

Efecto de macronutrientes en la producción de biomasa de *Amauroderma omphalodes* en cultivo sumergido

Mariana Palacio Duque^a, Laura María Ramírez Villa^a

Jacobo Gallo Machado^b, Luz Deisy Marín Palacio^c

^a Estudiante de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, Medellín Colombia

^b Estudiante de Maestría en Ingeniería, Co-asesor, Departamento de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia

^c Profesor, Asesor del Proyecto de Grado, Departamento de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia

Resumen

Amauroderma omphalodes es un basidiomiceto perteneciente a la familia Ganodermataceae el cual comparte características taxonómicas similares al hongo *Ganoderma lucidum*, que ha sido ampliamente estudiado para la producción de compuestos bioactivos. Debido a que no se encontraron reportes del hongo *Amauroderma omphalodes*, se tomó el modelo biológico de *G. lucidum*, para la producción de biomasa del hongo de estudio. Para los cultivos sumergidos realizados, se ajustó el pH inicial a 5,5, una agitación de 120 rpm y una temperatura de 30°C durante 12 días.

Este trabajo evaluó el efecto de las fuentes de carbono (glucosa, lactosa y sacarosa), la fuente de nitrógeno (extracto de levadura, peptona y una relación 50/50 extracto de levadura peptona) y la relación carbono/nitrógeno (10/1, 40/1, 12/1, 5/1 y 20/1) sobre la producción de biomasa. El medio de cultivo que favoreció la mayor producción de biomasa fue sacarosa (35 g/l) - extracto de levadura (7,7 g/l) alcanzando una concentración de $18,3 \pm 0,5$ g/l. La relación que más favoreció la producción de biomasa fue la relación 12/1 con una producción de biomasa de $15,1 \pm 0,5$ g/l.

1. Introducción

Los hongos han sido importantes en la dieta por su valor nutricional, contienen una cantidad de proteínas digeribles, carbohidratos, fibra, vitaminas, minerales y antioxidantes. Recientemente, han sido atractivos como alimento funcional y fuente medicamente eficiente en terapias contra el cáncer, antiviral, inmunopotenciadora y actividad hipolipidémica [1], [2]. Los hongos de la familia Ganodermataceae son de importancia económica ya que incluyen varias especies con propiedades medicinales con actividad antitumoral,

inmunomodulador, antiinflamatorio, antinociceptivo, antiviral, antioxidante, efectos hipoglucémicos y hepatoprotectores [3], [4], [5]. Los principales compuestos bioactivos son polisacáridos, terpenoides y esteroides [6], [7], [8]. Los polisacáridos, que se han aislado de *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis*, *Lentinula edodes*, *Coriolus versicolor*, *Grifola frondosa*, *Schizophyllum commune*, poseen actividad anticancerígena principalmente a través de la activación del sistema inmunitario y la facilidad de las células inmunes para atacar las células cancerosas [9].

Amauroderma omphalodes, es una especie que se encuentra dentro del filo Basidiomycota, clase Agaricomycetes (Homobasidiomycetes), orden Polyporal, familia Ganodermataceae y género *Amauroderma* [10], [11]. Por pertenecer a la familia Ganodermatacea, se presume que pueda producir metabolitos como los que posee *G. lucidum*, el cual ha sido conocido en Japón, China y otros países como un alimento y materia prima para el desarrollo de drogas y compuestos funcionales [12]. Para el género *Amauroderma* se han reportado aproximadamente 30 especies diseminadas por las áreas tropicales y para el caso de *A. grosero* se ha examinado el efecto anticancerígeno en las líneas celulares de carcinoma de mama. Así mismo, estudios recientes muestran que *A. grosero* tiene una actividad significativamente mayor en la eliminación de células cancerosas que *G. lucidum* [13] y para *A. rugosum*, se ha reportado como una buena fuente de nutrientes y actividad antioxidante y antiinflamatorias [14].

Para el caso de *A. omphalodes*, hongo objeto de estudio de este trabajo, no se ha reportado crecimiento en cultivo sumergido, así como propiedades biológicas de interés comercial. Sin embargo, por pertenecer a la familia Ganodermatacea y compartir características taxonómicas propias de ella, podría este sistema biológico ser una fuente inexplorada de productos naturales, que pueden constituir una fortaleza para generar estrategias de mantenimiento de bienes biológicos, con proyección económica relevante [15].

Los reportes de la familia Ganodermatacea para producción de biomasa y metabolitos de interés biológico en cultivos sumergidos, se han presentado en modelos biológicos tales como, hongos polypolares [16], *Humphreya coffeata* [17], *Psilocybe* [18], *Grifola* [19] y *Ganoderma lucidum* [4], evaluando condiciones de pH 5,5 [19], 6,0 y 6,5 [16], temperaturas de 26°C y 30 °C [19], [4] y agitación 120 rpm [19]. En estas investigaciones se ha identificado que los rangos de pH que favorecen la producción de biomasa son de 4,0 5,0 y 5,5 [4], [20], temperatura de 30 °C [5] y agitación de 120 rpm [4], [5].

Por otra parte, la mayoría de los trabajos experimentales realizados, indican que las fuentes de carbono más utilizadas para la producción de biomasa son: glucosa [5], [20], [21], [22], [23], sacarosa [4], [21], [22], lactosa [4], [19], [22] fructosa [21] y maltosa [21]. Como fuentes de nitrógeno se han empleado el extracto de levadura [4], [22], [21], , peptona [4], [19], [22], y licor de maíz [19]. Investigaciones llevadas a cabo con la familia

Ganodermatacea para la obtención de biomasa, emplean alrededor de 40 g de glucosa y 60 g de extracto de malta [22], para la producción de biomasa *Agaricus brasiliensis*, 2% de la fuente de carbono evaluando la glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa, y el 0,2 % de la fuente de nitrógeno evaluando el extracto de levadura y la peptona fueron utilizados [21]. Reportes con *G. lucidum*, muestran que la producción de biomasa de se ve favorecida por la presencia en el medio de cultivo de relaciones carbono/nitrógeno (C/N) cercanas a 16/1, 22/1,6 [4], 16,4/1,3 [5] 10/2 [21] 16,7/1 [23] conforme a la composición típica de los hongos [23], así como, por la presencia de sustratos complejos como la harina de cebada, que le aportan además de la fuente de carbono, micronutrientes necesarios para el desarrollo y crecimiento del hongo [21], [22].

El propósito de este trabajo fue evaluar las fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y la relación carbono nitrógeno sobre la producción de biomasa de *A. omphalodes* en cultivo sumergido. Esta investigación es pertinente porque va a aportar resultados que van a permitir enriquecer el estado del arte relacionado con el estudio del hongo, ya que la literatura es escasa para este sistema.

2. Materiales y métodos

El hongo *A. omphalodes* se encuentra almacenado en el laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Eafit y se conserva en papel filtro de 0,5 cm de diámetro, en agua destilada estéril y almacenados a 4 °C.

2.1 Activación de la cepa

Para la activación de la cepa se utilizó un disco de papel filtro con el micelio, que fue transferido a una caja Petri con medio PDA e incubada durante 7 días a 30 °C.

2.2 Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo se utilizaron 3 discos de agar, que fueron transferidos en matraces bafleados de 250 ml con 50 ml de medio, con la siguiente composición (g/l): glucosa 35; peptona 5; Extracto de levadura 2,5; $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ 1; $\text{MgSO}_4\text{H}_2\text{O}$ 0,5; vitamina B1 0,05 medio modificado descrito por [24], incubados a 150 rpm y 30°C por 72 horas, con un pH inicial de 5,5 [23].

2.3 Cultivos celulares variando la fuente de carbono y nitrógeno

Para el cultivo, 5 ml del inóculo fueron adicionados a matraces convencionales de 250 ml con 45 ml de medio de cultivo con la siguiente composición [24] en (g/l): KH_2PO_4 0,88, MgSO_4 0,5 y Vitamina B1 0,05, variando la fuente de carbono entre sacarosa, lactosa y glucosa con una concentración de 35 g/l; para la fuente de nitrógeno se usó extracto de levadura 7,7 g/l, peptona 1,1 g/l y para la relación 50 /50 peptona 0,5 g/l y extracto de levadura 3,9 g/l. manteniendo una relación carbono nitrógeno de 16/1. Los matraces fueron incubados a 120 rpm y 30°C por 72 horas, a un pH inicial de 5,5 [23]. En la Tabla 1, se presentan las fuentes de carbono y fuentes de nitrógeno evaluadas.

Tabla 1. Medios de cultivo variando las fuentes de carbono y nitrógeno.

Fuentes de Carbono (FC)	Fuentes de Nitrógeno (FN)
Glucosa (G)	Extracto de levadura (E)
	Peptona (P)
	Extracto de levadura – Peptona (E-P)
Lactosa (L)	Extracto de levadura (E)
	Peptona (P)
	Extracto de levadura – Peptona (E-P)
Sacarosa (S)	Extracto de levadura (E)
	Peptona (P)
	Extracto de levadura – Peptona (E-P)

2.4 Cultivo celulares variando la relación carbono y nitrógeno

La activación de la cepa y la preparación del inóculo se realizaron bajo la metodología descrita en el numeral 2.1 y 2.2.

Las fuentes de carbono y las fuentes de nitrógeno que favorecieron la producción de biomasa bajo los experimentos del numeral 2.3, fueron los sustratos que se emplearon para la evaluación de la relación Carbono/Nitrógeno (C/N).

Para el cultivo, 5 ml del inóculo fueron transferidos a matraces convencionales de 250 ml con 45 ml de medio de cultivo con la siguiente composición: KH_2PO_4 0.88, MgSO_4 0,5 y Vitamina B1 0,05 (g) [24] y variando relaciones C/N: 10/1, 40/1, 12/1, 5/1 y 20/1. Los matraces fueron incubados a 120 rpm, 30 °C y un pH inicial de 5,5 durante 12 días.

2.5 Determinación de biomasa

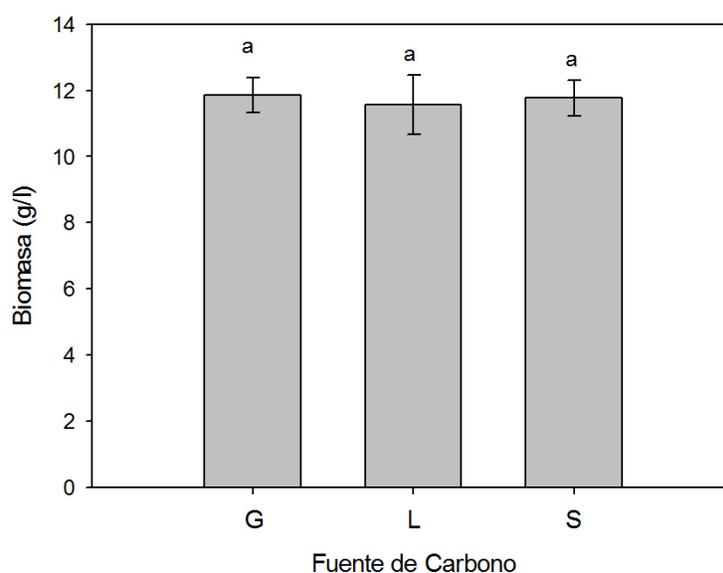
La cuantificación de biomasa de *Amauroderma omphalodes* se determinó por el método gravimétrico de peso seco, filtrando al vacío todo el cultivo celular a través de papel filtro Whatman #2, previamente pesado. La biomasa se lavó con agua destilada y posteriormente

fue secada a 70 °C durante 24 horas para obtener el peso y por diferencia de pesos determinar la cantidad de biomasa [23].

3. Resultados y análisis

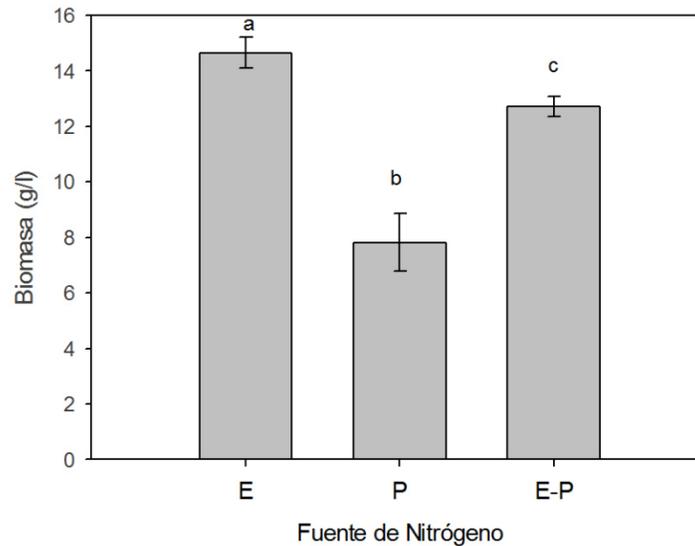
3.1. Resultados de Cultivos celulares variando la fuente de carbono y nitrógeno

Los promedios de la concentración de biomasa para las diferentes fuentes de carbono evaluadas se presentan en la gráfica 1.



Gráfica 1. Promedio de la concentración de biomasa para las fuentes de carbono evaluadas. G (Glucosa), L (Lactosa), S (Sacarosa). Resultados con la misma letra no muestran diferencias significativas con las pruebas de Tukey y LSD.

Para todos los sistemas, la concentración de biomasa estuvo alrededor de $11,7 \pm 0,2$ g/l; no presentándose diferencias estadísticamente significativas al aplicarse los métodos de Tukey y LSD ($p < 0,05$) en cuanto a la fuente de carbono. Caso contrario, ocurre con los promedios de las concentraciones de biomasa alcanzadas cuando se evaluaron las fuentes de nitrógeno (Gráfica 2), donde sí se presentan diferencias significativas en la producción de biomasa, alcanzándose una concentración de $14,7 \pm 0,6$ g/l para los medios enriquecidos con extracto de levadura; 10% más que con los medios con composición de extracto de levadura –peptona y 50 % más, al ser comparado con los medios con peptona.

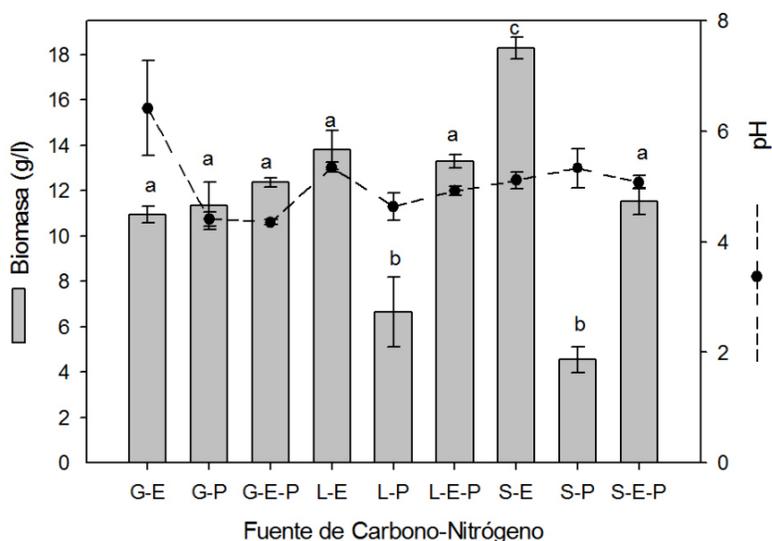


Gráfica 2. Promedio de la concentración de biomasa para las fuentes de nitrógeno evaluadas. E (Extracto de levadura), P (Peptona), E-P (Extracto de levadura-Peptona). Resultados con la misma letra no muestran diferencias significativas con las pruebas de Tukey y LSD.

Al comparar el efecto de la fuente de carbono y nitrógeno de forma simultánea sobre la producción de biomasa (Gráfica 3), se encuentra que los medios de cultivo donde está presente el extracto de levadura muestran las mayores concentraciones de biomasa, siendo el medio enriquecido con sacarosa, como fuente de carbono, y extracto de levadura, como fuente de nitrógeno, el que favorece la producción de *A. omphalodes* alcanzándose una concentración de $18,3 \pm 0,5$ g/l a los 12 días de cultivo. Los medios enriquecidos con peptona como única fuente de nitrógeno no favorecen la producción de altas concentraciones de biomasa, como se observa para los medios con sacarosa y lactosa donde se alcanzan concentraciones de $4,5 \pm 0,6$ g/l y $6,6 \pm 1,5$ g/l de biomasa, respectivamente.

Resultados similares a los obtenidos en el presente estudio fueron reportados por [25] donde evaluaron la producción de biomasa de *G. lucidum* variando las fuentes de carbono; no encontrando diferencias significativas entre glucosa, sacarosa y lactosa, obteniendo concentraciones de biomasa de 9,5 g/l para el medio enriquecido con 50 g/l de sacarosa y 13,3 g/l de extracto de levadura. En [26] se evaluó la sacarosa como fuente de carbono y extracto de levadura, extracto de malta como fuentes de nitrógeno, el medio que favoreció la producción de biomasa fue de 12,1 g/l de sacarosa y 2,3 g/l de extracto de levadura, encontrando que la sacarosa tenía un efecto estimulante en la producción de biomasa en *G. lucidum* alcanzándose concentraciones de 18,7 g/l. Tendencias similares en el uso de la fuente de nitrógeno fueron encontrados por [27], quienes evaluaron diferentes fuentes de nitrógeno, encontrando que el extracto de levadura favorecía la producción de biomasa del *G. lucidum*,

coincidiendo con los resultados obtenidos en esta investigación. Resultados disímiles fueron encontrados en [28] donde la sacarosa tenía un efecto inferior en la producción de biomasa de *G. lucidum* al ser comparadas con la glucosa y galactosa como fuente de carbono donde se alcanzaron concentraciones de biomasa de 25,5 g/l g/l para la glucosa; resultados similares, a los hallados en [29], donde obtuvieron con glucosa como fuente de carbono y extracto de malta como fuente de nitrógeno las mejores concentraciones de biomasa de *G. lucidum* (4,3 g/l). Por su parte, [29] encontró que la peptona y la sacarosa tenían mayores efectos significativos sobre la producción de biomasa para el modelo biológico de *G. lucidum*, cuando fueron comparados con medios de cultivo con glucosa, celulosa y lactosa como fuente de carbono y extracto de malta y asparagina como fuente de nitrógeno.



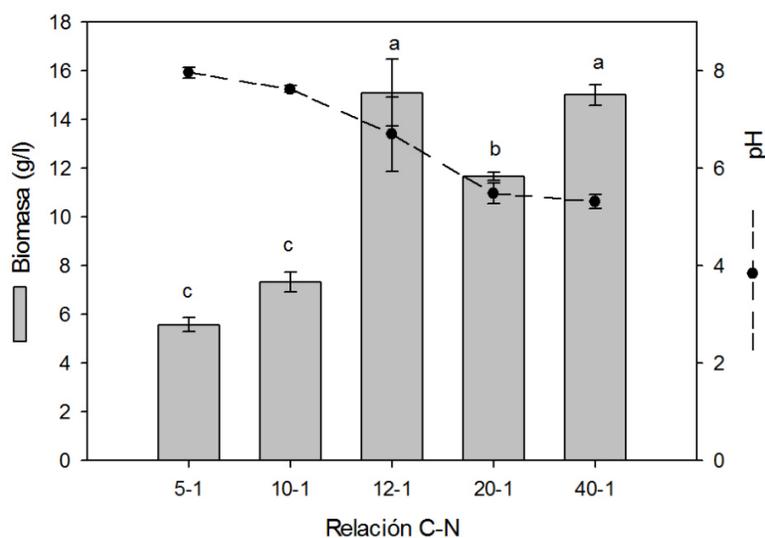
Gráfica 3. Concentración de biomasa promedio y pH al final del cultivo de los cultivos celulares variando la fuente de carbono y nitrógeno. G-E (Glucosa-Extracto de levadura), G-P (Glucosa-Peptona), G-E-P (Glucosa-Extracto de levadura-Peptona), L-E (Lactosa-Extracto de levadura), L-P (Lactosa-Peptona), L-E-P (Lactosa-Extracto de levadura-Peptona), S-E (Sacarosa-Extracto de levadura), S-P (Sacarosa-Peptona), S-E-P (Sacarosa-Extracto de levadura-Peptona). Resultados con la misma letra no muestran diferencias significativas con la prueba de Tukey para biomasa.

En la gráfica 3 también se presentan los valores de pH del extracto de cultivo al final de la fermentación. En general los medios presentan un pH ligeramente ácido y menor, comparado con el pH inicial del cultivo que se ajustó a 5.5. Los cultivos con menores valores de pH fueron en G-E-P (Glucosa-Extracto de levadura-Peptona) con un promedio de $4,3 \pm 0,5$; mientras que los mayores valores de pH se presentaron en el medio de G-E (Glucosa-Extracto de levadura) con un promedio de $6,4 \pm 0,5$. Este aumento de la acidez en la mayor parte de

los cultivos podría explicarse por la presencia de ácidos orgánicos en se producen en el ciclo del ácido cítrico como lo reporta [28] quienes trabajaron cultivos de lote alimentado y su comparación con cultivos batch para la producción de compuesto de *G. lucidum*, econtrando disminución en el pH durante los primeros 12 días de cultivo.

3.2. Resultados de cultivos celulares variando la relación carbono/nitrógeno

En la gráfica 4, se presentan los resultados de la concentración de biomasa a diferentes relaciones carbono/nitrógeno, empleando como fuente de carbono la sacarosa y como fuente de nitrógeno el extracto de levadura, condiciones que favorecieron la producción de biomasa como se discutió en el apartado 3.1.



Gráfica 4. Concentración de biomasa promedio y pH al final del cultivo evaluando las relaciones C/N. Resultados con la misma letra no muestran diferencias significativas con las pruebas de Tukey y LSD para biomasa.

Las relaciones carbono/nitrógeno evaluadas experimentalmente que favorecen el crecimiento de *A. omphalodes* son 12/1 y 40/1, donde se alcanzan concentraciones de biomasa de $15,1 \pm 1,3$ g/l y $14,9 \pm 0,4$ g/l respectivamente. Sin embargo, estas relaciones no presentan diferencias estadísticamente significativas. Por otra parte, para *G. lucidum* la producción de biomasa encontrada por [5] estuvo en un rango entre 8,5 y 24,2 g/l donde aplicaron relaciones de carbono/nitrógeno de 12/1 y 40/1 respectivamente, evaluaron la glucosa como fuente de carbono y la peptona como fuente de nitrógeno señalando que el aumento en la producción de biomasa se presentó cuando se empleaban niveles bajos de peptona y niveles altos de glucosa, encontrando que, las condiciones de cultivo se ven significativamente favorecidas por las concentraciones de glucosa.

Bajas relaciones C/N tiene un efecto negativo en la producción de biomasa, esto posiblemente a la limitación por sustrato que puede generar estas bajas concentraciones donde se limitan los nutrientes como fuente de carbono y fuente de energía. Relaciones superiores a 12/1 podrían no tener limitación de nutrientes (FC y FN) en este estudio donde se encuentra que por encima de esta relación las concentraciones de biomasa están por encima de 12 g/l. Resultados similares fueron encontrados en [23] donde las relaciones carbono/nitrógeno, no afectan la producción de biomasa de *G. lucidum* cuando se trabajan con concentraciones altas en la fuente de carbono, mientras que, a concentraciones bajas, la relación carbono/nitrógeno sí afecta la producción. Los autores reportan que la relación 17/1 [23] es la que favorece la producción de biomasa, mientras que en [29] relaciones C/N alrededor de 20/1 aumentan la producción de biomasa y polisacáridos de *Paecilomyces sinclairii*.

4. Conclusiones

Los experimentos llevados a cabo permiten concluir que la fuente de carbono no afecta significativamente la producción de biomasa de *A. omphalodes*, mientras que el extracto de levadura como fuente de nitrógeno favorece la producción. La interacción entre la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno tienen efectos sobre la producción de biomasa, en tal sentido, cuando se empleó como fuente de carbono la sacarosa y como fuente de nitrógeno el extracto de levadura, se alcanza la mayor concentración de biomasa con valores de $18,3 \pm 0,5$ g/l.

La relación carbono nitrógeno tiene efectos significativos en la producción de biomasa, encontrándose en este estudio, mayor producción de biomasa ($15,1 \pm 1,3$ g/l) de *A. omphalodes* con la relación 12/1, así mismo se encontró que con relaciones C/N superiores a 12/1 se favorece la producción de biomasa.

Referencias

- [1] J. M. Salazar López, . M. C. Martínez Saldaña, R. Reynoso Camacho, R. M. Chávez Morales, M. . L. Sandoval Cardoso y F. Guevara Lara, «Capacidad antioxidante y caracterización fitoquímica de extractos etanólicos de huitlacoche (*Ustilago maydis-Zea mays*) crudo y cocido,» *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 2017.
- [2] B. Chun Lee, J. Tae Bae, H. Bae Pyo, T. Boo Choe, S. Woo Kim, H. Jin Hwang y J. Won Yun , «Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*,» *Enzyme and Microbial Technology*, 2003.
- [3] Q. Wang, F. Wang, Z. Xu y Z. Ding, «Bioactive Mushroom Polysaccharides: A Review on Monosaccharide Composition, Biosynthesis and Regulation,» *Molecules*, 2017.
- [4] W. ZH, D. YY, Q. YQ, G. XF, L. YJ, J. SH, Z. ZX, S. SY, W. CR, C. XJ, Z. Y y Z. JJ, «Screening of *Ganoderma* strains with high polysaccharides and ganoderic acid contents and optimization of the fermentation medium by statistical methods.,» *Bioprocess Biosyst Eng*, 2014.
- [5] I. Fraga, J. Coutinho, R. M. Bezerra, A. A. Dias , G. Marques y F. M. Nunes , «Influence of culture medium growth variables on *Ganoderma lucidum* exopolysaccharides structural features,» *Carbohydrate Polymers*, nº 111, 2014.
- [6] G. Chi-Fung Chan, W. Keung Chan y D. Man-Yuen Sze, «The effects of β -glucan on human immune and cancer cells,» *Journal of Hematology & Oncology*, 2009.
- [7] N. DJ y C. GM, «Natural products as sources of new drugs over the last 25 years.,» *Journal of natural products*, 2007.
- [8] C. RY y Y. DQ, «Progress of studies on the chemical constituents of *Ganoderma* triterpene,» *Acta Farmacéutica Sinica*, 1989.
- [9] X. Li, Q. Wu, Y. Xie, Y. Ding, W. W. Du, M. Sdiri y B. B. Yang, «Ergosterol purified from medicinal mushroom *Amauroderma rude* inhibits cancer growth in vitro and in vivo by up-regulating multiple tumor suppressors,» *Oncotarget*, 2015.
- [10] B. Torrend, «The National Inventory of Natural Heritage,» 1920. [En línea]. Available: https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/804420/tab/taxo?lg=en.
- [11] «Sistema de Información de Biodiversidad,» [En línea]. Available: <https://sib.gob.ar/taxonomia/genero/amauroderma>. [Último acceso: 05 2020].
- [12] N. P. Money, *The Fungi*, 2016.

- [13] C. Jiao, Y.-Z. Xie, X. Yang, H. Li, X.-M. Li, H.-H. Pan, M.-H. Cai, H.-M. Zhong y B. Yang, «Anticancer Activity of Amauroderma rude,» *Plos one*, 2013.
- [14] P.-M. Chan, G. Kanagasabapathy, Y.-S. Tan, V. Sabaratnam y U. Rani Kuppusamy, «Amauroderma rugosum (Blume & T. Nees) Torrend: Nutritional Composition and Antioxidant and Potential Anti-Inflammatory Properties,» *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- [15] H. KK, K. SC, P. P, K. P, H. KD y W. TC, «Amauroderma (Ganodermataceae, Polyporales) – bioactive compounds, beneficial properties and two new records from Laos,» *Asian Journal of Mycology*, vol. 1, 2018.
- [16] C. Peña Serna, A. Sierra Cadavid, B. A. Rojano y A. A. Sáez Vega, «Establecimiento de un medio de cultivo sumergido para una cepa nativa de un hongo Poliporal,» *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. VIII, n° 1, 2006.
- [17] S. Gallego Giraldo y G. A. García Giraldo, «Obtención de biomasa y exopolisacáridos de *Humphreya coffeata* en cultivo sumergido,» proyectode grado, Universidad Eafit, Medellín, 2009.
- [18] P. García Gómez y N. Ramírez Lalinde, «Establecimiento de un medio de cultivo sumergido para *Psilocybe* sp,» proyecto de grado, Universidad Eafit, Medellín, 2009.
- [19] P. Zapata , D. Rojas, C. Fernández, D. Ramírez, G. Restrepo, V. Orjuela, M. Arroyave, T. Gómez y L. Atehortúa, «Producción de biomasa y exopolisacáridos de *Grifola frondosa* bajo cultivo sumergido utilizando fuentes de carbono no convencionales,» *Revista EIA*, n° 7, 2007.
- [20] D. Jaros, J. Köbsch y H. Rohm, «Exopolysaccharides from Basidiomycota: Formation, isolation and techno-functional properties,» *Engineering in life sciences*, 2018.
- [21] L. Fan, A. Thomaz Soccol, A. Pandey y C. R. Soccol, «Effect of nutritional and environmental conditions on the production of exo-polysaccharide of *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation and its antitumor activity,» *LWT*, vol. 40, 2005.
- [22] L. Papinutti, «Effects of nutrients, pH and water potential on exopolysaccharides production by a fungal strain belonging to *Ganoderma lucidum* complex,» *LWT*, 2010.
- [23] A. M. Torres López, J. C. Quintero Díaz y L. Atehortua Garcés, «Efecto de nutrientes sobre la producción de biomasa del hongo medicinal *Ganoderma lucidum*,» *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. 13, n° 1, 2011.
- [24] Q.-H. Fang y J.-J. Zhong, «Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic acid and polysaccharide,» *Biochemical Engineering Journal*, vol. 10, 2002.

- [25] C. A. Zárate-Chaves, M. C. Romero-Rodríguez, F. C. Niño-Arias, J. Robles-Camargo, M. Linares-Linares, M. X. Rodríguez-Bocanegra y I. Gutiérrez-Rojas, «Optimizing a culture medium for biomass and phenolic compounds production using *Ganoderma lucidum*,» *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 44, n° 1, 2013.
- [26] M.-Y. Chang, G.-J. Tsai y J.-Y. Houg, «Optimization of the medium composition for the submerged culture of *Ganoderma lucidum* by Taguchi array design and steepest ascent method,» *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 38, 2006.
- [27] Z.-h. Wei, L. Liu, X.-f. Guo, Y.-j. Li, B.-c. Hou, Q.-l. Fan, K.-x. Wang, Y. Luo y J.-J. Zhong, «Sucrose fed-batch strategy enhanced biomass, polysaccharide, and ganoderic acids production in fermentation of *Ganoderma lucidum* 5.26,» *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2016.
- [28] L.-W. Zhu, J.-J. Zhong y Y.-J. Tang, «Multi-fed batch culture integrated with three-stage light irradiation and multiple additions of copper ions for the hyperproduction of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides by the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*,» *Process Biochemistry*, 2010.
- [29] S. Kim, . H. Hwang, C. Xu, . Y. Na, S. Song y . J. Yun, «Influence of nutritional conditions on the mycelial growth and exopolysaccharide production in *Paecilomyces sinclairii*,» *Letters in Applied Microbiology*, vol. 34, 2002.
- [30] F. d. L. Guadarrama Acosta, «Identificación de esteroides del hongo *Ganoderma applanatum* aislado en casuarina (*Casuarina equisetifolia*),» Universidad Veracruzana, Xalapa, 2008.
- [31] L. M. Agudelo-Escobar, Y. Gutiérrez-López y S. Urrego-Restrepo, «Effects of aeration, agitation and pH on the production of mycelial biomass and exopolysaccharide from the filamentous fungus *Ganoderma lucidum*,» *DYNA*, vol. 84, n° 200, 2017.
- [32] P. Shah y H. Modi, «Optimization of Culture Conditions for Biomass Production of *Ganoderma lucidum*,» *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, vol. 7, n° 02, 2018.