
**TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA**

**DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUÍMICA Y BIOQUIMICA**

Tesis

**Propuesta de un sistema para la producción de biomasa de hongos basidiomicetos,
caso de estudio *Ganoderma lucidum*.**

Que para obtener el título de:

Ingeniero Químico

Presenta:

Eduardo Ramos Juárez

Número de control:

15161224

Asesor:

Dra. Claudia López Sánchez

Comisión Revisora:

M.C. Jorge Miguel Martínez Canseco

M.C. Minerva Donají Méndez López

Dra. María de Jesús Ramírez Altamirano

Dedicatoria

Para mi familia

Para mi madre,

Mi abuela dice que vivirás
en mi corazón, aunque
nunca en mi memoria.

Agradecimiento

A mis abuelos, mi tía y mis hermanitas, mi familia. Por todos los años que hemos vivido juntos y el apoyo que me han brindado.

Mi agradecimiento más sincero a mis compañeros y amigos de laboratorio, por la ayuda y consejos que me dieron y por el tiempo que dedicaron a instruirme. Con ellos he aprendido muchas cosas que me serán de utilidad en distintos momentos de la vida.

A todos mis profesores, por sus enseñanzas y consejos. Porque entre sus clases también se tomaron el tiempo para hacernos mejores personas.

Resumen

Entre los microorganismos más utilizados por la humanidad están los hongos, pues han sido utilizados para la elaboración de productos alimenticios desde hace cientos de años. Además, son capaces de sintetizar una gran cantidad de metabolitos y enzimas que pueden sustituir algunos de los productos químicos utilizados en distintas industrias.

Durante este trabajo se estudió el desarrollo del hongo *Ganoderma lucidum*, un hongo basidiomiceto, implementando la fermentación sumergida para el desarrollo de biomasa. Con el fin de estudiar el crecimiento de los basidiomicetos se realizaron distintos experimentos, comenzando por una cinética de crecimiento radial en tres medios de cultivo (ExM, DS, PDA), e incubando el micelio a una temperatura de 30 °C por una semana. Pasando a una cinética destructiva en fermentación sumergida con los mismos sustratos manteniendo una agitación constante de 120 rpm para favorecer el intercambio de oxígeno y la formación de pellets, con el fin de medir el consumo de sustrato y la generación de biomasa y proteína. Posteriormente se realizó una segunda cinética para obtener la mayor cantidad de biomasa posible y que tuvo una duración de 10 días, a la biomasa resultante se le aplicaron los análisis bromatológicos para obtener su composición nutrimental. Posteriormente la biomasa obtenida fue secada a 60 °C en un horno seco y sometida a un proceso de extracción sólido-liquido, obteniéndose un extracto etanólico que fue concentrado por destilación y se le realizaron pruebas de efecto antimicrobiano mediante la técnica de discos de papel.

Partiendo como base el estudio, estandarización y resultados obtenidos en estos experimentos con *G. lucidum*, se elaboró una propuesta de un sistema para la producción de biomasa de hongos basidiomicetos, iniciando por el crecimiento en caja Petri, para pasar después a la generación de biomasa en fermentación sumergida y finalmente recuperar la biomasa como un producto de interés comercial. Este trabajo puede servir de base para futuros proyectos, o bien pasar a ser implementado en una planta piloto.

Para la innovación y la elaboración de nuevos productos es necesaria la intervención de la ingeniería en los procesos, con el fin de optimizarlos, ante la búsqueda de soluciones más amigables con el medio ambiente la humanidad se ha dado a la tarea de reinventar los procesos productivos como se conocen, por lo que la implementación de los

microorganismos y otros seres vivos para la extracción y síntesis de compuestos de interés para las diferentes industrias es de gran importancia. Sin embargo, antes de poder implementar un nuevo sistema de producción es necesario pasar por distintas etapas, partiendo de la etapa experimental en laboratorio, continuando en una planta piloto y finalmente pasando a mayor escala en la etapa industrial.

INDICE

Introducción	10
Objetivos	12
General	12
Específicos	12
3. Marco teórico	13
3.1 Los hongos	13
3.2 Los basidiomicetos	16
3.2.1 Características de los basidiomicetos	16
3.2.3 Importancia bioquímica y usos medicinales.	18
3.3 <i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Karst	18
3.3.1 Morfología y taxonomía	19
3.3.2 Características	19
3.3.2.1 Condiciones de crecimiento	19
3.3.3 Propiedades medicinales	20
3.4 La biotecnología	21
3.4.1 Los hongos y la biotecnología	23
3.5 La Fermentación	24
3.5.1 La fermentación sumergida en la industria	25
4. Metodología	27
4.1 Cinética de crecimiento radial en fermentación solida	27
4.1.1 Preparación e inoculación del medio	27
4.1.2 Inoculación del micelio	27
4.1.3 Lectura del diámetro de crecimiento	28
4.2 Cinética de fermentación sumergida	28
4.2.1 Preparación e inoculación del medio	28
4.2.2 Toma de muestras	29
4.2.2.1 Análisis de Dubois para azúcares totales	29
4.2.2.2 Análisis Bradford para proteínas	30
4.3 Producción de micelio en mayor volumen	31
4.4 Segunda cinética destructiva de fermentación sumergida	31
4.4.1 Toma de muestras	32
4.4.1 Análisis bromatológicos	33

4.4.1.1 Determinación de humedad y cenizas (AOAC 925.45 y AOAC 923.03).....	33
4.4.1.2 Determinación de ácidos grasos por el método Soxhlet (AOAC 920.39).....	33
4.4.1.3 Determinación de fibra (AOAC 962.09).....	34
4.4.1.4 Determinación de proteínas (AOAC 988.05).....	35
4.5 Producción de micelio y recuperación de metabolitos	36
4.5.1 Producción de biomasa por fermentación sumergida.....	36
4.5.2 Elaboración de extractos	36
4.5.2.1 Concentración de extractos	37
4.5.3 Pruebas del efecto antimicrobiano	37
5. Resultados y discusión	39
5.1 Cinética de fermentación solida	39
5.2 Resultados de cinética de fermentación sumergida.....	46
5.2.1 Resultados de proteína.	46
5.2.2 Resultados del análisis de azúcares	49
5.2.2 Resultados de biomasa	52
5.3 Producción de biomasa a mayor volumen.....	54
5.4 Segundo experimento de crecimiento de biomasa	55
5.5 Análisis bromatológicos.....	58
5.6 Pruebas antimicrobianas de los extractos.....	62
5.7 Discusión.....	65
5.8 Propuesta de un sistema para la producción de biomasa de hongos basidiomicetos	69
5.8.1 Descripción del sistema propuesto	70
5.8.2 Diagrama de flujo del sistema.....	72
6. Conclusiones	74
Referencias	75
Anexos.....	78

Índice de figuras

figura 1 Héroes y villanos de la prosperidad humana (recuperado de Cuevas Moreno 2016)	14
figura 2 Clasificación actual de hongos, recuperada de "Biología de los hongos"	16
figura 3 muestra las partes de un basidiomiceto, incluye también su ciclo de reproducción. Recuperado de (Kuhar, Castigluta, & Papinutti, 2013)	17
figura 4 Crecimiento radial a las 72hr	42
figura 5 Crecimiento radial a las 96 hr	43
figura 6 Crecimiento radial a las 168 hr	44
figura 7 Crecimiento radial a las 216 hr	45
figura 8 Proteína en medio líquido ExM	46
figura 9 Proteína en medio líquido DS	47
figura 10 Proteína en medio líquido PDB	47
figura 11 Comparación de los resultados obtenidos para la proteína en los tres medios de cultivo	48
figura 12 Fotografías tomadas del análisis de proteínas, a), b) y c) son las muestras utilizadas en análisis Bradford de los medios ExM, PDB y DS respectivamente.	48
figura 13 Consumo de azúcares en el medio ExM	49
figura 14 Consumo de azúcares en el medio DS	50
figura 15 Consumo de azúcares en el medio PDB	50
figura 16 Comparación del consumo de azúcares en los tres medios de cultivo.	51
figura 17 análisis de azúcares método de Dubois	51
figura 18 Crecimiento de biomasa en medio ExM	52
figura 19 Crecimiento de biomasa en medio DS	53
figura 20 Crecimiento de biomasa en medio PDB	53
figura 21 Biomasa filtrada	55
figura 22 Aumento de biomasa en el medio líquido ExM	56
figura 23 Aumento de biomasa en el medio GP	56
figura 24 Crecimiento de biomasa, a) Preinóculos medio GP, b) Preinóculos medio ExM, c) Crecimiento de Pellets en ExM, d) Crecimiento de Pellets en medio GP, e) Biomasa filtrada	57
figura 25 Pruebas de humedad y cenizas a) horno seco, b) desecador, c) biomasa seca y d) cenizas	59
figura 26 Extracción Soxhlet, a) extracto de la muestra A1, b) extracto de la muestra A2	60
figura 27 análisis de fibra, a) destilación con ácido sulfúrico, b) filtrado, c) pH neutro, e) destilación con hidróxido de sodio y f) cenizas finales	61
figura 28 análisis de proteínas, a) Muestras en el digestor, b) destilador Kjendalt, c) Una de las muestras cristalizada, d) muestra A1 antes y después de la titulación, e) muestra A2 antes y después de la titulación	62
figura 29 Halos de actividad antimicrobiana, a) y b) son del ensayo con E. coli para la muestra M1 y M2, c) y d) son de la prueba utilizando Staphylococcus para las muestras M1 y M2	64

figura 30 Biomasa en medio de cultivo GP a) y b) son pellets formados en el medio, c) biomasa filtrada	66
Figura 31 biomasa en medio de cultivo ExM, a) y b) pellets formados en el medio, y c) biomasa filtrada	67
figura 32 Prueba de control negativa, a) E. coli 1x10E5, b) Staphylococcus 1x10E5.....	68

Índice de tablas

Tabla 1 Diluciones realizadas para el análisis de azúcares.	30
Tabla 2 Composición de medio de cultivo GP	32
Tabla 3 Resultados del crecimiento radial de micelio en cm	39
Tabla 4 Velocidad de crecimiento en medio PDA	40
Tabla 5 Velocidad de crecimiento medio ExM	41
Tabla 6 Velocidad de crecimiento, medio ADS	41
Tabla 7 Proteína encontrada en las muestras de los tres medios de cultivo utilizado en g/l	46
Tabla 8 Resultados del análisis de azúcares	49
Tabla 9 Resultados de biomas	52
Tabla 10 Gramos de biomasa y proteína producida por gramo de sustrato consumido	54
Tabla 11 Biomasa generada por los frascos a volumen de 200 ml.....	54
Tabla 12 Crecimiento de biomasa, segunda cinética de crecimiento	55
Tabla 13 Resultados de análisis bromatológicos para la muestra del medio ExM.....	58
Tabla 14 Resultados de los análisis bromatológicos de la muestra del medio GP	58
Tabla 15 Diámetros en cm de los halos de actividad antimicrobiana de los extractos frente a E. coli 1x10E6 UFC a 72 hr	63
Tabla 16 Diámetros en cm de los halos de actividad antimicrobiana de los extractos frente a Staphylococcus 1x10E6 UFC a 72 hr.....	63
Tabla 17 Diametros en cm de los halos de actividad antimicrobiana de los extractos frente a E. coli 1x10E5 UFC a 72 hr	63
Tabla 18 Diámetros en cm de los halos de actividad antimicrobiana de los extractos frente a Staphylococcus 1x10E5 UFC a 72 hr.....	64
Tabla 19 Diámetro de los halos en la prueba de control positiva.....	64
Tabla 20 Comparación de los resultados obtenidos con los extractos de las muestras 1 y 265	
Tabla 21 Comparación de las muestras 1 y 2 con el antibiótico	65

Introducción

El uso organismos vivos para el desarrollo de distintos productos empleando bioprocesos es una herramienta tecnológica muy usada en distintas industrias, tanto en la producción de los alimentos, como el control de plagas en la agricultura, así como el aprovechamiento de enzimas utilizadas por la industria química y las rutas metabólicas que permiten la síntesis de distintos productos (Ostos Ortiz, Rosas Arango, & González Devia, 2019).

Los hongos son organismos cosmopolitas, existen tanto microscópicos como macroscópicos y a lo largo de la historia la humanidad se les ha dado distintos usos, principalmente en la producción de alimentos fermentados y en la producción de medicinas, tales como los antibióticos (Cuevas Moreno, 2016).

El cultivo de hongos basidiomicetos para el consumo es una actividad de talla industrial, ya que son ricos en distintos nutrientes y sustancias bioactivas que ayudan a preservar la salud, mientras que para su cultivo se pueden usar distintos tipos de desechos orgánicos, por lo que representan una solución al manejo de residuos orgánicos producidos en distintos procesos productivos.

Por otro lado, los hongos producen distintas sustancias que están presentes tanto en el cuerpo fructífero como en el micelio. La gran cantidad de metabolitos que producen los hongos tiene distintos usos en la industria, desde la fabricación de medicinas como el uso que se les puede dar en otras industrias, un ejemplo es el uso de las enzimas producidas para la degradación de lignina en el blanqueamiento del papel (Hernández Melchor, Ferrera Cerrato, & Alarcón, 2019).

Mientras que el cultivo de hongos comestibles se puede realizar mediante el proceso de fermentación en estado sólido, lo cierto es que si el proceso a realizar está pensado para la recuperación de sustancias como los metabolitos del hongo, la fermentación en estado líquido o fermentación sumergida ofrece mayores ventajas al poder controlar más fácilmente las variables que influyen en el proceso, también se facilita la recuperación de los productos de interés y el proceso es fácilmente escalable (Suárez Arango & Nieto, 2013).

La biotecnología aplicada en los procesos industriales tiene un gran potencial para el desarrollo de distintos productos, por lo que existe un gran interés por el desarrollo de sistemas de producción que utilicen bioprocesos con el fin de obtener mayor eficiencia en el consumo de energía y productos obtenidos, pero para llevar estos sistemas a niveles industriales es necesario pasar por distintas fases iniciando por la etapa experimental.

En este trabajo se propone un sistema para obtener biomasa de hongos basidiomicetos utilizando *Ganoderma lucidum* como caso de estudio y así comprender el proceso de fermentación sumergida y las complicaciones y ventajas que implica, con el fin de obtener biomasa y metabolitos, como productos de interés comercial por la versatilidad que tiene en la elaboración de distintos productos.

Objetivos

General

Realizar una propuesta para la producción y recuperación de biomasa de *Ganoderma lucidum*

Específicos

Desarrollar cinéticas de crecimiento en fermentación sumergida con el fin de optimizar el tiempo de cultivo.

Obtener biomasa para la elaboración de extracto etanólico, realizar análisis bromatológico del micelio y determinación de proteína total.

Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos en presencia de *E. coli* y *Staphylococcus*

3. Marco teórico

3.1 Los hongos

Los hongos son organismos que a pesar de ser muy diferentes a las plantas estuvieron clasificados junto a ellas por mucho tiempo, pero ahora se clasifican en un reino distinto, el reino fungi. En el libro “Introducción a la micología” de C. J. Alexopoulos se menciona que los hongos son un grupo de organismos vivos desprovistos de clorofila, con pocas excepciones poseen paredes celulares definidas, se reproducen por esporas, pueden reproducirse sexual o asexualmente y tienen estructuras somáticas filamentosas ramificadas rodeadas por una pared celular filamentosa compuesta principalmente por celulosa, quitina o ambas.

Al ser organismos eucarióticos poseen un núcleo diferenciado y organelos citoplásmicos rodeados por membranas lo que los distingue de las bacterias, la gran mayoría de hongos tiene estructuras filamentosas llamadas hifas, estas crecen en forma de largos brazos en todas direcciones, son generalmente uniformes y delgadas con diámetros de 1 a 2 μ m, a la aglomeración de hifas se le llama micelio. Los hongos son heterótrofos y muchos de sus componentes orgánicos los obtienen del sustrato en el cual crecen y se desarrollan. Existe un amplio rango de sustratos que el hongo puede utilizar como nutriente, pero antes de tomar los nutrientes que necesita el hongo degrada la materia liberando enzimas hidrolíticas a través de sus paredes celulares, los hongos crecen en hábitats oscuros y necesitan humedad, la misma que pueden obtener del medio o de la atmosfera en la que crecen (Cepero de García, 2012).

Para su crecimiento necesitan del oxígeno libre como aceptor de electrones por lo que la mayoría son aerobios estrictos, pero algunos pueden ser anaerobios facultativos. No son organismos móviles ya que carecen de flagelos para permitirles el movimiento con excepción de las zoosporas y los planogametos. Como ya se mencionó la fase vegetativa o somática puede ser filamentosa como en los hongos que están constituidos por hifas; unicelular como las levaduras; o también plasmodial como los mohos mucilaginosos. La mayoría de los hongos son saprótrofos ya que alimentan de materia orgánica en descomposición, pero también forman relaciones simbióticas con otros organismos, cuando la relación es favorable

para ambos se dice que son mutualistas como por ejemplo las micorrizas y los líquenes, mientras que si el único beneficiado es el hongo entonces se denominan parásitos (Cepero de García, 2012).

Hace más de 20 años la estimación aceptada sobre el número de especies y hongos en la tierra era de 1.5 millones de especies, el día de hoy los estudios sugieren que este número varía entre 500, 000 y 5 millones de especies. Hasta la fecha se recomienda que se acepten hasta 3 millones de especies de hongo para uso general, actualmente se han descrito 110,000 especies de hongos de todo tipo, y la estimación del número de especies setas en la tierra (hongos basidiomicetos), está estimada entre 150,000 y 160,000, de las que solo el 10% son conocidas por la ciencia (Wasser S. P., 2014).

Se estima que en nuestro país existen 200 000 especies de hongos de los cuales solo se conoce el 5 %, sin embargo, esta cifra es variable debido a la gran diversidad que existe en el país. (Aguirre Acosta, Ulloa, Aguilar , Cifuentes, & Valenzuela, 2014).

Además de su papel en la naturaleza también pueden ser patógenos para los humanos y animales. Los hongos han formado parte de la historia de la humanidad jugando un papel de héroes y villanos pues, así como pueden causar infecciones también han sido útiles en la producción de alimentos como los quesos, el pan y licores, además de tener distintas aplicaciones tanto en la medicina como en la agricultura, el control biológico y los metabolitos que producen se utilizan en distintos procesos (Cuevas Moreno, 2016).

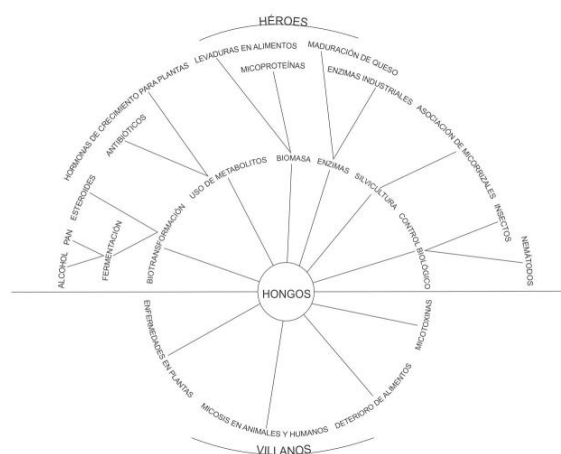


Figura 1 Héroes y villanos de la prosperidad humana (recuperado de Cuevas Moreno 2016)

Entre algunos los hongos que han sido útiles para el ser humano podemos destacar a *Penicillium notatum* aislado por Alexander Fleming para la producción de penicilina un antibiótico producido por este hongo y represento un gran avance para la medicina al permitir el tratamiento de enfermedades que antes eran incurables. Así mismo en la industria alimenticia se utilizan levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* para la fermentación de cerveza, vino y pan. Mientras que otros hongos como *Penicillium roquefortii* y *Penicillium camemberti* se encargan de la maduración del queso roquefort y camembert respectivamente. Por otro lado, los hongos también han causado distintos problemas como son las plagas en cultivos que incluso han causado hambrunas como el caso del tizón tardía de la papa causado por *Phytophthora infestans* en el siglo XIX, en los humanos los hongos pueden causar dermatomicosis que son infecciones superficiales en tejidos queratinizados producidos por dermatofitos, pero también hay otros hongos oportunistas que puedan causar infecciones o sobreinfecciones en la piel, uñas o pelo (Ocara, Vieille, Carvajal, & Cruz, 2018).

Clasificación de los hongos

Actualmente los organismos con características de hongos se distribuyen en tres reinos distintos, reino Fungi, reino Chromista y reino Protozoa. Distribuidos en estos reinos se encuentran 14 Filos, el grupo de hongos de interés para este trabajo es el *Filo Basidiomycota* que se encuentra en el reino Fungi.

A continuación, se presenta una tabla donde se resume la clasificación de los hongos que fue recuperada del libro Biología de los hongos (Cepero de García, 2012).

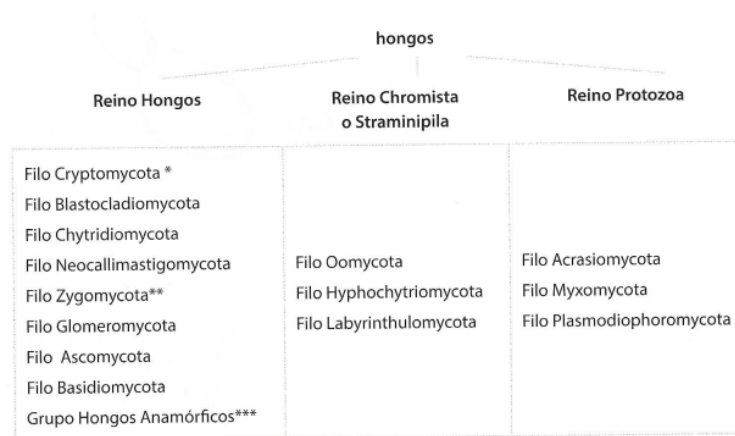


Fig. 1.1. Clasificación actual de los hongos

* Este filo ha sido validado recientemente por Jones *et al.* (2011).

** Grupo polifilético artificial no considerado actualmente como un filo.

*** Grupo artificial sinónimo: Hongos Conidiales, Mitospóricos, Deuteromicetes o Fungi Imperfecti.

Figura 2 Clasificación actual de hongos, recuperada de (Cepero de García, 2012)

3.2 Los basidiomicetos

El grupo de hongos basidiomicetos está dentro del grupo de macromicetos conocidos también como hongos superiores, los macromicetos son el grupo de hongos que son visibles a simple vista y aquí se encuentran los tres grupos más grandes; zigomicetos, ascomicetos y basidiomicetos. Dentro de esos tres grupos están especies comestibles, tóxicas, medicinales, degradadoras de material orgánico y que poseen características con aplicaciones en la biotecnología, así como en distintas industrias como la degradación de contaminantes y en la producción de enzimas. En la industria los basidiomicetos son de gran interés debido principalmente a la transformación de residuos agroindustriales lignocelulósicos en biomasa, además de esto el sustrato utilizado en el cultivo se puede utilizar después como abono orgánico para nuevos cultivos, lo que puede describirse como un proceso de reciclamiento ecológico (Ramírez Aristizábal & Arango Londoño, 2017).

3.2.1 Características de los basidiomicetos

Mientras que el micelio de este grupo de hongos pasa desapercibido, su principal característica es la formación de estructuras reproductoras llamadas cuerpos fructíferos, estas estructuras poseen tres partes características en su estructura; el píleo, himenio y estípite. El

píleo es una formación del cuerpo fructífero que en la mayoría de las especies se presenta con forma de sombrero, suele tener distintas formas dependiendo de la especie. El himenio es la estructura fértil que puede ser totalmente lisa o estar formada por laminas, venaciones, arrugas o poros. Por último, el estípite es una especie de tallo que puede ser muy pequeño o grande, puede estar presente o ausente y también puede presentarse de manera central o lateral al himenio (Quiroga Arenas & Supelano Gómez, 2019).

Además de esto algunas especies tienen una membrana, llamada velo parcial que cubre los cuerpos fructíferos cuando aún no maduran (primordios), este velo se extiende desde el tallo (estípite) hasta el sombrero y a medida que el hongo crece se va rompiendo el velo dejando un anillo parcial o total alrededor del tallo y residuos similares a escamas sobre el sombrero (Kuhar, Castiglulia, & Papinutti, 2013).

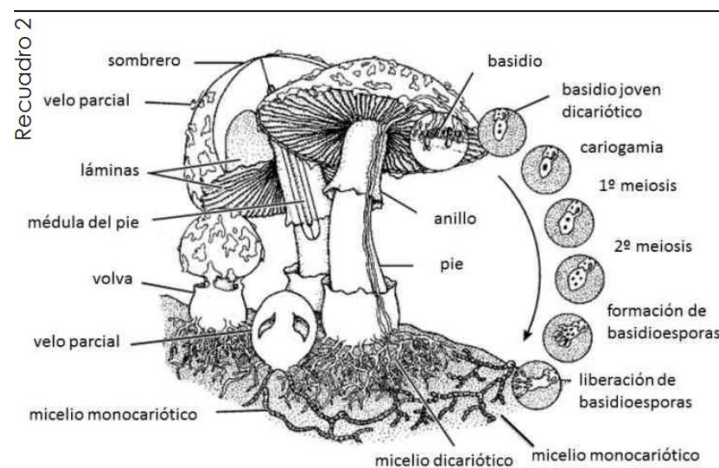


Figura 3 muestra las partes de un basidiomiceto, incluye también su ciclo de reproducción. Recuperado de (Kuhar, Castiglulia, & Papinutti, 2013)

Los basidiomicetos se reproducen sexualmente, empieza con las basidiósporas que se forman en la punta de los basidios. Cuando las basidiósporas germinan formando un micelio primario (micelios haploides uninucleados), luego ocurre una plasmogamia dando origen a un micelio secundario (micelio dicariótico) del cual se forma el cuerpo fructífero, en el himenio del cuerpo fructífero se forman los basidios que al principio son dicarióticos, después de sufrir una cariogamia presentan un solo núcleo diploide y finalmente ocurren las dos etapas de la división meiótica que da lugar a cuatro núcleos diploides (Kuhar, Castiglulia, & Papinutti, 2013).

3.2.3 Importancia bioquímica y usos medicinales.

Los basidiomicetos son conocidos por su alto valor proteico, su concentración de vitaminas y minerales, fibra dietética, bajos niveles de grasas insaturadas y sodio. Todos los metabolitos secundarios que producen y que les dan características especiales han sido en su mayoría aislados del carpóforo y en la actualidad algunos de estos compuestos se extraen para ser empleados en la producción de medicamentos comerciales. Investigaciones preliminares realizadas sobre basidiomicetos han puesto de manifiesto que la proporción de estos compuestos varía tanto con el estado del hongo como con el medio en que es cultivado (Suárez Arango & Nieto, 2013).

Las propiedades medicinales se encuentran estrechamente relacionadas con los compuestos que presentan acciones biológicas con potencial terapéutico, entre estos compuestos están los siguientes;

Polisacáridos, como la quitina, β -glucanos, celulosa y complejos polisacáridos-proteína son responsables de otorgarle al hongo propiedades antitumorales e inmunomoduladoras, antimicrobianas y antidiabéticas. Los carotenoides y los compuestos fenólicos, entre otros, les dan a los hongos propiedades antioxidantes, mientras que la eritadenina y las estatinas presentes en algunos hongos presentan actividad antihiperlipidémica, por último los triterpenoides poseen propiedades antivirales (Fernández, Haza, & Morales, 2020).

3.3 *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst

El hongo *Ganoderma lucidum* pertenece a la familia de hongos Ganodermataceae, son hongos poliporales distribuidos por todo el mundo. La especie *Ganoderma* está ampliamente distribuida y son degradadores de lignina por lo que suelen crecer como parásitos facultativos que pueden vivir como saprobios en madera en descomposición, debido a su sabor amargo y textura leñosa estos hongos no se clasifican en los hongos comestibles. El uso de este hongo en la medicina tradicional China y japonesa data de 2 mil años y es conocido como el hongo de la buena fortuna y longevidad, en distintos países le han dado distintos nombres como “Lingzhi” en China, “Reishi” o “Sachitake” en Japón y “Youngzhi” en Corea (Hapuarachchi, y otros, 2018).

3.3.1 Morfología y taxonomía

La taxonomía tradicional de *Ganoderma* está basada en las características morfológicas del cuerpo fructífero. Como resultado el concepto de género y especie no está claro y no es aceptado universalmente. La incertidumbre en la identificación taxonómica para este hongo se debe mayormente a la gran variabilidad de las características macroscópicas y microscópicas de cuerpo fructífero (Hapuarachchi, y otros, 2018).

A pesar de los distintos nombres que se le han dado y la controversia existente se puede entender la taxonomía de *Ganoderma lucidum* de la siguiente manera; Reino, Fungi; Filo, Basidiomycota; Clase, Agaricomycetes; Orden, Poliporales; Familia, Ganodermataceae; Genero, *Ganoderma*; Especie, *G. lucidum* (Nahata, 2013).

3.3.2 Características

Las especies del complejo *Ganoderma lucidum* poseen carpóforos con una cutícula laqueada amarilla a rojiza y una capa superior que es suave y usualmente está dispuesta en bandas concéntricas, con zonas de diferente color, las áreas de nuevo crecimiento son de color blanco, cuando madura el color se oscurece, la forma del sombrero es variable, circular, semicircular a arriñonada. El estípite, es blanco a amarillento, oscureciéndose a marrón rojizo cuando madura, el estipe puede o no estar presente y está unido de forma excéntrica o lateral al sombrero. Este hongo es suave, y húmedo cuando está fresco, cuando se seca es duro y leñoso (Bidegain, 2017).

Los poros que presenta son en un principio blancos y en una etapa posterior se vuelven marrón claro, las basidiósporas son amplias a estrechamente elipsoides con poro germinal y ápice truncado (Cepero de García, 2012).

3.3.2.1 Condiciones de crecimiento

El *Ganoderma lucidum*, se encuentra con mayor frecuencia en zonas subtropicales que en zonas templadas y puede crecer en distintos tipos de árboles. Los parámetros para el crecimiento son los siguientes:

La temperatura para el desarrollo del micelio está en un rango entre 27 y 30 °C, para el desarrollo del cuerpo fructífero se requiere una temperatura entre los 18 y 20 °C. El contenido de agua en el sustrato se debe mantener entre el 60 y 65 %. La humedad relativa para el micelio debe estar en un rango de 60 al 70% y para el desarrollo del cuerpo fructífero debe mantenerse entre 70 y 80%. Durante el periodo de fructificación se necesita una buena ventilación. El pH para el óptimo funcionamiento del micelio es de 5 a 5.5 y la luz durante el periodo de fructificación, 500 a 700 lux (Montoya, Sánchez, & Levin, 2013).

3.3.3 Propiedades medicinales

A continuación, se mencionan algunos efectos biológicos del *G. lucidum*, estos efectos se deben a la presencia de los compuestos bioactivos ya antes mencionados.

Efecto antitumoral: Reishi mostró efectos antineoplásicos en estudios en animales. En humanos la actividad antitumoral no está probada, sin embargo, estudios clínicos sugieren que algunos compuestos de *G. lucidum* tienen utilidad como coadyuvantes en terapias tradicionales, mejorando algunos parámetros hematológicos, reduciendo los síntomas y mejorando la calidad de vida en pacientes con cáncer. La actividad antitumoral del *G. lucidum* se debería a la acción conjunta de distintos compuestos, como los polisacáridos y su habilidad para mediar en el sistema inmune (Ayala Sánchez, Portillo López, Villareal Gómez, Rico Mora, & Soria Mercado, 2016).

Actividad antiinflamatoria: el *G. lucidum* se ha utilizado tradicionalmente como agente antiinflamatorio en el tratamiento de asma y alergia. Distintos triterpenoides presentes en Reishi han mostrado efectos antiinflamatorios.

Efecto anti diabetes: los polisacáridos que contiene este hongo tienen potencial actividad hipoglucémica y anti hiperglucémica. Estos efectos se deben a la capacidad de los polisacáridos para elevar los niveles séricos de insulina y en mejorar la utilización de glucosa.

Funciones cardiovasculares y circulatorias: estudios clínicos han mostrado actividad antihipertensiva y disminución en los niveles de colesterol y triglicéridos en la sangre.

Poder antibiótico y antiviral: algunos constituyentes de *G. lucidum* presentes en extractos acuosos son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias, además de esto algunos estudios

indican efectos inhibidores contra el VIH, y otro virus. El mecanismo de acción no está claro (Ayala Sánchez, Portillo López, Villareal Gómez, Rico Mora, & Soria Mercado, 2016).

Toxicidad: se presenta una toxicidad casi nula, aunque algunos pacientes tratados con Ganoderma han presentado algunos efectos secundarios como, sed, diarrea, erupciones, hinchazón y somnolencia. Por otro lado, Zabaleta Chávez (2017) en su trabajo de tesis hace un resumen de casos en los que debido a la ingesta de Ganoderma *lucidum* se produjeron efectos negativos como anorexia, se menciona un efecto negativo en la hemostasia debido a la ingesta del ácido ganoderico S aislado del hongo. También se menciona que el consumo del hongo en pequeñas dosis no produce efectos negativos.

3.4 La biotecnología

La definición de biotecnología es la siguiente: “*Biotecnología es el uso de organismos vivos o parte de ellos para obtener un producto o servicio útil para el hombre*”, mientras que un proceso que involucra métodos de la ingeniería química a los sistemas biotecnológicos se conoce como bioproceso (Real academia de la lengua española, s.f.).

La Ley general del equilibrio ecológico y protección al ambiente (2015), define a la biotecnología como toda aplicación de tecnología que utilice recursos biológicos, organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos.

De esta manera a lo largo de la historia se pueden encontrar distintos ejemplos del uso de biotecnología, como por ejemplo la fermentación para la elaboración de quesos o bebidas alcohólicas como el mezcal. Desde los tiempos del México prehispánico podemos encontrar el uso de la fermentación para la elaboración del chocolate a partir de los granos de cacao, y también el proceso de nixtamalización para la transformación del maíz en masa. Además de estos ejemplos también se puede mencionar la elaboración de pigmentos a partir de la grana cochinilla (Larqué Saavedra, 2016).

En si la biotecnología no es considerada una ciencia como tal sino más bien se trata de una combinación de distintas disciplinas como la bioquímica, genética, biología, agronomía, virología, ingeniería química, medicina, veterinaria, etc. La utilización de biotecnología en

la industrial puede permitir el desarrollo de nuevos productos, así como la modificación y optimización de procesos haciéndolos más eficientes, competitivos y reducir su impacto ambiental. Por lo que desde un punto de vista social y tecnológico la utilización de seres vivos para la obtención de productos tiene distintas ventajas (Rendueles & Díaz, 2014).

De acuerdo a la definición dada al principio de esta sección cuando se involucran los métodos de la ingeniería a un proceso de biotecnología se le puede considerar un bioproceso. Mientras que también podemos considerarlo como biotecnología industrial.

El uso de biotecnologías tiene un gran potencial para el desarrollo, sin embargo, para que un proceso biotecnológico pase a nivel industrial se necesitan realizar un proceso, primero a partir de la investigación a nivel laboratorio, posteriormente a una planta piloto y luego desarrollando el mismo sistema a nivel industrial (Rendueles & Díaz, 2014).

Los bioprocesos son aplicados en la obtención de diversos productos de gran interés para distintos sectores; alimentario, en la elaboración de distintos productos fermentados; ambiental y ecológico, en el desarrollo de sistemas más ecológicos y degradación de contaminantes; agronómico, en la elaboración de biocontroladores; farmacéutico, en el aprovechamiento de enzimas para la producción de medicinas (Rosales López, 2019).

En la industria las biotecnologías están presentes en distintos sectores y se utilizan en diversos procesos para la elaboración de una gran variedad productos. Podemos separar los bioprocesos en tres grupos dependiendo de que utilizan como catalizador; utilizan células para la transformación, como en la fermentación; utilizan enzimas, como en la síntesis de productos químicos o en la hidrólisis; sin catalizador, aprovechamiento de material biológico (Rendueles & Díaz, 2014).

Uno de los productos derivados de microorganismos de gran utilidad son las enzimas ya que son utilizadas para distintos fines, tanto para tratamientos médicos y diagnósticos, como aromatizantes y pesticidas, así como también biorremediación y biocombustibles e incluso en detergentes (Arroyo, Acebal, & de la Mata, 2014).

En anexos encontrara un diagrama con algunos procesos y productos que emplean biotecnologías para su elaboración.

3.4.1 Los hongos y la biotecnología

El empleo de seres vivos para la elaboración de distintos productos tiene una gran presencia en la industria (véase anexos, diagrama de industrias y productos donde se usan biotecnologías). Los hongos también tienen una gran presencia pues se utilizan para distintos fines, anteriormente se mencionó el uso de hongos para el descubrimiento y desarrollo de la penicilina, el aprovechamiento de los mismos para la industria alimentaria, así como su empleo en el sector agrícola como micorrizas y pesticidas, pero cada vez se descubren más usos que darles a estos organismos para el desarrollo de nuevos procesos, ahora revisaremos algunos ejemplos del empleo de hongos para distintos fines.

Los macromicetos se emplean principalmente para la alimentación, sin embargo, se han buscado distintas maneras de aprovecharlos, debido a que producen una gran cantidad de metabolitos secundarios, las investigaciones se han centrado en descubrir que se puede hacer con ellos en la industria, así tenemos el uso de metabolitos secundarios como el ácido oxálico y las enzimas hidrolíticas en el control de plagas, o los biosurfactantes que son compuestos que actúan como detergente, emulsionante o humectante y que son utilizados en distintas industrias, por otro lado los compuestos aromáticos como los ésteres, alcoholes, aldehídos y otros compuestos constituidos por anillos de benceno que son requeridos en la industria alimenticia pueden ser extraídos del micelio de distintos hongos (Cortés Sánchez & Mosqueda Olivares, 2013).

En el ámbito ambiental está el uso de encimas para el tratamiento de compuestos contaminantes como es el caso de las lacasas, compuestos con una capacidad oxidativa muy alta, que pueden utilizarse en el tratamiento de aguas residuales en la industria textil las cuales contienen una gran cantidad de colorantes. La implementación de un sistema de tratamiento con hongos demostró una decoloración del 70 al 95% (Manzano León, Sánchez López, Ramos Leal, Torres Ferradá, & Guerra Rivera, 2014).

Las lacasas y peroxidasas son utilizadas también en la producción de papel, sometiendo las fibras a estas enzimas para facilitar la deslignificación de manera que se pueden sustituir parte de los métodos más contaminantes, mitigando el impacto ambiental que tiene la producción de la pasta de celulosa para la producción del papel, así como los reactivos químicos utilizados en el blanqueamiento (Carbajo García, 2015).

Para la industria farmacéutica los hongos tienen un gran valor económico debido a la gran cantidad de compuestos útiles para la medicina, como son los compuestos fenólicos, carotenoides y ergosterol, ya que reducen el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares y cáncer, los polifenoles por otro lado tienen efectos antioxidantes, antiinflamatorios e intervienen en el desarrollo y progreso del cáncer (Cano Estrada & Romero Bautista, 2016).

Otro de los ejemplos más importantes es el desarrollo de antibióticos, que son un tipo de medicamento antimicrobiano que se define generalmente como cualquier medicamento que impide la aparición de microorganismos. Alexander Fleming fue el microbiólogo que en 1928 descubrió que las colonias de moho *Penicillium notatum* impedían el crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus*, a partir de este descubrimiento se pudo aislar el medicamento conocido como penicilina (Arce Torres, Gómez Díaz, Monge Artavia, & Prado Cordero, 2020).

Debido al gran interés sobre estos compuestos, la producción a gran escala es parte fundamental del desarrollo de biotecnologías en la industria.

3.5 La Fermentación

La fermentación es un proceso en el que los microorganismos producen biomasa y metabolitos a partir de la utilización de sustancias orgánicas, en ausencia o presencia de oxígeno. Dependiendo del estado del sustrato, la fermentación puede clasificarse como fermentación de estado líquido o fermentación sumergida y fermentación de estado sólida. La fermentación sumergida es la más utilizada en la industria ya que es fácil controlar las variables y el producto final se recupera con mayor facilidad, en comparación con la fermentación sólida (Suárez Arango & Nieto, 2013).

Por otro lado, la fermentación de estado sólido se utiliza principalmente para la transformación de las materias primas. En el sector alimenticio se utiliza en la producción de hongos comestibles utilizando desechos agroindustriales como sustratos, de manera que se aprovechan los residuos y se les da un tratamiento. Por ejemplo, Martínez et al. 2015, realizo

una cinética de crecimiento radial en orujos de pera, con la finalidad de evaluar la capacidad del hongo *Pleurotus ostreatus* para colonizar estos residuos de una industria de jugos.

Sin embargo, en la fermentación sólida la actividad de agua es mucho menor en comparación con la fermentación sumergida, la transferencia de oxígeno y dióxido de carbono junto a la contaminación por otros microorganismos son algunos de los problemas que aún se tienen, además es un proceso lento difícil de monitorizar, controlar y escalar, por lo que es difícil su implementación en las industrias donde se necesite recuperar biomasa o metabolitos. Para estos procesos suele emplearse la fermentación sumergida.

En la fermentación sumergida los microorganismos se desarrollan inmersos en el medio de cultivo, el crecimiento se lleva a cabo de forma típica, existe una fase de latencia, seguida de una fase de crecimiento logarítmica, luego la fase estacionaria y por último la fase de muerte. Para otras industrias como la farmacéutica resulta mucho más atractiva la fermentación sumergida, ya que resulta menos problemática, la transferencia de oxígeno es mayor y el medio es homogéneo, lo que permite que sea fácil de monitorear, repetible y reproducible (Suárez Arango & Nieto, 2013).

3.5.1 La fermentación sumergida en la industria

Durante la fermentación sumergida algunos parámetros que se deben controlar en el proceso de cultivo de microorganismos son el pH, la temperatura, la oxigenación y la composición del medio de cultivo. Como se mencionó anteriormente cuando un proceso involucra métodos de la ingeniería en un sistema biotecnológico se convierte en un bioproceso, así como el reactor se convierte en el corazón de una planta química, el equipo de fermentación sumergida también llamado biorreactor será el corazón del bioproceso.

Existen distintos tipos de biorreactor y las características que poseen dependen del tipo de proceso que utilice, así como de los productos que se pretendan recuperar. En esencia un biorreactor se diseña para funcionar como un ecosistema controlado que cumpla con los requerimientos necesarios para el desarrollo del organismo vivo (Rosales López, 2019).

Los hongos en fermentación sumergida, pueden crecer sobre la superficie del líquido formando una capa o si el biorreactor tiene agitación entre 110 y 120 rpm pueden formarse

esferas conocidas como pellets, estas formaciones favorecen la recuperación de la biomasa y el sobrenadante puede ser utilizado para la recuperación de enzimas y otros metabolitos de interés que comúnmente son excretados al medio de cultivo. Además, se puede conseguir un desarrollo de biomasa en un menor tiempo reduciéndose los periodos de incubación a tan solo 12 días para *Pleurotus ostreatus* y *Tremetes máxima* (Rodríguez Pérez, Arone, Soria Calzadillo, Aguilera Rodríguez, & Serrat Díaz, 2016).

Igualmente, Palacio Duque et al. (2020) reporto resultados similares en la producción de biomasa de *Amauroderma omphalodes*, basándose en el modelo biológico de *G. lucidum* para el cultivo de biomasa, utilizando un ph inicial de 5.5, agitación de 120 rpm, y 12 días de incubación.

El uso de lacasas de hongos en la degradación de contaminantes es una buena estrategia para la reducción del impacto ambiental, sin embargo, para esto se requiere producir un mayor volumen de estas enzimas. La aplicación de esta biotecnología es posible gracias a los cultivos de células a gran escala como lo es la fermentación en biorreactores, utilizando medios líquidos y diferentes tipos de biorreactores como el tanque con agitación para producir biomasa y metabolitos (Candia Sanchez, Álvarez Cervantes, Rubén, & Díaz Godínez, 2017).

4. Metodología

4.1 Cinética de crecimiento radial en fermentación sólida

Para la cinética de fermentación sólida, se utilizaron tres medios de cultivo agar extracto de malta (ExM), agar papa y dextrosa (PDA) y agar dextrosa Sabouraud (DS). Estos medios fueron suplementados con maderas de tres especies de árboles distintos, pino, encino y nogal. El procedimiento utilizado para preparar estos medios fue el siguiente.

4.1.1 Preparación e inoculación del medio

Los medios de cultivo fueron preparados de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se utilizaron cajas Petri de vidrio de 90x15 mm y viruta de madera de los tres árboles mencionados anteriormente. Las cajas Petri fueron esterilizadas en un horno de calor seco a 200°C por 2 hr, por otro lado, la viruta de madera fue cortada en partículas pequeñas de un tamaño promedio de 2 mm, luego se pesó en cantidades de un gramo para cada caja Petri, cada parte se colocó en papel aluminio y se esterilizó en autoclave a 15 Lb de presión y 40 min.

El medio de cultivo también fue esterilizado en autoclave a 15 Lb por 15 min, finalmente en el área estéril se adicionaron tres gotas de cloranfenicol (concentración 5mg/ml) por cada 100 ml de medio. Inmediatamente después de añadir el cloranfenicol se vertió 20ml (aproximadamente) de medio de cultivo y un gramo de madera a cada caja. Se utilizaron tres medios de cultivo y tres maderas distintas, por lo que para cada medio se trabajó con una caja suplementada con pino, una con encino, una de nogal y una caja sin suplementar (blanco), todo se hizo por duplicado.

4.1.2 Inoculación del micelio

Partiendo de una caja Petri ya colonizada con la cepa de *Ganoderma lucidum* perteneciente a la colección del Laboratorio de Control Ambiental del ITO, se prosiguió a inocular las 24 cajas ya preparadas. En el área estéril y con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio se cortaron

círculos de 5mm de diámetro de la caja Petri ya colonizada y se colocó en el centro de las cajas nuevas. Una vez terminado el proceso se guardaron las cajas en incubación a 28 °C.

4.1.3 Lectura del diámetro de crecimiento

A partir de las 72 hr de ser inoculado se estuvo midiendo el crecimiento con ayuda de un vernier, cada 24 hr se registró el diámetro del micelio en la caja Petri, para determinar la velocidad de crecimiento.

4.2 Cinética de fermentación sumergida

Para la fermentación sumergida se realizó una cinética de tipo destructiva, para esto se utilizaron los mismos medios utilizados anteriormente, pero en estado líquido, caldo de extracto de malta, caldo dextrosa Sabouraud y caldo de papa y dextrosa, suplementado con cloranfenicol para evitar el crecimiento de bacterias. Se utilizaron frascos pequeños, con un volumen de trabajo de 100 ml, por cada medio se usaron 16 frascos los cuales corresponden a 8 días de lectura normal y replica. La cantidad total de frascos usados fue de 48. Las formulaciones utilizadas para cada medio fueron las siguientes.

4.2.1 Preparación e inoculación del medio

El medio caldo ExM se preparó con 2.75g/l de dextrosa, 12.75g/l de extracto de malta, 0.78g/l de peptona de caseína y 1.8ml de glicerol.

El medio caldo DS se preparó con 40g/l de dextrosa y 5g/l de peptona de caseína.

Por último, el caldo PDB fue elaborado con 20g/l de Dextrosa y 4g/l de almidón soluble. A tres medios mencionados anteriormente se les ajustó el pH a 5.6 ± 1 .

Una vez preparados los medios se vertió 100ml de medio en cada frasco. Para cerrar los frascos se utilizó tela pellón a manera de tapa, usando tres capas de tela y asegurándola con una liga de goma en la boca de los frascos, posteriormente fueron esterilizados en autoclave a 15lb de presión por 15 min. Una vez estériles y enfriados, en campana se adicionó tres gotas de cloranfenicol en cada uno de ellos para después inocular el hongo, para esta última parte

de una caja colonizada con una espátula se cortaron trozos de 0.8 cm² (Tamaño promedio) y se depositaron dos en cada frasco. Posteriormente, los frascos fueron colocados en agitación a 90 rpm para el crecimiento del hongo y el desarrollo de pellets.

4.2.2 Toma de muestras

A partir de las 72 hr se comenzó con la toma de muestra que consistió en tomar dos frascos de cada medio seleccionados al azar, de estos frascos se tomó una alícuota de 5 ml del medio líquido y se guardó en un tubo de ensayo en congelación para su posterior análisis, luego el contenido de los frascos fue homogenizado y se tomó otra alícuota de 5ml que al igual que la anterior se guardó en congelación. Finalmente, de las muestras ya homogenizadas se tomaron 10 ml y se vertieron en charolas de aluminio que luego se colocaron en una parrilla eléctrica para evaporar el líquido y quedarnos solo con el micelio del hongo seco. Las charolas fueron llevadas a peso constante, Rodríguez Pérez et al. (2016), una vez evaporado el líquido se colocaron en el horno seco durante 40 minutos, transcurrido el tiempo se pusieron en un desecador y 15 minutos después fueron pesados en la balanza analítica, el proceso se repitió hasta peso constante.

Con las muestras guardadas en congelación se realizaron análisis de azúcares totales y de proteínas por métodos espectrofotométricos: Análisis de azúcares por el método de Dubois et al. de acuerdo a López Legarda et al. (2017) y proteínas de acuerdo al método de Bradford (1976).

4.2.2.1 Análisis de Dubois para azúcares totales

El método de Dubois consiste en tomar una muestra de 1ml en un tubo de ensayo y adicionarle 100µl de una solución al 5% de fenol, después de esperar 15 minutos se le adicionan 3 ml de ácido sulfúrico concentrado, se espera durante 15 minutos y posteriormente se realiza lectura con espectrofotómetro a 540 nm. Ya que este método funciona solo para concentraciones bajas de azúcares de las muestras que tomamos se realizaron diluciones.

Como la concentración de dextrosa es distinta para cada medio, las diluciones se realizaron dependiendo del medio y del día en que se tomó la muestra.

Medio	Días 1 y 2 de toma de muestra.	Días 3, 4 y 5 de toma de muestra.	Días 6, 7 y 8 de toma de muestra.
C. ExM	Dilución x 16	Dilución x 32	Dilución x 64
C. DS	Dilución x 32	Dilución x 64	Dilución x 128
C. PDB	Dilución x 16	Dilución x 16	Dilución x 32

Tabla 1 Diluciones realizadas para el análisis de azúcares.

4.2.2.2 Análisis Bradford para proteínas

El método Bradford consiste en tomar una muestra de 1 ml en un tubo de ensayo y adicionarle 5ml del reactivo Bradford el cual se prepara de la siguiente manera.

Se disuelven 100mg de brillante azul de Coomassie G-250 en 50 ml de etanol al 95%, añadir 100 ml de ácido fosfórico concentrado y añadir agua destilada hasta un volumen aforado de 200 ml. El colorante es estable a 4°C por lo que debe guardarse en refrigeración. Esta mezcla es un concentrado del Bradford, para usarlo en el análisis debe diluirse en una proporción de 1:5 con agua destilada.

Para el análisis de proteínas por este método se necesita tener una curva de calibración realizada con alguna proteína similar. Para este trabajo se realizó la curva de calibración en base a la proteína comercial “Bovine Serum Albumin” de la marca SIGMA. Se realizó una solución de 5 g/l, y se realizaron diluciones de 0.01 a 0.1 en concentración. De estas diluciones se tomó un mililitro en un tubo de ensayo y se le adicionaron 5ml del reactivo Bradford (Ya diluido a relación de 1:5), después de esperar 5 minutos se realizó la lectura con espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm, con los datos leídos se ajusta una curva a la ecuación de la recta para obtener una ecuación que nos servirá para determinar la cantidad de proteína en las muestras que analizaremos.

Una vez listo el reactivo y la curva de calibración se prosiguió con las muestras. De las alícuotas tomadas después de homogenizar el contenido de los frascos se tomaron 2 ml en un tubo eppendorf, luego se centrifugo durante 10 minutos y se retiró el sobrenadante y después se agregaron 2 ml de una solución buffer, entonces se homogenizo con un agitador vórtex

durante 1 minuto, y finalmente se tomó un mililitro del contenido para el análisis Bradford de acuerdo a lo descrito anteriormente para la curva de calibración. Se utilizó la ecuación encontrada con la curva para conocer la cantidad de proteína en las muestras.

La solución Buffer utilizada se compone de 8 g/l de cloruro de sodio, 0.2g/L de cloruro de potasio, 1.15g/l de fosfato de hidrogeno disódico y 0.2g/l di-hidrogenofosfato de potasio.

4.3 Producción de micelio en mayor volumen

Después de realizar la cinética de crecimiento en fermentación sumergida, se prosiguió a obtener una mayor cantidad de micelio, para esto se utilizó medio Caldo extracto de malta (la formulación fue descrita anteriormente).

En esta ocasión se utilizó un volumen de trabajo de 200 ml por cada frasco, se inoculó a partir de una caja Petri colonizada igual a lo descrito anteriormente con la diferencia de que en esta ocasión se colocó el doble del inóculo y se mantuvo en incubación a temperatura entre 28 y 30°C para el desarrollo de biomasa.

Después de 24 días de incubación el contenido se filtró con ayuda de una bomba de vacío, matraz Kitasato, y una tela filtrante. El contenido ya filtrado se colocó en charolas para muestras de aluminio, posteriormente estas charolas se colocaron en un desecador por 24 hr para después comenzar a retirar la humedad faltante con ayuda de un horno a temperatura de 60°C. Las charolas salieron de la estufa cada hora y se dejaron enfriar en un desecador para después pesarlas, este proceso se repitió hasta obtener un peso constante.

4.4 Segunda cinética destructiva de fermentación sumergida.

Se realizó un segundo experimento de cinética destructiva para evaluar el crecimiento del micelio en dos medios distintos, utilizando el medio de cultivo descrito por Palacio Duque et al. (2020) al que denominaremos medio GP (Tabla y comparándolo con el medio caldo extracto de malta preparado como se describió anteriormente).

Medio Gp (Palacio Duque et al., 2020)	g/l
Glucosa	30
Peptona	8.95
Fosfato monopotásico	1
Sulfato de magnesio	0.5
Tiamina	0.05

Tabla 2 Composición de medio de cultivo GP

Primero se realizó un preinóculo en un volumen de trabajo de 50 ml en frascos pequeños, se adicionaron los medios con dos gotas de cloranfenicol de concentración 5mg/ml y se inoculó el micelio de *G. lucidum* tal como se hizo anteriormente, posteriormente se colocaron en agitación constante a 120 rpm.

Después del periodo de latencia, unas 72 hr aproximadamente cuando el micelio empezó a crecer, los preinóculos se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, con un volumen de 200 ml de medio de cultivo, dando un total de 250 ml como volumen de trabajo final.

4.4.1 Toma de muestras

Cada 24 hr se tomó una muestra y su réplica para cada medio de cultivo durante 7 días. Estas muestras fueron filtradas con una bomba de vacío, matraz Kitasato y crisol Gooch con una capa de asbesto (crisoles más asbesto de peso constante conocido).

Posteriormente los crisoles con la biomasa filtrada fueron llevados a peso constante, calentándolos en una estufa seca, enfriando en un desecador y pesando, para finalmente obtener el peso de la biomasa seca por diferencia de pesos.

4.4.1 Análisis bromatológicos

Una vez que se obtuvo una buena cantidad de micelio se comenzó con los análisis bromatológicos del micelio producido, para la muestra obtenida de los dos medios de cultivo, esto se realizó de acuerdo a las normas AOAC.

4.4.1.1 Determinación de humedad y cenizas (AOAC 925.45 y AOAC 923.03)

En un crisol se colocó una muestra de 0.5 g para cada medio utilizado y se colocaron en la estufa por 40 min a una temperatura de 50°C, después la muestra fue trasladada a un desecador para enfriarse durante 15min y finalmente se pesó en la balanza. Este procedimiento se repitió hasta tener un peso constante. Después de retirar la humedad de la muestra, los crisoles se trasladaron a una mufla donde permanecieron a una temperatura de 550 a 600°C durante aproximadamente 5 hr, esto para la calcinación total de la muestra, al terminar el tiempo los crisoles se enfriaron en el desecador para finalmente ser pesados. El porcentaje de humedad y de cenizas se determina de acuerdo a las siguientes formulas.

$$\% \text{ de humedad} = \frac{(P - p)}{m} * 100$$

Donde: P es el peso del crisol más la muestra sin humedad; p es el peso del crisol; m es el peso de la muestra inicialmente.

$$\% \text{Cenizas} = \frac{(P - p)}{m} * 100$$

Donde: P es el peso del crisol más las cenizas; p es el peso del crisol; m es el peso de la muestra tomada.

4.4.1.2 Determinación de ácidos grasos por el método Soxhlet (AOAC 920.39)

Para esta prueba se utilizó el equipo de extracción Soxhlet que consiste de tres partes un matraz balón de fondo plano esmerilado de 250ml, un refrigerante esmerilado y el extractor, como solvente se utilizó éter de petróleo. El matraz balón se llevó a peso constante antes de llevar a cabo la extracción.

Se tomaron dos muestras una del medio ExM (A1) y una del medio GP (A2), la muestra **A1** tenía un peso de **0.4127g**, mientras que la muestra **A2** tenía un peso de **0.2525g**. Las muestras se colocaron dentro de un cartucho de papel filtro, luego se pusieron dentro del extractor, el equipo Soxhlet se montó en un soporte universal y se vertieron 200ml de éter de petróleo en el matraz balón, se utilizó una parrilla eléctrica con un baño maría como sistema de calefacción y todas las piezas del equipo se conectaron antes de comenzar a calentar la parrilla. A partir de que el éter comenzó a subir a la cámara de extracción, se comenzó a llenar hasta llegar al sifón, una vez alcanzado el nivel requerido el solvente vuelve al matraz balón logrando un reflujo. Se realizaron 20 reflujo, ya terminado el proceso el solvente se recuperó hasta que no quedaron restos en el matraz, finalmente el matraz balón se colocó en la campana de extracción para evaporar todo rastro de solvente que aun contenía para llevarlo a peso constante. El porcentaje de extracto etéreo se calculó con la siguiente formula.

$$\%E. \text{ Etereo} = \frac{(P - p)}{m} * 100$$

Donde; P es el peso del matraz balón más el extracto etéreo; p es el peso del matraz balón; m es el peso de la muestra inicialmente.

4.4.1.3 Determinación de fibra (AOAC 962.09)

Para esta determinación se necesitan muestras sin grasas y sin humedad, por lo que se utilizaron las muestras A1 y A2 que se emplearon en la determinación de ácidos grasos, se colocó cada muestra en un matraz balón, luego se le agregaron 200ml de una solución de ácido sulfúrico al 1.25%, esto se pusieron en destilación a reflujo total durante media hora de ebullición. Transcurrido el tiempo se filtró el contenido y se lavó con agua destilada hasta conseguir que el pH del líquido de lavado fuera neutro, entonces se trasladó la muestra de regreso al matraz y se repitió el procedimiento, usando hidróxido de sodio al 1.25% en lugar del ácido, una vez finalizado el tiempo de ebullición, se volvió a filtrar y se repitieron los lavados hasta pH neutro. Finalmente, la muestra se puso en un crisol, se pesó y calcino en la mufla a una temperatura de entre 550 y 600°C durante 3 hr, una vez que se enfriaron los crisoles se pesaron de nuevo. EL cálculo del porcentaje de fibra se calculó con la siguiente formula.

$$\% \text{ fibra} = \frac{(P - p)}{m} * 100$$

Donde; P es el peso del crisol más la ceniza; p es el peso del crisol; m es el peso de la muestra inicialmente.

4.4.1.4 Determinación de proteínas (AOAC 988.05)

Se tomaron muestras de 0.5 gr y se colocaron en un matraz digestor junto con 1.5 gr de mezcla digestora (Sulfato de cobre y sulfato de sodio anhidro en proporción 1:5), luego se le añadieron 5ml de ácido sulfúrico concentrado y se colocaron en el digestor, subiendo la temperatura lentamente. Trascurrido un tiempo y subiendo gradualmente la temperatura las muestras pasó de un color oscuro a un color claro y translucido. Luego se dejó enfriar lentamente y se vació el contenido en el micro destilador Kjeldahl, cuando se enfrían los matraces el contenido se solidifica por lo que antes de poder verterlo en el destilador se le agregó 5 ml de agua destilada caliente, justo después de verter esta mezcla se le añadió hidróxido de sodio en solución 1:1 con agua destilada, la cantidad que se añade es variable por lo que el hidróxido se vertió lentamente hasta que el contenido dentro del destilador se tornó café oscuro.

El destilado se recogió en un vaso de precipitados que contenía en un principio 6 ml de ácido bórico al 4 % y 10 gotas de indicador shiro-tashiro, el vaso se llenó hasta obtener 80ml del destilado. Una vez que llego al volumen necesario se pasó a un matraz de 250 ml y se tituló con una solución de HCl 0.05N. Se lleno la bureta con el ácido y se dejó gotear lentamente hasta el vire de color verde a morado. La cantidad de nitrógeno se calculó con la siguiente formula.

$$\%N = \frac{V * N * 0.014}{m} * 100$$

Donde; V es el volumen de la solución titulante; N es la normalidad de la solución; m es el peso de la muestra

El porcentaje de proteína en la muestra se calcula de acuerdo con lo siguiente.

$$\%P = (\% \text{ de } N)(\text{Factor de conversión})$$

El Factor de conversión depende del tipo de muestra que se esté analizando. Para este caso se utilizó un factor de conversión de 4.38.

4.5 Producción de micelio y recuperación de metabolitos

4.5.1 Producción de biomasa por fermentación sumergida

La biomasa del hongo se obtuvo al colocar el micelio de *G. lucidum* en fermentación sumergida utilizando un medio de cultivo elaborado a base de glucosa y peptona (GP), preparado de acuerdo a Torrez, 2011, la composición se presenta en la tabla 1.

En esta ocasión se utilizó una cepa silvestre que fue aislada de un carpóforo recolectado en un bosque de encinos y paso a formar parte de la colección de cepas de laboratorio de control ambiental de la institución, a esta cepa la llamaremos ITOGL2.

Se utilizó medio de cultivo Agar PDA para inocular el micelio de la cepa (ITOG2), se incubó a 30 °C por 10 días, una vez que el micelio colonizó toda superficie, se utilizó para inocular el medio líquido GP suplementado con cloranfenicol. Se utilizaron frascos de vidrio de 2 lt utilizándose un volumen de trabajo de 500 ml, un total de 6 frascos fueron inoculados con la cuarta parte de una caja Petri colonizada por el micelio. Los frascos se colocaron en agitación constante a 120 rpm por 10 días. Pasado este tiempo la biomasa se filtró con ayuda de un matraz Kitasato, un embudo büchner y una bomba de vacío y un filtro de tela. Finalmente, la biomasa fue colocada en crisoles y secada en estufa de calor seco a 60°C.

4.5.2 Elaboración de extractos

La biomasa seca fue triturada en un mortero, para reducir el tamaño de partícula y favorecer con ello el proceso de extracción. La biomasa total obtenida se dividió en tres partes de 12 gr y cada una se colocó en un frasco con 100 ml de etanol al 96%, se utilizó esta cantidad de solvente para facilitar el movimiento ya que se consideró que el volumen de la biomasa podría representar un problema debido a que limitaba el movimiento del solvente por agitación, los frascos se colocaron en agitación constante a 120 rpm por 20 días. Pasado este

tiempo eliminamos la fase solida de la fase líquida, utilizando un embudo y papel filtro. Los extractos se guardaron en refrigeración en frascos ámbar hasta el momento de concentrarlos.

4.5.2.1 Concentración de extractos

Los extractos fueron sometidos a un proceso de destilación para recuperar el solvente, se utilizó un equipo de destilación, constituido por un matraz para destilar y un refrigerante, se mantuvo una temperatura entre 74 y 78°C hasta concentrar la solución a volumen mínimo.

Se realizo este proceso para una parte del extracto mientras que otra cantidad igual fue sometida a un proceso de evaporación distinto. Mediante una pequeña bomba de aire se hizo pasar un flujo de aire continuo a través de una manguera y un filtro de papel hasta el fondo del matraz para volatilizar el solvente rápidamente.

4.5.3 Pruebas del efecto antimicrobiano

Preparación de inóculos microbianos

Para las pruebas se aisló *Staphylococcus aureus* de acuerdo a la norma Nom-210-SSA1-2014, mientras que el cultivo de *Escherichia Coli* se tomó de la colección de microorganismos del Laboratorio de Control Ambiental.

Se utilizo infusión cerebro corazón al doble de concentración para elaborar una suspensión de microorganismos. Con los cultivos en medio liquido se realizó una suspensión de microorganismos de concentración 1×10^6 UFC/ml y 1×10^5 UFC/ml.

Las unidades de estudio fueron cajas Petri con medio Müller-Hinton, en las que se inocularon los microorganismos por plaqueo y se colocaron en incubación a 36 °C por 24 hr.

Los extractos obtenidos se probaron en concentraciones de 100%, 75%, 50% y 25%. Para obtener estas concentraciones se realizaron diluciones del concentrado con etanol al 96%.

Con los extractos en estas concentraciones se impregnaron discos de papel de 9 mm de diámetro esterilizados previamente. Dentro de la zona estéril (Campana de flujo laminar) se colocaron los discos de papel en un vidrio de reloj estéril para después impregnarle 40µl de

las diluciones, debido a que se utilizó etanol para las diluciones se dejó los discos de papel bajo el flujo de aire hasta que el solvente se volatilizo.

En cada unidad de estudio se colocaron un disco de cada concentración y uno más de antibiótico, para *Staphylococcus* se utilizó Ciprofloxacino (125mg/ml) y para *E. Coli* se usó Amikacina (250 mg/ml), por lo que cada una tenía 5 discos de papel. La prueba fue realizada por duplicado para cada una de las concentraciones de UFC y cada bacteria.

Después de la incubación de 24 hr, una vez que se formó el césped microbiano en el área estéril se colocaron los discos de papel impregnados con las soluciones de extractos y antibiótico. Posteriormente las cajas Petri se guardaron nuevamente en incubación y se realizó observación cada 24 hr para buscar la presencia del halo de inhibición y medir su diámetro en caso de estar presente.

También se realizó una prueba de control negativa utilizando etanol para impregnar los discos de papel y luego evaporarlo bajo el flujo de aire de la campana laminar. Posteriormente se colocaron dos discos de papel en las cajas colonizadas como se hizo con los extractos.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico t de Student para comparar los resultados obtenidos con ambas muestras, posteriormente se hizo lo mismo para comparar los resultados obtenidos con los del antibiótico utilizado como control positivo.

5. Resultados y discusión

5.1 Cinética de fermentación sólida

Las mediadas del diámetro de crecimiento se pueden ver en la siguiente tabla, los datos están expresados en cm.

Tabla de resultados, crecimiento radial en cm.

		ADS		PDA		AEM	
	Tiempo/hr	1	2	1	2	1	2
Puro	72	1.8	1.8	2.45	2.7	2.4	2.6
	96	2.3	2.35	3.5	3.6	3.5	3.45
	120	2.5	2.5	4	4.3	4	4.2
	168	3.1	3.1	5.2	6.3	6.1	6.3
Pino	72	1.35	1.5	2.2	2.75	2.3	2.2
	96	2.25	2.2	2.95	3.35	3.3	3.5
	120	2.4	2.6	3.7	4.3	3.9	3.9
	168	3.1	3.7	4.9	7.5	4.1	4.9
Encino	72	2.6	2.5	3.85	3.6	4	3.8
	96	3.55	3.35	4.7	4.8	5.2	4.9
	120	4.2	3.7	6.3	6.1	6.4	6
	168	6.6	4.5	8.8	8.8	8.8	8.3
Nogal	72	2.4	2.45	2.8	2.85	2.6	3.2
	96	3.3	3.1	4.1	3.95	4.25	4.6
	120	4.3	3.4	5.4	5.1	4.4	5.4
	168	7.4	4.1	8.5	7.6	5.4	7.1

Tabla 3 Resultados del crecimiento radial de micelio en cm

Con estos datos se realizó un ajuste al modelo logístico y con ello se obtuvieron parámetros (A, B, C y D) que se usaron en las siguientes ecuaciones para calcular la velocidad máxima

de crecimiento, el tiempo de latencia y el tiempo para alcanzar la velocidad máxima de crecimiento.

Velocidad máxima de crecimiento micelial

$$v_{max} = \frac{a * b}{4b}$$

Tiempo en alcanzar la velocidad máxima

$$t_{max} = \frac{\ln\left(\frac{c}{b}\right)}{d}$$

Tiempo de latencia

$$t_{lat} = \frac{\ln\left(\frac{c}{b}\right) - 2}{4b}$$

Los datos calculados se muestran en las tablas (figura 3, 4 y 5) expresados en cm/hr.

Medio PDA			
	Vmax cm/hr	Tmax hr	Tlat hr
Normal			
Puro	0.25175	117.9116033	9.627899968
Pino	0.189275	103.466248	-1.19099952
Encino	0.14355	106.5217401	14.8627117
Nogal	0.302	136.9279162	36.07062927
	Vmax	Tmax	Tlat
Replica			
Puro	0.27825	86.49349799	-4.25060365
Pino	0.16515	237.8371938	92.80456148
Encino	0.160375	109.8571108	17.56361746
Nogal	0.26225	124.3345691	23.52811747

Tabla 4 Velocidad de crecimiento en medio PDA

Medio ExM			
	Vmax cm/hr	Tmax hr	Tlat hr
Normal			
Puro	0.2064	129.5175428	15.68715004
Pino	0.16395	61.95218243	-9.88689803
Encino	0.09685	95.65036565	10.0339273
Nogal	0.1543	71.38154369	-0.07254705
	Vmax	Tmax	Tlat
Replica			
Puro	0.1709	130.2012259	15.91551165
Pino	0.190725	81.91872275	-2.36277746
Encino	0.25525	96.92690316	8.626682413
Nogal	0.232225	87.5618213	6.884128679

Tabla 5 Velocidad de crecimiento medio ExM

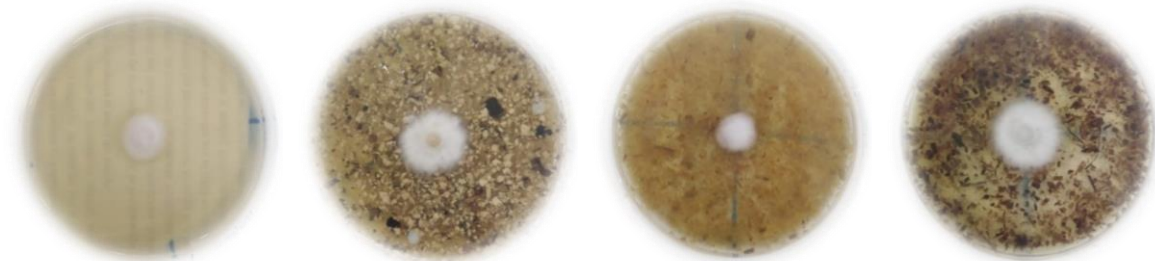
Medio ADS			
	Vmax cm/hr	Tmax hr	Tlat hr
Normal	0.18165	71.11855614	-41.2409944
Puro	0.221	103.4472088	-25.3357918
Encino	0.14615	144.0950402	24.33456118
Nogal	0.198875	205.6175227	74.55592377
	Vmax	Tmax	Tlat
Replica	0.2156	68.36285875	-40.9267587
Puro	0.34975	164.9782216	13.11793308
Pino	0.265	68.33048881	-15.1419653
Encino	0.2073	62.60797796	-22.0660271

Tabla 6 Velocidad de crecimiento, medio ADS

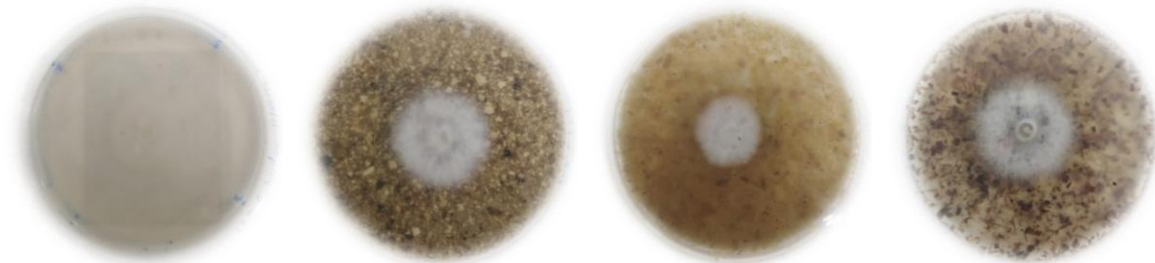
Las gráficas ajustadas al modelo logístico se encuentran en los anexos

A continuación, se muestran algunas fotografías del desarrollo del micelio en medio sólido.

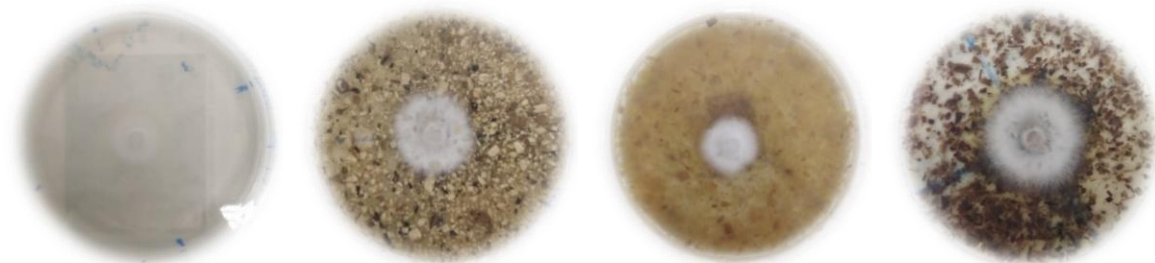
Crecimiento a las 72 hr



Medio ADS



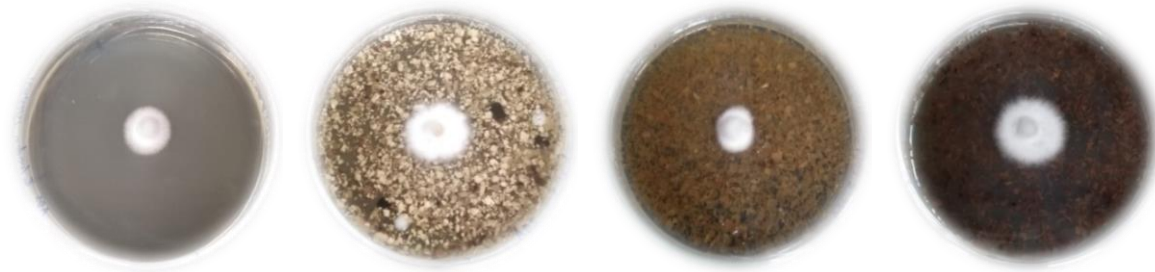
Medio EXT



Medio PDA

Figura 4 Crecimiento radial a las 72hr

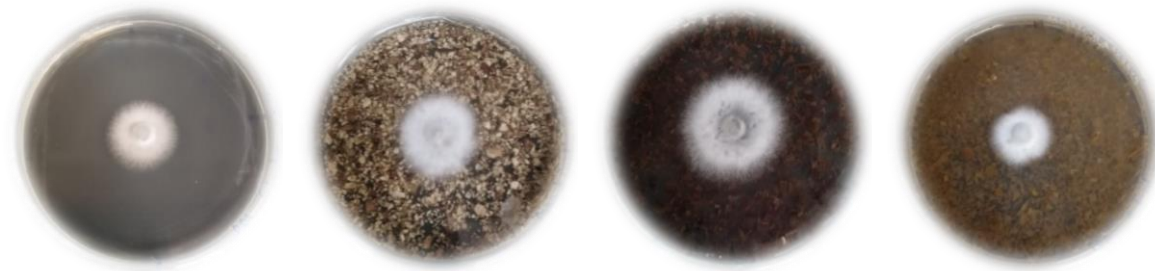
Crecimiento a las 96hr



Medio ADS



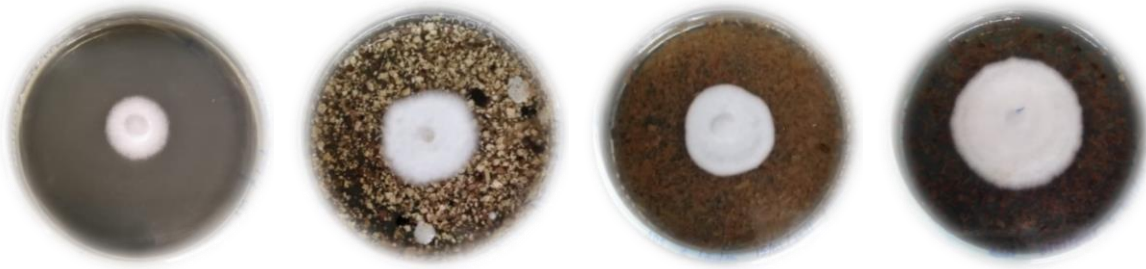
Medio EXT



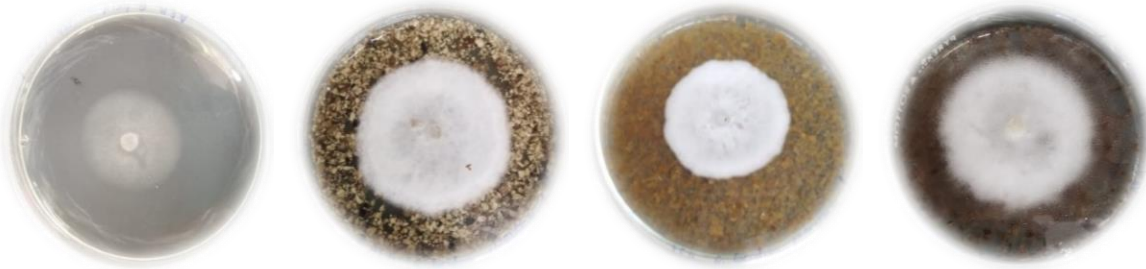
Medio PDA

Figura 5 Crecimiento radial a las 96 hr

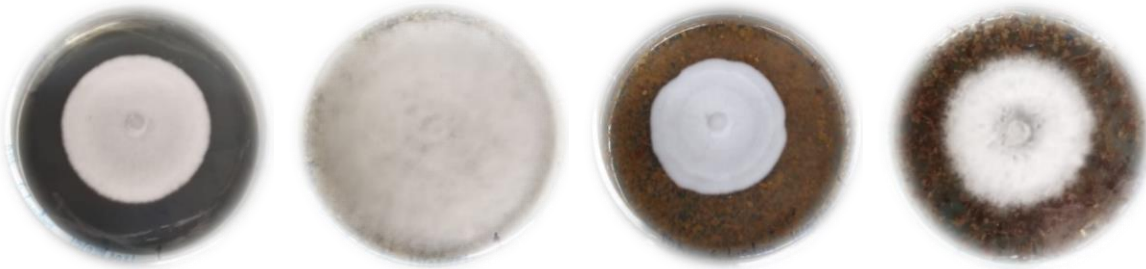
Crecimiento a las 168hr



Medio ADS



Medio EXT



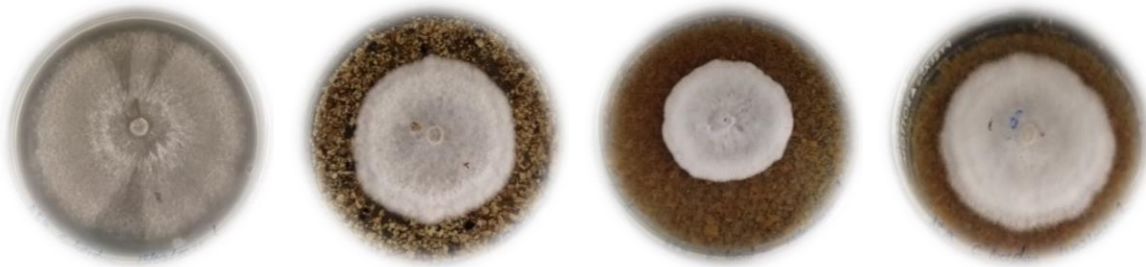
Medio PDA

Figura 6 Crecimiento radial a las 168 hr

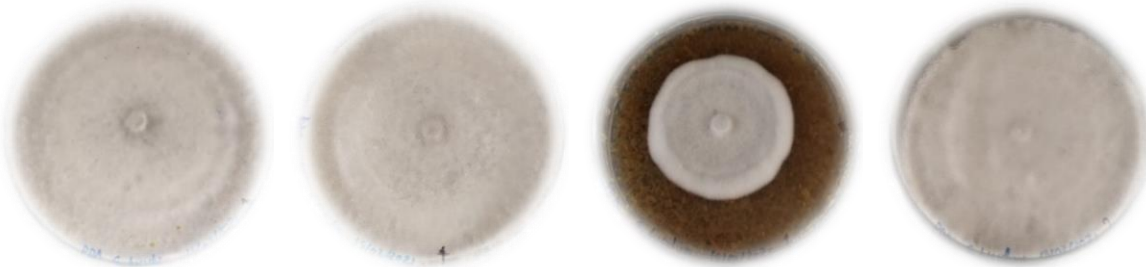
Crecimiento a las 216 hr



Medio ADS



Medio EXT



Medio PDA

Figura 7 Crecimiento radial a las 216 hr

5.2 Resultados de cinética de fermentación sumergida

5.2.1 Resultados de proteína.

La tabla muestra los promedios de los datos obtenidos entre la muestra y su réplica, expresado en g/l

Promedios	g/l		
	EXM	PDB	DS
72	0.00965775	0.04075245	0.05897645
96	0.0100564	0.04200535	0.05874865
120	0.01034115	0.04211925	0.05681235
144	0.0174599	0.04303045	0.06091275
168	0.01945315	0.0430874	0.05954595
192	0.0447959	0.04337215	0.05795135
216	0.050377	0.04394165	0.05795135
240	0.05590115	0.0474156	0.05795135

Tabla 7 Proteína encontrada en las muestras de los tres medios de cultivo utilizado en g/l

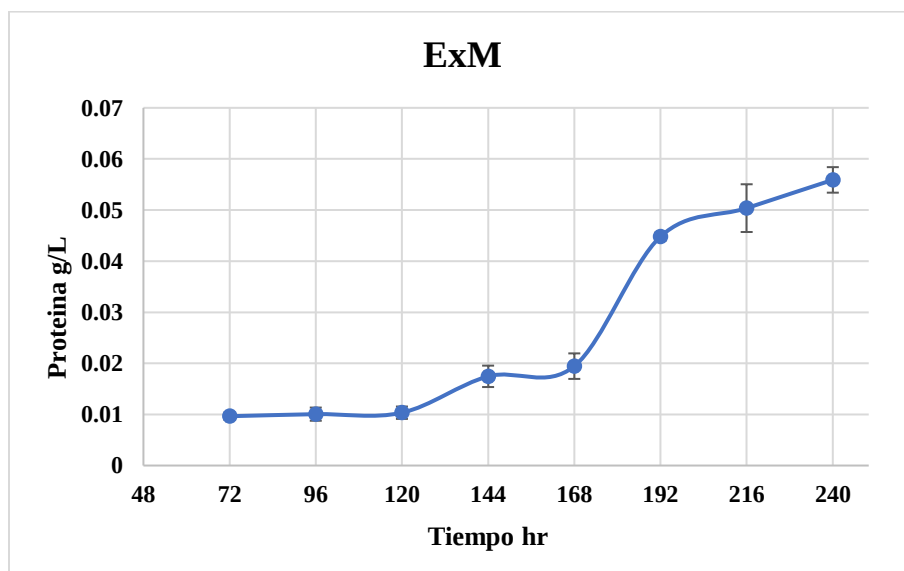


Figura 8 Proteína en medio líquido ExM

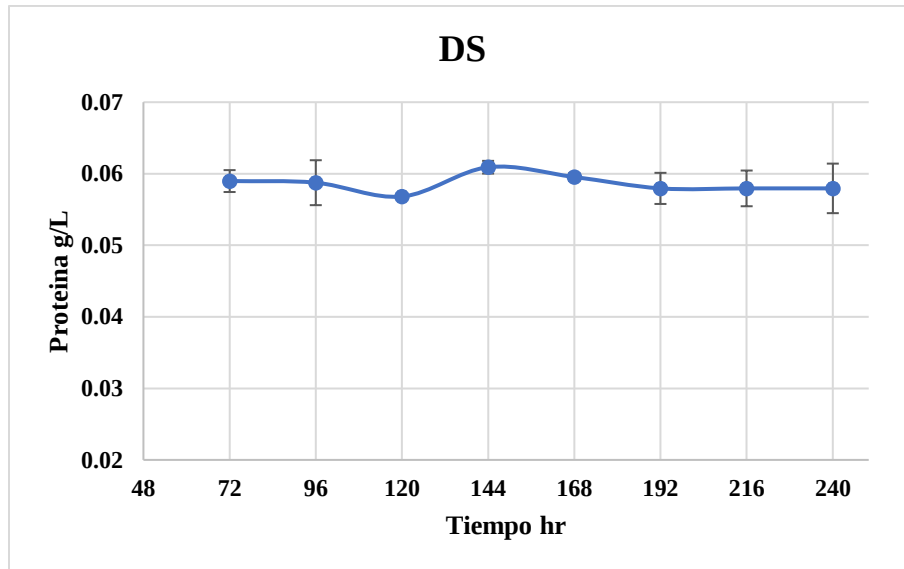


Figura 9 Proteína en medio liquido DS

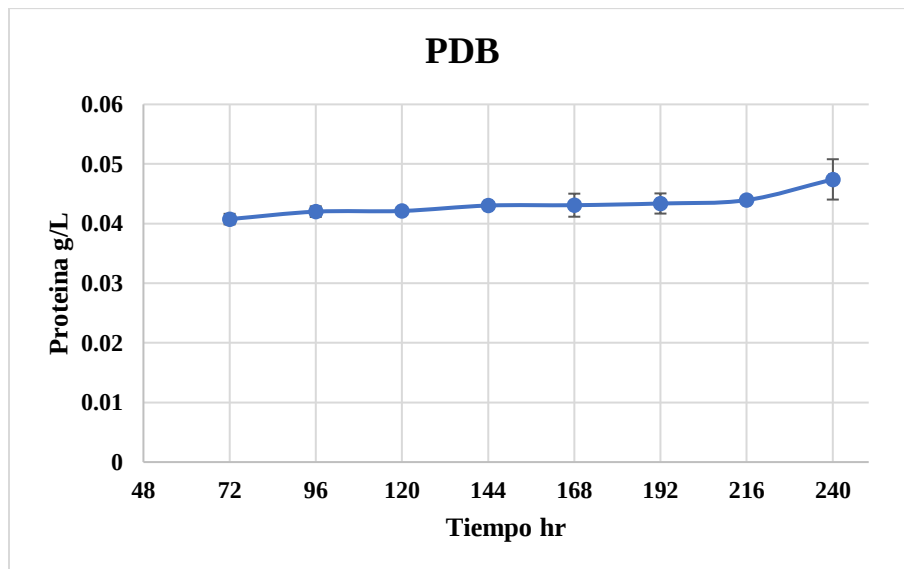


Figura 10 Proteína en medio líquido PDB

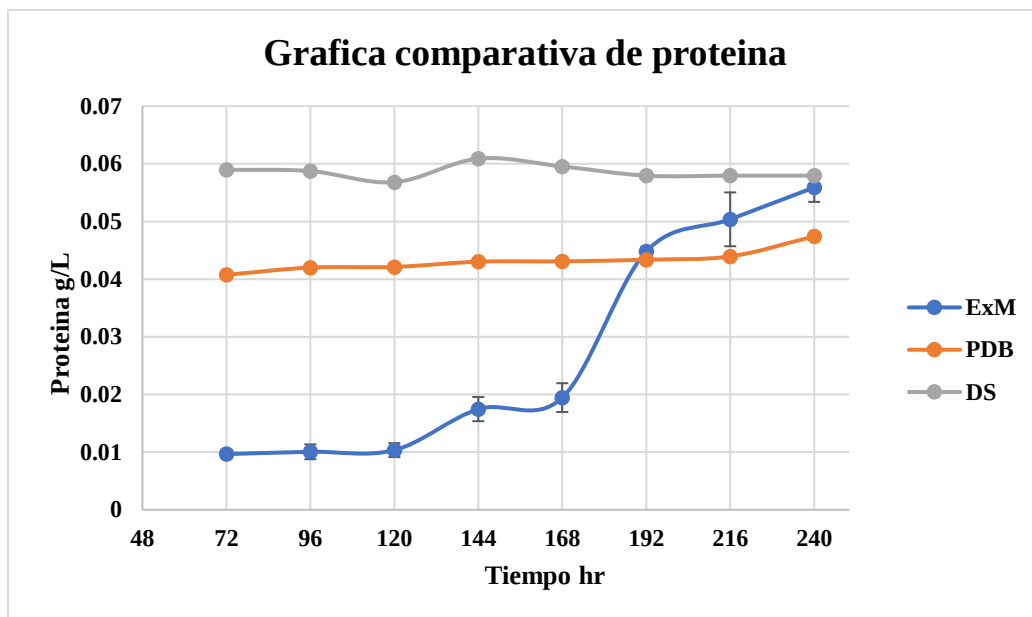


Figura 11 Comparación de los resultados obtenidos para la proteína en los tres medios de cultivo

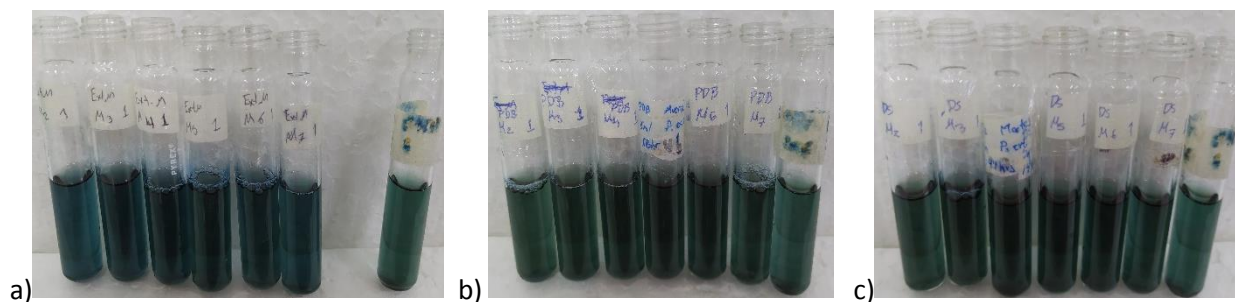


Figura 12 Fotografías tomadas del análisis de proteínas, a), b) y c) son las muestras utilizadas en análisis Bradford de los medios ExM, PDB y DS respectivamente.

5.2.2 Resultados del análisis de azúcares

La siguiente tabla muestra un promedio de los resultados obtenidos entre la muestra normal y su réplica, expresado en g/l.

Promedio			
	ExM	PDB	DS
72	7.5620264	6.105252	50.1649288
96	8.4453896	8.9103176	57.7587528
120	11.5759048	7.2830696	65.5695432
144	4.6562264	3.8348536	33.536004
168	5.3768648	4.1990472	28.034356
192	4.4470088	3.56752	27.0425096
216	2.4129488	3.6566312	14.7684104
240	1.9635184	3.8619744	16.178692

Tabla 8 Resultados del análisis de azúcares

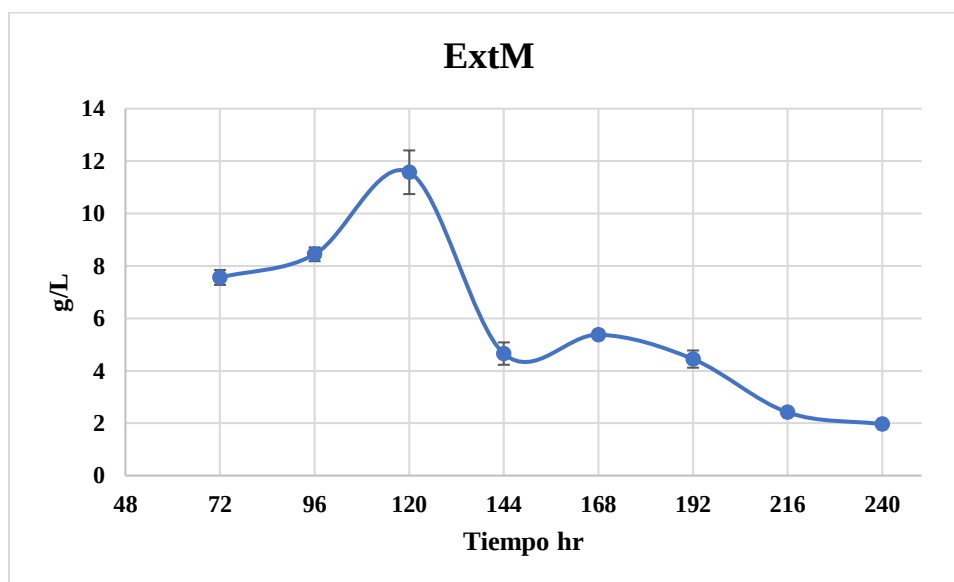


Figura 13 Consumo de azúcares en el medio ExM

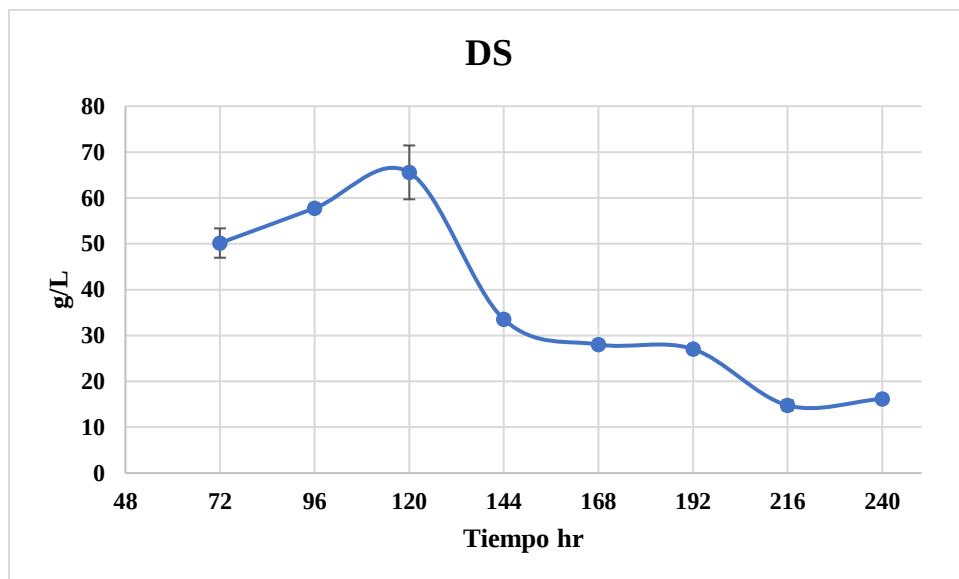


Figura 14 Consumo de azúcares en el medio DS

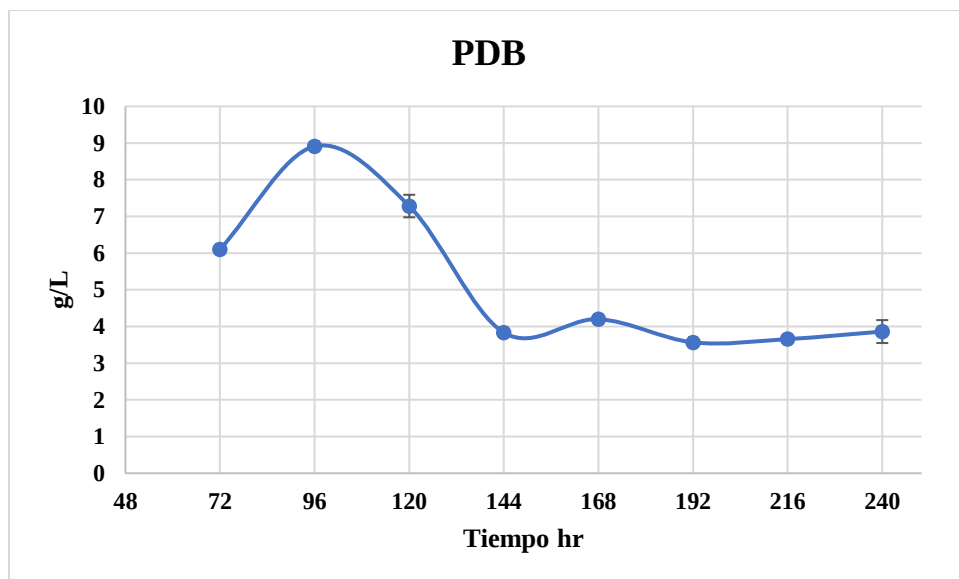


Figura 15 Consumo de azúcares en el medio PDB

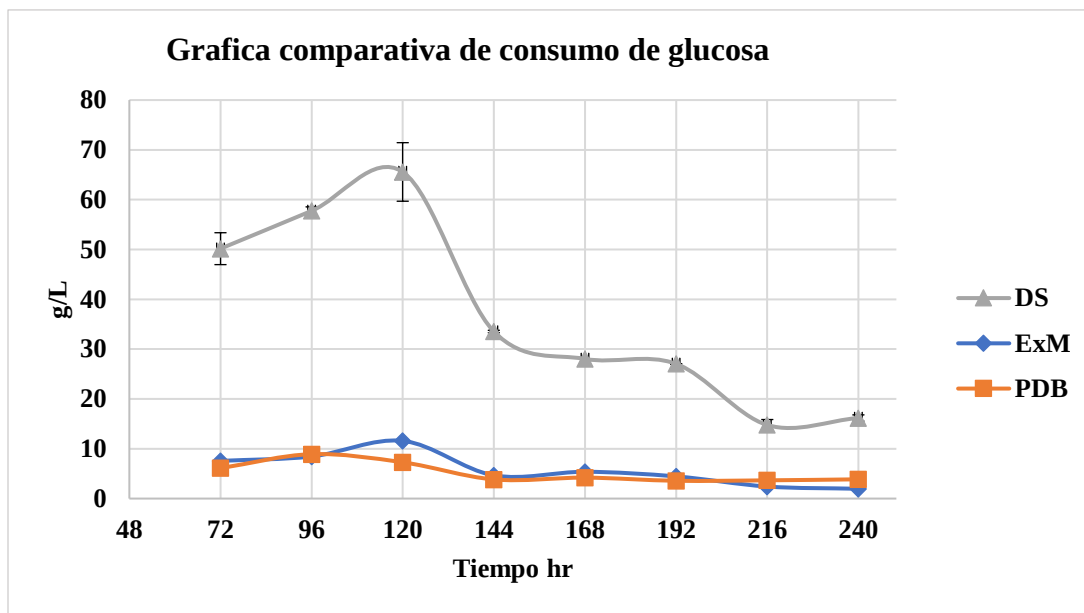


Figura 16 Comparación del consumo de azúcares en los tres medios de cultivo



Figura 17 análisis de azúcares método de Dubois

5.2.2 Resultados de biomasa

La siguiente tabla muestra un promedio de los resultados obtenidos entre la muestra normal y su réplica, expresado en g/l.

Promedios			
	ExM	PDB	DS
72	0.1295	0.1585	0.413
96	0.1548	0.1985	0.4105
120	0.163	0.208	0.444
144	0.168	0.1855	0.4605
168	0.1655	0.222	0.425
192	0.1505	0.201	0.396
216	0.1605	0.2015	0.413
240	0.186	0.197	0.439

Tabla 9 Resultados de biomas

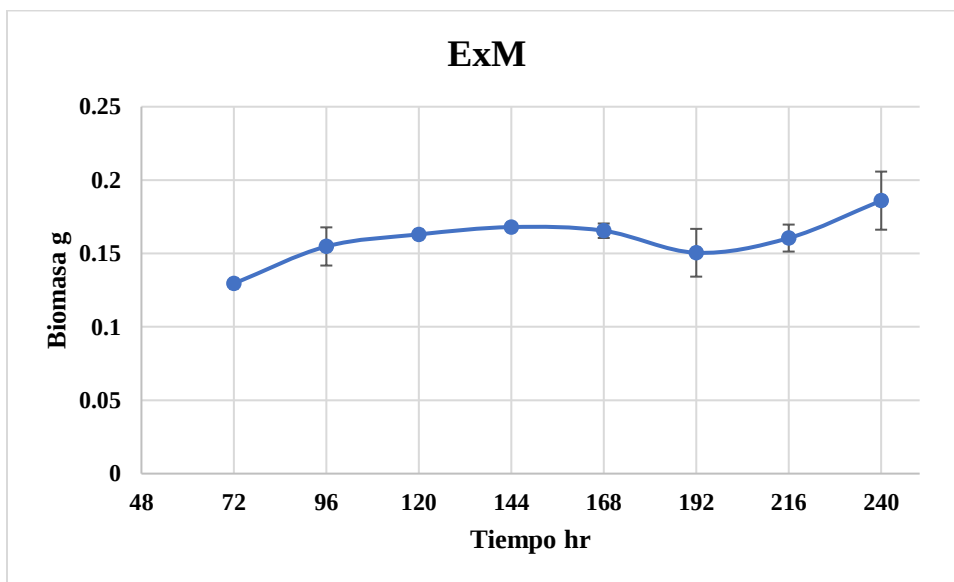


Figura 18 Crecimiento de biomasa en medio ExM

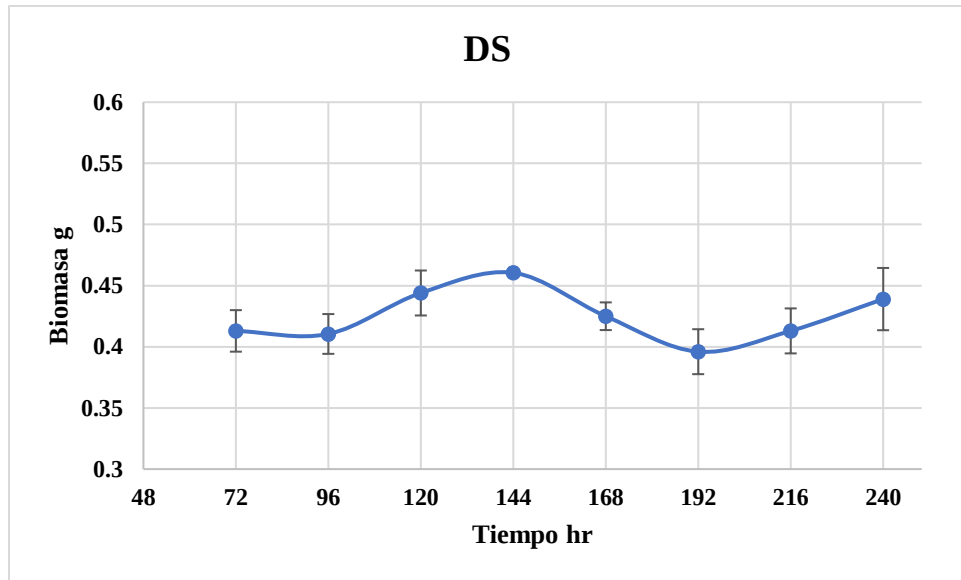


Figura 19 Crecimiento de biomasa en medio DS

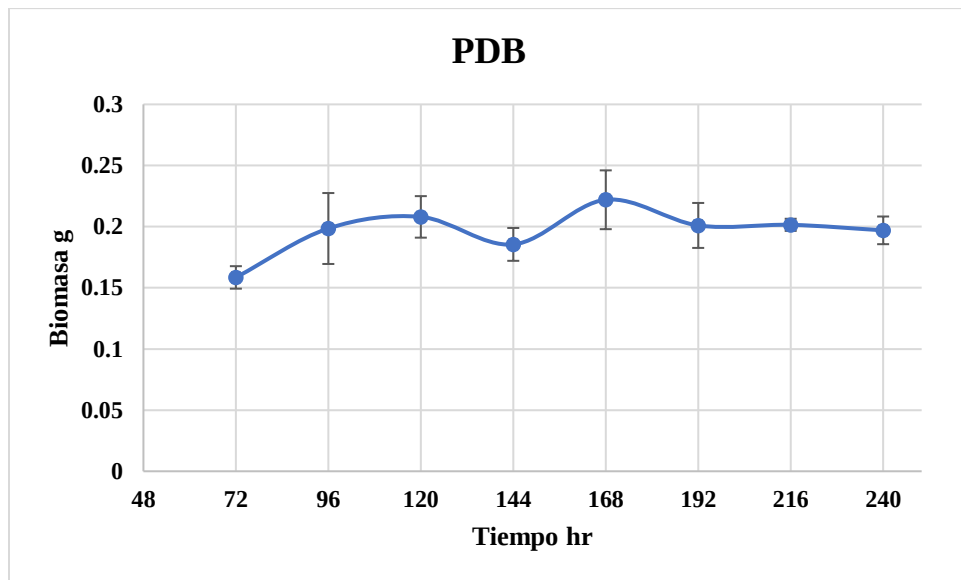


Figura 20 Crecimiento de biomasa en medio PDB

De estos resultados también se calcularon los gramos de biomasa producidos por gramo de sustrato.

$$Biomasa = \frac{\Delta x}{\Delta s} = \frac{gr \text{ de biomasa final} - gr \text{ de biomasa inicial}}{gr \text{ de azúcares iniciales} - gr \text{ de azúcares finales}}$$

$$Proteína = \frac{\Delta P}{\Delta s} = \frac{gr\ de\ proteína\ final - gr\ de\ proteína\ inicial}{gr\ de\ azúcares\ iniciales - gr\ de\ azúcares\ finales}$$

Los resultados fueron los siguientes.

	EXTM	PDB	DS
Biomasa	1.00919745	1.62708351	0.07797274
Proteína	0.00761909	0.00507739	-0.00019103

Tabla 10 Gramos de biomasa y proteína producida por gramo de sustrato consumido

5.3 Producción de biomasa a mayor volumen

Después de filtrar el contenido de los frascos, se pesó la biomasa en charolas y se colocaron en el desecador, después de 24 hr se tomó el peso de la muestra nuevamente y se obtuvieron los siguientes datos sobre la pérdida de humedad y el peso seco de la biomasa obtenida.

Frasco	Peso húmedo g	Peso seco g	Perdida g	%humedad
1	0.769	0.199	0.57	74.1222367
2	0.201	0.061	0.14	69.6517413
3	0.27	0.059	0.211	78.1481481
4	0.233	0.051	0.182	78.111588
5	0.458	0.065	0.393	85.8078603
total		0.435	Promedio=	77.1683149

Tabla 11 Biomasa generada por los frascos a volumen de 200 ml

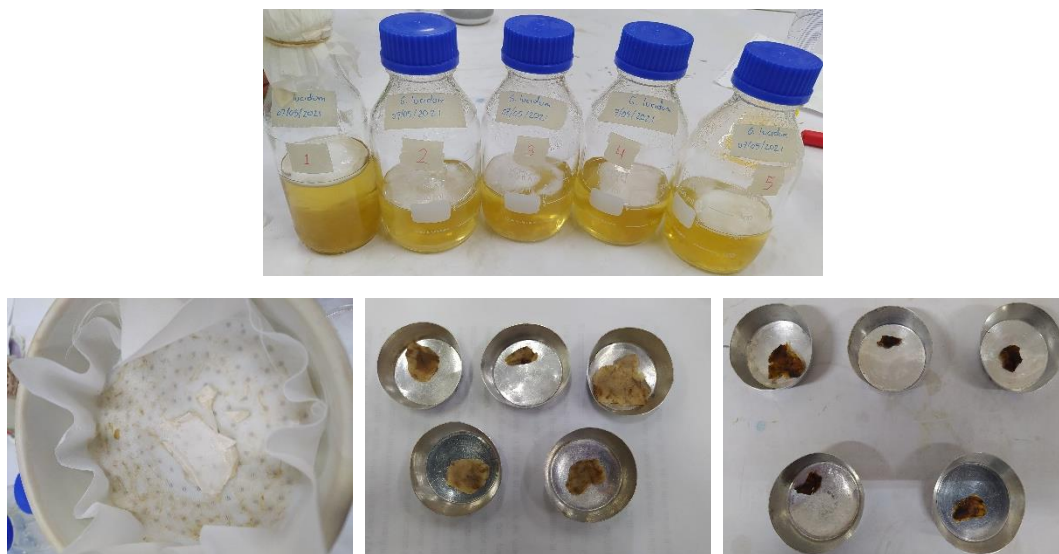


Figura 21 Biomasa filtrada

5.4 Segundo experimento de crecimiento de biomasa

En esta ocasión se utilizaron dos medios de cultivo líquido, ExM y GP. Después de filtrar los resultados fueron los siguientes.

T, hr	Peso en g	
	ExM	GP
96	0.0496	0.0108
120	0.0472	0.0263
144	0.0412	0.0184
168	0.0421	0.0262
192	0.0576	0.0241
216	0.066	0.0301
240	0.0938	0.1011

Tabla 12 Crecimiento de biomasa, segunda cinética de crecimiento

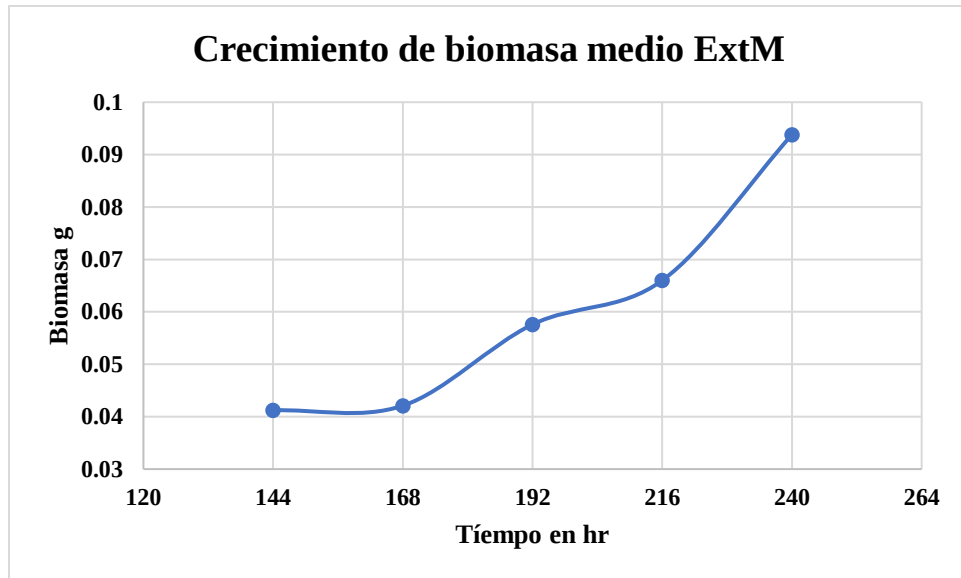


Figura 22 Aumento de biomasa en el medio liquido ExM

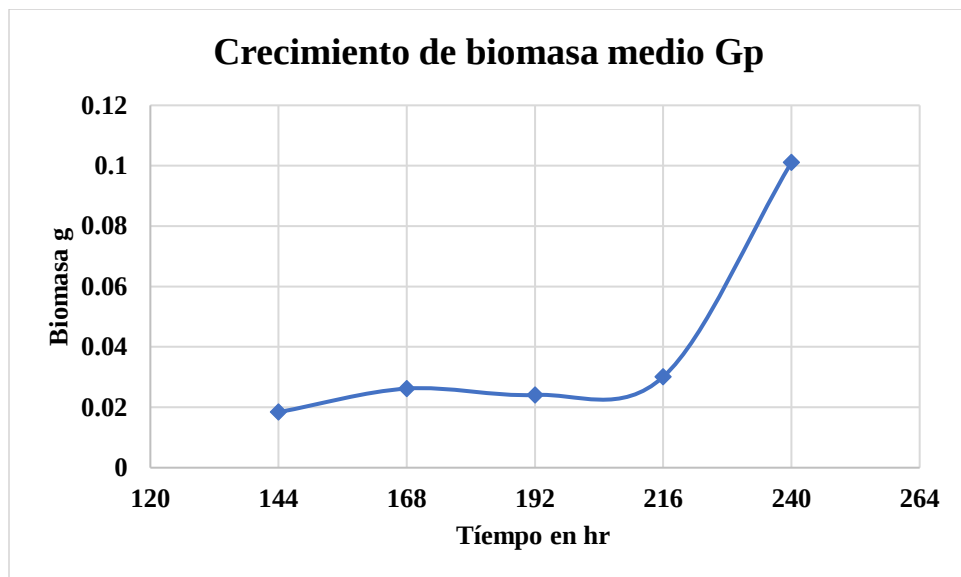
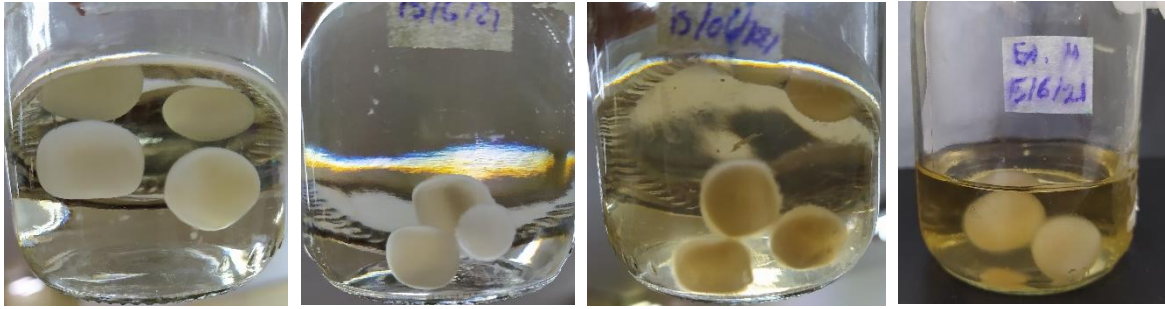
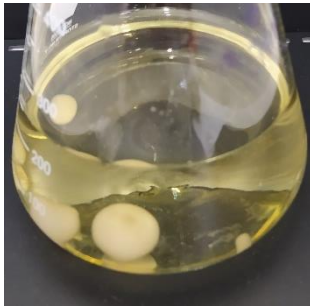


Figura 23 Aumento de biomasa en el medio GP



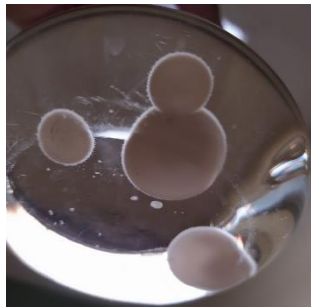
a)

b)



c)

d)



e)

Figura 24 Crecimiento de biomasa, a) Preinóculos medio GP, b) Preinóculos medio ExM, c) Crecimiento de Pellets en ExM, d) Crecimiento de Pellets en medio GP, e) Biomasa filtrada

5.5 Análisis bromatológicos

De los análisis bromatológicos se obtuvieron los siguientes resultados.

Porcentaje de humedad:

Para la muestra del ExM, %humedad=93.0742

La composición en peso seco de la muestra es la siguiente

Muestra, medio ExM	
Humedad %	93.0742
Composición % base seca	
grasa	1.18
fibra	0.098
ceniza	11.67
proteína	2.7292
Carbohidratos	84.3227
Total	100

Tabla 13 Resultados de análisis bromatológicos para la muestra del medio ExM

Mientras que para la muestra obtenida en el medio GP se obtuvo lo siguiente.

Muestra GP %humedad= 91.3511

La composición en peso seco de la muestra es la siguiente

Muestra, medio GP	
Humedad %	91.3511
Composición % a base seca	
grasa	1.5
fibra	0.57
ceniza	4.86
proteína	1.9446
Carbohidratos	91.1253
Total	100

Tabla 14 Resultados de los análisis bromatológicos de la muestra del medio GP



a)



B)



c)

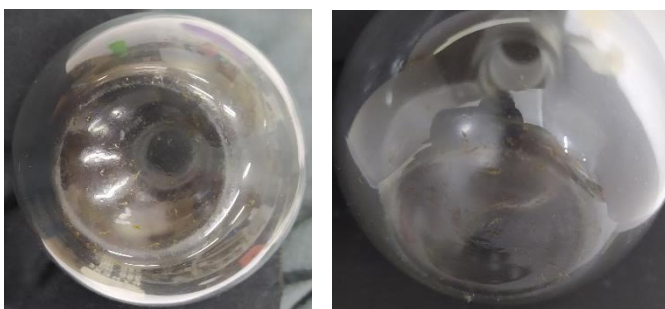


d)

Figura 25 Pruebas de humedad y cenizas a) horno seco, b) desecador, c) bimesa seca y d) cenizas



a)

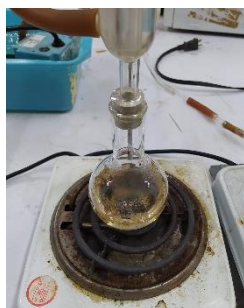


b)

Figura 26 Extracción Soxhlet, a) extracto de la muestra A1, b) extracto de la muestra A2



a)



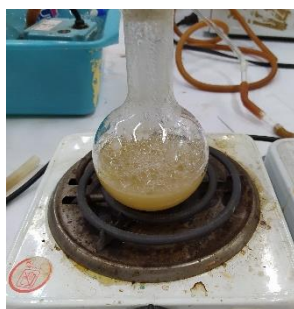
b)



c)



e)



f)

Figura 27 análisis de fibra, a) destilación con ácido sulfúrico, b) filtrado, c) pH neutro, e) destilación con hidróxido de sodio y f) cenizas finales

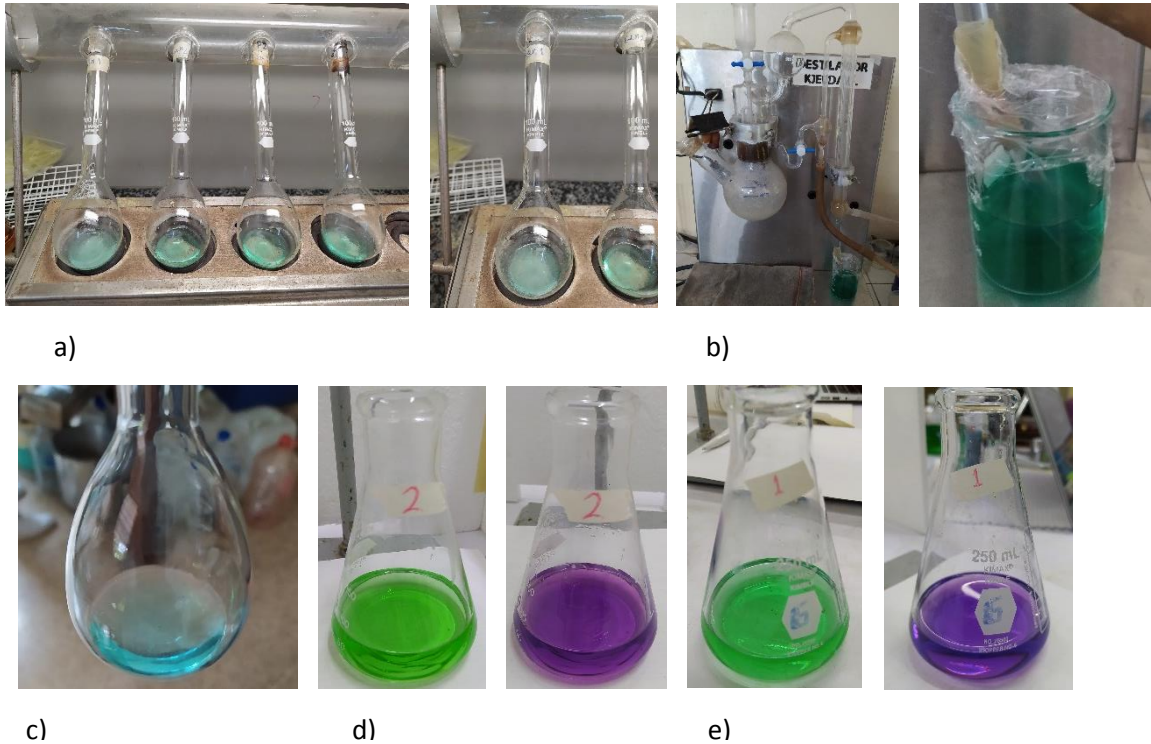


Figura 28 análisis de proteínas, a) Muestras en el digestor, b) destilador Kjendalt, c) Una de las muestras cristalizada, d) muestra A1 antes y después de la titulación, e) muestra A2 antes y después de la titulación

5.6 Pruebas antimicrobianas de los extractos

Los extractos obtenidos se concentraron en dos muestras distintas (M1 y M2) con las que se realizaron las pruebas del efecto antimicrobiano.

Las siguientes tablas muestran los diámetros de los halos donde los extractos mostraron actividad antimicrobiana.

En la tabla 15 se muestran los resultados del primer ensayo utilizando una concentración de microorganismos inoculados de 1×10^6 . Se obtuvieron pocas lecturas en este primer ensayo utilizando *E. coli*, los resultados muestran un mayor efecto del extracto M1. Por otro lado, en la tabla 16 podemos ver los resultados obtenidos de las pruebas con *Stafylococcus*, podemos ver que no se obtuvo más que una lectura utilizando en extracto M2.

E. coli a 72hr

M1				M2		
% concentración	normal	replica		% concentración	normal	replica
100	1.3	1.5		100	--	--
75	1.2	1.25		75	--	1.8
50	--	1.2		50	--	1.8
25	--	1.2		25	--	1.5

Tabla 15 Diámetros en cm de los halos de actividad antimicrobiana de los extractos frente a E. coli 1x10E6 UFC a 72 hr

Staphylococcus a 72 hr

M1				M2		
% concentración	normal	replica		% concentración	normal	replica
100	--	--		100	--	--
75	--	--		75	--	1.2
50	--	--		50	--	--
25	--	--		25	--	--

Tabla 16 Diámetros en cm de los halos de actividad antimicrobiana de los extractos frente a Staphylococcus 1x10E6 UFC a 72 hr

En las tablas 16 y 17 se muestran los resultados obtenidos de E. coli y Staphylococcus respectivamente, en esta segunda prueba se utilizó una concentración de microorganismos inoculados de 1×10^5 . Como se puede ver, en la tabla 16 para E. coli, se obtuvieron más datos, mientras que no hubo presencias de halos que demostrarán la actividad antimicrobiana en los ensayos de Staphylococcus, figura 29 c y d.

E. coli a las 72 hr

M1				M2		
% concentración	normal	replica		% concentración	normal	replica
100	1.86	2		100	1.9	2.1
75	1.8	2		75	1.8	1.9
50	1.8	1.5		50	1.7	1.73
25	1.6	1.5		25	1.7	1.7

Tabla 17 Diámetros en cm de los halos de actividad antimicrobiana de los extractos frente a E. coli 1x10E5 UFC a 72 hr

Staphylococcus a las 72 hr

M1				M2		
% concentración	normal	replica		% concentración	normal	replica
100	--	--		100	--	--
75	--	--		75	--	--
50	--	--		50	--	--
25	--	--		25	--	--

Tabla 18 Diámetros en cm de los halos de actividad antimicrobiana de los extractos frente a Staphylococcus 1x10⁵ UFC a 72 hr

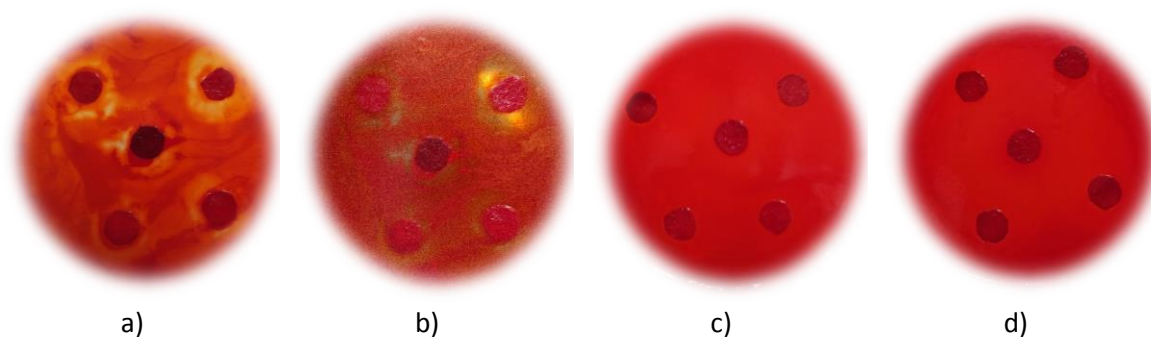


Figura 29 Halos de actividad antimicrobiana, a) y b) son del ensayo con E. coli para la muestra M1 y M2, c) y d) son de la prueba utilizando Staphylococcus para las muestras M1 y M2

De las pruebas realizadas con los antibióticos se obtuvieron resultados positivos solamente en los ensayos con E. coli. Se obtuvo lo siguiente

M1				M2		
Antibiótico	normal	replica		Antibiótico	Normal	Replica
E. coli	2.7	1.8		E. coli	1.8	1.7

Tabla 19 Diámetro de los halos en la prueba de control positiva.

Como podemos ver los resultados obtenidos son poco satisfactorios por lo que podemos decir que es necesario repetir el proceso experimental, sin embargo, con los resultados obtenidos en el segundo ensayo con E. coli se realizó un análisis de datos con una prueba estadística t

de Student. En la tabla 20 se encuentran los resultados comparando los resultados obtenidos de las dos muestras diferentes.

Concentración	Diámetro promedio M1	Diámetro promedio M2	Valor de P M1 vs M2
100	1.93	2	0.62422
75	1.9	1.85	0.698489
50	1.65	1.715	0.708362
25	1.55	1.7	0.095466

Tabla 20 Comparación de los resultados obtenidos con los extractos de las muestras 1 y 2

De la misma forma podemos aplicar este análisis para comparar los resultados obtenidos con el antibiótico y cada una de las muestras.

Concentración	Valor de P M1 vs antibiótico	Valor de P M2 vs antibiótico
100	0.5550406	0.15484575
75	0.52698384	0.29289322
50	0.33333333	0.57160696
25	0.26213521	0.42264973

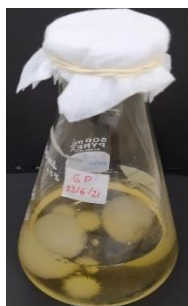
Tabla 21 Comparación de las muestras 1 y 2 con el antibiótico

5.7 Discusión

De los datos encontrados para la cinética de fermentación sólida podemos resaltar la discrepancia entre los datos de las lecturas tomadas en la caja Petri “normal” y su “replica”. Como pudimos observar por ejemplo en muchas de nuestras cajas Petri el desarrollo de micelio fue más rápido en la caja replica en comparación con la caja normal, esto representa un problema para nosotros ya que al no ser congruentes no podemos establecer una conexión entre el crecimiento del micelio y las maderas utilizadas para suplementar los medios. Uno de los problemas principales en la fermentación en estado sólido es que influyen muchas variables en el crecimiento del organismo, en este caso uno de estos factores fue la distribución de la madera en el agar, al no ser uniforme la distribución en la superficie (zona de contacto del micelio con el sustrato) el crecimiento del hongo se vio afectado.

En comparación con la fermentación sólida, la fermentación sumergida o de estado líquido tiene distintas ventajas, pues resulta más fácil la recuperación y determinación de la biomasa generada. Durante la cinética de fermentación sumergida se pudieron obtener datos que sirvieron para determinar no solo la cantidad de biomasa generada, sino también la producción de esta con respecto al sustrato. En la primera ocasión en la que se realizó el experimento, los frascos inoculados se colocaron en evitación constante a 90 rpm y ya que esta agitación no era suficiente para la formación de pellets, en su lugar la biomasa estaba distribuida en el medio. Posteriormente cuando se realizó el experimento nuevamente se colocaron los matraces a 120 rpm, con este cambio se logró obtener los pellets del hongo.

Por otro lado, la determinación de biomasa presenta errores ya que, aunque la tendencia de los datos es a ir en aumento, cuando se tomaron las muestras en las charolas y se evaporó el líquido que contenía, quedaron restos del medio por lo que cuando pesamos las charolas una parte del peso leído en realidad es residuo del medio de cultivo. Lo que se tendría que hacer en esta parte es filtrar la biomasa y posteriormente lavarla con agua destilada para retirar los restos del medio de cultivo, otra cosa que se pudo notar respecto al medio de cultivo es que el caldo ExM contenía pequeñas partículas que quedaban atrapadas en la biomasa, mientras que en los medios sin partículas dispersas la biomasa resultante era de un color blanco y limpio (figura 30c), en la biomasa de los frascos con ExM el color estaba oscurecido (figura 31c).



a)



b)



c)

Figura 30 Biomasa en medio de cultivo GP a) y b) son pellets formados en el medio, c) biomasa filtrada

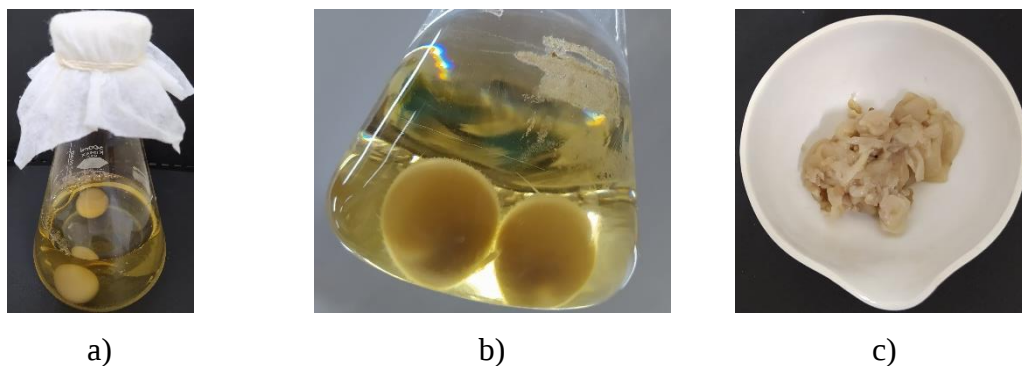


Figura 31 biomasa en medio de cultivo ExM, a) y b) pellets formados en el medio, y c) biomasa filtrada

La determinación de azúcares de acuerdo a los resultados, las gráficas muestran una tendencia a disminuir, pero podemos apreciar un par de picos de incremento, esto es más notorio en el caldo ExM (figura 13) donde inmediatamente después del primer descenso la cantidad de azúcares comenzó de nuevo a subir, mientras que en el medio DS después del primer incremento comenzó el descenso del contenido de azúcares y se mantuvo estable antes de continuar disminuyendo (figura 14), por otro lado en el medio PDA se observa un incremento considerable a las 96hr para después comenzar a descender, posteriormente se da otro incremento pero mucho menor al anterior (figura 15). Este comportamiento se puede asociarse a secreción de exopolisacáridos al medio de cultivo, pues los hongos los utilizan principalmente como mecanismo de protección, Donot et al. (2012), la producción de exopolisacáridos, se ve afectada por los nutrientes de los que dispone el hongo, por lo que es distinta para cada medio, Legarda et al. (2015).

Como se puede ver en las fotografías mostradas anteriormente (figura 24), en la segunda vez al hacer la cinética de fermentación sumergida el crecimiento del micelio si desarrollo pellets lo que facilita la tarea de recuperación de biomasa. Hay que mencionar que el crecimiento en los pre inóculos realizados fue muy variable, lo que afectó en el desarrollo de biomasa de los matraces más grandes.

En cuanto a los análisis bromatológicos, las diferencias encontradas entre las muestras producidas en uno y otro medio son mínimas, tomando en cuenta también que en el caso del medio ExM la muestra contenía partículas que procedían del medio de cultivo lo que pudo afectar en los resultados. Como pudimos ver las cantidades encontradas en cada una de las pruebas fue mínima, el porcentaje de extracto etéreo (grasas) no supero el 1.5 %, la diferencia

más significativa entre las muestras de los dos medios la encontramos en las cenizas, mientras que para el ExM obtuvimos un porcentaje de 11.67% en el medio GP obtuvimos 4.86%, por otro lado, en el medio ExM obtuvimos 2.72 % de proteína y en el medio GP se encontró 1.94% de proteína.

Finalmente, de las pruebas de actividad antimicrobiana podemos observar que en los ensayos con *Staphylococcus* no se obtuvo respuesta (figura 29 c y d), mientras que en los ensayos con *E. coli* se obtuvo un halo de inhibición visible en las dos muestras (M1 y 2).

Se realizó también una prueba de control negativa, esto se realizó debido a que para disolver los extractos se utilizó etanol. Por lo que en cada prueba con los extractos se esperó a que el etanol se volatilizara del papel filtro antes colocarlos en las cajas Petri. En esta prueba de control se buscó comprobar que después de volatilizar el alcohol los residuos dejados en el papel no afectarían a las bacterias (figura 32), de forma que no interfiriera con la actividad de los extractos dándonos una lectura falsa.

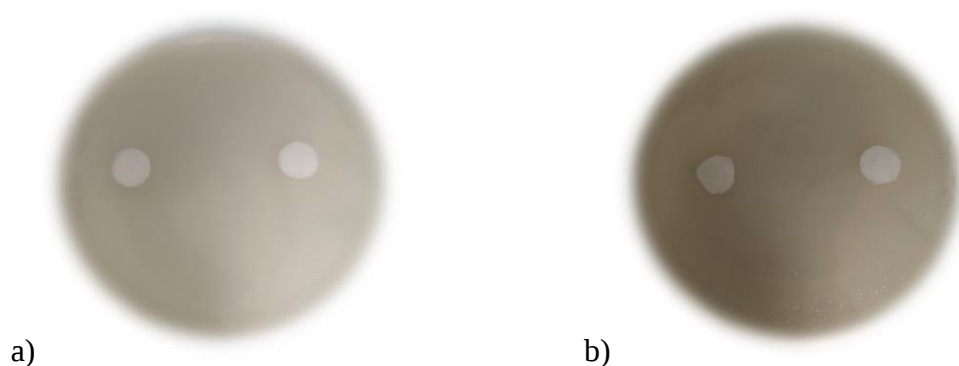


Figura 32 Prueba de control negativa, a) E. coli 1x10E5, b) Staphylococcus 1x10E5

De los resultados obtenidos en el análisis de datos aplicando la prueba t de student a los resultados en los ensayos de *E. coli*, se obtuvieron valores para el estadístico de prueba t menores al valor crítico (Valor crítico calculado= 4.3), por lo que la hipótesis nula, “los diámetros de los halos de acción de los extractos es igual tanto en la muestra 1 como en la muestra 2”, es aceptada. Por otro lado, se obtuvieron valores altos del P-valor, por lo que

podemos decir que existe una alta probabilidad de que los resultados obtenidos sean los mismos si se repite el experimento en las mismas condiciones.

Comparando de la misma forma los resultados obtenidos en contraste con los resultados del antibiótico se encontraron resultados similares. Valores para el estadístico de prueba menores al valor crítico, mientras que el p-valor se mantiene por arriba de 0.1548 siendo este el P-valor obtenido en la muestra 2 usando el 100% de extracto, mientras que en la muestra 1 se obtuvo con 25% de extracto un P-valor de 0.2621 y el valor más alto para la muestra 1 fue de P-valor= 0.5550 para la prueba de 100% extracto, en la Tabla 21 que para la muestra 1 el P-valor incrementa junto con la concentración, mientras que para la muestra 2 los valores son más erráticos.

Si bien los resultados no fueron positivos en el caso del *Staphylococcus*, hay que resaltar que tampoco se obtuvo un efecto al utilizar el antibiótico como prueba de control positiva, por lo que podemos mencionar que es posible que se tratara de una cepa con resistencia antibiótica.

De igual manera los resultados que se obtuvieron son pocos por lo que para que este estudio tenga una mayor validez es necesario recopilar más datos, para tener un muestreo mayor y poder utilizar una prueba estadística más precisa.

5.8 Propuesta de un sistema para la producción de biomasa de hongos basidiomicetos

Durante el proceso de crecimiento radial, observamos la rapidez con la que el micelio puede colonizar un sustrato, así como su comportamiento ante distintos medios de cultivo, estos estudios nos pueden servir de guía para la elección de un medio de cultivo ideal para mantener el micelio fresco y disponible para el proceso.

En las cinéticas de fermentación sumergida se estudió el comportamiento del hongo en un medio líquido, observándose el sistema tanto con agitación constante como en reposo, además de que también se pudo apreciar la diferencia en el crecimiento cuando hay intercambio de gases, favorecido por la agitación y el tapón de tela que permitió la ventilación en los matraces, y cuando no hay intercambio, sistema en reposo y sellado herméticamente. De manera que los frascos y matraces utilizados en la fermentación pueden ser considerados

biorreactores en los que se realizó experimentos donde se observó el comportamiento en distintas condiciones de agitación, nutrientes y oxigenación.

Finalmente, la biomasa fue recuperada del medio, para posteriormente hacer los análisis bromatológicos para obtener información de la composición nutricional del micelio obtenido. De manera adicional se realizó una extracción sencilla de los metabolitos presentes en el micelio del hongo y se realizaron las pruebas del efecto antimicrobianos.

Como ya se mencionó anteriormente los hongos basidiomicetos pueden aprovecharse de distintas maneras, se le han encontrado distintos usos tanto a la biomasa producida como a sus metabolitos, ejemplos de esto es el uso de hongos en el tratamiento de contaminantes y la fabricación de papel.

Los procedimientos realizados en este trabajo junto con los resultados obtenidos son en esencia una estandarización del proceso para la producción de biomasa del este tipo de hongos. En la fermentación sumergida las variables son fácilmente reguladas si se compara con la fermentación sólida, además los productos de interés son fácilmente recuperados, por estas razones los procedimientos manejados a nivel laboratorio pueden ser escalados a niveles de producción mayor, por estas razones podemos proponer el siguiente sistema para la producción de biomasa de hongos basidiomicetos.

5.8.1 Descripción del sistema propuesto

El sistema se dividirá en tres etapas.

Primera etapa; en la etapa inicial se prepara un cultivo de micelio del hongo con el que se desee trabajar, existen distintos medios de cultivo que se pueden emplear para el cultivo de hongos basidiomicetos uno de los más simples es el PDA (agar de papa y dextrosa). El hongo puede ser aislado a partir del tejido de un carpóforo o se puede conseguir micelio con otra empresa, una vez inoculado el micelio en las cajas Petri se incubarán hasta que la superficie sea colonizada totalmente, tanto el tiempo que tarde en crecer como la temperatura ideal de incubación dependerán de la especie de hongo con la que se esté trabajando, sin embargo, se puede estimar un mínimo de 7 a 10 días en incubación y una temperatura de 25 a 30°C. Esta

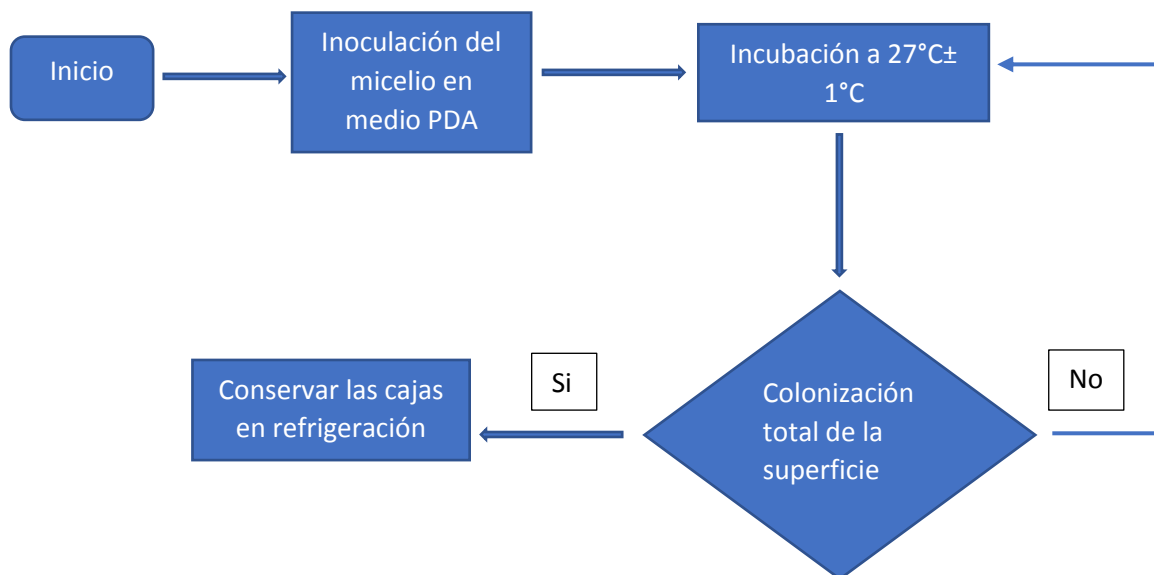
etapa es importante para la conservación y disponibilidad del micelio que servirá para la siguiente etapa del proceso.

Segunda etapa; en la segunda etapa se utilizan las cajas colonizadas como inóculo para la fermentación sumergida. La cantidad que se debe inocular depende del volumen con el que se quiere trabajar, por lo que de ser necesario se pueden hacer preinóculos de un litro en el que se inoculara el micelio de media caja Petri, la proporción de micelio inoculado es de 4 gr/l de micelio. El preinóculo tardará unos 10 días en crecer, después se verterán en el tanque o recipiente que servirá de biorreactor. El periodo que tarde en crecer la biomasa pueden variar dependiendo de la especie de hongo, pero podemos tomar los 10 días como una referencia del tiempo que tardará el crecimiento hasta la saturación del medio. Los hongos pueden sufrir autólisis cuando el sustrato se agota por lo que es importante recuperar la biomasa en cuanto el medio se sature de biomasa.

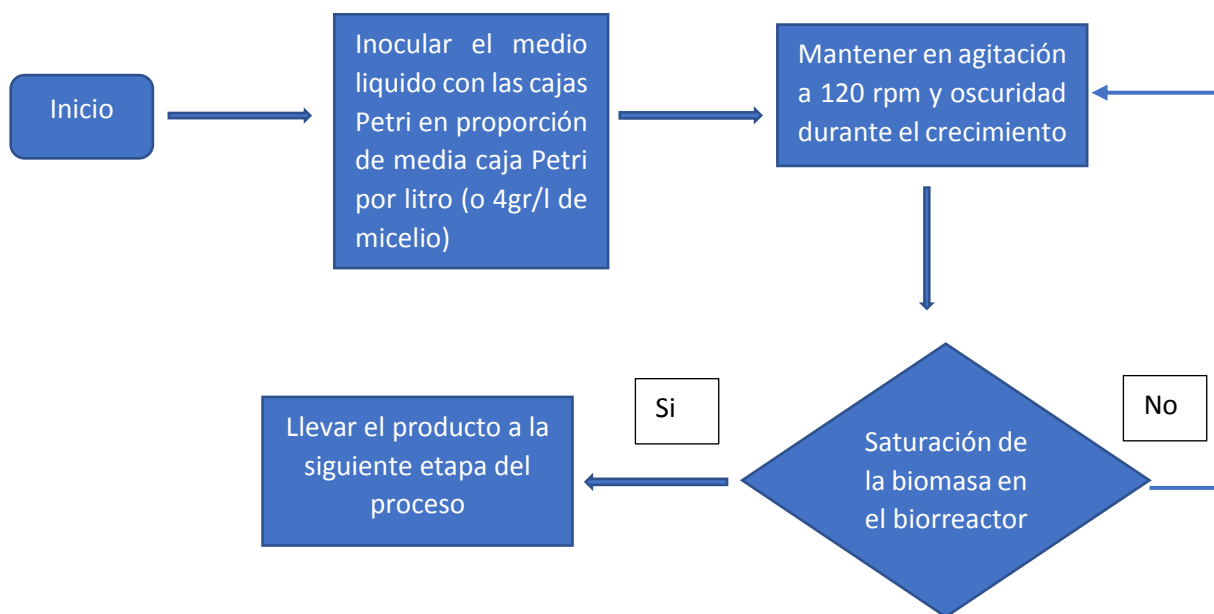
Tercera etapa; en la etapa final se recuperará por filtración la biomasa, el tratamiento final que se le dará al micelio dependerá del uso que se le dará al producto. Por ejemplo, un hongo comestible al ser una buena fuente de proteína puede servir para la elaboración de suplementos alimenticios, por lo que la biomasa debe tratarse de acuerdo a las normas para alimentos. Mientras que las enzimas producidas por los hongos como las lacasas pueden ser utilizadas para la degradación de contaminantes, por lo que se necesitaría recuperar estas enzimas por técnicas de extracción.

5.8.2 Diagrama de flujo del sistema

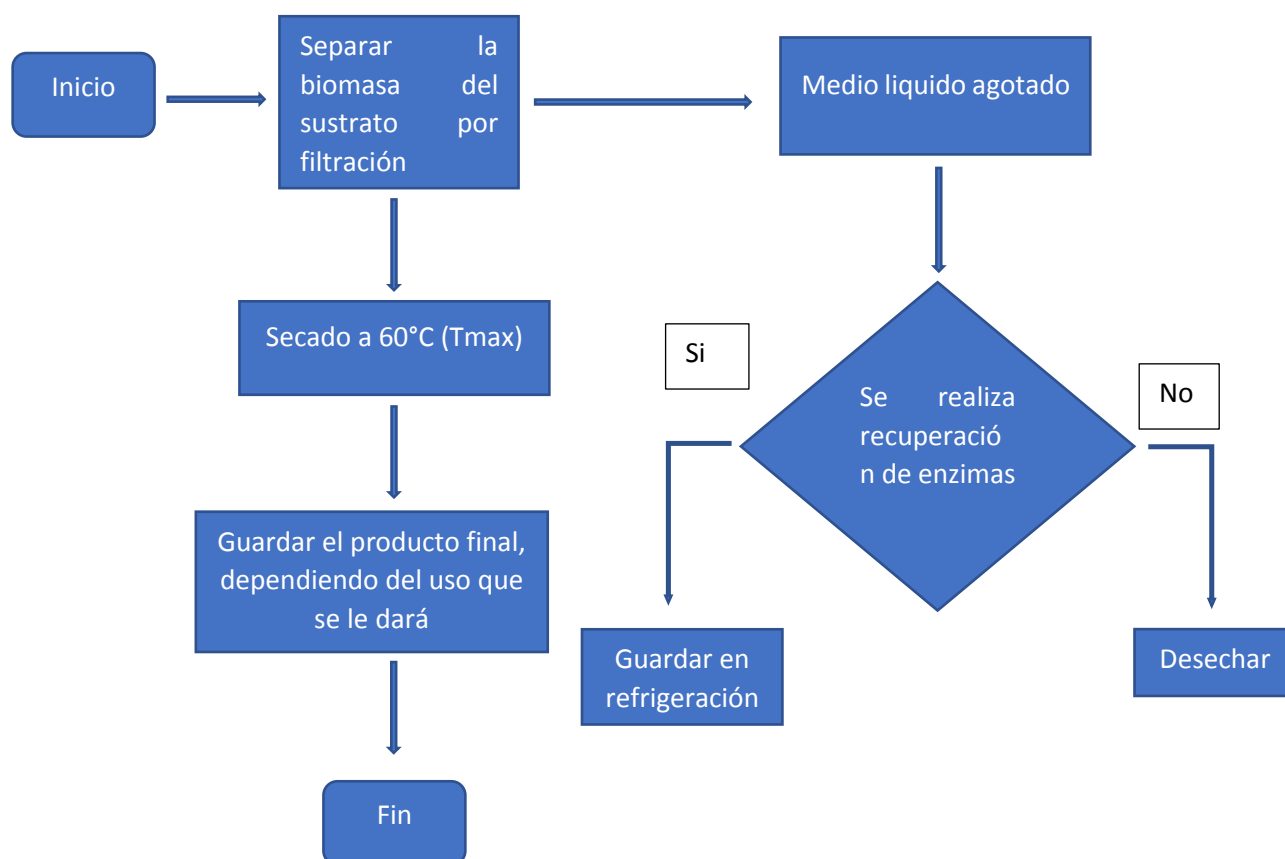
Primera etapa



Segunda etapa



Tercera etapa



6. Conclusiones

Si bien los resultados obtenidos son satisfactorios en el tiempo establecido para el desarrollo del proyecto, hay que mencionar que los experimentos llevados a cabo pueden mejorarse, ya sea optimizando los procesos o implementando nuevas estrategias para obtener resultados más precisos. El trabajo realizado nos debe servir como base para el planteamiento y desarrollo de nuevos proyectos relacionados con la producción de biomasa para el desarrollo de productos útiles.

El desarrollo de estrategias biotecnológicas y los procesos que utiliza representan una línea de investigación muy amplia, como se menciona en el marco teórico, por lo que para el desarrollo de nuevos procesos el seguimiento a este y otros proyectos semejantes son una oportunidad para el crecimiento y desarrollo tecnológico.

Como se mencionó anteriormente se tomó la opción de producir biomasa por fermentación sumergida porque se facilita la recuperación de los productos de interés y se optimiza la generación de biomasa, además de la facilidad con que se pueden manipular las variables que pueden afectar el proceso. Estas últimas características hacen que este proceso sea fácilmente escalable, por lo que el proceso realizado a nivel laboratorio se puede realizar a mayores escalas sin demasiadas modificaciones. Sin embargo, hay que recordar que tanto el tratamiento final como el almacenamiento de biomasa dependerá del tipo de producto que se necesite.

La biomasa que se puede obtener siguiendo el proceso aquí propuesto puede ser utilizada para distintos fines y distintos procesos. Por ejemplo, al ser los hongos comestibles ricos en proteína o medicinales, se pueden usar para realizar suplementos alimenticios, otro ejemplo puede ser el aprovechamiento de los metabolitos secundarios producidos por los hongos para el desarrollo de fármacos o la degradación de contaminantes.

Referencias

- Real academia de la lengua española. (s.f.). *DEL*. Recuperado el Julio de 2021, de Diccionario de la lengua española: <https://dle.rae.es/>
- Aguirre Acosta, E., Ulloa, M., Aguilar, S., Cifuentes, J., & Valenzuela, R. (2014). Biodiversidad de hongos en México. *Revista Mexicana de biodiversidad*, 76-81.
- Arce Torres, L. F., Gómez Díaz, I., Monge Artavia, M., & Prado Cordero, J. (2020). Metabolitos secundarios con actividad medicinal extraídos de hongos provenientes de centroamérica. *Tecnología en marcha*, 33(3), 80-89.
- Arroyo, M., Acebal, C., & de la Mata, I. (2014). Biocatálisis y biotecnología. *Arbor*, 1-11.
- Ayala Sánchez, N. E., Portillo López, A., Villareal Gómez, L. J., Rico Mora, R., & Soria Mercado, I. E. (2016). Los hongos como fuente de recursos farmacológicos: *Ganoderma lucidum*; *Grifola frondosa*; y *Pleurotus ostreatus*. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 20(58), 25-36.
- Bidegain, M. A. (2017). *Optimización del cultivo de Ganoderma lucidum Evaluación de actividad y desarrollo de nutraceuticos*. Bahía Blanca, Argentina: Universidad nacional del sur.
- Candia Sanchez, L. F., Álvarez Cervantes, J., Rubén, D., & Díaz Godínez, G. (2017). Uso potencial de los biorreactores para la producción de lacasas de hongos basidiomicetos. *Mexican Journal of Biotechnology*, 15-36.
- Cano Estrada, A., & Romero Bautista, L. (2016). Valor económico, nutricional y medicinal de hongos comestibles silvestres. *Revista Chilena de nutrición*, 75-80.
- Carbajo García, J. M. (2015). *Utilización de hongos de podredumbre blanca en la producción de pasta de celulosa de alto rendimiento*. Madrid: Universidad complutense de Madrid, Facultad de ciencias químicas, Departamento de Bioquímica y Biología molecular I.
- Cepero de García, M. C. (2012). *Biología de los hongos*. Ediciones Uniandes-Universidad de los Andes.
- Cortés Sánchez, A. d., & Mosqueda Olivares, T. (2013). Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico. *Química viva*, 64-90.
- Cuevas Moreno, J. A. (2016). Los Hongos: Heroes y villanos de la prosperidad humana. *Revista digital universitaria Unam*, 1-10.
- Fernández, P., Haza, A. I., & Morales, P. (2020). Propiedades funcionales de hongos comestibles. *Agro Sur*, 11-24.

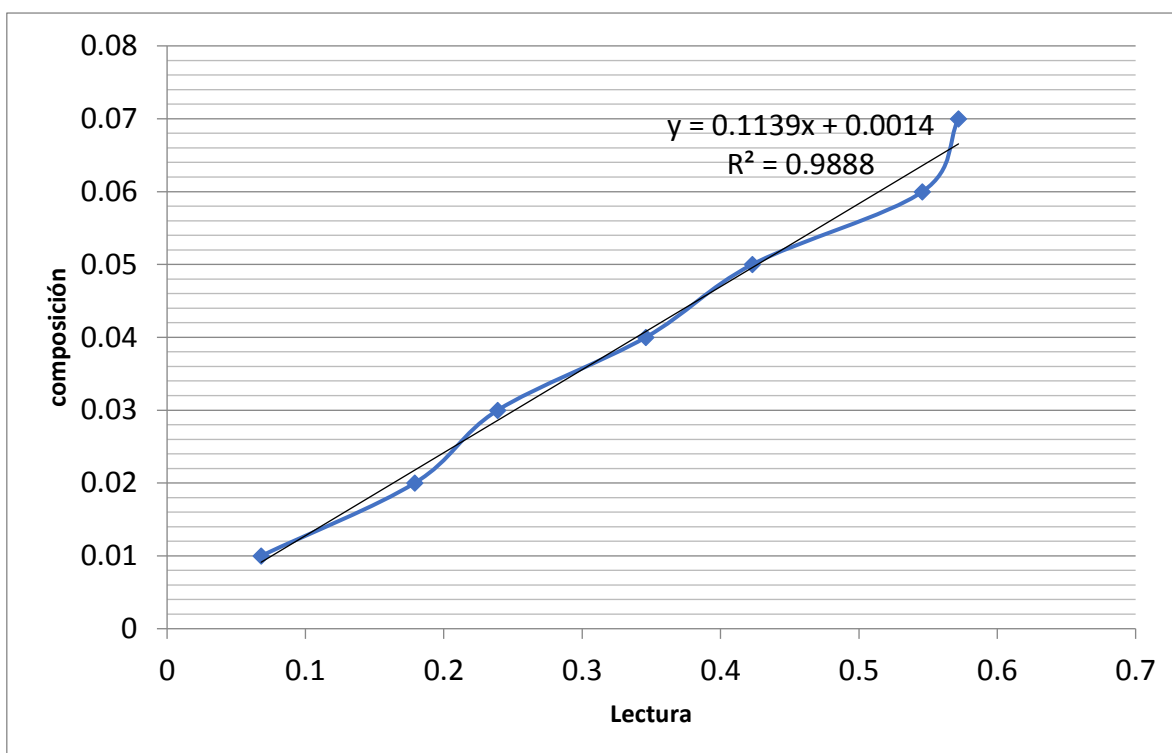
- Hapuarachchi, K., Elkhateeb, W., Karunarathna, S., Cheng, C., Bandara, A., KaKumyan, P., . . . Wen, T. (2018). Current status global Ganoderma cultivation, products, industry and market. *Mycosphere* , 125-1052.
- Hernández Melchor, D. J., Ferrera Cerrato, R., & Alarcón, A. (2019). Trichoderma: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 98-112.
- J. Alexopoulos, C., & W. Mins, C. (1985). *Introduccion a la Micología*. Barcelona: Ediciones omega.
- Kuhar, F., Castiglulia, V., & Papinutti, L. (2013). Reino Fungui: Morfología y estructura de los hongos. *Revista Boletín Biologica*, 11-18.
- Larqué Saavedra, A. (2016). Biotecnología prehispánica en mesoamérica. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 39(2), 107-115.
- Manzano León, A. M., Sánchez López, M. I., Ramos Leal, M., Torres Ferradá, G., & Guerra Rivera, G. (2014). Tratamiento biológico de efluentes con basidiomicetos ligninolíticos para la degradación de colorantes textiles a escala de laboratorio. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*, 4(2), 1-7.
- Montoya, S., Sánchez, Ó. J., & Levin, L. (2013). Polysaccharide Production by Submerged and Solid State Cuulteres from Several Medicinal Higher Basidiomycetes. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 71-79.
- Nahata, A. (2013). Ganoderma lucidum: A Potent Medicinal Mushroom with Numerous Health Benefits. *Phrmaceutica Analytica Acta*, 1-4.
- Ocara, M., Vieille, P., Carvajal, L., & Cruz, R. (2018). Los hongos en la salud y en la enfermedad. Parte 1. *Boletín Micológico*, 1-9.
- Ostos Ortiz, O. L., Rosas Arango, S. M., & González Devia, J. L. (2019). Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos. *NOVA*, 129-163.
- Quiroga Arenas, Y. A., & Supelano Gómez, W. L. (2019). *Aporte a la diversidad de macrohongos (Ascomycetes y Basidiomycetes) Presentes en el sendero ecologico de la quebrada Las Delicias. (Chapinero, Bogotá D.C)*. Bogota: Universidad distrital francisco José de caldas facultad de ciencias y educación, Licenciatura en biología.
- Ramírez Aristizábal, L. S., & Arango Londoño, Á. M. (2017). Macromicetos: generalidades, desinfección y cultivo in vitro . *Microciencia*, 105-118.
- Rendueles, M., & Díaz, M. (2014). Biotecnología industrial. *Arbor*, 1-13.
- Rodríguez Pérez, S., Arone, C. M., Soria Calzadillo, J., Aguilera Rodríguez, I., & Serrat Díaz, M. (2016). Determinación de biomasa fungica y su utilidad en procesos biotecnológicos. *AFINIDAD* , 60-67.

- Rojas Jiménez, S., Lopera Valle, J. S., Uribe Ocampo, A., Correa Pérez, S., Perilla Hernández, N., & Marín Cárdenas, J. S. (2015). Consumo de nutraceuticos, una alternativa en la prevención de las enfermedades cronicas no transmisibles. *Biosalud*, 91-103.
- Rosales López, C. (2019). Los bioprocesos en la biotecnología: uso de biorreactores para la produccion y el escalamiento de productos de interés comercial. *Tecnología en marcha*, 41-46.
- Suárez Arango, C., & Nieto, I. J. (2013). Cultivo biotecnologico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtencion de nutraceuticos. *Revista Iberoamericana de Micología* , 1-8.
- Wasser, S. P. (2014). Medicinal Mushroom science: current perspectives, advences, evidences, and challenges. *Blomed J*, 345-356.
- Legarda, X. L., Echavarría, 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.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., & Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 951-962.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- López-Legarda, X., Taramuel-Gallardo, A., Arboleda-Echavarría, C., Segura-Sánchez, F., & Restrepo-Betancur, L. F. (2017). Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales. *Revista Cubana de Química*, 29(2), 180-198.
- Palacio Duque, M., & Ramírez Villa, L. M. (2020). Efecto de macronutrientes en la producción de biomasa de Amauroderma omphalodes en cultivo sumergido (Bachelor's thesis, Universidad Eafit).

Anexos

Curva Bradford

Composición	Lectura
0.01	0.068
0.02	0.179
0.03	0.239
0.04	0.346
0.05	0.423
0.06	0.502
0.07	0.546



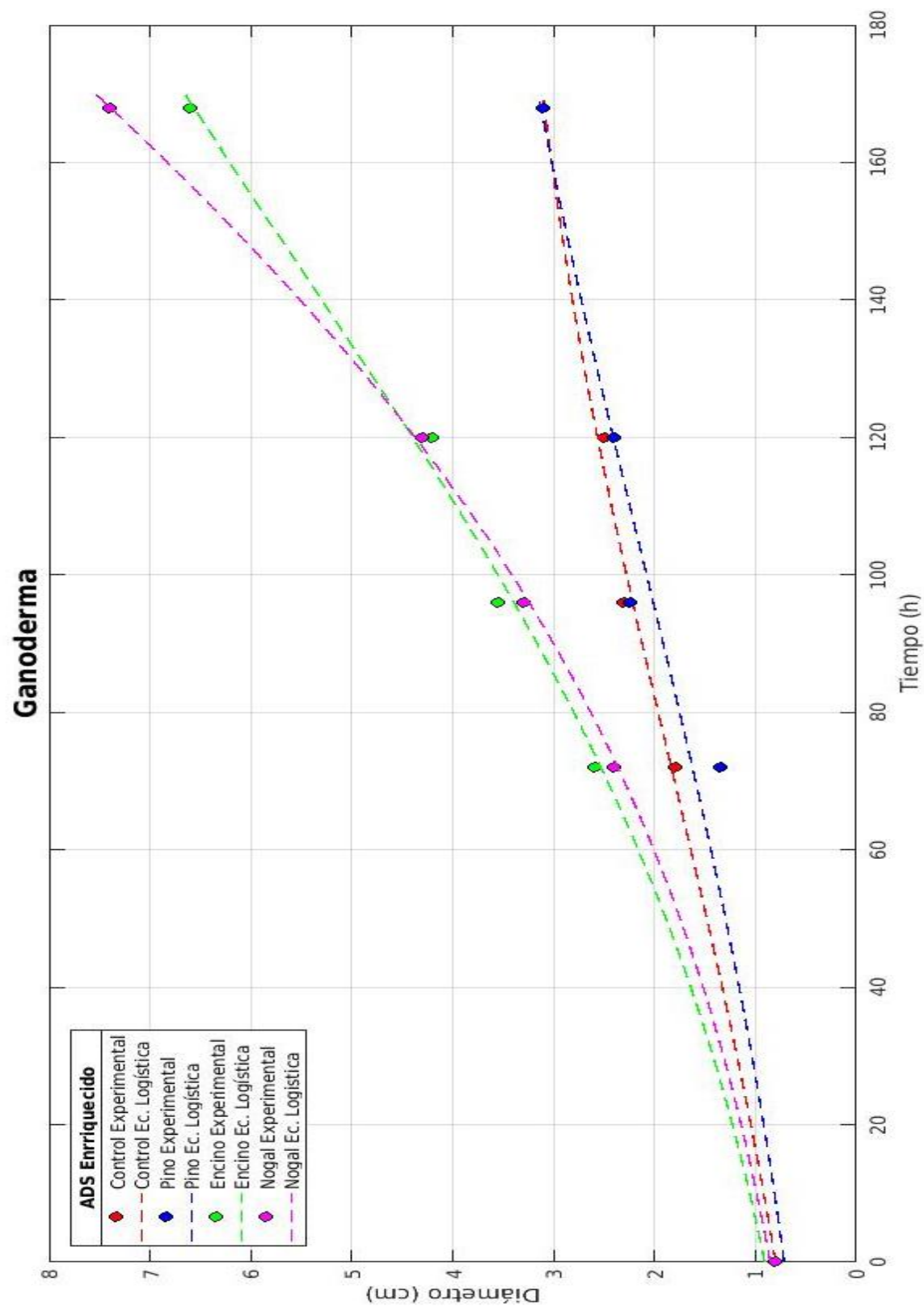
$$y = 0.1139x + 0.0014$$

Anexo

Medio ADS							
Parámetros	A	B	C	D	Vmax	Tmax	Tlat
Normal							
Puro	0.7266	0.1997	0.7082	0.0178	0.18165	71.11855614	-41.2409944
Pino	0.884	0.207	1.032	0.01553	0.221	103.4472088	-25.3357918
Encino	0.5846	0.0533	0.5913	0.0167	0.14615	144.0950402	24.33456118
Nogal	0.7955	0.03877	0.8937	0.01526	0.198875	205.6175227	74.55592377
Replica							
Puro	0.8624	0.2407	0.841	0.0183	0.2156	68.36285875	-40.9267587
Pino	1.399	0.1922	1.688	0.01317	0.34975	164.9782216	13.11793308
Encino	1.06	0.2167	1.114	0.02396	0.265	68.33048881	-15.1419653
Nogal	0.8292	0.1883	0.8262	0.02362	0.2073	62.60797796	-22.0660271
Medio PDA							
Parámetros	A	B	C	D	Vmax	Tmax	Tlat
Normal							
Puro	1.007	0.1151	1.016	0.01847	0.25175	117.9116033	9.627899968
Pino	0.7571	0.1194	0.8624	0.01911	0.189275	103.466248	-1.19099952
Encino	0.5742	0.05192	0.5306	0.02182	0.14355	106.5217401	14.8627117
Nogal	1.208	0.09233	1.395	0.01983	0.302	136.9279162	36.07062927
Replica							
Puro	1.113	0.184	1.238	0.02204	0.27825	86.49349799	-4.25060365
Pino	0.6606	0.02443	0.6491	0.01379	0.16515	237.8371938	92.80456148
Encino	0.6415	0.05706	0.6169	0.02167	0.160375	109.8571108	17.56361746
Nogal	1.049	0.09733	1.147	0.01984	0.26225	124.3345691	23.52811747
Medio AEM							
Parámetros	A	B	C	D	Vmax	Tmax	Tlat
Normal							
Puro	0.8256	0.09022	0.8782	0.01757	0.2064	129.5175428	15.68715004
Pino	0.6558	0.1476	0.8282	0.02784	0.16395	61.95218243	-9.88689803
Encino	0.3874	0.03747	0.35	0.02336	0.09685	95.65036565	10.0339273
Nogal	0.6172	0.1072	0.7905	0.02799	0.1543	71.38154369	-0.07254705
Replica							
Puro	0.6836	0.07192	0.7021	0.0175	0.1709	130.2012259	15.91551165
Pino	0.7629	0.1373	0.9592	0.02373	0.190725	81.91872275	-2.36277746
Encino	1.021	0.1033	0.928	0.02265	0.25525	96.92690316	8.626682413
Nogal	0.9289	0.1157	1.014	0.02479	0.232225	87.5618213	6.884128679

Anexo

Graficas obtenidas del ajuste logístico



Ganoderma Réplica

