



Vigilada Mineducación

Efecto de aditivos poliméricos en la producción de
Amauroderma omphalodes en cultivo sumergido

Effect of polymeric additives on the production of
Amauroderma omphalodes in submerged culture

Luis Fernando Chávez Bohórquez

Proyecto de grado

Asesor

Jacobo Gallo Machado

Co-asesora

Luz Deisy Marín Palacio

UNIVERSIDAD EAFIT
ESCUELA DE INGENIERÍAS
INGENIERÍA DE PROCESOS
MEDELLÍN

2022

Efecto de aditivos poliméricos en la producción de *Amauroderma omphalodes* en cultivo sumergido

Luis Fernando Chávez Bohórquez^a

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

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

^b Magister en Ingeniería, Asesor del Proyecto de Grado

^c Profesor, Co-asesor del Proyecto de Grado, Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia

Resumen

En este trabajo se evaluó el efecto de la adición de agar y Tween 80 en concentraciones de 0.1 y 0.2 g/L, sobre la morfología, la producción de biomasa y exopolisacáridos (EPS) de *Amauroderma omphalodes* en cultivo sumergido. Se determinó que el Tween 80 presenta mejores resultados en la producción de biomasa y EPS en comparación con el agar. Además, la mejor concentración para el Tween 80 fue de 0.1 g/L con lo que se obtuvo una producción de biomasa de 18.8 ± 0.6 g/L y para los EPS de 607.74 ± 32.61 mg/L, esto equivale a un aumento de producción de biomasa en 11.9% y los EPS en 12.69% en comparación con el cultivo de control, estas producciones fueron medidas por los métodos de gravimetría por peso seco y Dubois, respectivamente. Por otro lado, se realizó un análisis de imagen con el software ImageJ, para determinar la distribución de tamaño de partícula de los pellets, con el cual se obtuvo una reducción del diámetro de los pellets en un 36.59% con el Tween 80 en 0.1 g/L en comparación con el cultivo de control. Finalmente, se confirmó que existe una relación inversamente proporcional entre el tamaño de los pellets y la producción de biomasa y EPS.

1. Introducción

Los hongos tienen un alto valor económico, debido a sus propiedades nutricionales y medicinales. Por lo tanto, algunos de estos son considerados como alimentos funcionales, pues se ha demostrado que pueden ser utilizados en la prevención o tratamiento de enfermedades [1]. *Amauroderma omphalodes* es un basidiomiceto que pertenece a la familia Ganodermataceae, esta familia es utilizada en la medicina oriental tradicional. Además, se ha demostrado que tiene uso medicinal en el tratamiento de cáncer, diabetes y enfermedades cardíacas [2].

En relación a la morfología en cultivo sumergido, esta depende fuertemente de las condiciones ambientales del biorreactor, y afectan a su vez a las propiedades reológicas del caldo de cultivo y, por ende, el desempeño del biorreactor. Por consiguiente, la productividad y el consumo de energía del proceso son funciones de la morfología [3]. Además, a nivel macroscópico, se puede distinguir la forma de crecimiento filamentosos, como lo es el micelio disperso donde las hifas se dispersan libremente en el medio, también está la forma de pellets, donde el micelio se desarrolla de forma esférica agregada, que consiste en redes de hifas muy entrelazadas. De igual forma, se pueden reconocer algunas formas intermedias como floculante o crecimiento granular [4].

Por otra parte, se han realizado diferentes estudios en los cuales se puede evidenciar que la morfología, tiene influencia sobre la producción de biomasa. Por ejemplo, en el caso de *Phellinus vaninii* se reveló que el diámetro medio de la morfología del pellet se correlacionó positivamente con la biomasa ($R^2 = 0.82$) [5]. También, en el caso de *Agaricus blazei* se variaron las fuentes de carbono y nitrógeno, y cuando obtuvieron una mayor compacidad y circularidad en los pellets, se encontraron aumentos significativos en la producción de exopolisacáridos (EPS) y biomasa [6]. Además, se ha reportado en diferentes artículos que se utiliza el diámetro de Feret para medir el tamaño de los pellets, ya que generalmente se utiliza en la caracterización de partículas irregulares, cuyas imágenes se obtienen por microscopía. El diámetro de Feret representa la distancia entre dos

líneas paralelas que son tangentes a la proyección de la partícula [7], por lo cual es una medición pertinente cuando se requiere medir diámetros de pellets.

Por otro lado, los polisacáridos son polímeros con muchas aplicaciones industriales como la alimentaria, cosmética, textil y farmacéutica. Una creciente cantidad de evidencia sugiere que algunos polisacáridos aislados de fuentes microbianas cultivables tienen capacidades antioxidantes y baja citotoxicidad [8]. Estas características son de gran importancia ya que abre la puerta para reemplazar a los antioxidantes sintéticos. Así mismo, para el caso de *A. omphalodes* ya se ha reportado que tiene la capacidad de producir polisacáridos con gran actividad antioxidante contra los radicales libres DPPH y ABTS [9].

Adicionalmente, *A. omphalodes* es un basidiomiceto del cual en el laboratorio de Bioprocesos de la Universidad EAFIT se han llevado a cabo estudios donde se han mejorado el medio de cultivo o sus condiciones para la producción de biomasa [10] y EPS [9]. Sin embargo, no se ha reportado como los aditivos poliméricos afectan su morfología, producción de biomasa y exopolisacáridos. Por otro lado, tener conocimiento de los efectos de la morfología en la producción de biomasa y metabolitos es importante, debido a que como se ha revelado en estudios anteriores la comprensión de los cambios morfológicos de las células en un cultivo, puede ser una estrategia para mejorar la obtención de los metabolitos de interés [11].

El propósito de este trabajo fue evaluar el efecto de la adición de agar y Tween 80 en el medio de cultivo tienen un efecto en la morfología de *A. omphalodes* y, así mismo, sobre la producción de biomasa y EPS. Esta investigación es relevante ya que las mejores condiciones morfológicas pueden ser llevadas al biorreactor para solucionar los problemas de aglomeración que se han presentado, además de realizar un aporte a la literatura sobre *A. omphalodes* ya que su información es escasa.

2. Materiales y métodos

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 de PDA e incubada durante 7 días a 30 °C.

2.2 Preparación del inóculo y cultivo celular

Para la preparación del inóculo se utilizó 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; KH_2PO_4 1; MgSO_4 0.5; vitamina B1 0.05 medio modificado descrito por [12], incubados a 120 rpm y 30°C por 72 horas, con un pH inicial de 5.5. Mientras que, para el cultivo, 5 ml del inóculo serán adicionados a matraces convencionales de 250 ml con 45 ml de medio de cultivo con la siguiente composición en (g/l): KH_2PO_4 1; MgSO_4 0.5; Vitamina B1 0.05; Sacarosa 35; extracto de levadura 7.7 medio descrito por [10]. Los matraces serán incubados a 120 rpm, 30 °C y un pH inicial de 5,5 durante 12 días. Además, se variará la concentración de agar y Tween 80 de 0.1 a 0.2 g/l.

2.3 Determinación de diámetros de pellets

La evaluación de la morfología de los pellets se debe llevar utilizando un microestereoscópico. Se midió su diámetro mediante análisis de imagen empleando el software ImageJ, y para esto se tomaron 4 ml de muestras aleatorias de cada matraz durante los días 4, 8 y 12 para cada uno de los medios de cultivos midiendo aproximadamente 100 pellets.

2.4 Determinación de biomasa

La medición de la biomasa se realizó a través de la técnica de peso seco. Para ello, la muestra fue filtrada al vacío, con previo secado y pesado del papel filtro. Con agua destilada, se hizo la remoción de los restos de

medio presente en el papel filtro. Además, la biomasa húmeda se secó a 60 °C durante 24 horas, hasta garantizar un peso constante.

2.5 Determinación de EPS

Para la determinación y cuantificación de EPS se empleó el método del fenol - ácido sulfúrico [13] para ello se tomaron 0.5 mL del filtrado colectado por muestra y se realizó la precipitación de EPS con adición de 2 mL de etanol al 96%. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 4500 rpm por 20 min. Los componentes insolubles fueron suspendidos en 2 mL de NaOH 1M a 60 °C durante una hora. Una vez finalizado el procedimiento anterior, se aplicó el método del fenol - ácido sulfúrico a las muestras usando una curva de calibración de glucosa con concentraciones entre 10 y 100 mg/L.

2.6 Determinación de consumo de sustrato

Cada muestra de 75 µl del sobrenadante recolectado, se diluyeron en 25 µl de agua. Estos 100 µl fueron empleados para cuantificar el consumo de sustrato usando el método de determinación de sacarosa siguiendo el protocolo del ácido dinitrosalicílico descrito por Miller [14].

3. Resultados y análisis

3.1 Resultados de producción de biomasa

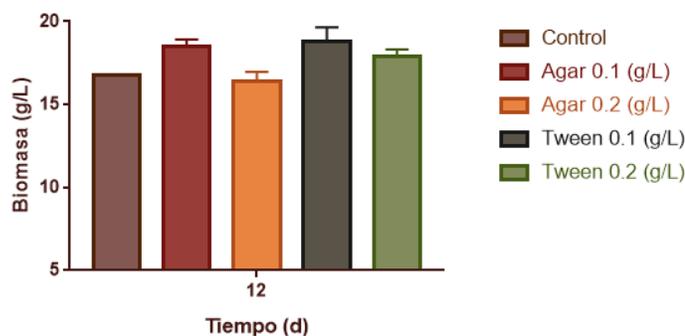


Figura 1. Resultados de la producción de biomasa con respecto a la adición de agar y Tween 80 en el día 12.

En la figura 1 se pueden observar los resultados obtenidos de la producción de biomasa para los cultivos evaluados en el proyecto, de los cuales cabe destacar que la mayor producción de biomasa fue de 18.8 ± 0.6 g/L, en el día 12 con la adición de Tween 80 en una concentración de 0.1 g/L, siendo esta una concentración menor en comparación con el estudio realizado para *Ganoderma lucidum* [15] donde se determinó que la concentración óptima era de 0.25 g/L y se obtuvo una producción de biomasa de 7.24 g/L.

Además, en comparación con el cultivo de control, el Tween 80 en una concentración de 0.1 g/L provocó un aumento de 11.9% en el día 12 en comparación con el cultivo de control, siendo este menor al que se obtuvo en [15] donde el Tween 80 reportó un aumento del 19.76%. Mientras que, en el caso del agar la concentración de 0.1 g/l provocó un aumento del 10.1% en el día 12 en comparación con el cultivo de control, siendo este menor a lo que se encuentra reportado en [16] donde el agar en una concentración 0.1 g/L reportó un aumento del 22.39% para *G. lucidum*.

En relación con la producción de biomasa de *A. omphalodes*, en [10] se evaluó el efecto de la variación de fuentes de carbono y nitrógeno, y se determinó que el mejor medio de cultivo entregaba 18.3 g/L, mientras que en [9] la mayor producción de biomasa a nivel de matraz fue de 14.09 g/L, teniendo en cuenta lo mencionado con anterioridad se puede evidenciar que los resultados obtenidos en el cultivo con Tween 80 en 0.1 g/L ofrece mayores resultados para *A. omphalodes*.

3.2 Resultados de producción de EPS

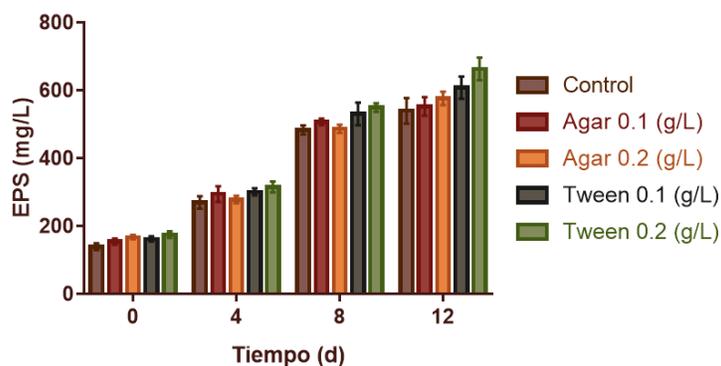


Figura 2. Resultados de producción de EPS con respecto a la adición de agar y Tween 80.

En la figura 2 se puede evidenciar los resultados obtenidos para los EPS en cada medio de cultivo durante diferentes días de la siembra, se puede evidenciar que todos los resultados son mayores que en el cultivo de control. Además, se observa que las EPS tienden a crecer siempre con el paso del tiempo, caso contrario a lo que se reporta en [9] donde las EPS disminuyen después del día 9 y se obtienen 501.03 mg/L siendo esta la mayor concentración durante todo el crecimiento. Por consiguiente, la máxima concentración para cada medio de cultivo es mayor a la reportada en [9] ya que la menor concentración en el día 12 fue la del cultivo de control que reportó 539.36 ± 37.68 mg/L.

En cuanto a los aumentos en exopolisacáridos que son provocados por la adición de Tween 80, en la literatura se han reportado aumentos del 68.18% para la especie de *Cordyceps militaris* [17], mientras que en el caso de *A. omphalodes* se obtuvo el mayor aumento siendo del 22.91% para el Tween 0.2 en el día 12 con una concentración de 662.96 ± 33.04 mg/L en comparación con el cultivo de control. Por otro lado, La adición de agar obtuvo su mayor aumento en una concentración de 0.2 g/L en el día 12 con un resultado de 575.88 ± 19.71 mg/L y obtuvo un aumento del 6.77% con en comparación el cultivo de control.

3.3 Análisis de morfología celular

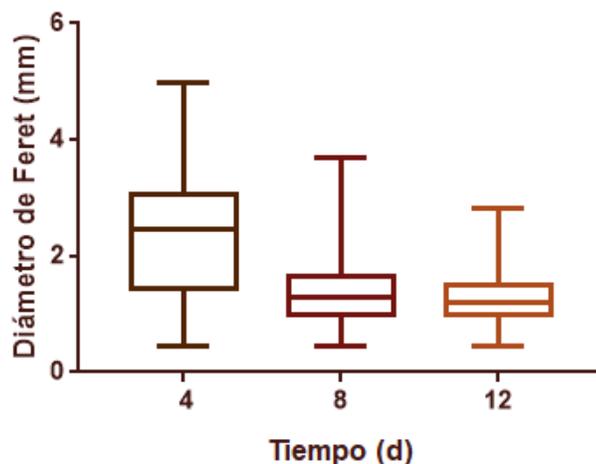


Figura 3. Cinética de la distribución de diámetros del cultivo de control

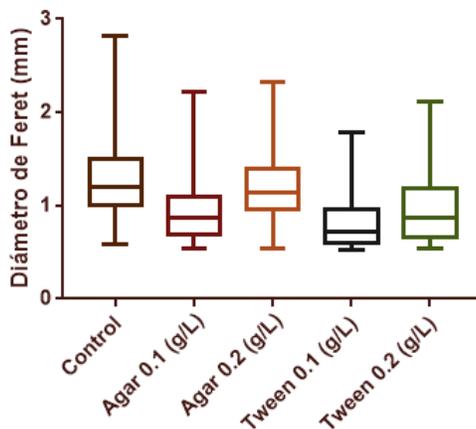


Figura 4. Distribución de diámetros en los cultivos en el día 12 con respecto a la adición de agar y Tween 80

En la figura 3 se puede observar cómo se encuentra distribuido los tamaños de los pellets del cultivo de control, y con la información del Anexo 1 se puede corroborar que en el día 4 el 31% del diámetro de los pellets se encuentra entre 2.0 y 2.8 mm y después esta distribución de tamaño empieza a disminuir con el paso de los días hasta el día 12 donde el 35% encuentra entre 1.0 y 1.3 mm. Entonces, se obtuvo una variación más pequeña que la determinada para *G. lucidum* en [16] ya que allí varió de 2 a 15 mm sin adición de aditivos poliméricos.

Dentro del análisis que se realizó en el Anexo 1, se puede observar la distribución de tamaño de pellets para los cultivos de agar y de Tween 80, y se puede evidenciar que no se presenta una tendencia en el tamaño de los pellets como ocurrió para el cultivo de control. Sin embargo, los diámetros de los pellets están en un intervalo más pequeño durante los 12 días para los cultivos de agar y Tween 80 en comparación con el cultivo de control como se puede observar en la figura 4. Además, se puede identificar que el cultivo de control presenta una mayor distribución de tamaño de pellets que los demás cultivos y presenta los valores más altos cercanos a 3 mm. Por otro lado, se puede afirmar que el Tween 80 tiene una mayor eficiencia en la disminución del tamaño de los pellets ya que su intervalo de distribución es más pequeño que el del agar para ambas concentraciones.

También se puede evidenciar que el Tween 80 en una concentración de 0.1 g/L es el que presenta más reducción de su tamaño, y si se observa el anexo 1 su diámetro promedio en el día 12 logra disminuir en un 36.59% en comparación con el cultivo de control. Similar a la mejor reducción que se obtuvo en [18] donde el tamaño se logró reducir en un 33.33% añadiendo Agar.

3.4 Cinética de cultivo celular con Tween 80 a 0.1 g/L

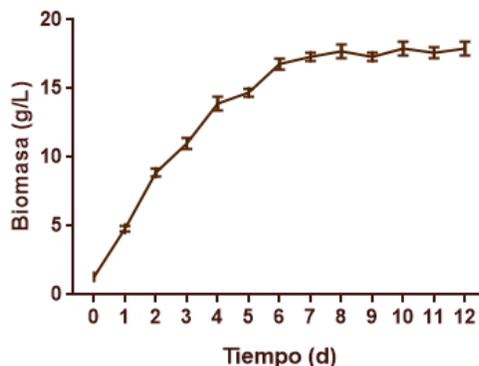


Figura 5. Cinética de crecimiento celular de *A. omphalodes*

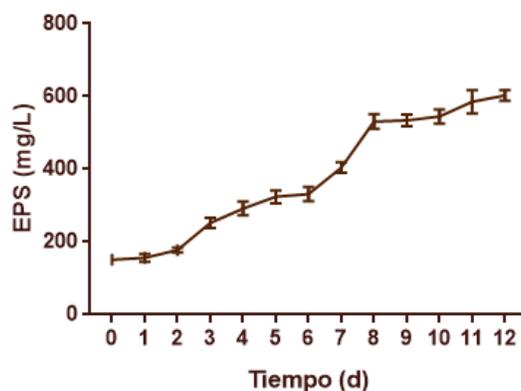


Figura 6. Resultados de cinética de EPS para Tween 0.1

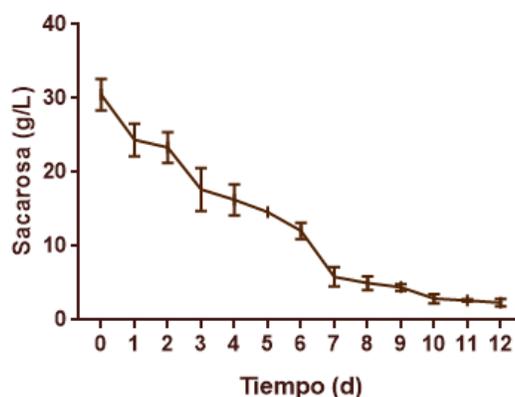


Figura 7. Cinética para el consumo de sacarosa para Tween 0.1

Para comprender mejor el comportamiento del Tween 80 al 0.1 g/L se realizaron mediciones durante 12 días para observar al detalle el comportamiento del cultivo, al observar la figura 5 se identifica que la fase de crecimiento exponencial va hasta el día 7 con una velocidad específica de crecimiento (μ) de 1.82 d^{-1} la cual se aumentó en un 29.07 % en comparación con los reportado en [9]. Además, la mayor producción de biomasa se da en el día 10 con una concentración de $17.9 \pm 0.5 \text{ g/L}$, presentando un aumento del 5.2% en comparación con el cultivo de control y se obtiene un 27% de aumento en comparación por lo reportado en [9].

También, en el caso de los exopolisacáridos según la figura 6 se obtiene su mayor valor en el día 12 con una concentración de $602.96 \pm 10.43 \text{ mg/L}$ lo que es un aumento del 20.34% según lo reportado en [9] y un 11.79% en comparación con lo obtenido por el cultivo de control, presentándose un rendimiento EPS-biomasa (Y_{px}) de 34.11 mg de EPS/ g de biomasa. Sin embargo, estos resultados siguen siendo menores a los de la literatura ya que en [19] se adiciona el Tween 80 a *Schizophyllum commune* y se obtiene un 37.17% de aumento en las EPS en comparación con el cultivo de control.

Por otro lado, al observar la figura 7 se puede evidenciar un 92% de consumo del sustrato durante los 12 días que se evaluaron y los valores mínimos se encuentran entre 2.9 y 2.4 g/L, lo que genera un rendimiento biomasa-sustrato (Y_{xs}) de 1.2 g de biomasa / g de sustrato esto teniendo en cuenta que el medio no está compuesto solo por sacarosa como fuente de carbono sino también por extracto de levadura que también puede proveer carbono y nitrógeno. Mientras, que en [9] el sustrato se consume completamente a partir del día 9 y caso similar se reporta en [19] donde el sustrato es consumido por completo después del día 7.

También, cabe destacar que se atribuye los menores resultados tanto en la producción de biomasa como en la producción de EPS a que en este segundo ensayo la distribución del tamaño de los pellets fue menor que en el primero. Y se ha reportado con anterioridad que cuando se tiene un menor tamaño de pellets se aumentan las producciones de biomasa y EPS [20], además específicamente para *G. lucidum* se determinó que se favoreció la producción con pellets pequeños y compactos [21].

4. Conclusiones

Se determinó que para *A. omphalodes* el aditivo polimérico que más aumenta la producción de biomasa y EPS fue el Tween 80 en una concentración de 0.1 g/L, la biomasa aumentó en un 11.9% y los EPS en un 12.69% en comparación con el cultivo de control. Con respecto a su morfología, se logró reducir su diámetro promedio en un 36% en comparación con el cultivo de control. También, se confirma que existe una relación entre el aumento de producción de biomasa y EPS en función del tamaño de los pellets. Adicionalmente, se determinó que el cultivo celular con la adición de Tween a 0.1 g/L no consume completamente el sustrato en su medio antes del día 12 y presentó una concentración residual de sacarosa de 2.36 g/L. Por otro lado, se evidencia que el agar solo presenta efectos beneficios en una concentración de 0.1 g/L, ya que en comparación con 0.2 g/L se aumenta el tamaño de los pellets y se reduce la producción de biomasa y a su vez de EPS.

5. Tabla de Anexos o Apéndices

Tabla 1. Documentos adicionales incluidos con el proyecto de grado.

Nombre	Desarrollo (propio/terceros)	Tipo de Archivo	Enlace google drive (https://goo.gl/)
Diametros	Propio	Excel	https://docs.google.com/spreadsheets/d/1kmexlq38hDv29Ks2UAqj-r933Zgum4hl/edit?usp=sharing&ouid=100767881645714150581&rtopf=true&sd=true

Referencias

- [1] A. Cano-Estrada and L. Romero-Bautista, "Valor económico, nutricional y medicinal de hongos comestibles silvestres," *Rev. Chil. Nutr.*, vol. 43, no. 1, pp. 75–80, 2016, doi: 10.4067/S0717-75182016000100011.
- [2] D. López-Peña, A. Gutierrez, E. Hernández-Navarro, R. Valenzuela, and M. Esqueda, "Diversidad y distribución de Ganoderma (Polyporales: Ganodermataceae) en Sonora, México," *Bot. Sci.*, vol. 94, no. 2, p. 431, Jun. 2016, doi: 10.17129/botsci.463.
- [3] P. Žnidaršič and A. Pavko, "The Morphology of Filamentous Fungi in Submerged Cultivations as a Bioprocess Parameter," *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 39, no. 3, pp. 237–252, 2001.
- [4] J. Moore and M. E. Bushell, "The effect of morphology and oxygen uptake on penicillin production by *Aspergillus nidulans* in submerged culture," *Mycol. Res.*, vol. 101, no. 10, pp. 1237–1241, Oct. 1997, doi: 10.1017/S0953756297003882.
- [5] H. Wei, L. Shuai, Z. Yuexin, X. Deng, and X. Chunping, "Mycelial fermentation characteristics and antiproliferative activity of *Phellinus vaninii* Ljup," *Pharmacogn. Mag.*, vol. 10, no. 40, pp. 430–434, Oct. 2014, doi: 10.4103/0973-1296.141812.
- [6] A. Hamedi, F. Ghanati, and H. Vahidi, "Study on the effects of different culture conditions on the morphology of *Agaricus blazei* and the relationship between morphology and biomass or EPS production," *Ann. Microbiol. 2011 622*, vol. 62, no. 2, pp. 699–707, Jul. 2011, doi: 10.1007/S13213-011-0309-3.
- [7] R. L. Roselló Valera, I. P. Pérez Morales, and C. A. Recarey Morfa, "Caracterización y evaluación sistémica de empaquetamientos de partículas como conjuntos iniciales para simulaciones con elementos discretos," *Rev. Cuba. Ing.*, vol. 8, no. 2, pp. 35–46, 2017, [Online]. Available:

[https://rci.cujae.edu.cu/index.php/rci/article/download/637/pdf#:~:text=El diámetro de Feret%2C al,partícula \(figura 2 b.](https://rci.cujae.edu.cu/index.php/rci/article/download/637/pdf#:~:text=El diámetro de Feret%2C al,partícula (figura 2 b.)

- [8] M. J. Armoa-Rojas, "Produccion De Exopolisacaridos a Partir De Bacterias Acido Lacticas Utilizando Tusa De Maiz Como Fuente De Carbono," p. 197, 2020.
- [9] J. Gallo-machado and L. D. Marín-palacio, "Efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción y actividad biológica de exopolisacáridos de Amauroderma omphalodes en cultivo sumergido," EAFIT.
- [10] M. Palacio Duque and L. M. Ramírez Villa, "Efecto de macronutrientes en la producción de biomasa de Amauroderma omphalodes en cultivo sumergido," EAFIT, 2020.
- [11] S. Gallego Giraldo, G. Adriana García Giraldo, L. Deisy Marín Palacio, and C. Giraldo Estrada, "Obtención de biomasa y exopolisacáridos de *Humphreya coffeata* en cultivo sumergido," EAFIT, Medellín, 2009.
- [12] A. NR *et al.*, "Pellet diameter of *Ganoderma lucidum* in a repeated-batch fermentation for the trio total production of biomass-exopolysaccharide-endopolysaccharide and its anti-oral cancer beta-glucan response," *AIMS Microbiol.*, vol. 6, no. 4, pp. 379–400, 2020, doi: 10.3934/MICROBIOL.2020023.
- [13] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith, "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances," *Anal. Chem.*, vol. 28, no. 3, pp. 350–356, 1956, doi: 10.1021/ac60111a017.
- [14] G. L. Miller, "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar," *Anal. Chem.*, vol. 31, no. 3, pp. 426–428, 1959, doi: 10.1021/ac60147a030.
- [15] X. Yang, Y. Yang, Y. Zhang, J. He, and Y. Xie, "Enhanced exopolysaccharide production in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* by Tween 80 supplementation," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 44, no. 1, pp. 47–56, 2021, doi: 10.1007/s00449-020-02418-1.
- [16] F. C. Yang, M. J. Yang, and S. H. Cheng, "A novel method to enhance the mycelia production of *Ganoderma lucidum* in submerged cultures by polymer additives and agitation strategies," *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, vol. 40, no. 2, pp. 148–154, 2009, doi: 10.1016/j.jtice.2008.09.003.
- [17] J. D. Cui and Y. N. Zhang, "Evaluation of metal ions and surfactants effect on cell growth and exopolysaccharide production in two-stage submerged culture of *cordyceps militaris*," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 168, no. 6, pp. 1394–1404, 2012, doi: 10.1007/s12010-012-9865-7.
- [18] R. Okumura, Y. Nakamura, C. Sasaki, and C. Asada, "Effects of Tween series and agar additives on mycelia biomass and β -glucan production by *Herichium erinaceus* in submerged culture," *Biomass Convers. Biorefinery*, 2021, doi: 10.1007/s13399-021-01342-y.
- [19] Q. Meng *et al.*, "Effect of surfactants on the production of polysaccharides from *Schizophyllum commune* through submerged fermentation," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 192, pp. 201–218, 2021.
- [20] K. P. Singh, P. P. Wangikar, and S. Jadhav, "Correlation between pellet morphology and glycopeptide antibiotic balhimycin production by *Amycolatopsis balhimycina* DSM 5908," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 39, no. 1, pp. 27–35, 2012, doi: 10.1007/s10295-011-0995-7.
- [21] N. R. Abdullah *et al.*, "Pellet diameter of *ganoderma lucidum* in a repeated-batch fermentation for the trio total production of biomass-exopolysaccharide-endopolysaccharide and its anti-oral cancer beta-glucan response," *AIMS Microbiol.*, vol. 6, no. 4, pp. 379–400, 2020, doi: 10.3934/microbiol.2020023.