

**Universidad Católica de Santa María**

**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y  
Biotecnológicas**

**Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica**



**Determinación de parámetros fermentativos en medio líquido para la  
producción de Exopolisacáridos (EPS) por *Ganoderma lucidum*.**

Tesis presentada por las Bachilleres:

**Heredia Rondon, Ornella Almendra**

**ORCID: 0009-0000-6517-5264**

**Zarate Pareja, Karoline Maribel**

**ORCID: 0009-0004-5946-9791**

para optar el Título Profesional de Ingeniera Biotecnóloga

Asesor:

**Mgter. Tejada Meza, Kevin**

**ORCID: 0000-0002-9716-7821**

**Arequipa – Perú**

**2025**

UCSM-ERP

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**

**INGENIERIA BIOTECNOLOGICA**

**TITULACIÓN CON TESIS**

**DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR**

Arequipa, 12 de Noviembre del 2024

**Dictamen: 012050-C-EPIB-2024**

Visto el borrador del expediente 012050, presentado por:

**2019201662 - HEREDIA RONDON ORNELLA ALMENDRA**

**2018101282 - ZARATE PAREJA KAROLINE MARIBEL**

Titulado:

**DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FERMENTATIVOS EN MEDIO LÍQUIDO PARA LA  
PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS (EPS) POR GANODERMA LUCIDUM.**

Nuestro dictamen es:

**APROBADO**

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

**INGENIERO BIOTECNOLOGO**

**42098888 - CORDOVA BARRIOS CINTHIA CAROL  
DICTAMINADOR**



**44810251 - TERAN HILARES RULY  
DICTAMINADOR**



**45945764 - YUGRA CONDORI MONICA MEYLIN  
DICTAMINADOR**



# Determinación de parámetros fermentativos en medio líquido para la producción de Exopolisacáridos (EPS) por *Ganoderma lucidum*.

## INFORME DE ORIGINALIDAD

19%

INDICE DE SIMILITUD

18%

FUENTES DE INTERNET

6%

PUBLICACIONES

9%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	3%
2	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	1%
3	<a href="http://repositorio.uncp.edu.pe">repositorio.uncp.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
4	<a href="http://repositorio.unal.edu.co">repositorio.unal.edu.co</a> Fuente de Internet	1%
5	<a href="http://revistas.utadeo.edu.co">revistas.utadeo.edu.co</a> Fuente de Internet	1%
6	Submitted to Consorcio CIXUG Trabajo del estudiante	1%
7	Submitted to ITESM: Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey Trabajo del estudiante	1%
8	<a href="http://riaa.uaem.mx">riaa.uaem.mx</a>	

*Dedicatoria*

*A mis padres, Maribel y Arturo que con esfuerzo lograron brindarme mi carrera. Gracias por siempre creer en mí y apoyarme en todo momento.*

***Karoline Zarate Pareja***



*A Dios. A papá, mamá y mamá Doris*

*(1 Timoteo 1:17)*

***Ornella Heredia Rondon***

### *Agradecimientos*

Agradezco a mi mamá Maribel por su paciencia y perseverancia, a mi papá Arturo, por la compañía y sus consejos; porque están orgullosos de mí. Ambos me han dado su apoyo y amor incondicional, pero sobre todo gracias por creer en mí.

A mis maestros de mi E.P Ingeniería Biotecnológica, en especial a la Dra. Terán, por sus conocimientos, consejos y porque el tiempo en laboratorio se pasaba volando con ella. Al Ing. Kevin Tejada que no dudó en apoyar nuestro tema y brindar sus consejos para que esta tesis sea una realidad y al Dr. Ruly Terán porque me inspiró a seguir el ámbito de investigación especialmente el área de agroindustrial y bioprocesos.

Al laboratorio de bioprocesos, cada uno de sus miembros, gracias por las risas, los buenos momentos y la buena música que acompañaba de fondo.

A mis tilinas, que estuvieron toda mi carrera siendo un apoyo académico como también se convirtieron en mis íntimas, gracias por hacer la universidad una época memorable. A Isabel, gracias por la paciencia y el amor.

A la P y la 3 de octubre, que fueron mis fieles compañeras de cuatro ruedas para poder llegar a la universidad. Al Xin-Hua, por ser una guarida donde podíamos reunirnos a conversar, comer y reír, olvidarnos de toda preocupación en la hora de almuerzo.

Y a todos aquellos que en mi carrera me desearon lo mejor. Sí se pudo.

*Karoline Zarate Pareja*

A mis padres. A Juan Pablo por incentivar mi curiosidad y ser un ejemplo de esfuerzo y dedicación constante. A Yuliana por ser mi mejor amiga en los momentos más difíciles, por enseñarme desde pequeña a ser siempre esforzada y soñar en grande, por quererme incondicionalmente. A ambos, por luchar por darme una buena educación y cariño.

A todos los maestros de la E.P de Ingeniería Biotecnológica. Al ingeniero Kevin, excelente maestro y asesor, gracias por todo el acompañamiento y los consejos. Al doctor Ruly por ser también un gran guía, expandir nuestro panorama en el mundo de la investigación y, sobre todo, abrirnos las puertas del Laboratorio de Bioprocesos que se convirtió en la mejor compañía, incluso en momentos de caos y desasosiego, que me permitió conocer a personas tan maravillosas, inteligentes y trabajadoras.

Al Xin-Hua, por ser testigo de victorias y una que otra derrota a lo largo de este recorrido. Por volverme adicta al chifa también.

A las tilinas y a cada persona que soportó mis quejas y lágrimas, que me brindó risas descontroladas en medio de la incertidumbre, por estar en este proceso de seis años. Valió la pena.

*Ornella Heredia Rondon*

## RESUMEN

*Ganoderma lucidum* es un hongo valorado por sus diversas propiedades inmunomoduladoras, antioxidantes y antitumorales, con aplicaciones en las industrias farmacéutica y alimentaria. En esta investigación, se evaluaron los efectos de diferentes condiciones de cultivo, como la concentración de glucosa y extracto de levadura, pH, temperatura y velocidad de agitación, sobre la producción de biomasa y EPS, además, se aplicó un diseño experimental Box-Behnken con los tres factores más influyentes.

El estudio fue realizado mediante fermentación sumergida, ajustando las variables del medio de cultivo para influir en el crecimiento del hongo y la síntesis de EPS. Las muestras obtenidas fueron caracterizadas usando espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Los resultados mostraron que la mayor producción de EPS se obtuvo con concentraciones intermedias de glucosa y extracto de levadura, un pH ligeramente ácido (5-6), y una temperatura de 28°C. En cambio, para la biomasa, fue más beneficiosa una concentración mayor de glucosa (50 g/L). La velocidad de agitación a 150 rpm fue la óptima para la producción de EPS sin afectar significativamente la producción de biomasa. Estos datos sugieren que las condiciones de cultivo pueden ser ajustadas para optimizar la producción de EPS, lo cual es valioso para su uso industrial.

Este estudio ha permitido determinar las condiciones ideales de cultivo para la generación de exopolisacáridos (EPS) y biomasa de *Ganoderma lucidum*. Los hallazgos logrados amplían el entendimiento de la biología de este hongo y ofrecen un fundamento sólido para futuros estudios orientados a la creación de nuevos productos y usos basados en los EPS de *Ganoderma lucidum*.

**Palabras clave:** Exopolisacáridos, Fermentación sumergida, *Ganoderma lucidum*, MSR

## ABSTRACT

*Ganoderma lucidum* is a fungus valued for its diverse immunomodulatory, antioxidant and antitumor properties, with applications in the pharmaceutical and food industries. In this research, the effects of different culture conditions, such as glucose and yeast extract concentration, pH, temperature and stirring speed, on biomass and EPS production were evaluated, and a Box-Behnken experimental design with the three most influential factors was applied.

The study was carried out by submerged fermentation, adjusting the variables of the culture medium to influence fungal growth and EPS synthesis. The obtained samples were characterized using Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and high-performance liquid chromatography (HPLC).

The results showed that the highest EPS production was obtained with intermediate concentrations of glucose and yeast extract, a slightly acidic pH (5-6), and a temperature of 28°C. In contrast, for biomass, a higher concentration of glucose (50 g/L) was more beneficial. Stirring speed at 150 rpm was optimal for EPS production without significantly affecting biomass production. These data suggest that culture conditions can be adjusted to optimize EPS production, which is valuable for industrial use.

This study has allowed us to determine the ideal culture conditions for the generation of exopolysaccharides (EPS) and biomass of *Ganoderma lucidum*. The findings achieved broaden the understanding of the biology of this fungus and provide a solid foundation for future studies aimed at the creation of new products and uses based on the EPS of *Ganoderma lucidum*.

**Keywords:** Exopolysaccharides, *Ganoderma lucidum*, Submerged fermentation, RSM

## ÍNDICE GENERAL

**DEDICATORIA**

**AGRADECIMIENTOS**

**RESUMEN**

**ABSTRACT**

**INTRODUCCIÓN** ..... 1

**HIPÓTESIS**..... 3

**OBJETIVO GENERAL**..... 4

OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... 4

TABLA DE VARIABLES E INDICADORES ..... 5

**CAPÍTULO I** ..... 6

**1.MARCO TEÓRICO**..... 6

**1.1. GANODERMA LUCIDUM**..... 6

1.1.1. Hábitat ..... 7

1.1.2. Taxonomía ..... 7

1.1.3. Características y composición ..... 8

1.1.4. Usos e importancia ..... 9

1.1.5. Importancia en el sector industrial..... 10

**1.2. EXOPOLISACÁRIDOS** ..... 11

1.2.1. Ruta metabólica ..... 12

1.2.2. Composición..... 13

1.2.3. Propiedades..... 15

1.2.4. Microorganismos que producen EPS ..... 16

1.2.5.	Función biológica del EPS en el hongo.....	18
1.2.6.	Técnicas de caracterización del EPS .....	18
<b>1.3.</b>	<b>PARÁMETROS FERMENTATIVOS .....</b>	<b>20</b>
1.3.1.	Influencia de la glucosa y extracto de levadura.....	20
1.3.2.	Influencia de las sales .....	20
1.3.3.	Condiciones ambientales .....	20
<b>1.4.</b>	<b>DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>20</b>
1.4.1.	Metodología de Superficie de respuesta.....	20
<b>CAPÍTULO II.....</b>		<b>22</b>
<b>2.MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>		<b>22</b>
2.1.	LUGAR DE EJECUCIÓN .....	22
2.2.	MATERIALES.....	22
2.2.1.	Material biológico .....	22
2.2.2.	Reactivos químicos.....	22
2.2.3.	Materiales de laboratorio .....	22
2.2.4.	Aparatos y equipos .....	23
2.2.5.	Software.....	23
2.3.	MÉTODOS.....	24
2.3.1.	Preparación del inóculo .....	24
2.3.2.	Condiciones de cultivo .....	24
2.3.3.	Producción de exopolisacáridos y determinación de la cinética de crecimiento .....	26
2.3.4.	Maximización de la producción de biomasa y EPS con Superficie de Respuesta .....	27
2.3.5.	Caracterización del EPS .....	28

2.3.6. Análisis estadístico .....	29
2.3.7 Diagrama de flujo de actividades. ....	30
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>31</b>
<b>3.RESULTADOS Y DISCUSIONES .....</b>	<b>31</b>
3.1. Establecimiento de condiciones de cultivo .....	31
3.2. Curva de crecimiento.....	38
3.3. Consumo de glucosa.....	36
3.4. Maximización de la producción de biomasa y EPS .....	38
3.4.1. FTIR .....	48
3.4.2. Hidrólisis ácida para HPLC.....	51
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>53</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>54</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>65</b>

## Índice de tablas

Tabla 1. Variables e indicadores.....	5
Tabla 2. Resumen de principales microorganismos productores de EPS.....	16
Tabla 3. Resumen de condiciones de cultivo .....	24
Tabla 4. Ensayos propuestos por diseño experimental Box-Benhken.....	38
Tabla 5. Análisis de varianza (ANOVA) de los factores evaluados en la etapa de optimización de componentes del medio de cultivo para producción de Biomasa.....	39
Tabla 6. Análisis de varianza (ANOVA) de los factores evaluados en la etapa de optimización de componentes del medio de cultivo para producción de EPS .....	40
Tabla 7. Condiciones óptimas para producción de Biomasa y EPS en la optimización numérica de DE .....	47
Tabla 8. Resultados experimentales de la optimización de variables.....	48
Tabla 9. Regiones con mayor umbral en FTIR. Adaptado de (90) .....	49
Tabla 10. Análisis de Varianza de la producción de biomasa en función de la concentración inicial de glucosa.....	71
Tabla 11. Agrupación de las medias para determinación de significancia de la concentración inicial de glucosa sobre la producción de biomasa .....	71
Tabla 12. Análisis de Varianza de la producción de EPS en función de la concentración inicial de glucosa .....	72
Tabla 13. Agrupación de las medias para determinación de significancia de la concentración inicial de glucosa sobre la producción de EPS.....	72
Tabla 14. Análisis de Varianza de la producción de biomasa en función de la concentración inicial de extracto de levadura.....	73
Tabla 15. Agrupación de las medias para determinación de significancia de la concentración inicial de extracto de levadura sobre la producción de biomasa.....	73
Tabla 16. Análisis de varianza para la producción de EPS en función de la concentración inicial de extracto de levadura (g/L) .....	74
Tabla 17. Agrupación de las medias para determinación de significancia de la concentración inicial de extracto de levadura sobre la producción de EPS .....	74
Tabla 18. Análisis de varianza de la producción de biomasa en función de la velocidad de agitación.....	75
Tabla 19. Agrupación de las medias para determinación de significancia de la velocidad de agitación sobre la producción de EPS.....	75

Tabla 20. Análisis de Varianza de la producción de EPS en función de la velocidad de agitación. ....	75
Tabla 21. Agrupación de las medias para determinación de significancia de la velocidad de agitación sobre la producción de EPS.....	76
Tabla 22. Análisis de varianza de la producción de biomasa en función de la Temperatura.....	77
Tabla 23. Agrupación de las medias para determinación de significancia de la temperatura sobre la producción de Biomasa.....	78
Tabla 24. Análisis de varianza para la producción de EPS en función de la Temperatura .....	78
Tabla 25. Agrupación de las medias para determinación de significancia de la temperatura sobre la producción de Biomasa.....	79
Tabla 26. Análisis de la varianza para la producción de biomasa en función del pH....	79
Tabla 27. Agrupación de las medias para determinación de significancia de la temperatura sobre la producción de Biomasa.....	80
Tabla 28. Análisis de varianza para la producción de EPS en función de pH.....	80
Tabla 29. Agrupación de las medias para determinación de significancia de la temperatura sobre la producción de EPS.....	80

## Índice de Figuras

Figura 1. Especies representativas de <i>Ganoderma</i> . Adaptado de (10).....	7
Figura 2. Biosíntesis de glucosa hasta la obtención de EPS (*Se suele considerar no solo a Transportadores ABC, sino también flipasas, permeasas entre otros). Adaptado de (35) .....	13
Figura 3. Estructuras químicas de los EPS, incluidos homopolisacáridos [por ejemplo, curdlan (a)]; heteropolisacáridos [por ejemplo, xantano (b)]; polisacáridos lineales [por ejemplo, pululano (c)]; y exopolisacáridos ramificados [por ejemplo, EPS de <i>Lactobacillus plantarum</i> (d)] (37). .....	14
Figura 4. Estructura de EPS encontrados en <i>G.lucidum</i> . a) Estructura cíclica de proyección Haworth; b) Estructura de conformación de silla c) Estructura tridimensional ver McMurry (38).....	15
Figura 5. Proceso de producción de EPS por <i>Ganoderma lucidum</i> : a) Inóculo inicial, b) Preparación del medio; c) Incubación. ....	25
Figura 6. Equipo (HPLC) utilizado para el análisis de azúcar .....	26
Figura 7. a) Determinación de la biomasa en pirotines de aluminio y b) precipitación de exopolisacáridos en etanol al 96%.....	26
Figura 8. a) Preparación de la muestra y b) Análisis de humedad de biomasa .....	27
Figura 9. Equipo de FT-IR; a) prensador; b) KBr y c) accesorios. ....	28
Figura 10. Hidrólisis ácida del EPS para análisis en HPLC.....	29
Figura 11. Diagrama de flujo de actividades.....	30
Figura 12. a) Producción de EPS y biomasa respecto a la concentración de glucosa en g/L, b) Producción de EPS y biomasa respecto a la concentración de extracto de levadura en g/L, c) Producción de EPS y biomasa respecto a la Temperatura en °C, d) Producción de EPS y biomasa respecto a pH, e) Producción de EPS y biomasa respecto a Velocidad de agitación (rpm).....	34
Figura 13. Curva de crecimiento de <i>G. lucidum</i> . Consumo de glucosa, producción de Biomasa y de producto (EPS) en función de tiempo.....	35
<b>Figura 14.</b> Consumo de glucosa determinado por HPLC en función de la concentración inicial de glucosa (a); concentración inicial de extracto de levadura (b); pH inicial (c); Temperatura (d); y velocidad de agitación (e).....	37
Figura 15. Representación de las interacciones respecto a la producción de Biomasa, a) Evaluación de residuos respecto a la normalidad, b) Residuos vs valores predichos	

respecto a homocedasticidad, c) Predicción de las corridas vs Corridas actuales evaluando independencia d) Resultados predichos vs actuales .....	42
Figura 16. Representación de las interacciones respecto a la producción de EPS, a) Evaluación de residuos respecto a la normalidad, b) Residuos vs valores predichos respecto a homocedasticidad, c) Predicción de las corridas vs Corridas actuales evaluando independencia d) Resultados predichos vs actuales .....	43
Figura 17. Interacción [Glucosa] y [Extracto de levadura]. Donde: a) Superficie de respuesta del efecto de la interacción de los factores sobre la concentración de Biomasa y b) Superficie de respuesta del efecto de la interacción de los factores sobre la concentración de EPS. ....	45
Figura 18. Interacción [Glucosa] y pH. Donde a) Superficie de respuesta del efecto de la interacción de los factores sobre la concentración de Biomasa y b) Superficie de respuesta del efecto de la interacción de los factores sobre la concentración de EPS. ....	46
Figura 19. Interacción [Extracto de levadura] y pH. Donde a) Superficie de respuesta del efecto de la interacción de los factores sobre la concentración de Biomasa y b) Superficie de respuesta del efecto de la interacción de los factores sobre la concentración de EPS. ....	47
Figura 20. Resultados FTIR de la muestra de EPS .....	50
Figura 21. a) Estándares de celobiosa, glucosa y xilosa y b) Muestra de EPS hidrolizada con HCl 10M en HPLC .....	52
Figura 22. Prueba de normalidad de la concentración de Glucosa (g/L) .....	65
Figura 23. Prueba de normalidad de la concentración de extracto de levadura (g/L) ....	65
Figura 24. Prueba de normalidad de la Velocidad de agitación .....	66
Figura 25. Prueba de normalidad de Temperatura (°C) .....	66
Figura 26. Prueba de normalidad de pH.....	66
Figura 27. Gráfica de homocedasticidad de la producción de EPS en función de la concentración de Glucosa (g/L).....	67
Figura 28. Gráfica de homocedasticidad de la producción de biomasa en función de la concentración de Glucosa (g/L).....	67
Figura 29. Gráfica de homocedasticidad de la producción de biomasa en función de la concentración de extracto de levadura (g/L) .....	68
Figura 30. Gráfica de homocedasticidad de la producción de EPS en función de la concentración de extracto de levadura (g/L) .....	68

Figura 31. Gráfica de homocedasticidad de la producción de biomasa en función de la Velocidad de agitación .....	68
Figura 32. Gráfica de homocedasticidad de la producción de EPS en función de la Velocidad de agitación .....	69
Figura 33. Gráfica de homocedasticidad de la producción de biomasa en función de la Temperatura.....	69
Figura 34. Gráfica de homocedasticidad de la producción de EPS en función de la Temperatura.....	69
Figura 35. Gráfica de homocedasticidad de la producción de biomasa en función del pH .....	70
Figura 36. Gráfica de homocedasticidad de la producción de EPS en función del pH..	70
Figura 37. Gráfica de intervalos de la concentración de biomasa en función de la concentración inicial de glucosa.....	71
Figura 38. Gráfica de intervalos de la concentración de EPS en función de la concentración inicial de glucosa.....	72
Figura 39. Gráfica de intervalos de la producción de biomasa en función de la concentración inicial de extracto de levadura.....	73
Figura 40. Gráfica de intervalos de la producción de EPS en función de la concentración inicial de extracto de levadura .....	74
Figura 41. Gráfica de intervalos de la producción de biomasa en función de la velocidad de agitación.....	75
Figura 42. Gráfica de intervalos de la producción de EPS en función de la velocidad de agitación .....	76
Figura 43. Prueba de normalidad de Temperatura (°C) .....	77
Figura 44. Gráfica de intervalos de la producción de biomasa en función de la temperatura .....	77
Figura 45. Gráfica de intervalos de la producción de EPS en función de la temperatura .....	78
Figura 46. Gráfica de intervalos de la producción de Biomasa en función del pH.....	79
Figura 47. Gráfica de intervalos de la producción de EPS en función del pH .....	80
Figura 48. Consumo de glucosa determinado por HPLC en función de la concentración inicial de glucosa (a y b); concentración inicial de extracto de levadura (c y d); pH inicial (e y f); Temperatura (g y h); y velocidad de agitación (i y j) .....	82

### Abreviaturas

**DBB** – Diseño Box Behnken

**DE** – Design expert

**EPS** – Exopolisacáridos

**FTIR** – Espectroscopia infrarrojo por transformada de Fourier

**HPLC** - Cromatografía líquida de alta eficiencia

**IRMS** – Espectrometría de masas de relación de isótopos

**GLP** - Glucolípidos

**GLT** – Glucanos

**GLS** – Gen de la 1,3 B-glucano sintasa

**KBr** – Bromuro de potasio

**MRB** – Modificadores de respuesta biológica

**nm** – Nanómetros

**PUFA** – Ácidos grasos poli – insaturados

**Qp** – Productividad

**RSM** – Metodología de superficie de respuesta

**TNF** – Factor de necrosis tumoral

**UDP** – Uridina Difosfato

**UTP** – Uridina Trifosfato

**$r_s$**  – Velocidad de consumo de sustrato

**$\mu$**  - Tasa de crecimiento microbiana

**$Y_{x/s}$**  - Rendimiento de Biomasa por Sustrato

**$Y_{p/s}$**  - Rendimiento de Producto por Sustrato

## INTRODUCCIÓN

*Ganoderma lucidum*, conocido comúnmente como "Reishi" o "Lingzhi", es un hongo basidiomiceto ampliamente reconocido por sus propiedades medicinales y nutricionales que crece en áreas cálidas y húmedas de Europa y, principalmente, Asia. Desde hace más de 5 mil años, culturas asiáticas lo conocen como "el hongo de la inmortalidad" y su uso ha pasado de generación en generación por la creencia del aumento de vitalidad y rejuvenecimiento con el consumo de este alimento. Así, su valor en la industria farmacéutica y alimentaria ha generado un interés creciente en su cultivo y producción a gran escala en los últimos años (1,2).

Por un lado, la demanda de biomasa y del cuerpo fructificado de *G.lucidum* y otras especies al ser empleada como materia prima para su fructificación en industria alimentaria, así como en la obtención de diferentes metabolitos secundarios como terpenos, ácido ganodérico, polisacáridos, entre otros que posteriormente se sintetizan en la producción de suplementos alimenticios y, recientemente, en la fabricación de productos para el cuidado de la piel (3). En este contexto, la biotecnología ha permitido el desarrollo de sustratos sólidos sostenibles de cultivos y biorreactores de fermentación sumergida para maximizar la producción de esta biomasa.

Sin embargo, unos de los componentes de mayor interés son los exopolisacáridos (EPS) que son macromoléculas con múltiples propiedades inmunomoduladoras, antitumorales, antiviral, antifúngica, antioxidantes y neuroprotectora, que han demostrado efectos benéficos en la salud humana. Uno de los EPS más representativo es el betaglucano, compuesto de D-glucosa y tiene propiedades anticancerígenas, antipatógenas, etc. (1,2,4).

El presente estudio se centra en el desarrollo de un medio de cultivo optimizado para la fermentación sumergida de *Ganoderma lucidum* con el objetivo de incrementar la producción de EPS y maximizar la producción de biomasa del hongo a través de la modificación de diversas condiciones del cultivo. Para lograrlo, se llevaron a cabo ajustes en factores críticos como la concentración de glucosa, la concentración de extracto de levadura, el pH inicial del medio, la temperatura de incubación y la velocidad de agitación.

La optimización de estas condiciones es esencial, ya que influyen de manera directa en el crecimiento y metabolismo del hongo, así como en la producción y composición de los EPS. La modificación de estos factores proporciona una herramienta poderosa para manipular y mejorar los rendimientos de ambos productos de interés (5).

Así mismo, en esta investigación, se optó por la utilización de la Metodología de la Superficie de Respuesta, una técnica estadística reconocida por su eficiencia en la exploración de múltiples variables independientes y sus interacciones (6). El uso de esta técnica permite visualizar y examinar las conexiones intrincadas entre las variables y las reacciones del sistema. La superficie de respuesta ofrece una ilustración visual de las relaciones entre las variables, facilitando la identificación de óptimos y áreas de interés de forma precisa e intuitiva. (7).

La aplicación del diseño experimental Box-Behnken se presenta como una estrategia efectiva para abordar el desarrollo de las condiciones de cultivo de *Ganoderma lucidum*. Este enfoque estadístico brinda una herramienta poderosa para analizar y cuantificar el impacto de las variables de interés, así como para determinar las configuraciones óptimas que maximicen la producción de EPS y biomasa (8).

Al utilizar este método, el objetivo no es solo conseguir resultados fiables y repetibles, sino también sentar fundamentos para investigaciones futuras en el área de la micología y microbiología aplicada. Además, posibilita disminuir la cantidad de experimentos requeridos, mejorando de esta manera el uso de recursos y tiempo, sin afectar la calidad de los resultados logrados (6,7). Así, el diseño experimental se transforma en un componente esencial en la creación de saber científico, además aporta considerablemente al progreso de la investigación en esta área.

Así, el objetivo principal de la investigación es determinar los parámetros de fermentación sumergida de *Ganoderma lucidum* para obtener una mayor cantidad de biomasa y de EPS, así como la caracterización cualitativa de los productos obtenidos por medio de las técnicas de FTIR y HPLC.

## HIPÓTESIS

Investigaciones previas han demostrado la producción significativa de EPS de *Ganoderma lucidum* mediante fermentación sumergida, por lo cual se espera que la aplicación de la metodología de superficie de respuesta permita mejorar las condiciones de cultivo (pH, temperatura, velocidad de agitación) y de la composición del medio (concentración de glucosa y de extracto de levadura), para optimizar la producción de biomasa y de EPS.



## OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción de EPS por *Ganoderma lucidum* por fermentación sumergida empleando el método de Superficie de Respuesta para obtener una mayor cantidad de biomasa y de EPS, así como la caracterización de este.

### Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de las variables: concentración de glucosa, extracto de levadura, pH, Temperatura y velocidad de agitación, sobre la producción de EPS y biomasa por *Ganoderma lucidum* en matraces Erlenmeyer.
- Optimizar la producción de EPS por *Ganoderma lucidum* utilizando la metodología de Superficie de Respuesta tipo Box-Behnken considerando la concentración de glucosa, extracto de levadura y pH inicial del medio como variables de estudio.
- Caracterizar los EPS obtenidos en condiciones optimizadas mediante las técnicas de espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés).

**TABLA DE VARIABLES E INDICADORES**

**Tabla 1.** Variables e indicadores

Variables	Variable	Indicadores	Unidades
Independientes	Concentración de fuente de carbono	Concentración inicial de glucosa	g/L
	Concentración de fuente de nitrógeno	Concentración inicial de extracto de levadura	g/L
	Velocidad de agitación	Velocidad de agitación durante el proceso	Rpm
	pH	pH inicial del proceso	-
	Temperatura	Temperatura durante el proceso	°C
Dependientes	Biomasa	Concentración de biomasa	g/L
	Exopolisacáridos	Concentración de Exopolisacáridos	g/L
	Consumo de sustrato	Concentración de glucosa durante el proceso	g/L

## CAPÍTULO I

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1. *Ganoderma lucidum*

*Ganoderma lucidum*, también llamado lingzhi chino y apodado el "hongo de la inmortalidad", ha sido una de las especies más empleadas en las poblaciones asiáticas a lo largo de los siglos para potenciar el bienestar general como complemento en tratamientos contra el cáncer y otros propósitos medicinales. Inicialmente, su uso fue exclusivo a aquellos con recursos económicos elevados, sin embargo, el cultivo y consumo de este alimento se ha expandido entre diversos estratos socioeconómicos en la actualidad (9).

Este basidiomiceto es grande, y de textura leñosa. La raíz latina "*Lucidum*", que significa brillante, se ha relacionado con el aspecto brillante del exterior de estos hongos, lo mismo que lo hace llamativo visualmente (9). La estructura de *G. lucidum* suele ser en forma de abanico, de riñón o semicircular, y suele presentar un color rojo oscuro, marrón o negro rojizos. Las tonalidades amarillas u ocres se acentúan en los bordes, mientras la carne del hongo suele ser de color marrón amarillento a marrón oscuro (9).

Existen más de 250 especies de *Ganoderma*, 6 especies se encuentran entre las más utilizadas: *G. lucidum*, *G. applanatum*, *G. sinense*, *G. tsugae*, *G. capense* y *G. boninense* (Figura 1) (10).

El futuro de la investigación en *G. lucidum* es prometedor y multifacético, abriendo nuevas vías para el desarrollo de terapias innovadoras y sostenibles. A través de la nanotecnología, se vislumbra la creación de formulaciones que optimicen la disponibilidad de sus compuestos bioactivos, mientras que la combinación con otros agentes terapéuticos podría potenciar sus efectos sinérgicamente. Asimismo, la exploración de los mecanismos moleculares subyacentes, como la interacción con el microbioma intestinal y las vías de señalización celular, prometen desvelar nuevos blancos terapéuticos (11).

Las aplicaciones clínicas se expandirán hacia enfermedades neurodegenerativas, trastornos del estado de ánimo y el envejecimiento saludable, posicionando al *Reishi* como un complemento prometedor en la medicina personalizada. Además, el cultivo

sostenible y la biotecnología garantizarán un suministro constante de este hongo medicinal, mientras que la estandarización de los productos y la educación del consumidor serán fundamentales para su uso seguro y eficaz. La colaboración interdisciplinaria y los estudios epidemiológicos a largo plazo serán cruciales para consolidar el papel del *Ganoderma lucidum* en la promoción de la salud y el bienestar (11).



**Figura 1.** Especies representativas de *Ganoderma*. Adaptado de (10).

### 1.1.1 Hábitat

Este hongo, al ser multiporoso y saprofito, generalmente se encuentra en climas templados y tropicales. Crece de manera natural en madera muerta o en descomposición de árboles caducifolios, como robles, arces y álamos. También se ha encontrado en coníferas en algunas regiones. Prefiere ambientes húmedos y sombreados, típicos de los bosques densos y antiguos (12).

### 1.1.2 Taxonomía

**Reino:** Fungi

**División:** Basidiomycota

**Clase:** Agaricomycetes

**Orden:** Polyporales

**Familia:** Ganodermataceae

**Género:** Ganoderma

**Especie:** *Ganoderma lucidum* (12)

### 1.1.3 Características y composición

Al desarrollarse en árboles dañados o muertos de climas cálidos, *G. lucidum* desarrolla una apariencia única y distintiva (13).

Este hongo presenta una coloración variable, desde tonos claros en los márgenes hasta matices más oscuros hacia el centro, pasando por gamas ocres y rojizas. Su forma es irregular, con dimensiones que oscilan entre 2 – 20 cm de diámetro y un grosor de 4 a 8 cm (13).

La superficie superior, a menudo recubierta por esporas, contrasta con la inferior, porosa y de color claro, que se oscurece al manipularse. El estípite, cuando está presente, es excéntrico y de coloración variable, tendiendo a oscurecer con la edad. En estado fresco, la textura es suave y ligeramente correosa, endureciéndose al secarse y generalmente se encuentra compuesto por carbohidratos en un porcentaje de 44,5, seguido por las proteínas con 15,75%, ceniza 4% (13). Por otro lado, el hongo se encuentra compuesto en un 90% de agua y 10% de materia seca, misma que se encuentra conformada de 27-48% de proteína, aproximadamente 60% carbohidratos (especialmente fibra dietética) y de 2-8% lípidos (donde se destaca el ácido linolénico, ácidos grasos poliinsaturados o PUFAs por sus siglas en inglés); en caso de que el hongo sea cultivado in vitro, su cantidad de lípidos puede incrementar a 6,5% siendo más del 80% ácidos grasos insaturados y en menor cantidad ácidos grasos saturados (14).

Entre los compuestos bioactivos más destacados que se encuentran presentes en *G. lucidum* son los terpenoides como ácidos ganodéricos y triterpenoides (15), y polisacáridos como los  $\beta$ -glucanos que conforman aproximadamente el 46% de la pared celular del hongo. Además de los compuestos bioactivos, se pueden identificar compuestos químicos con actividad antioxidante como polifenoles (16).

Por otro lado, tenemos a la biomasa del *Ganoderma lucidum*, la cual representa la estructura física del hongo y constituye una fábrica bioquímica donde se sintetizan y acumulan una amplia variedad de compuestos bioactivos, entre los que destacan los

polisacáridos y triterpenos. Esta biomasa es vital para la producción de los compuestos de interés farmacológico debido a sus propiedades medicinales, como efectos inmunomoduladores, antioxidantes y antiinflamatorios (17).

#### ***1.1.4 Usos e importancia***

##### ***1.1.1.1. Uso nutricional***

*Ganoderma lucidum* es reconocido por su perfil nutricional, lo que lo hace un complemento perfecto para una alimentación balanceada. Su estructura, abundante en fibra y proteínas de gran valor biológico, le otorga características ventajosas para la salud del sistema digestivo y el sistema inmunológico (18).

En relación con su aporte de carbohidratos, estos están mayoritariamente compuestos por fibra alimentaria, vital para regular el tránsito intestinal y evitar el estreñimiento. La fibra funciona como un prebiótico, fomentando la proliferación de bacterias útiles en el intestino y aportando a una flora intestinal sana (18).

Las proteínas son el segundo compuesto más presente en el cuerpo fructífero del hongo (27-48%), siendo mayoritariamente formadas por aminoácidos esenciales. Adicionalmente, se ha comprobado que algunas glicoproteínas presentes en *G. lucidum* tienen características antifúngicas y antivirales, resaltando su capacidad para luchar contra infecciones por virus como el herpes (16).

##### ***1.1.1.2. Uso para salud humana***

*G. lucidum* se ha empleado a lo largo de los siglos en la medicina tradicional oriental para curar una extensa gama de enfermedades, incluyendo el cáncer. Investigaciones científicas recientes han corroborado las características anticancerígenas de este hongo, revelando los procesos moleculares que respaldan su función (19).

Los triterpenoides, componentes bioactivos encontrados en *G. lucidum*, provocan la apoptosis o la muerte programada de células malignas, restringiendo así su crecimiento. Adicionalmente, estos compuestos bloquean la angiogénesis, es decir, la creación de nuevos vasos sanguíneos que alimentan a los tumores, privándolos de los nutrientes esenciales para su desarrollo (20).

En cambio, los polisacáridos, otro tipo de compuestos bioactivos presentes en *G. lucidum*, regulan la respuesta del sistema inmunológico del cuerpo, fomentando la actividad de células inmunológicas como los macrófagos y las células T citotóxicas. Estas células tienen la habilidad de identificar y aniquilar células malignas, favoreciendo de esta manera la erradicación del cáncer (20).

De esta manera, este hongo ha ganado popularidad en la prevención de la obesidad, reducción del colesterol, recuperar la sensibilidad a la insulina, control de la diabetes, entre otros beneficios para la salud debido a las propiedades de su biomasa y de sus exopolisacáridos. Actualmente, es consumido como nutracéutico y el crecimiento exponencial de su uso subraya la necesidad de una identificación precisa de las especies y los ingredientes activos, así como el establecimiento de dosis seguras y estándares de calidad para satisfacer la creciente demanda nutracéutica (21) (22).

### ***1.1.5 Importancia en el sector industrial***

*G. lucidum* ha probado ser un recurso valioso para el sector alimentario y farmacéutico, dado que puede ayudar a potenciar la salud y el bienestar de los seres humanos. Para asegurar la calidad y seguridad de los productos obtenidos de *G. lucidum*, es esencial definir estándares internacionales que controlen su fabricación y venta. Estas reglas no solo resguardan a los consumidores, sino que también impulsan el desarrollo sostenible de este sector y fomentan la colaboración a escala mundial (23).

*G. lucidum* ha probado poseer un gran potencial tanto en el mercado como en la industria. China resalta como el principal productor global de *G. lucidum*, seguido por Japón y Corea del Sur, naciones con una industria considerable de *Ganoderma* por su alta demanda, llegando a las 1500 y 4500 toneladas anuales de producción, respectivamente (24).

En la actualidad, se está impulsando el crecimiento balanceado de toda la cadena de valor de *G. lucidum*, desde el cultivo y la producción hasta el procesamiento, la venta y el flujo. El uso de métodos innovadores de control de calidad, como la espectrometría de masas de relación de isótopos (IRMS), facilita la caracterización del *G. lucidum* en función de su especie, zona de procedencia y técnica de cultivo. Es vital para luchar

contra el etiquetado engañoso de productos de *G. lucidum* y apoyar a las entidades reguladoras en la verificación de las reclamaciones originarias (25).

El sector de bienes como el té, las bebidas alcohólicas y los suplementos nutricionales ha llegado a valores multimillonarios, fomentando la necesidad de nuevos componentes funcionales. El proceso de normalización en la identificación y estudio de los componentes activos funcionales del *G. lucidum*, tales como los glucolípidos (GLP) y los glucanos (GLTs), ha cobrado una relevancia creciente. El incremento en la confiabilidad y excelencia de los productos de *G. lucidum* está fomentando la necesidad de normalización en el sector, lo que consecuentemente producirá beneficios competitivos y ampliará las oportunidades de mercado (26).

### **1.2. Exopolisacáridos**

Los exopolisacáridos (EPS) son biomoléculas complejas y versátiles producidas por una amplia variedad de microorganismos en respuesta a condiciones ambientales cambiantes. Estos polímeros de alto peso molecular (de  $10^3$  -  $10^6$  Da) exhiben una gran diversidad estructural, lo que confiere a cada EPS sus propiedades únicas y funcionales. La mayoría son  $\beta$ -glucanos con algunas cadenas laterales de residuos monosacáridos. Muchas bioactividades de los EPS son el resultado de su estructura tridimensional, una conformación helicoidal. Son hidrosolubles pero insolubles en alcohol, por lo que usualmente el proceso de aislamiento de los EPS, normalmente, implica su extracción con agua y su precipitación con alcohol (27).

Debido a sus características fisicoquímicas, los EPS han encontrado numerosas aplicaciones en diversos sectores industriales. Por ejemplo, se utilizan como espesantes, estabilizantes y agentes gelificantes en la industria alimentaria; sus propiedades como biomateriales y en el desarrollo de fármacos se están explorando en biomedicina; y en la industria cosmética son valorados por sus propiedades hidratantes y formadoras de películas (28).

### 1.2.1. Ruta metabólica:

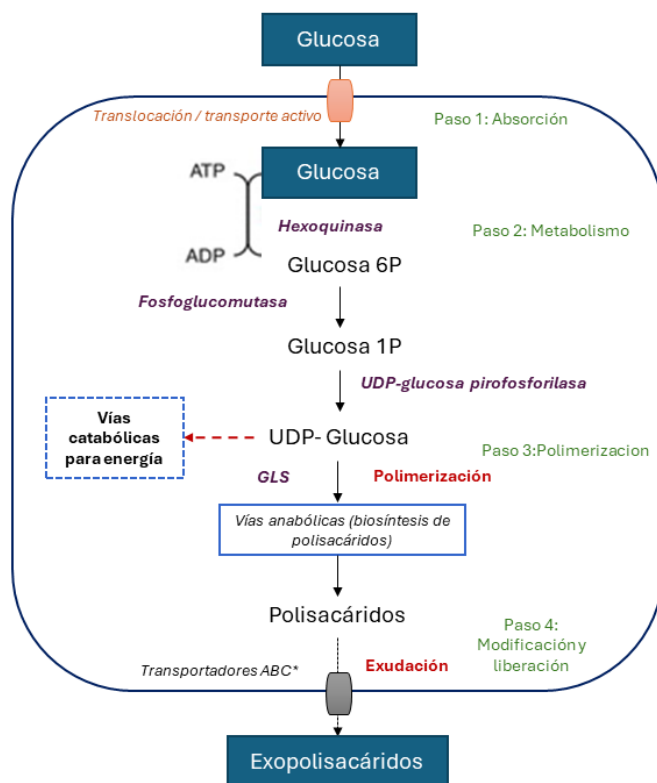
El proceso metabólico de los EPS puede abarcar diversas fases, que incluyen la activación de los precursores (principalmente glucosa), la extensión de la cadena de polímero y la alteración posterior para crear la estructura específica (29)(30).

Por lo general, la producción de betaglucanos requiere la participación de enzimas determinadas, como las glucosiltransferasas y glucanasas, las cuales catalizan la conexión de moléculas de glucosa para crear las cadenas de betaglucano (31).

Estas enzimas actúan sobre los sustratos presentes en la célula del microorganismo, generalmente se trata de UDP-glucosa (uridina difosfato glucosa), como es el caso del  $\beta$ -D-Glucano generado por *Levilactobacillus brevis* (32) (33).

En *G. lucidum*, la biosíntesis de los polisacáridos se inicia con la transformación de la glucosa en glucosa-6-fosfato por acción de una hexoquinasa y la glucosa-6-fosfato en glucosa-1-fosfato, una reacción catalizada por la fosfoglucomutasa. Esta última se fusiona con uridina trifosfato (UTP) debido al efecto de la UDP-glucosa pirofosforilasa, generando UDP-glucosa. Este nucleótido glucosídico actúa como sustrato para la  $\beta$ -1,3 glucano sintasa, la enzima encargada de catalizar la polimerización de las unidades de UDP-glucosa en cadenas  $\beta$ -1,3-glucano, constituyendo el esqueleto fundamental de los polisacáridos generados por este hongo (Figura 2). La  $\beta$ -1,3-GLS realiza el proceso de transmisión de glucosa desde el donante UDP glucosa hasta la cadena de glucano en expansión mediante enlaces  $\beta$ -1,3-glicosídicos. Esta es una enzima esencial en la biosíntesis de polisacáridos (34).

Una vez sintetizados, los exopolisacáridos experimentan una serie de cambios enzimáticos, tales como la acilación, acetilación, sulfatación y metilación, que modifican sus características físicas y químicas. Estas modificaciones les facilitan realizar tareas concretas tanto dentro como fuera de la célula. Luego, estos polisacáridos alterados se llevan a la superficie de la célula a través de la acción de proteínas transportadoras como las flipasas, las permeasas y los transportadores ABC. Finalmente, son extruidos al entorno, creando estructuras como cápsulas o estratos de limo, debido a la acción coordinada de varias proteínas y procesos celulares. Estos cambios y procedimientos de transporte son esenciales para establecer las propiedades y funciones de los exopolisacáridos en los microorganismos (35).



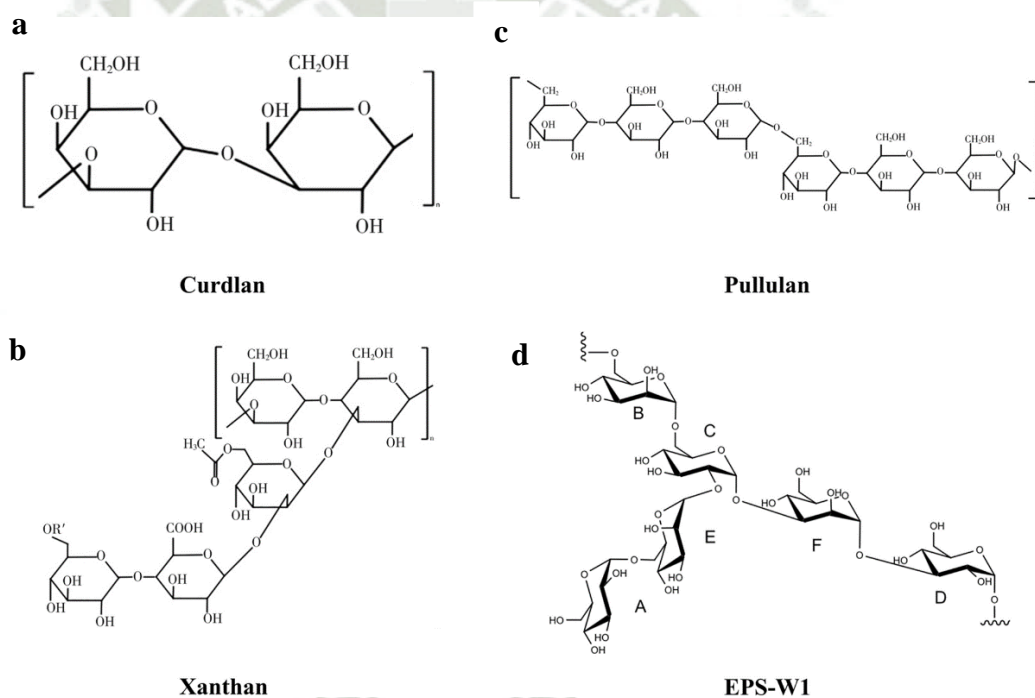
**Figura 2.** Biosíntesis de glucosa hasta la obtención de EPS (\*Se suele considerar no solo a Transportadores ABC, sino también flipasas, permeasas entre otros). Adaptado de (35)

### 1.2.2. Composición

Los EPS también forman parte de un conjunto significativo de atributos fisiológicamente activos, y generalmente se les conoce como modificadores de la respuesta biológica (MRB). Hoy en día, el análisis de la estructura y la bioactividad de los  $\beta$ -D-glucanos se enfoca en su actividad en la MRB. Dentro de las características estructurales más destacadas se incluyen las composiciones de monosacáridos, la presencia de enlaces glicosídicos, las estructuras de cadenas principales y ramificadas, además de los tipos y cantidades de reemplazos. Los enlaces glicosídicos de la cadena principal pueden ser de un solo tipo o una mezcla de  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) glucano,  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) glucano, manano y galactosano, con  $\alpha$ ,  $\beta$ -glucanos u otros enlaces (36).

Las cadenas principales de los EPS consisten principalmente en  $\beta$ -D-Glcp y algunos  $\alpha$ -D-Galp, y tendrá actividad antioxidante si la cadena lateral tiene  $\beta$ -D-Glcp, y tendrá actividad inmunomoduladora si la cadena lateral tiene  $\alpha$ -L-Fucp (36).

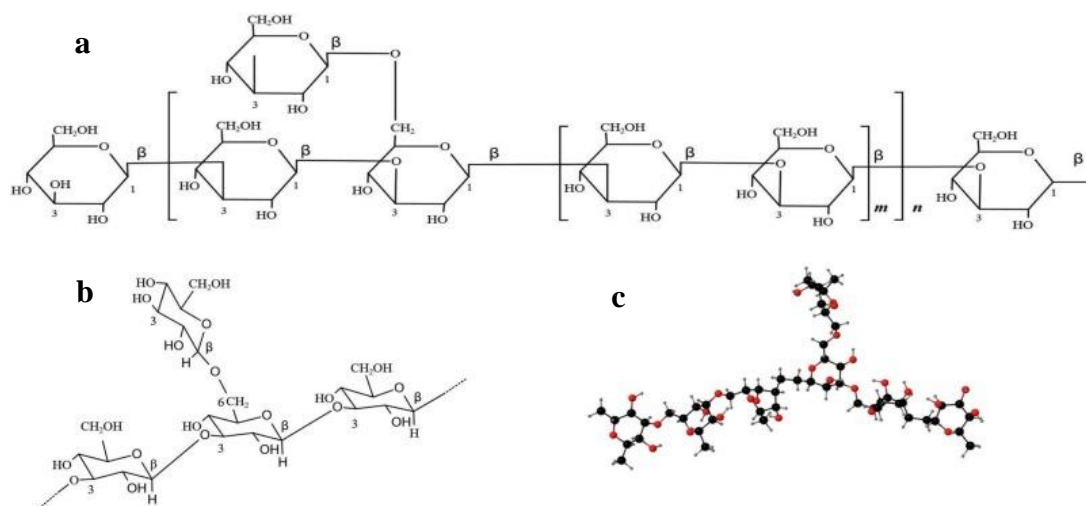
Los EPS exhiben una notable variedad estructural, lo cual se manifiesta en sus distintas formas de secreción y composición. Es posible que generen cápsulas adheridas a la pared celular o que sean liberadas al medio como sustancias de viscosidad. Respecto a su composición, pueden clasificarse como homopolisacáridos, compuestos por un solo tipo de monosacárido (como el curdlan), o heteropolisacáridos, compuestos por una diversidad de monosacáridos. Estos últimos pueden incluir azúcares comunes (glucosa, galactosa, fructosa) y otros más raros (ramnosa, xilosa, fucosa, manosa), así como ácidos urónicos y aminoazúcares. Además, en función de su estructura, los EPS pueden ser lineales (como el pululano) o ramificados como es el caso de *G. lucidum*. En la Figura 3, podemos observar ejemplos de cada tipo de estructura (37).



**Figura 3.** Estructuras químicas de los EPS, incluidos homopolisacáridos [por ejemplo, curdlan (a)]; heteropolisacáridos [por ejemplo, xantano (b)]; polisacáridos lineales [por ejemplo, pululano (c)]; y exopolisacáridos ramificados [por ejemplo, EPS de *Lactobacillus plantarum* (d)] (37).

En cuanto a la estructura de los polisacáridos identificados en el *G. lucidum*, se observa una columna vertebral de residuos de D-glucopiranosilo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-vinculados, con ramificaciones de cadenas laterales de mono-, di- y oligosacáridos (Figura 4). Los estudios indican que el grado de sustitución de la cadena principal y la longitud de las

cadena ramificadas son factores clave para determinar las actividades biológicas de los  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucanos. Estos hallazgos resaltan la importancia de comprender la estructura detallada de los EPS para aprovechar sus propiedades antioxidantes, antitumorales e inmunomoduladores en aplicaciones biotecnológicas (36).



**Figura 4.** Estructura de EPS encontrados en *G.lucidum*. a) Estructura cíclica de proyección Haworth; b) Estructura de conformación de silla c) Estructura tridimensional de McMurry (38)

### 1.2.3. Propiedades

Los EPS pueden tener una procedencia bacteriana o fúngica, además han sido categorizados acorde a su función como (i) constructivas o estructurales, (ii) de sorción, (iii) superficiales, (iv) activas, (v) informativas, (vi) redox-activas, y (vii) nutritivas (39).

Estos juegan un rol crucial en el desarrollo y la estabilización de biopelículas. Respecto a sus características biológicas, las visiones acerca de los EPS hacen referencia a aplicaciones como antitrombóticos, anticoagulantes, inmunomoduladores, anticancerígenos y biofloculantes (39).

En general, los EPS están muy bien considerados para aplicaciones en los sectores de salud, tecnología e industria alimentaria. Debido a la diversidad de cepas bacterianas que producen EPS, existen grandes variaciones moleculares, así como en la complejidad del mecanismo por el que se producen los cambios físicos y los efectos bioactivos. (40).

Por su parte, los EPS son ideales para la industria de la alimentación debido a sus excelentes características emulsionantes, sobrepasando a los comerciales. Esto lo hace adecuado para su uso en productos alimenticios que requieren emulsiones estables, como aderezos y salsas; así como actividades antioxidantes, que pueden proteger los alimentos del daño oxidativo. Esta característica resulta ventajosa para incrementar la durabilidad y la calidad nutricional de los alimentos (41).

Asimismo, posee propiedades favorables como menor viscosidad, mayor solubilidad, y fuerte absorción de humedad comparado al quitosano y la urea, lo que lo convierte en un candidato prometedor para diversas aplicaciones en las industrias alimentaria y cosmética (42).

Estos hallazgos resaltan la importancia de comprender la estructura detallada de los EPS para aprovechar sus propiedades antioxidantes e inmunomoduladoras en aplicaciones biotecnológicas (36).

#### 1.2.4. *Microorganismos que producen EPS*

**Tabla 2.** Resumen de principales microorganismos productores de EPS.

Microorganismo	Propiedad del EPS	Bibliografía
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Beneficios para la salud, incluyendo efectos antioxidantes, protección contra úlceras, propiedades antitumorales y capacidad para modular el sistema inmunológico. La función inmunomoduladora de estos EPS se atribuye principalmente a su capacidad para estimular la producción de citoquinas como IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ y TNF, lo que a su vez favorece el proceso de fagocitosis	(43)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Las películas hechas de pululano exhiben excelentes propiedades mecánicas, incluyendo resistencia y elasticidad. La adición de componentes como la goma xantana y el glicerol mejora aún más estas propiedades, haciendo que las películas sean	(44)

---

	más duraderas y flexibles, además estas no son tóxicas las cuales las haría ideales para conservación en la industria alimentaria.	
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Ventajas significativas para promover el crecimiento de las plantas, controlar enfermedades y plagas, y proporcionar una alternativa estable y natural para aplicaciones agrícolas. Estos beneficios contribuyen a prácticas agrícolas más sustentables y mejores rendimientos de los cultivos.	(45)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Proporcionan beneficios metabólicos al mejorar el metabolismo de la glucosa, mantener el equilibrio energético, producir ácidos grasos beneficiosos de cadena corta, alterar el microbiota intestinal y potencialmente prevenir enfermedades relacionadas con el estilo de vida. Estos hallazgos subrayan la importancia de los componentes dietéticos en la promoción de la salud y la prevención de trastornos metabólicos.	(46)
<i>Pleurotus sapidus</i>	Prevención de la formación de coágulos sanguíneos, lo cual es crucial para la salud cardiovascular, mejora los perfiles lipídicos hepáticos, demostró propiedades antitumorales significativas. Prometedores para futuras investigaciones y posibles aplicaciones terapéuticas en medicina.	(47)

---

### **1.2.5. Función biológica del EPS en el hongo**

Los exopolisacáridos cumplen una serie de funciones, la mayoría relacionadas con la protección. Una matriz de material polimérico extracelular protege a los microorganismos de los antimicrobianos, de condiciones de aridez, estrés osmótico, fagocitosis, cambios de pH extremos y algunos agentes químicos, como los metales pesados (48) (49).

Los materiales exopoliméricos tienen las siguientes propiedades útiles: adhesión, agregación, actividad aglutinante, cohesión, aceptor o donante de electrones, energía y fuente de nutrientes, actividad enzimática, exportación de componentes celulares, barrera protectora, retención de agua, sorción y transmisión de información genética (48).

Los polisacáridos extracelulares juegan un papel importante para resistir la toxicidad de los metales pesados y mantener la estabilidad de las membranas celulares. Los componentes poliméricos extracelulares de hongos pueden quelar metales peligrosos (por ejemplo, Pb, Zn y Cu). La hematites podría ser hidrolizada por el hongo *T. guizhouense* y convertirse en minerales secundarios, también las hifas fúngicas se consideran redox-activas y alteran el estado redox local del Fe (48).

En entornos anaerobios, los EPS desempeñan un papel multifuncional como biopolímero. Cuando los EPS forman una capa viscosa alrededor de las células, generan una barrera física que resguarda a los microorganismos de las variaciones del entorno y promueve la retención de agua. Adicionalmente, la estructura porosa de los EPS facilita la dispersión de nutrientes y metabolitos, promoviendo el desarrollo y la supervivencia del hongo en situaciones de escasez de oxígeno (50).

Por otro lado, la utilización de campos eléctricos pulsados impacta en la generación de EPS al incrementar la permeabilidad celular, modificar el peso molecular y estimular los procesos metabólicos, todo ello manteniendo la viabilidad celular (51).

### **1.2.6. Técnicas de caracterización del EPS**

#### **1.2.6.1. FT-IR**

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés) es una técnica espectroscópica de análisis que emplea una sección del espectro

electromagnético, específicamente, longitudes de onda entre 4000 a  $400\text{ cm}^{-1}$ . Esta área corresponde al “Infrarrojo Medio”, por lo que la técnica también es conocida por este nombre (52).

Este espectro proporciona datos útiles acerca de la composición monomérica, además de detectar la existencia de grupos funcionales particulares en el EPS, como los grupos carboxilo e hidroxilo. Estos grupos son relevantes dado que se consideran que aportan a la capacidad de retención de agua (WHC) del polisacárido, una característica relevante para sus posibles usos (52).

Además, la FTIR posibilita la comparación de muestras desconocidas con estándares, lo que simplifica la detección de los exopolisacáridos (53).

### **1.2.6.2.HPLC**

La cromatografía líquida de alta eficiencia es un método analítico esencial que facilita la separación y análisis de una extensa gama de compuestos en combinaciones complejas. Su adaptabilidad la ha hecho una herramienta esencial en varias industrias, desde la farmacéutica hasta la investigación en el ámbito forense (54).

Este procedimiento se fundamenta en el principio de interacción diferencial entre los analitos y una fase estacionaria, a la vez que son arrastrados por una fase móvil. La fase estacionaria, usualmente una columna encapsulada con partículas de sílice alteradas químicamente funciona como una barrera selectiva, captando los componentes de la muestra basándose en sus características fisicoquímicas. La fase móvil, que puede ser un líquido orgánico o acuoso, lleva la muestra a través de la columna y simplifica la eliminación de los analitos (55).

Para esta metodología, es necesario hidrolizar la muestra, ya que es esencial para la composición monosacárida de los exopolisacáridos. Al romper los enlaces glicosídicos a través de un proceso ácido, se liberan los monosacáridos componentes, lo que facilita su análisis futuro. Es crucial identificar y medir estos monosacáridos para entender las características y el potencial de uso de los exopolisacáridos en diferentes áreas. (56).

### ***1.3. Parámetros fermentativos***

#### ***1.3.1. Influencia de la glucosa y extracto de levadura***

De acuerdo con investigaciones previas, las fuentes de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas son las más influyentes tanto el desarrollo de micelio de *G. lucidum* como de la fermentación. Tienen influencia directa en el peso molecular de los EPS (57)

Es importante señalar que la utilización de glucosa como fuente es distinta a la referencia a otro monosacárido, dado que los efectos y características de los EPS futuros se verán modificados, por ejemplo, si se **emplea Xilosa, se podría lograr una correlación negativa en la producción.** (57).

#### ***1.3.2. Influencia de las sales***

El crecimiento del micelio y la producción de EPS se vieron inhibidos en los medios suplementados con fosfatos de sodio, sugiriendo que estos iones no son adecuados para la fermentación sumergida de *G. lucidum* (58).

Tal como muestra Feng et al (57) en su estudio, logró una producción de polisacáridos de 1.98 g/L teniendo como sal fosfato monopotásico con una concentración de 3 g/L, la cual proporcionó las condiciones ideales para la síntesis de polisacáridos intracelulares, lo que lo convierte en la fuente de fósforo más adecuada para este cultivo.

#### ***1.3.3. Condiciones ambientales***

Las condiciones normales estudiadas para la fermentación sumergida de *G. lucidum* son el pH, la velocidad de agitación y la temperatura, definiendo por ejemplo una temperatura cálida (de 26 a 30°C) (59). Sin embargo, es necesario tener en cuenta el clima del lugar de origen de la cepa y considerar alguna variación evolutiva en contraposición a las cepas de origen asiático y si tiene algún efecto en su crecimiento a nivel laboratorio.

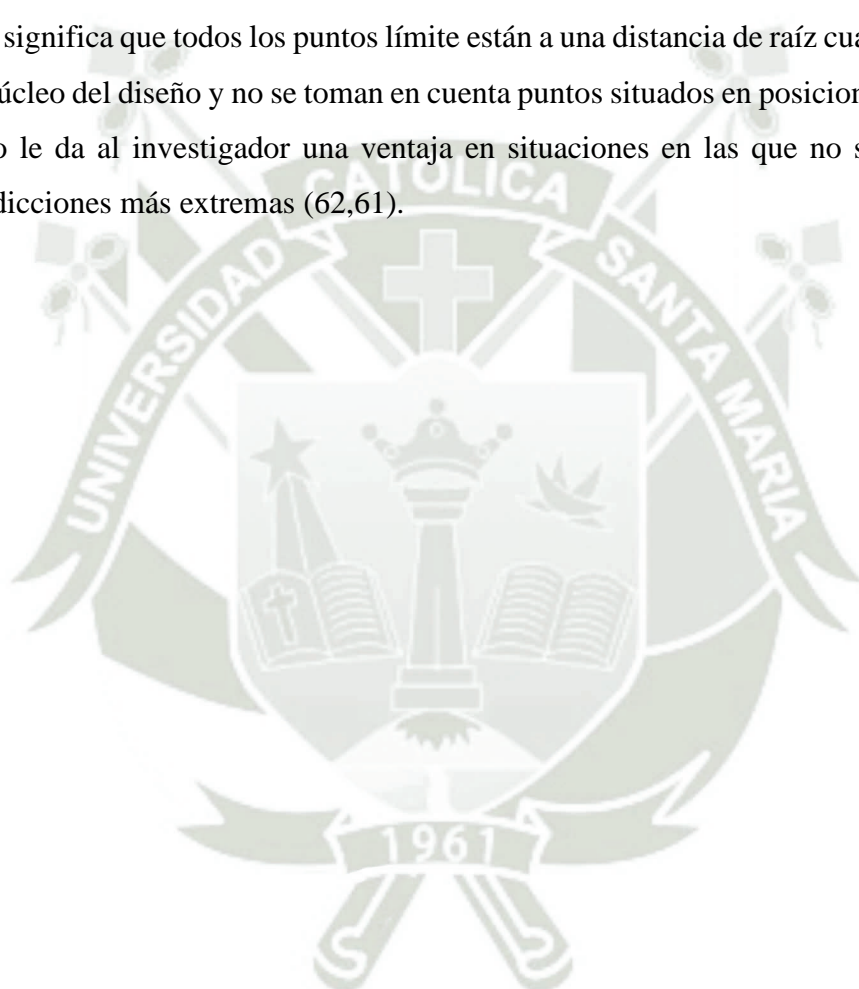
### ***1.4. Diseño experimental***

#### ***1.4.1. Metodología de Superficie de respuesta***

La Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) es un grupo de métodos estadísticos diseñados para entender y optimizar los procesos, al examinar la manera en que diversas variables independientes (factores) afectan una o varias variables de respuesta. La MSR

se fundamenta en una metodología secuencial experimental. Conforme recolectamos más información, mejoramos nuestro modelo y elaboramos experimentos más concretos para investigar las áreas más alentadoras del espacio de diseño. Este procedimiento iterativo nos facilita aproximarnos progresivamente a la mezcla ideal de factores que maximiza (o reduce) nuestra respuesta de interés (60,61).

El principal beneficio del Diseño de Box Behnken es que ofrece la cantidad adecuada de perfiles para evaluar la capacidad de ajuste y posee una estructura de diseño esférica, lo que significa que todos los puntos límite están a una distancia de raíz cuadrada de 2 desde el núcleo del diseño y no se toman en cuenta puntos situados en posiciones más distantes. Esto le da al investigador una ventaja en situaciones en las que no se consideran las predicciones más extremas (62,61).



## CAPÍTULO II

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1. Lugar de ejecución

Los ambientes utilizados para la etapa de investigación fueron el Laboratorio de Bioprocesos (F-405), Laboratorio de Materiales (F-406) y el laboratorio multidisciplinario del vicerrectorado de investigación E-406 de la Universidad Católica de Santa María (UCSM) en la provincia de Arequipa, departamento de Arequipa, Perú.

#### 2.2. Materiales.

##### 2.2.1. Material biológico

La cepa pura de *Ganoderma lucidum* fue donada por el laboratorio de bioprocesos de la UCSM y fue aislada de la tierra en el Valle Sur de la ciudad de Andahuaylillas, Cusco, Perú.

##### 2.2.2. Reactivos químicos

*Reactivos para medio de cultivo:* Glucosa, Extracto de levadura, Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), Sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ) los mismos que fueron de grado analítico adquiridos de Sigma Aldrich Inc.

PDA (Potato dextrose agar), etanol al 96%, solución de Hidróxido de sodio (NaOH) y de Ácido clorhídrico (HCl) se obtuvieron de Sigma Aldrich Inc. y se utilizaron sin ningún tratamiento adicional.

##### 2.2.3. Materiales de laboratorio

- Tubos de ensayo, beakers, matraces, fiolas, probetas de vidrio de distintos volúmenes, crisoles.
- Tubos falcon de 15 y 50 mL, tubos eppendorf de 2 mL.
- Micropipetas de 200, 1000 y 5000  $\mu\text{L}$
- Desecador
- Picetas, cucharas, espátula, mortero y gradillas.
- Celdas rectangulares de cuarzo Spectrosil 10 mm VWR.
- Jeringas de 1 mL, filtros de jeringa de nylon de 0.22  $\mu\text{m}$ , Millex-GV, viales de vidrio de 1.5 ml, para HPLC.

#### **2.2.4. Aparatos y equipos**

- Espectrofotómetro GENESYS™ 180 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific).
- pH-metro portátil STARTER300 (OHAUS).
- Balanza analítica Adventurer (OHAUS).
- Analizador de humedad Mettler Toledo HE73
- Baño de enfriamiento (DAIHAN Scientific).
- Vortex VWR 10153-814
- Estufa de secado y esterilización analógica (BINDER).
- Cocinilla eléctrica.
- Autoclave Wisd WAC – 60 (WITEG Labortechnik).
- Campana de extracción de gases (HNG).
- Incubador VELP Científica
- Refrigerador Ilumi
- Incubadora con agitación LBX S50L.
- Digestor Spectroquant TR 420
- Centrífuga Gemmy PLC-03
- Microcentrífuga eppendorf minispin plus
- Cromatógrafo Líquido de Alto Rendimiento (HPLC), Thermo Scientific Ultimate 3000.
- Equipo de FTIR, Thermo Scientific Nicolet Summit FTIR Spectrometer.
- Accesorios para equipo FTIR, Specac.

#### **2.2.5. Software**

- Software Design-Expert 13.0.
- Origin Pro
- Minitab Statistical
- OMNIC Paradigm Desktop Software

## 2.3. Métodos

### 2.3.1. Preparación del inóculo

Se prepararon 10 placas de agar PDA y se realizó un repique a partir de la cepa pura de *Ganoderma lucidum* obtenida en Andahuaylillas, Cusco, Perú. Estas placas se incubaron por 7 días a 28°C y se almacenaron a 4°C para posteriormente ser usadas como inóculo para los ensayos de fermentación (63) (64).

### 2.3.2. Condiciones de cultivo

En el cultivo se evaluó el efecto de las variables de concentración de glucosa como fuente de carbono; concentración de extracto de levadura como fuente de nitrógeno; pH inicial del medio, temperatura y velocidad de agitación en 3 niveles como se muestra en la Tabla 3. Estos niveles se definieron a partir de investigaciones precedentes (63,65).

El medio se preparó en matraces de 100 mL con 50 mL de medio, basado en los medios de fermentación sumergida propuestos en reportes previos (58,66–68), compuesto por glucosa, extracto de levadura,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1.5 g/L) y agua destilada. Este medio se autoclavó a 121°C y 15 psi, posteriormente se sembró un inóculo de 4 discos de agar/micelio de 5 mm de diámetro (figura 5b) y se dejó en incubación por 6 días en las diferentes condiciones establecidas en la Tabla 3. El pH del medio fue ajustado utilizando Ácido clorhídrico 3N y 1N e Hidróxido de sodio 1N y 0.5N.

**Tabla 3.** Variables de estudio y sus respectivos niveles

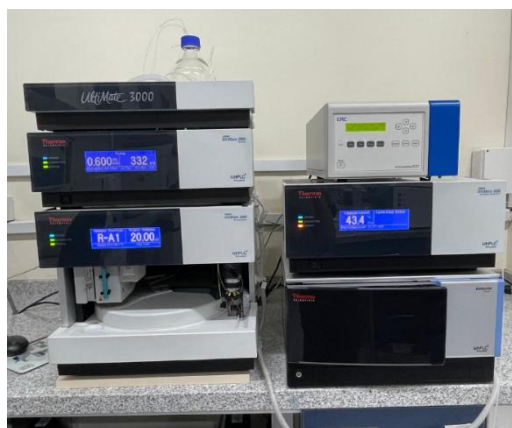
Factor	Niveles
Concentración de glucosa	20 g/L
	35 g/L
	50 g/L
Concentración de extracto de levadura	2 g/L
	5 g/L
	8 g/L
Temperatura	24°C

	28°C
	32°C
<b>pH</b>	4
	6
	8
<b>Velocidad de agitación</b>	100 rpm
	150 rpm
	200 rpm



**Figura 5.** Proceso de producción de EPS por *Ganoderma lucidum*: a) Inóculo inicial, b) Preparación del medio; c) Incubación.

En cada ensayo, las muestras fueron obtenidas periódicamente para el análisis de EPS y concentración de azúcares. Para azúcares el método utilizado fue el de HPLC. Para ello, se reservó 1 mL de medio cada 24 horas durante 8 días. Las muestras fueron diluidas en agua destilada y filtradas por un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  a viales de 1.5 mL. que fueron enviados al equipo (figura 6) para la evaluación de concentración de azúcares, que en este caso fue únicamente glucosa. Para el análisis se utilizó un equipo HPLC UltiMate™ 3000 LC de Thermo Fisher implementado con un detector de índice de refracción. Se empleó una columna HyperRez de 7,7 mm de diámetro y 300 mm de longitud, con muestreador automático y un volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$  (69).

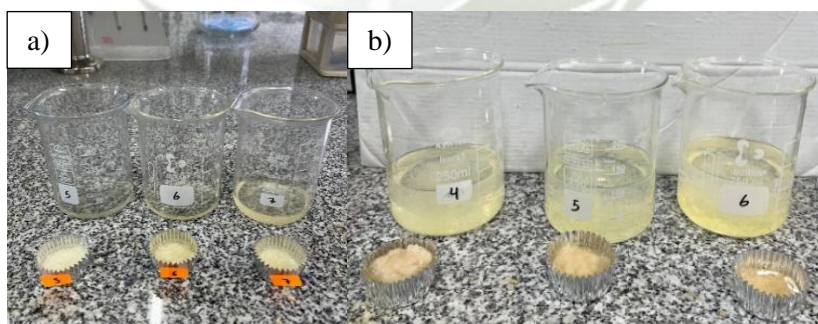


**Figura 6.** Equipo (HPLC) utilizado para el análisis de azúcar

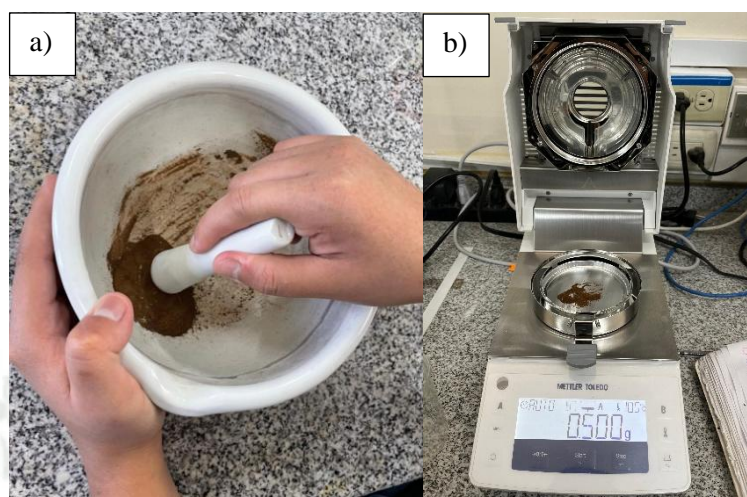
### 2.3.3. *Producción de exopolisacáridos y determinación de la cinética de crecimiento*

Las muestras obtenidas en el día seis fueron centrifugadas a 10 000 rpm por 10 minutos, obteniéndose un precipitado (biomasa) que fue secado a 60°C por 12 horas para posteriormente calcular el peso seco de la biomasa (65).

La fracción líquida fue precipitada con 3V de etanol al 96% 4°C por 24 horas conforme lo reportado por Wan Mothar et al. (65). El polímero precipitado fue recuperado por centrifugación a 10 000 rpm por 15 minutos y secado a 60°C por 4-6 horas para calcular la producción de EPS. Este procedimiento se muestra en la figura 7. Para validar los resultados del peso seco de la biomasa y del EPS, se analizó el porcentaje de humedad en el analizador de humedad Mettler Toledo HE73 a una temperatura de 105°C.



**Figura 7.** a) Determinación de la biomasa en pirotines de aluminio y b) precipitación de exopolisacáridos en etanol al 96%.



**Figura 8.** a) Preparación de la muestra y b) Análisis de humedad de biomasa

Por otro lado, se prepararon 8 matraces de medio de cultivo, ajustando las condiciones de la siguiente forma: 20 g/L de glucosa, 5 g/L de extracto de levadura, pH 6, a 28°C y 150 rpm en donde se determinó la concentración de la biomasa y EPS luego de 2, 4, 6 y 8 días por duplicado. Esto con el fin de determinar la cinética de crecimiento microbiano y confirmar que la mayor producción de EPS ocurre al sexto día de fermentación.

#### **2.3.4. Maximización de la producción de biomasa y EPS con Superficie de Respuesta**

A partir de los resultados obtenidos experimentalmente en las pruebas anteriores, se realizó una prueba de Tukey para determinar la significancia de las variables y se determinaron las tres condiciones que influyeron significativamente en la producción de biomasa y EPS: concentración de glucosa, concentración de extracto de levadura y pH.

Para la optimización de las condiciones de fermentación, se trabajó con el diseño experimental Box-Behnken utilizando el software Software Design-Expert 13.0 (stat-Ease, Inc., USA) en el cual se elaboró un modelo empírico que describe a las variables de respuesta (biomasa y EPS) en función del pH, las concentraciones de glucosa y de extracto de levadura. La optimización se llevó a cabo mediante el uso de la función de optimización numérica del software, generando 3 niveles para cada factor (-1 0 y 1) (66) (70).

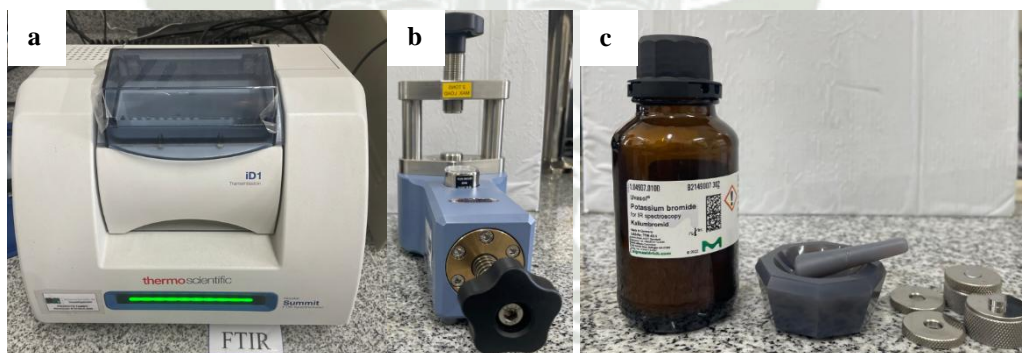
Se desarrollaron así 12 experimentos y 4 puntos centrales, generando 16 corridas en total.

Los 16 ensayos fueron llevados a cabo en matraces de 100 mL con 50 mL de medio, manteniendo las concentraciones de sales mencionadas en los primeros experimentos.

### 2.3.5. Caracterización del EPS

Se realizaron dos procedimientos de caracterización. Por una parte, el método FTIR posibilitó determinar los grupos funcionales del exopolisacárido; en cambio, el método HPLC permitió examinar los monómeros que constituyen dicho EPS. Para alcanzar este objetivo, se purificaron las muestras obtenidas al disolverlas en agua caliente hasta que no presentaran sólidos. Después, se centrifugaron durante 10 min a 10000 rpm para eliminar impurezas y posibles trazas de la biomasa. Luego, el sobrenadante se resuspendió en etanol 3V por 24 horas, se centrifugó la muestra para, finalmente llevar el precipitado a secado en la estufa a 60°C durante 6 horas, de acuerdo con Sun K et al. (71).

Una fracción del EPS fue analizada en el FT-IR, para lo cual se pulverizó hasta obtener un polvo fino color crema. Para llevar a cabo esta técnica, se compactó una pastilla de 50 mg de Bromuro de potasio (KBr), previamente secado en la estufa a 105°C por 1 hora, que fue usado como blanco al ser transparente al IR y pastillas de 50 mg de KBr y 0.5 mg de la muestra pulverizada. Las pastillas se realizaron al pulverizar el blanco y las muestras con un mortero de ágata y se compactaron con el prensador. Se leyó las muestras con 32 barridos para evitar presentar ruido en los resultados.



**Figura 9.** Equipo de FT-IR; a) prensador; b) KBr y c) accesorios.

A otra fracción del EPS se le realizó un procedimiento de hidrólisis ácida para determinar la composición de monosacáridos por HPLC según Ge Z et al. (72).

Para la hidrólisis, se realizó una modificación del protocolo propuesto por Levander F. et al. (73), para lo cual se hidrató 10 mg de muestra con 250  $\mu$ L de agua destilada y se le añadió 250  $\mu$ L de HCl 10 M en tubos de vidrio que se llevaron al digestor a una temperatura de 100°C por 45 minutos.

Luego de este tiempo la muestra se secó en la estufa por 30 minutos a 60°C y se le añadió 1 mL de agua para disolver la muestra y filtrarlo en viales de HPLC para el respectivo análisis mostradas en la figura 10.

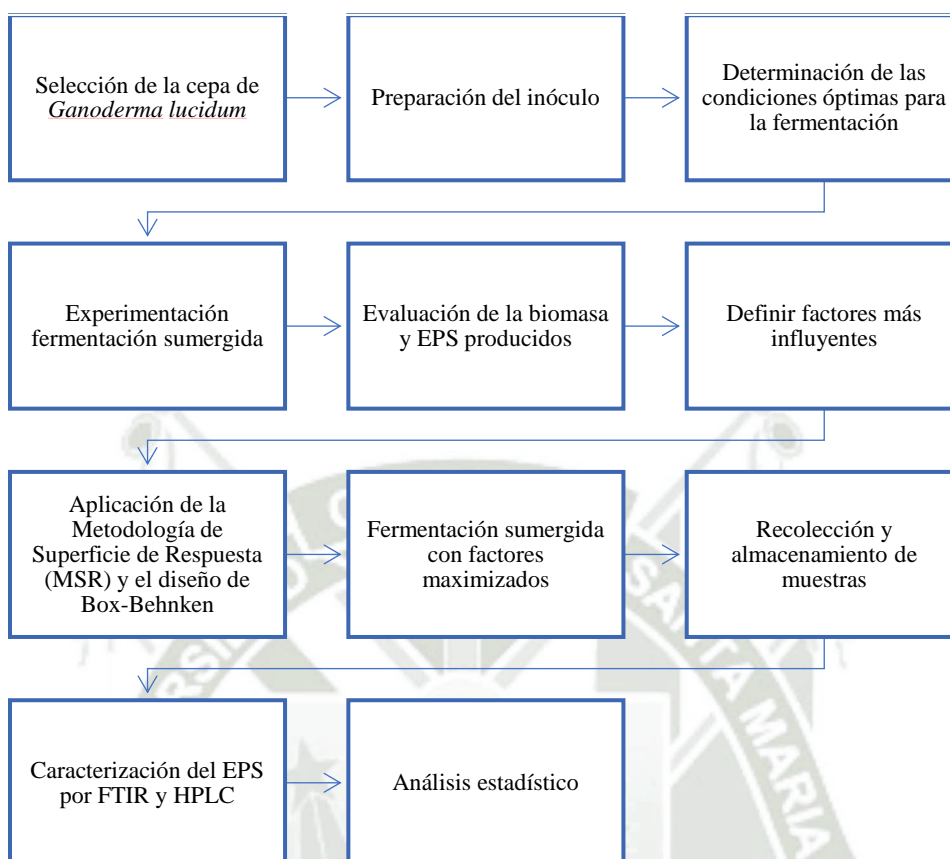


**Figura 10.** Hidrólisis ácida del EPS para análisis en HPLC

### **2.3.6. Análisis estadístico**

Todos los ensayos de las condiciones de cultivo se hicieron por triplicado y se les aplicó las pruebas de normalidad, homocedasticidad e independencia, así como las comparaciones en pareja de Tukey en el software Minitab Statistical. Mientras que el análisis de los resultados de los ensayos se realizó en el Software Design-Expert 13.0. en donde se utilizó un modelo cuadrático y se realizó de igual manera las pruebas de normalidad, homocedasticidad e independencia. Asimismo, se obtuvo los diversos gráficos de superficie de respuesta (RSM).

**2.3.7. Diagrama de flujo de actividades.**



**Figura 11.** Diagrama de flujo de actividades.

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 3.1. Establecimiento de condiciones de cultivo

Se estudió el impacto de las cinco variables de cultivo valoradas en la generación de biomasa y EPS por *G. lucidum*, registrando la concentración de cada muestra. Para la biomasa, el porcentaje de humedad alcanzó el 0.60% y un 2.4% para la muestra de EPS. Los datos obtenidos se analizaron para identificar los tres factores más influyentes y, a partir de ellos, se realizó el diseño experimental utilizando el método de Box-Behnken.

A estos resultados se les aplicó la respectiva prueba de normalidad y homocedasticidad como se visualiza en el Anexo 1 (Figuras 22 – 26) y Anexo 2 (Figuras 27-36), respectivamente.

En la Figura 11a se observa el efecto de la concentración de la glucosa sobre ambas variables de respuesta, obteniéndose la mayor producción de biomasa con una concentración inicial de glucosa de 50 g/L en el medio, mientras que la mayor producción de EPS fue a una menor concentración de glucosa (20 g/L). Investigaciones recientes asocian una mayor producción de biomasa y polisacáridos con la concentración inicial de glucosa, por ejemplo, en una investigación reportada por Hassan et al. (66), la mayor producción de biomasa fue de 3 g/L y se logró con una concentración inicial de glucosa de 50 g/L. Sin embargo, a partir de este precedente se buscó la optimización de otros parámetros y se disminuyó progresivamente la fuente de carbono en las investigaciones posteriores. Por ejemplo, una investigación reciente agrega únicamente 14 g/L de glucosa en su medio de fermentación, pero añade diferentes fuentes de nitrógeno y un surfactante como Tween 80 para obtener finalmente una producción de 15.13 g/L de biomasa y 0.90 g/L de EPS de *G. lucidum* (74). Así se determinó que, para la cepa nativa de Perú, no es necesario aplicar altas concentraciones de glucosa para la maximización de EPS, únicamente de la biomasa.

En el caso de la influencia de la concentración de extracto de levadura, en la Figura 11b se observa que una concentración de 8 g/L de extracto de levadura influyó negativamente en la producción de biomasa y una concentración de 2 g/L permitió la mayor obtención de esta pero una producción escasa de EPS; mientras que un nivel medio (5 g/L) obtuvo la mayor producción de EPS y, a su vez, una alta producción de biomasa. En el estudio de Liang Xu et al. (75) se utilizó una concentración inicial de 5 g/L de extracto de levadura logrando una producción máxima de 1.55 g/L de EPS al cabo de 15 días de *G. lucidum*. Para este estudio el

autor no consideró la biomasa. Por otro lado, Yang et al. (76) realizó un estudio en donde usó una concentración de extracto de levadura de 2 g/L, pero añadió otras fuentes de nitrógeno como triptona 5g/L y Tween 80 como surfactante, el cual ayuda a la absorción de nutrientes para una mayor producción de EPS y biomasa, obteniendo así una concentración final para biomasa (7.24 g/L) y EPS (1.33 g/L). Además, en 2022 Liu et al. (57) reportó el uso de diversas fuentes de nitrógeno entre ellas, polvo de levadura, extracto de levadura y peptona junto a diferentes concentraciones de glucosa (20, 50 y 70 g/L) donde obtuvo que para una concentración de glucosa de 20 g/L el uso de peptona resultó en la menor producción de EPS con  $1.97 \pm 0.14$  g/L es por ello que, en la presente investigación, se descartó el uso de peptona como fuente de nitrógeno.

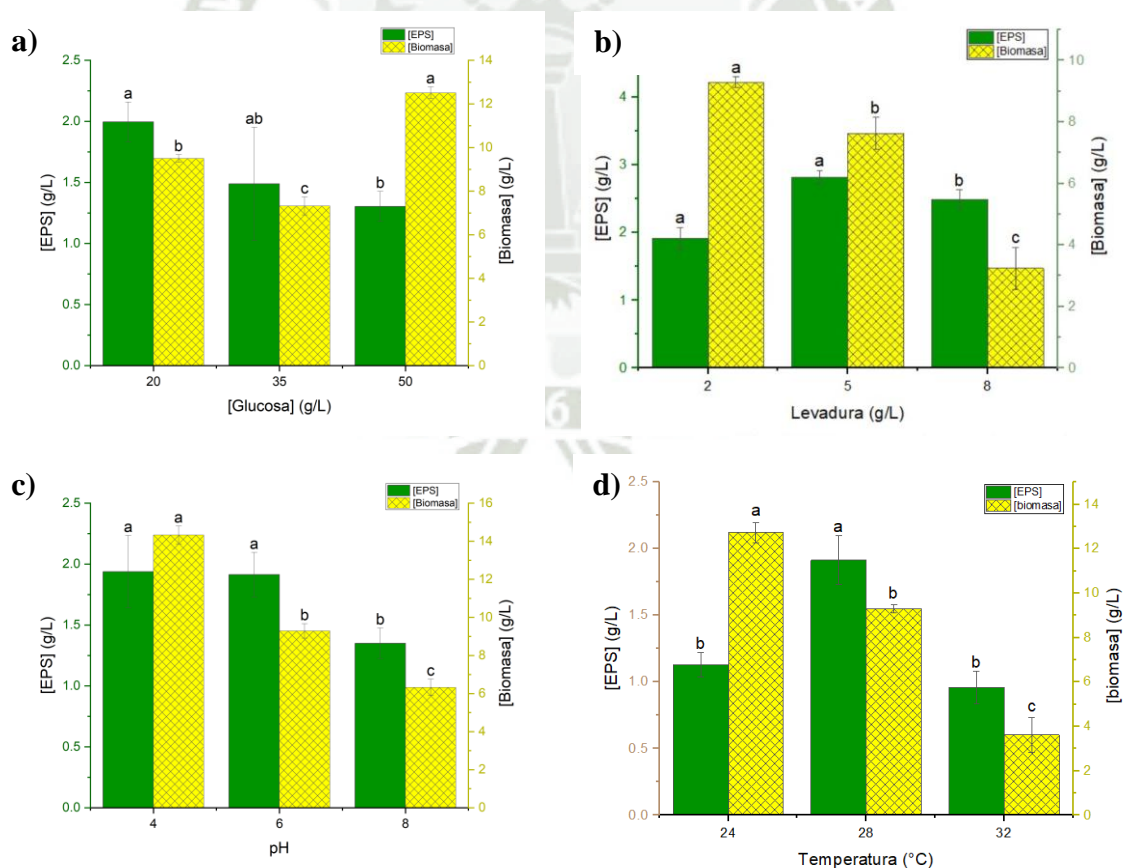
El efecto de la temperatura se detalla en la Figura 11c, donde a 32°C se obtuvo la menor cantidad de producción de EPS y biomasa, lo que indica una posible inhibición del crecimiento. A una menor temperatura se obtuvo mayor cantidad de biomasa, pero mínima producción de EPS, mientras que a la temperatura de 28°C se obtuvo la mayor cantidad de EPS y un valor significativo de biomasa. Diversos reportes indican la temperatura ideal para la fermentación de *G. lucidum* a los 28°C (76,77). Sin embargo, algunas investigaciones indicaron que temperaturas más bajas (22-24°C) influían en una mayor producción de EPS (74), por lo cual se vio necesario hacer este análisis. En la presente investigación, sin embargo, al trabajar a una temperatura de 24°C no se observó una mayor obtención de EPS, si no que una mayor cantidad de biomasa y se confirmaron los reportes de 28°C como temperatura ideal.

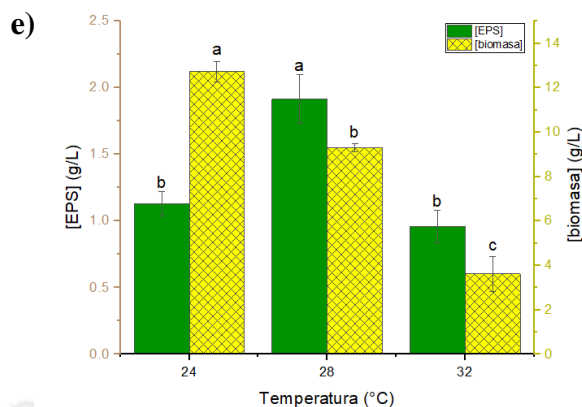
Por otro lado, se observó que un pH más ácido generó la mayor producción de biomasa y EPS, como se ve en la Figura 11d, donde un pH de 8 afectó negativamente la producción de ambas variables de respuesta y un pH de 4 favoreció el crecimiento de la biomasa y no disminuyó la producción de EPS respecto al pH natural del medio (6). Por ejemplo, la investigación de Li et al (75) que empleó un pH 7 y registró 7 g/L de biomasa, corroborando los resultados de nuestra investigación. Por otro lado, F. Asadi et al. (63) reportó que la mayor obtención de EPS (3.35 g/L) en un co-cultivo de *G. lucidum* y *P. ostreatus* fue con un pH inicial de 5 y un pH final de 4.94, que coincide con la presente investigación para el caso de un monocultivo.

Por último, la velocidad de agitación a 150 rpm favoreció la producción de EPS (Figura 11e) sin afectar la producción de biomasa, como fue el caso cuando se aplicó una velocidad de 200 rpm. Por otro lado, una menor velocidad de agitación como 100 rpm favoreció la producción de biomasa, pero disminuyó la de EPS. Estos resultados coinciden con lo reportado por A.

Umar et al. (78), donde estudia el efecto de la velocidad de agitación en la morfología de otra especie de *Ganoderma multistipitatum* y se observó que a 200 rpm en condiciones aeróbicas se daña el micelio del hongo. Por otro lado, Pessoa et al (79) reportó que una baja velocidad de agitación favorecía la producción de biomasa logrando una producción de 7 g/L que es un valor que se ha logrado superar en el presente trabajo de investigación, alcanzando una producción de 12.12 g/L.

Así, los factores con una mayor significancia sobre la producción de biomasa y EPS para llevar al diseño Box-Behnken fueron la concentración de glucosa, concentración de extracto de levadura y pH. A estos factores, además, se les realizó comparaciones múltiples de Tukey. Se observa que las medias para la obtención de biomasa son significativas al tener las agrupaciones de a, b y c como se puede apreciar en la Figura 11a, 11b, y 11d encima de las barras. Para el caso del EPS también existe una diferencia significativa de al menos una de las medias. Los resultados obtenidos en esta prueba de ANOVA se observan en el Anexo 3 (Figuras 37-47) (Tablas 10-29).





**Figura 12.** a) Producción de EPS y biomasa respecto a la concentración de glucosa en g/L, b) Producción de EPS y biomasa respecto a la concentración de extracto de levadura en g/L, c) Producción de EPS y biomasa respecto a la Temperatura en °C, d) Producción de EPS y biomasa respecto a pH, e) Producción de EPS y biomasa respecto a Velocidad de agitación (rpm)

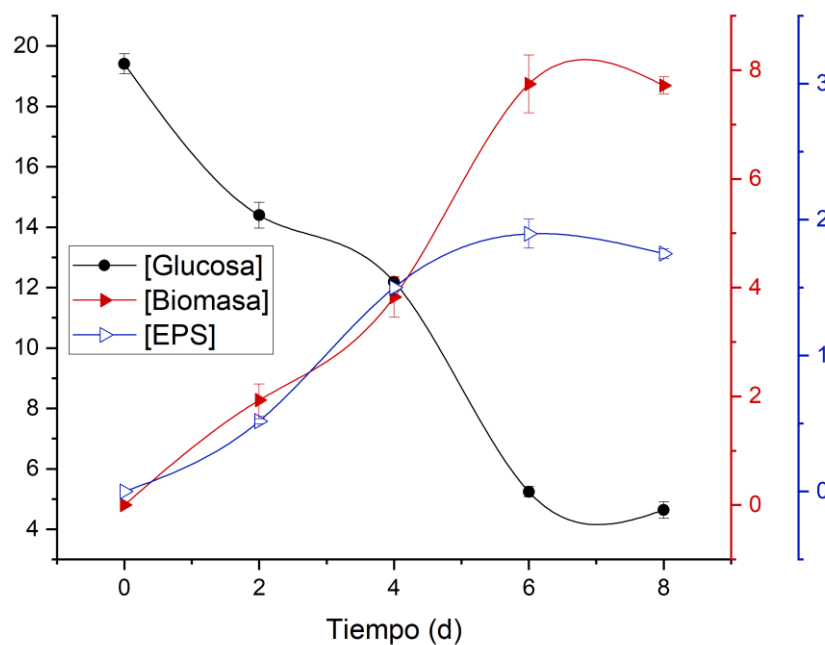
### 3.2. Curva de crecimiento

Para conocer la cinética de crecimiento de la cepa *G. lucidum*, se evaluó el consumo de glucosa como principal fuente de sustrato frente a la producción de biomasa y de EPS como producto, por un tiempo de 8 días, como se observa en la Figura 13.

Por un lado, se determinó el valor de  $Q_p$  (productividad volumétrica, g/L.día) de EPS, es decir, la cantidad de EPS generado por unidad de volumen y tiempo. Durante el sexto día se obtuvo un valor de 0.316 g/L/día, lo que representa un valor importante en la etapa inicial de producción. Por ello se infiere que la fase exponencial y la productividad máxima se da entre los días 4 y 6, periodo en el que se registran las mayores cantidades de EPS y coincide con reportes anteriores que indican una fase exponencial y mayor concentración de EPS a los 6 días de fermentación (63). A su vez, se determinó que el parámetro de  $\mu_{max}$  para la biomasa fue también al día 6 con un valor de  $0.3527 \text{ día}^{-1}$ , sin embargo, al octavo día, observamos un descenso en  $\mu$ , lo que sugiere que la biomasa ha dejado de crecer y podría estar atravesando una fase de decaimiento, debido al consumo total del sustrato.

Por otro lado;  $Y_{x/s}$  muestra el desempeño de la biomasa en relación con el sustrato utilizado. Este desempeño es elevado (0.3977 g biomasa/g sustrato), lo que señala una adecuada transformación de sustrato en biomasa durante los 8 días de estudio. Además,  $Y_{p/s}$  muestra que

los microorganismos también transforman el sustrato en EPS. Este rendimiento (0.0901 g EPS/g sustrato), puede incrementarse durante los días subsiguientes, tal como se refleja en la producción total de EPS.



**Figura 13.** Curva de crecimiento de *G. lucidum*. Consumo de glucosa, producción de Biomasa y de producto (EPS) en función de tiempo.

### 3.3. Consumo de glucosa

Adicionalmente, en esta primera parte de la investigación, se evaluó el efecto de cada factor sobre el consumo de glucosa. Los resultados se presentan al determinar la concentración de glucosa del medio por la técnica de HPLC cada 24 horas por un tiempo de 8 días.

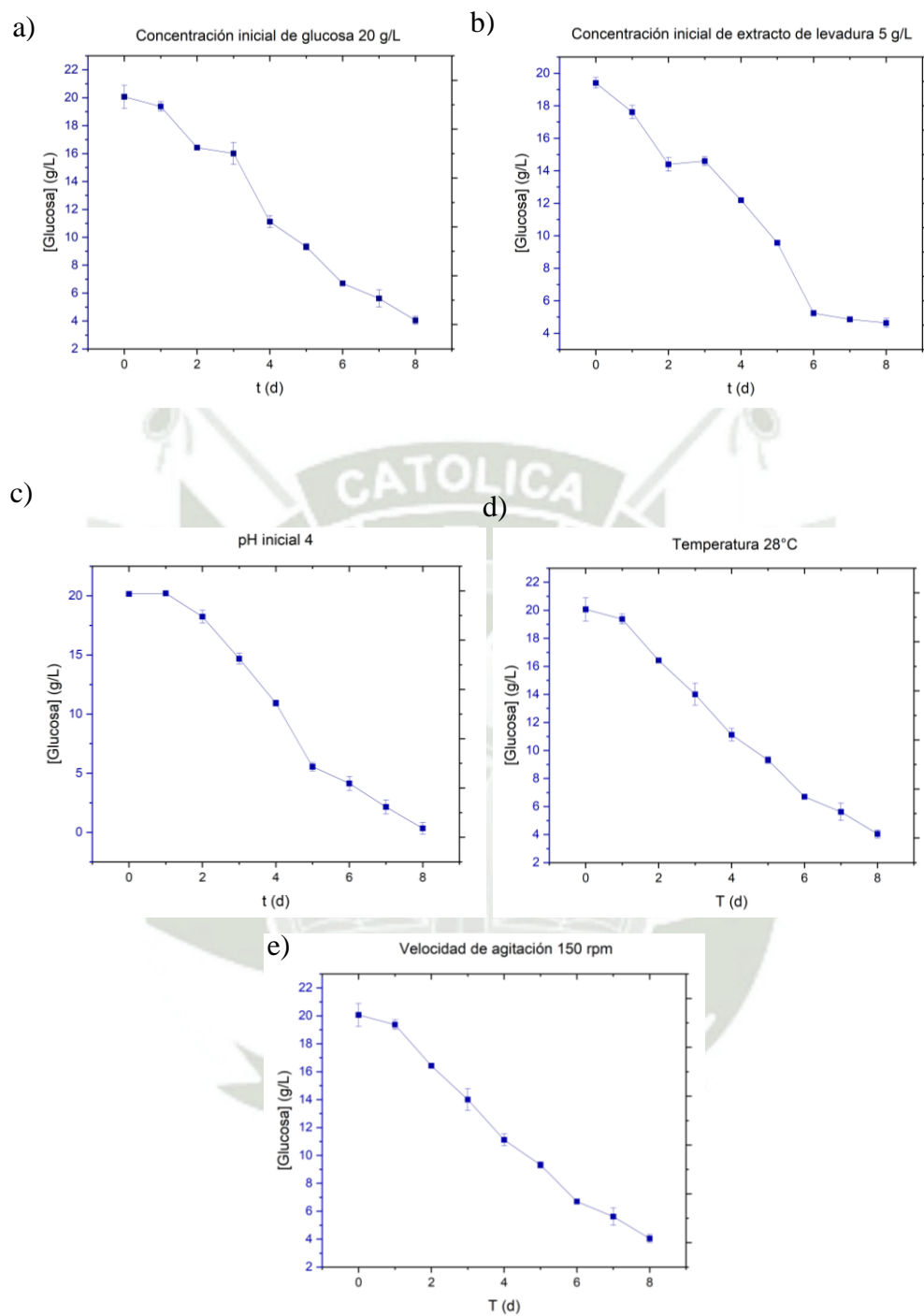
Para el caso de la glucosa, como se observa en las Figuras 13 a, cuando la concentración inicial fue de 20 g/L, el consumo de glucosa fue uniforme hasta llegar a consumirse un 79.84%, mientras que, al aumentarse la concentración inicial de 50 g/L, el consumo fue más lento, alcanzando apenas el 23.83% de consumo a los 8 días de cultivo, por lo mismo se observó una baja producción de EPS. Con una concentración de 20g/L de glucosa se alcanzó una  $S$  velocidad de consumo de sustrato ( $r_s$ ) de -3.476 g/L. día, teniendo en cuenta que fue la mayor de todas para el día 6 corroborando así que en este día se da el mayor consumo, así como la mayor producción de Biomasa y EPS.

Para la concentración inicial de extracto de levadura (Figura 13b) (Figura 48 - Anexo 4), no se detectó un impacto notable en el consumo de glucosa. Esto se debe a que, en los tres ensayos, el consumo fue homogéneo y alcanzó el 75-95% del consumo total.

Se observó el mismo comportamiento para el pH inicial, tal como se ilustra en la Figura 13c, en la que el consumo es constante hasta alcanzar un 80-98% de consumo total durante los 8 días de cultivo. Esto sugiere que el pH influye positivamente en el crecimiento y metabolismo de *G. lucidum*, ya que a un estrés ácido se estimuló una mayor producción de EPS, como se reportó previamente que un pH ácido induce a una mayor producción de exo y endopolisacáridos de *G. lucidum* (80,81).

Por el contrario, se determinó que el efecto de una temperatura de cultivo elevada como 32°C fue negativo sobre la producción de biomasa y el EPS ya que el consumo fue lento, irregular y llegó a un 23.26% de consumo total, en cambio a 24 y 28°C (Figura 13d) el consumo fue regular. Distintas investigaciones reportan un bajo crecimiento del micelio de *G. lucidum* a temperaturas mayores a 28°C, por lo que también explica un menor consumo de glucosa (66,82).

Para el caso de la velocidad de agitación (Figura 13e), una velocidad de 100 rpm afectó también negativamente el crecimiento del inóculo y se observa el consumo de glucosa que alcanza solo al 23.59%.



**Figura 14.** Consumo de glucosa determinado por HPLC en función de la concentración inicial de glucosa (a); concentración inicial de extracto de levadura (b); pH inicial (c); Temperatura (d); y velocidad de agitación (e)

### 3.4. Maximización de la producción de biomasa y EPS

Se realizaron los 16 experimentos propuestos por el software Design Expert V 13.0 para evaluar el efecto de la concentración de glucosa, concentración de extracto de levadura y del pH sobre las dos variables de respuesta; concentración de Biomasa en g/L y concentración de EPS en g/L (Tabla 4). Con los resultados obtenidos experimentalmente, se hizo el análisis estadístico y se evaluó la Superficie de Respuesta.

Tabla 4. Ensayos propuestos por diseño experimental Box-Benhken

N° experimento	[Glucosa] g/L	[Levadura] g/L	pH	[Biomasa] g/L	[EPS] g/L
1	15	5	3	7.38	1.05
2	15	5	5	7.73	1.02
3	20	4	5	8.03	1.18
4	25	6	4	11.93	1.36
5	20	4	3	6.86	0.97
6	20	5	4	9.82	0.87
7	15	4	4	8.31	0.82
8	25	5	3	10.72	1.38
9	20	5	4	9.92	0.72
10	20	6	5	11.35	1.67
11	15	6	4	9.35	1.09
12	25	5	5	10.12	2.07
13	25	4	4	9.03	1.02
14	20	6	3	10.89	1.09
15	20	5	4	9.67	1.2
16	20	5	4	10.76	0.79

La predicción del  $R^2$  se obtuvo (0.89) con un  $R^2$  ajustado de 0.74 para el ANOVA de la biomasa como variable de respuesta. En la Tabla 5 observamos el valor F del modelo de 5,99 implica que el modelo es significativo. Sólo hay un 2,06% de posibilidades de que un valor F tan grande se deba al ruido.

Los valores p inferiores a 0,0500 indican que los términos del modelo son significativos. En este caso, la concentración de glucosa con un valor p de 0.0206 y la concentración de extracto de levadura con un valor p de 0.005 son términos significativos del modelo. El valor F de falta de ajuste de 3,67 implica que la falta de ajuste no es significativa en relación con el error puro. Hay un 15,71% de posibilidades de que un valor F de falta de ajuste tan grande se deba al ruido. Por otro lado, una falta de ajuste no significativa es buena ya que queremos que el modelo se ajuste.

**Tabla 5.** Análisis de varianza (ANOVA) de los factores evaluados en la etapa de optimización de componentes del medio de cultivo para producción de Biomasa

Fuente	Suma de cuadrados	df	Promedio de cuadrados	Valor F	Valor p	
<b>Modelo</b>	30.09	9	3.34	5.99	0.0206	<b>Significativo</b>
<b>A-[Glucosa]</b>	10.19	1	10.19	18.25	0.0053	
<b>B-[Levadura]</b>	15.93	1	15.93	28.52	0.0018	
<b>C-pH</b>	0.2380	1	0.2380	0.4262	0.5381	
<b>AB</b>	0.8649	1	0.8649	1.55	0.2598	
<b>AC</b>	0.2256	1	0.2256	0.4039	0.5485	
<b>BC</b>	0.1260	1	0.1260	0.2256	0.6516	
<b>A<sup>2</sup></b>	0.4658	1	0.4658	0.8339	0.3964	
<b>B<sup>2</sup></b>	0.0086	1	0.0086	0.0153	0.9055	
<b>C<sup>2</sup></b>	2.04	1	2.04	3.65	0.1047	
<b>Residual</b>	3.35	6	0.5586			
<b>Falta de ajuste</b>	2.63	3	0.8778	3.67	0.1571	<b>No significativo</b>
<b>Error puro</b>	0.7181	3	0.2394			
<b>Total</b>	33.44	15				

La predicción del  $R^2$  se obtuvo 0.86 con un  $R^2$  ajustado de 0.66. En la Tabla 6 observamos el valor F del modelo de 4,32 implica que el modelo es significativo. Sólo hay un 4,44% de posibilidades de que un valor F tan grande pueda ocurrir debido al ruido.

Los valores p inferiores a 0,0500 indican que los términos del modelo son significativos. En este caso, A, C, C<sup>2</sup> son términos significativos del modelo. Los valores superiores a 0,1000

indican que los términos del modelo no son significativos. Si hay muchos términos del modelo no significativos (sin contar los necesarios para apoyar la jerarquía), la reducción del modelo puede mejorarlo.

El valor F de falta de ajuste de 0,78 implica que la falta de ajuste no es significativa en relación con el error puro. Hay un 57,82% de posibilidades de que un valor F de falta de ajuste tan grande se deba al ruido. De igual manera, una falta de ajuste no significativa es buena en este caso.

**Tabla 6.** Análisis de varianza (ANOVA) de los factores evaluados en la etapa de optimización de componentes del medio de cultivo para producción de EPS

Fuente	Suma de cuadrados	df	Promedio de cuadrados	Valor F	Valor p	
<b>Modelo</b>	1.56	9	0.1734	4.32	0.0444	<b>Significativo</b>
<b>A-[Glucosa]</b>	0.4278	1	0.4278	10.65	0.0172	
<b>B-[Levadura]</b>	0.1861	1	0.1861	4.63	0.0748	
<b>C-pH</b>	0.2628	1	0.2628	6.55	0.0430	
<b>AB</b>	0.0012	1	0.0012	0.0305	0.8671	
<b>AC</b>	0.1296	1	0.1296	3.23	0.1225	
<b>BC</b>	0.0342	1	0.0342	0.8523	0.3915	
<b>A<sup>2</sup></b>	0.1089	1	0.1089	2.71	0.1507	
<b>B<sup>2</sup></b>	0.0006	1	0.0006	0.0156	0.9048	
<b>C<sup>2</sup></b>	0.4096	1	0.4096	10.20	0.0187	
<b>Residual</b>	0.2409	6	0.0402			
<b>Falta de ajuste</b>	0.1056	3	0.0352	0.7807	0.5782	<b>No significativo</b>
<b>Error puro</b>	0.1353	3	0.0451			
<b>Total</b>	1.80	15				

Las ecuaciones obtenidas mediante el DBB se presentan a continuación y describen el impacto de las variables evaluadas en la producción de biomasa y exopolisacáridos (EPS). En estas ecuaciones, el factor A representa la concentración de glucosa, el factor B representa la

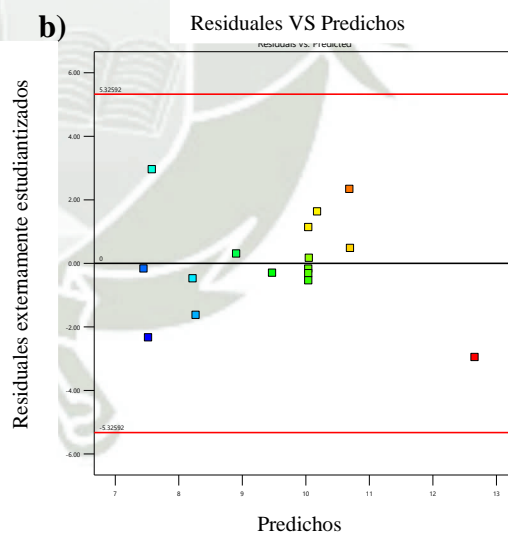
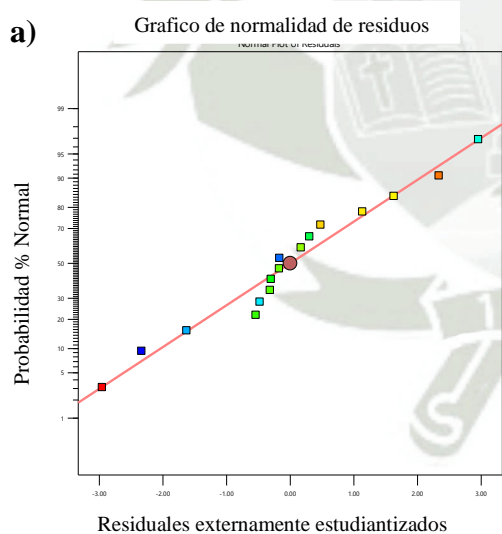
concentración de extracto de levadura y el factor C representa el pH. A través de una evaluación previa, se determinaron que estos tres elementos eran los más influyentes.

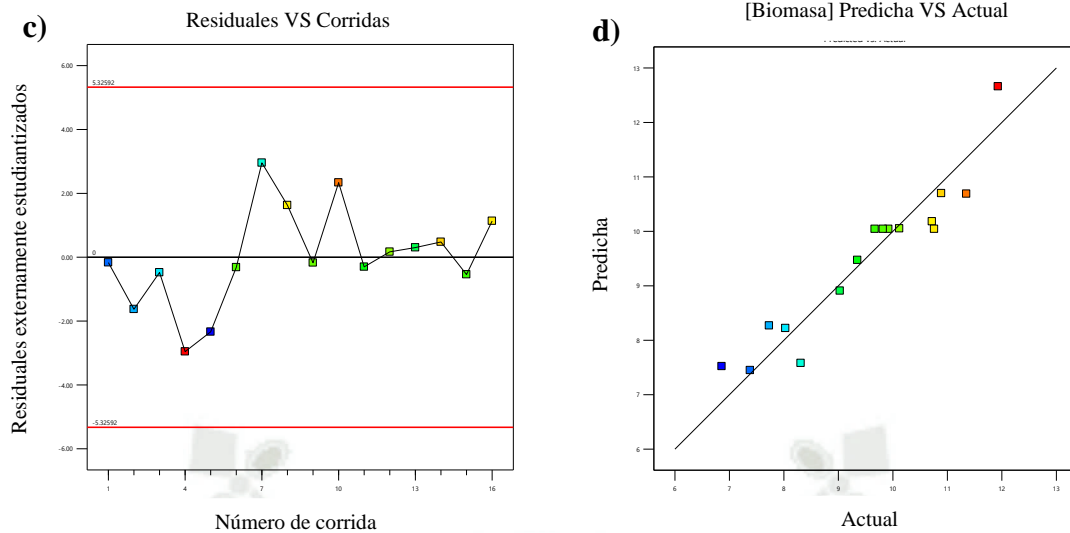
Es importante señalar que tanto la temperatura como la velocidad de agitación no se incluyeron en el modelo final porque no mostraron diferencias significativas en las respuestas de producción ni contribuyeron de manera relevante a los resultados.

La relación entre los factores y la producción de biomasa se muestra en la ecuación 1, mientras que la producción de EPS es la ecuación 2 obtenidas del modelo cuadrático.

$$[Biomasa] = 10.04 + 1.13 * A + 1.41 * B + 0.1725 * C + 0.4650 * AB + -0.2375 * AC + -0.1775 * BC + -0.3412 * A^2 + -0.04625 * B^2 + -0.7138 * C^2 \text{ Ecuación 1}$$

$$[EPS] = 0.8950 + 0.2313 * A + 0.1525 * B + -3.56125 * C + 0.0175 * AB + 0.1800 * AC + 0.0925 * BC + 0.1650 * A^2 + 0.0125 * B^2 + 0.3200 * C^2 \text{ Ecuación 2}$$





**Figura 15.** Representación de las interacciones respecto a la producción de Biomasa, a) Evaluación de residuos respecto a la normalidad, b) Residuos vs valores predichos respecto a homocedasticidad, c) Predicción de las corridas vs Corridas actuales evaluando independencia d) Resultados predichos vs actuales

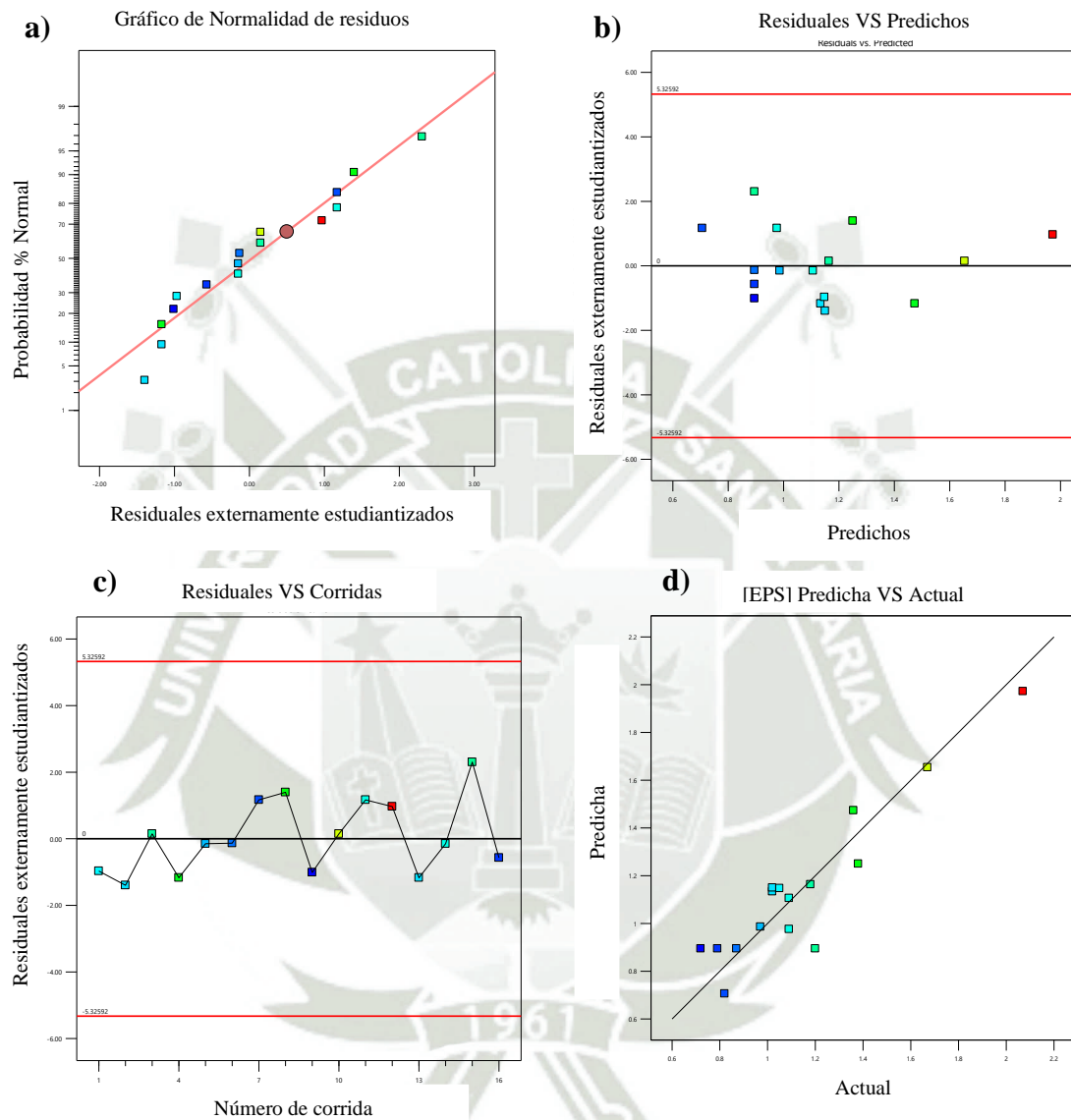
En la Figura 15a se presenta la normalidad de nuestras corridas, la mayoría de estas se distribuyen de manera razonablemente normal, lo cual es positivo para la validez del modelo. Se observan algunos *outliers* o pequeñas desviaciones, pero estas son cercanas a las corridas del punto central y son mínimas por lo que el modelo tiene validez (83).

En la Figura 15b se observa que todas las corridas se encuentran dentro de los límites superiores e inferiores y la mayoría de ellas se encuentran correctamente dispersas, es decir, alejadas de la línea central demostrando así el principio de homocedasticidad, a excepción de algunos experimentos que serían del punto central, esto se suele dar por errores como factores de ruido, no controlados, etc (84).

En la Figura 15c se observa el cumplimiento del principio de independencia de los residuos, esto ya que las corridas no presentan un patrón sistemático. Asimismo, existen algunos puntos que se alejan considerablemente de la línea media, lo que podría indicar la presencia de ligeras desviaciones. Sin embargo, estos puntos no afectan la independencia de los residuos (85).

Y en la Figura 15d se muestra la predicción de resultados de producción vs los experimentos realizados, en donde la mayoría de los experimentos se mantienen cercanos a la línea de

tendencia central, la cual representa la predicción, lo que indica que el ajuste del modelo es adecuado (86).



**Figura 16.** Representación de las interacciones respecto a la producción de EPS, a) Evaluación de residuos respecto a la normalidad, b) Residuos vs valores predichos respecto a homocedasticidad, c) Predicción de las corridas vs Corridas actuales evaluando independencia d) Resultados predichos vs actuales

En la figura 16a se observa el gráfico de normalidad y este parece mostrar un buen ajuste para la mayoría de los puntos casi en su totalidad, pero algunos residuos en los extremos se desvían ligeramente, lo que es común y generalmente aceptable, esto quiere decir que el modelo es aceptable (87).

En la Figura 16b se observa que la distribución de los residuos es uniforme alrededor de la línea central, demostrando así que el modelo ajustado es adecuado. La ausencia de patrones sistemáticos en los residuos sugiere que la varianza de los errores es constante, lo que refuerza la validez del modelo demostrando así el principio de homocedasticidad (88,89).

En la Figura 16c se muestra los residuos obtenidos vs la corrida de los experimentos, en este gráfico se muestra la independencia de nuestros resultados respaldando el modelo debido a que no existe un patrón entre las corridas, es decir se encuentran dispersas y están dentro de los límites superiores e inferiores. En este caso no presenta repeticiones para punto central por lo que los errores fueron mínimos (85).

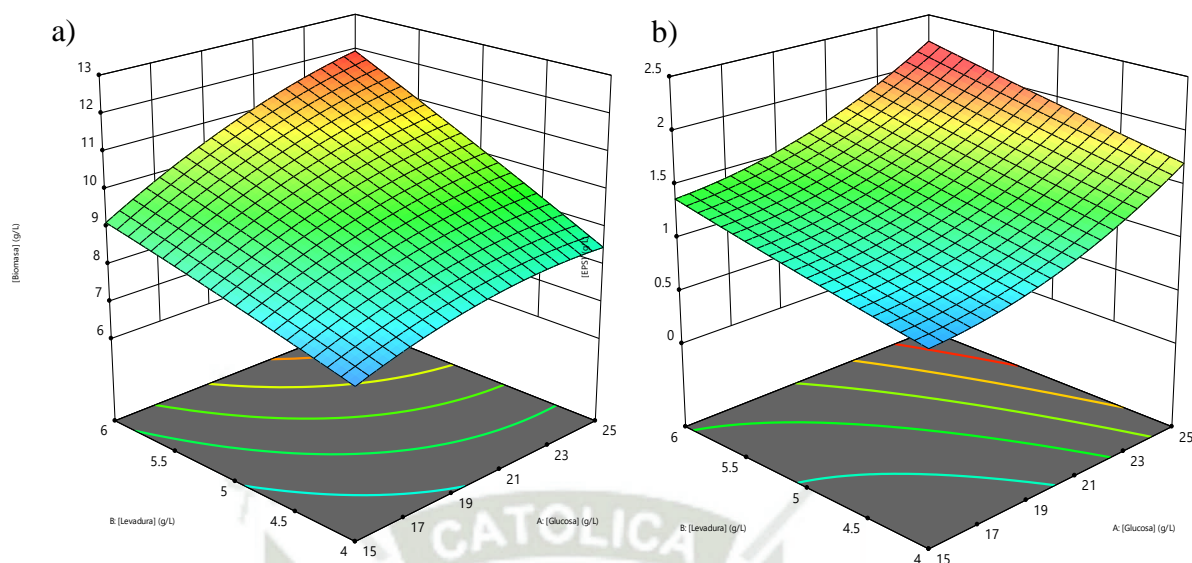
En la Figura 16d por último se observa la predicción de resultados de producción vs los experimentos realizados tienen una gran concordancia con los valores predichos, esto debido a su proximidad con la línea central (90,91).

Por lo que se puede interpretar que los modelos para producción de Biomasa, así como de EPS son validados.

### ***3.5. Interacción [Glucosa] y [Extracto de levadura]***

En la Figura 17a se puede observar una **superficie cóncava con un máximo local** entre la concentración de glucosa y de extracto de levadura en la producción de biomasa, A medida que la concentración de Glucosa y de Extracto de levadura aumentan, la producción de biomasa lo hará de igual forma, **es decir son directamente proporcionales**. Sin embargo, más allá de estos niveles ideales, aumentar alguno de los factores no aumentaría la producción de biomasa, lo que indica una posible inhibición a concentraciones muy altas.

Por otro lado, en la Figura 17b para la producción de exopolisacáridos (EPS) tiene una superficie convexa con un mínimo local, lo que indica que las combinaciones de concentración de glucosa y de extracto de levadura llevadas al punto máximo reducen la producción de EPS. Esto sugiere que las concentraciones de extracto de levadura y glucosa deben estar equilibradas para obtener una producción óptima (92).

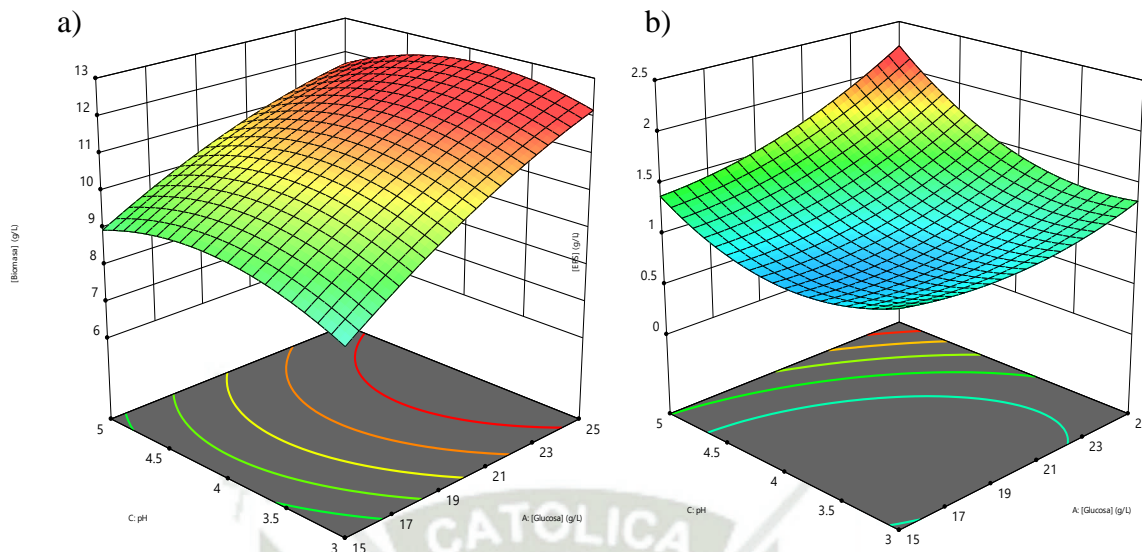


**Figura 17.** Interacción [Glucosa] y [Extracto de levadura]. Donde: a) Superficie de respuesta del efecto de la interacción de los factores sobre la concentración de Biomasa y b) Superficie de respuesta del efecto de la interacción de los factores sobre la concentración de EPS.

### 3.6. Interacción [Glucosa] y pH

La Figura 18a muestra la respuesta tridimensional de la producción de biomasa respecto a la interacción entre la concentración de Glucosa y pH. Se observa un máximo local de biomasa en un pH de 4.99 y una concentración de glucosa de 24.99 g/L. Este comportamiento sugiere una interacción sinérgica entre ambos factores, donde el pH óptimo maximiza la eficiencia de utilización de la glucosa para el crecimiento celular. Sin embargo, fuera de estos rangos la producción de biomasa se reduce. Estos resultados indican que el pH influye en la permeabilidad de la membrana celular a la glucosa y en la actividad de las enzimas involucradas en su metabolismo.

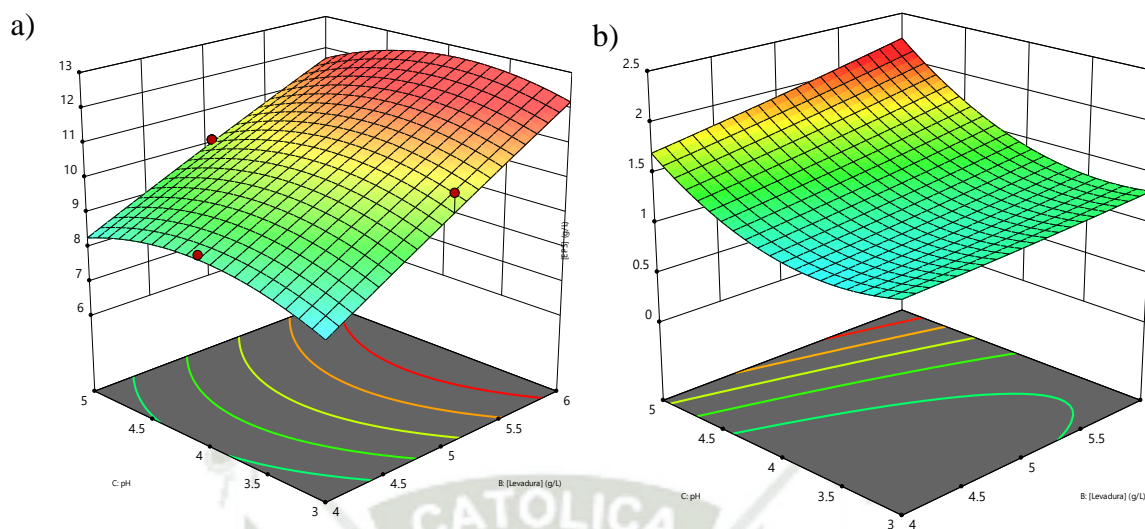
La Figura 18b muestra la superficie de respuesta de la producción de EPS en función de la concentración de glucosa y el pH, se observa un mínimo local es decir que existe una ventana estrecha de condiciones óptimas para la síntesis de EPS. Fuera del rango de 4 a 6 en pH y de 15 a 25 g/L para la concentración de glucosa, se inhiben la actividad de las enzimas involucradas en la biosíntesis de EPS, lo que resulta en una menor producción (35).



**Figura 18.** Interacción [Glucosa] y pH. Donde a) Superficie de respuesta del efecto de la interacción de los factores sobre la concentración de Biomasa y b) Superficie de respuesta del efecto de la interacción de los factores sobre la concentración de EPS.

### 3.7. Interacción [Extracto de levadura] y pH

La Figura 19a muestra la producción de biomasa, evidenciando una evidente relación entre la combinación de pH y la concentración de extracto de levadura. El área de respuesta muestra un máximo local, lo que señala que hay una ventana cercana de condiciones ideales para potenciar el crecimiento celular. Es clara la relación entre ambos elementos, en la que un pH apropiado realza el efecto beneficioso del extracto de levadura en la generación de biomasa. Las desviaciones de estas condiciones ideales, ya sea debido a niveles extremos de pH o a las concentraciones del extracto, restringen considerablemente el crecimiento celular. En cambio, la Figura 19b ilustra una conexión intrincada entre la concentración de extracto de levadura y el pH en la generación de exopolisacáridos (EPS). La superficie de respuesta presenta un mínimo local, indicando que existe una combinación específica de ambos factores que inhibe significativamente la producción de EPS (93).



**Figura 19.** Interacción [Extracto de levadura] y pH. Donde a) Superficie de respuesta del efecto de la interacción de los factores sobre la concentración de Biomasa y b) Superficie de respuesta del efecto de la interacción de los factores sobre la concentración de EPS.

Basándonos en estos hallazgos, se realizó el DBB con la finalidad de maximizar la producción de Biomasa como EPS. De acuerdo con la optimización numérica, se registraron 55 respuestas, de las cuales 3 presentan una deseabilidad de 1. Estas respuestas se presentan en la tabla 7. Estas respuestas señalan que el factor de concentración de Glucosa a emplear es de 24.99 g/L, el extracto de levadura es de 5.99 g/L y con un pH de 4.84 se alcanzaría una concentración máxima total de Biomasa de 11.93 g/L y de EPS de 2.08 g/L.

**Tabla 7.** Condiciones óptimas para producción de Biomasa y EPS en la optimización numérica de DE

Numero	[Glucosa]	[Levadura]	pH	[Biomasa]	[EPS]	Deseabilidad	
1	24.990	5.990	4.834	11.943	2.071	1.000	
2	24.990	5.990	4.843	11.930	2.080	1.000	Elegido
3	24.990	5.990	4.844	11.930	2.080	1.000	

Estas condiciones de optimización se realizaron experimentalmente por quintuplicado donde en la Tabla 8 se muestra las diversas concentraciones obtenidas. Además, la producción de

biomasa superó la concentración estimada por el modelo, mientras que la de EPS fue menor a la esperada.

**Tabla 8.** Resultados experimentales de la optimización de variables

[Biomasa] g/L	[EPS] g/L	Promedio Biomasa	Promedio EPS	Desviación estándar Biomasa	Desviación estándar EPS
12.524	1.92				
11.876	1.95				
12.568	1.65	12.1218 g/L	1.784 g/L	0.4058	0.1460
11.988	1.64				
11.653	1.76				

### 3.8. Caracterización del EPS

#### 3.8.1. FTIR

Los sólidos recuperados de los exopolisacáridos fueron analizados mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) con el objetivo de identificar los grupos funcionales presentes en la muestra y compararlos con la literatura.

En la Tabla 9 se muestran los picos obtenidos, los cuales abarcan un rango desde  $3404.34\text{ cm}^{-1}$  hasta  $506.21\text{ cm}^{-1}$ , con mediciones realizadas a través de 32 barridos. Al comparar estos resultados con estudios previos (79), se observa que la presente investigación comparte tres picos clave con otros autores. El primero, en  $3400\text{ cm}^{-1}$ , el cual es de banda ancha se asocia con la presencia de grupos aminos (NH) y triterpenos (OH) provenientes del azúcar del EPS. El segundo, entre  $1650$  y  $1600\text{ cm}^{-1}$ , corresponde a  $\beta$ -dicetonas y  $\beta$ -hidroxiarildicetonas, con grupos funcionales C=O.

Finalmente, se ve un pico destacado en este reporte en  $1077\text{ cm}^{-1}$ , mientras que otros autores lo reportan en un rango cercano a  $1000\text{ cm}^{-1}$  ya considerando la huella digital, está relacionado con el grupo funcional C-O que es encontrado en caracterización de carbohidratos (94).

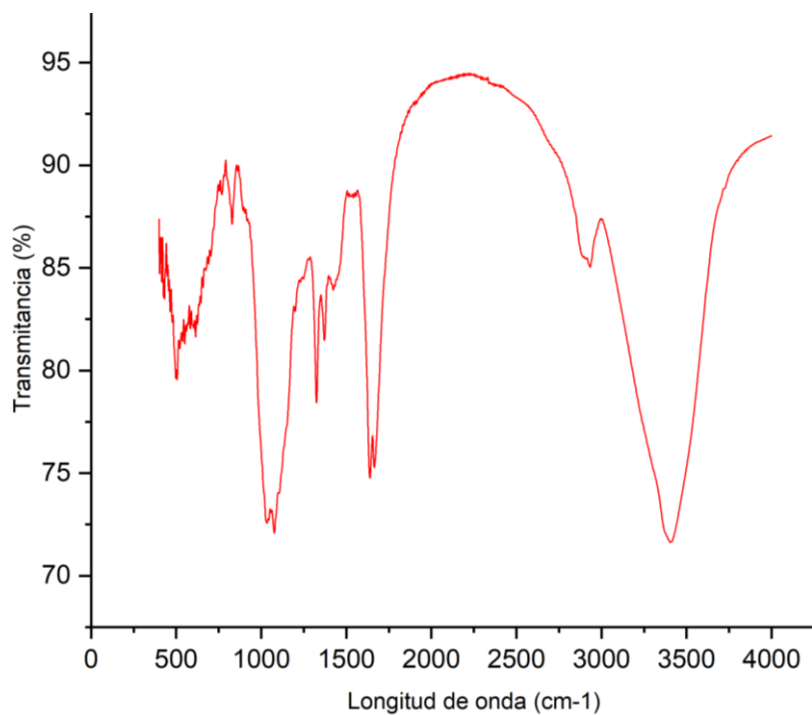
Es relevante mencionar que, según otros estudios existe un pico amplio entre  $1316$  y  $1425\text{ cm}^{-1}$  que se asocia a enlaces C-H y C-CH<sub>3</sub>, lo que apoya la presencia de estas estructuras en los EPS analizados (80). La Figura 19 confirma la obtención de

exopolisacáridos en el presente reporte, lo cual es consistente con los resultados de otros autores (79,80).

**Tabla 9.** Regiones con mayor umbral en FTIR. Adaptado de (95)

Posición ( $\text{cm}^{-1}$ )	Intensidad (%)	Cadena	Clasificación
3404.338	71.625	Aminas / Alcohol	R-CH <sub>2</sub> -OH / NH
2933.403	85.035	Alcanos	C-H
1665.163	75.275	Hidroxilo	H-O-H
1639.622	74.759	Cetonas /Amidas	C=O / C=C
1371.820	81.473	Halógenos	C-CH <sub>3</sub> / F
1325.398	78.423	Alcohol	C-OH
1077.465	72.077	Monómeros	H-C-O

Además, diversos investigadores han señalado que el pico observado entre 1000 y 1200  $\text{cm}^{-1}$ , con alta intensidad, es indicativo de la estructura lineal del  $\beta$ -glucano, unido a través de enlaces 1-3. De manera similar, el pico entre 3400 y 3200  $\text{cm}^{-1}$  sugiere la presencia de  $\beta$ -glucanos, lo que refuerza la caracterización de los EPS obtenidos en nuestra investigación (81–83).



**Figura 20.** Resultados FTIR de la muestra de EPS



### 3.8.2. Hidrólisis ácida para HPLC

Para el análisis azúcares en el EPS hidrolizado se contó con los estándares de celobiosa, glucosa, xilosa y arabinosa en el equipo de HPLC. En la Figura 21a se presenta los estándares frente a los resultados de la muestra del hidrolizado (Figura 21b). Se observa que los picos no coinciden al mismo tiempo de retención del eje x para ambos gráficos, esto se debe a factores como un aumento de temperatura, principalmente; las propiedades del eluyente, presencia de impurezas en la muestra y mantenimiento de las columnas del equipo (96,97).

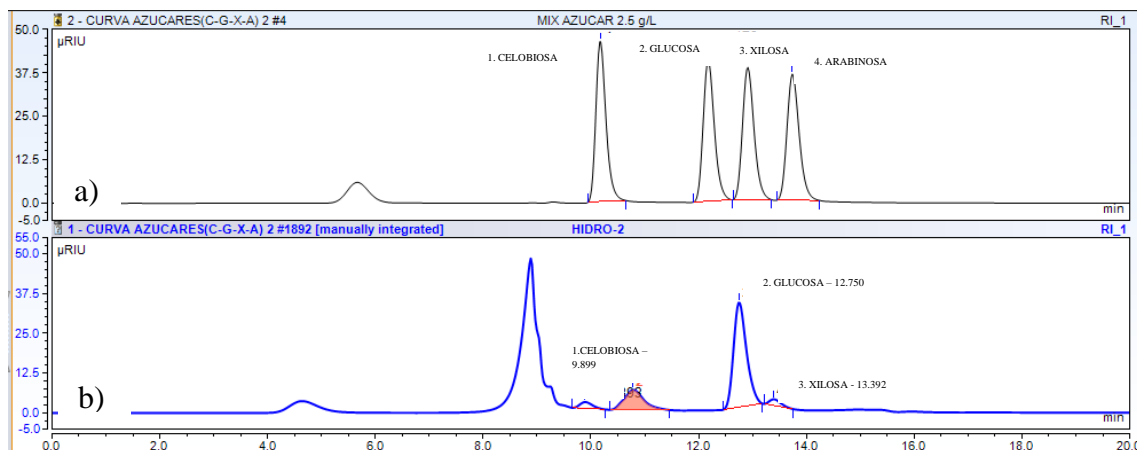
En la Figura 21b se ve un primer pico a los 3.5 minutos de tiempo de retención, pertenece al blanco empleado que fue agua ultrapura. El segundo pico en un tiempo de retención de 8 minutos pertenece principalmente a trazas del medio, compuesto por HCl y polímeros que no son reconocidos en el equipo. A los 9.89 min se presenta un pico que representa el área de la celobiosa, un disacárido formado por dos moléculas de  $\beta$ -glucosa; a los 12.750 min se ve un gran pico que representa la glucosa; y, por último, la presencia del pico a los 13.392 min. de retención en el área de xilosa. No se encontró presencia de arabinosa en la muestra.

Múltiples investigaciones confirman la producción de betaglucanos y, en menor cantidad, heteroglucanos, a partir de la fermentación sumergida de *Ganoderma lucidum*. El review publicado por Bin Du. Et al (98) reportó la presencia de cadenas de triple hélice de glucano en un EPS de *G. lucidum*. C. Caseiro et al (99) también analizaron la estructura molecular de los betaglucanos sintetizados por hongos, plantas y bacterias, resaltando las propiedades de los betaglucanos fúngicos que se encuentran conformados principalmente por  $\beta$ -1,3-glucanos y en menor cantidad  $\beta$ -1,6-glucanos y  $\beta$ -1,4-glucanos.

Susan M. Tosh y colaboradores (100) reportaron un análisis de la composición de betaglucano extraído en avena, determinando la presencia de glucosa, celobiosa y arabinosa.

El reporte presentado por M. Deuk Han et al (101) por otro lado, documentó la presencia de de alfa y beta glucosa, en el micelio obtenido por fermentación sumergida de *G.lucidum*, además de trazas de fructosa, manosa y galactosa. Así, se confirma la obtención de betaglucano a partir de la fermentación sumergida de *Ganoderma lucidum*, junto a trazas de otros azúcares como residuos del medio. Sin embargo, no se

contó con los estándares de estos azúcares para poder llevar a cabo un análisis completo, al no poder determinar el tipo de enlaces del glucano obtenido.



**Figura 21.** a) Estándares de celobiosa, glucosa y xilosa y b) Muestra de EPS hidrolizada con HCl 10M en HPLC

## CONCLUSIONES

### PRIMERA:

Esta investigación mostró que la concentración de glucosa, el extracto de levadura y el pH son las variables que tienen un mayor impacto en la generación de exopolisacáridos (EPS) y biomasa de *Ganoderma lucidum*. Estos indicadores evidenciaron ser de gran importancia en el proceso de fermentación.

### SEGUNDA:

A partir de los tres factores seleccionados, se aplicó la metodología de superficie de respuesta y Diseño de Box – Behnken (DBB) que permitió maximizar la producción de biomasa y de EPS de *Ganoderma lucidum* en un contexto de condiciones ambientales adversas para dicha especie. Los niveles que permitieron una mayor producción de biomasa y EPS fueron con una concentración de 24.9 g/L de glucosa, 5.99 g/L de extracto de levadura y un pH de 4.84. Se obtuvo una concentración promedio de Biomasa de 12.1218 g/L y de EPS de 1.784 g/L.

### TERCERA:

A través de los métodos de espectroscopía infrarroja (FTIR) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se caracterizó cualitativamente el EPS producido por *Ganoderma lucidum*, reconociendo la obtención de betaglucano el cual contiene unidades de glucosa.

## RECOMENDACIONES

1. Dado que uno de los objetivos es maximizar la producción de EPS y biomasa, se recomienda a los investigadores interesados realizar estudios adicionales que analicen la influencia de otros elementos ambientales (tales como la concentración de oxígeno) en la producción de EPS. Esto podría implicar ensayos de diseño factorial para determinar las combinaciones ideales.
2. Se recomienda al sector agroindustrial y/o ambiental, explorar el uso de desechos agroindustriales, tales como la cascarilla de arroz y el bagazo de caña de azúcar, como recursos de carbono para la generación de exopolisacáridos (EPS) y biomasa de *Ganoderma lucidum*. Estos desechos son numerosos y asequibles, lo que podría disminuir los gastos de producción y favorecer la sostenibilidad del medio ambiente. Del mismo modo, es necesario analizar la composición química de cómo estos desechos influyen en la producción de EPS y biomasa, además de mejorar las condiciones de fermentación para optimizar el desempeño.
3. Se recomienda a la industria farmacéutica, para simplificar el paso de los hallazgos de laboratorio a usos industriales, establecer protocolos de escalado que contemplen la valoración de la producción de EPS en biorreactores de sobremesa. Esto facilitará la comprobación de la factibilidad del proceso a nivel industrial y la optimización de los costos productivos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mawar R, Ram L, Deepesh, Mathur T. Ganoderma. Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi. 2020 Jan 1;625–49.
2. Wu S, Zhang S, Peng B, Tan D, Wu M, Wei JC, et al. *Ganoderma lucidum*: a comprehensive review of phytochemistry, efficacy, safety and clinical study. Food Science and Human Wellness [Internet]. 2024 Mar 1 [cited 2024 Jan 18];13(2):568–96. Available from: <https://www.sciopen.com/article/10.26599/FSHW.2022.9250051>
3. Ahmad MF, A. Alsayegh A, Ahmad FA, Akhtar MS, Alavudeen SS, Bantun F, et al. *Ganoderma lucidum*: Insight into antimicrobial and antioxidant properties with development of secondary metabolites. Heliyon. 2024 Feb 15;10(3):e25607.
4. Chen SN, Nan FH, Liu MW, Yang MF, Chang YC, Chen S. Evaluation of Immune Modulation by  $\beta$ -1,3; 1,6 D-Glucan Derived from *Ganoderma lucidum* in Healthy Adult Volunteers, A Randomized Controlled Trial. Foods 2023, Vol 12, Page 659 [Internet]. 2023 Feb 3 [cited 2024 Nov 4];12(3):659. Available from: <https://www.mdpi.com/2304-8158/12/3/659/htm>
5. Fraga I, Coutinho J, Bezerra RM, Dias AA, Marques G, Nunes FM. Influence of culture medium growth variables on *Ganoderma lucidum* exopolysaccharides structural features. Carbohydr Polym. 2014 Oct 13;111:936–46.
6. Atwi-Ghaddar S, Destandau E, Lesellier E. Optimization of supercritical fluid extraction of polar flavonoids from *Robinia pseudoacacia* L. heartwood. Journal of CO2 Utilization. 2023 Apr 1;70:102440.
7. Rao JS, Kumar B. 3D Blade root shape optimization. Institution of Mechanical Engineers - 10th International Conference on Vibrations in Rotating Machinery. 2012 Jan 1;173–88.
8. Martínez E, Guillén JA. Aplicación de la metodología de superficie de respuesta para la optimización de parámetros de soldadura en función de la distribución térmica resultante.
9. Vázquez Jiménez J, Vazquez jimenez J 626362. Producción de inoculo de cepas nativas de *Ganoderma* spp y su perspectiva de uso en el sector agroindustrial [Internet]. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2017 [cited 2024 Apr 6]. Available from: <https://hdl.handle.net/20.500.12371/185>
10. Ekiz E, Oz E, Abd El-Aty AM, Proestos C, Brennan C, Zeng M, et al. Exploring the Potential Medicinal Benefits of *Ganoderma lucidum*: From Metabolic Disorders to Coronavirus Infections. Foods 2023, Vol 12, Page 1512 [Internet]. 2023 Apr 3 [cited 2024 Aug 14];12(7):1512. Available from: <https://www.mdpi.com/2304-8158/12/7/1512/htm>
11. Optimización de la producción del hongo medicinal Reishi.
12. Figlas D, Curvetto N. Monografía sobre las propiedades medicinales del hongo reishi (*Ganoderma lucidum*).

13. La Facultad De Química Farmacéutica R DE, Moreno HP, Martínez AM, Fujimoto Y. Aislamiento e identificación de dos esteroides y un triterpenoide del cuerpo fructífero de *Ganoderma lucidum* cultivado en Colombia. Isolation and identification of two sterols and a triterpene from dry fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* cultivated in Colombia artículo corto.
14. Suely C, De Carvalho M, Sales-Campos C, Pessoa De Carvalho L, Teixeira De Almeida Minhoni M, Luiz A, et al. Cultivation and bromatological analysis of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst cultivated in agricultural waste. *African Journal of Biotechnology* [Internet]. 2015 Feb 4 [cited 2024 Aug 14];14(5):412–8. Available from: <https://academicjournals.org/journal/AJB/article-abstract/081A97650280>
15. Su HG, Peng XR, Shi QQ, Huang YJ, Zhou L, Qiu MH. Lanostane triterpenoids with anti-inflammatory activities from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*. 2020 May 1;173:112256.
16. Delgado SA, Ac M, Paola D, Tobar O. Estado del arte de las propiedades nutricionales y funcionales de *Ganoderma Lucidum*. *Revista Mutis* [Internet]. 2023 Jan 1 [cited 2024 Aug 14];13(1):1–13. Available from: <https://revistas.utadeo.edu.co/index.php/mutis/article/view/Estado-arte-propiedades-nutricionales-funcionales-Ganoderma-Lucidum>
17. De Investigación C, Biotecnología En. universidad autónoma del estado de Morelos.
18. Fernández P, Haza AI, Morales P. Propiedades funcionales de Hongos Comestibles. *Agro Sur* [Internet]. 2020 [cited 2024 Aug 25];48(1):11–24. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/342232633\\_Propiedades\\_funcionales\\_de\\_Hongos\\_Comestibles\\_Functional\\_Mushrooms](https://www.researchgate.net/publication/342232633_Propiedades_funcionales_de_Hongos_Comestibles_Functional_Mushrooms)
19. Chang CJ, Lin CS, Lu CC, Martel J, Ko YF, Ojcius DM, et al. *Ganoderma lucidum* reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota. *Nature Communications* 2015 6:1 [Internet]. 2015 Jun 23 [cited 2024 Aug 25];6(1):1–19. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncomms8489>
20. - KN, - MK, - JR, - AS. Bioactive Compounds of *Ganoderma lucidum* and their Therapeutic Applications. *IJFMR - International Journal For Multidisciplinary Research* [Internet]. 2023 Jun 24 [cited 2024 Aug 25];5(3). Available from: <https://www.ijfmr.com/research-paper.php?id=3982>
21. Bishop KS, Kao CHJ, Xu Y, Glucina MP, Paterson RRM, Ferguson LR. From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. *Phytochemistry*. 2015 Jun 1;114:56–65.
22. Andrés Bidegain Directores M, María Amelia Cubitto Santiago Palma Bahía blanca argentina d. universidad nacional del sur tesis de doctor en ciencia y tecnología de los alimentos Optimización del cultivo de *Ganoderma lucidum*. Evaluación de actividad y desarrollo de nutraceuticos. 2017;
23. Wu P, Zhang C, Yin Y, Zhang X, Li Q, Yuan L, et al. Bioactivities and Industrial Standardization Status of *Ganoderma lucidum*: A Comprehensive Review. *Heliyon*

- [Internet]. 2024 Aug [cited 2024 Sep 4];0(0):e36987. Available from: <http://www.cell.com/article/S2405844024130186/fulltext>
24. Li Z, Zhou J, Lin Z. Development and Innovation of Ganoderma Industry and Products in China. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2019 [cited 2024 Sep 4];1181:187–204. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31677144/>
  25. Wadood SA, Nie J, Li Z, Li C, Zhang N, Rogers KM, et al. A preliminary elemental and isotopic investigation to develop authentication tools for Chinese *Ganoderma lucidum*. *Food Control*. 2023 Nov 1;153:109888.
  26. Wu P, Zhang C, Yin Y, Zhang X, Li Q, Yuan L, et al. Bioactivities and Industrial Standardization Status of *Ganoderma lucidum*: A Comprehensive Review. *Heliyon* [Internet]. 2024 Aug [cited 2024 Sep 4];0(0):e36987. Available from: <http://www.cell.com/article/S2405844024130186/fulltext>
  27. Lu J, He R, Sun P, Zhang F, Linhardt RJ, Zhang A. Molecular mechanisms of bioactive polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (Lingzhi), a review. *Int J Biol Macromol*. 2020 May 1;150:765–74.
  28. Prabhu K, Kannan N. Review on microbial production of exopolysaccharides and its applications. *Res J Biotechnol*. 2024 Jun 1;19(6):149–58.
  29. Nwagu TN, Okolo B, Aoyagi H, Yoshida S. Chemical modification with phthalic anhydride and chitosan: Viable options for the stabilization of raw starch digesting amylase from *Aspergillus carbonarius*. *Int J Biol Macromol*. 2017 Jun 1;99:641–7.
  30. KEGG PATHWAY: Exopolysaccharide biosynthesis - Reference pathway [Internet]. [cited 2024 Apr 10]. Available from: <https://www.kegg.jp/pathway/map=map00543&keyword=polysaccharide>
  31. Caseiro C, Dias JNR, de Andrade Fontes CMG, Bule P. From Cancer Therapy to Winemaking: The Molecular Structure and Applications of  $\beta$ -Glucans and  $\beta$ -1, 3-Glucanases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2024 Apr 10];23(6). Available from: [/pmc/articles/PMC8949617/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3949617/)
  32. Bockwoldt JA, Meng C, Ludwig C, Kupetz M, Ehrmann MA. Proteomic Analysis Reveals Enzymes for  $\beta$ -D-Glucan Formation and Degradation in *Levilactobacillus brevis* TMW 1.2112. *Int J Mol Sci*. 2022 Mar 1;23(6).
  33. Mariana J, Rojas A. Universidad Nacional de Asunción Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Dirección de Postgrado.
  34. Xu YL, Yuan H, Li N, Xiao JH, Xu JW. Increased production and anti-senescence activity of exopolysaccharides in *Ganoderma lingzhi* by co-overexpression of  $\beta$ -1,3-glucan synthase and UDP-glucose pyrophosphorylase. *Int J Biol Macromol*. 2023 Dec 31;253:126778.
  35. Mishra A, Jha B. Microbial exopolysaccharides. *The Prokaryotes: Applied Bacteriology and Biotechnology*. 2013 Jan 1;9783642313318:179–92.

36. Benkeblia N. Ganoderma lucidum Polysaccharides and Terpenoids: Profile and Health Benefits. *Journal of Food, Nutrition and Dietetics*. 2016 Jan 25;01(01).
37. Wang W, Ju Y, Liu N, Shi S, Hao L. Structural characteristics of microbial exopolysaccharides in association with their biological activities: a review. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 2023 10:1 [Internet]. 2023 Nov 28 [cited 2024 Aug 28];10(1):1–16. Available from: <https://chembioagro.springeropen.com/articles/10.1186/s40538-023-00515-3>
38. Kou F, Ge Y, Wang W, Mei Y, Cao L, Wei X, et al. A review of Ganoderma lucidum polysaccharides: Health benefit, structure–activity relationship, modification, and nanoparticle encapsulation. *Int J Biol Macromol*. 2023 Jul 15;243:125199.
39. Birch J, Van Calsteren MR, Pérez S, Svensson B. The exopolysaccharide properties and structures database: EPS-DB. Application to bacterial exopolysaccharides. *Carbohydr Polym*. 2019 Feb 1;205:565–70.
40. Hamrouni Zahmoul S, Chaabouni RL, Srih A, Dogan HH, Varıcioglu E, Sbissi I, et al. Nutritional and pharmacological potentials of the medicinal mushroom Ganoderma adspersum (Schulz.) Donk. *South African Journal of Botany*. 2024 Mar 1;166:360–74.
41. Ge Z, Azi F, Bao X, Yin X, Feng X, Zhang M, et al. Optimization and characterization of exopolysaccharides from *Leuconostoc citreum* BH10 and its functional properties in vitro. *Food Production, Processing and Nutrition* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2024 Aug 25];5(1):1–17. Available from: <https://fppn.biomedcentral.com/articles/10.1186/s43014-023-00134-3>
42. Chen X, Siu KC, Cheung YC, Wu JY. Structure and properties of a (1→3)-β-d-glucan from ultrasound-degraded exopolysaccharides of a medicinal fungus. *Carbohydr Polym*. 2014 Jun 15;106(1):270–5.
43. Chabot S, Yu HL, De Léséleuc L, Cloutier D, Van Calsteren MR, Lessard M, et al. Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN-γ in mouse splenocytes. *Lait* [Internet]. 2001 Nov 1 [cited 2024 Aug 26];81(6):683–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1051/lait:2001157>
44. Ignatova L V., Urazova ZK, Brazhnikova Y V., Vedyashkina N V. Obtaining Edible Pullulan-based Films with Antimicrobial Properties. *Eurasian Chemico-Technological Journal* [Internet]. 2023 [cited 2024 Aug 26];25(4):241–7. Available from: <https://ect-journal.kz/index.php/ectj/article/view/1547>
45. Liu Y, Su P, Zhai Z, Zhang Z, Yang H, Dai J, et al. References Cited ( 54 ) exopolysaccharide from *Rhodospseudomonas palustris* and method for preparing and use.
46. Miyamoto J, Shimizu H, Hisa K, Matsuzaki C, Inuki S, Ando Y, et al. Host metabolic benefits of prebiotic exopolysaccharides produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Gut Microbes* [Internet]. 2023 Dec 31 [cited 2024 Aug 26];15(1). Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19490976.2022.2161271>

47. Abd El-Zaher EHF, Abou Zied AM, Mohamed YM, Semana FMA. The role of exopolysaccharide produced by *Pleurotus Sapidus* as medical agent. *Delta Journal of Science* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2024 Aug 27];43(1):133–48. Available from: [https://djs.journals.ekb.eg/article\\_197873.html](https://djs.journals.ekb.eg/article_197873.html)
48. Mohamed HI, Basit A, Abdallah WE. Exopolysaccharides produced by fungi and their environmental applications. *Fungal Secondary Metabolites: Synthesis and Applications in Agroecosystem*. 2024 Jan 1;219–40.
49. Netrusov AI, Liyaskina E V., Kurgaeva I V., Liyaskina AU, Yang G, Revin V V. Exopolysaccharides Producing Bacteria: A Review. *Microorganisms* 2023, Vol 11, Page 1541 [Internet]. 2023 Jun 9 [cited 2024 Aug 26];11(6):1541. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/6/1541/htm>
50. Ma Y, Zhao M, Zhou F, Liu X, Liu C. Anaerobic production and biosynthesis mechanism of exopolysaccharides in *Schizophyllum commune* 20R-7-F01. *Int J Biol Macromol*. 2023 Dec 31;253:127339.
51. Ohba T, Uemura K, Nabetani H. Moderate pulsed electric field treatment enhances exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris*. *Process Biochemistry*. 2016 Sep 1;51(9):1120–8.
52. Fundamentos del análisis FTIR [Internet]. [cited 2024 Aug 23]. Available from: <https://www.fossanalytics.com/es-ar/news-articles/technologies/a-short-intro-to-ftir-analysis>
53. Lakra U, Lincoln Singh Munda V, Nigam VK, Sharma SR. Optimisation, characterization, and biological evaluation of novel exopolysaccharide from *Bacillus licheniformis* (BITSL006). *Nat Prod Res* [Internet]. 2023 [cited 2024 Sep 2]; Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2023.2265041>
54. Suarez Ospina D, Morales Hernández Y. Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas basic principles of High Performance Liquid Chromatography for the separation and analysis of mixtures. *América Revista Semilleros: Formación Investigativa*. 2018;4.
55. Cromatografía Líquida (HPLC).
56. Uhliaríková I, Matulová M, Capek P. Optimizing acid hydrolysis for monosaccharide compositional analysis of *Nostoc cf. linckia* acidic exopolysaccharide. *Carbohydr Res*. 2021 Oct 1;508:108400.
57. Liu L, Feng J, Gao K, Zhou S, Yan M, Tang C, et al. Influence of carbon and nitrogen sources on structural features and immunomodulatory activity of exopolysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry*. 2022 Aug 1;119:96–105.
58. Feng J, Feng N, Tang QJ, Liu YF, Yang Y, Liu F, et al. Optimization of *Ganoderma lucidum* Polysaccharides Fermentation Process for Large-Scale Production. *Appl Biochem Biotechnol* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2024 Aug 27];189(3):972–86. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-019-02968-5>

59. Liu L, Feng J, Gao K, Zhou S, Yan M, Tang C, et al. Influence of carbon and nitrogen sources on structural features and immunomodulatory activity of exopolysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry*. 2022 Aug 1;119:96–105.
60. Figueroa Preciado G. Mosaicos Matemáticos No. 11 Nivel Superior Diciembre. 2003;
61. Box GEP, Behnken DW. Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. *Technometrics*. 1960;2(4):455–75.
62. Huertas-García R, Gázquez-Abad JC, Martínez-López FJ, Esteban-Millat I. Propuesta metodológica mediante diseños Box-Behnken para mejorar el rendimiento del análisis conjunto en estudios experimentales de mercado. *Revista Española de Investigación de Marketing ESIC*. 2014 Jan 1;18(1):57–66.
63. Asadi F, Barshan-tashnizi M, Hatamian-Zarmi A, Davoodi-Dehaghani F, Ebrahimi-Hosseinzadeh B. Enhancement of exopolysaccharide production from *Ganoderma lucidum* using a novel submerged volatile co-culture system. *Fungal Biol*. 2021 Jan 1;125(1):25–31.
64. Lim TC, Ilham Z, Wan-Mohtar WAAQI. Production of Ganodiesel from the biomass of *Ganoderma lucidum* in air-L-shaped bioreactor (ALSB). *Heliyon*. 2024 Aug 15;10(15):e35170.
65. Wan Mohtar WAAQI, Ab. Latif N, Harvey LM, McNeil B. Production of exopolysaccharide by *Ganoderma lucidum* in a repeated-batch fermentation. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2016 Apr 1;6:91–101.
66. Hassan NA, Supramani S, Azzimi Sohedein MN, Ahmad Usuldin SR, Klaus A, Ilham Z, et al. Efficient biomass-exopolysaccharide production from an identified wild-Serbian *Ganoderma lucidum* strain BGF4A1 mycelium in a controlled submerged fermentation. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2019 Sep 1;21:101305.
67. Peng L, Qiao S, Xu Z, Guan F, Ding Z, Gu Z, et al. Effects of culture conditions on monosaccharide composition of *Ganoderma lucidum* exopolysaccharide and on activities of related enzymes. *Carbohydr Polym*. 2015 Nov 20;133:104–9.
68. Rosales-López C, Vargas-López A, Monge-Artavia M, Rojas-Chaves M. Evaluation of Conditions to Improve Biomass Production by Submerged Culture of *Ganoderma* sp. *Microorganisms* 2022, Vol 10, Page 1404 [Internet]. 2022 Jul 12 [cited 2024 Aug 27];10(7):1404. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/7/1404/htm>
69. UltiMate™ 3000 RSLCnano System [Internet]. [cited 2024 Nov 2]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ULTIM3000RSLCNANO>
70. Supramani S, Rejab NA, Ilham Z, Ahmad R, Show PL, Ibrahim MF, et al. Performance of Biomass and Exopolysaccharide Production from the Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* in a New Fabricated Air-L-Shaped Bioreactor (ALSB). *Processes* 2023, Vol 11, Page 670 [Internet]. 2023 Feb 22 [cited 2024 Jan 19];11(3):670. Available from: <https://www.mdpi.com/2227-9717/11/3/670/htm>

71. Sun K, Li Z, Lian M, Li Q, Wang R, Gu Y, et al. Characterization of a novel exopolysaccharide from *Acinetobacter rhizosphaerae* with ability to enhance the salt stress resistance of rice seedlings. *Int J Biol Macromol*. 2024 Jan 1;256:128438.
72. Ge Z, Wang D, Zhao W, Wang P, Dai Y, Dong M, et al. Structural and functional characterization of exopolysaccharide from *Leuconostoc citreum* BH10 discovered in birch sap. *Carbohydr Res*. 2024 Jan 1;535:108994.
73. Levander F, Svensson M, Rådström P. Small-scale analysis of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a semi-defined medium. *BMC Microbiol* [Internet]. 2001 Sep 26 [cited 2024 Sep 18];1(1):1–5. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/1471-2180-1-23>
74. Yang B, Kai J, Dai D, Chen G, Hu W. Systematic Optimization of *Ganoderma lucidum* Polysaccharide Fermentation: A Guidance for Industrialization. *Am J Biochem Biotechnol* [Internet]. 2024 Jan 30 [cited 2024 Sep 4];19(4):358–72. Available from: <https://thescipub.com/abstract/ajbbbsp.2023.358.372>
75. Xu YL, Yuan H, Li N, Xiao JH, Xu JW. Increased production and anti-senescence activity of exopolysaccharides in *Ganoderma lingzhi* by co-overexpression of  $\beta$ -1,3-glucan synthase and UDP-glucose pyrophosphorylase. *Int J Biol Macromol*. 2023 Dec 31;253:126778.
76. Yang X, Yang Y, Zhang Y, He J, Xie Y. Enhanced exopolysaccharide production in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* by Tween 80 supplementation. *Bioprocess Biosyst Eng* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2024 Jan 19];44(1):47–56. Available from: <https://ezproxy.ucsm.edu.pe:2178/article/10.1007/s00449-020-02418-1>
77. Li Z, Ji X, Yuan C, Ma S. Bioactivity of *Ganoderma lucidum* and optimization of mycelial fermentation conditions. *BIO Web Conf* [Internet]. 2023 Jun 21 [cited 2024 Sep 5];61:01016. Available from: [https://www.bioconferences.org/articles/bioconf/abs/2023/06/bioconf\\_fbse2023\\_01016/bioconf\\_fbse2023\\_01016.html](https://www.bioconferences.org/articles/bioconf/abs/2023/06/bioconf_fbse2023_01016/bioconf_fbse2023_01016.html)
78. Umar A, Abid I, Elshikh MS, Dufossé L, Abdel-Azeem AM, Ali I. Agitation role (Dissolved Oxygen) in production of laccase from newly identified *Ganoderma multistipitatum* sp. nov. and its effect on mycelium morphology. *BMC Microbiol* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2024 Sep 5];23(1):1–10. Available from: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-023-03009-2>
79. Pessoa VA, Soares LBN, Silva GL, Vasconcelos AS, Silva JF, Fariña JI, et al. Production of mycelial biomass, proteases and protease inhibitors by *Ganoderma lucidum* under different submerged fermentation conditions. *Brazilian Journal of Biology* [Internet]. 2023 May 8 [cited 2024 Sep 5];83:e270316. Available from: <https://www.scielo.br/j/bjb/a/FSg6fK8PCvm5z3g8CbTYNrc/?lang=en>
80. Kim HM, Park MK, Yun JW. Culture pH affects exopolysaccharide production in submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum*. *Appl Biochem Biotechnol* [Internet]. 2006 Sep [cited 2024 Oct 31];134(3):249–62. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1385/ABAB:134:3:249>

81. Fang QH, Zhong JJ. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry*. 2002 Feb 1;37(7):769–74.
82. Rosyida VT, Hayati SN, Apriyana W, Darsih C, Hernawan, Poeloengasih CD. Effects of Cultivating Conditions on the Water Soluble Polysaccharides Content of *Ganoderma lucidum* Mycelium in Submerged Flask Culture. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2024 Nov 3];101(1):012008. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/101/1/012008>
83. Ikegwu UM, Ozonoh M, Okoro NJM, Daramola MO. Effect and optimization of process conditions during solvolysis and torrefaction of pine sawdust using the desirability function and genetic algorithm. *ACS Omega* [Internet]. 2021 Aug 10 [cited 2024 Oct 5];6(31):20112–29. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsomega.1c00857>
84. Silva EDO, Borges LL, Da Conceição EC, Teresa M, Bara F. Box-Behnken experimental design for extraction of artemisinin from *Artemisia annua* and validation of the assay method. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [Internet]. 2017 [cited 2024 Oct 5];27:519–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2017.03.002>
85. Dadkhah H, Behnajady MA. Optimization of photooxidative removal of p-nitrophenol in a spinning disc photoreactor using response surface methodology. *Chem Eng Commun* [Internet]. 2019 Mar 4 [cited 2024 Oct 5];206(3):398–408. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/328329032\\_Optimization\\_of\\_photooxidative\\_removal\\_of\\_p\\_nitrophenol\\_in\\_a\\_spinning\\_disc\\_photoreactor\\_using\\_response\\_surface\\_methodology](https://www.researchgate.net/publication/328329032_Optimization_of_photooxidative_removal_of_p_nitrophenol_in_a_spinning_disc_photoreactor_using_response_surface_methodology)
86. Solairaju JA, Rathinasamy S, Thanikodi S. Modeling for predicting and optimizing of the flexural and hardness properties of jute/kenaf/glass fiber nano-composite through RSM. *Results in Engineering*. 2024 Dec 1;24:102977.
87. Öge E, Nural Yaman B, Buruk Şahin Y. Optimization of biodegradation yield of reactive blue 49: An integrated approach using response surface methodology based marine predators algorithm. *J Microbiol Methods*. 2023 Mar 1;206:106691.
88. Singh G, Goyal S. Dry sliding wear behaviour of AA6082-T6/SiC/B4C hybrid metal matrix composites using response surface methodology. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part L: Journal of Materials: Design and Applications* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2024 Oct 5];232(11):952–64. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/304613219\\_Dry\\_sliding\\_wear\\_behaviour\\_of\\_AA6082-T6SiCB4C\\_hybrid\\_metal\\_matrix\\_composites\\_using\\_response\\_surface\\_methodology](https://www.researchgate.net/publication/304613219_Dry_sliding_wear_behaviour_of_AA6082-T6SiCB4C_hybrid_metal_matrix_composites_using_response_surface_methodology)
89. El Baz AF, Shetaia YMH, Shams Eldin HA, ElMekawy A. Optimization of Cellulase Production by *Trichoderma viride* Using Response Surface Methodology. *Curr Biotechnol* [Internet]. 2016 Feb 5 [cited 2024 Oct 5];7(1):19–25. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/293193015\\_Optimization\\_of\\_Cellulase\\_Production\\_by\\_Trichoderma\\_viride\\_Using\\_Response\\_Surface\\_Methodology](https://www.researchgate.net/publication/293193015_Optimization_of_Cellulase_Production_by_Trichoderma_viride_Using_Response_Surface_Methodology)

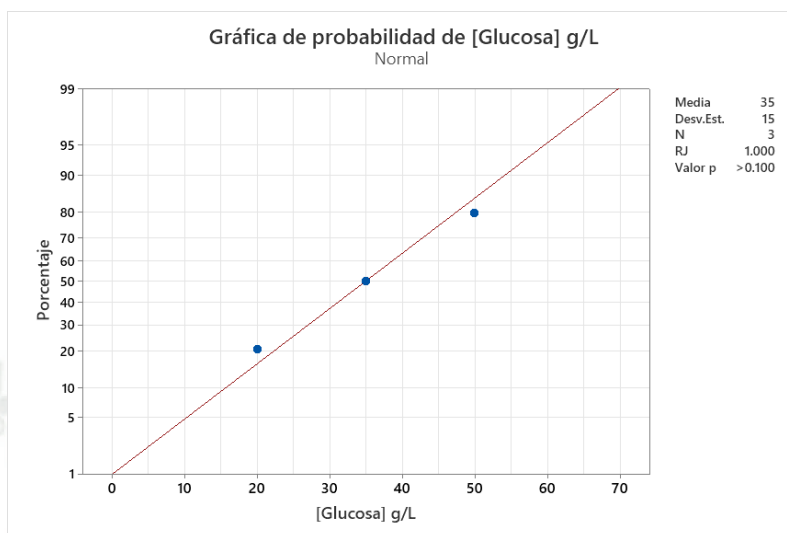
90. Naseri M, Movagharnejad K, Nanvakenari S. Comparison of the dried properties of *Ganoderma lucidum* produced by the convective dryer and infrared dryer. *Sci Rep*. 2023 Dec 1;13(1).
91. Lu H, Dong Q, Yan S, Chen X, Wang X. Development of flexible grouting material for cement-stabilized macadam base using response surface and genetic algorithm optimization methodologies. *Constr Build Mater*. 2023 Dec 15;409:133823.
92. Balamurugan JP, Supramani S, Ahmad Usuldin SR, Ilham Z, Klaus A, Khairul Ikram NK, et al. Efficient biomass-endopolysaccharide production from an identified wild-Serbian *Ganoderma applanatum* strain BGS6Ap mycelium in a controlled submerged fermentation. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2021 Oct 1;37:102166.
93. Hamza A, Khalad A, Kumar DS. Enhanced production of mycelium biomass and exopolysaccharides of *Pleurotus ostreatus* by integrating response surface methodology and artificial neural network. *Bioresour Technol*. 2024 May 1;399:130577.
94. (PDF) Characterization of exopolysaccharide produced by *Ganoderma* sp. TP and its immunomodulatory properties [Internet]. [cited 2024 Sep 27]. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/363889623\\_Characterization\\_of\\_exopolysaccharide\\_produced\\_by\\_Ganoderma\\_sp\\_TP\\_and\\_its\\_immunomodulatory\\_properties](https://www.researchgate.net/publication/363889623_Characterization_of_exopolysaccharide_produced_by_Ganoderma_sp_TP_and_its_immunomodulatory_properties)
95. Sangeetha B, Krishnamoorthy AS, Amirtham D, Jeya D, Sharmila S, Renukadevi P, et al. FT-IR Spectroscopic Characteristics of *Ganoderma lucidum* Secondary Metabolites. *Current Journal of Applied Science and Technology* [Internet]. 2020 Jan 15 [cited 2024 Sep 28];38(6):1–8. Available from: <https://journalcjast.com/index.php/CJAST/article/view/2405>
96. Lundanes E, Greibrokk T. Temperature effects in liquid chromatography. *Adv Chromatogr* [Internet]. 2006 [cited 2024 Nov 2];44:45–77. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/7519170\\_Temperature\\_Effects\\_in\\_Liquid\\_Chromatography](https://www.researchgate.net/publication/7519170_Temperature_Effects_in_Liquid_Chromatography)
97. Temperature effects on retention in reversed phase liquid chromatography - Tran - 2001 - *Journal of Separation Science* - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2024 Nov 2]. Available from: [https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1615-9314\(20011201\)24:12%3C930::AID-JSSC930%3E3.0.CO;2-2](https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1615-9314(20011201)24:12%3C930::AID-JSSC930%3E3.0.CO;2-2)
98. Du B, Meenu M, Liu H, Xu B. A Concise Review on the Molecular Structure and Function Relationship of  $\beta$ -Glucan. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol 20, Page 4032 [Internet]. 2019 Aug 18 [cited 2024 Sep 27];20(16):4032. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/16/4032/htm>
99. Caseiro C, Dias JNR, de Andrade Fontes CMG, Bule P. From Cancer Therapy to Winemaking: The Molecular Structure and Applications of  $\beta$ -Glucans and  $\beta$ -1, 3-Glucanases. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol 23, Page 3156 [Internet]. 2022 Mar 15 [cited 2024 Sep 27];23(6):3156. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/6/3156/htm>

100. Tosh SM, Wood PJ, Wang Q, Weisz J. Structural characteristics and rheological properties of partially hydrolyzed oat  $\beta$ -glucan: the effects of molecular weight and hydrolysis method. *Carbohydr Polym.* 2004 Mar 15;55(4):425–36.
101. Han MD, Han YS, Hyun SH, Shin HW. Solubilization of water-insoluble  $\beta$   $\beta$   $\beta$   $\beta$ -glucan isolated from *Ganoderma lucidum*. *J Environ Biol.* 2008;

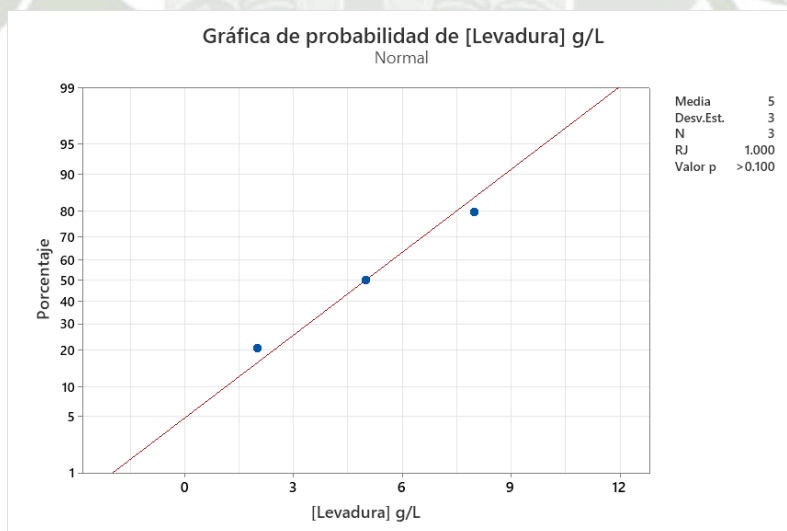


## ANEXOS

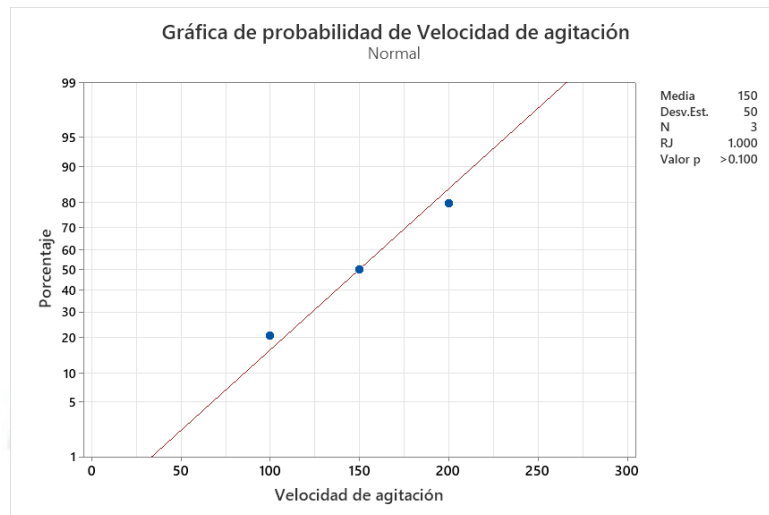
**Anexo 1.** Pruebas de normalidad del efecto de las concentraciones de glucosa, extracto de levadura, de la temperatura, el pH y la velocidad de agitación sobre la concentración de biomasa y EPS.



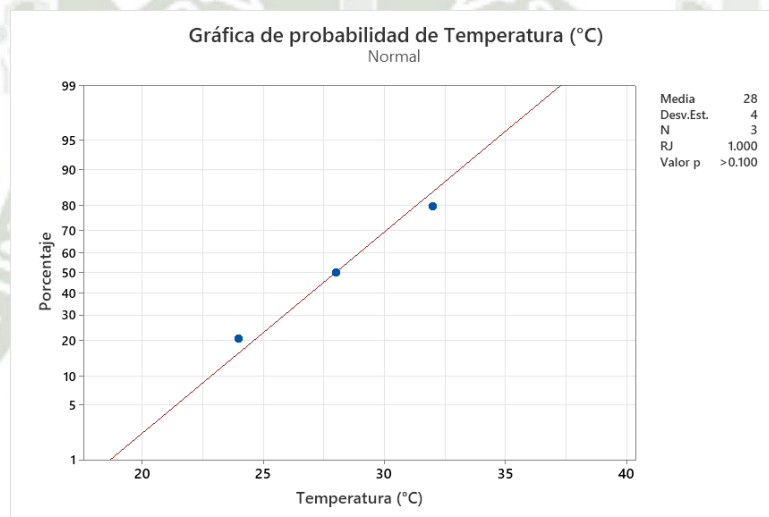
**Figura 22.** Prueba de normalidad de la concentración de Glucosa (g/L)



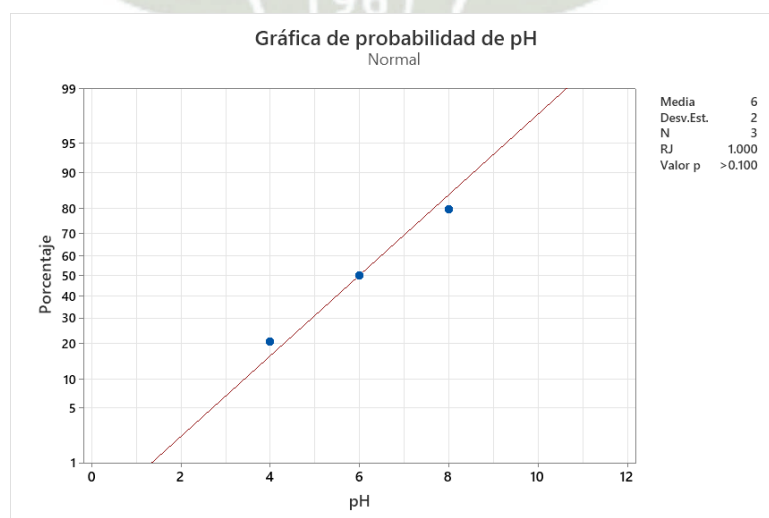
**Figura 23.** Prueba de normalidad de la concentración de extracto de levadura (g/L)



**Figura 24.** Prueba de normalidad de la Velocidad de agitación

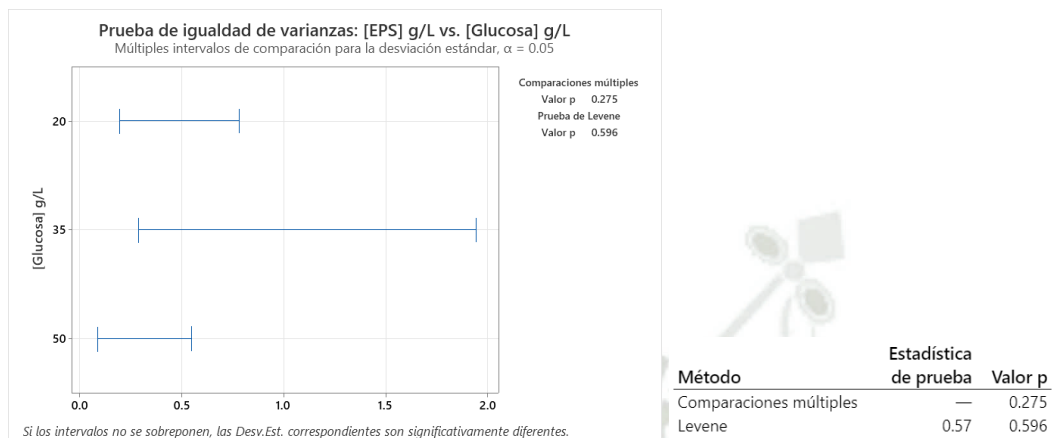


**Figura 25.** Prueba de normalidad de Temperatura (°C)

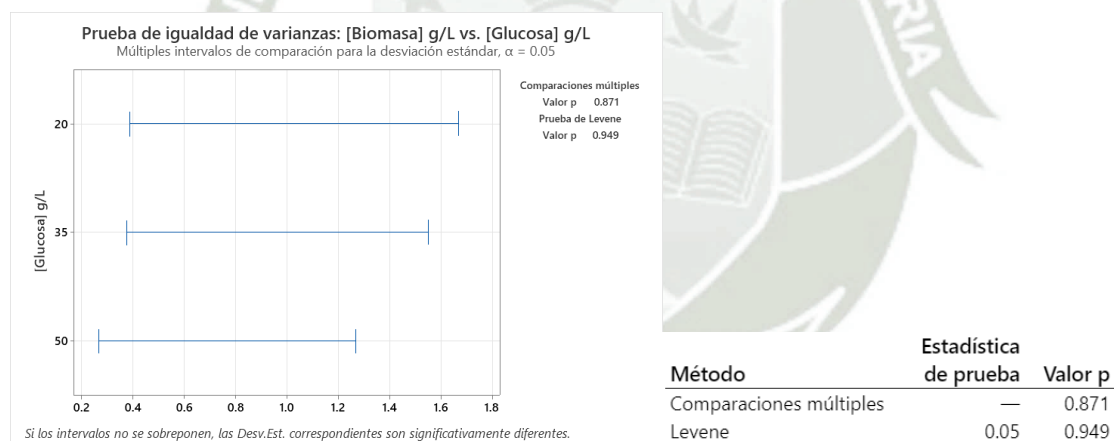


**Figura 26.** Prueba de normalidad de pH

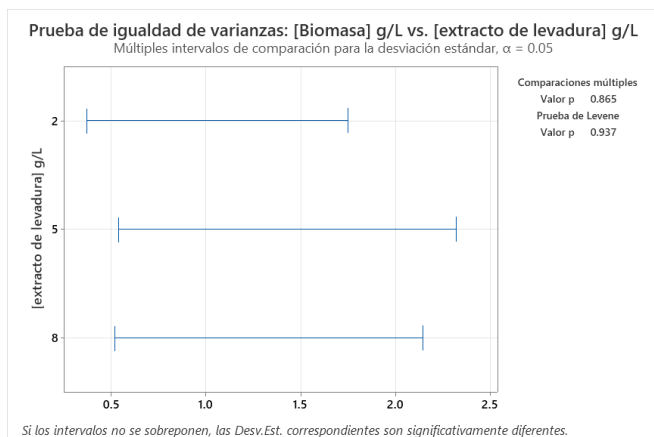
**Anexo 2.** Pruebas de homocedasticidad del efecto de las concentraciones de glucosa, extracto de levadura, de la temperatura, el pH y la velocidad de agitación sobre la concentración de biomasa y EPS.



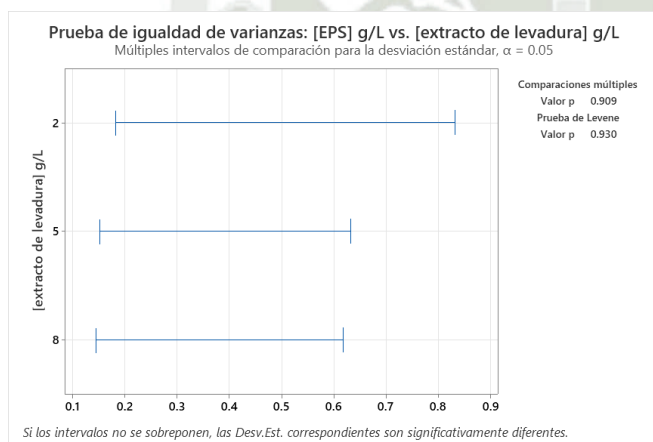
**Figura 27.** Gráfica de homocedasticidad de la producción de EPS en función de la concentración de Glucosa (g/L)



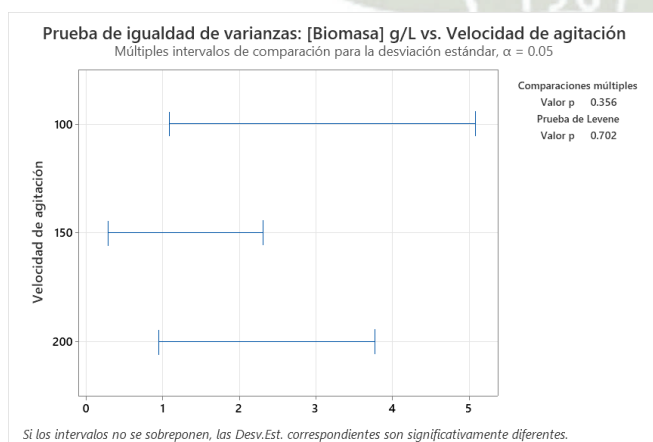
**Figura 28.** Gráfica de homocedasticidad de la producción de biomasa en función de la concentración de Glucosa (g/L)



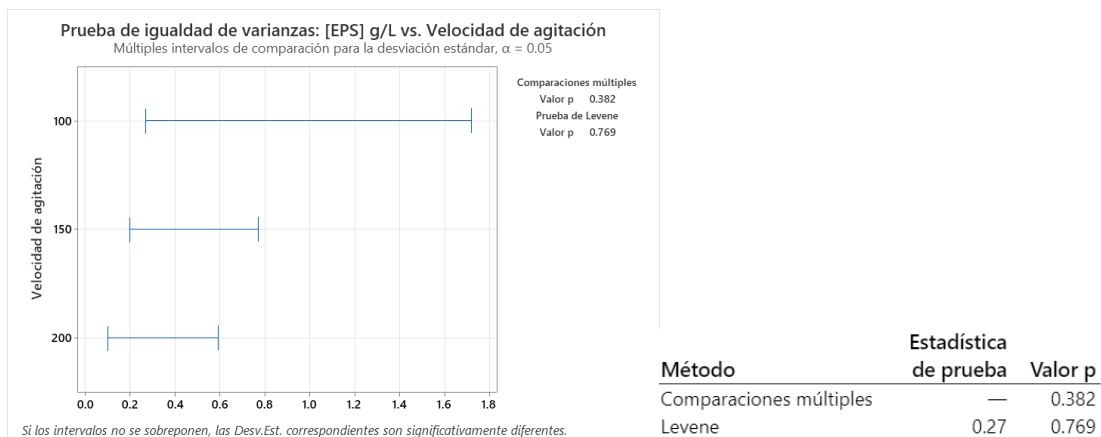
**Figura 29.** Gráfica de homocedasticidad de la producción de biomasa en función de la concentración de extracto de levadura (g/L)



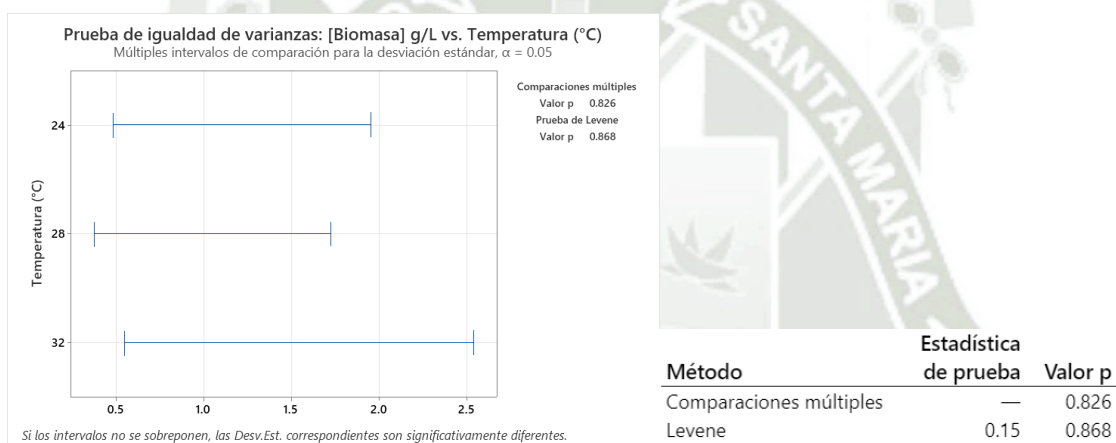
**Figura 30.** Gráfica de homocedasticidad de la producción de EPS en función de la concentración de extracto de levadura (g/L)



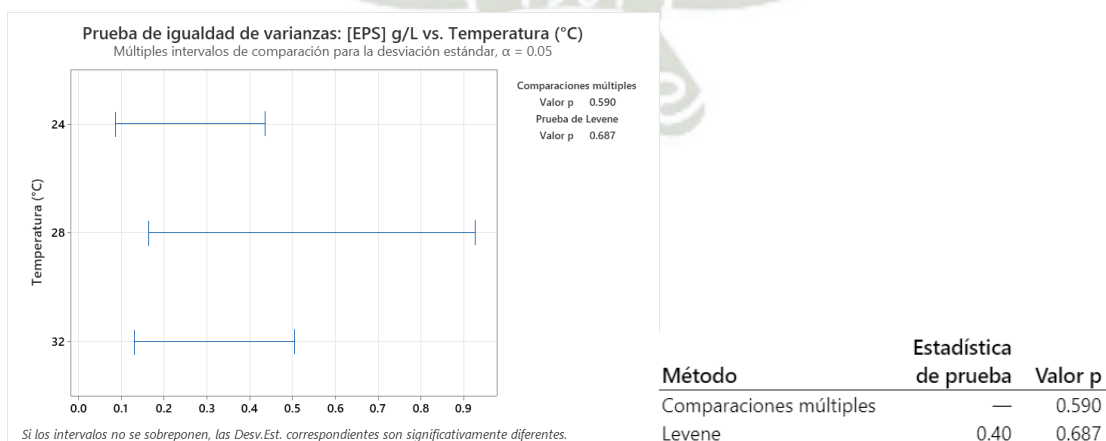
**Figura 31.** Gráfica de homocedasticidad de la producción de biomasa en función de la Velocidad de agitación



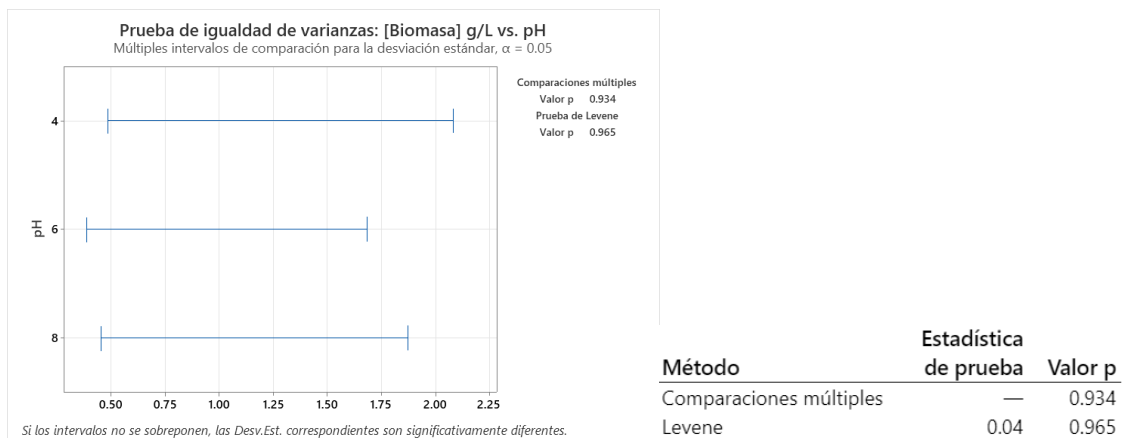
**Figura 32.** Gráfica de homocedasticidad de la producción de EPS en función de la Velocidad de agitación



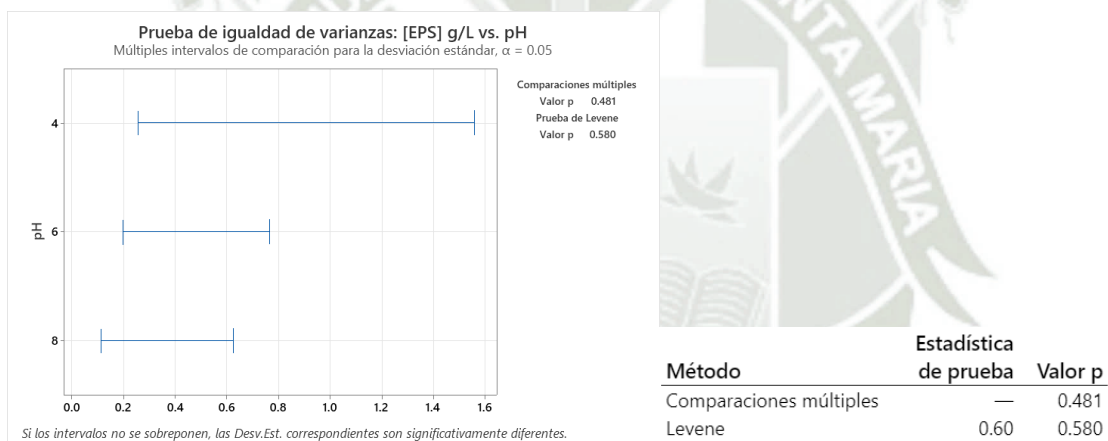
**Figura 33.** Gráfica de homocedasticidad de la producción de biomasa en función de la Temperatura



**Figura 34.** Gráfica de homocedasticidad de la producción de EPS en función de la Temperatura



**Figura 35.** Gráfica de homocedasticidad de la producción de biomasa en función del pH



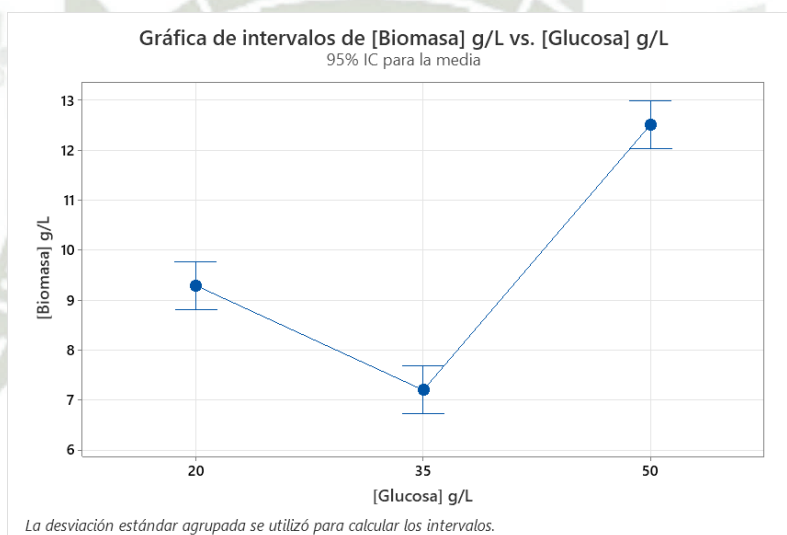
**Figura 36.** Gráfica de homocedasticidad de la producción de EPS en función del pH

**Anexo 3.** Pruebas de independencia del efecto de las concentraciones de glucosa, extracto de levadura, de la temperatura, el pH y la velocidad de agitación sobre la concentración de biomasa y EPS.

**Tabla 10.** Análisis de Varianza de la producción de biomasa en función de la concentración inicial de glucosa

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
[Glucosa] g/L	2	42.8758	21.4379	187.21	0.000
Error	6	0.6871	0.1145		
Total	8	43.5628			



**Figura 37.** Gráfica de intervalos de la concentración de biomasa en función de la concentración inicial de glucosa

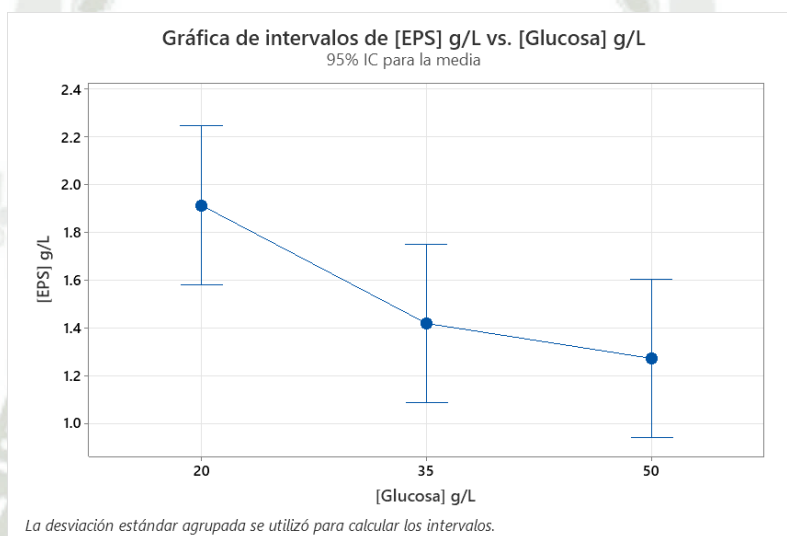
**Tabla 11.** Agrupación de las medias para determinación de significancia de la concentración inicial de glucosa sobre la producción de biomasa

[Glucosa] g/L	N	Media	Agrupación
50	3	12.507	A
20	3	9.290	B
35	3	7.200	C

**Tabla 12.** Análisis de Varianza de la producción de EPS en función de la concentración inicial de glucosa

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
[Glucosa] g/L	2	0.6775	0.33876	6.13	0.035
Error	6	0.3314	0.05523		
Total	8	1.0089			



**Figura 38.** Gráfica de intervalos de la concentración de EPS en función de la concentración inicial de glucosa

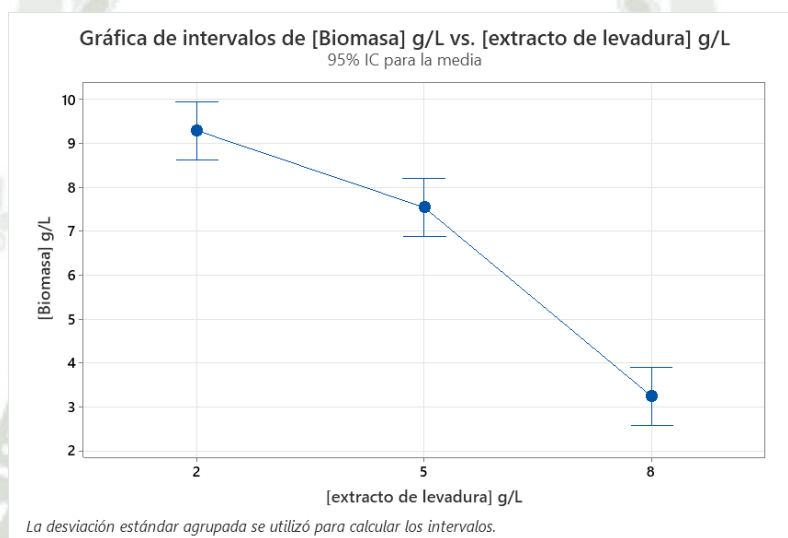
**Tabla 13.** Agrupación de las medias para determinación de significancia de la concentración inicial de glucosa sobre la producción de EPS

[Glucosa] g/L	N	Media	Agrupación
20	3	1.913	A
35	3	1.419	A B
50	3	1.272	B

**Tabla 14.** Análisis de Varianza de la producción de biomasa en función de la concentración inicial de extracto de levadura

**Análisis de Varianza**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
[extracto de levadura] g/L	2	58.158	29.0792	132.21	0.000
Error	6	1.320	0.2199		
Total	8	59.478			



**Figura 39.** Gráfica de intervalos de la producción de biomasa en función de la concentración inicial de extracto de levadura

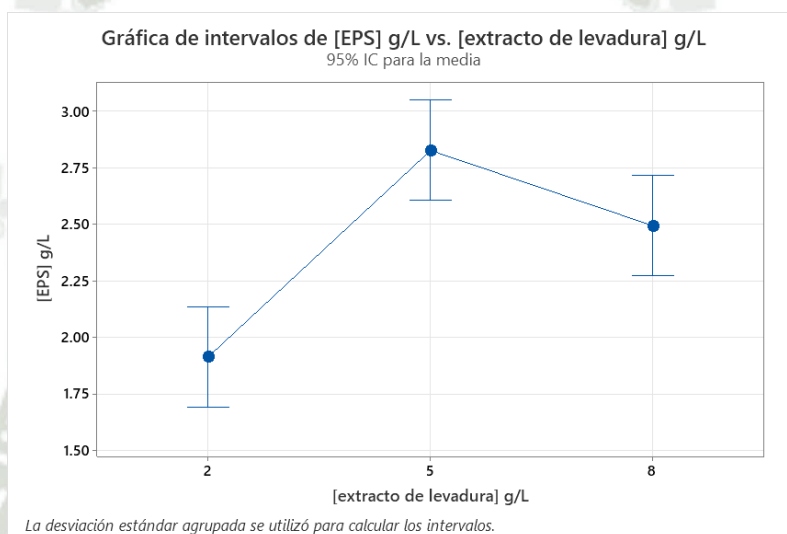
**Tabla 15.** Agrupación de las medias para determinación de significancia de la concentración inicial de extracto de levadura sobre la producción de biomasa

[extracto de levadura] g/L	N	Media	Agrupación
2	3	9.290	A
5	3	7.541	B
8	3	3.240	C

**Tabla 16.** Análisis de varianza para la producción de EPS en función de la concentración inicial de extracto de levadura (g/L)

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
[extracto de levadura] g/L	2	1.2817	0.64084	26.02	0.001
Error	6	0.1478	0.02463		
Total	8	1.4295			



**Figura 40.** Gráfica de intervalos de la producción de EPS en función de la concentración inicial de extracto de levadura

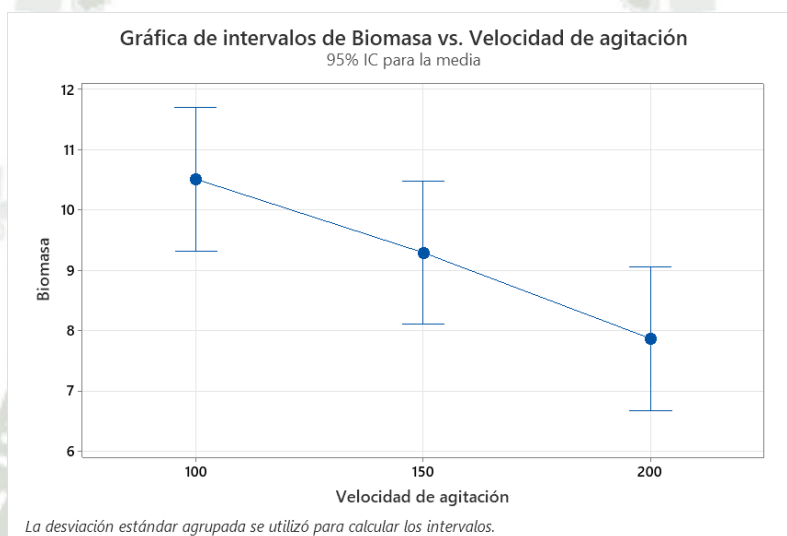
**Tabla 17.** Agrupación de las medias para determinación de significancia de la concentración inicial de extracto de levadura sobre la producción de EPS

[extracto de levadura] g/L	N	Media	Agrupación
5	3	2.8267	A
8	3	2.4933	A
2	3	1.913	B

**Tabla 18.** Análisis de varianza de la producción de biomasa en función de la velocidad de agitación

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Velocidad de agitación	2	10.481	5.2406	7.40	0.024
Error	6	4.249	0.7082		
Total	8	14.730			



**Figura 41.** Gráfica de intervalos de la producción de biomasa en función de la velocidad de agitación

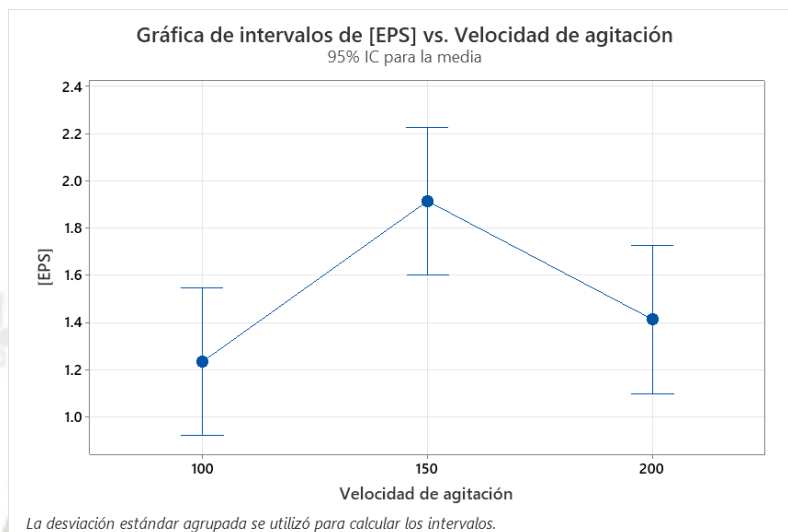
**Tabla 19.** Agrupación de las medias para determinación de significancia de la velocidad de agitación sobre la producción de EPS

Velocidad de agitación	N	Media	Agrupación
100	3	10.507	A
150	3	9.290	A B
200	3	7.866	B

**Tabla 20.** Análisis de Varianza de la producción de EPS en función de la velocidad de agitación.

## Análisis de Varianza

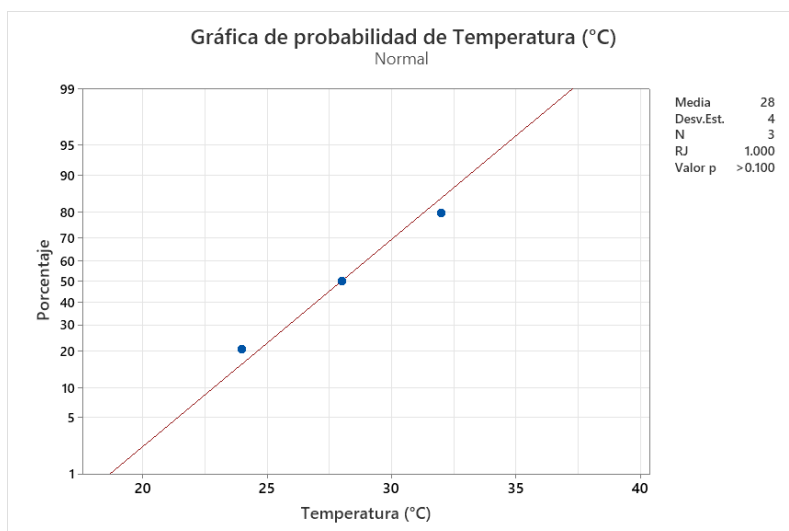
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Velocidad de agitación	2	0.7462	0.37311	7.59	0.023
Error	6	0.2949	0.04914		
Total	8	1.0411			



**Figura 42.** Gráfica de intervalos de la producción de EPS en función de la velocidad de agitación

**Tabla 21.** Agrupación de las medias para determinación de significancia de la velocidad de agitación sobre la producción de EPS

Velocidad de agitación	N	Media	Agrupación
150	3	1.913	A
200	3	1.4120	A B
100	3	1.233	B

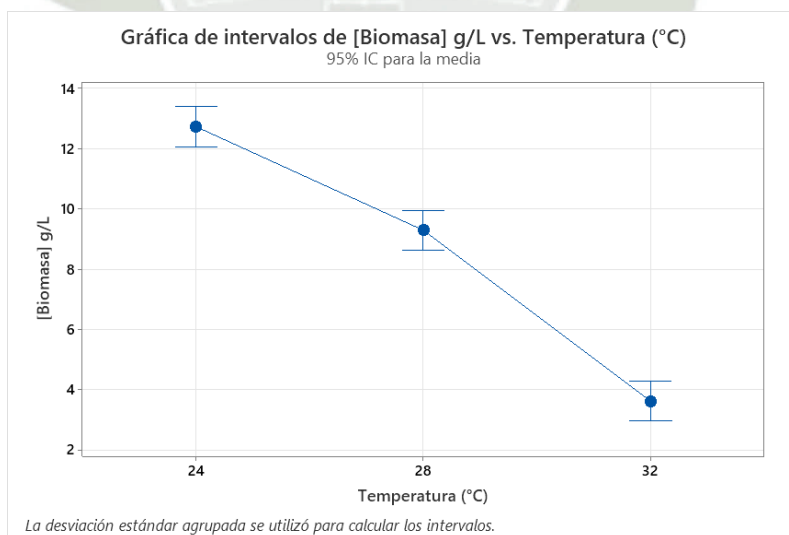


**Figura 43.** Prueba de normalidad de Temperatura (°C)

**Tabla 22.** Análisis de varianza de la producción de biomasa en función de la Temperatura

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Temperatura (°C)	2	126.938	63.4689	290.90	0.000
Error	6	1.309	0.2182		
Total	8	128.247			



**Figura 44.** Gráfica de intervalos de la producción de biomasa en función de la temperatura

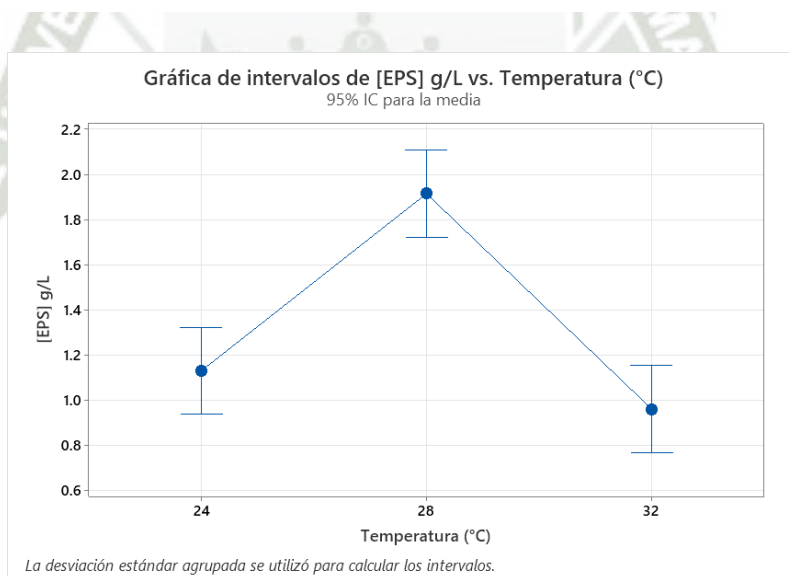
**Tabla 23.** Agrupación de las medias para determinación de significancia de la temperatura sobre la producción de Biomasa

Temperatura (°C)	N	Media Agrupación	
24	3	12.725	A
28	3	9.290	B
32	3	3.617	C

**Tabla 24.** Análisis de varianza para la producción de EPS en función de la Temperatura

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Temperatura (°C)	2	1.5522	0.77609	41.71	0.000
Error	6	0.1116	0.01861		
Total	8	1.6638			



**Figura 45.** Gráfica de intervalos de la producción de EPS en función de la temperatura

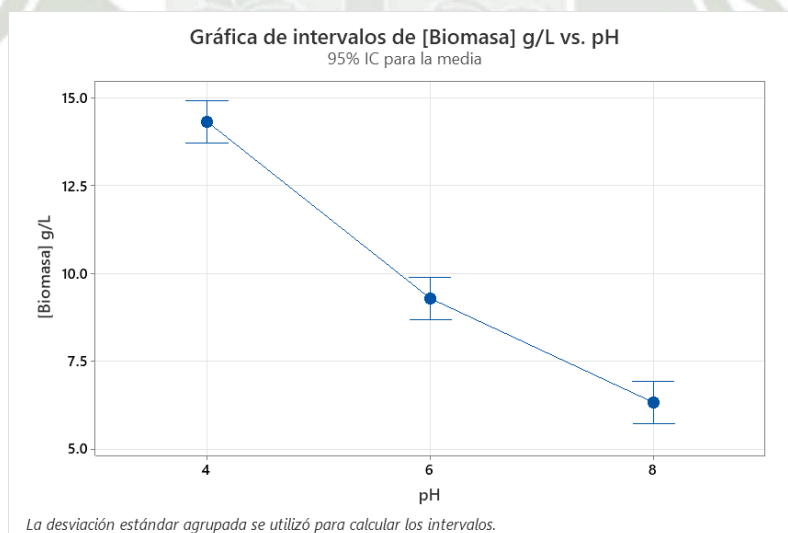
**Tabla 25.** Agrupación de las medias para determinación de significancia de la temperatura sobre la producción de Biomasa

Temperatura (°C)	N	Media	Agrupación
28	3	1.913	A
24	3	1.1293	B
32	3	0.9600	B

**Tabla 26.** Análisis de la varianza para la producción de biomasa en función del pH

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
pH	2	98.309	49.1547	269.42	0.000
Error	6	1.095	0.1824		
Total	8	99.404			



**Figura 46.** Gráfica de intervalos de la producción de Biomasa en función del pH

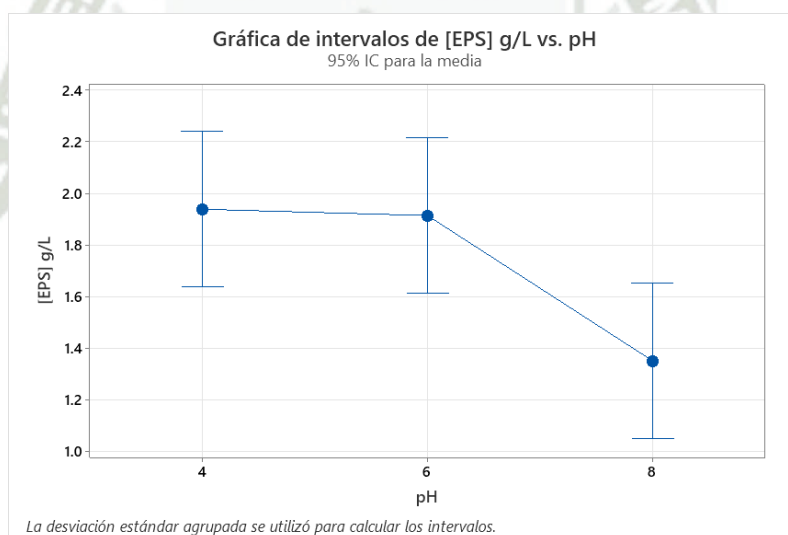
**Tabla 27.** Agrupación de las medias para determinación de significancia de la temperatura sobre la producción de Biomasa

pH	N	Media	Agrupación
4	3	14.330	A
6	3	9.290	B
8	3	6.323	C

**Tabla 28.** Análisis de varianza para la producción de EPS en función de pH

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
pH	2	0.6629	0.33146	7.27	0.025
Error	6	0.2736	0.04561		
Total	8	0.9366			

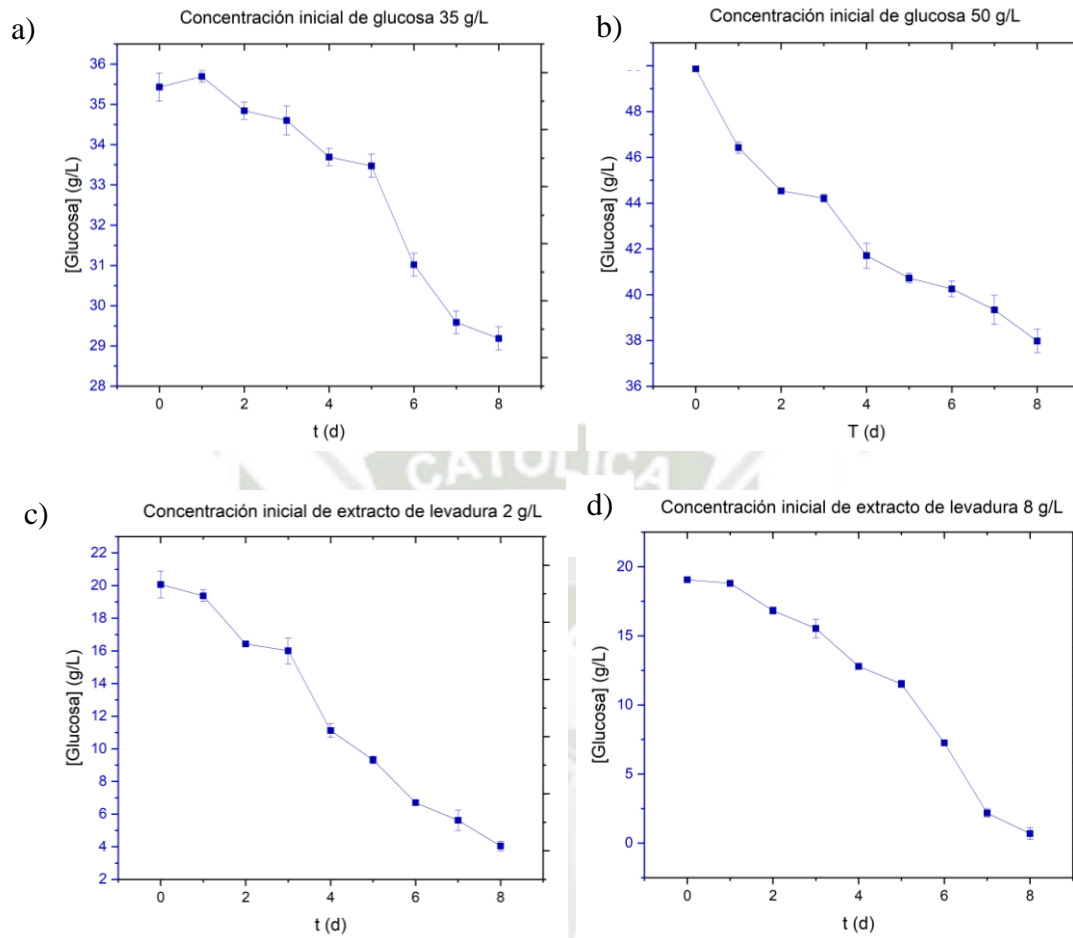


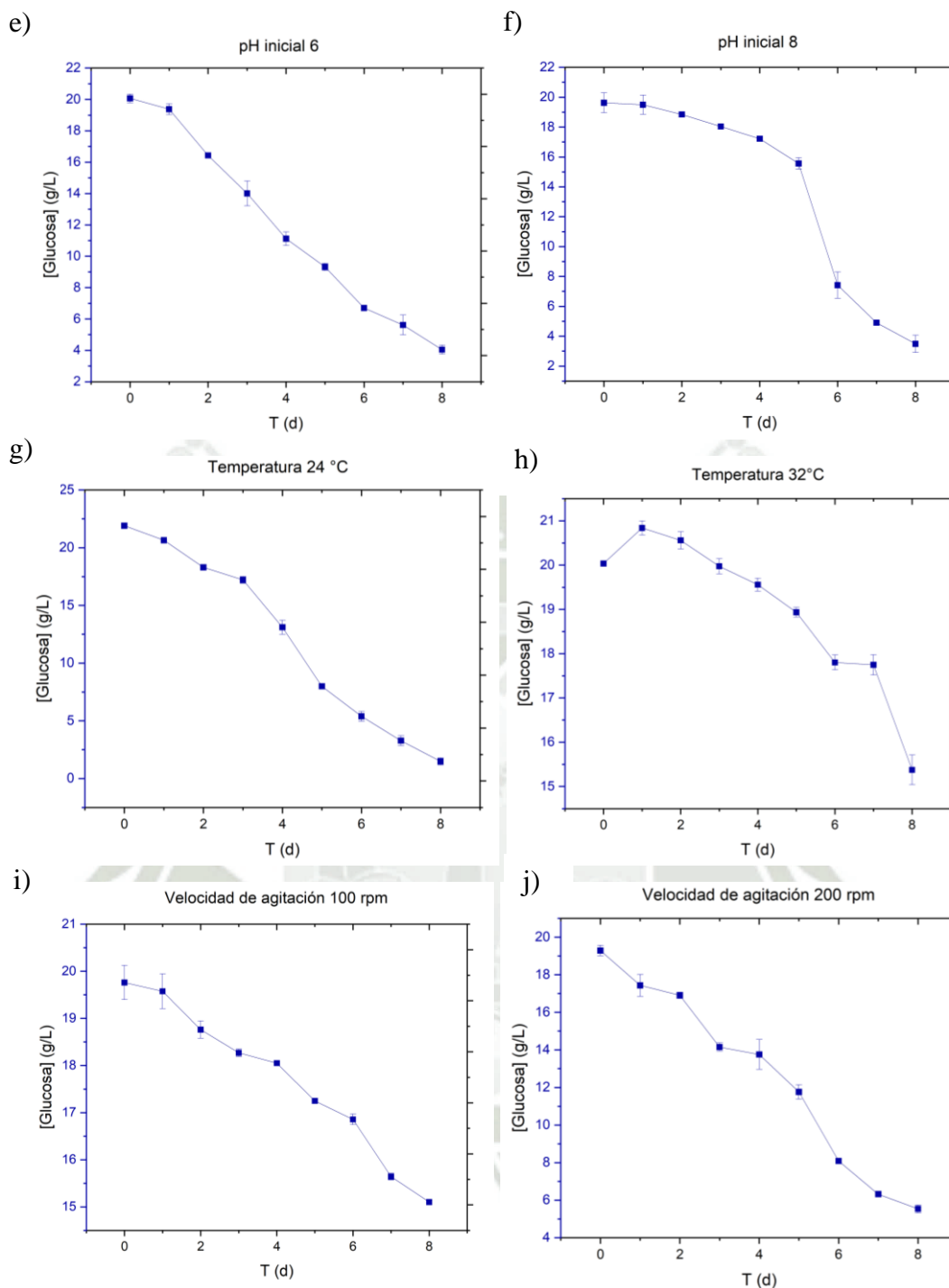
**Figura 47.** Gráfica de intervalos de la producción de EPS en función del pH

**Tabla 29.** Agrupación de las medias para determinación de significancia de la temperatura sobre la producción de EPS

pH	N	Media	Agrupación
4	3	1.938	A
6	3	1.913	A
8	3	1.3503	B

**Anexo 4.** Consumo de glucosa determinado por HPLC





**Figura 48.** Consumo de glucosa determinado por HPLC en función de la concentración inicial de glucosa (a y b); concentración inicial de extracto de levadura (c y d); pH inicial (e y f); Temperatura (g y h); y velocidad de agitación (i y j)