comestibles.

6-. Agentes de blanqueo de harinas

Los principales agentes utilizados son el ácido ascórbico, bromato de potasio con proporciones de 50 mg/kg (máx.), peróxido de benzoilo 40mg/kg (máx.).

7-. Agentes leudantes

Utilizados en los polvos para hornear pues debido a su naturaleza, permiten la fermentación de la masa. Ej. Levadura fresca, bicarbonato de sodio con tartrato ácido de potasio, fosfato monocalcico.

8-. Agentes aditivos con función sensorial

Se encargan de acentuar el sabor y/o el aroma del producto. Como ejemplos se tienen aromatizantes naturales como esencias de especias. Ejemplo de saborizantes están ácidos lácticos, cítrico, tartárico, málico, fumárico, adípico, glicolico-delta-lactona (sabores ácidos), cloruro de sodio, glutamato de sodio (sabores salados), edulcorantes calóricos, intercambiables y sintéticos (sabores dulces), carotenos y derivados, carotenoides (como agente colorante).

(Schmidt-Hebbel, 1990).

Por la naturaleza del producto (extracto de *Ganoderma*), la mejor opción para elegir un aditivo fue ácido sorbido (1g/L), pues lo que se pretende al tener el producto embazado es poder mantenerlo en condiciones óptimas durante un tiempo prolongado.

Debido a las cualidades del ácido sòrbico como antioxidante, y el ácido ascórbico, como antiséptico, se eligieron estas opciones para preservar el producto a base de metabolitos secundarios de *Ganoderma*.

3.3.3. Los glucanos como metabolitos con propiedades farmacológicas

Los glucanos son grupos formados por bastas unidades monómericas de azúcares llamados D-glucosa, corresponden al grupo de polisacáridos y su función farmacológica está demostrada en diferentes rubros de la medicina. Otros aspectos importantes de estos polisacáridos es que están unidos por enlaces glucosídicos, su longitud de cadena y cierto grado de ramificación (Wagner, *et al.*, 1990).

3.3.3.1. Los alfa-glucanos

Los glucanos alfa o α -glucanos, son el grupo de polisacáridos que se forman por D-glucosas unidas por enlaces glucosídicos del tipo α (Figura 7). Algunos ejemplos son el almidón o el glucógeno. (Wagner, *et al.*, 1990). Una cualidad importante de los alfa-glucanos, es ayudar en el proceso de metabolización de los azúcares, estos, controlan la absorción de azúcar presente en la dieta.

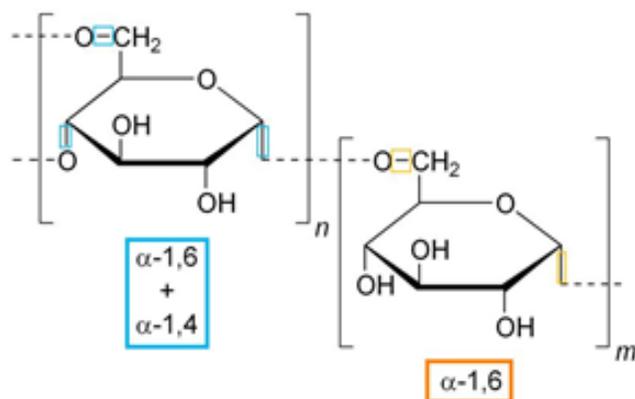


Figura 7. Estructura química de los α -glucanos presentes en el extracto de *Ganoderma curtisii*.

3.3.3.2. Los beta-glucanos

Los glucanos beta o β -glucanos, son el grupo de D-glucosas enlazadas del tipo β -(1,3) y (1,6), es sabido que este tipo de moléculas se encuentran por todo el reino de los hongos, plantas y algunas algas. (Wagner, *et al.*, 1990). (Figura 8). Inclusive, en algunos grupos de hongos forman parte de su pared celular, esto en cierta medida, les sirven como parte de sus estructuras.

Una de las razones más importantes por la cuales se han estudiado durante los últimos años, se debe a su capacidad inmunomodulador frente a determinados antígenos tanto en animales como en el ser humano. La razón por la cual existe esta reacción inmunológica, es en gran parte por la producción de macrófagos presentadores de antígenos, quienes se encargan de fagocitar bacterias y otros microorganismos. (Wagner, *et al.*, 1990).

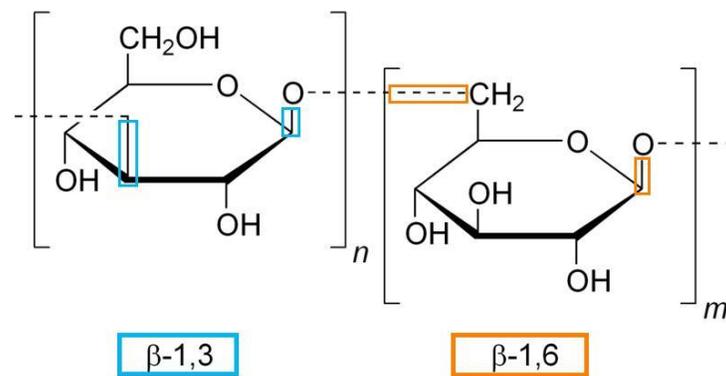


Figura 8. Estructura química de los β -glucanos (1,3) y (1,6) presentes en el extracto de *Ganoderma curtisii*.

3.3.4. Los polifenoles como agentes antioxidativos

En la naturaleza, hay un conmensurable grupo de compuestos químicos en cuya estructura, existe una o varios grupos de anillos fenólicos, a estos compuestos, se les denomina polifenoles. (Quiñones, *et al.*, 2012). Para poder determinar el grupo de polifenoles, como su función, es necesario conocer la cantidad de anillos fenólicos que estos poseen. Algunos de los principales grupos fenólicos son los siguientes: ácidos fenólicos, estilbenos, lígnanos, alcoholes fenólicos y los bien conocidos flavonoides. (Figura 9).

La importancia de estos metabolitos, recae en sus propiedades antioxidantes, como también existen estudios que demuestran poseer propiedades antitromboticas, antiinflamatorias, antiapoptoticas como vasoprotectoras y vasodilatadoras. (Quiñones, *et al.*, 2012).

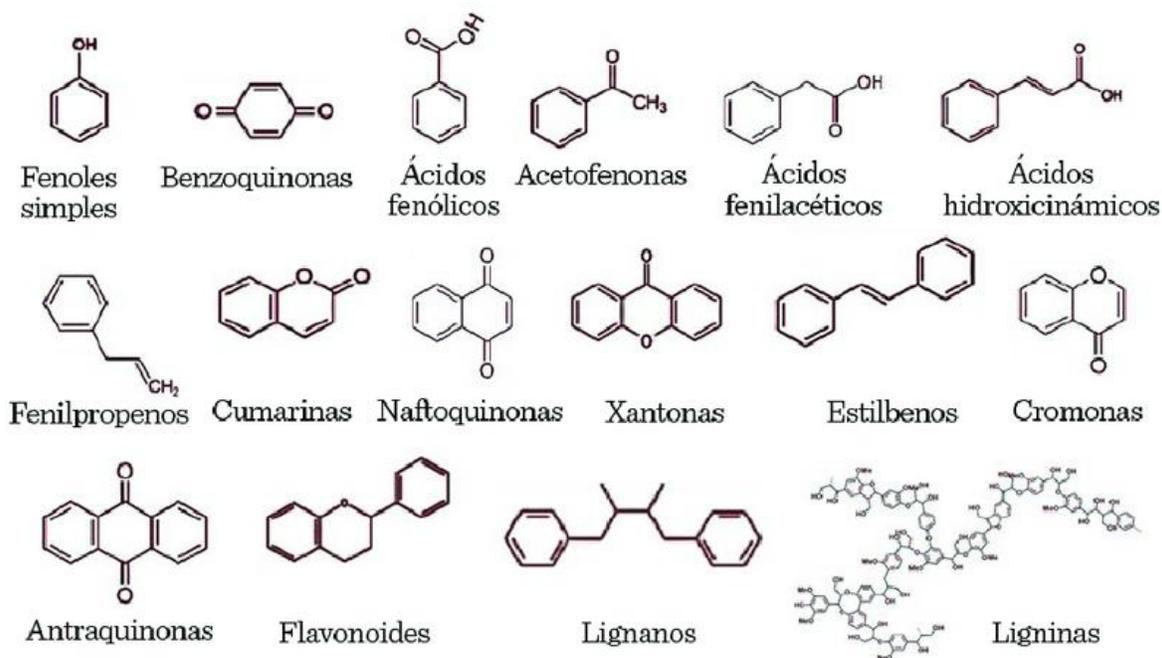


Figura 9. Estructura química de los distintos grupos de polifenoles

3.3.5. Adición de suplementos vitamínicos (Complejo B y Zinc)

Los diferentes grupos nutricionales (zinc, hierro o vitaminas entre otros) que se encuentran en los suplementos (nutracéutico), proveen de distintas sustancias que pueden beneficiar la salud de determinados pacientes en respectivas etiologías médicas (Riveros y Baquero, 2004).

El zinc, es un elemento importante para el desarrollo adecuado de las personas en sus primeras etapas de vida, como en etapas futuras. Solo detrás del hierro (Fe), es el segundo elemento más abundante del cuerpo (*Biblioteca Nacional de Medicina de los EU en Medlineplus*, 2019). Su principal función en el organismo recae en el desarrollo del sistema inmunológico como también su mantenimiento, ya que, es parte de todas las células del cuerpo.

De igual forma, el Zinc participa en la división celular, crecimiento celular, cicatrización y en la metabolización de los hidratos de carbono. Por ende, una adecuada alimentación rica en Zinc, ofrece una mejor respuesta inmunológica frente a algunas enfermedades infecciosas como al mantenimiento de la salud. (*Biblioteca Nacional de Medicina de los EU en Medlineplus*, 2019).

El complejo B, son sustancias orgánicas que en medida ayudan al organismo a desarrollarse adecuadamente, entre ellas están, Tiamina (Vitamina B1), Riboflavina (B2), Niacina (B3), ácido pantoténico (B5) Vitamina B6, Biotina (B7) y la vitamina B12. Algunos autores incluyen al ácido fólico dentro del complejo B. La falta de algunas de estas vitaminas, puede conducir a severas enfermedades como es el caso de la Anemia a falta de Vitamina B6 o B12 (*Biblioteca Nacional de Medicina de los EU en Medlineplus*, 2019).

El presente trabajo, plantea la agregación de estos dos elementos al extracto para una mejor comercialización en mediano plazo.

4. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad el cultivo de *Ganoderma* spp., provee de grandes beneficios socioeconómicos a nivel mundial manifestado en una producción industrializada y relativamente masiva. Esto, debido a las propiedades farmacológicas que posee, entre las más importantes, inmunomoduladoras y anticancerígenas.

Sin embargo, en México su producción es limitada y solo se tienen registros de producciones caseras dentro de la república, o datos no registrados en alguna plataforma, esto se debe principalmente al desconocimiento de las técnicas de cultivo y al proceso de comercialización. Además, los rendimientos obtenidos bajo el esquema de cultivo tradicional (cultivo de basidiomas) resultan ser poco efectivos económicamente para el productor.

El uso de herramientas biotecnológicas, ha venido a revolucionar la producción de metabolitos funcionales, con procedimientos que permiten la estandarización de los métodos, así como, homogeneización de los metabolitos producidos. Sin embargo, los rendimientos aún son bajo y están poco estandarizados para la producción a gran escala.

La empresa ACyPROVEMI, comercializadora de productos de origen fúngico, desea incrementar los rendimientos en un proceso de producción de metabolitos con actividad funcional, principalmente polisacáridos, por el interés como reguladores del sistema inmunológico, por lo que, el presente estudio tiene como objetivo mejorar los rendimientos que se tienen actualmente, modificando condiciones, así como, fuentes de carbono utilizadas para la producción de polisacáridos.

5. HIPÓTESIS

En un sistema de crecimiento diáuxico, mediante las modificaciones de las condiciones de cultivo se puede incrementar la biomasa y en segundo ciclo de crecimiento aumentar la producción de polisacáridos extracelulares de *Ganoderma curtisii*.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general:

- Incrementar el rendimiento y producción de polisacáridos y biomasa producidos por *Ganoderma curtisii* en un sistema de cultivo sumergido modificando las condiciones de cultivo.

6.2. Objetivos específicos:

- Evaluar el rendimiento de los α y β glucanos de *Ganoderma curtisii* modificando las fuentes de carbono a nivel de matraz.
- Establecer un cultivo de crecimiento celular modificando la temperatura de cultivo.
- Escalar el proceso de producción a nivel biorreactor en tanque agitado.
- Evaluar el comportamiento de producción de polisacáridos extracelulares y biomasa al inducir un sistema de cultivo diáuxico.
- Evaluar el rendimiento de los α y β glucanos de *Ganoderma curtisii* modificando las condiciones de crecimiento a nivel biorreactor tanque agitado a 30°C.
- Determinar la cuantificación de polifenoles totales en el cultivo de *Ganoderma curtisii* en biorreactor tanque agitado a 30°C.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. Material Biológico y activación de la cepa

Se activó la cepa *Ganoderma curtisii* COBIOCH UAEMor G-397 del cepario del Centro de Investigaciones Biológicas, la cual se encuentra en actual explotación industrial. La activación se realizó resemebrando la cepa en diferentes medio de cultivo tanto sólidos como líquidos. El cultivo solido consiste en el uso de las cajas de Petri, mientras que, el cultivo liquido en matraces con medio líquido.

7.2. Preparación de preinóculo

La preparación del preinóculo, se efectuó bajo los siguientes esquemas, malta 30 g/L y agua destilada 300 ml colocada en un matraz de 500 ml para su correcta agitación y disolución de la malta. Se colocaron 100 ml en matraces Erlenmeyer, posteriormente, los matraces se llevaron a la esterilización en la olla exprés a 15 lb por min de presión durante 20 minutos. Al próximo día, con los matraces esterilizados, se inocularon con pequeños trozos provenientes de la caja de Petri con la cepa G-397 de *Ganderma curtisii*. Por último se colocaron en la agitadora durante un aproximado de 7 días a 200 rpm para que el micelio pueda desarrollarse correctamente.

7.3. Medio de cultivo modificado y factores determinantes

Una vez hecho el preinóculo, se realizó la preparación del medio de cultivo. Este consiste en agregar malta (30 g/L) y cereal (20 g/L). Para aumentar las condiciones del cultivo, primeramente se llevó al punto de ebullición en tres repeticiones con solo el cereal agregado, se filtró tres veces para evitar residuos y al final se agregó la malta. Se prepara para 500 ml en matraz de 1 litro para la adecuada disolución de los ingredientes. Finalizado esto, se procederá a esterilizar a una presión de 15 lb por min durante 25 minutos. Por paso último, se inoculo con el preinóculo previamente elaborado, se utilizó micropipeta para hacer la inoculación, aumentando las condiciones de profilaxis.

Se planteó elaborar distintas condiciones abióticas para la evaluación del crecimiento micelial. Estas consistirán en las siguientes: temperatura a 25°C, 30°C y 35°C, esta condición permitirá evaluar los diferentes metabolitos que pudiesen estar presentes, derivado del metabolismo (primario o secundario).

Con estas condiciones, más las fuentes de carbono y la agitación, se han propuesto estos tres nutrientes pertinentes al experimento, lo cual nos permitirá evaluar la producción de biomasa y polisacáridos en función a estas condiciones del medio.

7.4. Cinética de crecimiento

Las cinéticas de crecimientos se realizaron por medio de los matraces Erlenmeyer de 1,000 ml (600 ml volumen trabajo) que se han inoculado previamente con la cepa G-397 (esterilizado y en reposo por 24 horas). Para esto se dejaron en la agitadora a 200 rpm durante 48 horas, al haber pasado ese tiempo, se continuara con la toma de muestras cada 48 horas durante 10 días. La cuantificación de biomasa y polisacáridos presentes en el medio se obtuvo de cada muestra, tomando 100 ml de medio.

Las cinéticas serán de igual forma evaluadas con los elisitors previamente descritos con las condiciones abióticas.

7.5. Cuantificación de la biomasa en el medio modificado

La cuantificación de la biomasa consiste en una técnica basada en la medida del peso seco, está básicamente consiste en, pesar el papel filtro (conocer su peso exacto) y el extracto con la biomasa presente será filtrado. Con sutiliza se tendrá que remover los residuos de medio presentes para evitar cualquier alteración. Terminado esto, se dejara el total de biomasa en el trozo de papel filtro durante 48 horas a una temperatura de 60°C hasta obtener el peso constante. La cuantificación se llevara a cabo cada 48 horas.

7.6. Cuantificación de los polisacáridos en el medio modificado

Para la evaluación de la producción de polisacáridos de los matraces Erlenmeyer (1,000 ml) se mezclara el sobrenadante con etanol (proporción 1:1), es decir, 100 ml de sobrenadante con 100 ml de etanol. Al precipitar los polisacáridos, se pasaran por papel filtro, previamente pesado, así estos quedarán en el papel filtro. Al final, se dejara el papel filtro con los polisacáridos en incubadora a 60°C durante 48 horas hasta obtener el peso constante y poder cuantificarlos.

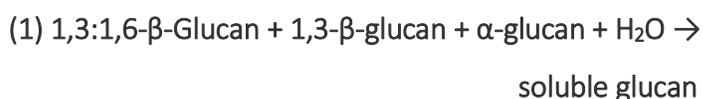
7.7. Cuantificación de α y β beta glucanos

Para la cuantificación de alfa y beta glucanos se utilizara el kit enzimático Megazyme para hongos y levaduras K-YGBL, este consiste en hidrolizar los glucanos (presentes en extracto) tanto alfa como beta por medio de ácido clorhídrico (HCL) y ácido sulfúrico (H₂SO₄), con esta técnica la cuantificación de estos metabolitos es notablemente eficaz cuyo principio se expresa en la parte inferior.

De acuerdo a McCleary y Draga (2016), existen 5 diferentes vías mediante las cuales se pueden obtener los resultados, sin embargo, para especies propias del genero *Ganoderma*, recomienda la hidrolisis con H₂SO₄.

Principio:

(12 M H₂SO₄, 0°C, 2 h)



(1 M H₂SO₄, 100°C, 2 h)



(*exo*-1,3- β -glucanase + β -glucosidase)

(3) Laminarisaccharides + H₂O → D-glucose

(glucose oxidase)

(4) D-Glucose + H₂O + O₂ → D-gluconate + H₂O₂

(peroxidase)

(5) 2H₂O₂ + p-hydroxybenzoic acid + 4-aminoantipyrine →
quinoneimine + 4H₂O

7.7.1 Técnica de Solubilización e hidrólisis parcial de glucanos totales (α -glucano + β -glucano) + D-glucosa en oligosacáridos, sacarosa y libre de D-glucosa.

1. Colocar 100 ml de muestra líquida exactamente pesada en un tubo de cultivo Fisher Brand 20 x 125 mm. Hacer las réplicas requeridas para cada muestra (n =2). Realizar el mismo procedimiento para el control.
2. Añadir 1.5 ml de ácido clorhídrico concentrado (37% v/v) a cada uno de los tubos, tapar los tubos y agitar en vórtex por 5 min.
3. Colocar los tubos en baño María a 30 °C durante 1 h y agitar en vórtex cada 15 min (para asegurar la disolución completa del β -glucano).
4. Añadir 10 ml de agua destilada a cada tubo, tapar los tubos y agitar el contenido en el vórtex durante 2 min.
5. Afloje las tapas de los tubos y colóquelos en el baño María con agua hirviendo (~100 °C). Después de 5 min apretar las tapas y continuar la incubación durante 2 h.
6. Enfriar los tubos a temperatura ambiente, afloje con cuidado las tapas y añada 10 mL de **BUFFER C** (2 N KOH).

7. Transfiera cuantitativamente el contenido de cada tubo a un matraz aforado de 100 mL, usando el **BUFFER A** (acetato de sodio 2 mM pH 5.0) para lavar el tubo y ajuste el volumen a 100 ml. Mezclar bien por inversión.
8. Del volumen de 100 ml, sólo se pasan 30 ml a tubos de PPCO de 30 mL para centrifugar a 1500 rpm durante 20 min
9. Transferir alícuotas de 100 μ L (0.1 ml) del extracto centrifugado (por duplicado) a la parte inferior de los tubos de ensayo de vidrio (16 x 100 mm, de 14 mL).
10. Agregar 100 μ L (0.1 ml) de exo-1,3- β -glucanasa (20U/MI) plus β -glucosidasa (4U/MI) in 200 Mm buffer de acetato de sodio (pH=5), mezclar en vortex e incubar a 40 °C por 1 hora.
11. Añadir 3 mL de **Solución II** (mezcla de glucosa oxidasa/peroxidasa GOPOD) en cada tubo e incubar a 40 °C durante 20 min.
12. Colocar 200 μ L por pozo en la microplaca (n= 5). Medir la absorbancia de todas las soluciones y la **D-glucosa standard** a 510 nm contra el **blanco**.
13. El **reactivo blanco** consiste en 0,2 mL de buffer de acetato de sodio (200 mM, pH 5.0) (**BUFFER A**) + 3 mL reactivo de glucosa oxidasa/peroxidasa (**Solución II**).
14. La **D-glucosa standard** consiste de 0.1 mL D-glucose standard (1 mg/mL) (**Bottle 5**) + 0.1 mL de buffer de acetato de sodio (200 mM, pH 5.0) (**BUFFER A**) + 3.0 mL reactivo de glucosa oxidasa/peroxidasa (**Solución II**).

7.7.2. Soluciones del Kit Megazyme K-YGBL

Frasco 1: Suspensión de exo-1,3- β -Glucanase (100 U/mL) plus β -Glucosidase (20 U/mL), 2.0 mL

Stable for > 4 years at 4°C

Frasco 2: Solución de amyloglucosidase (1630 U/mL) plus invertase (500 U/mL) 50 % v/v de glicerol, 20 mL

Stable for ~ 2 years at 4°C or > 4 years at -20°C

Frasco 3: GOPOD Reagent Buffer. Buffer (48 mL, pH 7.4)

Ácido p-hydroxybenzoico y sodium azide (0.4 % w/v).

Stable for > 4 years at 4°C.

Frasco 4: GOPOD Reagent Enzymes. Glucose oxidase plus peroxidase and 4-aminoantipyrine. Freeze-dried powder.

Stable for > 5 years at -20 °C.

Frasco 5: D-Glucose standard solution (5 mL, 1.00 mg/mL) in 0.2% w/v benzoic acid.

Stable for > 5 years at room temperature.

Frasco 6: Control yeast β -glucan preparation (~ 2 g, β -glucan content stated on the bottle label).

Stable for > 5 years at room temperature.

7.7.3. Preparación de los reactivos soluciones/suspensiones

1. Solución I

Añadir 8 ml de buffer acetato de sodio (200 mM, pH 5.0) (**BUFFER A**) al **frasco 1** (es decir, diluir el contenido del vial a 10 mL). Dividir en alícuotas en la cantidad deseada (se ocupa 1 mL por ensayo) y almacenar en tubos de polipropileno a -20 °C una vez diluido, y mantener en hielo durante el uso.

Una vez diluido estable por > 2 años a -20°C.

2. Frasco 2: Se utilizará como es suministrada (*estable por 2 años a 4°C o > 4 años a -20 °C*).

3. Diluir el contenido del **frasco 3** en 1 litro con agua destilada (*estable > 2 años a 4°C*).

4. Solución II: Disolver el contenido del **frasco 4** en el contenido diluido del **frasco 3**. Dividir esta mezcla de reactivo (**GOPOD reagent**) en alícuotas deseables para su almacenamiento, se utilizan 3 mL por ensayo (*estable de 2-3 meses a 4°C en botella oscura o por más de 12 meses a -20°C*).

5. Usar el contenido del **frasco 5** como es suministrado (*estable a temperatura ambiente por más de 4 años*).

6. Usar el contenido del **frasco 6** como es suministrado (*estable > 5 años a temperatura ambiente*).

7.7.4. Reactivos requeridos (no incluidos en el kit)

1. **Buffer A. Acetato de sodio (200 mM, ph 5.0)**

Adicionar 11.6 mL de ácido acético glacial (1.05 g/mL) a 900 mL de agua destilada y ajustar el pH a 5.0 usando una solución 4 M de hidróxido de sodio (16 g/100 mL). Ajustar a 1 L. *Estable por 1 año a 4°C.*

2. **Buffer B. Acetato de sodio (1.2 M, ph 3.8)**

Adicionar 69.6 mL de ácido acético glacial (1.05 g/mL) a 800 mL de agua destilada estéril y ajustar el pH a 3.8 usando hidróxido de sodio 4 M. Ajustar el volumen a 1 L con agua destilada. *Estable > 2 años a temperatura ambiente.*

3. **Buffer C. Hidróxido de potasio (2 M)**

Adicionar 112 g de KOH a 800 mL de agua destilada y disolver por agitación. Ajustar el volumen a 1 L. *Estable > 2 años a temperatura ambiente.*

4. **Ácido clorhídrico (37% p/p; ~10 M)**

Merck No. 100317-2500. *Estable >10 años a temperatura ambiente*

7.8. Extrapolación en biorreactor tanque agitado

Este paso, a diferencia de las anteriores, es el eximio del presente trabajo. Al igual que con las cinéticas de crecimiento en matraz, en el biorreactor se hizo un escalamiento pertinente para evaluar tanto la biomasa como los polisacáridos extracelulares presentes. El biorreactor tanque agitado posee una capacidad de 7 L, solamente se ocupara un 50% de su volumen total.

Se utilizó medio de cultivo modificado (cereal + malta) y se inocula con 100 ml del inoculo con la cepa de *Ganoderma curtisii* G-397. Se tomaron muestras cada 48 horas de 50 ml para poder determinar la biomasa y los polisacáridos producidos en el medio.

La cuantificación de la biomasa y los polisacáridos es de la misma manera con respecto a las cinéticas con matraces.

7.9. Cuantificación de polifenoles por método Folin-Ciocalteu

El método colorimétrico a partir del ensayo Folin-Ciocalteu, es útil para determinar la concentración de fenoles. Folin-Ciocalteu, 1927 fueron los primeros que determinaron la concentración de tirosina y triptófano en proteínas gracias a este método. No fue sino hasta 1965, cuando Singleton y Rossi lo adaptaron para medir compuestos fenólicos provenientes del vino.

El principio de este ensayo, se basa en la oxidación del ion fenolato del extracto antioxidante que se encuentre en la muestra y la reducción del reactivo fosfotungstico-fosfomolibdico, todo esto bajo condiciones alcalinas pues el fenol necesita absorber oxígeno. Se produce un color azul estable con un pico ancho de absorción de luz que puede ser medido por el espectrofotómetro. La concentración de fenoles es proporcional a la intensidad de la absorción de la luz cercana a 760 nm en donde otras especies no absorben luz a esta longitud de onda. (Schwannecke, 2009)

Para determinar los valores de absorbancia, se comparan con el estándar, este es, el ácido gálico. Los valores totales de los compuestos fenólicos de las muestras se expresan en equivalentes de ácido gálico por gramo o litro de muestra (EAG/g o EAG/L). Este procedimiento es fiable debido a la respuesta equivalente a sustancias fenólicas. (Schwannecke, 2009)

7.9.1 Reactivos para la determinación de polifenoles totales

Se prepararon los siguientes reactivos, los cuales servirán para cuantificar los polifenoles totales como equivalentes del ácido gálico.

1-**Solución saturada de carbonato de sodio:** Se disuelve 7.5 g de carbonato de sodio en 100 ml de agua destilada. Para precipitar, se agregan 0.3 g de carbonato de sodio y se coloca en refrigeración una hora.

2- **Reactivo Folin-Ciocalteu:** Se diluye 1 ml del reactivo Folin-Ciocalteu en 9 ml de agua destilada, se afora a 10 ml.

3- **Solución stock de ácido gálico a 1mg/ml:** Pesar 0.010050 g de ácido gálico y se disuelven en 1 ml de etanol con el fin de ayudar a su disolución, después se afora a 10 ml con agua destilada para disolver el ácido gálico.

7.9.2. Curva estándar de calibración de ácido gálico

La evaluación en forma cuantitativa de la concentración de polifenoles totales como equivalente del ácido gálico, se determina por medio de una curva de calibración. Para esto, se colocan en tubos *ependorf* de 2 ml., 0, 25, 50, 100, 150, y 200 μ l de la solución estándar de ácido gálico a 1mg/ml y se afora con agua destilada a 1 ml. Estas soluciones tienen una concentración de 0, 25, 50, 100, 150 y 200 μ g/ml (**Tabla 3**).

Tabla 3. Valores de concentración de ácido gálico y su absorbancia para la curva de calibración.

[Eq. Ác. gálico(μg)]	Absorbancia (λ)
0	0
25.125	0.367
50.25	0.655
100.5	0.952
150.75	1.096

7.9.3. Cálculo para la cuantificación de polifenoles totales

El cálculo de polifenoles totales es determinado por la ecuación dada por la curva de calibración y sus datos graficados, dicha ecuación consiste en una gráfica lineal. Donde Y= son los microgramos de equivalente de ácido gálico por mililitro de extracto, y X es la densidad óptica. La R^2 de esta ecuación debe ser 0.9977, de preferencia.

7.10. Los parámetros cinéticos y estequiométricos con un modelo logístico de crecimiento

El modelo logístico, se destinó para describir el crecimiento celular, con el objeto de determinar con más precisión la velocidad específica de crecimiento, este modelo se desarrolló para resolver las ecuaciones de producción y consumo de sustrato, mediante la siguiente expresión:

$$\frac{\partial X}{\partial t} = \mu_{\max} X \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)$$

Donde:

$$\mu t = \ln \frac{X}{X_{\max} - X} + \left(\ln \frac{X}{X_0} - 1\right)$$

Integrando para $X_0 = X(t=0)$.

$$\mu t = \ln \frac{X}{X_{\max} - X} + \left(\ln \frac{X}{X_0} - 1\right)$$

Donde:

$$X^* = \frac{Xt}{X_{\max}}$$

y (b) es el intercepto.

$$-b = \ln \left[\left(\frac{X_{\max}}{X_0} \right) - 1 \right]$$

La velocidad específica de crecimiento (μ) fue calculada por regresión lineal de $(X^*/1-X^*)$ contra tiempo, el coeficiente angular de la tendencia lineal corresponde al valor de (μ).

8. RESULTADOS

8.1. Análisis de la producción de biomasa y polisacáridos.

8.1.1. Biomasa producida en matraz (medio modificado), cuantificación por peso.

Como análisis preliminar del trabajo, se evaluaron condiciones como., volumen de producción, agitación, fuente de carbono primaria y secundaria, así como, temperatura, donde se obtuvo en comparación con trabajos anteriores un decremento de biomasa final de 4.30 g/L, y un rendimiento de 0.83 mg P por g de biomasa. Respecto a Núñez-Urquiza, 2017. **Tabla 4.**

Tabla 4. Producción de biomasa de *Ganoderma curtisii* en matraz.

<i>Biomasa tiempo final</i>			Presente
Cepa- 397		Núñez, 2017	trabajo
<i>Ganoderma curtisii</i>	biomasa (g/l)	5.5 g/L	4.3 ± 0.8

En la evaluación visual del cultivo sumergido se logró homogenizar el tamaño de pellet de micelio, **Figura 10**. Este punto es muy importante ya que la producción de metabolitos de interés funcional en hongos está estrechamente relacionado con el crecimiento y tamaño de pellet del hongo. (Quintero, 1991). Por otra parte, en la figura 10-b, se observa una apariencia con viscosidad, generada principalmente por la presencia de polisacáridos extracelulares.

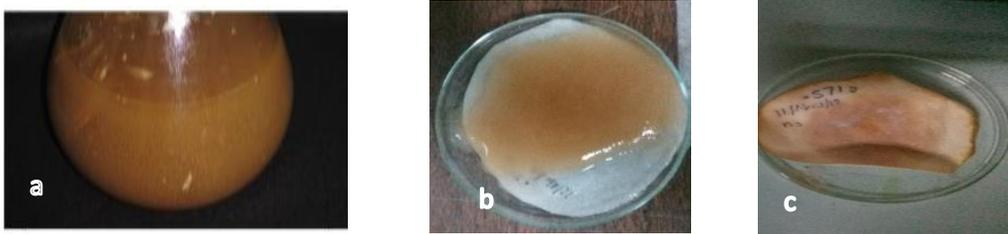


Figura 10. Evaluación visual de los pellets producidos por *Ganoderma curtisii*. a) Producción de biomasa en matraz, b) apariencia de biomasa fresca y c) peso seco de la biomasa.

8.1.2. Polisacáridos producidos en matraz (medio modificado), cuantificados por peso.

Los polisacáridos, solo son cuantificados de los tiempos finales de las cinéticas preliminares. La producción de polisacáridos fue de 3.9 g/l, utilizando un volumen de producción de 1000 ml, 200 rpm de agitación, adición de malta no-diastasa como fuente de carbono primaria, así como, cereal como fuente secundaria y una temperatura de producción de 30°C. El rendimiento final de la cinética de crecimiento, respecto a lo reportado por Núñez-Urquiza, 2017 fue casi tres veces mayor. **Tabla 5.**

Tabla 5. Producción de polisacáridos de *Ganoderma curtisii* en matraz.

<i>Polisacáridos tiempo final</i>		
Cepa- 397	Núñez, 2017	Presente trabajo
<i>Ganoderma curtisii</i> polisacáridos (g/L)	1.1 g/L	3.6 ± 0.3

En la evaluación visual de los polisacáridos precipitados del cultivo sumergido, se observan de apariencia viscosa, al secar los polisacáridos se observa una apariencia de laca y fibrosa. **Figura 11.**

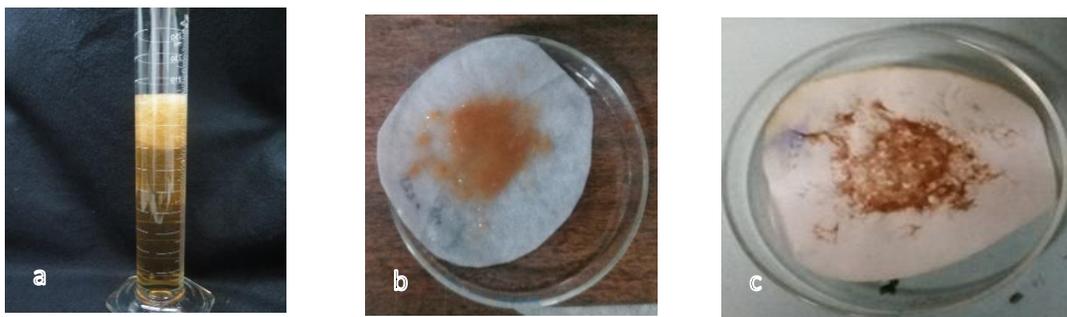


Figura 11. Apariencia visual de los polisacáridos precipitados con alcohol al 97%. a) Precipitación de polisacáridos extracelulares del cultivo agotado por el crecimiento micelial de *G. curtisii*, b) apariencia de polisacáridos en base húmeda y c) apariencia de polisacáridos en base seca.

8.1.3. Determinación de α -glucanos producidos en matraz, (cuantificación por método enzimático).

Con el objeto de identificar la presencia de α -glucanos presentes en los polisacáridos extracelulares obtenidos de la producción en matraz con condiciones controladas, se cuantificaron por el método enzimático KIT Megazyme. Al cuantificar los α -glucanos se obtuvo un promedio de 154.05 % w/w para los polisacáridos extracelulares y 17.75 % w/w para los intracelulares. **Figura 12.**

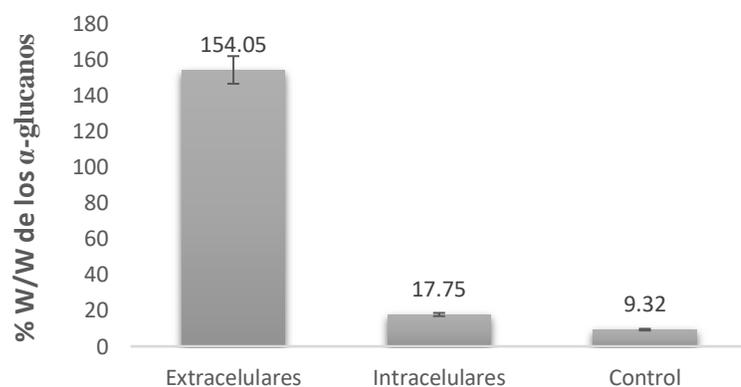


Figura 12. α -glucanos producidos en matraz, cuantificación por método enzimático en cultivo de *G. curtisii*.

8.1.4. Determinación de β -glucanos producidos en matraz, (cuantificación por método enzimático).

De igual forma, de los polisacáridos obtenidos de la producción en el matraz Erlenmeyer con el medio modificado, se cuantificaron por el método enzimático los β -glucanos presentes, obteniendo un promedio de 76.86 % w/w para los extracelulares y 9.62% w/w para los intracelulares (**Figura 13**).

Cabe resaltar, la muestra del control está basada a partir de una levadura (propia del Kit). En base a dicha muestra, los porcentajes de α -glucanos representa la gran mayoría de glucanos presentes en el cultivo de *Ganoderma curtisii*.

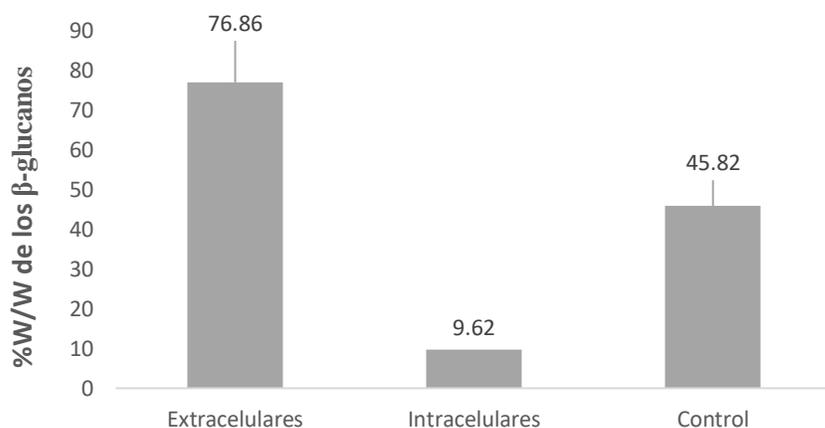


Figura 13. β -glucanos producidos en matraz, cuantificación por método enzimático en cultivo de *G. curtisii*.

8.1.5. Cuantificación del porcentaje glucanos totales (exopolisacáridos)

El grafico final, muestra ambos comparativos (alfa y beta glucanos) clarificando con veracidad la diferencia de los dos tipos de glucanos. Como se mencionó con anterioridad, los α -glucanos representan la gran mayoría de glucanos presentes en el extracto de medio modificado. El 60% del extracto está compuesto por α -glucanos. **Figura 14.**

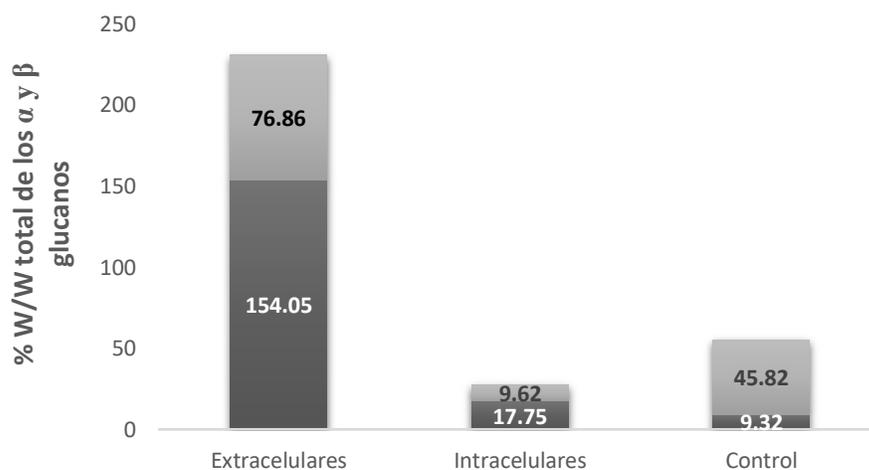


Figura 14. Porcentaje de los glucanos presentes en el extracto de *G. curtisii*.

8.2. Análisis de producción en tres condiciones de temperatura y modificación de la fuente de carbono.

8.2.1. Caracterización de la producción de biomasa, exopolisacáridos y rendimiento a nivel matraz a 25°C

El gráfico siguiente, muestra la cinética llevada a cabo a 25 grados Celsius de la biomasa del hongo *Ganoderma curtisii* en medio modificado. En este bioensayo, cada punto representa la media entre tres muestras, las barras de error equivalen a la desviación estándar de las réplicas. Se puede observar, que bajo estas condiciones existe una producción considerablemente continua de biomasa, esto, de acuerdo a lo planteado podría favorecer la producción de los exopolisacáridos de la cepa G-397 de *Ganoderma curtisii*.

La biomasa máxima ($X_{m\acute{a}x.}$) fue de 4.7 g/L para el día 10. Se elaboró la regresión lineal de la producción de biomasa cuya velocidad específica de crecimiento fue $\mu = 0.376 \text{ d}^{-1}$ y su tiempo de duplicación fue $t_d = 1.84 \text{ d}$ ($\ln 2 / \mu$).

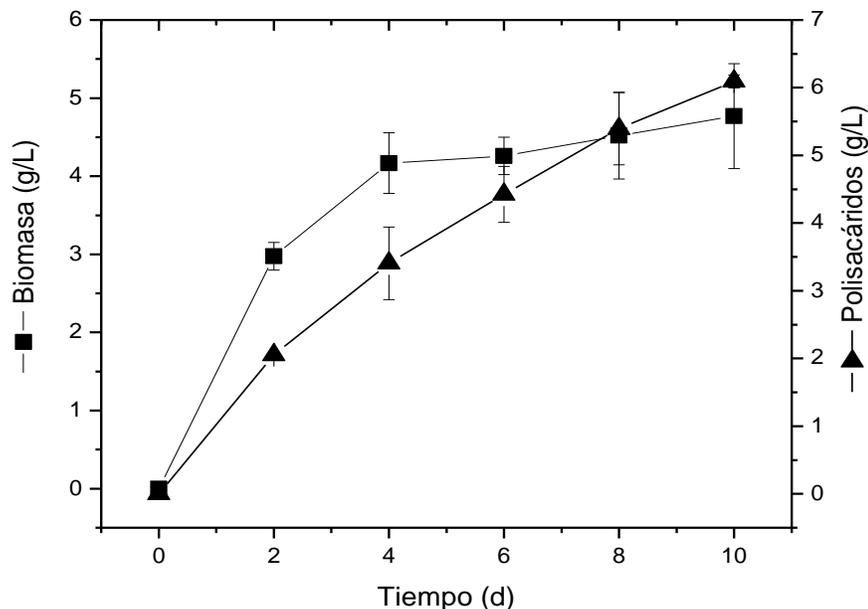


Figura 15. Cinética de crecimiento de la biomasa y exopolisacáridos a 25°C de la cepa *G. curtisii* en matraz de 1,000 ml al 50% de capacidad con medio modificado.

El grafico anterior, de igual forma, pueden observarse la producción de los exopolisacáridos en medio modificado (**Figura 15**). En este Bioensayo, cada punto representa la media entre tres muestras, las barras de error equivalen a la desviación estándar de las réplicas, tal como en la biomasa. De igual manera, se evaluó el rendimiento de los exopolisacáridos. Es decir, la cantidad de miligramos de producto sobre cada gramo de biomasa. (**Figura 16**).

La producción (Pmax) total de exopolisacáridos fue de 6.09 g/L, al día 10 cuyo rendimiento fue $Y_{P/B} = 1.29 \text{ mg P/g B}$. También se evaluó el rendimiento de cada punto con respecto a la biomasa.

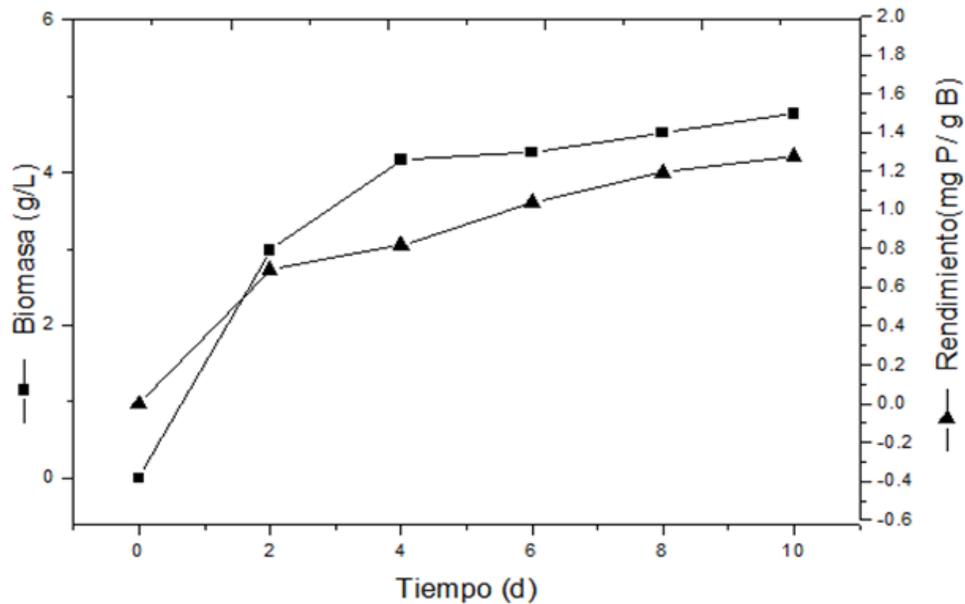


Figura 16. Cinética crecimiento del rendimiento de polisacáridos a 25°C de la cepa *G. curtisii* a nivel matraz de 1,000 ml al 50% de capacidad con medio modificado.

8.2.2. Caracterización de la producción de biomasa, exopolisacáridos y rendimiento a nivel matraz a 30°C.

Otra de las variables consideradas dentro del proyecto, fue realizar cinéticas a 30°C, cuyos resultados se observan en el siguiente gráfico (Figura 17). Al igual que en los gráficos anteriores, las barras de error representan la desviación estándar de las réplicas, mientras que cada punto el promedio de cada una de las réplicas. La grafica muestra la tendencia de la biomasa, en forma ascendente debido a la fuente de carbono alterna, esto de acuerdo a lo propuesto estaría relacionado con la producción de exopolisacáridos (cultivo diáuxico). La tendencia de un cultivo de crecimiento diáuxico, se manifiesta en los puntos de los días dos y seis, respectivamente. Es en estos días cuando la cepa aprovecha las dos fuentes de carbono para producir el producto (polisacárido).

La producción (X_{max}) total de biomasa fue de 5.9 g/L, al día 10. La regresión lineal de la producción de biomasa tuvo una velocidad especifica de crecimiento de $\mu = 0.423 \text{ d}^{-1}$ y un tiempo de duplicación $td = 1.63 \text{ d}$ ($\ln 2 / \mu$).

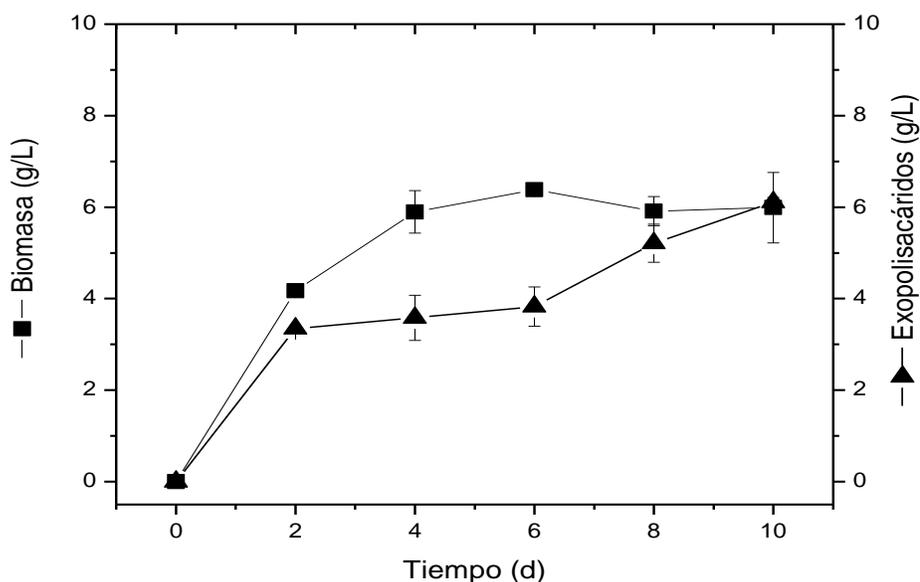


Figura 17. Cinética de crecimiento de biomasa y polisacáridos a 30°C de la cepa *G. curtisii* en matraz de 1,000 ml al 50% de capacidad con medio modificado.

La cinética de crecimiento a 30°C permitió evaluar la producción de polisacáridos extracelulares bajo estas condiciones de temperatura. Durante el desarrollo de la misma, se observa el incremento de los polisacáridos con respecto al tiempo, donde, en el segundo y sexto día se manifiesta una tendencia diáuxica del cultivo. (Figura 18).

La producción (Pmax) total de exopolisacáridos fue de 6.1 g/L. El rendimiento $Y_{P/B}$ fue de 1.03 mg P/g B.

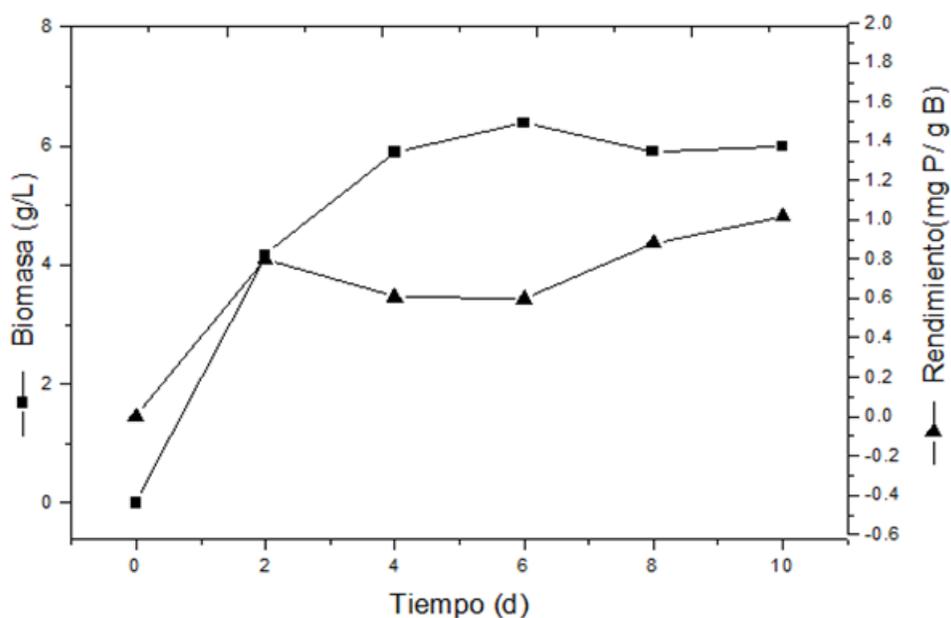


Figura 18. Cinética de crecimiento del rendimiento de los polisacáridos a 30°C de la cepa *G. curtisii* en matraz de 1,000 ml al 50% de capacidad con medio modificado.

8.2.3. Caracterización de la producción de biomasa, exopolisacáridos y rendimiento a nivel matraz 35°C.

Las cinéticas que se elaboraron a 35°C, representaron el punto en el cual ya no se podría hacer crecer a la cepa G-397, *ergo*, el micelio del hongo no pudo desarrollarse bajo estas condiciones de temperatura.

En consecuencia, este dato se toma en cuenta como el parámetro máximo al cual *Ganoderma curtisii* no es capaz de crecer. Durante la elaboración de la cinética, se pudo observar que el estrés provocado por la alta temperatura es demasiado como para generar micelio (pellets).

8.3. Caracterización del crecimiento de biomasa y polisacáridos a nivel biorreactor tanque agitado en medio sin modificar a 30°C.

Bajo condiciones de un medio sin modificar (baja biodisponibilidad), se observa la clara tendencia de la biomasa a descender, esto debido a, la presencia de cereal en el biorreactor. En otras palabras, durante los primeros días de toma de muestra existe sustrato en exceso lo que hace que exista un margen de error en el bioensayo con respecto a la muestra. Durante el tiempo de la fermentación, se observa una disminución de la biomasa debido a que el micelio va alimentándose del sustrato en el biorreactor, este comportamiento refleja claramente que un medio modificado otorga resultados de mayor fidelidad, concluyendo que modificar ciertas variables en el experimento, nos arrojaría resultados más precisos.

La producción (X_{max}) total de biomasa fue de 4.8 g/L

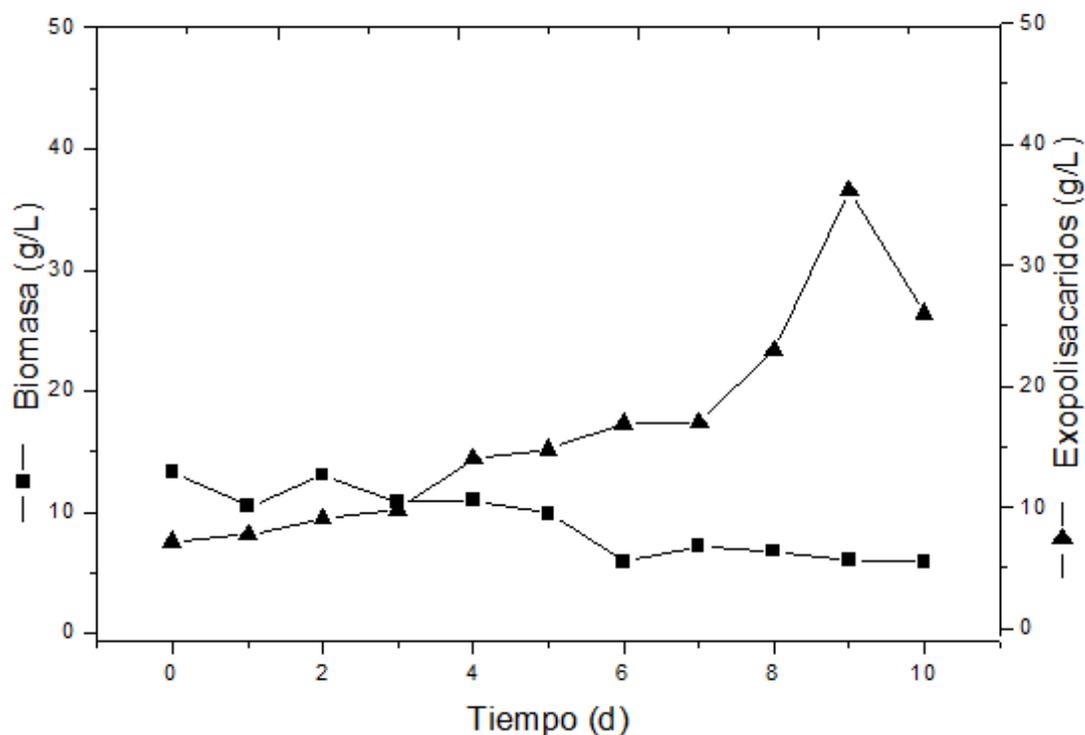


Figura 19. Cinética de crecimiento de la biomasa y polisacáridos a 30°C de la cepa *G. curtisii* en biorreactor tanque agitado de 7L con 50% de medio sin modificar.

Por otra parte, la producción de exopolisacáridos se observa en crecimiento, (Figura 19). Aunque esto se refleje en la gráfica, lo que sucede en realidad es que el micelio del hongo empieza a crecer aprovechando el sustrato, que además al estar sin filtrar, interfiere en la toma de muestra. Esto trae consigo un error en la interpretación de datos, es por este motivo que en la elaboración de los bioensayos se decidió filtrar tres veces el medio para evitar todo residuo en el experimento.

El pico más alto de exopolisacáridos fue de 36.2 g/L en medio sin modificar. El rendimiento $Y_{P/B}$ fue de 4.46 mg P/g B. El análisis de estos datos, nos otorga una perspectiva errónea con respecto a parámetros cinéticos.

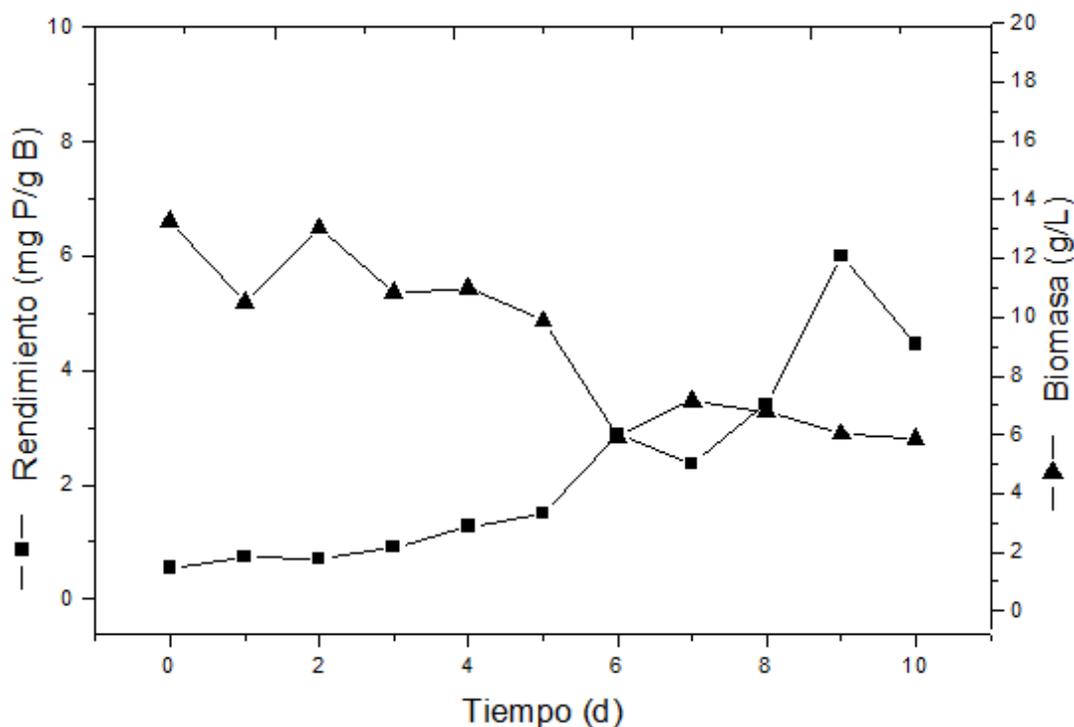


Figura 20. Cinética de crecimiento del rendimiento de los polisacáridos a 30°C de la cepa *G. curtisii* en biorreactor tanque agitado de 7L con 50% de medio sin modificar.

8.4. Análisis de producción en diferentes condiciones de temperatura y medio modificado a nivel biorreactor tanque agitado

8.4.1. Caracterización del crecimiento de biomasa y polisacáridos a 25°C (primer bioensayo).

Se elaboraron cinéticas de crecimiento a 25°C para observar el comportamiento de la biomasa y los polisacáridos que previamente se evaluaron a partir de matraz. En el bioensayo, se percibe que el comportamiento diáuxico se presenta en los días dos y ocho en la producción de biomasa. (Figura 21). Esto revela que en efecto, este tipo de modelo cinético es viable para la producción de polisacáridos extracelulares. Por ello, la agregación de dos alternativas de fuente de carbono resulte adecuado para el objetivo del presente trabajo.

La producción máxima de biomasa ($X_{m\acute{a}x.}$) fue de 12.76 g/L al día diez.

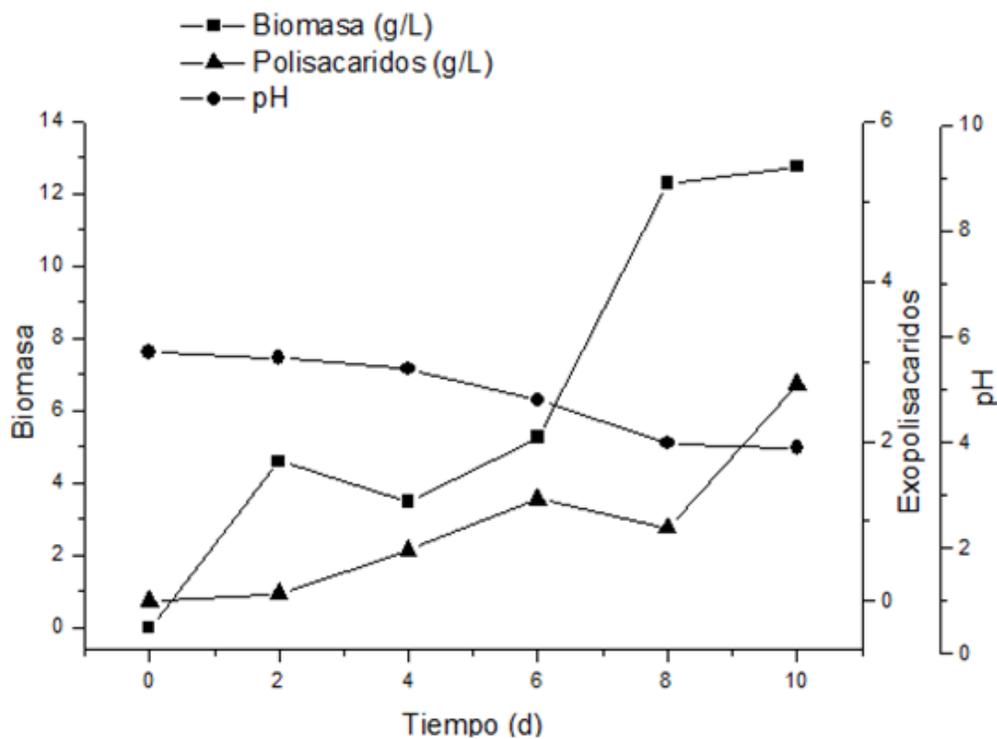


Figura 21. Cinética de crecimiento de biomasa, exopolisacáridos y pH de la cepa *G. curtisii* en biorreactor tanque agitado de 7L con 50% de medio modificado a 25°C.

En contraparte, la producción de los polisacáridos extracelulares, se manifiestan en los días seis y diez de la fermentación, es decir, también presentan una tendencia de cultivo diáuxico en la cinética de crecimiento (**Figura 21**). En el biorreactor de tanque agitado, se observan mejor las tendencias del cultivo diáuxico con respecto a matraz, a causa de, que el biorreactor ofrece mejores condiciones de cultivo para la cepa. La producción total de exopolisacáridos (P_{máx.}) fue de 2.72 g/L al día diez.

En el bioensayo, se observó que una de las variables que tiende a bajar con el respecto al tiempo de la fermentación como de la producción de biomasa y polisacáridos, es el pH. No obstante, esta condición también es observada en el trabajo previo de Nuñez-Urquiza, 2017., lo cual no determina la producción del producto, sino, que durante el desarrollo de la fermentación también se producen otros metabolitos (ácidos orgánicos), los cuales hacen disminuir el pH en la fermentación. (**Figura 21**).

8.4.2 Rendimiento con respecto a la biomasa, (primer bioensayo).

La figura 22, es una muestra comparativa de rendimiento de los polisacáridos extracelulares con respecto a la cantidad de biomasa producida. La forma de obtener estos resultados, consiste en dividir la cantidad de producto (polisacárido) entre la cantidad de biomasa producida. A diferencia de las cinéticas a 30 °C, estas produjeron un menor rendimiento, donde la temperatura juega un papel fundamental.

El rendimiento $Y_{P/B}$ fue de 0.21 mg P/g B de producto.

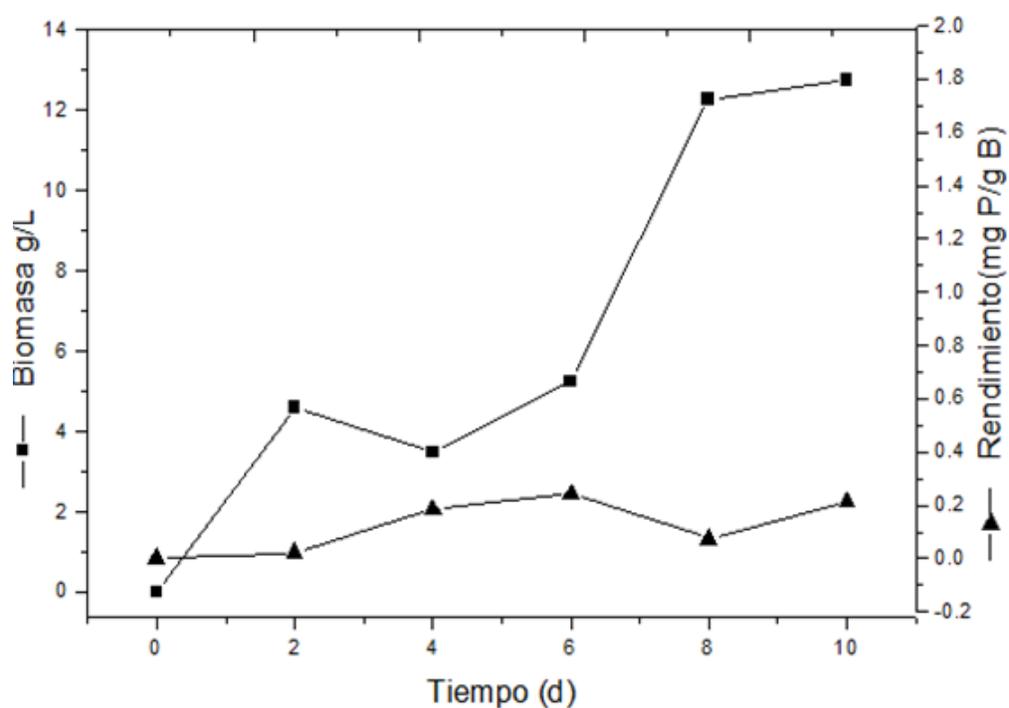


Figura 22. Cinética de crecimiento del rendimiento de los polisacáridos de la cepa *G. curtisii* en biorreactor tanque agitado de 7L c con 50% de medio modificado a 25°C.

8.4.3. Caracterización del crecimiento de biomasa y polisacáridos 25°C, (segundo bioensayo).

El segundo bioensayo hecho a 25°C, alcanzo el máximo de producción de biomasa dos días antes con respecto al primero. Como en la primera cinética, se demostró que en términos de temperatura, esta interfiere, en la producción de polisacáridos extracelulares. A pesar de generar una cantidad optima de biomasa y mantener una tendencia diáuxica en el cultivo, no se genera una producción considerable de polisacáridos.

La producción máxima de biomasa ($X_{m\acute{a}x.}$) fue de 9.22 g/L al día ocho.

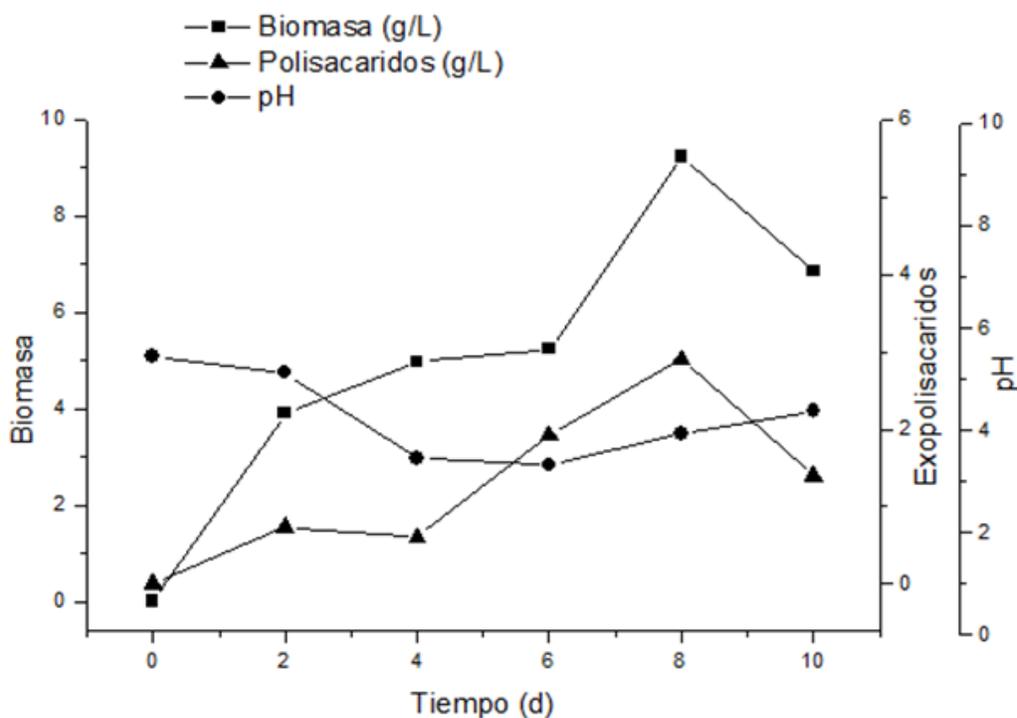


Figura 23. Segunda cinética de crecimiento de biomasa, exopolisacáridos y pH de la cepa *G. curtisii* en biorreactor tanque agitado de 7L con 50% de medio modificado a 25°C.

En esta segunda cinética de crecimiento, la producción de polisacáridos extracelulares fue más baja en comparación con las cinéticas a 30°C bajo las mismas condiciones de cultivo, salvo la temperatura. Esto nos lleva a concluir, que las fuentes de carbono interfieren en distintos tiempos de la fermentación, y pueden ser la fuente de alimento para la cepa en la formación de los polisacáridos, pero el factor que determina una alta producción de los polisacáridos extracelulares, es la temperatura. En este bioensayo, resalta que los tiempos en donde se produce la mayor cantidad tanto de biomasa como exopolisacáridos, fue al día ocho. La producción total de exopolisacáridos (Pmax.) fue de 2.9 g/L al día ocho.

La disminución del pH en el sistema de cultivo, se debe en gran medida a la producción de metabolitos biológicamente activos de la cepa G-397. Esos metabolitos son los ácidos orgánicos, como el ácido ganoderico, presente en la mayoría de especies del genero *Ganoderma* como lo reporta Hu *et al.*, (2017). Las tres graficas permiten identificar los puntos máximos en la producción de biomasa y producto, que en este bioensayo fue dos días antes con respecto a la primera cinética. **(Figura 23)**.

8.4.4. Rendimiento con respecto a la biomasa, (segundo bioensayo).

El rendimiento de las cinéticas de crecimiento elaboradas a 25°C, obtuvieron un rendimiento menor que a mayor temperatura (30°C). Dichas observaciones, lo demuestran las gráficas de las cinéticas de crecimiento del rendimiento, a pesar de esto, la tendencia de cultivo diáuxico esta en manifiesto en ambos bioensayos, pero la producción de exopolisacáridos es claramente mayor a temperaturas más altas.

El rendimiento $Y_{P/B}$ fue de 0.31 mg P/g B de producto.

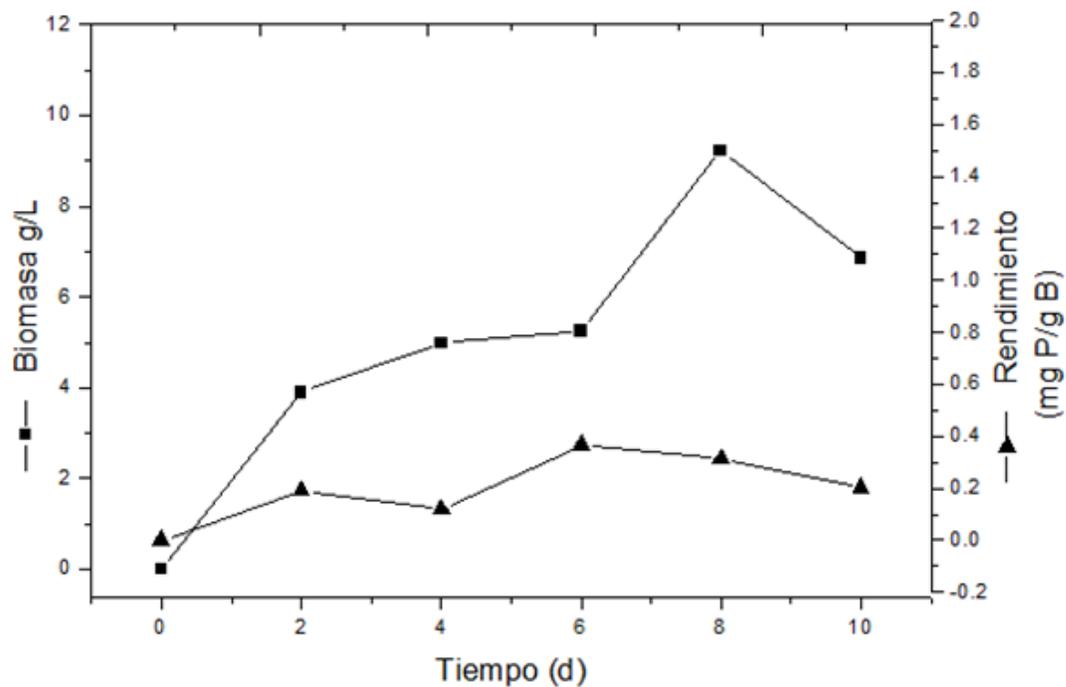


Figura 24. Segunda cinética de crecimiento del rendimiento de los polisacáridos de la cepa *G. curtisii* en biorreactor tanque agitado de 7L con 50% de medio modificado a 25°C.

8.4.5. Análisis estadístico de los bioensayos del cultivo de *G. curtisii* en biorreactor tanque agitado a 25°C

El presente análisis estadístico, tuvo como fin observar los valores de discrepancia de cada uno de los puntos con respecto a los dos bioensayos elaborados. Se calculó el error estándar como la media de los dos experimentos. En la **figura 25**, se muestra el error estándar manifestado en las barras de error, cada uno de los puntos representa la media de los dos bioensayos.

Se percibe que los últimos dos puntos en el eje de la biomasa, existe una discrepancia marcada de los datos que fueron disimiles en los últimos días. A pesar de ello, la discrepancia de los puntos en el eje de los polisacáridos fue escasa, esto se traduce en un error estándar menos marcado, de tal forma, la certeza del bioensayo resulta mayor. La regresión lineal de la producción de biomasa tuvo una velocidad específica de crecimiento $\mu = 0.339 \text{ d}^{-1}$ y un tiempo de duplicación $td = 2.04 \text{ d} (\ln 2 / \mu)$.

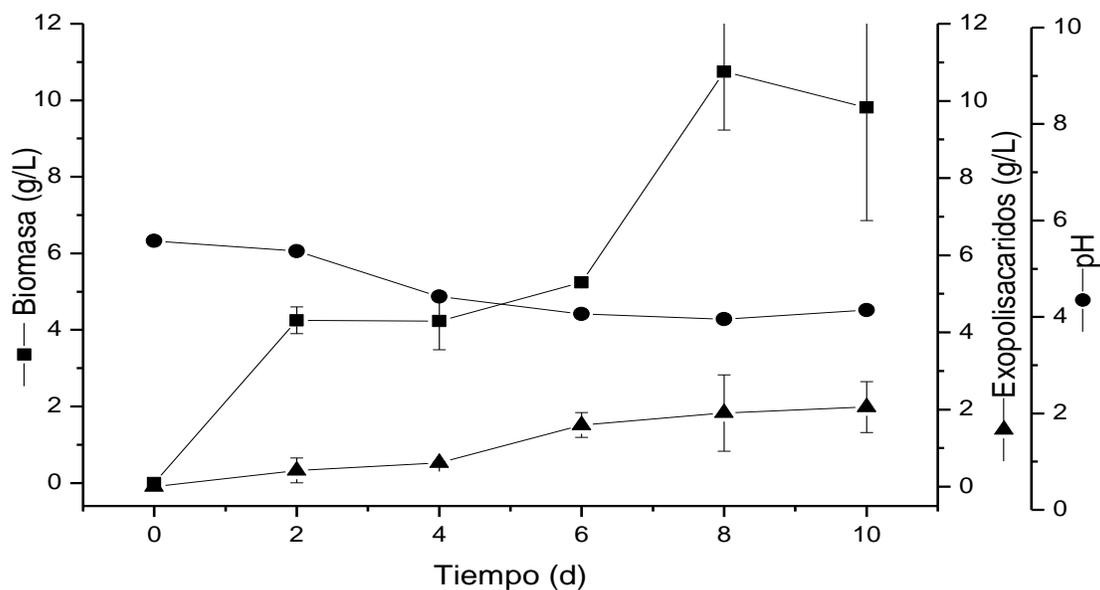


Figura 25. Análisis estadístico de los bioensayos elaborados a 25°C del cultivo de *G. curtisii*, se observa error estándar y media de ambos experimentos.

8.4.6. Caracterización del crecimiento de biomasa y polisacáridos a 30°C, (primer bioensayo).

Los resultados obtenidos en un cultivo con medio modificado, otorgaron resultados con una mejor tendencia en cuanto a la producción de biomasa como de polisacáridos. En estos bioensayos elaborados en biorreactor, se tomaron en cuenta variables como son temperatura, agitación y fuentes de carbono.

En la **figura 26**, se observa la producción de biomasa con respecto al tiempo, el punto máximo de producción fue al día seis de la fermentación. Se percibe el comportamiento esperado debido a que se observan las diferentes fases de una fermentación, (adaptación, crecimiento, estacionaria, deceso). Además de, observarse la tendencia de cultivo diáuxico en los días dos y seis de la fermentación.

La producción máxima de biomasa ($X_{m\acute{a}x.}$) fue de 10.2 g/L al día seis.

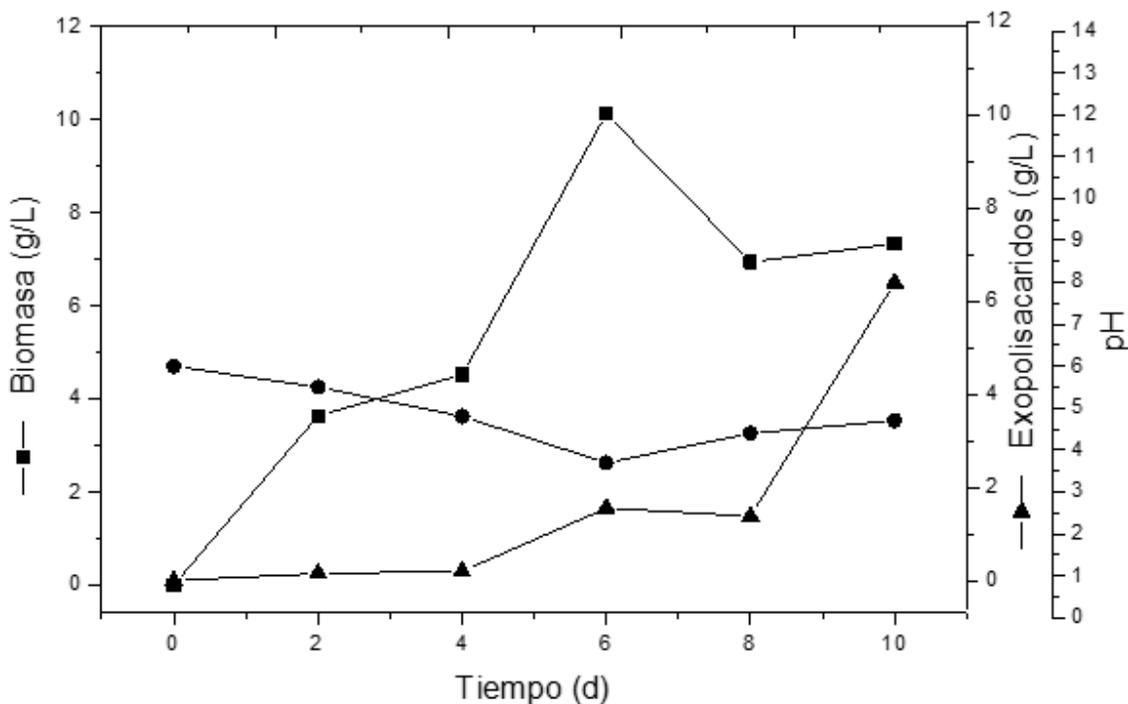


Figura 26. Cinética de crecimiento de biomasa, exopolisacáridos y pH de la cepa *G. curtisii* en biorreactor tanque agitado de 7L con 50% de medio modificado a 30°C.

En términos de producción de metabolitos secundarios (exopolisacáridos), el cultivo con medio modificado, a temperatura de 30°C y una agitación de 200 rpm, genera una tendencia de cultivo diáuxico. Esto, se clarifica en los días seis y diez, durante esos días la cepa tiende a producir una cantidad importante de polisacáridos. Dadas las circunstancias, podemos decir que durante el día seis, la cepa es capaz de aprovechar su primera fuente carbono, en este caso, la malta. Por otro lado, en el día diez, la cepa aprovecha el carbono y otros nutrientes provenientes del cereal. Estas dos observaciones, fundamenten la hipótesis de la producción de exopolisacáridos en función de la biomasa y de la fuente de carbono, así como, de las variables abióticas del medio. La producción total de exopolisacáridos (Pmax) fue de 6.4 g/L al día diez.

En este gráfico, se entrelazan cada uno de los parámetros cinéticos que se llevaron a cabo, el pH sufre una pequeña disminución (también observado por Núñez-Urquiza, 2017, Legarda *et al.*, 2015, Papinutti *et al.*, 2015). Esta cualidad ciclotímica del pH, se debe al consumo de la fuente de carbono, como la producción de otros metabolitos en el medio., cabe resaltar que el presente trabajo no se usó buffer de fosfatos para mantener pH. La razón por la que se desistió, es que posiblemente esté interfiera en la producción de polisacáridos. También, es posible que durante la disminución del pH esté ligado a la producción de ácidos orgánicos.

En la **figura 26**, se muestra la producción de biomasa, la producción de exopolisacáridos y el pH, medido con respecto al tiempo de la fermentación.

8.4.7. Rendimiento con respecto a la biomasa, (primer bioensayo).

También, se evaluó el rendimiento de la producción de exopolisacáridos por cada gramo de biomasa producidos. La **figura 27**, nos muestra el comportamiento de la biomasa y el rendimiento de los exopolisacáridos, en dicha gráfica, se observa que a partir del cuarto y octavo día, existe un crecimiento diáuxico, lo cual indica que la primera fuente de carbono otorga una cantidad considerable de Carbono para la producción de biomasa, mientras que, la segunda (cereal) ayuda a crear el producto y la temperatura elevada determina la gran cantidad de este.

El rendimiento $Y_{P/B}$ fue de 0.62 mg P/g B de producto.

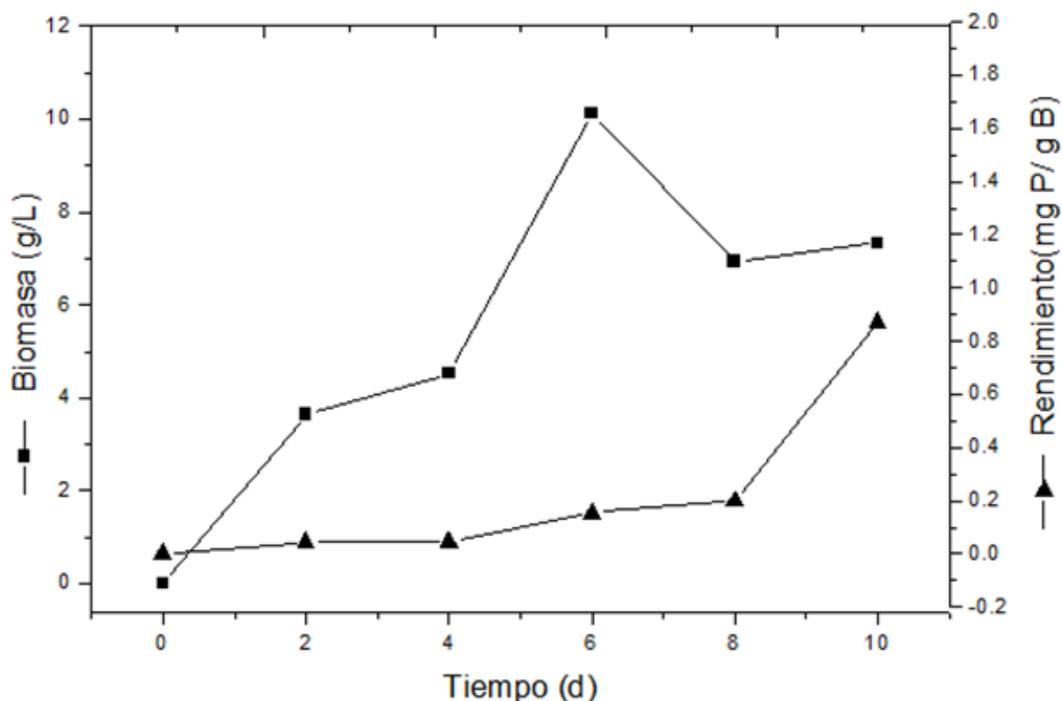


Figura 27. Cinética de crecimiento del rendimiento con respecto a la biomasa de la cepa *G. curtisii* en biorreactor tanque agitado de 7L con 50% de medio modificado a 30°C.

8.4.8. Caracterización del crecimiento de biomasa y polisacáridos modificado a 30°C, (segundo bioensayo).

Se llevó cabo una segunda cinética de diez días, esto con el fin de comparar los datos obtenidos de la cinética anterior. En esta cinética, el comportamiento del crecimiento de la biomasa también desarrolla una tendencia diáuxica salvo que en esta, se observa en los días cuatro y diez de la fermentación.

Cabe resaltar, que durante la toma de muestra del punto seis, la disminución tan drástica de la biomasa fue motivo de cierto error en el bioensayo, por consiguiente, se decidió desistir de este.

La producción máxima de biomasa ($X_{m\acute{a}x.}$) fue de 12.38 g/L al día diez.

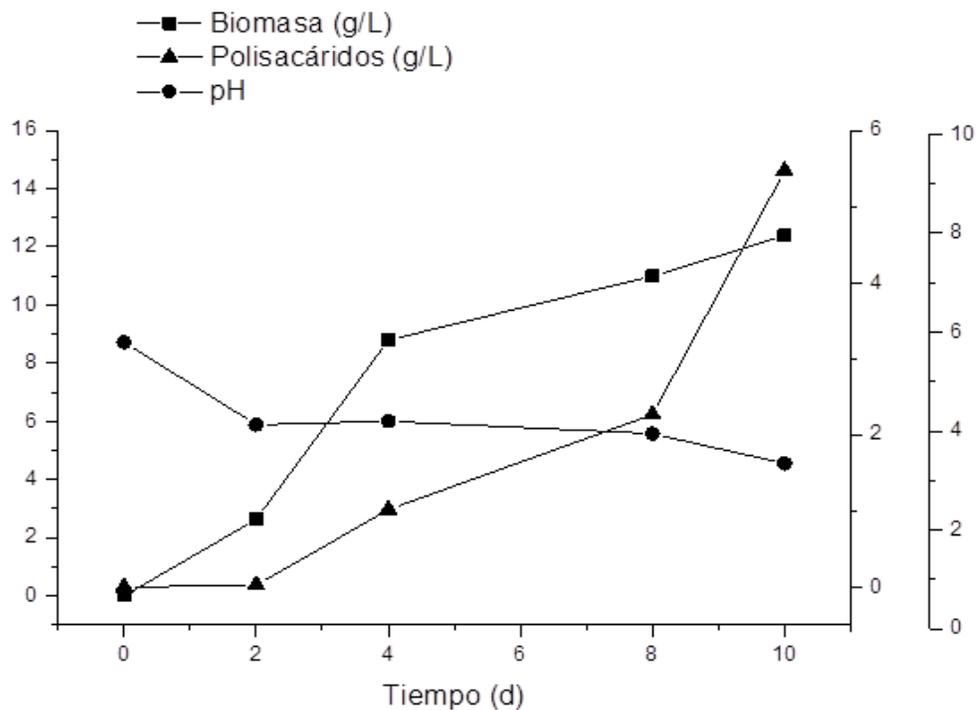


Figura 28. Segunda cinética de crecimiento de biomasa, exopolisacáridos y pH de la cepa *G. curtisii* en biorreactor tanque agitado de 7L con 50% de medio modificado a 30°C.

La producción de los exopolisacáridos pudo ser valorada en función de la cantidad de biomasa producida, esto se percibe, en la gráfica de la **figura 28**. Cuando el crecimiento celular de la cinética tiene un punto considerable de biomasa, la cepa es capaz de producir la máxima cantidad de producto. De esta forma, utilizar un sistema diáuxico, garantiza una producción elevada de biomasa que por consiguiente, generaría una importante cantidad de polisacáridos extracelulares.

El cultivo diáuxico, la agitación y la temperatura elevada fueron variables que influyeron de manera significativa en el cultivo de *Ganoderma curtisii*, logrando cumplir el objetivo de producir más producto bajo estas condiciones. La producción total de exopolisacáridos (Pmax) fue de 5.8 g/L al día diez.

Se compararon las tres graficas anteriores en una, de esta forma, es más visible la tendencia del cultivo diáuxico (Tanto biomasa como en polisacáridos). Con dos fuentes distintas de carbono, agitación y temperatura elevada, la producción de exopolisacáridos es mayor con respecto a condiciones con menor temperatura.

8.4.9. Rendimiento con respecto a la biomasa, (segundo bioensayo).

Como en la cinética anterior a 30°C, se evaluó el rendimiento de los exopolisacáridos obtenidos, dichos resultados concuerdan con la cinética previa, variando ligeramente en la cantidad de polisacáridos producidos. La **figura 29** hace alusión al comportamiento del rendimiento con respecto al tiempo y a la cantidad de biomasa producida. Al igual que en los resultados de la cinética anterior, se observa que el crecimiento máximo de polisacáridos extracelulares se registra en el día diez de la fermentación.

Estos indicios, evidencian que la segunda fuente de carbono es la encargada de intervenir en la producción de estos metabolitos, además de la temperatura.

El rendimiento $Y_{P/B}$ fue de 0.46 mg P/g B de producto.

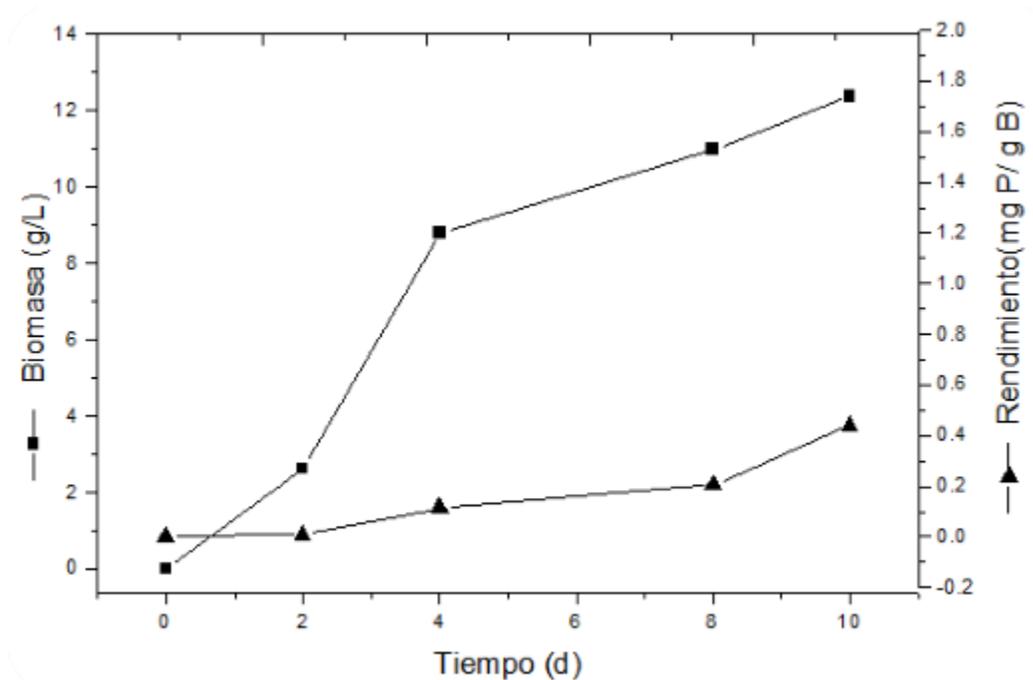


Figura 29. Segunda cinética de crecimiento del Rendimiento con respecto a la biomasa de la cepa *G. curtisii* en biorreactor tanque agitado de 7L con 50% de medio modificado a 30°C.

8.4.10. Análisis estadístico de los bioensayos del cultivo de *G. curtisii* en biorreactor tanque agitado a 30°C.

En este análisis estadístico como en el anterior, se midió la media entre los puntos de cada bioensayo como el error estándar de los datos. El propósito de dicho análisis es verificar los valores de discrepancia de cada uno de los puntos, esto significa que entre menor sea la barra de error mayor será la certeza del experimento. En los puntos finales como en el tercero se percibe una desviación considerable, aunado a la posible interpretación de datos durante el experimento, no obstante, en los puntos que corresponden a la producción de polisacáridos extracelulares, la discrepancia de los datos es poca.

La regresión lineal de la producción de biomasa tuvo una velocidad específica de crecimiento $\mu = 0.596$ y un tiempo de duplicación $td = 1.16$ d ($\ln 2 / \mu$)

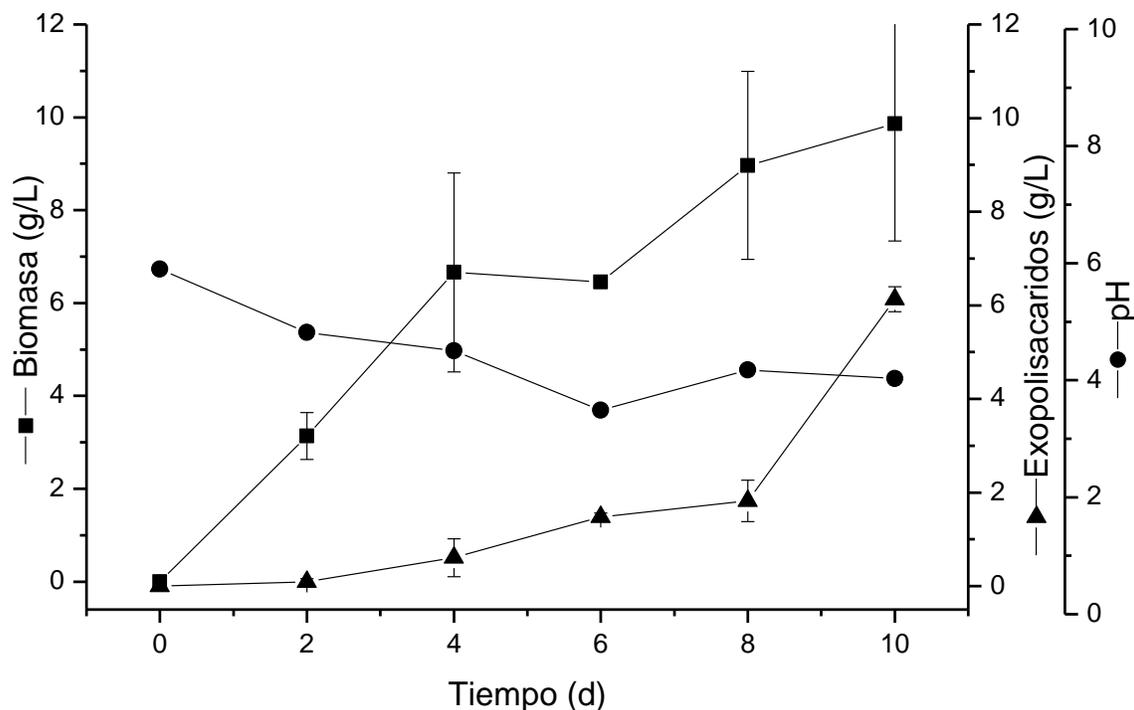


Figura 30. Análisis estadístico de los bioensayos elaborados a 30°C del cultivo de *G. curtisii*, se observa error estándar y media de ambos experimentos.

8.5. Cuantificación del porcentaje glucanos totales por método enzimático en biorreactor tanque agitado a 30°C

La cuantificación de los glucanos totales se implementó por vía del KIT enzimático K-YGBL Megazyme para hongos y levaduras con ayuda de los ensayos incluidos en la metodología del mismo. Para obtener el valor de los glucanos totales, se implementó una fórmula a partir de los valores de absorbancia obtenidos por el espectrofotómetro. El valor de los glucanos totales se expresa en peso sobre peso del polisacárido (%w/w).

$$\Delta E \left(\frac{F}{W} \right) (90)$$

Donde:

ΔE = El valor de la absorbancia de la muestra – absorbancia de reactivo blanco

F = El valor de la absorbancia de D-glucosa

W = El valor del peso de la muestra

Se obtuvo una cantidad de glucanos totales de 239.90 %w/w para la muestra obtenida del extracto del hongo producido en biorreactor a 30°C, mientras que en la muestra del cuerpo fructífero seco de *Ganoderma curtisii*, se cuantificó 22.41 %w/w y para el control 34.42 %w/w de glucanos totales (**Figura 31**).

Estos datos, nos demuestran la cantidad de glucanos existentes en el extracto de *Ganoderma curtisii*, que nos indica que bajo condiciones de temperatura elevada es posible incrementar la cantidad de estos metabolitos, y que a partir de los basidiomas del hongo seco, la cantidad de glucanos es considerablemente menor.

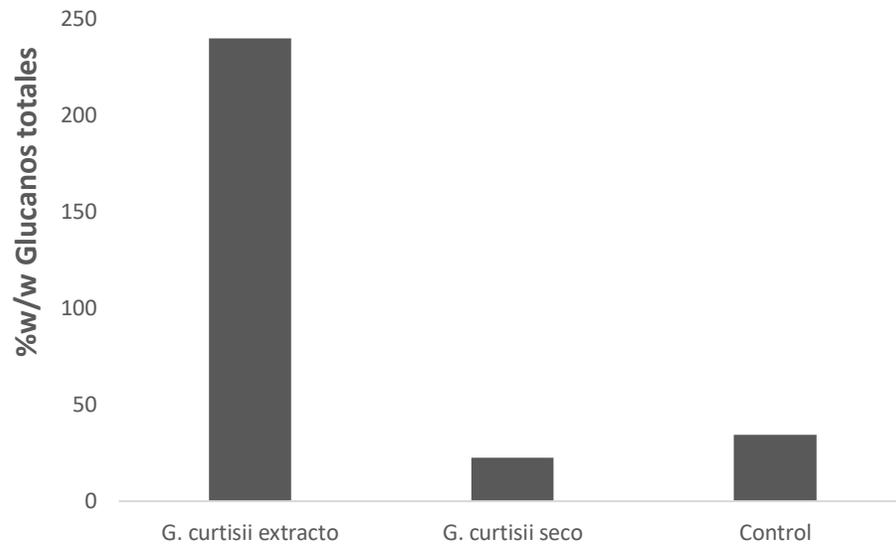


Figura 31. Glucanos totales presentes en bioensayos elaborados en biorreactor a 30°C del cultivo de *G. curtisii*, se observan tres muestras correspondientes al extracto, cuerpo fructífero y control.

8.5.1. Determinación de α -glucanos en biorreactor a 30°C

La cuantificación de los α -glucanos se observa en la **figura 32**, en dicha gráfica, vemos la presencia de estos metabolitos en tres diferentes muestras obtenidas a partir de extracto, el cuerpo fructífero y el control del kit. Es importante mencionar que los valores de las gráficas corresponden a la media de tres datos. Los valores fueron 113.01 %w/w de α -glucanos en extracto, 10 %w/w para el basidioma y el control un 3.81 %w/w. Esto refleja la gran presencia de estos metabolitos presentes en el extracto de *Ganoderma curtisii*, que nos lleva a pensar que siguiendo una metodología de producción donde las fuentes de carbono, agitación y la temperatura tienen un papel importante para la eficacia productiva de polisacáridos.

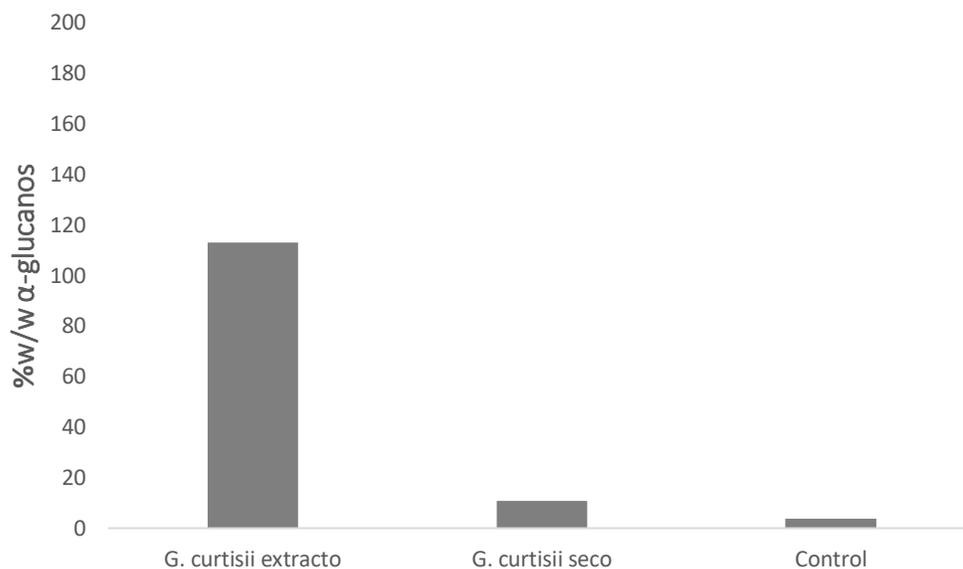


Figura 32. α -glucanos en bioensayos elaborados a 30°C del cultivo de *G. curtisii*, se observan tres muestras correspondientes al extracto, cuerpo fructífero y control.

8.5.2. Determinación de β -glucanos en biorreactor a 30°C

Los β - glucanos presentes en el extracto de *G. curtisii* también fueron sobresalientes, sus valores fueron 126.89 %w/w para la muestra del extracto, 11.60 %w/w para la muestra del cuerpo fructífero seco y 30% w/w para el control del kit. (Figura 33). Para obtener el valor de estos metabolitos se resta la diferencia de los α -glucanos al valor de los glucanos totales. A diferencia de los valores obtenidos en las cinéticas de matraz, en el biorreactor se pudo contemplar una presencia equilibrada de ambos metabolitos.

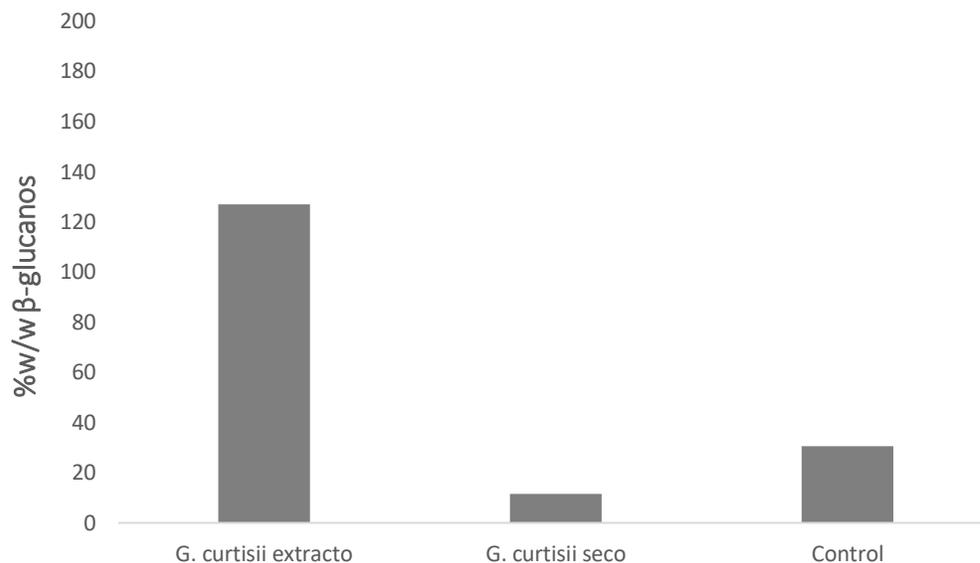


Figura 33. β -glucanos en bioensayos elaborados a 30°C del cultivo de *G. curtisii*, se observan tres muestras correspondientes al extracto, cuerpo fructífero y control.

8.6. Análisis por RMN del cultivo de *Ganoderma curtisii* a nivel biorreactor tanque agitado a 30 °C

El espectro de la RMN de ^1H , a 500 Mhz nos permitió corroborar que en el cultivo de *Ganoderma curtisii*, los polisacáridos son los componentes más abundantes. Al observar las señales con mayor intensidad en la región 3.7-3.8 ppm vemos que corresponden a ácidos orgánicos mientras que en la región 3.2-5.5 ppm corresponden a los polisacáridos. Esto se debe, a la presencia de dobletes de los protones anoméricos que corresponden a grupos CH. (Figura 34). Además, en la región 3.2 ppm se observa la presencia de los α -glucanos, por otro lado, la región 5.4 ppm muestra la presencia de los β -glucanos.

Este estudio, es de los más certeros en Química orgánica, pues por medio de las señales que genera el espectro, se puede conocer los metabolitos secundarios presentes en determinado extracto.

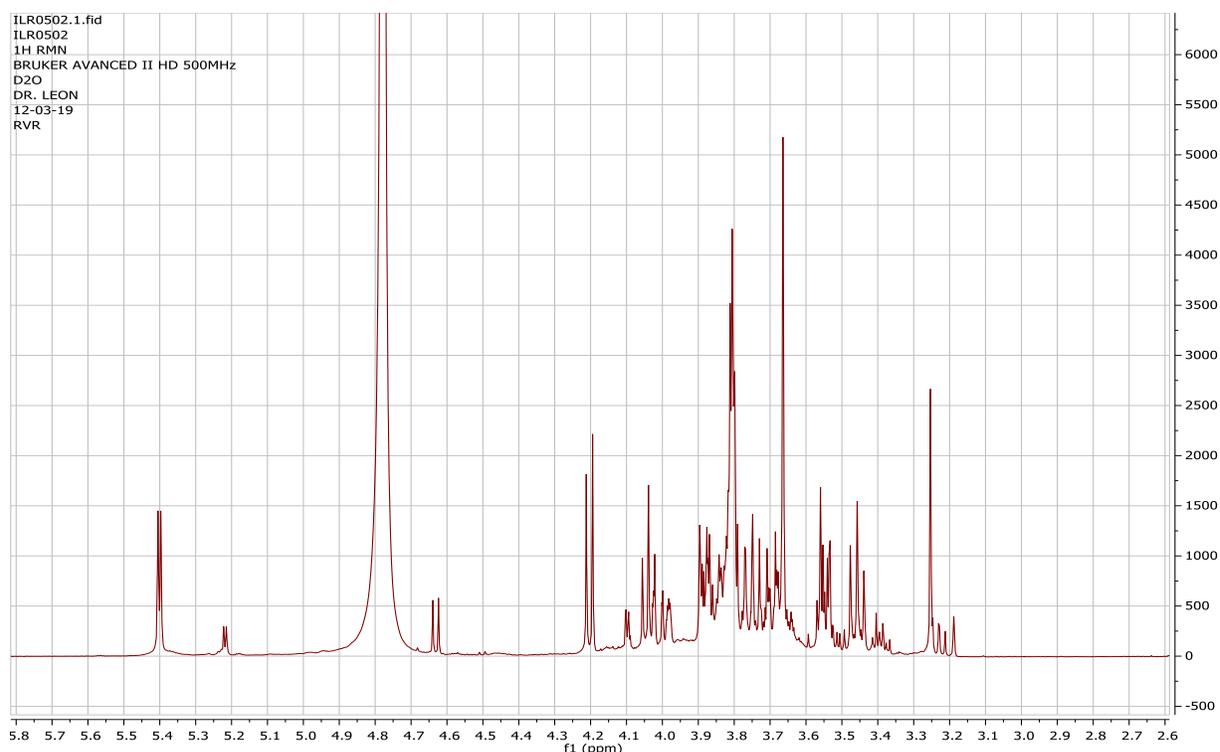


Figura 34. Espectro RMN ^1H de la fracción de polisacáridos soluble del cultivo en biorreactor tanque agitado de *Ganoderma curtisii*.

El espectro de la RMN de 1H, de la fracción de polisacáridos ampliado, permitió observar a mayor detalle los compuestos presentes en el cultivo de *Ganoderma curtisii*. Sin la señal del espectro del agua, pico 4.8 ppm, es posible ver a claridad los componentes mayoritarios en el cultivo de *Ganoderma curtisii*.

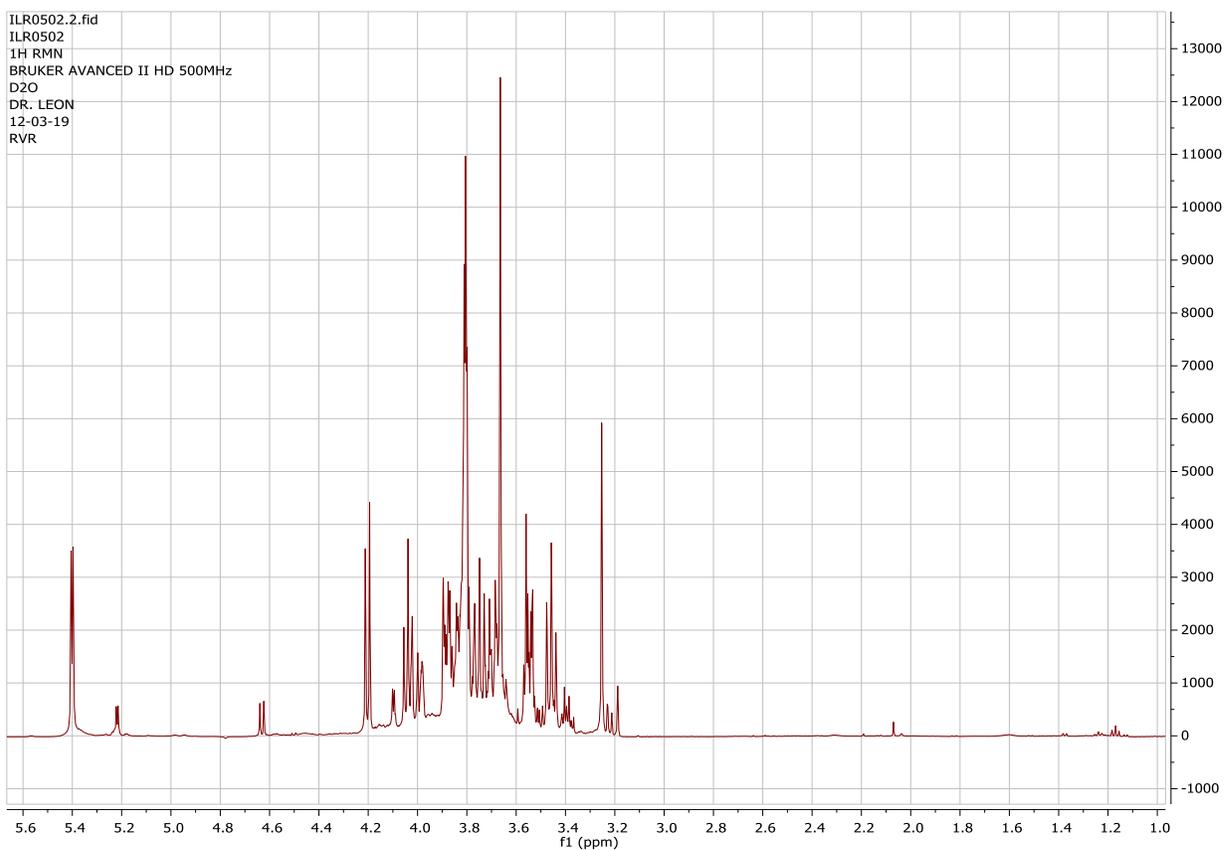


Figura 35. Espectro RMN 1H pre-saturado de la fracción de polisacáridos soluble del cultivo en biorreactor tanque agitado de *Ganoderma curtisii*.

En el espectro DEPT-Q, se observan nueve señales en las regiones 70 ppm a 106 ppm, tres corresponden a carbonos anoméricos 70.2 ,94.2 y 98.5.

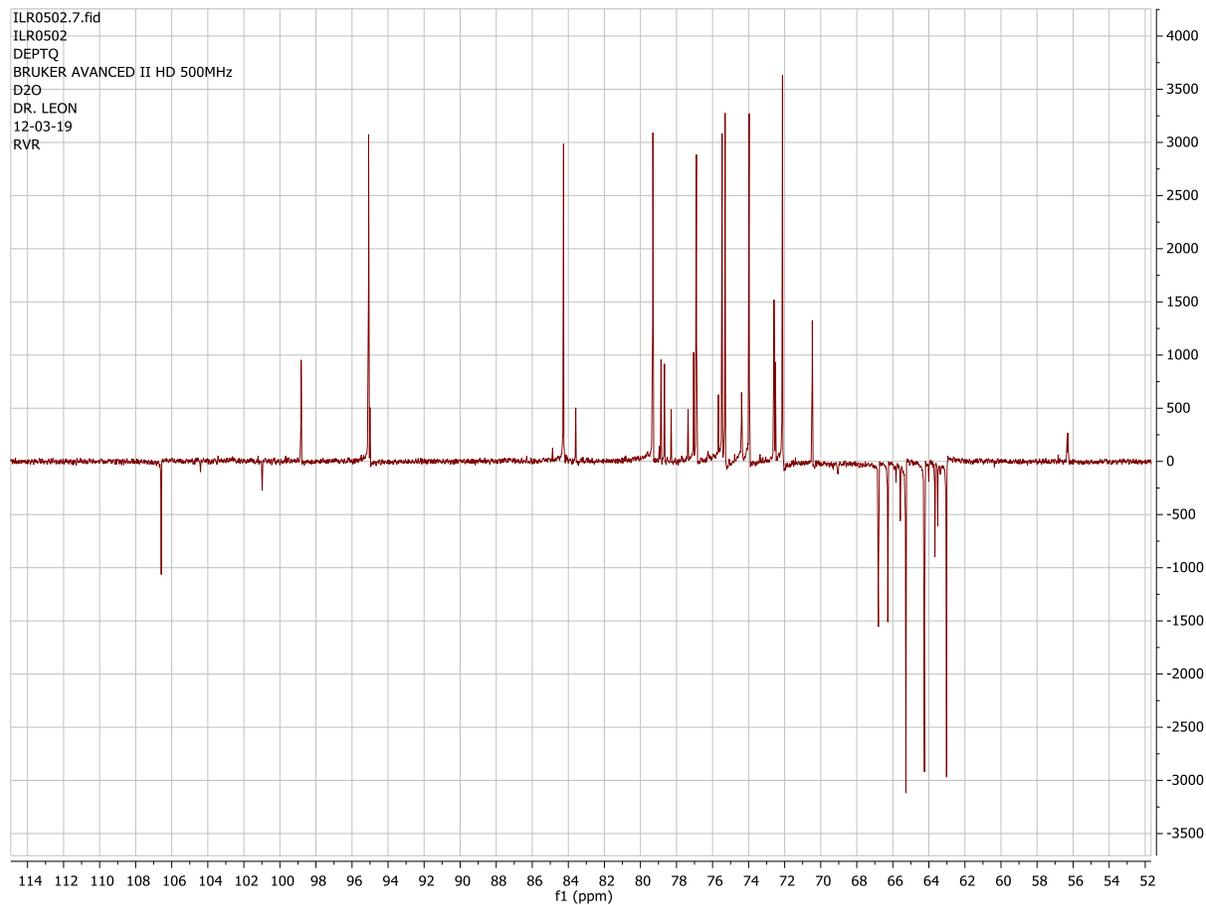


Figura 36. Espectro RMN DEPTQ de la fracción de polisacáridos soluble del cultivo en biorreactor tanque agitado de *Ganoderma curtisii*.

8.7. Cuantificación de los polifenoles totales en el cultivo de *Ganoderma curtisii* a nivel biorreactor tanque agitado a 30 °C

Se realizaron dos pruebas con 1 ml de medio 1:1(Sin diluir), del cultivo de *Ganoderma curtisii*, la absorbancia de las celdas fue 0.679 y 0.645 a una longitud de onda de 740 nm. Para obtener la cuantificación de polifenoles totales, se desarrolló la curva de calibración en equivalentes de ácido gálico (Figura 34).

De la ecuación de la recta, $y = mx + b$, se despeja x para obtener los polifenoles totales. El resultado de dichos metabolitos fue 74.58 $\mu\text{g/ml}$, y 69.72 $\mu\text{g/ml}$, esto permitió evaluar la actividad antioxidante presente en el cultivo de *Ganoderma curtisii* a nivel biorreactor tanque agitado bajo las condiciones específicas del cultivo, pues una de las cualidades de los polifenoles es la actividad antioxidante.

Despejando "x" en la ecuación $Y = mx + b$

Entonces
$$\frac{y-b}{m} = x$$

Sustituyendo
$$\frac{0.679-0.1569}{0.007} = x$$

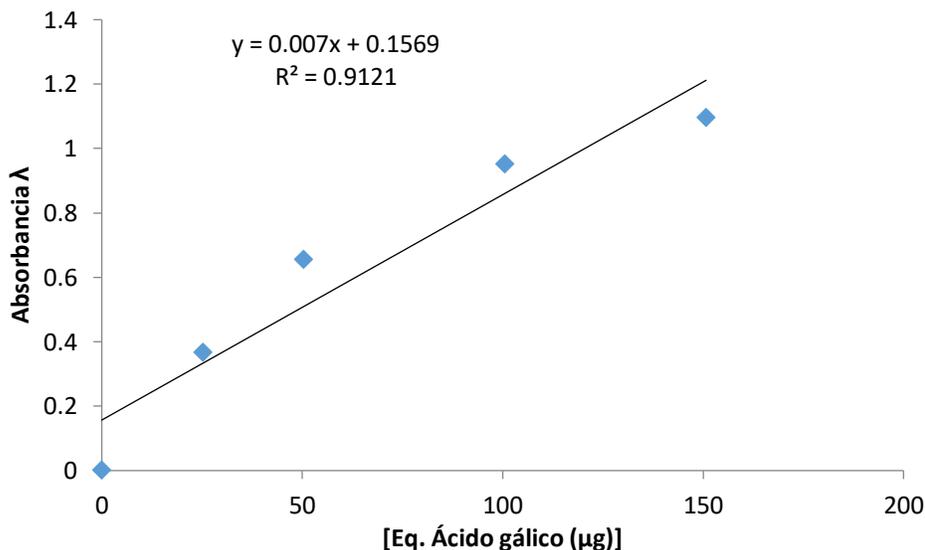


Figura 37. Curva de calibración de ácido gálico para cuantificar los polifenoles totales del cultivo de *Ganoderma curtisii* en Biorreactor a 30°C.

9. DISCUSIÓN

El cultivo de *Ganoderma* spp., y el uso potencial con enfoque medicinal, ha sido una alternativa significativa durante mucho tiempo en países asiáticos. No obstante, una de las formas más comunes de la extracción de metabolitos de este hongo, es por medio de infusión durante tiempos prolongados del basidioma (cuerpo fructífero). Sin embargo, esta técnica no resulta apropiada para la extracción de polisacáridos y muchos compuestos termolábiles son degradados además de la obtención de bajos rendimientos. Otra metodología utilizada es la extracción con solventes, sin embargo, el uso de algunos están restringidos por normas que controlan los productos que el ser humano puede consumir (De la Federación, D. O., 2016).

Núñez-Urquiza (2017), menciona que la producción de polisacáridos a partir de fases miceliales en cultivo sumergido produce hasta 10 veces más producto que lo obtenido utilizando el cuerpo fructífero, puesto que cada 80 g de carpóforos, se pueden obtener 100 mg de polisacáridos.

Esta clara desventaja del cultivo sólido es la razón por la que el cultivo sumergido resulte una buena estrategia productiva, de la cepa G-397, nativa del estado de Morelos. Aunado a esto, Núñez-Urquiza (2017), también resalta las cualidades de dicha cepa para producir metabolitos secundarios, inherente a la naturaleza de la especie. Otro aspecto importante de la producción en medios sumergidos es la reproducibilidad de métodos, así como, en los metabolitos producidos ya que estos al ser producidos bajo las mismas condiciones son susceptibles a estandarización, por lo tanto, en algunas ocasiones de producción de metabolitos libres de impurezas, lo que nos permite en un futuro la producción de fármacos especializados de origen natural y sin utilizar costosos sistemas de purificación lo que a la industria farmacéutica le es atractivo económicamente.

Uno de los puntos más importantes para el cultivo sumergido de *Ganoderma*, radica en el uso adecuado de las fuentes de carbono, pues en ellas, se encuentran los nutrientes fundamentales (carbono, minerales, azúcares etc.) para que el micelio sea capaz de aprovecharlos.

En el presente trabajo, se ajustaron variables para optimizar la producción de polisacáridos funcionales de *Ganoderma curtisii*, unas de esas variables es la fuente de carbono, en el cual en cultivos convencionales se utiliza glucosa como fuente de carbono principal y de fácil asimilación por las células fúngicas, sustituyendo su adición por (extracto de malta no diatasa al 3% , además de una fuente de carbono más compleja, como lo es el almidón y la celulosa presente en cereal a base de trigo en una concentración al 2%). También, se ajustó la velocidad de agitación orbital, utilizando mayor velocidad de agitación (200 rpm), lo que produce mayor fragmentación del micelio y por ende aceleramiento del crecimiento celular y disminución en el tamaño de pellet. Y por último, se utilizó un mecanismo de estrés, modificando la temperatura (25°C y 30°C), con la finalidad de inducir estimulación en los metabolitos responsables de la protección celular, como los son los polisacáridos.

Estas modificaciones se escalaron de un sistema en agitación orbital a un sistema de crecimiento de agitación mecánica en un sistema de fermentación controlada en un biorreactor. Como resultado de estas modificaciones se observó un mejor rendimiento en la producción de biomasa y polisacáridos. Bajo estas condiciones, se elaboraron cinéticas, a manera de preámbulo en matraz de 1,000 ml con 50% de capacidad de volumen de trabajo se obtuvo una $X_{max}= 4.30$ g/L y $P_{max}= 3.96$ g/L de los tiempos finales de la cinética (7 días).

Estos resultados, fueron la base para elaborar el bioensayo tanto a nivel matraz como biorreactor, pues modificando las variables previamente establecidas se logró observar un mejor rendimiento en la producción de biomasa y polisacáridos.

De los resultados pre-bioensayo, se obtuvieron también los rendimientos de los glucanos totales (α -glucanos y β -glucanos), se llevaron a cabo por medio del kit-enzimático K-YGBL (Megazyme). En el análisis mediante este método, se logró cuantificar una mayor cantidad

de α -glucanos con respecto a los β -glucanos, algo novedoso ya que, la literatura y el propio control establecen que las especies fúngicas poseen una mayor cantidad de β -glucanos. Es decir que la modificación de unas cuantas variables pueden resultar significativas al momento de obtener los resultados.

Los resultados obtenidos de la muestra del sobrenadante, se cuantificaron los glucanos totales de *Ganoderma curtisii*, los cuales fueron 230.91 % w/w, mientras que Legarda, *et al.*, (2015) reporta datos de dos muestra de glucanos totales de 39.63 % w/w y 40.39 % w/w para *Ganoderma* spp. Para el caso de los α -glucanos, se obtuvo un total de 154 % w/w y de β -glucanos 76.86 % w/w, comparado con Legarda, *et al.*, (2015) cuyos resultados fueron α -glucanos 5.66 y 5.09 %w/w y β -glucanos 33.98 y 35.30 % w/w, se produjo una cantidad más elevada de ambos glucanos.

Otros reportes indican porcentajes de glucanos totales para algunas especies fúngicas. Por ejemplo, para *Boletus edulis*, la cantidad de glucanos totales reportados es 27.4 % w/w., 3.8 % w/w para α -glucanos y 23.8 % w/w de β -glucanos (Megazyme, 2011). Para la especie *Morchella conica* el porcentaje de glucanos totales es de 26.8 %w/w, para α -glucanos 18.9 y β -glucanos 7.9 % w/w. (Megazyme, 2011).

Teniendo en cuenta a esta última especie (*Morchella conica*), podemos decir que existe una cantidad mayoritaria de α -glucanos en algunas especies de hongos macroscópicos reportado. Además, los resultados de Legarda, *et al.*, (2015), muestran una cantidad menor de glucanos con respecto al presente trabajo donde las variables utilizadas resultaron viables para la obtención de estos polisacáridos.

Los resultados demostraron que bajo condiciones específicas de cultivo (sistema diáxico, temperatura y agitación) es posible influir en el desarrollo de determinados metabolitos secundarios (polisacáridos) del hongo *Ganoderma curtisii*.

Se realizaron bioensayos a nivel matraz y biorreactor (tanque agitado), primeramente, fueron a nivel matraz donde se tomaron las tres variables mencionadas anteriormente. Los

datos obtenidos fueron $X_{\text{máx}} = 4.7 \text{ g/L}$ y $P_{\text{máx}} = 6.09 \text{ g/L}$ cuyo rendimiento fue $Y_{P/B} = 1.29 \text{ g/ml}$ en un tiempo de 10 días de duración de la fermentación con Malta 3% y Cereal 2%, con agitación a 200 rpm, filtración y temperatura de 25°C (Tabla 6).

La literatura muestra que es posible modificar las fuentes de carbono y la temperatura, como lo muestra Huang, H. C., *et al.*, (2009), Papinutti, L. (2010), Zhou, H *et al.*, (2014), Liu, S. R., y Zhang, W. R. (2018). Dichos autores, utilizaron alternativas para la fuente de carbono, temperatura ambiente (25°C) y obtuvieron resultados en función de estas variables. Para el caso de trabajos a 30 °C, Yang, F. C., & Liau, C. B. (1998), Legarda, X. L. *et al.*, (2015) establecen que también es posible el crecimiento celular de especies de *Ganoderma* a estas condiciones. Ver tabla de Anexo.

Con el medio modificado a 25°C es posible incrementar la producción de biomasa y polisacáridos, en este trabajo se obtuvo casi 3 veces más con respecto a los autores mencionados. Salvo el trabajo de Pappinuti (2010), quien uso fuentes convencionales glucosa y malta 4% y 6%, donde obtuvo Pmax de 15 g/L, aunque en un mayor tiempo de fermentación (21 días). Huang, H. C., *et al.*, (2009) y Liu, S. R., y Zhang, W. R. (2018) obtuvieron una cantidad mayor de Xmax, 12.9 g/L y 14.71 g/L, correspondientemente, pero una menor cantidad de Polisacaridos (Pmax). Ver tabla de Anexo.

Tabla 6. Resultados obtenidos de las cinéticas nivel matraz a 25°C del presente trabajo

Especie	F.C.	pH	T°C	Xmax	Pmax	Tiempo (d)	Autor
<i>Ganoderma curtisii</i>	Malta 3% Cereal2%	_	25°C	4.7 g/L	6.09 g/L	10	Presente trabajo

En los bioensayos donde se realizaron cinéticas a 30°C, se logró obtener resultados más satisfactorios, pues aunque Legarda, X, L., *et al.*, (2015) logro producir una cantidad mayor

de biomasa (12 g/L), no fue proporcional con la cantidad de polisacáridos producidos (2.6 g/L). Fang *et al.*, (2002) y Zhong *et al.*, (2002), también reportan grandes cantidades de biomasa (15.4 g/L y 16 g/L, respectivamente) pero una baja cantidad de producto (0.65 g/L y 0.55 g/L). El presente trabajo obtuvo una cantidad de casi tres veces mayor con respecto a estos autores en cuanto a polisacáridos, bajo estos criterios. (Tabla 7). Para las cinéticas en matraz a 30 °C, se obtuvo $X_{\text{máx}} = 5.9$ y $P_{\text{máx}} = 6.09$ g/L con rendimiento de $Y_{P/B} = 1.03$ mg P/g B con las mismas condiciones antes mencionadas. Ver tabla de Anexo.

Tabla 7. Resultados obtenidos de las cinéticas nivel matraz a 30°C del presente trabajo

Especie	F.C.	pH	TC	Xmax	Pmax	Tiempo (d)	Autor
<i>Ganoderma curtisii</i>	Malta 3% Cereal 2%	_____	30°C	5.9 g/L	6.1 g/L	10	Presente trabajo

La alta producción de polisacáridos tiene un impacto positivo en el rendimiento $Y_{P/B}$, que está en función de la fuente de carbono, con respecto a los trabajos reportados puede decirse que la fuente de carbono está en una media y se aprovecha adecuadamente para la producción de biomasa. Las variables de temperatura y agitación, representan condiciones específicas que influyen en la producción de biomasa y polisacáridos.

Una agitación de mayor prolongación garantiza la oxigenación del sistema, haciendo que las condiciones de cultivo se optimicen, mientras por otro lado, la temperatura puede utilizarse como un elisor abiótico y desarrolle perturbación a la cepa, lo cual provoque la mayor producción de moléculas del metabolismo secundario (exopolisacáridos) como respuesta al estrés generado.

La hipótesis del cultivo diáuxico, se basa en el aprovechamiento de las fuentes de carbono en diferentes periodos de la fermentación. A pesar de que en especies de hongos

macroscópicos no se hace énfasis en este concepto de ingeniería bioquímica, es importante resaltarlo, pues en el presente trabajo se fijó expectativas hacia este modelo cinético.

En las gráficas de los resultados, se percibe este comportamiento tanto en matraz (30°C) como en biorreactor (25°C y 30°C), lo que conlleva a pensar que la administración de dos fuentes de carbono distintas (malta y cereal) influya directamente en la producción de biomasa en un primer momento y de exopolisacáridos en un segundo momento.

Se observa también, una mayor cantidad de polisacáridos producidos a nivel matraz que con respecto a biorreactor, no resulta del todo certero, esto en consecuencia del tipo de condiciones físicas de uno y otro bioensayo. En el matraz, el espacio físico donde crece el hongo en los últimos días resulta demasiado pequeño, esto hace que llegue a un punto donde la biomasa quede completamente viscosa y sea difícil separar los exopolisacáridos. Por deducción, es posible que las muestras de los últimos días de matraz contengan residuo de biomasa y esto interfiera levemente en los resultados.

Los bioensayos a nivel biorreactor tanque agitado, por otra parte, fueron más certeros, tanto a 25°C como 30°C. En estas cinéticas de crecimiento, se observó el adecuado desarrollo del micelio del hongo, aunque alcanzo un desarrollo micelial considerado (biomasa), no llego a punto tal como en matraz. La producción máxima de biomasa (X_{max}) fue de 12.76 g/L y de polisacáridos extracelulares (P_{max}) 2.72 g/L en condiciones de temperatura a 25°C, con un rendimiento de 0.21 mg P/g B (**Tabla 8**).

La segunda caracterización del cultivo fue X_{max} de 9.22 y P_{max} de 2.9 tuvo un rendimiento de 0.31 mg P/g B. En los bioensayos hechos en biorreactor, se desarrolla la tendencia de cultivo diáuxico por las dos fuentes de carbono aplicadas, salvo que, en los bioensayos a 25°C la producción de polisacáridos extracelulares no fue tan grande como a 30°C. Ver tabla de **Anexo**.

Tabla 8. Resultados obtenidos de las cinéticas nivel biorreactor a 25°C del presente trabajo

Especie	F.C.	pH	TC	Xmax	Pmax	Tiempo (d)	Autor
<i>Ganoderma</i>	Malta 3%	_____	25°C	12.7 g/L	2.72	10	Presente trabajo
<i>curtisii</i>	Cereal 2%		25°C	9.22 g/L	2.9 g/L		

Los bioensayos a 30°C elaborados en biorreactor tanque agitado, obtuvieron resultados de Xmax de 10.2 g/L y Pmax de 6.4 g/L en condiciones de temperatura elevada, con un rendimiento de 0.62 mg P/g B. En el segundo bioensayo, los resultados para Xmax fue 12.38 g/L y Pmax 5.8 g/L con un rendimiento de 0.46 mg P/g B. Estos resultados, otorgaron un análisis profundo en torno a la aplicación de variables específicas de las condiciones de cultivo hacia la búsqueda de metabolitos secundarios, en este caso, exopolisacáridos (Tabla 9).

Autores como Choi, D.*et al.*, (2007), quienes obtuvieron Xmax de 7.9 g/L y Pmax de 2.6 g/L a través de biorreactor tanque agitado, ya reportaban la posibilidad de modificar las condiciones de cultivo (30°C y dos fuentes de carbono), para la producción de exopolisacáridos de *Ganoderma lucidum*, sin en cambio, no obtuvieron la misma cantidad de producto.

Berovic et al., (2015) realizaron cinéticas de crecimiento en biorreactor a 30°C, donde obtuvieron Xmax 17 g/L y Pmax de 1.7 g/L con solo una fuente de carbono (glucosa). La cantidad de producto fue de una décima parte al solo usarse una fuente de carbono, pues aunque hubo una importante producción de biomasa, no fue así con los polisacáridos de *Ganoderma lucidum*. Estos mismos autores, reportan para la especie *Grifola frondosa* una Xmax de 15.2 g/L y Pmax de 3.6 g/L, es decir que también la propia naturaleza de la especie

interfiere en la formación de metabolitos secundarios, puesto que, las condiciones tanto de temperatura como una única fuente de carbono fueron las mismas.

Tabla 9. Resultados obtenidos de las cinéticas nivel biorreactor a 30°C del presente trabajo

Especie	F.C.	pH	TC	Xmax	Pmax	Tiempo (d)	Autor
<i>Ganoderma curtisii</i>	Malta 3%	—	30°C	10.2 g/L	6.4.g/L	10	Presente trabajo
	Cereal 2%		30°C	12.3 g/L	5.8 g/L		

Solo el caso de Legarda, X. L. *et al.*, (2015), sale de este patrón, ellos lograron obtener una increíble Xmax de 156 g/L con una Pmax de 26 g/L, empero, utilizaron dos fuentes elevadas de carbono., Bio 3% (residuo agroindustrial) y lactosa 10% para una cepa reportada como *Ganoderma spp.*, silvestre. En este ejemplo, recae dos de los argumentos anteriores, una es la utilización de dos fuentes de carbono en el cultivo de *Ganoderma spp* (cultivo diáuxico), y la otra las cualidades biológicas de las especies. Por tanto, algunas especies de hongos macroscópicos pueden responder de manera positiva a las fuentes de carbono, como a la estimulación por temperatura para producir metabolitos secundarios.

La cuantificación de los glucanos totales producidos en biorreactor a 30°C, fue 239.90 %w/w en el extracto, mientras que en la muestra del cuerpo fructífero seco se cuantifico 22.41 %w/w y para el control 34.42 %w/w de glucanos totales. A diferencia de las muestras de las cinéticas previas, en estos resultados se obtuvo una cantidad casi semejante de α -glucanos y β -glucanos. Los valores de α -glucanos en extracto fueron 113.01 %w/w, 10 %w/w para el basidioma y el control un 3.81 %w/w. Para los β - glucanos presentes en el extracto también fueron sobresalientes, sus valores fueron 126.89 %w/w para la muestra del extracto, 11.60 %w/w para la muestra del cuerpo fructífero seco y 30% w/w para el control del kit.

La presencia de estos dos metabolitos se ve en manifiesto en el análisis por RMN hecho del extracto del hongo, pues en dicho se observan los singuletes que corresponden a protones anoméricos de CH cuyas constante de acoplamiento están en 3 a 4 pmm para alfa y 3 a 8 pmm para beta, esto nos refiere que en efecto ambos metabolitos se encuentran en forma casi igualitaria bajo condiciones de temperatura elevada y modificación de las fuente de carbono pero en un biorreactor tanque agitado.

Los polifenoles que se cuantificaron a nivel biorreactor bajo condiciones elevadas de temperatura y modificación del medio con respecto a las fuentes de carbono, no tuvieron una cantidad prevaleciente basado en otros autores. Los valores obtenidos fueron 0.0697 mg/ml y 0.0745 mg/ml, empero, autores como Mohsin *et. al.*, (2011) reportan valores de 0.953 mg/ml y 3.295 mg/ml de una cepa silvestre de *Ganoderma lucidum*.

Dubost, *et. al.*, (2007) reportan una cantidad importante de polifenoles para *Agaricus bisporus*, los valores son de 4.2 a 10.6 mg/g para dicha especie. Para especies como *L. edodes*, *P. otreatus* y *G. frondosa* la cantidad de polifenoles es un poco menor, los valores obtenidos rondan entre 0.21- 2,6 mg /g. Cabe resaltar que la R2 de este último autor fue de 0.86. Huerta *et. al.*, reportan para extractos hidroalcoholicos de *Ganoderma curtisii* valores de 35.63 mg/g y en extractos etanolicos de 49.14 mg/g provenientes de cuerpo fructífero, es decir, los polifenoles son compuestos que están mayormente representados en los basidiomas y no a partir del cultivo sumergido.

10. CONCLUSIONES

- El cultivo diáuxico a nivel matraz, pero mejor observado en biorreactor tanque agitado, resulta viable para producir una cantidad importante de biomasa y polisacáridos extracelulares, esto se debe, a la disponibilidad de las fuentes de carbono que son aprovechadas en dos momentos de la fermentación.
- La producción de glucanos totales fue mayoritaria con respecto al control del kit enzimático como de la literatura. Los α -glucanos, fueron mayoría en el cultivo de *Ganoderma curtisii* con respecto a los β -glucanos bajo condiciones de cultivo controladas en las cinéticas del análisis previo pero con el medio modificado a nivel matraz.
- El aumento de temperatura (30°C) en el cultivo de *Ganoderma curtisii* a nivel biorreactor tanque agitado fue determinante para la producción de polisacáridos extracelulares, a pesar de, observarse la misma tendencia diáuxica tanto a 25°C como a 30°C, solo en esta última hubo un aumento en la producción de exopolisacáridos.
- En la cuantificación de glucanos totales en biorreactor a 30°C, se observó una cantidad casi semejante de ambos tipos de glucanos, contrario a, las cinéticas previas en matraz, donde los α -glucanos fueron mayoría pero en ambos ensayos se demostró la gran cantidad de estos metabolitos presentes en el cultivo de *Ganoderma curtisii*.
- La cuantificación de polifenoles también pudo ser reportado, salvo que esos metabolitos no son tan abundantes como en otras especies de hongos empero, si se encuentran presentes en el cultivo de *Ganoderma curtisii*.
- *Ganoderma curtisii* es una cepa capaz de producir una cantidad importante de polisacáridos extracelulares, esto quizá se deba a la naturaleza silvestre de la cepa, donde en condiciones adversas es capaz de subsistir por medio de producción de metabolitos secundarios.

11. LITERATURA CITADA

Bhosle, S., Ranadive, K., Bapat, G., Garad, S., Deshpande, G., & Vaidya, J. (2010). Taxonomy and diversity of Ganoderma from the Western parts of Maharashtra (India). *Mycosphere*, 1(3), 249-262.

Blank, S (2012). The StartUp owner's manual: the step-by-step guide for building a great company hardcover-march 1, 2012.

Cao, Y., Wu, S. H., & Dai, Y. C. (2012). Species clarification of the prize medicinal Ganoderma mushroom "Lingzhi". *Fungal Diversity*, 56(1), 49-62.

Castillo-Lormendez, C., (2006). Escalamiento de raíces transformadas de la especie *Galphimia glauca* en un biorreactor *Airlift* modificado. Tesis profesional. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.68:1-68.

Chávez-Sánchez, M., (2017). Los macromicetes del bosque mesófilo de montaña de la comunidad de Los Robles, municipio de Tlalnepantla. Tesis Profesional. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 84:1-51.

Choi D.I, Maeng JM, Ding J.L, Cha W.S. (2007). Exopolysaccharide production and mycelial growth in an air-lift bioreactor using *Fomitopsis pinicola*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 17 (8): 1369-78.

Cornejo-Martínez, A. (2016). Modelos de gestión de la innovación basado en *Lean StartUp* para una MIPyME Mexicana. Tesis profesional. Universidad autónoma del estado de Morelos. Cuernavaca, Mexico.

Dubost, N. J., Ou, B., & Beelman, R. B. (2007). Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 105(2), 727-735.

De la Federación, D. O. (2016). Reglamento de control sanitario de productos y servicios. *Mexico: Diario Oficial de la Federación*.

Fang QH, Zhong JJ (2002) Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites-ganoderic acid and polysaccharide. *Biochem. Eng. J.* **10**: 61–65.

Fang, Q. H., & Zhong, J. J. (2002). Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry*, *37*(7), 769-774.

Feng. W., Nagal, J, e Ikekawa, (2001). A clinical pilot study of EEM for advanced cáncer-Treatment with EEM for improvement of cachexia and inmune function compard with MPA. *Biotherapy*. 2276-2781.

Herrera, T. y Ulloa, M. (2013) El reino de los hongos. Editorial fondo cultura económica. Segunda edición. Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF.Pp.552.

Hu, Y., Ahmed, S., Li, J., Luo, B., Gao, Z., Zhang, Q., y Hu, X. (2017). Improved ganoderic acids production in *Ganoderma lucidum* by wood decaying components. *Scientific reports*, *7*, 46623.

Huang, H. C., Chen, C. I., Hung, C. N., & Liu, Y. C. (2009). Experimental analysis of the oil addition effect on mycelia and polysaccharide productions in *Ganoderma lucidum* submerged culture. *Bioprocess and biosystems engineering*, *32*(2), 217-224.

Ivone, H. A., Jorge, M. T., Guadalupe, G. R. M., & Berenice, Y. J. (2016). Total polyphenols and antioxidant activity of *Ganoderma curtisii* extracts. *J of Med Plants Studies*, *4*(4), 136-141.

Legarda, X. L., Echevarria, C. A., & Sánchez, F. S. (2015). Producción de polisacáridos a partir de *Ganoderma sp.*, aislado en la región andina. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *17*(2), 44-54.

Liu, S. R., & Zhang, W. R. (2018). Hyperproduction of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* using a solid seed grown in fine-powder of wheat bran and in vitro evaluation of the antioxidant activity of the exopolysaccharides produced. *Food science and biotechnology*, *27*(4), 1129-1136.

Liu, Y., Du, J., Jia, R., Cao, L., Jeney, G., Teraoka, H., Yin, G., y Xu, P, (2017) Protective effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharide against carbon tetrachlorid induced hepatic damage in precision-cut carp liver slices. Oct., 43 (5): 1209-1221.

López-Peña, D., Gutiérrez, A., Hernández-Navarro, E., Valenzuela R., Esqueda, M (2016) Diversity and distribution of *Ganoderma* (Polyporales: *Ganodermataceae*) from Sonora, Mexico. *Botanical Science* 94(2): 431-439, 2016.

Ma, H,T., Hsieh, J,F., y Chen, S,T., (2015) Anti-diabetic effects of *Ganoderma**Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*. Jun., 114: 109-13.

Martínez-Carrera, D., Morales, P., Sobal, M., Bonilla, M., & Martínez, W. (2007). México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos comestibles. *JMC Sánchez, El cultivo de las setas Pleurotus spp. en México*, 20-40.

McCleary, B.V. & Draga, A. (2016). Measurement of β -Glucan in Mushrooms and Mycelial Products. *Journal of AOAC International*, Vol. 99, No. 2.

Min-Lee K, Young-Lee K, Yong-Lee, H. (1999). Bistage control of pH for improving exopolysaccharide production from micelia of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermentor. *Journal of Bioscience and Bioengineering.*, 88, 646-650.

Mohsin, M., Negi, P. S., & Ahmed, Z. (2011). Determination of the antioxidant activity and polyphenol contents of wild Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt. Fr.) P. Karst.(higher Basidiomycetes) from central Himalayan hills of India. *International journal of medicinal mushrooms*, 13(6).

Nuñez-Urquiza, V., (2017) Obtención de polisacáridos con actividad neuroprotectora en cultivo sumergido de *Ganoderma lucidum*. Tesis profesional. Morelos, Mexico. Pp.75.

Olmedo-Hernández, A., (2014) Cultivo de cepas nativas de *Ganoderma* spp. Conocido como reishi en los mercados internacionales. Tesis profesional. Morelos, México. Pp.54.

Papinutti, L. (2010). Effects of nutrients, pH and water potential on exopolysaccharides production by a fungal strain belonging to Ganoderma: *Ganoderma lucidum* complex. *Bioresource technology*, 101(6), 1941-1946.

Quinones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). The polyphenols, naturally occurring compounds with beneficial effects on cardiovascular disease. *Nutrición hospitalaria*, 27(1), 76-89.

Quintero-Ramírez, R., (1990). Ingeniería Bioquímica: teoría y aplicaciones. Editorial Alhambra segunda edición. México, DF. Pp.332.

Riveros, H., y Baquero, M., (2004). Inocuidad, calidad y sellos alimentarios. Documento técnico. Primera edición, Quito, Ecuador.

Sancho, R. (2007). Innovación industrial: perspectivas. *Revista Española de documentación científica*.(4): 553-564.

Schmidt-Hebbel, H., (1990). Aditivos alimentarios y la reglamentación de los alimentos. Editorial, fundación Chile, Universidad de Chile. Santiago, Chile.

Schwannecke, M, K., (2009). Physico-chemical characteristics and antioxidant activity of tart cherry powder dried by various drying methods. ProQuest.

Svagelj, M. B. M., Habijanac, J., Gregori, A., Boh, B., Pankl, M., & Wraber, B. (2015). Cultivation of Medicinal Mushrooms *Ganoderma lucidum* and *Grifola frondosa* Mycelia and Polysaccharides in Bioreactors.

Unlu, A, Nayir, E, Kirca, O, Ozdogan, M. (2016) *Ganoderma lucidum* (Reishi mushroom) and Cáncer. Review article. 2016; 21(4): 792-798.

Wagner, J, R., Sceni, P., y Otero, M., (2008). Las levaduras y sus productos derivados como ingredientes en la industria de alimentos. Editorial, Universidad Nacional de Quilmes. (5) 233:246

Yang, F. C., & Liao, C. B. (1998). The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. *Process Biochemistry*, 33(5), 547-553.

Zhou, H., Bi, P., Wu, X., Huang, F., & Yang, H. (2014). Improved polysaccharide production in submerged culture of *Ganoderma lucidum* by the addition of coixenolide. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(3), 1497-1505.

Páginas web consultadas:

Organización mundial de la Salud. (2018). Las principales causa de defunción. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2017). Enfermedades crónico-degenerativas en Mexico. <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo125&s=est>

Página web especializada. (2018). Identificación y Taxonomía de Hongos, *Ganoderma curtisii*. <http://www.mushroomexpert.com/>

Página de Gobierno en Salud (2018). Norma Oficial Mexicana NOM-072-SSA1-1993. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/072ssa13.html>

Página de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. (2018) <https://www.gob.mx/cofepris>

Página especializada de la Biblioteca Nacional de Medicina de los E.U. (2019). El complejo B como Fuente nutracéutica. <https://medlineplus.gov/spanish/bvitamins.html>

Página especializada de la Biblioteca Nacional de Medicina de los E.U. (2019). El zinc en la dieta. <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/002416.htm>

Página especializada del Método Enzimático Kit megazyme. (2019). <https://secure.megazyme.com/Beta-Glucan-Assay-Kit-Yeast-Mushroom>

ANEXOS

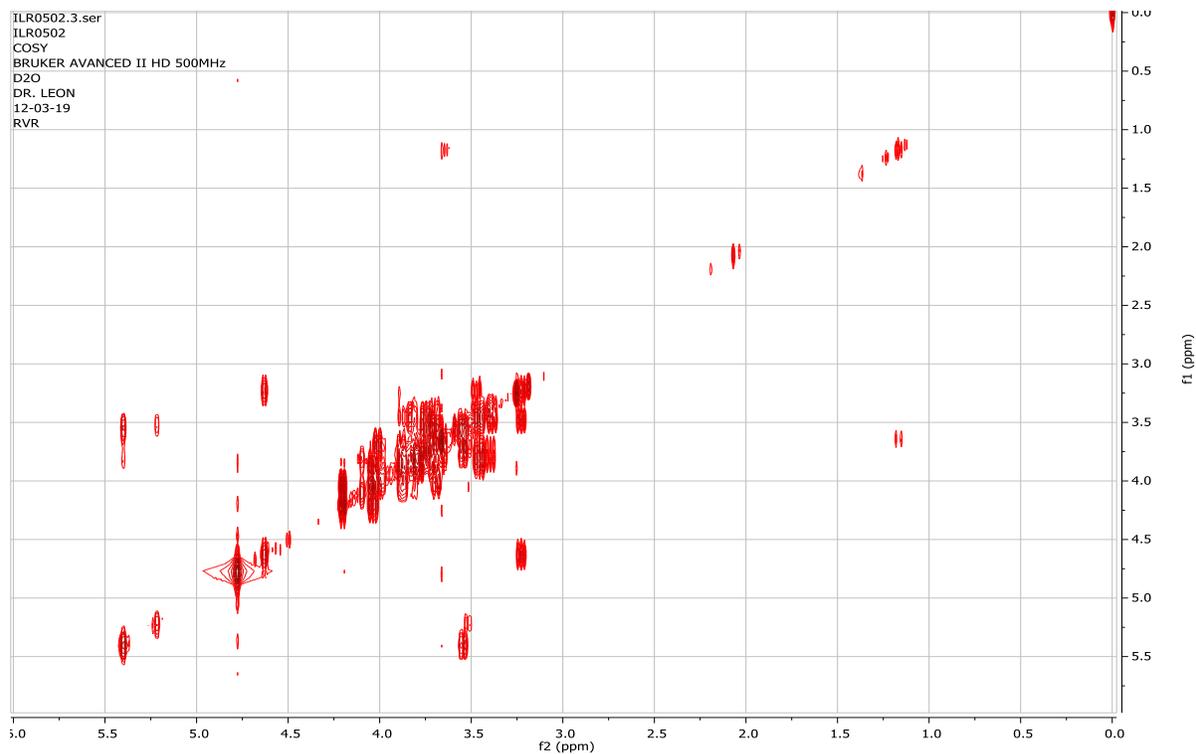
Especie	F.C.	pH	T °C	Xmax	Pmax	t (días)	Autor
<i>Ganoderma lucidum</i>	Semilla de coix, coixenolide 0.05% Glucosa 2.5%	---	25 °C	3.9 g/L	0.283 g/L	7	Zhou, H <i>et al.</i> , (2014)
<i>Ganoderma lucidum</i>	0.75 g/L Trigo/semilla	----		14.71 g/L	0.74 g/L	12	Liu, S. R., & Zhang, W. R. (2018)
<i>Ganoderma lucidum</i>	Glucosa 4% Malta 6%	3.5		-----	15 g/L	21	Papinutti, L. (2010)
<i>Ganoderma lucidum</i>	Glucosa 1% Malta 1%	4		4.32 g/L	2.2 g/L	12	Papinutti, L. (2010)
<i>Ganoderma lucidum</i>	Aceite de maíz 2%	---		12.9 g/L	1.03 g/L	13	Huang, H. C., <i>et al</i> (2009).
<i>Ganoderma lucidum</i>	Glucosa 5% Levadura 0.01%	4	30 °C	-----	1.6 mg/ml * rend.	14	Yang, F. C., & Liao, C. B. (1998)
<i>Ganoderma sp.</i>	Medio Bio 3% Lactosa 10%	4	30 °C	12 g/L	2.6 g/L	10	Legarda, X. L. <i>et al.</i> , (2015).

Trabajos realizados a nivel matraz para especies de del genero *Ganoderma* de acuerdo a la literatura revisada en el presente.

Especie	F.C	pH	T°C	Xmax	Pmax	t (días)	Autor
<i>Fomitopsis pinicola</i>	Glucosa al 4% Malta 0.1% Levadura 0.5%	6	25 °C	7.9 g/L	2.6 g/L	12	Choi, D.et al., (2007).
<i>Ganoderma lucidum</i>	Glucosa 3% extracto de levadura 0.1%	4	30 °C	-----	1.8 mg/ml *Rend.	12	Yang, F. C., & Liau, C. B. (1998)
<i>Ganoderma lucidum</i>	Glucosa 3%	5-4	30 °C	17 g/L	1.7 g/L	14	Berovic et al., (2015)
<i>Grifola frondosa</i>	Glucosa 3%	5-4	28°C	15.2 g/L	3.6 g/L	28	Berovic et al., (2015)
<i>Ganoderma sp.</i>	Bio 3% lactosa 10%	_____	30 °C	153 g/L	26 g/L	5	Legarda, X. L. et al., (2015).

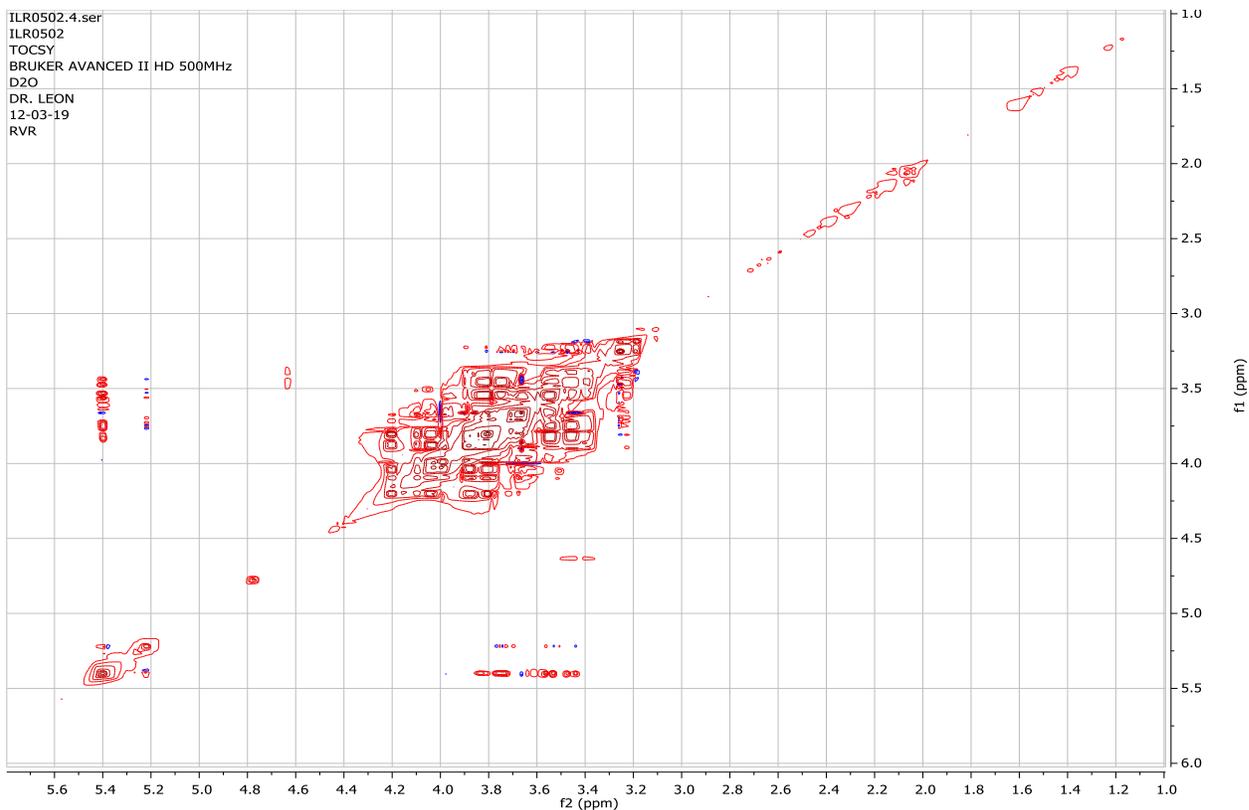
Trabajos realizados a nivel biorreactor para especies de del genero *Ganoderma* de acuerdo a la literatura revisada en el presente.

El experimento COSY, nos permite asignar los desplazamientos químicos de cada 1H de las unidades de los polisacáridos, usando los acoplamientos que se muestran en el espectro.



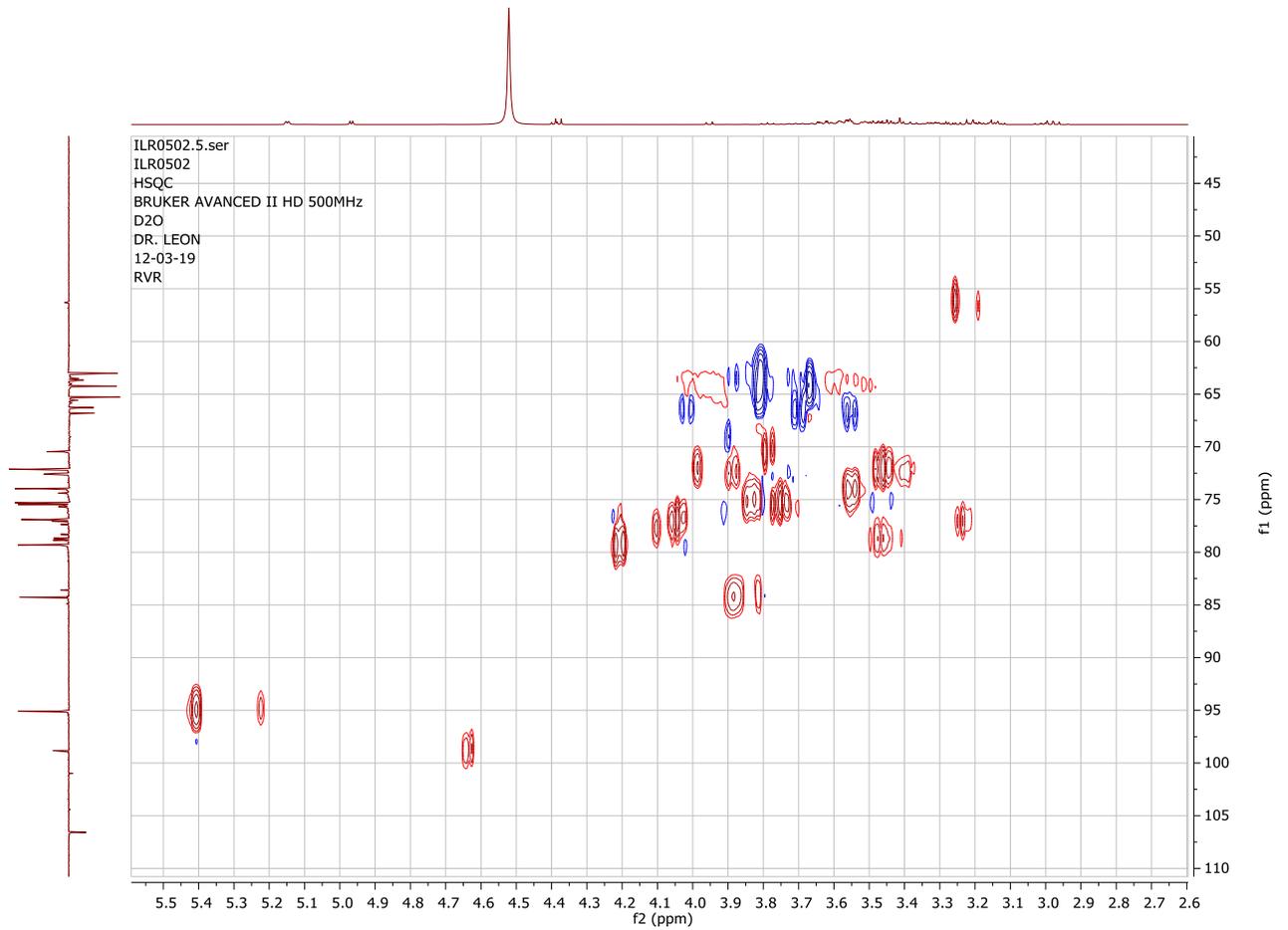
Espectro RMN COSY de la fracción de polisacáridos soluble del cultivo en Bioreactor agitado de *Ganoderma curtisii*.

El experimento TOCSY, ayuda a determinar las señales del sistema de espines de los polisacáridos, esto se logra, a partir de los desplazamientos químicos de las porciones anoméricas.



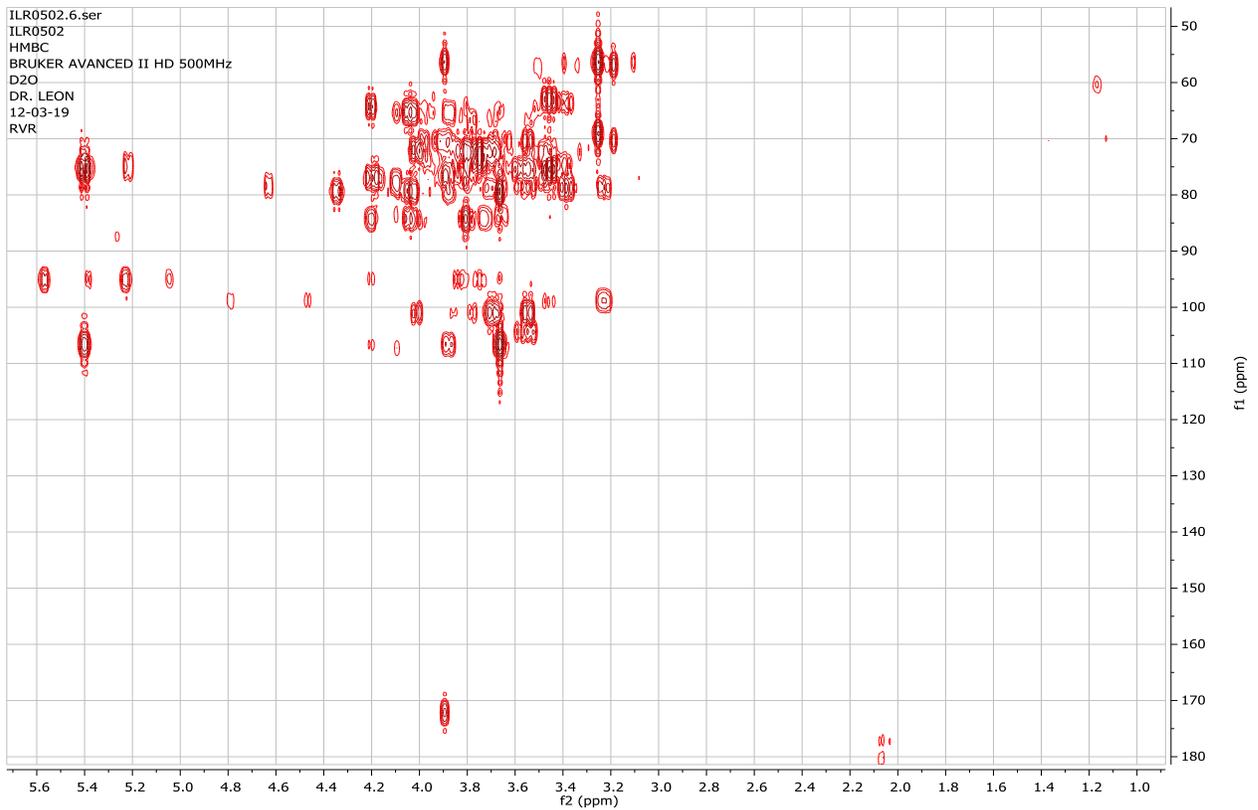
Espectro RMN TOCSY de la fracción de polisacáridos soluble del cultivo en Bioreactor agitado de *Ganoderma curtisii*.

El experimento HSQC, permite conocer los desplazamientos químicos que en los protones de átomos de C, se encuentren unidos.



Espectro RMN HSQC de la fracción de polisacáridos soluble del cultivo en Biorreactor agitado de *Ganoderma curtisii*.

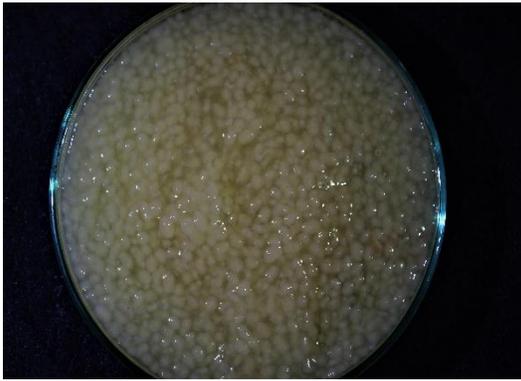
Los sitios de unión, de los diferentes polisacáridos se determinaron por el experimentos HMBC, esto, por medio de correlaciones entre si.



Espectro RMN HMBC de la fracción de polisacáridos soluble del cultivo en Bioreactor agitado de *Ganoderma curtisii*



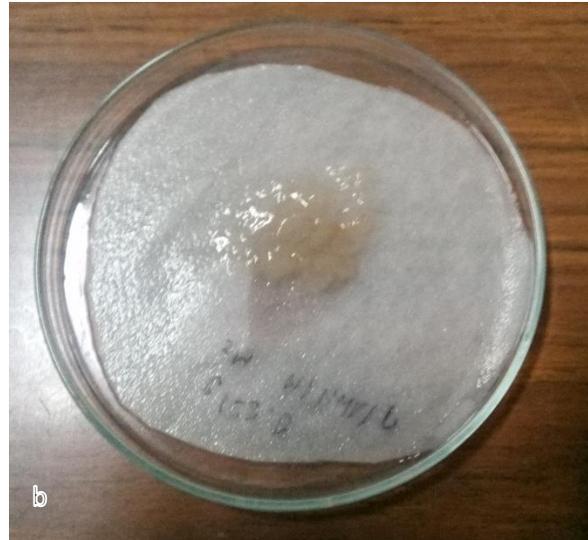
Biorreactor tipo tanque agitado de 7L por medio del cual se desarrollaron las cinéticas de crecimiento para evaluar su producción de biomasa y polisacáridos extracelulares. La imagen corresponde al biorreactor a 30°C de la cepa G-397 del hongo *Ganoderma curtisii*.



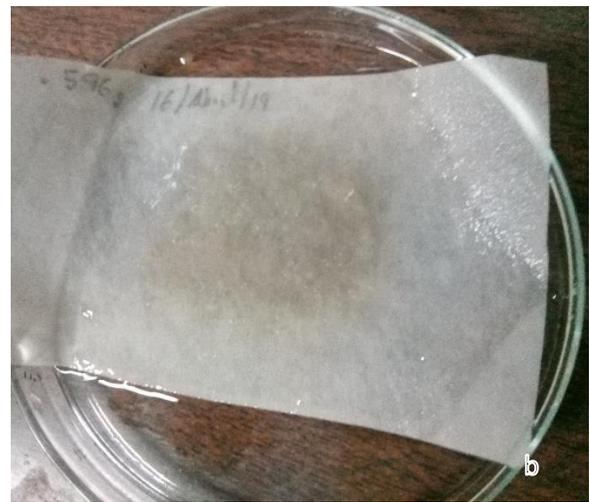
Pellets más homogéneos de la biomasa obtenidos de biorreactor tipo tanque. La imagen corresponde al biorreactor a 30°C de la cepa G-397 del hongo *Ganoderma curtisii*.



Pellets de biomasa obtenidos de biorreactor tipo tanque. La imagen corresponde al biorreactor a 25°C de la cepa G-397 del hongo *Ganoderma curtisii*.



La imagen corresponde a las muestras obtenidas del biorreactor tanque agitado a 30°C de la cepa G-397 del hongo *Ganoderma curtisii*. a) Biomasa apunto de procesar para obtener peso constante, b) Polisacáridos excretados al medio listos para procesar.



La imagen corresponde a las muestras obtenidas del biorreactor tanque agitado a 25°C de la cepa G-397 del hongo *Ganoderma curtisii*. a) Biomasa fresca a procesar en peso constante, b) Polisacáridos excretados al medio.



Imágenes correspondientes al biorreactor tanque agitado con el cultivo de la cepa G-397 del hongo *Ganoderma curtisii*. a) Biorreactor a 30°C, donde se observa una gran cantidad de biomasa al final de la cinética. b) Biorreactor a 25°C, igual forma corresponde al final de la cinética, salvo que en este caso la biomasa no rodeo la superficie del biorreactor.

COMITÉ REVISOR

Dr. Isaac Tello Salgado (tutor)

Dra. Irene Perea Arango

Dr. Porfirio Juárez López

Dr. Ismael león rivera

MCCI. Ana Ligia Espinosa García



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

Cuernavaca, Mor., a 20 de enero de 2020.

Programa:
Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Título de la tesis: **Optimización del proceso de producción de polisacáridos de *Ganoderma curtisii***

Alumno que presenta tesis a revisión: **Mario Oscar Chávez Sánchez**

Comité de revisión de tesis:
Dr. Isaac Tello Salgado (Tutor)
Dra. Irene Perea Arango
Dr. Porfirio Juárez López
Dr. Ismael León Rivera
MCCI. Ana Ligia Espinosa García

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

Dr. Isaac Tello Salgado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

Cuernavaca, Mor., a 20 de enero de 2020.

Programa:
Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Título de la tesis: **Optimización del proceso de producción de polisacáridos de *Ganoderma curtisii***

Alumno que presenta tesis a revisión: **Mario Oscar Chávez Sánchez**

Comité de revisión de tesis:
Dr. Isaac Tello Salgado (Tutor)
Dra. Irene Perea Arango
Dr. Porfirio Juárez López
Dr. Ismael León Rivera
MCCI. Ana Ligia Espinosa García

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE



Dra. Irene Perea Arango

Cuernavaca, Mor., a 20 de enero de 2020.

Programa:
Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Título de la tesis: **Optimización del proceso de producción de polisacáridos de *Ganoderma curtisii***

Alumno que presenta tesis a revisión: **Mario Oscar Chávez Sánchez**

Comité de revisión de tesis:
Dr. Isaac Tello Salgado (Tutor)
Dra. Irene Perea Arango
Dr. Porfirio Juárez López
Dr. Ismael León Rivera
MCCI. Ana Ligia Espinosa García

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE



Dr. Porfirio Juárez López



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

Cuernavaca, Mor., a 20 de enero de 2020.

Programa:
Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Título de la tesis: **Optimización del proceso de producción de polisacáridos de *Ganoderma curtisii***

Alumno que presenta tesis a revisión: **Mario Oscar Chávez Sánchez**

Comité de revisión de tesis:
Dr. Isaac Tello Salgado (Tutor)
Dra. Irene Perea Arango
Dr. Porfirio Juárez López
Dr. Ismael León Rivera
MCCI. Ana Ligia Espinosa García

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

Dr. Ismael León Rivera



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

Cuernavaca, Mor., a 20 de enero de 2020.

Programa:
Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Título de la tesis: **Optimización del proceso de producción de polisacáridos de *Ganoderma curtisii***

Alumno que presenta tesis a revisión: **Mario Oscar Chávez Sánchez**

Comité de revisión de tesis:
Dr. Isaac Tello Salgado (Tutor)
Dra. Irene Perea Arango
Dr. Porfirio Juárez López
Dr. Ismael León Rivera
MCCI. Ana Ligia Espinosa García

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE



MCCI. Ana Ligia Espinosa García

