



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Aislamiento y bioactividad de los exopolisacáridos producidos en cultivo sumergido de *Humphreya coffeata*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MONSERRAT GARCÍA GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MAURICIO ALBERTO TRUJILLO ROLDÁN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:
DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNAM

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de abril de 2014, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **GARCÍA GARCÍA MONSERRAT** con número de cuenta **512028622** con la tesis titulada "**Aislamiento y bioactividad de los exopolisacáridos producidos en cultivo sumergido de *Humphreya coffeata***", realizada bajo la dirección del **DR. MAURICIO ALBERTO TRUJILLO ROLDÁN**.

Presidente: DRA. BLANCA HAYDÉ RUÍZ ORDÁZ
Vocal: DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJIA
Secretario: DR. OCTAVIO LOERA CORRAL
Suplente: DR. JUAN MIRANDA RIOS
Suplente: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 4 de julio de 2014.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

Agradecimientos

❧ *Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.*

❧ *Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), No. de becario 270159, Proyecto 178528 (CONACYT-INNOVAPYME 214404) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT-UNAM IN-210013 and IN-209113).*

❧ *A mi tutor el Dr. Mauricio A. Trujillo Roldán por su asesoría y apoyo incondicional en el desarrollo del proyecto.*

A los miembros del comité tutorial.

❧ *Dra. Leticia Rocha Zavaleta por todo el conocimiento brindado, facilitarnos las instalaciones, equipos y reactivos para realizar los ensayos de bioactividad de este trabajo.*

❧ *Dr. Octavio Loera Corral por las valiosas aportaciones y enseñanzas para la realización de este trabajo*

Agradecimientos a título Personal

- ❧ *A mi tutor el Dr. Mauricio A. Frujillo Roldan por aceptar en su grupo de trabajo y apoyar mi desarrollo profesional en todos los ámbitos.*
- ❧ *A la M.C Luz Deisy Marin Palacio por toda la ayuda infinita que siempre presto para la realización de este proyecto.*
- ❧ *A la Dra. Leticia Rocha Zavaleta por toda la ayuda y conocimiento que me brindo.*
- ❧ *A la M. C María Cecilia Aguilar Zacarías por todos los conocimiento, tiempo y paciencia que me brindo.*
- ❧ *Al Ing. Abel blancas y el Biol. Jesús Villegas por el apoyo brindado.*
- ❧ *A la M.C Catalina Giraldo Estrada de la Universidad EAFIT (Medellín-Colombia), por la donación del aislado de *H. coffeata* con el que se realizó este trabajo.*
- ❧ *A la Dra. Norma Adriana Valdez Cruz del IIB UNAM, por la ayuda que siempre nos brindó y por facilitarnos las instalaciones y equipos para la realización de los ensayos de bioactividad para este trabajo.*
- ❧ *A la M.C. Celia Flores Ocampo del IIB UNAM, por el apoyo brindado para la obtención de los pesos moleculares promedios de los EPS de *H. coffeata*.*
- ❧ *Al M.C Ramsés J. García Cabrera UBP UNAM, por el apoyo en la realización de los cultivos en reactor.*
- ❧ *Al Ing. Abel Blancas Cabrera y el Biol. Jesús Villegas de la UBP UNAM, por la colaboración y ayuda durante los cultivos en biorreactor.*
- A los miembros del jurado*
- ❧ *Dra. Blanca Haydé Ruiz Ordáz*
- ❧ *Dra. Rosa Laura Camarena Mejía*
- ❧ *Dr. Juan Miranda Ríos*
- Por todas las valiosas aportaciones que enriquecieron aún más este trabajo*
- ❧ *A todos mis compañeros de laboratorio Andreita, Ram Gamboa, Ram García. Karen, Andrea B, Luis, Pedro, Memo, Martha, Greta, Giroschi, Sara, Andrés, Daniel J, Daniel V, luz y Mafer que siempre que lo necesite me apoyaron*

Dedicatoria

A mi familia y a Zan que los amo

A Deisy por apoyarme siempre

*A mi tía Verónica por brindarme
apoyo siempre que los necesito y por
ser un gran ejemplo para mí*

*Y a todos mis amigos que nunca
dudaron de mí*

“Para el investigador no existe alegría comparable a la de un descubrimiento, por pequeño que sea”

Alexander Fleming

ÍNDICE GENERAL

	ÍNDICE FIGURAS Y TABLAS	IX
	ÍNDICE FIGURAS Y TABLAS DE ANEXOS	XI
I	RESUMEN	1
II	ABSTRACT	3
III	INTRODUCCIÓN	5
IV	ANTECEDENTES	6
	4.1 Polisacáridos y otros metabolitos de interés en hongos	6
	4.2 Bioactividad de los polisacáridos en células tumorales	10
	4.3 <i>Ganoderma lucidum</i> : aspectos generales y propiedades farmacológicas	11
	4.4 Cultivo sumergido	12
	4.5 <i>Humphreya coffeata</i> : aspectos generales	13
V	JUSTIFICACIÓN	15
VI	HIPÓTESIS	16
VII	OBJETIVOS	16
VIII	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	17
IX	METODOLOGÍA	18
	9.1 Cepas y cultivo	18
	9.2 Reactivación del aislado de <i>H. coffeata</i> inoculación en medio de cultivo sumergido	18
	9.3 Métodos de Conservación del aislado	18
	9.4 Cultivos en Matraces	19
	9.5 Cultivos en biorreactor	19
	9.6 Métodos analíticos	20
	9.6.1 Determinación de biomasa	20
	9.6.2 Cuantificación de azúcares	20
	9.6.3 Extracción y cuantificación de exopolisacáridos	21
	9.7 Determinación del Peso Molecular	22
	9.8 Evaluación de Bioactividad	22
	9.8.1 Cultivo Celular	22
	9.8.2 Conteo de células por exclusión de azul de tripano	22
	9.8.3 Ensayo de citotoxicidad	23
	9.8.4 Ensayo de MTT	23
	9.9 Pruebas estadísticas	24
X	RESULTADOS	25
	10.1 Método de conservación	25
	10.2 Definición de las condiciones de cultivo	27
	10.3 Comparación entre cinéticas (inóculo, geometrías y fuentes de carbono)	28

10.3.1	Cinética comparación de inóculo y tipo de geometría	28
10.3.2	Comparación entre medios de cultivo	30
10.4	Análisis Estadísticos	36
10.4.1	Velocidad específica de crecimiento	37
10.4.2	Comparación de rendimientos $Y_{x/s}$ y $Y_{p/x}$	38
10.4.2.1	Rendimiento $Y_{x/s}$	39
10.4.2.2	Rendimiento $Y_{p/s}$	40
10.5	Cultivos en biorreactor	41
10.6	Determinación de pesos moleculares promedio	44
10.7	Ensayos de bioactividad	48
XI	DISCUSIÓN	59
XII	CONCLUSIONES	68
XIII	PERSPECTIVAS	69
XIV	BIBLIOGRAFIA	70
XV	ANEXOS	87
	anexo 1	88
	anexo 2	89
	anexo 3	89
	anexo 4	93
	anexo 5	98

ÍNDICE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1	Diagrama esquemático de los matraces de 250 mL (SCHOTT DURAN®) utilizados en las cinéticas de <i>H. coffeata</i> . a) Matraz convencional, b) matraz bafleado.	20
Figura 2	Ensayo de viabilidad del método de conservación del aislamiento de <i>H. coffeata</i> . Se inoculó papel filtro con micelio de <i>H. coffeata</i> almacenado en agua destilada estéril en una placa con medio FZM y fue incubado a 30°C durante 4 días; considerándose viable el cultivo cuando se presentó crecimiento. En la parte superior de la figura se muestran los resultados de la prueba de viabilidad del método a través del tiempo. En la parte inferior se muestra el crecimiento observado al tiempo 0 (a), 3 (b), 6 (c), 12 (d), 15 (e) y 18 (f) meses de observación.	26
Figura 3	Crecimiento de <i>H. coffeata</i> en los diferentes tipos de geometría de matraz, día 7 de crecimiento. Condiciones del cultivo, medio FZM, 30°C a 150 rpm. a) Matraz bafleado, agregados pequeños b) matraz convencional agregados grandes y c) matraz con resorte, micelio adherido al resorte del matraz.	28
Figura 4	Comparación visual de crecimiento de <i>H. coffeata</i> utilizando la forma de inocular 1 (utilizando un disco de agar de 5mm diámetro). Condiciones de cultivo: 30°C, 150 rpm medio FZM. Observación realizada a los 5 días de la cinética de crecimiento; matraz bafleado (izquierda) donde se observan pequeños agregados y matraz convencional (derecha) donde se observan grandes agregados.	29
Figura 5	Comparación visual de crecimiento de <i>H. coffeata</i> utilizando la forma de inocular 2 (inóculo realizado mediante un preinóculo en matraz bafleado durante 3 días). Condiciones de cultivo: medio FZM, 150 rpm, 30°C. a) Tiempo 0; inóculo disperso derecha matraz convencional, a la izquierda matraz bafleado b) Tiempo final día 20; izquierda matraz convencional agregados pequeños dispersos, derecha matraz bafleado agregados muy pequeños y dispersos.	31
Figura 6	Comparación entre la forma de inocular 1 (utilizando un disco de agar de 5mm diámetro) y 2 (inóculo realizado mediante un preinóculo en matraz bafleado durante 3 días) en cinéticas de crecimiento de <i>Humphreya coffeata</i> . Condiciones de cultivo: 30°C, 150 rpm medio FZM (glucosa), matraz convencional ●, matraz bafleado ▼	33
Figura 7	Comparación de medios de cultivo con diferente fuente de carbono, en cinética de crecimiento de <i>H. coffeata</i> , condiciones de cultivo 30°C, 150 rpm, matraz convencional ●, matraz bafleado ▼.	35
Figura 8	Crecimiento de <i>H. coffeata</i> en biorreactor (30 °C, medio FZM, 300, 450 y 500 rpm). a) cultivo de 3 días, agregados de tamaño uniforme, el micelio comienza a pegarse a las paredes del biorreactor, b) cultivo de 10 días, micelio en su mayoría adherido a las paredes del biorreactor, c) micelio de <i>H. coffeata</i> adherido al impulsor y baffes del biorreactor después de 10 días de cultivo.	42
Figura 9	Cinéticas de crecimiento de <i>H. coffeata</i> en reactor de 14L. Evaluando las velocidades de agitación 300, 450 y 500 rpm. Condiciones de cultivo: medio FZM, 30°C, volumen de trabajo 10L (trabajo en colaboración con la Ing. Diana Carolina Bautista Tovar.	43
Figura 10	Obtención de EPS en cinética de crecimiento de <i>H. coffeata</i> en reactor de 14L. Evaluando las velocidades de agitación 300, 450 y 500 rpm. Condiciones de cultivo: medio FZM, 30°C, volumen de trabajo 10L (trabajo en colaboración con la Ing. Diana Carolina Bautista Tovar).	43
Figura 11	Pesos moleculares promedio de los EPS de <i>H. coffeata</i> correspondientes a cinéticas medio FZM (arriba), medio MPO (abajo) utilizando dos diferentes geometrías matraz Convencional ● y matraz Bafleado ○.	45
Figura 12	Índice de polidispersión (IP) de EPS de <i>H. coffeata</i> correspondientes a cinéticas medio FZM (arriba), medio MPO (abajo), utilizando dos diferentes geometrías matraz. Convencional ● y matraz Bafleado ○.	47
Figura 13	Efecto de los exopolisacáridos de <i>H. coffeata</i> sobre la viabilidad celular. Células K562 fueron incubadas durante 48h en presencia de concentraciones crecientes (500, 1000, 1500, 2500 µg/mL) de EPS obtenidos en cultivos creciendo en medio FZM (a), o medio MPO (b). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT. Como control negativo (control -) se	50

	incluyeron células sin tratamiento, y como control positivo (control +) células tratadas con H ₂ O ₂ al 3%, todos los experimentos fueron realizados por triplicado. * = < 0.05 con respecto al control negativo.	
Figura 14	Efecto de los exopolisacáridos del día 18 de cultivo de <i>H. coffeata</i> sobre la viabilidad celular. Células K562 fueron incubadas durante 48h en presencia de concentraciones crecientes (9.75, 19.5, 39, 78.1, 156.2, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000, 10000 µg/mL) de EPS obtenidos en cultivos creciendo en medio FZM (●), o medio MPO (○). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT. Como control negativo (control -) se incluyeron células sin tratamiento, y como control positivo (control +) células tratadas con H ₂ O ₂ al 3%, todos los experimentos fueron realizados por triplicado. * = < 0.05 con respecto al control negativo.	51
Figura 15	Efecto de los exopolisacáridos del día 16 de cultivo de <i>H. coffeata</i> sobre la viabilidad celular. Células K562 fueron incubadas durante 48h en presencia de concentraciones crecientes (9.75, 19.5, 39, 78.1, 156.2, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000, 10000 µg/mL) de EPS obtenidos en cultivos creciendo en medio FZM (●), o medio MPO (○). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT. Como control negativo (control -) se incluyeron células sin tratamiento, y como control positivo (control +) células tratadas con H ₂ O ₂ al 3%, todos los experimentos fueron realizados por triplicado. * = < 0.05 con respecto al control negativo.	52
Figura 16	Efecto de los exopolisacáridos día 10 de cultivo de <i>H. coffeata</i> en biorreactor sobre la viabilidad celular. Células K562 fueron incubadas durante 48h en presencia de concentraciones crecientes (9.75, 19.5, 39, 78.1, 156.2, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000, 10000 µg/mL) de EPS obtenidos en cultivos creciendo en medio FZM (●). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT. Como control negativo (control -) se incluyeron células sin tratamiento, y como control positivo (control +) células tratadas con H ₂ O ₂ al 3%, todos los experimentos fueron realizados por triplicado. * = < 0.05 con respecto al control negativo.	53
Figura 17	Efecto de los exopolisacáridos del día 16 de cultivo de <i>H. coffeata</i> sobre la viabilidad celular. Células K562 fueron incubadas durante 48h en presencia de concentraciones crecientes (2.5, 5, 10, 15, 20 µg/mL) de EPS obtenidos en cultivos creciendo en medio FZM (●), o medio MPO (○). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT. Como control negativo (control -) se incluyeron células sin tratamiento, y como control positivo (control +) células tratadas con H ₂ O ₂ al 3%, todos los experimentos fueron realizados por triplicado. * = < 0.05 con respecto al control negativo.	55
Figura 18	Efecto de los exopolisacáridos del día 18 de cultivo de <i>H. coffeata</i> sobre la viabilidad celular. Células K562 fueron incubadas durante 48h en presencia de concentraciones crecientes (2.5, 5, 10, 15, 20 µg/mL) de EPS obtenidos en cultivos creciendo en medio FZM (●), o medio MPO (○). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT. Como control negativo (control -) se incluyeron células sin tratamiento, y como control positivo (control +) células tratadas con H ₂ O ₂ al 3%, todos los experimentos fueron realizados por triplicado. * = < 0.05 con respecto al control negativo.	56
Figura 19	Efecto de los exopolisacáridos día 10 de cultivo de <i>H. coffeata</i> en biorreactor sobre la viabilidad celular. Células K562 fueron incubadas durante 48h en presencia de concentraciones crecientes (2.5, 5, 10, 15, 20 µg/mL) de EPS obtenidos en cultivos creciendo en medio FZM (●). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT. Como control negativo (control -) se incluyeron células sin tratamiento, y como control positivo (control +) células tratadas con H ₂ O ₂ al 3%, todos los experimentos fueron realizados por triplicado. * = < 0.05 con respecto al control negativo.	57
Tabla 1	Principales componentes encontrados en polyporales y sus efectos a la salud	7
Tabla 2	Estructuras químicas de polisacáridos antitumorales de basidiomicetos	8
Tabla 3	Resultado de los ensayos preliminares de cultivo de <i>H. coffeata</i> . Se muestra la concentración de biomasa y exopolisacáridos de <i>H. coffeata</i> al día 7 de la cinética de crecimiento en diferente tipo de matraz, utilizando medio FZM, temperatura de 30°C a 150 rpm	28

Tabla 4	Comparativo de los resultados máximos obtenidos en cultivos de <i>H. coffeata</i> , donde se evalúan diferentes parámetros como formas de inóculo, geometría de matraz y medios de cultivo. Inóculo 1 con disco 0.50 mm, inóculo 2 de matraz bafleado, medio FZM (Fang y Zhong 2002), medio MPO (Porras et al 2009), condiciones 30°C, 150 rpm 20 días de cultivo. C (matraz convencional), B (matraz Bafleado).	34
Tabla 5	Velocidad específica de crecimiento obtenida bajo diferentes condiciones de cultivo de <i>H. coffeata</i> . El numero 1 o 2 indica el tipo de inóculo utilizado. Valores con la misma letra no muestran diferencias significativas en los resultados obtenidos con la prueba de Tukey.	38
Tabla 6	Rendimientos obtenidos bajo diferentes condiciones de cultivo de <i>H. coffeata</i> . El número 1 o 2 indica el tipo de inóculo utilizado; FZM medio de cultivo con glucosa y MPO medio de cultivo con lactosa, condiciones: 30°C, 150 rpm, duración de la cinética 20 días. Los días elegidos, fueron donde se presentó la máxima concentración de biomasa y EPS.	39

ÍNDICE FIGURAS Y TABLAS (Anexos)

Figura 1.1	Curva estándar utilizada para el cálculo de consumo de glucosa por <i>H. coffeata</i> en medio FZM.	88
Figura 1.2	Curva Patrón utilizada para el cálculo de consumo de Lactosa por <i>H. coffeata</i> en medio MPO.	88
Figura 2.1	Curva estándar utilizada para el cálculo de células k562 viables.	89
Tabla 3.1	Resultado de las prueba de Tukey. Comparación de μ Inóculo 1 con Inóculo 2 FZM	89
Tabla 3.2	Resultado de las prueba de Tukey. Comparación μ Medio de cultivo MPO vs FZM Inóculo 2	90
Tabla 3.3	Resultado de las prueba de Tukey. Comparación de rendimientos Y x/s Inóculo 1 con Inóculo 2 medio de cultivo FZM	90
Tabla 3.4	Resultado de las prueba de Tukey. Comparación de rendimiento Y x/s Medio de cultivo MPO con FZM Inóculo 2	91
Tabla 3.5	Resultado de las prueba de Tukey. Comparación rendimiento Y p/s Inóculo 1 con Inóculo 2 medio de cultivo FZM	91
Tabla 3.6	Resultado de las prueba de Tukey. Comparación rendimiento Y p/s medio de cultivo MPO con FZM Inóculo 2	92
Tabla 4.1	Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD Filtrado completo día 20 FZM. Se identificaron 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.	93
Tabla 4.2	Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD Filtrado completo día 20 MPO. Se identificaron 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.	93
Tabla 4.3	Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD EPS 16 FZM. Se identificaron 5 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's	94
Tabla 4.4	Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD EPS 16 MPO. Se identificaron 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.	94

Tabla 4.5	Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD EPS 18 FZM. Se identificaron 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.	95
Tabla 4.6	Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD EPS 18 MPO. Se identificaron 5 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.	95
Tabla 4.7	Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD EPS reactor 450 rpm tiempo final cultivado en medio FZM. Se identificaron 6 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.	96
Tabla 4.8	Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD EPS día 16 cultivado en medio FZM. Se identificaron 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.	96
Tabla 4.9	Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD EPS día 16 cultivado en medio MPO. Se identificaron 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.	97
Tabla 4.10	Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD EPS día 18 cultivado en medio FZM. Se identificaron 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.	97
Tabla 4.11	Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD EPS día 18 cultivado en medio MPO. Se identificaron 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.	97
Tabla 4.12	Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD EPS reactor 450 rpm tiempo final cultivado en medio FZM. Se identificaron 6 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.	98

I. RESUMEN

Los hongos producen diferentes compuestos bioactivos, que pueden ser aprovechados en la investigación médica y biotecnológica. Además, pueden ser grandes biorremediadores del medio ambiente y en ocasiones se utilizan en el control de plagas en el campo. Diversos hongos basidiomicetos y ascomicetos han sido estudiados en diferentes campos de la ciencia, siendo la biomedicina uno de los más importantes. En esta área se busca encontrar alternativas de cura que presenten bajos efectos secundarios para diversas enfermedades (cáncer, diabetes, cardiovasculares, respiratorias, obesidad entre otras).

El hongo basidiomiceto *Humprheya coffeata* es conocido en Colombia por sus propiedades medicinales (antiinflamatorio, daños en la piel). Esta característica llevó a que este hongo fuese colectado y adaptado a un medio de cultivo que permitió su manipulación en condiciones controladas de laboratorio. Se reportaron valores de producción de exopolisacáridos (EPS) de hasta 6.8 ± 0.3 g/L (Porras *et al* 2009); Mientras que los valores reportados para otros hongos basidiomicetos estudiados por sus efectos (antitumoral, antibacterial, antioxidante entre otros) benéficos a la salud como *G. lucidum* cultivados en medio sumergido, apenas alcanzan valores cercanos a 1.6 g/L (Baskar *et al* 2011; Elisashvili 2012).

El presente trabajo se enfocó en mejorar la producción y caracterización de EPS mediante la evaluación del crecimiento de *H. coffeata* en diferentes condiciones de cultivo: utilizando dos geometrías de matraz (convencional y bafleado), dos fuentes de carbono (glucosa, lactosa) y dos formas de inóculo (inóculo tipo 1, disco de agar 5mm de diámetro; inóculo tipo 2, preinóculo en matraz bafleado).

Asimismo, se evaluó la producción de EPS en un reactor de 10L a diferentes velocidades de agitación (300, 450 y 500 rpm). Finalmente, se evaluó la actividad biológica de los EPS mediante ensayos de citotoxicidad utilizando como modelo la línea celular de leucemia mieloide crónica K562.

Los resultados mostraron que la mayor concentración de EPS se obtiene al cultivar *H. coffeata* en medio MPO (lactosa), utilizando un preinóculo de matraz

bañeado (4.50 ± 0.20 g/L) en comparación con lo obtenido utilizando el medio FZM (glucosa) con un valor de 1.50 ± 0.21 g/L. Interesantemente, cuando se escala el cultivo a biorreactor, agitado a una velocidad de 450 rpm, se obtiene una cantidad mayor de EPS (6 g/L al día 10). Los pesos moleculares obtenidos de los EPS, mostraron diferentes valores durante el transcurso de la cinética, siendo de mayor peso los obtenidos al cultivar *H. coffeata* en medio FZM tanto en los cultivados en matraz convencional (19880 Da) y matraz bañeado (18912 Da), como en los obtenidos en el cultivo de reactor agitado a 450 rpm (47666 Da).

Finalmente, los ensayos de citotoxicidad mostraron que existe un efecto citotóxico utilizando bajas concentraciones de EPS ($9.5 \mu\text{g/mL}$) en la línea celular de leucemia mieloide crónica K562.

Los resultados obtenidos, permiten postular a *H. coffeata* como una fuente para la obtención de metabolitos secundarios (EPS, IPS) con posibles aplicaciones médicas (medicamento antitumoral o auxiliar en el tratamiento contra el cáncer).

II. ABSTRACT

The fungi produce different bioactive compounds, which can be utilized in medical and biotechnological research. In addition, they could be used in environmental bioremediators and sometimes are used as pest controllers in the field. Many fungi have been studied in different fields of science; biomedicine is one of the most important. In this we seek to find alternative cure for various diseases that present low side effects.

The mushroom *Humprheya coffeata* is known in Colombia for its medicinal properties. For this reason led to this fungus was adapted to a culture medium that allowed their manipulation in controlled laboratory conditions. Previously, production values of exopolysaccharides (EPS) of up to 6.8 ± 0.3 g/L were reported (Porras et al. 2009); While the values reported in other fungus studied because of its beneficial to health as *G. lucidum* cultivated on submerged medium, barely reaches values close to 1.6 g/L (Baskar et al 2011; Elisashvili 2012).

The present work is focused on improving the production and characterization of EPS by assessing the growth of *H. coffeata* under different culture conditions: using two geometries of shake flask, two carbon sources (glucose, lactose) and two forms of inoculum (inoculum type 1, agar disk 5mm in diameter; inoculum type 2, preinoculum in baffled shake flask). Likewise, it is evaluated the production of EPS in a 10L reactor under different speeds of agitation (300, 450 and 500 rpm). Finally, the evaluation of bioactivity of the EPS was performed by cytotoxicity assays using as a model the cell line of chronic myeloid leukemia K562.

The results showed that the largest concentration of EPS is obtained cultivating *H. coffeata* in culture medium MPO (lactose), using a preinoculum from blaffled shake flask (4.50 ± 0.20 g/L) compared with those obtained using the medium FZM (glucose) with a value of 1.50 ± 0.21 g/L.

Interestingly, when scaling the cultivation to reactor, agitated at a speed of 450 rpm, is obtained a larger quantity of EPS (6 g/L). The molecular weights obtained from the EPS, showed different values during the course of the kinetics. EPS with the

highest molecular weights were obtained by cultivating *H. coffeata* in FZM medium, either in conventional shake flask (19880 Da), baffled shake flask (1810 Da) or agitated bioreactor at 450 rpm (47666 Da). Finally, the bioactivity tests showed that there exists a cytotoxic effect using low concentrations of EPS (9.5 µg/ml) on the cell line of chronic myeloid leukemia K562.

The results obtained allow us to postulate to *H. coffeata* as a source for obtaining secondary metabolites with possible medical applications.

III. INTRODUCCIÓN

Los polisacáridos son biopolímeros compuestos de monosacáridos unidos por enlaces glicosídicos, pueden ser clasificados en 2 grupos basados en su origen. El primero lo conforman aquellos obtenidos de organismos como algas, plantas, por microorganismos y animales. El segundo grupo lo conforman los polisacáridos semisintéticos que son producidos por la modificación química o enzimática (Zong *et al* 2012). Una de las fuentes naturales de obtención de polisacáridos son los hongos, los cuales han sido utilizados en la medicina tradicional, en algunos países como Japón, China y Corea donde se les atribuyen propiedades que contribuyen al bienestar y mejora de la salud (Miyazaki and Nishijima 1981; Xie. *et al* 2006). En los últimos 30 años, se han llevado a cabo investigaciones con aislamientos de diversos hongos basidiomicetos como *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus blazei* (Lu *et al* 2004; Russell and Paterson 2006; Liu *et al* 2012; El Enshasy *et al* 2013), con el fin de identificar varios componentes y metabolitos secundarios, como: polisacáridos, ácidos ganodéricos, terpenoides, proteínas, esteroides, alcaloides, policétidos y compuestos fenólicos (Elisashvili 2012; Jie-Quin *et al* 2011; Xie *et al* 2012). Se ha reportado que algunos componentes causan efecto citotóxico en células tumorales. Así mismo componentes presentan efectos proliferativos (en bajas concentraciones) en células de cáncer cervical (HeLa y LnBI) como también se han observado efectos antioxidantes (Porras *et al* 2009), y se han reportado algunos otros beneficios a la salud como efecto antidiabético (Russell and Peterson 2006; Xu *et al* 2011). En muchos de los casos, son polisacáridos que actúan como componentes bioactivos, estos tienen diferente composición química, pero en su mayoría se presentan como glucanos con enlaces (1→3)-β, (1→6)-β y (1→3)-α. Se ha postulado que los polisacáridos obtenidos de hongos no actúan directamente en las células cancerígenas, pero llegan a producir efectos antitumorales por la activación de la respuesta inmunes en el hospedero (Deshmukh y Rai 2005; Zhu *et al.* 2012).

IV. ANTECEDENTES

4.1 Polisacáridos y otros metabolitos de interés en hongos

Se estima que existen alrededor de 140,000 especies de hongos en la Tierra y menos del 10% han sido identificados. Muchos de estos hongos comprenden una fuente aún inexplorada de productos naturales con distintas actividades biológicas importantes (antiviral, antitumoral, antioxidante, antibiótica) para la medicina moderna (Wasser 2002).

Las propiedades medicinales son atribuidas a varios componentes y metabolitos secundarios (polisacáridos, proteínas, compuestos fenólicos, triterpenos policétidos, esteroides, alcaloides, nucleótidos entre otros), aislados principalmente de cuerpos fructíferos, micelio y medio de cultivo (Elisashvili 2012).

Existen alrededor de 650 especies de hongos que tienen actividad antitumoral. En su mayoría hongos pertenecientes al filum basidiomycota. Un ejemplo son los Polyporales que han sido evaluados por sus beneficios a la salud (tabla 1), donde se reporta que contienen más de 400 diferentes metabolitos con actividad biológica (Elisashvili 2012). Varios de los metabolitos descritos en hongos son glucanos o polisacáridos compuestos de no menos de 26 especies diferentes que han demostrado tener propiedades antitumorales e inmunomodulatorias (Chang 2002; Rusell y Paterson 2006).

Los polisacáridos con propiedades antitumorales aislados de basidiomicetos pueden ser ácidos o neutros con diferentes enlaces glicosídicos y con grandes diferencias en estructura química (tabla 2). En diversas especies de basidiomicetes los polisacáridos se encuentran unidos a proteínas o péptidos, esta unión favorece a una mejor actividad antitumoral. Se ha reportado que diferencias en pesos moleculares, estructuras terciarias o conformación y composición afectan la actividad antitumoral de los polisacáridos, en general polisacáridos con una configuración β 1-3, 1-4 o cadenas 1-6 son necesarios para una la actividad antitumoral. Polisacáridos de cadenas complejas ramificadas y con altos pesos moleculares tienen mejor

actividad inmunoestimulante (Chang 2002, Rusell y Paterson 2006; Zhang et al 2007).

Tabla1. Principales componentes encontrados en polyporales y sus efectos a la salud.

Componentes	Efecto	Referencia
Adenosina	Agregación antiplaquetaria	Kawagishi <i>et al</i> 1997; Shimizu <i>et al</i> 1985
Lectinas	Mitogénica	Ngai and Ng 2004; Zhao <i>et al</i> 2005; Zhang <i>et a</i> 2010
Polisacáridos	Antifibrótico	Park <i>et al</i> 1997
	Antiherpético	Eo <i>et al</i> 1999; Kim <i>et al</i> 2000; Oh <i>et al</i> 2000.
	Anti-inflamatorio	Ukai <i>et al</i> 1983;
	Hepatoprotector	Zhang <i>et al</i> 2002
	Hipoglucémico	Hikino <i>et al</i> 1989; Hikino and Mizuno 1989;
	Inmunó-modulador, anti-tumoral	Tomoda <i>et al</i> 1986; Zhang and Lin 2004; Gao <i>et al</i> 2000; Li <i>et al</i> 2000; Li and Zhang 2000; Lee <i>et al</i> 2001; Lin <i>et al</i> 2001; Zhu <i>et al</i> 2012; Kimura 2013; Giavasis 2014.
	Varios (radio protector, genotóxico, antioxidante)	Mau <i>et al</i> 2005; Asatiani <i>et al</i> 2007; Lin <i>et al</i> 2010; Xu <i>et al</i> 2011; Elisashvilli 2012.
Proteínas	Inmunomoduladorio	Van der Hem <i>et al</i> 1995
Terpenoides	Anti-bacterial	Van der Hem <i>et al</i> 1995
	Anti-complemento	Smania <i>et al</i> 1999
	Anti-inflamatorio	Kleinwächter <i>et al</i> 2001
	Antioxidante	Zhu <i>et al</i> 1999
	Agregación antiplaquetaria	Shiao 1992
	Antiviral	Mothana <i>et al</i> 2003
	Citotóxica	Gao <i>et al</i> 2002; Gonzalez <i>et al</i> 2002; Kimura <i>et al</i> 2002; Lin <i>et al</i> 1999; Su <i>et al</i> 2000; Wu <i>et al</i> 2001 Lee <i>et al</i> 1998
	Inhibidores enzimáticos	Chen and Yu 1999; Kim <i>et al</i> 1999
	Hepatoprotector	Komoda <i>et al</i> 1989; Shiao 1992
	Hipolipemiente	Morigiwa <i>et al</i> 1986
	Hipotensor	

Tabla 2. Estructuras químicas de polisacáridos antitumorales de basidiomicetos

Polisacáridos	Tipo de enlace	Hongo fuente	Cadena principal	Ramificación
Homoglucano	(1→3) -β-D glucano	<i>Lentinus edodes</i> (Mizuno 1997)	(1→3) -β-D glucano	(1→6) -β
	Con 1-6 ramas	<i>Schizophyllum commune</i> (Yamamoto 1981)	(1→3) -β-D glucano	(1→6) -β
		<i>Grifola frondosa</i> (Zhuang et al 1994)	(1→3) -β-D glucano	(1→6) -β
		<i>Sclerotium sclerotia</i> (Palleschi et al 2005)	(1→3) -β-D glucano	
		<i>Pleurotus tuber-regium</i> (Zhang et al 2003)		(1→6) -β
	Lineal (1→3) -β-D glucano	<i>Auricularia Auricula</i> (Ukai et al 1983)	Lineal(1→6)-β glucano	
		<i>Lyophyllum decaste</i> (Ukawa et al 2000)	(1→3) -β-D glucano	
		<i>Armillariella tabescens</i> (Kiho et al 1992)	(1→3) -α- glucano	
	Lineal(1→6)-β glucano	<i>Poria cocos</i> (Kanayma et al 1986)	(1-6) β- glucano	(1→2) -β
	(1→3) -β-D glucano con 1-2 o 1.6 ramas	<i>Armillariella tabescens</i> (Kanayma et al 1986)		(1→6) -β
(1→3) -α- glucano	<i>Amanita muscaria</i> (Kiho et al 1992)		(1→4) -α-	
(1→4) -α-(1-6) β- glucano	<i>Agaricus Blazei</i> (Mizuno 1992; Mizuno 1998)		(1→4) -α- (1→6) -β	
Heterogalactano	Glucogalactano	<i>Ganoderma tsugae</i> (Peng et al 2005)	Galactano	Glucosa
	Arabinoglucano	<i>Pleurotus citrinopileatus</i> (Wang et al 2005)	Galactano	Arabinosa
	Fucogalactano	<i>Sarcodon aspratus</i> (Mizuno et al 2000)	Galactano	Fucosa
	Manogalactano	<i>Pleurotus pulmonarios</i> (Wasser 2002)	Galactano	Manosa
	Fucomanagalactano	<i>Grifola frondosa</i> (Cun et al 1994)	Galactosa	Fucosa y manosa

Tabla 2. Continuación

Polisacáridos	Tipo de enlace	Hongo fuente	Cadena principal	Ramificación
Heteroglucanos	(1→3)-β-D	<i>Ganoderma lucidum</i>	Glucoronoglucano	_____
	Glucoronoglucano	(Mizuno 1998)		
	Xiloglucano	<i>Grifola frondosa</i> (Mizuno <i>et al</i> 1995; Zhuang <i>et al</i> 1994)	Glucano	Xilosa
		<i>Polyporus confluens</i> (Sugiyama <i>et al</i> 1992)		
		<i>Pleurotus pulmonarius</i> (Wasser, 2002)		
	Arabinoglucano	<i>Ganoderma tsugae</i> (Wang <i>et al</i> 1993)	Glucano	Arabinosa
	Riboglucano	<i>Agricus blaize</i> (Mizuno 1992; Mizuno 1998)	Glucano	Ribosa
		<i>Flammulina velutipes</i> (Zeng 1990)		
	Galactomanoglucano	<i>Hohenbuehelia serótina</i> (Ma <i>et al</i> 1991)	Glucano	Galactosa y manosa
		<i>Leocupaxillus giganteus</i> (Wasser 2002)		
	Galactoxiloglucano	<i>Hericium erinaceus</i> (Kawagishi <i>et al</i> 1990; Mizuno 1992; Mizuno 1998)	Glucano	Galactosa y xilosa
	Manoxiloglucano	<i>Grifola frondosa</i> (Cun <i>et al</i> 1994; Zhuang <i>et al</i> 1994;	Glucano	Manosa y xilosa
	xilagalactoglucano	<i>Inonotus obliquus</i> (Kim <i>et al</i> 2005)		
			Glucano	Xilosa y galactosa
	Manoxiloglucano	<i>Ganoderma lucidum</i> (Liao <i>et al</i> 2013)	Glucanos	Manosas y xilosas
	1,6-α-D-glucopiranosil	<i>Auricularia polytricha</i> (Zhou <i>et al</i> 2013)	Glucano	Glucopiranosil
	(1→3),(1→6)-β-D-glucano	<i>Lactarius rufus</i> (Ruthes <i>et al</i> 2013)	Glucano	Glucopiranososa
	α-D-glucano	<i>Ganoderma capense</i> (Li <i>et al</i> 2013)	Glucano	Glucopiranosil
	(1-3,1-6)-β glucano	<i>Candida albicans</i> (Lowman <i>et al</i> 2014)	Glucano	

4.2 Bioactividad de los polisacáridos en células tumorales

Los polisacáridos son compuestos bioactivos que se encuentran en hongos, líquenes, bacterias, plantas superiores y marinas, así como en animales en todo el mundo. Se ha sugerido que los polisacáridos pueden inhibir el crecimiento tumoral a través de los siguientes mecanismos: 1) actividad anti-cáncer directa, tales como la inducción de la apoptosis de las células tumorales; 2) actividad inmunomodulatoria (activación de la respuesta inmune) y 3) la inhibición de la metástasis tumoral (Zong *et al* 2012; Chang 2002; Chang *et al* 2009). Sin embargo los polisacáridos mejor caracterizados y clínicamente relevantes son los encontrados en hongos que figuran en la medicina China tradicional como productos herbales de amplia distribución como Ganodex, Immuna, Lentinex, Immunoglukan, Pure Red Reishi Capsule, LifeShield, Bene-X y Zymucan (El Enshasy *et al* 2013)

Uno de los responsables del efecto inmune de los productos herbales es una forma compleja de polisacáridos conocidos como β glucanos. Los β glucanos son la forma más abundante de polisacáridos encontrados en la pared celular de hongos y bacterias (Chan *et al* 2009). Se ha sugerido que el alto grado de complejidad estructural que presentan los polisacáridos está asociado con la capacidad inmunomodulatoria y efecto anti cancerígeno, también se han propuesto 2 mecanismos de acción responsables del efecto anti cáncer de los polisacáridos, uno es vía directa con efecto citotóxico y la otra es indirecta a través de acción inmunomodulatoria (Wasser 2002; Borchers *et al* 2004). Estudios *in vitro* señalan que los β -glucanos actúan sobre diferentes receptores del sistema inmune como los de tipo Dectina-1, receptores del complemento (CR3) y TLR-2/6, que activan a un grupo de células inmunes como: macrófagos, neutrófilos, monocitos, células natural “killer” y células dendríticas (Chan *et al* 2009). Como consecuencia de la activación de células del sistema inmune, tanto la respuesta inmune innata y la respuesta adaptativa pueden ser moduladas por la β -glucanos. También pueden potenciar la fagocitosis opsónica (marcado al patógeno para su fagocitosis y destrucción por células del sistema fagocítico mononuclear) y no opsónica. Por otro lado, en estudios *in vivo* (usando ratones BALB/c), después de la administración oral, la mayoría de los

β -glucanos al entrar en el intestino delgado son capturados por los macrófagos que los internalizan vía dectina-1, TLR 2/6 y fragmentan dentro de las células, los pequeños fragmentos de β -glucanos son finalmente liberados por los macrófagos y absorbidos por otra células del sistema inmune (granulocitos, monocitos, vía receptor CR3) que finalmente desencadenarán la respuesta inmune, como la fagocitosis de la célula tumoral (Chan *et al* 2002; Chan *et al* 2009).

4.3 *Ganoderma lucidum*: aspectos generales y propiedades farmacológicas

La especie *Ganoderma lucidum* es un hongo basidiomicete que posee diferentes metabolitos (en su mayoría polisacáridos y terpenoides) obtenidos principalmente del cuerpo fructífero, micelio y caldos de cultivo (Elisashvili 2012; Zhou 2014; Phan 2014); que muestran diversas actividades biológicas, tales como la inducción de supresión del crecimiento de células tumorales, producción de citocinas, aumento de la actividad inmune, inducción de la apoptosis, citotoxicidad, actividad antioxidante entre otros (Chang y Lu 2004; Miyazaki y Nishijima 1981; Russel y Peterson 2006; Wu *et al* 2006; Xie *et al* 2006; Xie *et al* 2012; Liu *et al* 2012). El cuerpo fructífero de donde se han obtenido la mayoría de los metabolitos, está constituido por una estructura multicelular y es donde se producen las esporas (Ulloa y Hanlin 1978). Esta estructura ha sido usada en la medicina tradicional china desde hace más de 2000 años, figurando en la farmacopea como uno de los medicamentos con alto potencial curativo contra enfermedades como el cáncer, diabetes y cardiovasculares, además de ser un considerado como promotor de longevidad. Es conocido comúnmente en algunos países asiáticos como Japón y China con el nombre de Lingzhi (que significa “hierba que potencia el espíritu”), Reishi o Ling-shin.

El basidiomicete *G. lucidum* pertenece al orden de los polyporales, los cuales se caracterizan por tener una distribución principalmente en zonas tropicales y templadas del mundo (característicamente en aquellas donde abunda la humedad y se cuentan con poca luz), incluyendo Asia, Europa, África, Norteamérica y Sudamérica (Herrera y Ulloa 2005). Otra de las características de este orden es que la mayoría de las especies son lignícolas (que crecen en sustratos ricos en ligninas

como la madera de los árboles) y muchas de las especies pueden producir metabolitos de interés farmacológico (Carvajal y Rendón 2004).

En la mayoría de los ensayos biológicos realizados con *G. lucidum* donde se mide la citotoxicidad, se utiliza el cuerpo fructífero, el cual es secado para poder llevar a cabo la extracción de los metabolitos (polisacáridos ácidos ganodéricos, entre otros) y finalmente realizar los ensayos de citotoxicidad. Por otro lado, también se ha reportado que se pueden extraer metabolitos como los polisacáridos del micelio, esporas y de cultivos de hongos llevados a cabo en medios líquidos (Russel y Peterson 2006; Elisashvili 2012).

Por otro lado, a pesar de que los polisacáridos y triterpenos son conocidos como los principales ingredientes activos, los diferentes procesos por los que ejercen su efecto anti cancerígenos siguen sin estar bien definidos (Kao *et al* 2013). Por lo tanto, la comprensión de los mecanismos de acción anti cancerígena puede dar lugar a un uso más específico de los derivados activos de *Ganoderma* como agentes anti-cáncer. Algunos de los procesos en los que contribuyen los polisacáridos son: la inducción de la respuesta inmune a través de la unión de los polisacáridos a receptores de células inmunológicas (CR3, TLR 2/6), Propiciando actividad antioxidante e inhibición de angiogénesis (Zhou 2007; Chan *et al* 2009). Por otro lado los efectos atribuidos a los triterpenos se asocian con el arresto del ciclo celular, el efecto citotóxico, la actividad antioxidante y la reducción del potencial metastásico general. Sin embargo es importante señalar que son necesarios más estudios para poder dilucidar cuales son los mecanismos de acción que ejercen los polisacáridos y triterpenos en células tumorales (Kao *et al* 2013).

4.4 Cultivo sumergido

En diferentes reportes de hongos basidiomicetes la extracción de componentes bioactivos se lleva a cabo en su mayoría a partir del cuerpos fructífero (cultivos que pueden tomar de 3 a 5 meses), en menor proporción los metabolitos son derivados

de micelio y esporas, finalmente en un grado escaso los bioactivos son obtenidos de filtrados de cultivo de hongos llevados a cabo en medios líquidos (Elisashvili 2012; Fang y Zhong, 2002).

El cultivo sumergido para hongos fue desarrollado durante los 1970s. Surgió como una alternativa prometedora y eficiente para la producción de metabolitos a bajo costo (desarrollada principalmente en hongos microscópicos); Este proceso puede llevarse a cabo en tan solo pocos días bajo condiciones controladas, permitiendo ahorrar tiempo, flexibilidad al manipular nutrientes y condiciones de cultivo (temperatura, pH, oxígeno entre otros). El principal objetivo de este método es agregar el medio líquido a un fermentador, tanque agitado o matraz, esto incrementará el oxígeno disuelto contenido en el medio, lo que mejorará el metabolismo respiratorio de hongos miceliales, a la vez que permite observar los efectos de estrés que se pueda ocasionar en el desarrollo del hongo y su posible repercusión en la producción de metabolitos de interés (Wagner et al. 2004, Zhou et al 2011).

4.5 *Humphreya coffeata*: aspectos generales

En el hemisferio sur del continente Americano, específicamente en Colombia habita *Humphreya coffeata* al que se le atribuyen propiedades medicinales (antiinflamatorio, ayuda a tratar daños en la piel) similares a las de *G. lucidum*. Estos hongos basidiomicetos comparten ciertas características taxonómica propias de la familia *Ganodermataceae* a la que pertenecen ambas especies (Porrás et al. 2009). A continuación se describe la clasificación taxonómica llevada a cabo por la Dra. Ana Esperanza Franco de la Universidad de Antioquia Colombia (Porrás 2007).

Reino: Fungí, **Phylum:** Basidiomycota, **Categoría:** Hymenomycetos, **Clase:** Homobasidiomycetes, **Orden:** Aphyllohorales, **Familia:** Ganodermataceae, **Género:** *Humphreya*, **Especie:** *coffeata*.

Humphreya coffeata fue colectado en Tierra alta (Departamento de Córdoba, Colombia), lugar en donde los nativos le conocen por sus propiedades benéficas a la

salud, cualidad que impulso el interés por investigar los componentes de este basidiomiceto, posicionándolo como un candidato para llevar a cabo ensayos citotóxicos que permitan conocer los diferentes metabolitos producidos por *H. coffeata* y su potencial antitumoral. En 2007 Porras diseñó un medio de cultivo apropiado para la producción de biomasa y exopolisacáridos, además reportó que los componentes extracelulares de los cultivos *H. coffeata* tienen efecto citotóxico en una línea celular de leucemia linfoide (Jurkat) a bajas concentraciones, se encontró también a bajas concentraciones un efecto proliferativo en un líneas celulares epiteliales de cáncer cervical (HeLa y InBl) y ningún efecto sobre queratinocitos no tumorales (HaCaT), adicionalmente también se reportó que este hongo tiene efectos genotóxico y antioxidantes (Jurkat).

V. JUSTIFICACIÓN

Debido a que el filtrado del cultivo del hongo *Humphreya coffeata* presentó actividad antitumoral y antioxidante, este hongo al igual que otros basidiomicetes como *G. lucidum*, *T. besicolor* y *A. blazei*, comprenden una fuente inexplorada de productos naturales con potencial farmacéutico. Entre los metabolitos que podríamos encontrar en este hongo como responsables del efecto antitumoral y antioxidante son polisacáridos en micelio y exopolisacáridos en el medio de cultivo, cuya complejidad estructural está asociada con su efecto inmunomodulatorio y efecto anticáncer. La mayoría de los polisacáridos de hongos basidiomicetes con efecto antitumoral se han obtenido principalmente del cuerpo fructífero, micelio y medio de cultivo. El medio de cultivo representa una alternativa rápida para la obtención de metabolitos de interés como los polisacáridos en un corto tiempo. Sin embargo, las condiciones de cultivo (agitación, pH, fórmula del medio de cultivo, temperatura entre otros) pueden afectar el desarrollo del hongo durante el cultivo, influyendo en la estructura y tipo de polisacárido producido. Debido a esto es importante conocer cuáles son las condiciones adecuadas para el cultivo de *H. coffeata* que nos permita la producción de metabolitos como polisacáridos con efecto antitumoral.

VI. HIPÓTESIS

Los exopolisacáridos producidos por *Humphreya coffeata* en cultivo sumergido tienen bioactividad citotóxica en la línea celular de leucemia mieloide crónica K562.

VII. OBJETIVOS

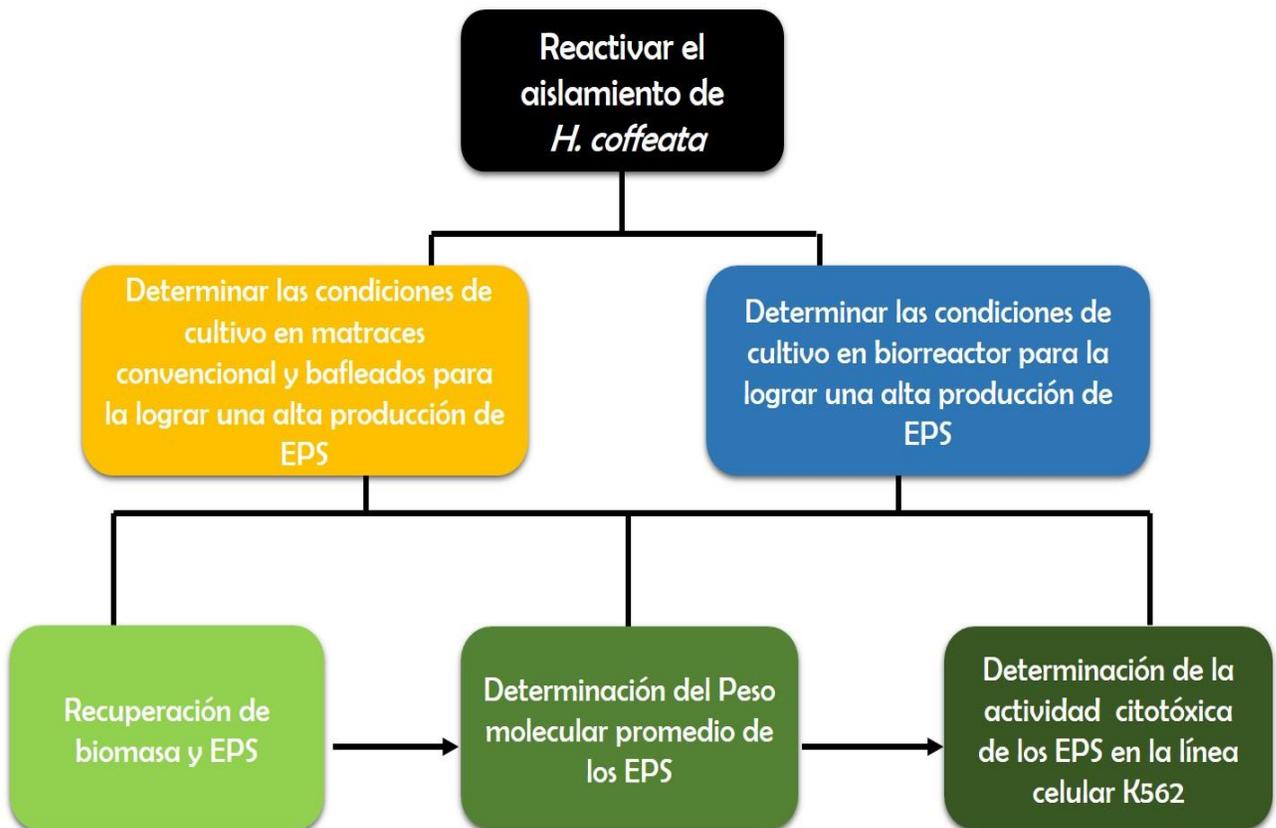
Objetivo General

Obtener y caracterizar exopolisacáridos de *Humphreya coffeata* en cultivo sumergido y determinar sus capacidad citotóxica en la línea celular de leucemia mieloide crónica K562.

Objetivos Particulares

- Evaluar la producción de exopolisacáridos, crecimiento celular y morfología de *H. coffeata* en cultivos sumergidos en diferente geometría de matraz.
- Determinar el peso molecular promedio de los EPS producidos en cultivos sumergidos en matraces y fermentador.
- Transferir la producción de cultivo sumergido de *H. coffeata* de matraces a biorreactor evaluando el crecimiento y morfología de *H. coffeata*, así como también la producción de exopolisacáridos
- Caracterizar la bioactividad de los exopolisacáridos producidos de *H. coffeata* en la línea celular de leucemia mieloide crónica K562 mediante ensayos de citotoxicidad.

VIII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



IX. METODOLOGÍA

9.1 Cepas y cultivo

En el presente trabajo se utilizó un aislamiento de *Humphreya coffeata* el cual proviene de un aislamiento donado por la M. en C. Catalina Giraldo Estrada de la colección de la Universidad EAFIT (Medellín-Colombia) previamente colectado en el poblado de Tierra alta, Córdoba, Colombia (Porrás *et al*, 2009).

9.2 Reactivación del aislado de *H. coffeata* inoculación en medio de cultivo sumergido

Se reactivó el aislado de *H. coffeata* resemebrándolo en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (200g/L de papa en trozos, 20g/L dextrosa, 15 g/L agar) y se incubo a 30°C durante 5 días Ulloa y Hanlin (1978). Posteriormente, se transfirió a cultivo sumergido (35 g/L de glucosa, 2.5 g/L extracto de levadura, 5.0 g/L peptona, 1.0 g/LK₂H₂PO₄•H₂O, 0.5 g/LMgSO₄•7H₂O y 0.05 g/L Vitamina B1), medio modificado descrito por Fang y Zhong (2002) el cual se nombró durante todo el ensayo como FZM. Se mantuvo en agitación a 150 rpm (Incubadora de agitación C25 New Brunswick Scientific; diámetro de agitación de 2.54 cm) a 30°C con un pH inicial de 5.5 por 7 días en la oscuridad (Porrás 2007).

9.3 Métodos de Conservación del aislado

Una parte importante para el trabajo con organismos vivos es el o los métodos que se utilizan para preservar vivo a dicho organismo, en el caso de los hongos filamentosos, existen métodos de conservación a corto y largo plazo. Algunos métodos a largo plazo implican congelación o liofilización y son recomendados para hongos que produzcan esporas ya que estas tienen más posibilidades de sobrevivir.

Para el aislado vegetativo de *H. coffeata* no se recomiendan métodos de conservación que impliquen congelación, por este motivo se evaluó un método a largo plazo que conserva el micelio en papel filtro, garantizando la viabilidad hasta por 18 meses (García-García *et al* 2014).

Humphreya coffeata se cultivó en medio sólido malta glucosa (20 g/L de extracto de malta, 20 g/L de glucosa, 1 g/L peptona, Ulloa y Hanlin 1978), en la misma caja Petri se colocaron tiras de papel filtro estéril y se incubaron a 30°C durante 7 días. Transcurridos los 7 días el micelio pobló toda la caja incluyendo las tiras de papel las cuales fueron retiradas y se colocadas en tubos con agua destilada estéril de 4.0 mL, los cuales se almacenaron a 4°C (Castellani 1939, 1963, 1964; López *et al* 2012).

9.4 Cultivos en Matraces

Los cultivos se llevaron a cabo utilizando matraces de 250 mL de dos diferentes geometrías (convencional y bafleado figura 1 Gamboa-Suasnavart *et al* 2011) con 50 mL de medio. Se utilizaron dos medios de cultivo, medio FZM (35g/L de glucosa, 2.5 g/L extracto de levadura, 5.0 g/L peptona, 1.0 g/L $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.05 g/L Vitamina B1, Fang y Zhong 2002) y medio MPO (50 g/L de Lactosa, 5.0 g/L extracto de levadura, 5.0 g/L peptona, 1.0 g/L $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.05g/L Vitamina B1, pH 4.5, Porras 2007).

Adicionalmente, se utilizaron 2 tipos de inóculo. El Inóculo 1 fue elaborado con un disco de 5 mm de cultivo en agar FZM de *H. coffeata*. El Inóculo 2, se elaboró mediante un preinóculo en matraz bafleado durante 3 días, del que posteriormente se utilizó para inocular cada matraz con 1 mL. Los cultivos se incubaron a 30°C a 150 rpm (Incubadora de agitación C25 New Brunswick Scientific; diámetro de agitación de 2.54 cm) durante 20 días.

9.5 Cultivos en biorreactor

Los cultivos en biorreactores se llevaron a cabo en volúmenes de 10 L (New Brunswick Scientific, modelo FS-314), utilizando el medio FZM, mismo que se utilizó para los crecimientos en matraz (35 g/L de glucosa, extracto de levadura 2.5 g/L, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L, y Vitamina B1 0.05 g/L, pH 5.5 Fang y Zhong 2002). El biorreactor está equipado con dos turbinas tipo Rusthon de 6 paletas planas y un difusor de 5 orificios para efectuar la aireación por burbujeo. La tensión de oxígeno disuelto (TOD) se siguió mediante un electrodo polarográfico de oxígeno

(Ingold). Las señales de TOD, pH, el control de temperatura y agitación fueron guardadas en línea mediante una PC y un sistema de control y automatización Dusher Inc (Trujillo-Roldán *et al* 2013).

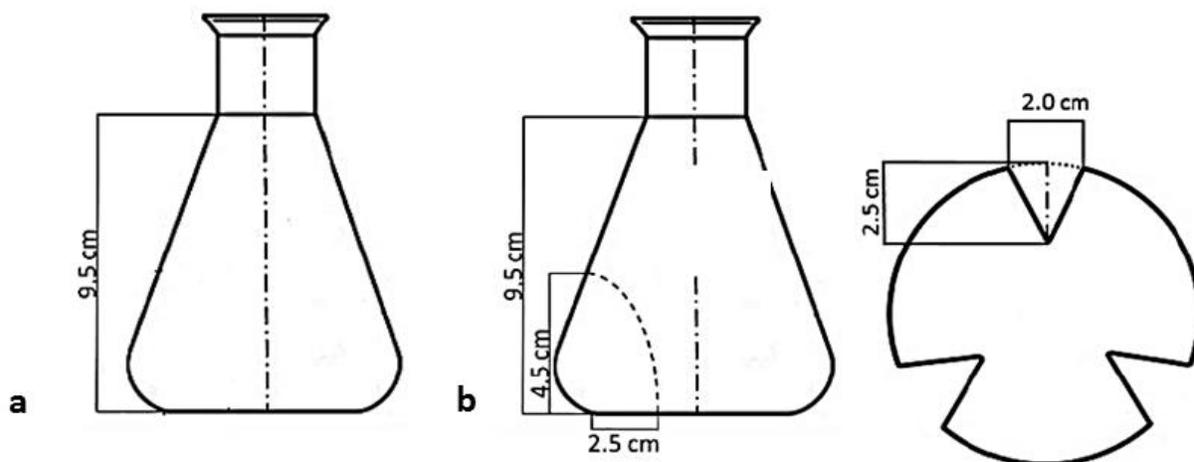


Figura 1. Diagrama esquemático de los matraces de 250 mL (SCHOTT DURAN®) utilizados en las cinéticas de *H. coffeata*. a) Matraz convencional, b) matraz bañeado.

9.6 Métodos analíticos

9.6.1 Determinación de biomasa

La biomasa de *H. coffeata* se determinó por un método gravimétrico de peso seco, filtrando al vacío todo el cultivo celular a través de papel Whatman® No.1 o 4 (previamente pesado). Posteriormente, se retiró el sobrenadante (de donde posteriormente se extrajeron los EPS) y se lavó la biomasa con agua destilada. Posteriormente, se secó la biomasa a 70 °C durante 24 horas, para obtener (por diferencia de pesos) la cantidad de biomasa (Fang y Zhong 2002, Porras *et al.* 2009).

9.6.2 Cuantificación de azúcares

Los azúcares reductores se determinaron por el método de DNS ácido 3,5-dinitrosalicílico (un azúcar reductor es aquel que poseen subgrupo carbonil intacto, y que a través del mismo pueden reaccionar con otras moléculas, el azúcar reductor

más abundante es la glucosa, Berg *et al* 2008). Este es un método colorimétrico el cual está basado en la hidrólisis de la sacarosa, lactosa entre otras y la posterior medición de los azúcares reductores libres por medio de la reducción del ácido dinitrosalicílico el cual formará un compuesto nitro-aminado color amarillo, en el cual su densidad óptica es proporcional a la concentración de grupos reductores (Miller 1959, Porras *et al* 2009, Trujillo- Roldan 2003).

La solución DNS se preparó con 16 g/L de NaOH, 300 g/L de tartrato de sodio y 10 g/L de DNS se mezclaron en el orden citado (menos el DNS) en 1L de agua destilada, se calentó para lograr una disolución total, adicionando el DNS poco a poco para evitar que se precipite.

Finalmente, en tubos de ensayo de 15 mL se agregó 1.0 mL de caldo de cultivo y se adicionó 1.5 mL de DNS, se calentaron los tubos hasta ebullición durante 5 minutos y después se enfriaron en baño de hielo, posteriormente a cada tubo se le agregaron 10 mL de agua destilada y se leyó la absorbancia a 450 nm contra un blanco (agua) de reactivos. Para realizar cálculos se utilizó curva patrón hecha para cada ensayo y fuente de carbono (Anexo 1).

9.6.3 Extracción y cuantificación de exopolisacáridos

La técnica de extracción de EPS se basa en la precipitación de polisacáridos con isopropanol y cuantificación gravimétrica de los mismos. En un tubo de 50 mL se agregaron 30 mL de isopropanol y se adicionaron 10 mL de caldo de cultivo (previamente obtenido al filtrar el cultivo en matraz para obtener la biomasa) y se dejaron en reposo 1 h, se filtró el precipitado en membranas de policarbonato Nucleopore de 0.45 μm (previamente pesada), la cual se secó a 70°C durante 24 h. Finalmente, se pesó la membrana y se calculó (por diferencia de peso) la concentración de exopolisacáridos en el medio. Para la determinación de pesos moleculares y ensayos de citotoxicidad se precipitaron con isopropanol, posteriormente en una centrifuga Eppendorf 5804 se centrifugaron a 10,000 rpm durante 8 minutos, la pastilla obtenida se resuspendió en agua. Para eliminar el agua

se utilizó un roto evaporador Dusher 101 y un liofilizador Labconco Lyph Lock 45, finalmente el polvo fino se guardó a 4°C hasta su uso (Trujillo-Roldan *et al* 2003).

9.7 Determinación del Peso Molecular

El peso molecular promedio (PMP) de los EPS se determinó por GPC (cromatografía de exclusión molecular), mediante un conjunto de columnas de ultrahidrogel (UG 500 and linear, Waters), usando un HPLC (Waters, 410), el eluyente usado fue 0.1 M NaNO₃ a 35°C en un flujo de 0.9 mL/min. Pululanos de *Aureobasidium pullulans* (de 5,800 a 1, 600,000 Daltons) se utilizaron como estándar (Trujillo-Roldán *et al.* 2001, Trujillo-Roldán *et al.* 2004). El cálculo de los PMP y el índice de polidispersión (el índice de polidispersión es la relación entre el peso molecular promedio en peso (Mw) y el peso molecular promedio en número (Mn) y nos da una idea de la diversidad de moléculas existentes en una mezcla) se realizaron usando el programa *Waters Empower Chromatography Data Software 2.0*.

9.8 Evaluación de Bioactividad

9.8.1 Cultivo Celular

La línea celular de leucemia mieloide crónica K562 fue donada por la Dra. Leticia Rocha Zavaleta (Dpto. de Biología Molecular y Biotecnología, IIB UNAM) y fue mantenida en medio RPMI 1640 Gibco 1X con 10% de suero fetal bovino inactivo y 1% de Penicilina-estreptomicina (10,000 U/mL) en un frasco T de 25 cm², en un incubadora (Nuair Inc. 5500) a 37°C con 5% de CO₂.

9.8.2 Cuento de células por exclusión de azul de tripano

El método de azul de tripano es usado para determinar el número de células viables presentes en una suspensión celular. Está basado en el principio de que las células vivas poseen intacta su membrana celular y excluyen determinados colorantes (como el azul de tripano, Eosin o propidio) y las células muertas no. En esta técnica se mezcla el colorante con las células en suspensión y se visualiza para determinar las células que absorben o excluyen el colorante (Strober 2001).

Se concentraron todas las células K562 del cultivo en un volumen final de 1mL. Se tomó una alícuota, la cual se centrifugó (centrífuga Eppendorf 5804 equipada con un rotor FA-45-30-11) a 2000 rpm durante 3 minutos y se descartó el sobrenadante.

Posteriormente, se resuspendió la pastilla en PBS y se adicionaron 10 μ L de azul de tripano (0.4% Gibco) se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 3 a 8 minutos. Finalmente el conteo se realizó en una cámara de Neubauer (factor de la cámara 10⁴), se añadió 10 μ L de la mezcla de células con azul de tripano.

9.8.3 Ensayo de citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo utilizando los EPS de los días 16 y 18 (matraz convencional) de los cultivos desarrollados en medio FZM; días 16 (matraz convencional) y 18 (bafleado) de los cultivos usando el medio MPO. Los EPS a diferentes concentraciones (10000, 5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.2, 78.1, 39, 19.5 μ g/mL) fueron incubados durante 48 h con la línea celular de leucemia mieloide crónica K562 (concentración inicial 50x10³ células por pozo); Se utilizó como control positivo H₂O₂ al 3% y como control negativo células K562 sin tratamiento.

9.8.4 Ensayo de MTT

La viabilidad celular fue evaluada con el método de MTT, es un método simple determina la cantidad de células vivas presentes en el cultivo mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables (Bounous *et al* 1992).

El amarillo de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) es reducido a formazán que es de color morado en las mitocondrias de las células vivas. La absorbancia de esta solución se puede cuantificar a una cierta longitud de onda (usualmente entre 500-600 nm) en un espectrofotómetro. La reducción se lleva a cabo cuando la enzima reductasa es activada y por lo tanto la conversión puede estar relacionada con el número de células viables (Bounous *et al* 1992; Carmichael *et al* 1987; Denizot 1986).

El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pozos fondo “V” con 100 µL de EPS (los cuales fueron resuspendidos en agua destilada estéril) a diferentes concentraciones (10000, 5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.2, 78.1, 39, 19.5 µg/mL). Se añadieron 100 µL de medio RPMI 2X y 10% SFB (el control negativo solo se realizó con RPMI 1X y 10% SFB), se incubó durante 24h. Posteriormente, se centrifugó la placa a 3000 rpm durante 4 minutos a temperatura ambiente (Centrifuga Eppendorf 5804 equipada con rotor de placas A-2-DWP), se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de células K562 con 100 µL de medio RPMI 1X 10% y SFB, Posteriormente se adicionaron 50 µL de MTT, y se incubó durante 2 a 4 h.

Transcurrido el tiempo, se centrifugó la placa nuevamente a 3000 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante, se resuspendió la pastilla de células k562 en 100µL de isopropanol, finalmente se leyó la absorbancia a 570 nm (Lector de microplacas BioTek® ELx800) Denizot 1986.

La cantidad de células se obtuvo por medio de una correlación lineal utilizando una curva patrón (anexo 2), la cual se obtuvo en el ensayo de MTT con diferentes concentraciones de células que abarcaron un rango de 0 a 200×10^3 células.

9.9 Pruebas estadísticas

Se realizó la comparación de los datos obtenidos a través del análisis de varianzas, (ANOVA) por medio de la prueba de Tukey que mide la diferencia de los valores de la medias entre dos grupos en términos de la varianza intragrupal. Los cálculos fueron realizado en línea mediante la página “One-Way Analysis of Variance for Independent or Correlated Samples” <http://vassarstats.net/anova1u.html> el software STATGRAPHICS Centurión XV Versión 15.1.02 Copyright©1982-2006 StatPoint, Inc.

X. RESULTADOS

10.1 Método de conservación

Los hongos son microorganismos de gran importancia en diferentes ramas de la ciencia como la biotecnología, microbiología y la agronomía debido a las afectaciones o beneficios que los microorganismos pueden proporcionar. El mantenimiento y preservación de los cultivos fúngicos es esencial, diversos métodos de conservación son necesarios para asegurar su morfología, fisiología, viabilidad e integridad genética durante un lapso prolongado de tiempo. Existen diversos métodos de conservación, algunos de los más usados son el crecimiento continuo, el secado y la congelación (Borman *et al* 2006; de Capriles *et al* 1989; Prakash *et al* 2013, Nakasone *et al* 2004). Sin embargo, algunos de estos métodos no son compatibles con todos los hongos debido a las características particulares de cada especie.

Humphreya coffeata posee esporas únicamente en el cuerpo fructífero y nuestros aislados son vegetativos, debido a esto se llevó a cabo la prueba de un método de conservación a largo plazo que no implique el uso de congelación. Se buscó para la conservación del micelio un método poco agresivo, como la conservación en agua destilada estéril descrita por Castellani (1939, 1963, 1964) ya que se ha reportado que puede garantizar la viabilidad del asilamiento por 1 a 20 años dependiendo de la especie (de Capriles *et al* 1989). Se llevaron a cabo algunas modificaciones al método como las descritas por López *et al* (2012) donde finalmente *H. coffeata* fue conservada en papel filtro sumergido en agua destilada estéril.

Se evaluó la eficiencia de este método a los 0, 3, 6, 12, 18 y 24 meses. La viabilidad se determinó por medio de la siembra en agar FZM e incubación a 30°C durante 4 días. Considerándose viable el cultivo cuando se presentó crecimiento. El crecimiento fue evaluado macroscópicamente (figura 2) el experimento se realizó por duplicado. Los resultados mostraron que el método fue eficiente para preservar el micelio de *H. coffeata*, se observó que no se presentaron cambios morfológicos ni

contaminación por otros hongos o bacterias, manteniendo el aislado viable hasta por 18 meses.

Este método demostró ser confiable y económico para la conservación del aislado de *H. coffeata*. Estos resultados del proyecto, se publicaron en el artículo "Conservation of the mycelia of the medicinal mushroom *Humphreya coffeata* (Berk.) Stey. in sterile distilled water" García-García M, Rocha-Zavaleta L, Valdez-Cruz N, Trujillo Roldan M.A. MethodsX, 1 (2014)19–22 (anexo 5).

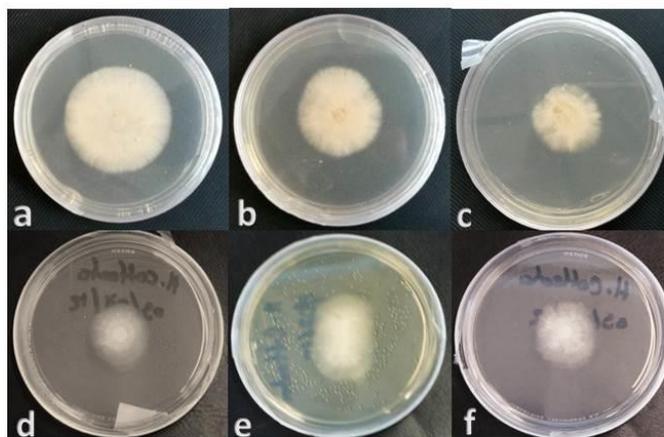
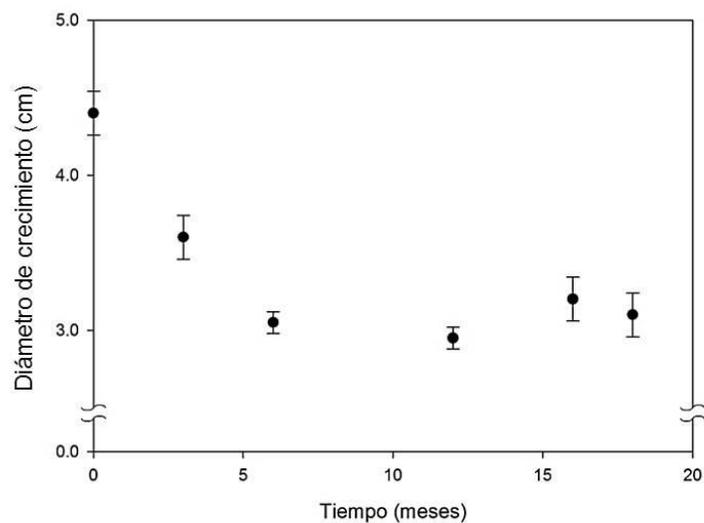


Figura 2. Ensayo de viabilidad del método de conservación del aislamiento de *H. coffeata*. Se inoculó papel filtro con micelio de *H. coffeata* almacenado en agua destilada estéril en una placa con medio FZM y fue incubado a 30°C durante 4 días; considerándose viable el cultivo cuando se presentó crecimiento. En la parte superior de la figura se muestran los resultados de la prueba de viabilidad del método a través del tiempo. En la parte inferior se muestra el crecimiento observado al tiempo 0 (a), 3 (b), 6 (c), 12 (d), 15 (e) y 18 (f) meses de observación.

10.2 Definición de las condiciones de cultivo

Se llevó a cabo un ensayo para determinar las condiciones del cultivo con referencia al tipo de matraz que se utilizaría en los experimentos de cinéticas de crecimiento y extracción de exopolisacáridos. Se utilizaron matraces convencionales, bafleados y con resorte de acero inoxidable, todos de un volumen de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo FZM, se incubaron a una temperatura de 30°C a 150 rpm durante 7 días en oscuridad. Se observaron diferencias con respecto al crecimiento de la biomasa de cada matraz; grandes agregados en el matraz convencional, en el matraz bafleado los agregados fueron de menor tamaño (figura 3). Esto puede ser indicativo del aprovechamiento de nutrientes y oxígeno que se puede obtener en cada sistema.

Por otro lado, en el matraz con resorte se observó el micelio en su mayoría creciendo en el resorte lo cual representó un problema al manipularlo para su recuperación. Se midió la biomasa y exopolisacáridos de los matraces por gravimetría. Los resultados se muestran en la tabla 3. El matraz convencional tiene mayor producción de biomasa (3.94 ± 0.22 g/L) y exopolisacáridos (0.80 ± 0.14 g/L), al igual que se observa que el matraz con resorte proporciona alta producción de biomasa (3.92 ± 0.12 g/L), pero una baja producción de exopolisacáridos (0.50 ± 0.04); el matraz bafleado por otra parte, tiene la menor producción de biomasa (3.52 ± 0.07 g/L), pero es el segundo en la producción de exopolisacáridos (0.60 ± 0.04).

Este ensayo mostró un panorama de lo que se podía obtener en cada tipo de matraz (Porras 2007). Sin embargo, al ver la adherencia de los agregados celulares sobre el resorte y la dificultad que esto presentaba en términos de su recuperación, se decidió que las cinéticas de crecimiento para la producción de EPS utilizando diferentes fuentes de carbono se llevarían a cabo únicamente en matraces convencionales y bafleados

Tabla 3. Resultado de los ensayos preliminares de cultivo de *H. coffeata*. Se muestra la concentración de biomasa y exopolisacáridos de *H. coffeata* al día 7 de la cinética de crecimiento en diferente tipo de matraz, utilizando medio FZM, temperatura de 30°C a 150 rpm.

Condición	M. convencional	M. bafleado	M. con resorte
Biomasa	3.94±0.22	3.52±0.07	3.92±0.12
EPS	0.80±0.14	0.60±0.04	0.50±0.04

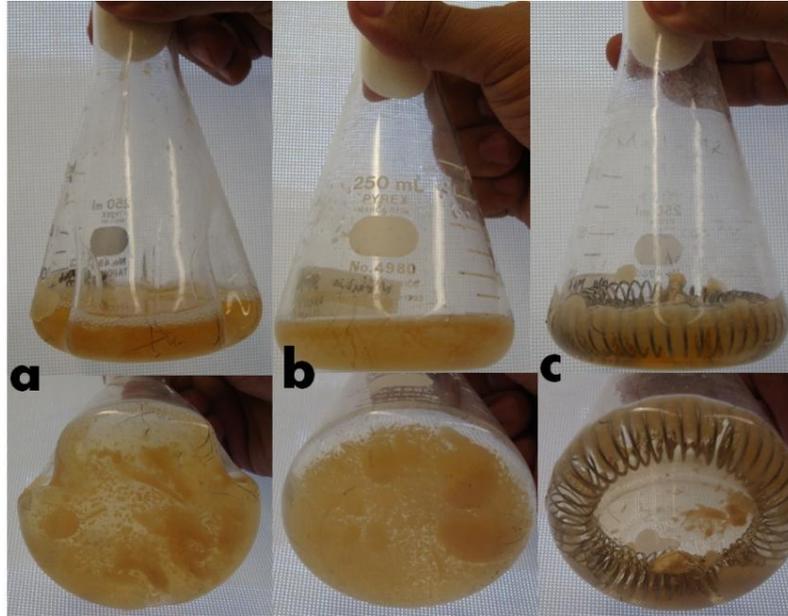


Figura 3. Crecimiento de *H. coffeata* en los diferentes tipos de geometría de matraz, día 7 de crecimiento. Condiciones del cultivo, medio FZM, 30°C a 150 rpm. a) Matraz bafleado, agregados pequeños b) matraz convencional agregados grandes y c) matraz con resorte, micelio adherido al resorte del matraz.

10.3 Comparación entre cinéticas (inóculo, geometrías y fuentes de carbono)

10.3.1 Cinética comparación de inóculo y tipo de geometría

Se llevaron a cabo tres cinéticas de crecimiento de *H. coffeata* donde se evaluó el crecimiento, el consumo de la fuente de carbono y la producción de exopolisacáridos. Se siguió la morfología de manera cualitativa de los cultivos en matraces convencionales y bafleados de 250 mL con 50 mL de medio FZM y MPO.

Primero se eligió como inóculo un disco de 5 mm de diámetro de una caja Petri con medio sólido FZM en la búsqueda de un inóculo uniforme (denominado inóculo

1). Por otro lado, se llevó a cabo una cinética bajo las mismas condiciones, la única variación que presentó fue el inóculo, en esta cinética se elaboró un preinóculo en matraz bafleado como se indica en materiales y métodos (denominado inóculo 2). Se midió la biomasa, el pH, la producción de exopolisacáridos y el consumo de fuente de carbono en ambas cinéticas.

Los resultados permitieron observar un notable cambio en la morfología durante el transcurso de las cinéticas. En el matraz convencional usando el inóculo 1, la biomasa es más compacta, formando un gran agregado y en el matraz bafleado la biomasa es más dispersa, encontrándose en pequeños agregados. Este fenómeno pudiese ser causado por el estrés hidrodinámico que sufre el microorganismo. Los matraces bafleados someten al micelio a ruptura constante por el impacto que sufre al chocar contra las paredes. En matraz bafleado se pueden ver pequeños agregados a diferencia del matraz convencional donde los agregados que se forman son de tamaño mayor (figura 4).



Figura 4. Comparación visual de crecimiento de *H. coffeata* utilizando la forma de inocular 1 (utilizando un disco de agar de 5mm diámetro). Condiciones de cultivo: 30°C, 150 rpm medio FZM. Observación realizada a los 5 días de la cinética de crecimiento; matraz bafleado (izquierda) donde se observan pequeños agregados y matraz convencional (derecha) donde se observan grandes agregados.

Con respecto a la forma de inocular, algunos reportes señalan que también el tipo de inóculo y la cantidad de inóculo pueden influir en el crecimiento del organismo (Zhou *et al* 2012, Chang 2002). Cuando se utilizó la forma de inocular 2, se observó que en matraces convencionales la biomasa crece en forma de agregados pequeños y redondos; en el matraz bafleado los agregados al igual que con la forma de inocular 1 (figura 5) son más pequeños y amorfos, debido a la potencia volumétrica que entregan estos matraces al ser agitados (Gamboa-Suasnavart *et al* 2011).

Una mayor cantidad de biomasa (8.02 ± 1.98 g/L convencional; 8.20 ± 0.07 g/L bafleado) y EPS (2.0 ± 0.33 g/L convencional; 2.20 ± 0.47 g/L bafleado) fue obtenida cuando se utilizó la forma de inocular 2 (tabla 4). El consumo de la fuente de carbono y pH presentó ligeras variaciones en matraz bafleado. También, se observó que en matraz bafleado, la fase exponencial ocurrió más rápidamente (dentro de los primeros 4 días). Esto podría sugerir que el matraz bafleado mejora la transferencia de oxígeno y debido a que el micelio es más disperso en los cultivos realizados en este matraz, existen un mayor número de puntas hifales en contacto con el medio que podría estar favoreciendo el metabolismo de *H. coffeata* (figura 6). Los resultados sugieren que la forma de inocular 2 mostró ser mejor para la producción de biomasa y EPS en cultivos de *H. coffeata* debido a que se observan diferencias significativas entre los resultados obtenidos usando el inóculo 1 y el inóculo 2 (tabla 4).

10.3.2 Comparación entre medios de cultivo

La fuente de carbono es un elemento de gran importancia, debido a que es el mayor componente nutritivo del medio de cultivo y que asegurar el crecimiento de los microorganismos y la producción de metabolitos de interés (Elisashvili 2012). Dada la importancia de este elemento, en esta etapa se decidió evaluar el crecimiento de *H. coffeata* utilizando dos diferentes medios de cultivo, que varían en la fuente de carbono que utilizan. Los medios de cultivo utilizados fueron: medio MPO (fuente de carbono lactosa) y medio FZM (fuente de carbono glucosa); adicionalmente, también

se evaluó el impacto que ejercen en el crecimiento las dos diferentes geometrías de matraz (bafleado y convencional).

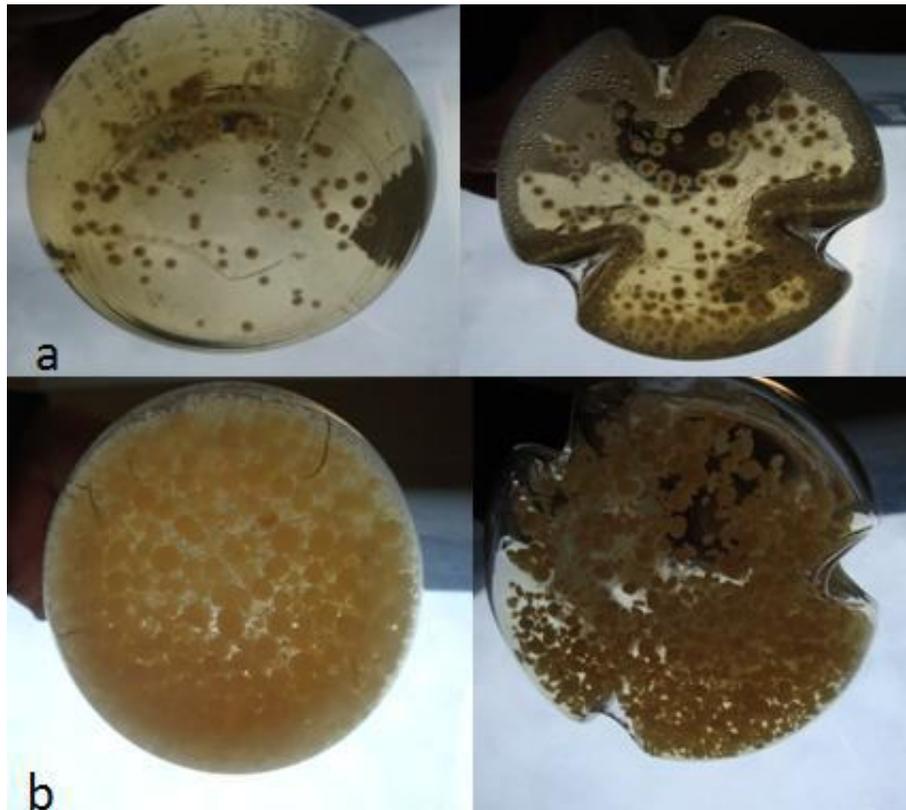


Figura 5. Comparación visual de crecimiento de *H. coffeata* utilizando la forma de inocular 2 (inóculo realizado mediante un preinóculo en matraz bafleado durante 3 días). Condiciones de cultivo: medio FZM, 150 rpm, 30°C. a) Tiempo 0; inóculo disperso derecha matraz convencional, a la izquierda matraz bafleado b) Tiempo final día 20; izquierda matraz convencional agregados pequeños dispersos, derecha matraz bafleado agregados muy pequeños y dispersos.

Las condiciones de cultivo fueron las mismas que se utilizaron para los cultivos anteriores, dos geometrías de matraz (convencional y bafleado), 50 mL de medio en cada matraz de 250 mL con 1 mL de inóculo proveniente de matraz bafleado, la velocidad de agitación usada fue 150 rpm, temperatura 30°C. La cinética se llevó a cabo durante 20 días, tomando muestra del día 0 al 4 y posteriormente cada 2 a 4

días (la muestras fueron tomadas sacrificando el matraz), el ensayo se llevó a cabo por duplicado (figura 7).

Los resultados de estas cinéticas (tabla 4) se compararon con los obtenidos con el inóculo proveniente de un disco de agar de 5 mm diámetro y lo reportado por Porras (2009), de tal forma que esta comparación mostró un panorama del impacto que tienen los diferentes factores involucrados en las condiciones de cultivo de *H. coffeata* en la producción de biomasa y EPS tales como geometrías de matraz, fuente de carbono y tipo de inóculo.

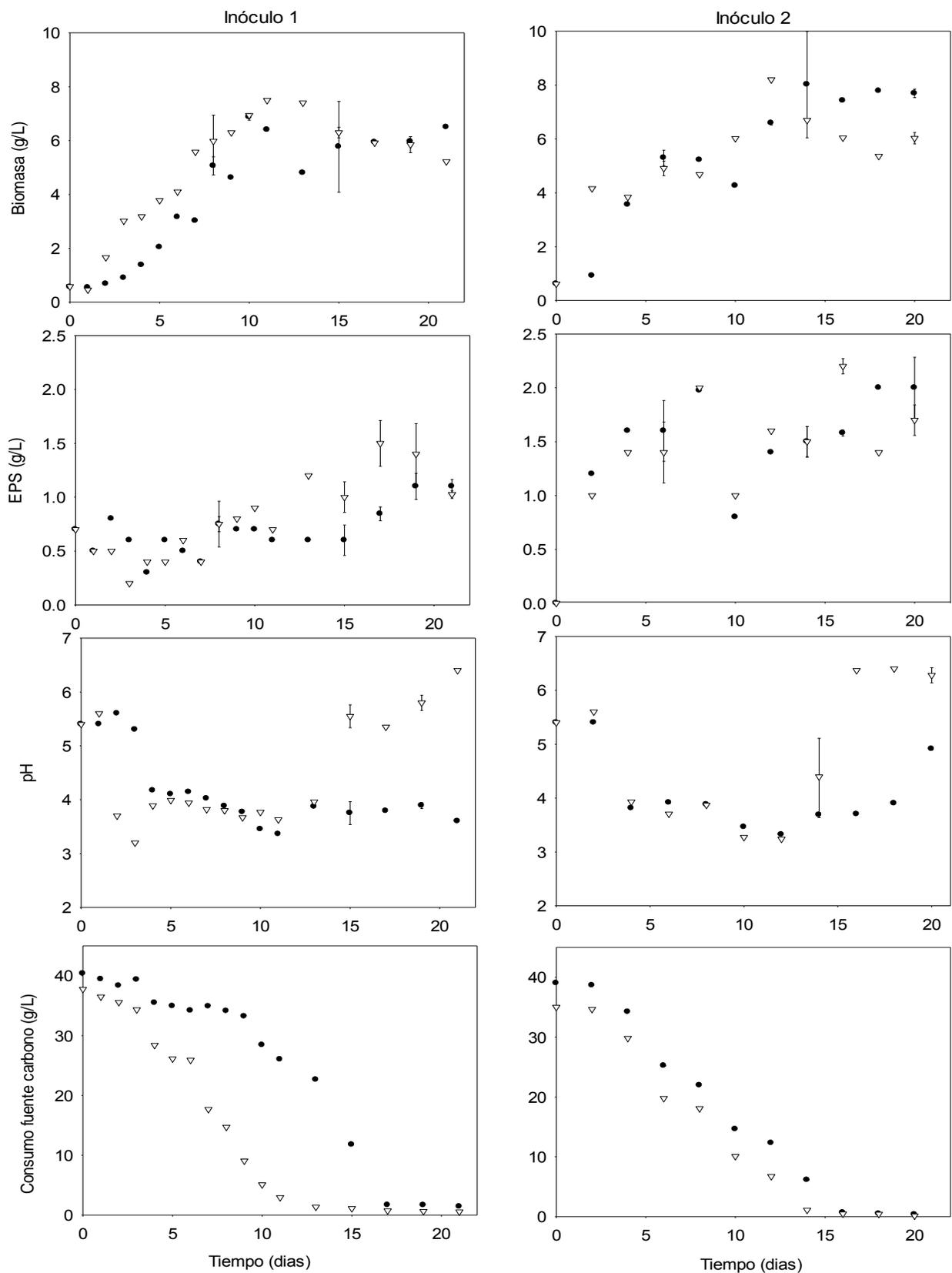


Figura 6. Comparación entre la forma de inocular 1 (utilizando un disco de agar de 5mm diámetro) y 2 (inóculo realizado mediante un preinóculo en matraz bafleado durante 3 días) en cinéticas de crecimiento de *Humphreya coffeata*. Condiciones de cultivo: 30°C, 150 rpm medio FZM (glucosa), matraz convencional ●, matraz bafleado ▼

Los resultados muestran que el inóculo proveniente de matraz bafleado mejora la cantidad de biomasa y EPS que se obtienen; también se observa que se produce un cambio en la morfología con respecto al inóculo proveniente del disco de agar. Este cambio en la morfología junto con la velocidad de agitación podría estar proporcionando un mejor aprovechamiento de los nutrientes del medio y una adecuada transferencia de oxígeno. Algunos reportes sugieren que la velocidad de agitación y la aireación durante los cultivos son de suma importancia para la producción de exopolisacáridos y el control en el crecimiento de agregados miceliales en hongos como *C. militaris* y *G. lucidum* (Yang y Liao 1998; Park *et al* 2002).

Tabla 4. Comparativo de los resultados máximos obtenidos en cultivos de *H. coffeata*, donde se evalúan diferentes parámetros como formas de inóculo, geometría de matraz y medios de cultivo. Inóculo 1 con disco 0.50 mm, inóculo 2 de matraz bafleado, medio FZM (Fang y Zhong 2002), medio MPO (Porras *et al* 2009), condiciones 30°C, 150 rpm 20 días de cultivo. C (matraz convencional), B (matraz Bafleado).

Parámetros	Inóculo 1		Inóculo 2				Porras 2009
	C. FZM	B. FZM	C. FZM	B. FZM	C. MPO	B. MPO	
Tipo de Matraz	C. FZM	B. FZM	C. FZM	B. FZM	C. MPO	B. MPO	C. MPO
Biomasa (g/L)	6.88±0.12	7.50±0.01	8.02±1.98	8.20±0.07	11.40±0.07	11.50±1.54	12.2±0.30
EPS (g/L)	1.10±0.12	1.50±0.21	2.0±0.14	2.20±0.07	4.50±0.20	3.40±0.04	6.80±0.30
Rendimiento (x/s) g/g	0.528±0.01	0.199±0.00	0.225±0.60	0.334±0.00	0.727±0.00	0.535±0.07	0.500
Rendimiento (p/s) g/g	0.028±0.00	0.041±0.00	0.049±0.00	0.064±0.00	0.257±0.01	0.240±0.00	0.280
μ (d ⁻¹)	0.269±0.013	0.287±0.048	0.389±0.008	0.457±0.002	0.841±0.029	0.814±0.089	0.432

Es importante destacar que de los cultivos de *H. coffeata* llevados a cabo, los cultivados en medio MPO son los que presentaron mayores concentraciones de biomasa (matraz convencional 11.40±0.07 g/L, matraz bafleado 11.50±1.54 g/L) y EPS (matraz C 4.50±0.20 g/L, matraz B 3.40±0.04 g/L) figura 7.

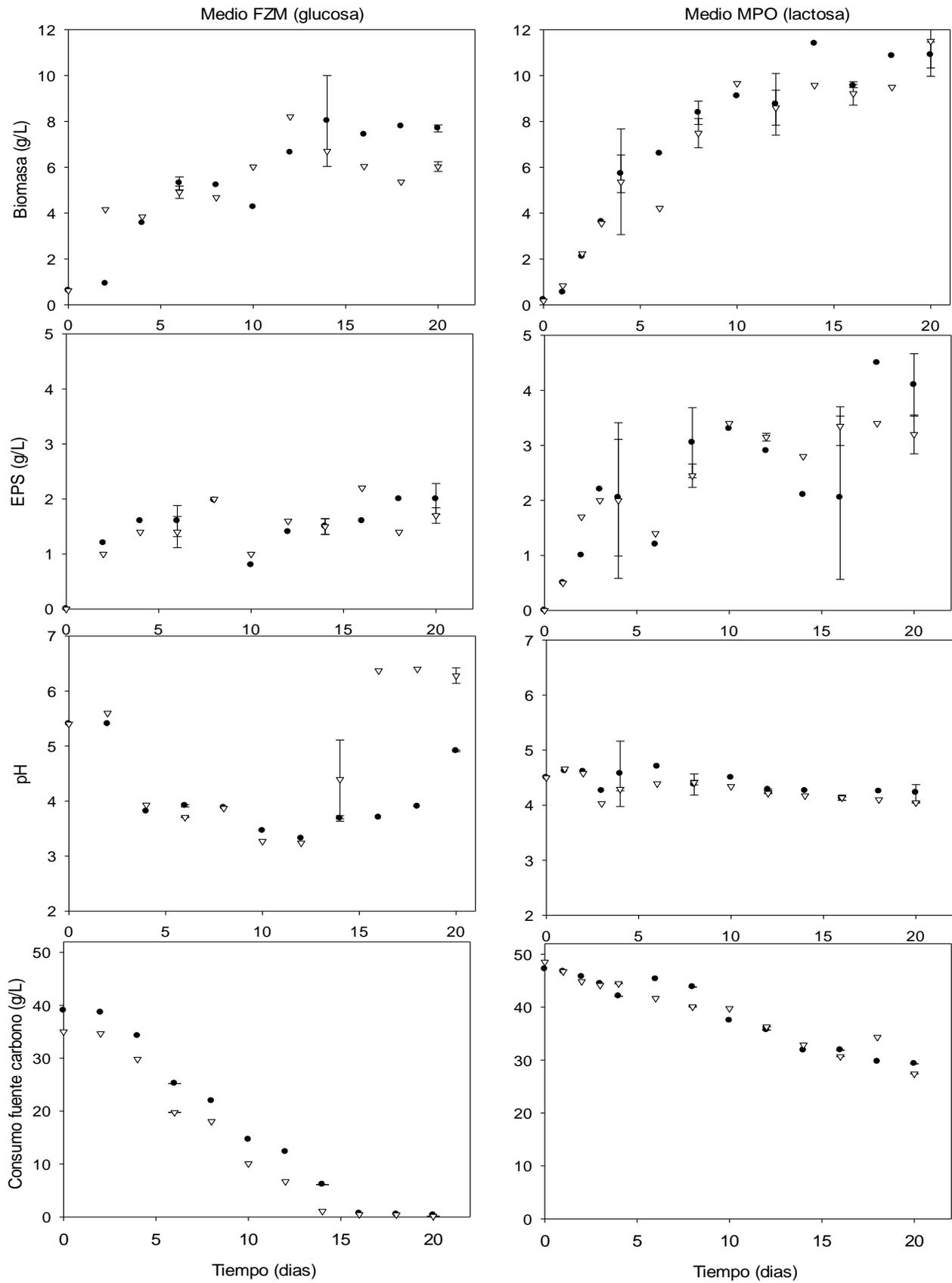


Figura 7. Comparación de medios de cultivo con diferente fuente de carbono, en cinética de crecimiento de *H. coffeata*, condiciones de cultivo 30°C, 150 rpm, matraz convencional ●, matraz bafeado ▼.

Cabe mencionar que la fuente de carbono es uno de los factores importantes a considerar durante los cultivos de *H. coffeata*. Esto es debido a que los carbohidratos son los mayores componentes de la pared celular de los hongos, siendo importantes nutrientes para el desarrollo y crecimiento de los hongos. Algunas de las fuentes de carbono mayormente utilizadas en los medios de cultivo para hongos, son las que incluyen azúcares simples como la glucosa, sacarosa y maltosa (Elisashvili 2009; Fazenda *et al* 2008). En algunos casos, la glucosa se ha reportado como la mejor fuente de carbono para la producción de EPS.

Para el caso de *H. coffeata* los valores de concentración de biomasa y EPS utilizando glucosa fueron bajos (biomasa matraz en g/L convencional 8.02 ± 1.98 , matraz bafleado 8.20 ± 0.07 , EPS en g/L matraz convencional 2.0 ± 0.14 , matraz bafleado 2.20 ± 0.07 g/L) con respecto a los valores obtenidos utilizando medio de cultivo con lactosa (MPO).

Se sabe que la formación de EPS está relacionada con la fuente de carbono utilizada (Elisashvili 2012). Para el caso particular de *H. coffeata*, se observa que la lactosa es la fuente de carbono adecuada para lograr una mayor obtención de EPS. En algunos reportes es señalado que la producción de EPS es mejorada cuando se utilizan disacáridos (sacarosa, lactosa, maltosa etc.) o es generalmente mejor que cuando se utilizan monosacáridos (Elisashvili 2009).

Finalmente, con respecto a las geometrías de los matraces utilizados, no parece existir diferencias aparentes en la producción de biomasa y EPS.

10.4 Análisis Estadísticos

Los análisis se llevaron a cabo mediante la prueba de Tukey. Se compararon las velocidades específicas de crecimiento y los rendimientos obtenidos con el inóculo 1 y 2, medio FZM, MPO, matraz convencional y bafleado. Las tablas comparativas se muestran en el anexo 3 (tabla 3.1, 3.2).

10.4.1 Velocidad específica de crecimiento

La velocidad específica de crecimiento fue obtenida a partir de la pendiente de una gráfica de $\ln X$ contra el tiempo tabla 5.

Bajo condiciones exponenciales se describe como:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

(1)

En donde μ es la velocidad específica de crecimiento y puede ser modelada por distintas expresiones siendo la más común la de Monod, relacionando la velocidad con el efecto de la concentración del reactivo limitante en el medio de cultivo, la velocidad máxima de crecimiento y una constante de saturación. Las comparaciones se realizaron usando la prueba de Tukey. Se realizaron primero entre las velocidades específicas de crecimiento obtenidas utilizando el inóculo 1 e inóculo 2, en medio de cultivo FZM.

El resultado del análisis mostró que cuando se comparó la velocidad específica de crecimiento en las mismas condiciones (utilizando inóculo tipo 1, temperatura 30°C, 150 rpm, medio FZM) comparando entre geometrías de matraz no se presentaron diferencias significativas. El mismo fenómeno se presentó cuando se comparó la velocidad específica de crecimiento utilizando el inóculo 2, comparando entre matraz convencional y bafleado. Sin embargo, cuando se realizó la comparación entre el inóculo 1 y el inóculo 2, usando diferentes geometrías de matraz, sí se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$). Lo que sugiere que la forma en la que se inoculan los cultivos de *H. coffeata* tiene un efecto que impacta sobre la velocidad específica de crecimiento. Siendo mayor la velocidad de crecimiento cuando se utiliza el inóculo tipo 2. Es importante evaluar el impacto que puede generar el inóculo durante el cultivo, debido a que una correcta selección de parámetros de cultivo es crucial para la óptima producción de biomasa y metabolitos de interés (Elisashvili 2012).

Tabla 5. Velocidad específica de crecimiento obtenida en diferentes condiciones de cultivo de *H. coffeata*. El numero 1 o 2 indica el tipo de inóculo utilizado. Valores con la misma letra no muestran diferencias significativas en los resultados obtenidos con la prueba de Tukey.

Condición	Valor μ (d ⁻¹)	Efecto del inóculo	Efecto del medio de cultivo
FZM Convencional 1	0.269±0.013 ^a	a	
FZM Bafleado 1	0.287±0.048	a	
FZM Convencional 2	0.389±0.008	b	a
FZM Bafleado 2	0.457±0.002	b	a
MPO Convencional 2	0.841±0.029		b
MPO Bafleado 2	0.841±0.089		b

La segunda comparación fue llevada a cabo entre las dos fuentes de carbono (glucosa, lactosa), utilizando el inóculo 2. Los resultados del análisis mostraron que cuando se compara bajo la misma condición utilizando la misma fuente de carbono, es decir, cuando se utilizó solo medio FZM o medio MPO comparando solo las geometrías de matraz, no hubo diferencias significativas. Sin embargo, cuando se comparó entre las fuentes de carbono sí se observan diferencias significativas en todos los casos ($p < 0.05$) tabla 5. Esto muestra que existe una mejor velocidad de crecimiento cuando se usa medio MPO (lactosa). Sugiriendo con estos resultados que el inóculo y la fuente de carbono son parámetros importantes que pueden intervenir en el crecimiento de *H. coffeata*. Hasta este momento parece ser que la geometría de matraz no tiene un alto impacto en el crecimiento de *H. coffeata*, pero sí en su morfología.

10.4.2 Comparación de rendimientos $Y_{x/s}$ y $Y_{p/x}$

El rendimiento está definido como la relación entre el producto obtenido y el sustrato consumido.

$$P_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta t} \quad ; \quad P_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta t}$$

(2)

Los datos utilizados para realizar las pruebas de Tukey, fueron en los que se observó la mayor producción de biomasa y EPS tabla 6.

Tabla 6. Rendimientos obtenidos bajo diferentes condiciones de cultivo de *H. coffeata*. El número 1 o 2 indica el tipo de inóculo utilizado; FZM medio de cultivo con glucosa y MPO medio de cultivo con lactosa, condiciones: 30°C, 150 rpm, duración de la cinética 20 días. Los días elegidos, fueron donde se presentó la máxima concentración de biomasa y EPS.

Día	Condición	Y _{x/s} (g/g)	Día	Y _{p/s} (g/g)
10	FZM Convencional inóculo 1	0.528±0.010	19	0.028±0.003
11	FZM Bafleado inóculo 1	0.199±0.00	17	0.041±0.006
14	FZM Convencional inóculo 2	0.225±0.60	20	0.049±0.004
12	FZM Bafleado inóculo 2	0.334±0.003	16	0.064±0.002
14	MPO Convencional inóculo 2	0.727±0.005	18	0.257±0.011
20	MPO Bafleado inóculo 2	0.535±0.073	18	0.240±0.003

10.4.2.1 Rendimiento Y_{x/s}

La primera comparación llevada a cabo mediante la prueba de Tukey, fue entre los datos de rendimiento Y_{x/s} obtenidos usando medio FZM comparando el inóculo 1 y el inóculo 2 en las dos geometrías de matraz (anexo 3).

Se observó que no se presentaron diferencias significativas al comparar los cultivos realizados en matraz bafleado utilizando el inóculo 1 con matraz convencional inóculo 2. Al igual que también al comparar el cultivo realizado en matraz convencional usando el inóculo 2 con el cultivado en matraz bafleado (inóculo 2). En los casos restantes sí se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) (anexo 3, tabla 3.3).

Los resultados muestran que usar el inóculo 2 puede mejorar la concentración de biomasa y EPS obtenidos del cultivo de *H. coffeata*. Por otro lado, la geometría de matraz no parece ejercer un impacto en la concentración de biomasa obtenida cuando se utiliza el inóculo tipo 2, ya que no se presentaron diferencias significativas al comparar los rendimientos obtenidos de cada matraz. Sin embargo, cuando el inóculo es de tipo 1, la geometría de matraz mejora las condiciones para la obtención

de EPS, siendo mejor cuando se utiliza el matraz bafleado. Esto es debido a que la geometría del matraz bafleado puede contribuir a mejorar la cantidad de oxígeno disuelto en el medio durante el cultivo (Gamboa-Suasnavart *et al* 2011).

La segunda comparación realizada mediante la prueba de Tukey, fue entre los datos de rendimiento $Y_{x/s}$ obtenidos usando el inóculo 2, comparando el medio FZM con el medio MPO en las dos geometrías de matraz (anexo 3). Cuando se compararon los rendimientos obtenidos en los cultivos realizados en matraz convencional medio FZM con los cultivos realizado en matraz bafleado medio FZM, no se presentaron diferencias significativas. En todos los sistemas restantes si se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) (anexo 3, tabla 3.4), mostrando que los mejores rendimientos se obtuvieron usando medio MPO (tabla 6).

10.4.2.2 Rendimiento $Y_{p/s}$

Se llevó a cabo mediante la prueba de Tukey, la comparación entre los datos de rendimiento $Y_{p/s}$ obtenidos usando medio FZM, comparando el inóculo 1 con el inóculo 2 en las dos geometrías de matraz (anexo 3, tabla 3.5).

Los resultados de las pruebas de Tukey, mostraron que en los cultivos realizados en el medio FZM, cuando se comparó entre matraz convencional y bafleado usando el inóculo tipo 1 no se presentaron diferencias significativas. El mismo fenómeno ocurrió cuando se compararon los cultivos de matraz convencional y bafleado usando el inóculo tipo 2. Al igual que cuando los cultivos provenían de matraz bafleado inóculo tipo 1 y matraz convencional inóculo tipo 2. Estos resultados sugieren que la forma en la que se inoculan los cultivos de *H. coffeata* tiene un impacto en el rendimientos producto sustrato.

La segunda comparación $Y_{p/s}$ que se llevó a cabo mediante la prueba de Tukey fue entre los datos de rendimiento $Y_{p/s}$ obtenidos usando inóculo 2, comparando medio FZM con medio MPO, en las dos geometrías de matraz. Los datos obtenidos de la prueba de Tukey mostraron que cuando se comparan los rendimientos de

cultivos de matraz convencional y bafleado realizados en medio FZM, no hay diferencias significativas entre ellos. Al igual que cuando se compararon los rendimientos obtenidos de matraz convencional y bafleado cultivados en medio MPO (anexo 3, tabla 3.6), sugiriendo que la geometría de matraz no tiene impacto en los rendimientos $Y_{p/s}$ obtenidos del cultivo de *H. coffeata*. Sin embargo, cuando se compara entre los medios de cultivo, sí se presentan diferencias significativas ($P < .01$), dejando ver que la fuente de carbono fue un factor importante para la obtención de mayores rendimientos, siendo lactosa la fuente de carbono que presentó mayores rendimientos como lo señala Porras en 2007.

10.5 Cultivos en biorreactor

Los cultivos se llevaron a cabo en un reactor de 14 L con un volumen final de 10L, se utilizó medio FZM debido a que se ha reportado que cultivos donde se utiliza glucosa como fuente de carbono producen polisacáridos de alto peso molecular (Reshetnikov *et al* 2001; Elisashvili 2012) que usualmente exhiben una alta bioactividad (El Enshasy *et al* 2013). El cultivo tuvo una duración de 10 días, la temperatura utilizada fue de 30°C (el cultivo en reactor se realizó con la colaboración de la Ing. Diana Carolina Bautista Tovar como parte de su trabajo para obtener el grado de Ingeniera Química en la Universidad Nacional de Colombia, 2013). La toma de muestra para medir la biomasa y EPS se realizó durante 3 días, debido a que transcurridas 24 horas de cultivo el micelio se adhiere a las paredes y no permite la cuantificación correcta de la biomasa (figura 8).

Se evaluaron 3 diferentes velocidades de agitación 300, 450 y 500 rpm. La mayor productividad de biomasa a las 72 h de cultivo (10.4 ± 0.1 g/L) y EPS (2.31 ± 0.1 g/L) fueron obtenidas en el reactor agitado a 450 rpm (figura 9 y 10).

Altas velocidades de agitación favorecen la producción de EPS, debido a que decrece la adsorción de los polisacáridos extracelulares secretados para formar pared celular (Elisashvili 2012). Sin embargo, se debe ser cauteloso debido a que cuando ocurren altas velocidades de agitación y aireación, también incrementan el estrés por corte causado por la alta velocidad. Esto podría tener un efecto perjudicial

sobre el crecimiento del micelio, ocasionando que los polisacáridos producidos sean descompuestos por las condiciones desfavorables del cultivo (Yang y Liau 1998).

Para el caso de *H. coffeata* se observó que la velocidad de agitación de 450 rpm, presenta una buena obtención de biomasa. Por otro lado, en la concentración de EPS obtenidos (todo en g/L, 300 rpm 1.04 ± 0.39 ; 450rpm 1.35 ± 0.41 ; 500 rpm 1.16 ± 0.12), no se observaron diferencias entre las velocidades de agitación evaluadas. Para los ensayos de citotoxicidad se seleccionaron los EPS obtenidos del reactor agitado a 450 rpm tiempo final (día 10), debido a que presentaron mejores valores de biomasa y EPS.

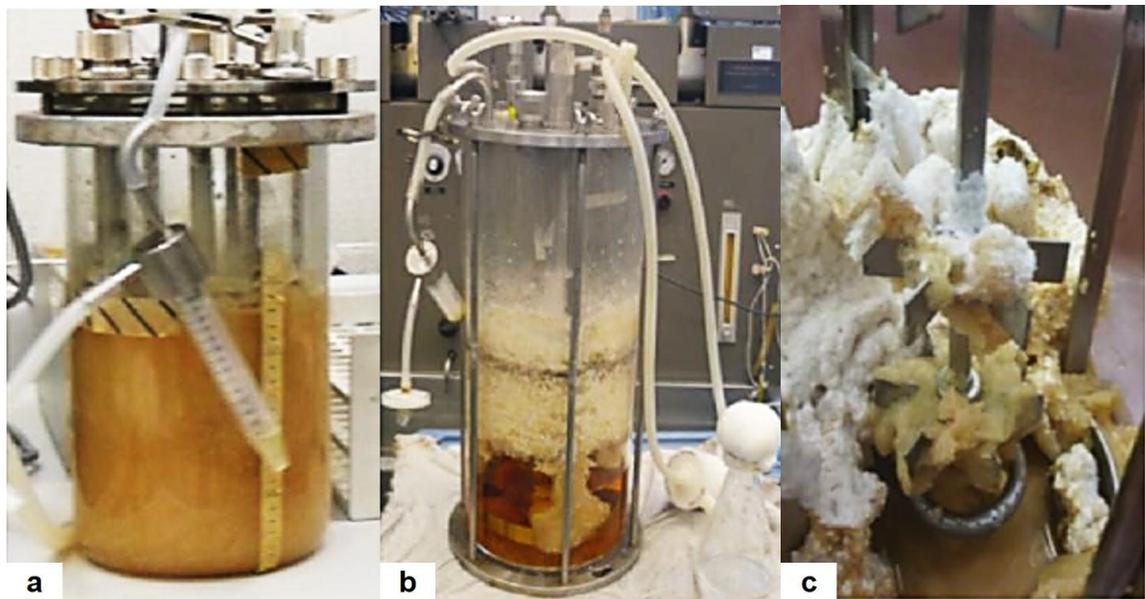


Figura 8. Crecimiento de *H. coffeata* en biorreactor (30 °C, medio FZM, 300, 450 y 500 rpm). a) cultivo de 3 días, agregados de tamaño uniforme, el micelio comienza a pegarse a las paredes del biorreactor, b) cultivo de 10 días, micelio en su mayoría adherido a las paredes del biorreactor, c) micelio de *H. coffeata* adherido al impulsor y baffles del biorreactor después de 10 días de cultivo.

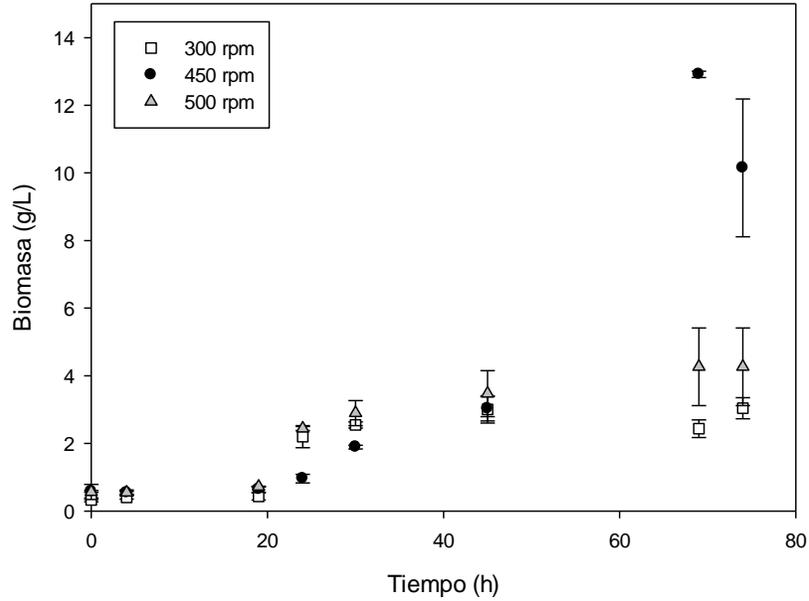


Figura 9. Cinéticas de crecimiento de *H. coffeata* en reactor de 14L. Evaluando las velocidades de agitación 300, 450 y 500 rpm. Condiciones de cultivo: medio FZM, 30°C, volumen de trabajo 10L (trabajo en colaboración con la Ing. Diana Carolina Bautista Tovar).

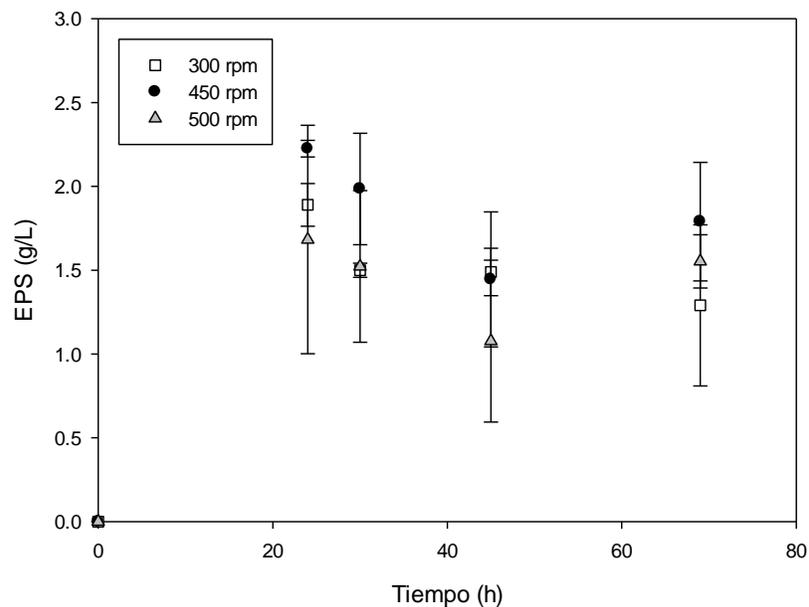


Figura10. Obtención de EPS en cinética de crecimiento de *H. coffeata* en reactor de 14L. Evaluando las velocidades de agitación 300, 450 y 500 rpm. Condiciones de cultivo: medio FZM, 30°C, volumen de trabajo 10L (trabajo en colaboración con la Ing. Diana Carolina Bautista Tovar).

10.6 Determinación de pesos moleculares promedio

La figura 11 muestra los pesos moleculares promedio (PMP) e índice de polidispersión (IP) de los EPS producidos los días 4, 10, 14, 16, 18 y 20 de las cinéticas de crecimiento de *H. coffeata*, donde se utilizaron 2 medio de cultivo (FZM y MPO), el inoculo 2 y dos diferentes geometrías de matraz. La determinación de los pesos moleculares se realizó por duplicado.

Se observó que existen diferencias entre los pesos moleculares obtenidos a lo largo de la cinética, observándose que son de menor peso durante los primeros 16 días del cultivo y aumentar el peso conforme se acercan al final de la cinética (día 20); coincidiendo con los días en los que se obtienen los mayores rendimientos $Y_{p/s}$ (FZM convencional 0.049 ± 0.004 g/g, bafleado 0.064 ± 0.002 g/g, MPO convencional 0.257 ± 0.011 g/g, bafleado 0.240 ± 0.003 g/g).

EPS con pesos molecular altos son los que se obtuvieron de los cultivos llevados a cabo en medio FZM (19880 Da.) que tienen como fuente de carbono glucosa y EPS de menor peso molecular fueron obtenidos de los cultivos con medio MPO (4737 Da.) donde se usó lactosa como fuente de carbono. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Elisashvili (2012), quien señala que los cultivos de hongos llevados a cabo en medios que utilizan glucosa o maltosa como fuente de carbono presentan EPS de altos pesos moleculares; mientras que EPS de bajos pesos moleculares se encuentran cuando lactosa, fructosa o sacarosa son usadas como fuente de carbono en el medio de cultivo.

El PMP más alto se observó el día 18 de la cinética con 19880 Da en matraz convencional y 18912 Da en matraz Bafleado. Los valores más bajos para el medio FZM fueron 618 Da en matraz convencional y 1716 Da en matraz bafleado. Por otra parte los PMP mayores observados usando el medio MPO fueron 1542 Da en matraz convencional y 4737 Da en matraz bafleado, los valores menores fueron 613 Da en matraz convencional y 461 Da en matraz bafleado (figura 11).

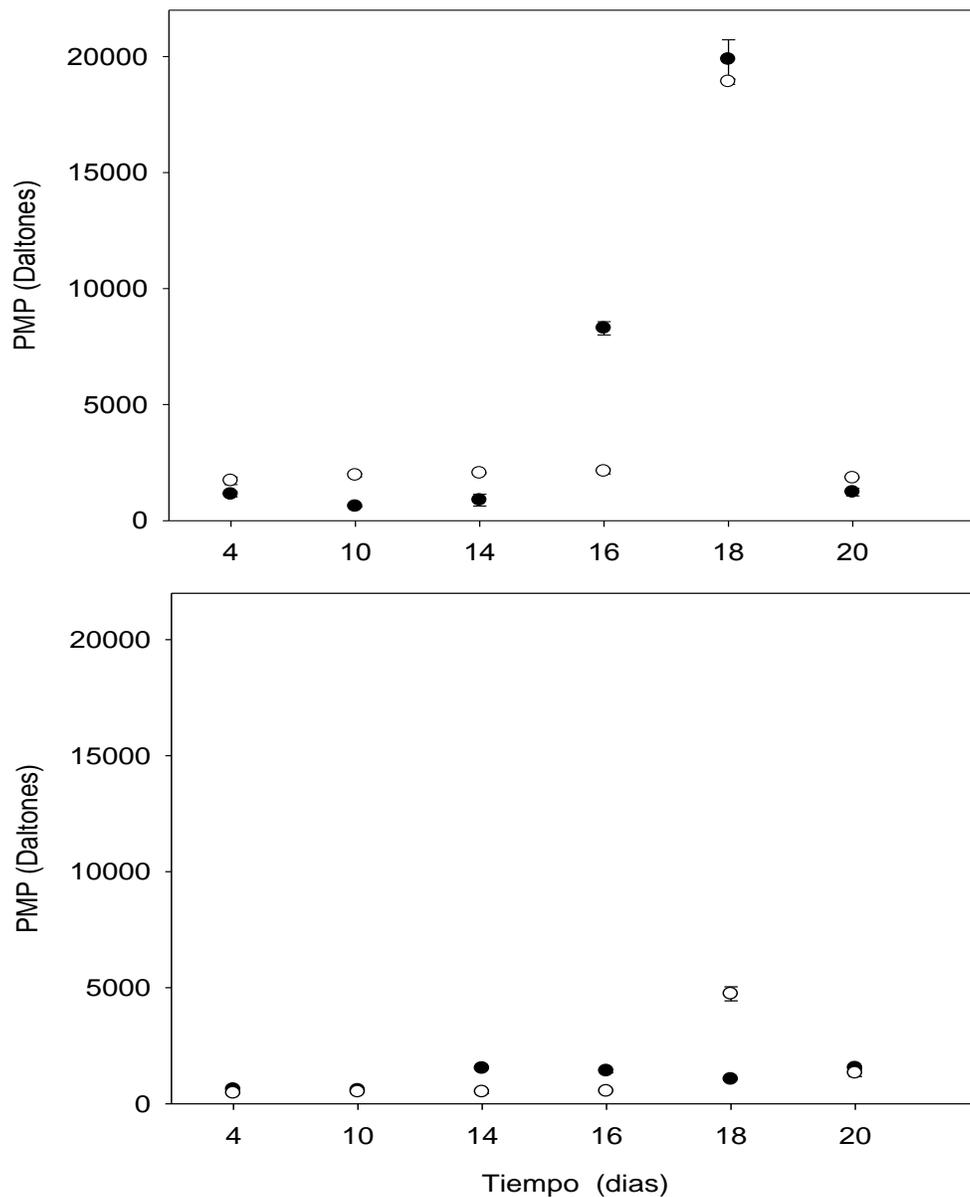


Figura 11. Pesos moleculares promedio de los EPS de *H. coffeata* correspondientes a cinéticas medio FZM (arriba), medio MPO (abajo) utilizando dos diferentes geometrías matraz Convencional ● y matraz Bafleado ○.

El PMP es un aspecto importante, ya que se ha propuesto en la literatura que el PMP de los diferentes extractos de hongos como *Ganoderma lucidum* (posiblemente algunos exopolisacáridos), podrían estar regulando la actividad citotóxica sobre líneas celulares epiteliales. Donde aquellos que presentan alto peso molecular

parecen ser los que presentan mejor actividad (Elisashvili 2012; Lai *et al* 2006; Zhu *et al* 2012). En el caso de *H. coffeata*, es posible que el peso molecular pueda estar relacionado con la actividad biológica de los componentes precipitados con isopropanol. Conocer los pesos moleculares de los EPS permitió diseñar de acuerdo al peso molecular los ensayos de citotoxicidad.

La figura 12 muestra el índice de polidispersión (el IP es la relación entre el peso molecular promedio en peso (M_w) y el peso molecular promedio en número (M_n) de los EPS obtenido en las cinéticas de *H. coffeata*. Los resultados revelan que los EPS obtenidos con medio FZM tienen un rango mayor de polidispersión que los obtenidos con MPO, estos últimos permanecen constantes.

Finalmente, se obtuvieron los PMP para los EPS cultivados en reactor tiempo fina día 10 del cultivo (agitado a 450 rpm, usando medio FZM), los resultados fueron de interés, debido a que los EPS obtenidos en reactor alcanzaron el mayor peso molecular (47666 Da) comparándolos con los obtenidos en matraz (dato no mostrado).

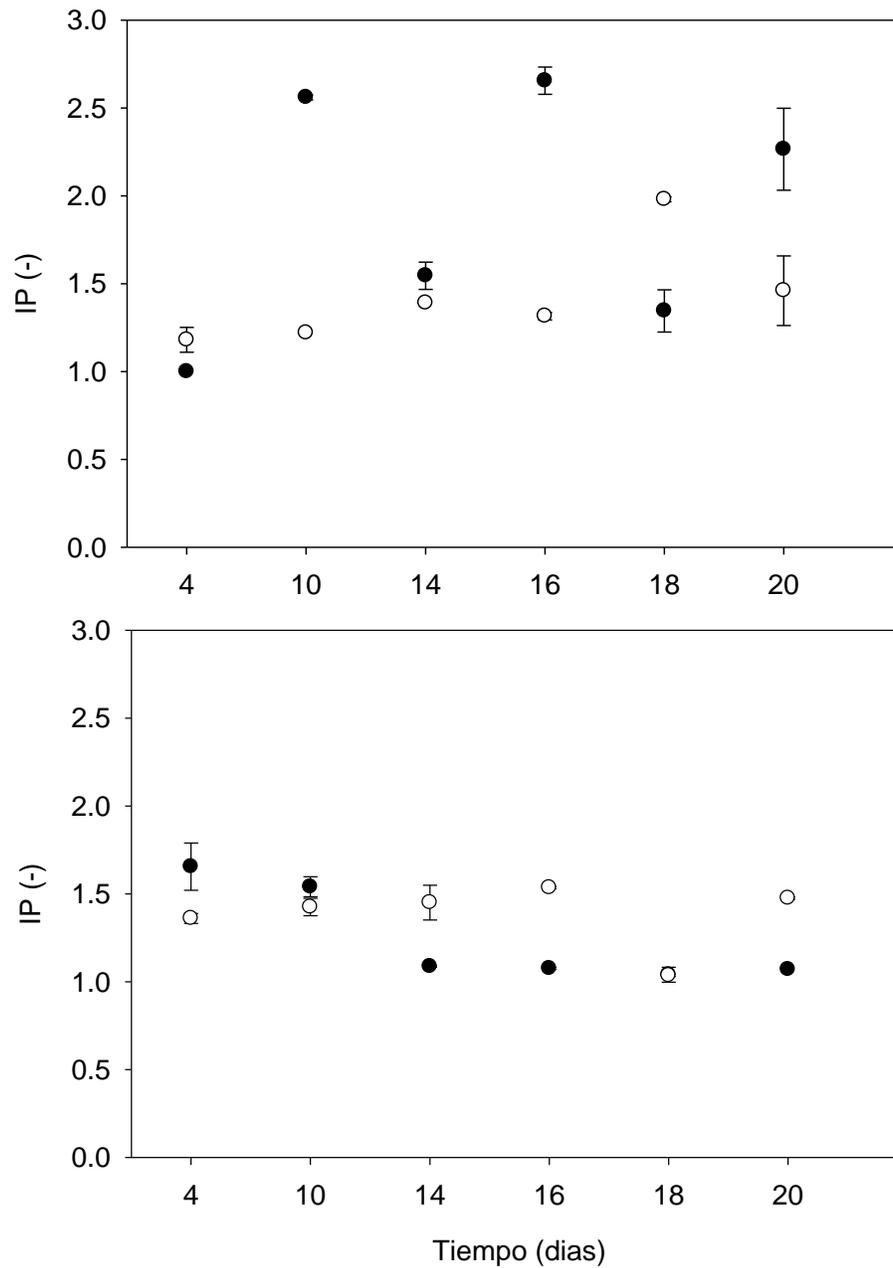


Figura 12. Índice de polidispersión (IP) de EPS de *H. coffeata* correspondientes a cinéticas medio FZM (arriba), medio MPO (abajo), utilizando dos diferentes geometrías matraz. Convencional ● y matraz Bafeado ○.

10.7 Ensayos de bioactividad

Con el fin de evaluar el efecto citotóxico de los EPS de *H. coffeata* en la línea celular de leucemia mieloide crónica K562 (línea celular derivada de pacientes con leucemia mieloide crónica CML, tal como lo describió Lozzio y Lozzio 1975), se realizó un ensayo preliminar de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), utilizando el filtrado completo obtenidos de los cultivos llevados a cabo en matraces usando medio MPO y FZM, a concentraciones de 2500, 1500, 1000 y 500 µg/mL, similares a las reportadas por Porras (2009). Los resultados de este análisis mostraron niveles de inhibición celular de $30\pm 3.7\%$ (MPO) y $37\pm 6.4\%$ (FZM) después de 48h de incubación, comparado con el control positivo.

Posteriormente se llevaron a cabo los ensayos de MTT usando los EPS obtenidos de cultivo en matraces, seleccionando los que presentaron mayor (FZM convencional día 18, 19880 Da, FZM bafleado día 16, 8219 Da) y menor peso molecular promedio (MPO día 16, convencional 1053 Da y MPO día 16, convencional 1411.5 Da). Finalmente se llevaron a cabo los ensayos de citotoxicidad con los EPS obtenidos de reactor agitado a 450 rpm (día 10 de cultivo, 47666 Da). Esto se llevó a cabo con el fin de determinar qué tan relevante o relacionado está la característica peso molecular con respecto a la actividad citotóxica sobre las células tumorales K562.

Los EPS fueron resuspendidos en agua destilada estéril (concentración 10 mg/mL). El ensayo de citotoxicidad fue realizado por triplicado en placas de 96 pozos, con una concentración inicial de 50×10^3 células (el experimento en todos los casos se realizó por lo menos 2 veces para verificar que fuese reproducible), que posteriormente se incubaron con diferentes concentraciones de EPS durante 48h.

Los resultados del ensayo de MTT de los EPS obtenidos de matraz, muestran tener un efecto aparentemente citotóxico sobre la línea celular K562 cuando es expuesta a concentraciones bajas (9.75 µg/mL) de los EPS de *H. coffeata* (figuras 14 y 15). Este fenómeno fue observado para los cuatro EPS de *H. coffeata* provenientes de cultivo en matraz.

Se ha reportado que se ha expuesto a las células K562 a diferentes concentraciones de EPS de hongos como *Cladonia furcata* y *Cordyceps gunnii* usando diferente tiempos de exposición a los EPS 24, 48 y 72h (Lin *et al* 2001;Zhu *et al* 2012), observándose mejores resultados a las 48h de exposición; las concentraciones utilizadas variaron de 25 a 800 $\mu\text{g/mL}$, mostrando ser mejor para el caso de *Cladonia furcata* 800 $\mu\text{g/mL}$ inhibiendo hasta un 52.7% el crecimiento de las células K562 (Lin *et al* 2001) y en el caso de *Cordyceps gunnii* 400 $\mu\text{g/mL}$, inhibió hasta un 56.67% el crecimiento celular (Zhu *et al* 2012b). Estos resultados sugieren que las concentraciones de EPS y los resultados que se puedan obtener pueden variar dependiendo de las características propias del EPS utilizados.

Para el caso particular de *H. coffeata*, los mejores resultados de inhibición celular se observaron cuando se utilizaron los EPS cultivados en medio MPO del día 18 (1053 Da) y el EPS cultivado en MPO del día 16 (1411 Da), debido a que presentaron citotoxicidad del $82\pm 5.3\%$ y $76\pm 14.2\%$ respectivamente. Los resultados de citotoxicidad en los EPS cultivados en medio FZM fueron bajos comparados con los obtenidos en medio MPO, $65\pm 1.8\%$ para el del día 16 y $53\pm 3.10\%$ para el del día 18. También, fue observado que en todos los casos la concentración más alta utilizada en los ensayos (10000 $\mu\text{g/mL}$) también presentó citotoxicidad, siendo $59\pm 17\%$ con respecto al control negativo, la más alta se presentó en el EPS del día 18 cultivado en medio MPO.

Con respecto al EPS obtenido del cultivo en reactor agitado a una velocidad de 450 rpm (47666 Da) se observa efecto citotóxico en todas las concentraciones usadas (10000, 5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.2, 78.1, 39, 19.5 y 9.75) figura 16, exhibiendo el mejor efecto citotóxico ($89\pm 3.1\%$) al igual que en los EPS cultivados en matraz en la concentración de 9.75 $\mu\text{g/mL}$.

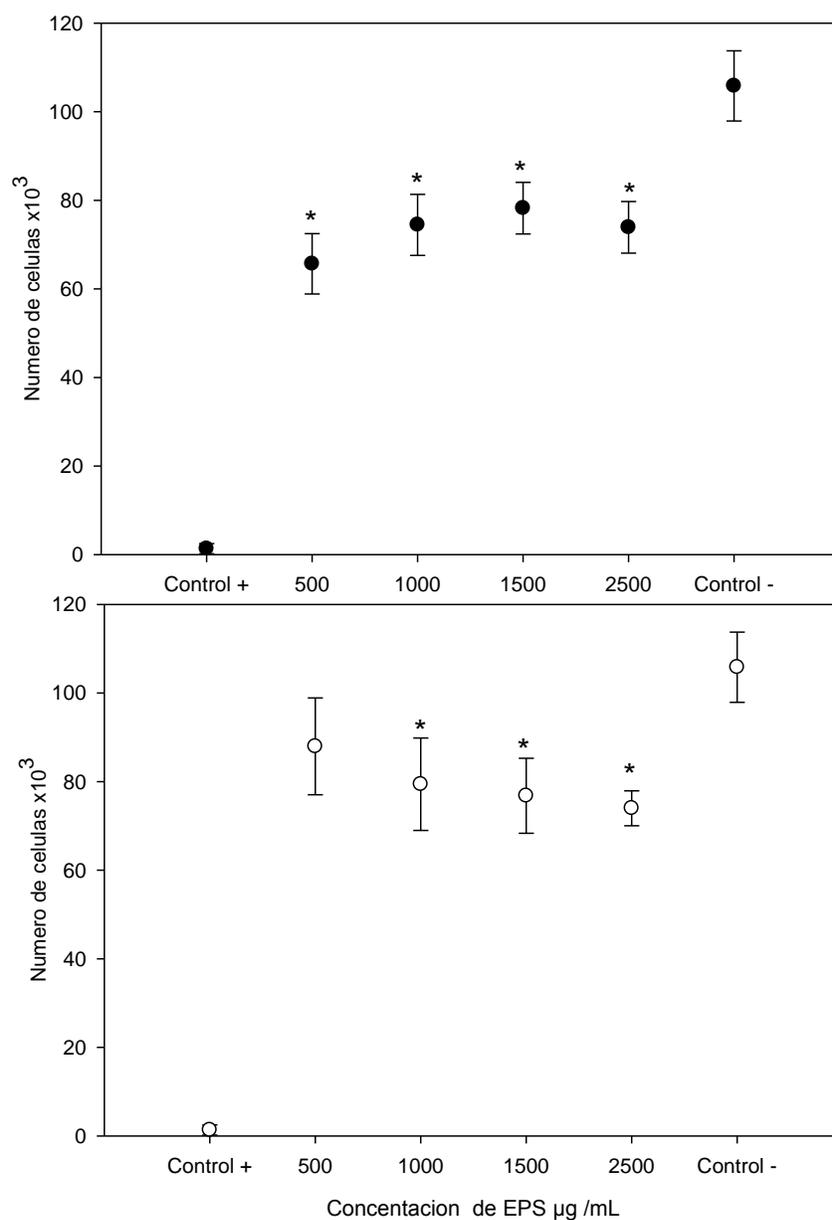


Figura 13. Efecto de los exopolisacáridos de *H. coffeata* sobre la viabilidad celular. Células K562 fueron incubadas durante 48h en presencia de concentraciones crecientes (500, 1000, 1500, 2500 µg/mL) de EPS obtenidos en cultivos creciendo en medio FZM (a), o medio MPO (b). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT. Como control negativo (control -) se incluyeron células sin tratamiento, y como control positivo (control +) células tratadas con H₂O₂ al 3%, todos los experimentos fueron realizados por triplicado. * = < 0.05 con respecto al control negativo.

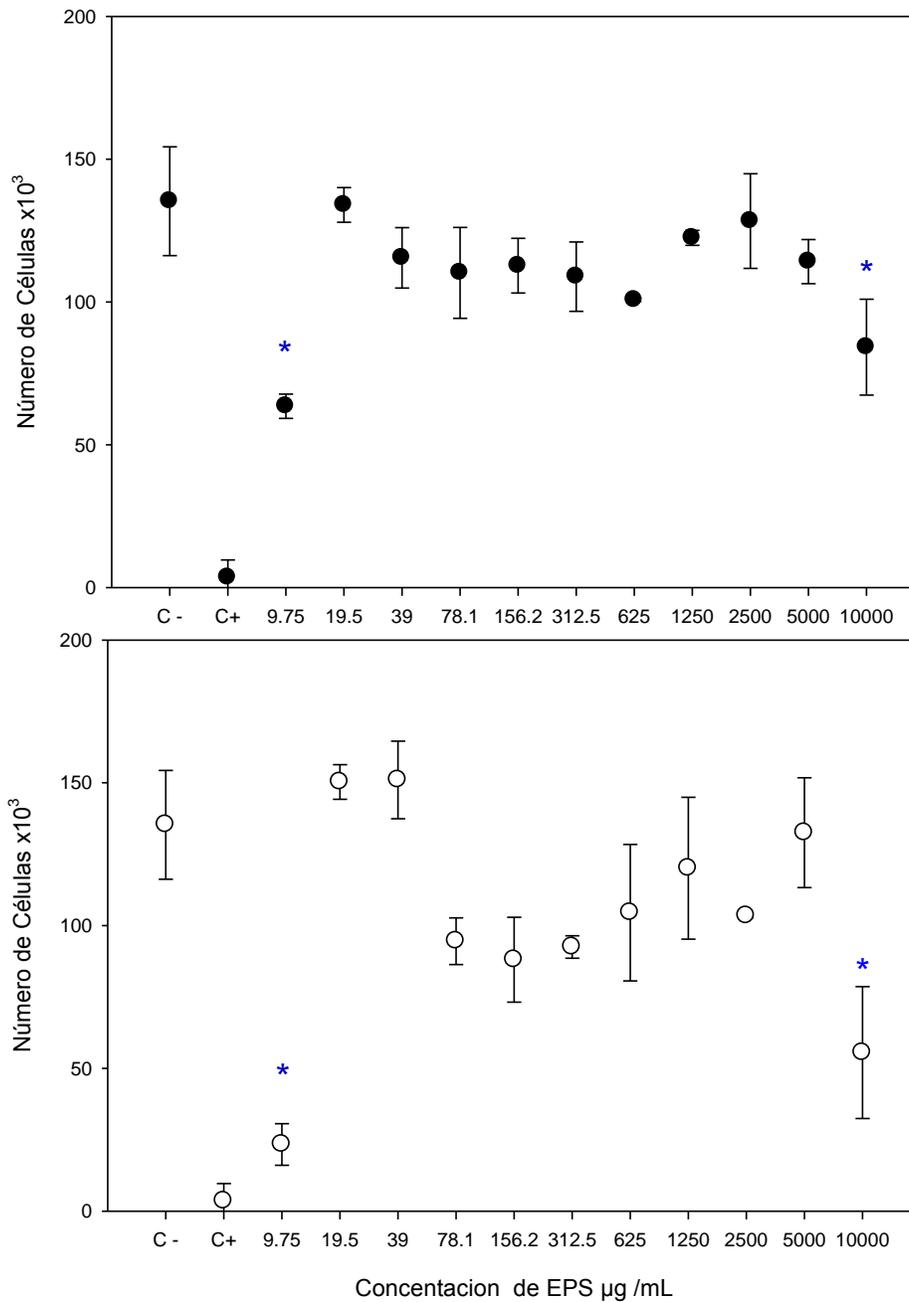


Figura 14. Efecto de los exopolisacáridos del día 18 de cultivo de *H. coffeata* sobre la viabilidad celular. Células K562 fueron incubadas durante 48h en presencia de concentraciones crecientes (9.75, 19.5, 39, 78.1, 156.2, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000, 10000 µg/mL) de EPS obtenidos en cultivos creciendo en medio FZM (●), o medio MPO (○). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT. Como control negativo (control -) se incluyeron células sin tratamiento, y como control positivo (control +) células tratadas con H₂O₂ al 3%, todos los experimentos fueron realizados por triplicado. * = < 0.05 con respecto al control negativo.

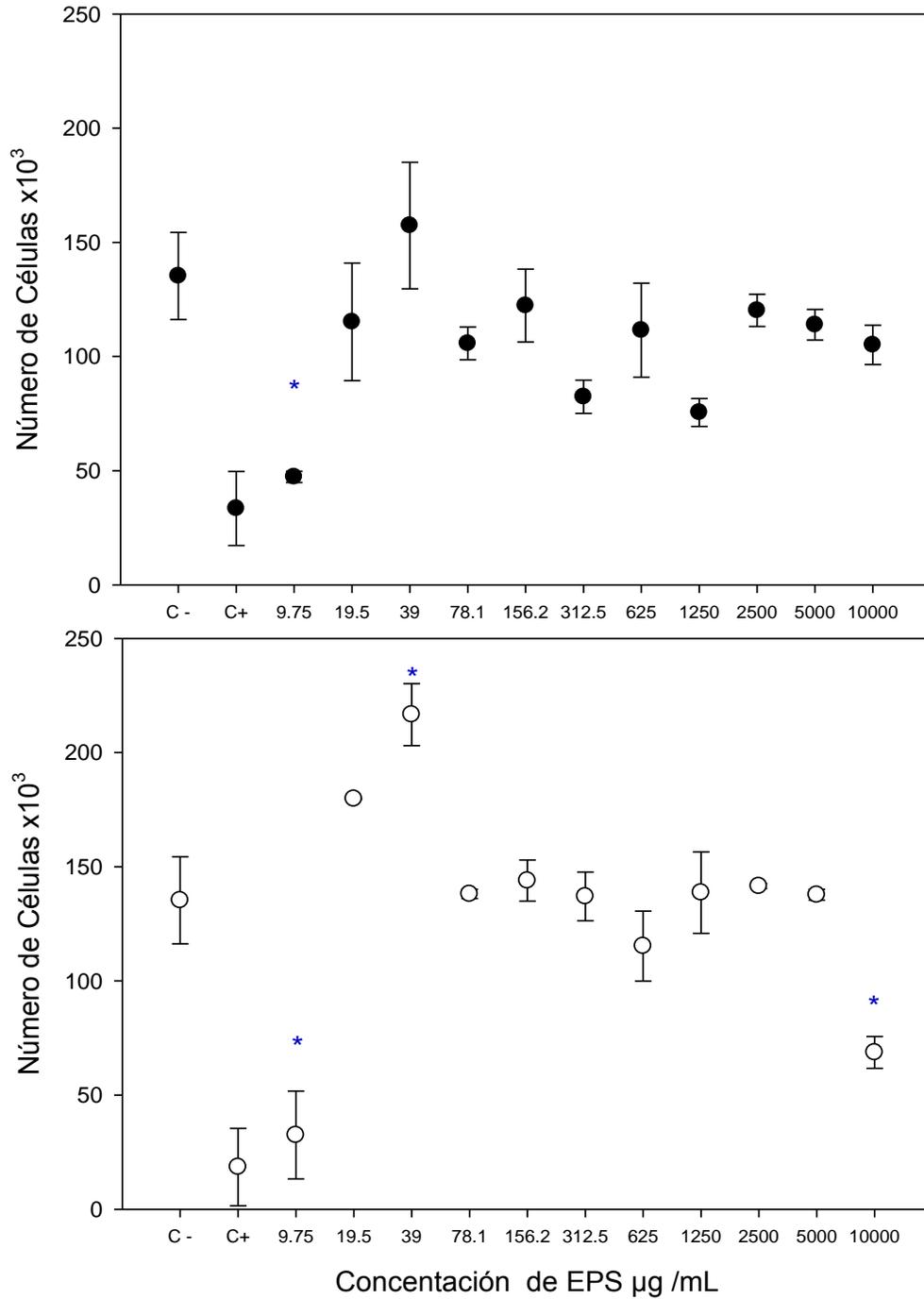


Figura 15. Efecto de los exopolisacáridos del día 16 de cultivo de *H. coffeata* sobre la viabilidad celular. Células K562 fueron incubadas durante 48h en presencia de concentraciones crecientes (9.75, 19.5, 39, 78.1, 156.2, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000, 10000 µg/mL) de EPS obtenidos en cultivos creciendo en medio FZM (●), o medio MPO (○). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT. Como control negativo (control -) se incluyeron células sin tratamiento, y como control positivo (control +) células tratadas con H₂O₂ al 3%, todos los experimentos fueron realizados por triplicado. * = < 0.05 con respecto al control negativo.

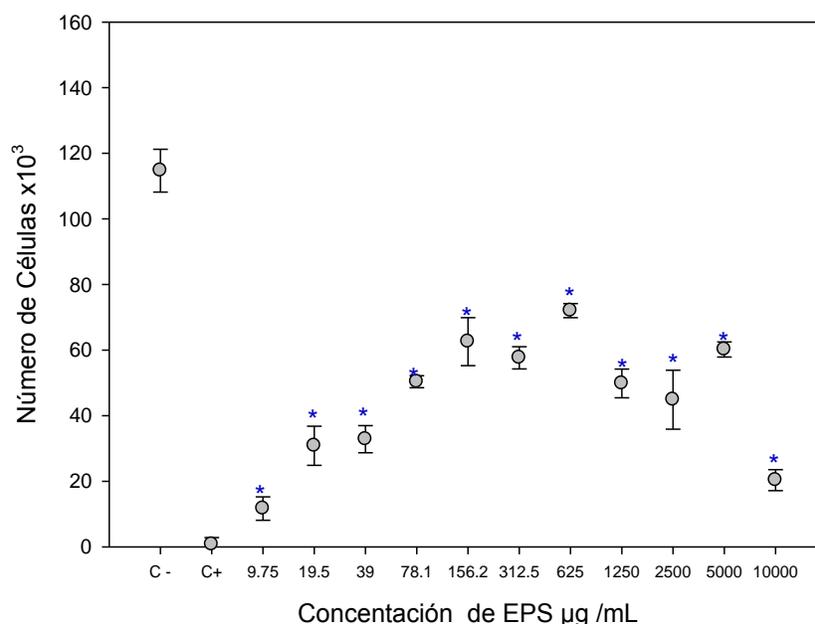


Figura 16. Efecto de los exopolisacáridos día 10 de cultivo de *H. coffeata* en biorreactor sobre la viabilidad celular. Células K562 fueron incubadas durante 48h en presencia de concentraciones crecientes (9.75, 19.5, 39, 78.1, 156.2, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000, 10000 µg/mL) de EPS obtenidos en cultivos creciendo en medio FZM (●). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT. Como control negativo (control -) se incluyeron células sin tratamiento, y como control positivo (control +) células tratadas con H₂O₂ al 3%, todos los experimentos fueron realizados por triplicado. * = < 0.05 con respecto al control negativo.

Se llevaron a cabo los análisis estadísticos mediante la prueba de Tukey para comparar si existían diferencias significativas entre las diferentes concentraciones usadas y el control negativo. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Statgraphics centurion® XVI.I.

Para el caso del EPS 16 cultivado en medio FZM (anexo 4, tabla 4.3) se observó que el control negativo tuvo diferencias significativas al compararlo con la concentración 9.75 µg/mL. Para el caso del EPS 16 cultivado en medio MPO (anexo 4, tabla 4.4) se observó que se presentaron diferencias significativas cuando se comparó el control negativo con las concentraciones 19.5, 39 µg/mL (el primero por presentar inhibición celular y el segundo por tener un valor de viabilidad por encima del control negativo). En el EPS 18 cultivado en medio FZM (anexo 4, tabla 4.5) se observó que el control negativo tuvo diferencias significativas cuando se comparó con las concentraciones 10000 y 9.75 µg/mL. Para el caso del EPS 18 cultivado en medio MPO (anexo 4, tabla 4.6) se observó que el control negativo presentó

diferencias significativas cuando se comparó con las concentraciones 10000 y 9.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En el caso del EPS obtenido al tiempo final del reactor cultivado en medio FZM (anexo 4, tabla 4.7) se observó que el control negativo presentó diferencias significativas con todas la concentraciones utilizadas en el experimento, lo que sugiere que este EPS tiene efecto citotóxico en cualquier concentración utilizada, observándose un efecto mayor en concentraciones bajas.

Debido a que la concentración 9.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mostró tener mejor efecto citotóxico en las células K562, se decidió realizar un experimento exploratorio en las concentraciones que están por debajo y arriba de ésta. Se probaron las concentraciones 20, 15, 10, 5 y 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los diferentes EPS. Los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado y repetidos por lo menos dos veces para probar su reproducibilidad. Se realizaron con una concentración inicial de células K562 de 40×10^3 (se bajó la concentración celular para descartar un falso positivo debido a muerte por alta densidad celular), el tiempo de exposición al EPS fue de 48h incubadas a 30°C con 5% de CO_2 .

Los resultados mostraron para el caso del EPS día 16 cultivado en FZM que en las concentraciones 15,10 y 20 existe citotoxicidad hasta del $45.9 \pm 1.6\%$ (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con respecto al control negativo, pero se observa que conforme disminuye la concentración de EPS, el efecto citotóxico también disminuye. En el ensayo del día 16 medio MPO las concentraciones en las que se observó inhibición hasta de $33 \pm 1.31\%$ fueron 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, las restantes concentraciones mostraron bajo a nulo efecto citotóxico (Figura 17). En el ensayo usando el EPS del día 18 FZM como para el 18 MPO mostraron tenerla misma tendencia a la observada en el ensayo del EPS 16 MPO donde 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mostraron inhibir el crecimiento celular ($48 \pm 12.3\%$ MPO y $58 \pm 4.1\%$ FZM) el resto de la concentraciones tuvieron bajo efecto citotóxico a nulo Figura 18.

El mejor resultado fue observado en el EPS obtenido del reactor agitado a 450 rpm cultivado en medio FZM, donde se presentó efecto citotóxico en todas las

concentraciones siendo mejor el alcanzado en la concentración 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (hasta un $49 \pm 7.9\%$) disminuyendo el efecto citotoxicidad conforme disminuía la concentración de EPS (Figura 19).

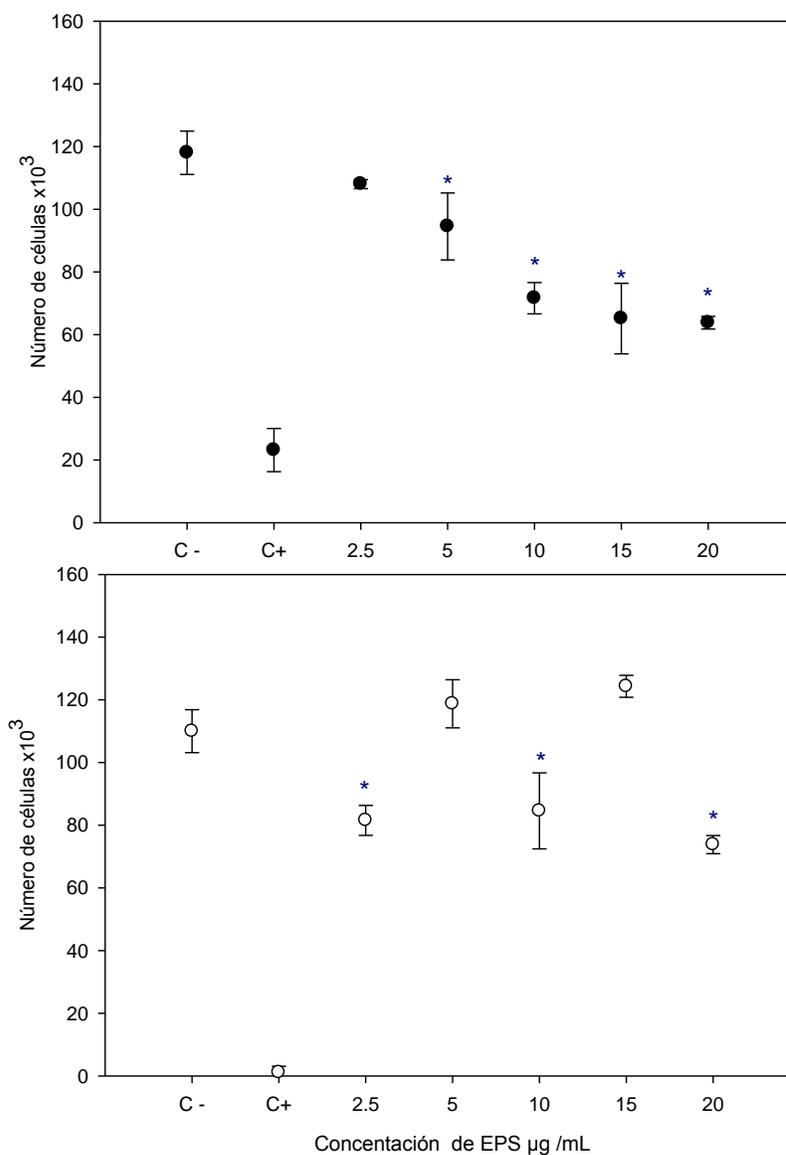


Figura 17. Efecto de los exopolisacáridos del día 16 de cultivo de *H. coffeata* sobre la viabilidad celular. Células K562 fueron incubadas durante 48h en presencia de concentraciones crecientes (2.5, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de EPS obtenidos en cultivos creciendo en medio FZM (●), o medio MPO (○). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT. Como control negativo (control -) se incluyeron células sin tratamiento, y como control positivo (control +) células tratadas con H_2O_2 al 3%, todos los experimentos fueron realizados por triplicado. * = < 0.05 con respecto al control negativo.

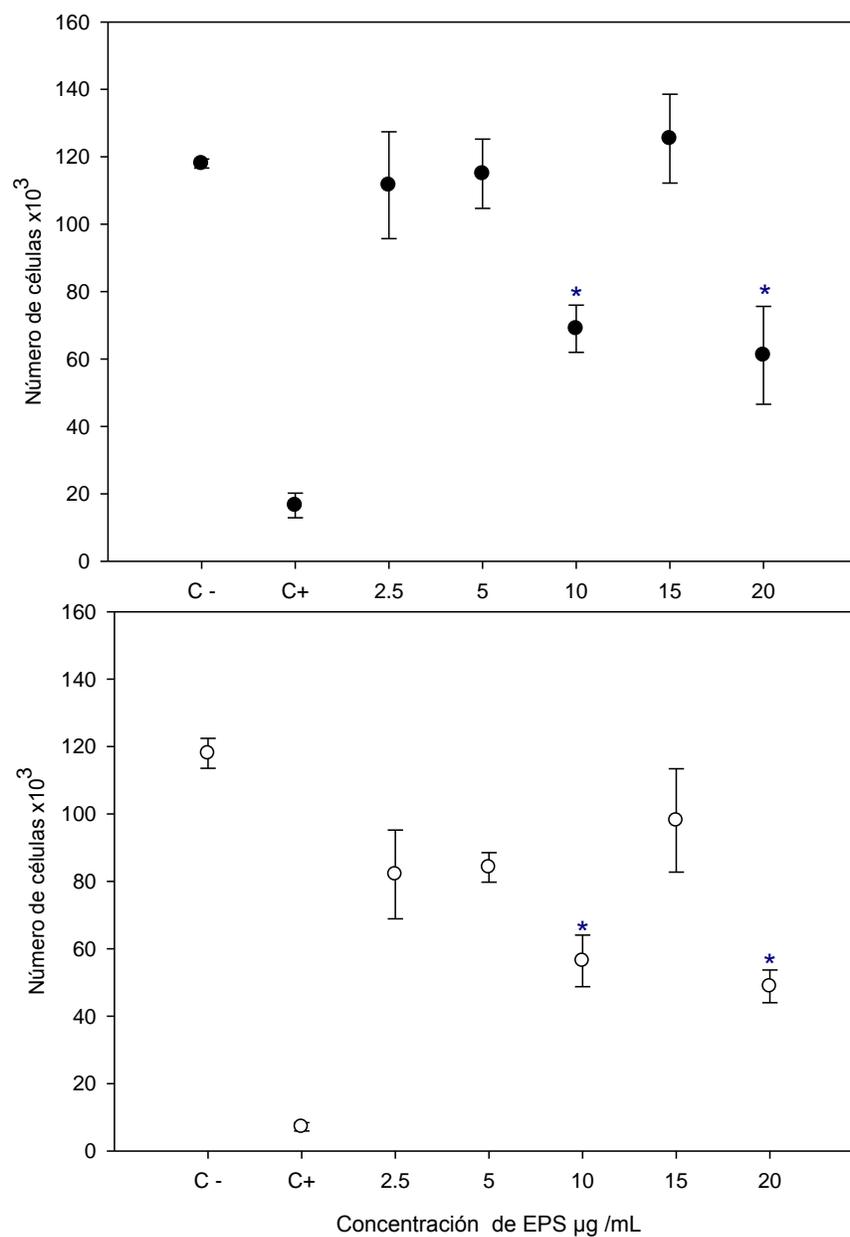


Figura 18. Efecto de los exopolisacáridos del día 18 de cultivo de *H. coffeata* sobre la viabilidad celular. Células K562 fueron incubadas durante 48h en presencia de concentraciones crecientes (2.5, 5, 10, 15, 20 µg/mL) de EPS obtenidos en cultivos creciendo en medio FZM (●), o medio MPO (○). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT. Como control negativo (control -) se incluyeron células sin tratamiento, y como control positivo (control +) células tratadas con H₂O₂ al 3%, todos los experimentos fueron realizados por triplicado. * = < 0.05 con respecto al control negativo.

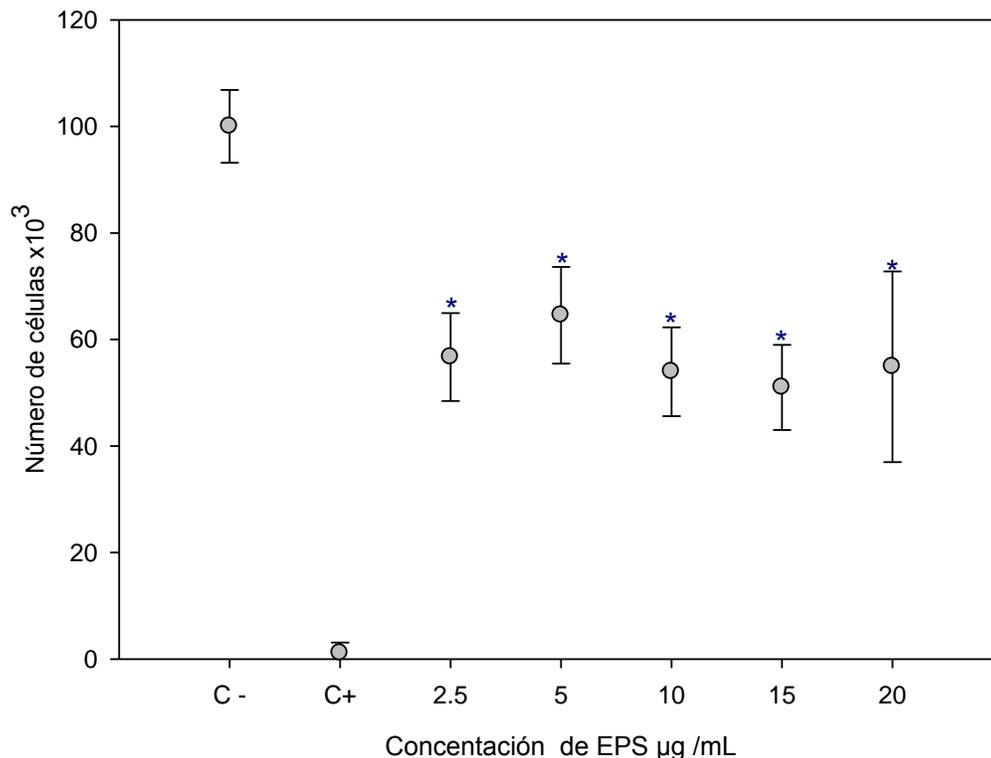


Figura 19. Efecto de los exopolisacáridos día 10 de cultivo de *H. coffeata* en biorreactor sobre la viabilidad celular. Células K562 fueron incubadas durante 48h en presencia de concentraciones crecientes (2.5, 5, 10, 15, 20 µg/mL) de EPS obtenidos en cultivos creciendo en medio FZM (●). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT. Como control negativo (control -) se incluyeron células sin tratamiento, y como control positivo (control +) células tratadas con H₂O₂ al 3%, todos los experimentos fueron realizados por triplicado. * = <math>p < 0.05</math> con respecto al control negativo.

Se observó que existe efecto inhibitorio tanto con EPS de bajo peso molecular como los obtenidos de los cultivos en medio MPO, como también en los EPS de alto peso molecular. Teniendo un mayor efecto los EPS de alto peso molecular como el obtenido de reactor (47666 Da). Estos resultados podrían sugerir que la inhibición del crecimiento celular podría estar ligado a dos tipos de efecto, el citoestático (ligado a un arresto en el ciclo celular) o a un efecto citotóxico. El tipo de efecto podría estar ligado al tamaño de peso molecular del EPS como lo sugieren algunos autores, ya sea por el alto peso molecular (Elisashvili 2012; Lai *et al* 2006), o por pesos moleculares bajos (Kimura 2013).

El probable mecanismo de acción de los EPS de *H. coffeata* sobre células tumorales podría estar relacionado con el propuesto por Li *et al* (2011) donde señalan que los polisacáridos producidos por hongos pueden inducir apoptosis asociada con la activación de algunas caspasas como la caspasa 3 y 9, e incluso pueden inducir algunas otras formas de muerte como la necrosis.

Sin embargo, para averiguar si *H. coffeata* puede inducir apoptosis o arresto en el ciclo celular de células tumorales será necesario realizar experimentos que nos permitan identificar productos generados durante las vías de apoptosis y necrosis.

XI. DISCUSIÓN

Los hongos han sido consumidos por su alto valor nutritivo, sabor y propiedades medicinales en diversas culturas desde hace cientos de años. En la cultura asiática los hongos son consumidos, por ser una fuente de energía rica en proteínas, minerales y fibra; adicionalmente existen varias especies como son *Lentinus edodes* (Shiitake), *Agaricus spp*, *Ganoderma lucidum* (reishi) que son altamente apreciadas por contribuir a mantener la salud y longevidad humana (Fazenda *et al* 2008). Estos beneficios a la salud se deben a los compuestos que forman la pared celular como la quitina, hemicelulosa, mananos, y distintos glucanos que dependiendo de su estructura química, grupos funcionales y ramificaciones desencadenaran diversas respuestas inmunes ligadas a mejorar la salud (Chen y Serviour 2007; Fazenda *et al* 2008; Chan *et al* 2009; Kimura *et al* 2013).

Debido a que muchos hongos tienen aplicaciones biotecnológicas y ambientales, es importante desarrollar nuevas tecnologías y técnicas de cultivo que nos permitan producir metabolitos específicos con procesos industriales económicos y viables. Para el caso particular de los basidiomicetos los métodos de cultivo tradicionales en medios sólidos toman varios meses hasta que aparezca el cuerpo fructífero, el medio de cultivo sumergido es una alternativa para producir compuesto de interés en menor tiempo (Fazenda *et al* 2008). Sin embargo, es importante tener claro que la forma en la que los basidiomicetos obtienen sus nutrientes en la naturaleza tiene un impacto a la hora de buscar las condiciones de crecimiento adecuadas en sistemas de cultivos líquidos (Elisashvili 2012), es por esto que cuidar cada aspecto de las condiciones de cultivo es importante para lograr finalmente producir diversos compuestos de interés.

Algunas de las etapas primordiales para trabajar con microorganismos con potencial de aplicación industrial son su aislamiento, selección y mantenimiento de cultivos estables. Para lograrlo es necesario seleccionar el adecuado método de conservación que nos permita mantener nuestro microorganismo libre de contaminación, mutaciones, deterioro y muerte, tomando en cuenta las características particulares de la especie.

Existe una variedad de métodos de conservación y mantenimiento para aislamiento de hongos, como aquellos que implican congelación, cultivo subsecuente en placas de agar, liofilización entre otros (Homolka 2014) sin embargo, no todos son exitosos cuando se usan en hongos basidiomicetes. Para el caso particular de *Humphreya coffeata* donde no se tienen esporas, ya que estas se producen solo cuando se genera el basidiocarpo o cuerpo fructífero (Herrera y Ulloa 2005), el aislamiento de *H. coffeata* es de tipo vegetativo y sensible a métodos que impliquen congelación, es por esto que se buscó un método de conservación no agresivo, que garantizara la integridad del aislado. Se usó y adaptó el método descrito por Castellani (1939) el cual consiste en conservar el aislado o esporas de hongos en agua destilada estéril, garantizando su integridad por varios años dependiendo de la especie (Castellani 1963, 1964). Se probó este método con algunas modificaciones en *H. coffeata* y mostró ser eficiente conservando el aislado hasta por 18 meses, sin presentar contaminación ni alteraciones aparentes (García-García *et al* 2014) convirtiéndose en una excelente alternativa para la conservación de *H. coffeata*. Este método descrito por Castellani es considerado efectivo, e incluso es reportado que existen especies de hongos en su mayoría ascomicetes que han sido conservados con este método durante 20 años de manera estable y hasta 2 años para algunos basidiomicetes (Ellis 1979; de Capriles 1989; Bueno y Gallardo 1998; Diogo *et al* 2005; Borman *et al* 2008; Homolka 2014).

Una vez asegurado el aislamiento, se definieron las condiciones de cultivo, tomando en cuenta lo reportado para *H. coffeata* (Porras 2007; Porras *et al* 2009) y los diversos factores físicos, químicos y biológicos que pueden afectar las condiciones de cultivo, morfología y producción de metabolitos deseados.

Factores Físicos

Algunos de los factores físicos como la temperatura, agitación, aireación, diseño de matraz y biorreactor pueden afectar las condiciones de cultivo (Fazenda *et al* 2008; Elisashvili 2012), Los cultivos de *H. coffeata* se realizaron a una temperatura de 30°C como lo reportó Porras (2007), la temperatura no fue modificada debido a que se ha reportado que en la mayoría de los hongos basidiomicetes las temperatura

óptima para la obtención de biomasa y polisacáridos oscila en un rango cerrado entre los 20°C y 35°C, puede variar dependiendo de la especie que se cultiva. Por ejemplo, *Antrodia cinnamomea* fue cultivada en temperaturas de 20°C a 32 °C, siendo mejor para la obtención de EPS las que abarcaron de 23°C a 28°C, *G. lucidum* presentó alta producción de EPS cuando se cultivó a 30°C y 35°C, *Fomes fomentarius* mostró mejores resultados cuando se cultivó a 25 °C, en algunas otras especies 30°C fue la temperatura óptima para la obtención de biomasa y polisacáridos (Yang *et al* 1998; Chen *et al* 2008; Elisashvili 2012)

La agitación y aireación son factores importantes para mejorar la producción de biomasa y metabolitos de interés en el cultivo, debido a que contribuyen a la transferencia de masa, sustrato, productos y oxígeno. Una óptima agitación representa un balance entre la transferencia de oxígeno en el medio y el estrés por corte, los cuales se ven afectados cuando se incrementa la agitación (Elisashvili 2012).

Los cultivos de *H. coffeata* realizados en matraz convencional y bafleado fueron agitados a 150 rpm, los realizados en biorreactor de 10L fueron agitados a 300, 450 y 500 rpm. En los cultivos realizados en matraz utilizando el inóculo 1 se observó que cambia la morfología, se incrementa la velocidad específica de crecimiento, la producción de biomasa y EPS de los cultivos llevados a cabo en matraz bafleado, esto podría deberse a que en el matraz bafleado se tiene una mejor transferencia de oxígeno debido a que los baffles podrían ejercer una fuerza de corte en el micelio, lo cual produce la diferencia en la morfología (agregados pequeños) y una adecuada agitación, que mantiene un gradiente de concentración entre el interior y exterior de la célula, que por medio del aumento de la velocidad de difusión ayudara a establecer un suministro adecuado de nutrientes a la célula (Oh *et al* 2007). Yang y Liao (1998) cultivaron *G. lucidum* en matraces convencionales probando diferentes velocidades de agitación (50-250 rpm) y se observaron que a 100 rpm se obtienen mayores cantidades de biomasa y a 150 rpm mejores producciones de EPS, sus resultados sugiriendo que altas velocidades de agitación favorecen la producción de

EPS debido a que decrece la absorción en las paredes celulares ocasionado por el estrés de corte, activando rutas para la producción de polisacáridos.

Sin embargo, la fuerza de corte creada por una alta agitación puede afectar el micelio de diferentes formas, ocasionando daño en la estructura celular conduciendo a cambios morfológicos y causando variaciones en la velocidad de crecimiento y formación de productos (Papagianni 2004). Lo cual podría explicar por qué se observaron mejor producción de EPS (2.31 g/L) y biomasa (10.4 g/L) en los cultivos realizado en biorreactor de 10L cuando se agito a 450 rpm y no cuando se agito a 500 rpm.

Algunos factores químicos como el pH y la composición del medio son importantes en los cultivos para mejorar la obtención de biomasa y productos de interés. El pH es un factor importante determinante en los cultivos, debido a que el pH inicial puede afectar la función de la membrana celular, la morfología, la estructura, consumo de nutrientes, actividad enzimática y síntesis de bioproductos (Elisashvili 2012; Fraga *et al* 2014).

En los cultivos llevados a cabo con *H. coffeata* se utilizaron diferentes pH iniciales, cuando se usó medio FZM el pH inicial fue 5.5, en medio MPO el pH fue 4.5. Los resultados de los cultivos en medio FZM durante la cinética mostraron perfiles similares cuando se inóculo de forma 1 o 2, donde se puede observar que el pH disminuye el día 4 del cultivo y se mantienen en pH alrededor de 3.0 y 4.0, pasado el día 10 de cultivo se observa un incremento que alcanza hasta pH 7.0. Estos resultados son consistentes con los reportados por Fang y Zhong (2002) donde en cultivos de *G. lucidum* se probaron diferentes pH iniciales que abarcaron de 3.5 a 7.0 y en todos observaron perfiles similares durante el cultivo, donde al día 4 del cultivo el pH decrece hasta 3.2 y permanece constante por una semana, alrededor del día 10 a 14, cuando la mayoría de la fuente de carbono está agotada el pH incrementa hasta 7. Los autores sugieren con estos resultados que durante los primeros 4 a 5 días se presenta un alto consumo de la fuente de carbono que resultar en la producción de ácidos orgánicos, los cuales hacen que el pH en el medio disminuya; Otros reportes sugieren que el aumento del pH hacia el final del

cultivo se debe al incremento de secreción de proteasas que degradan complejas fuentes de nitrógeno (Fazenda *et al* 2008). En los cultivos realizados utilizando medio MPO con un pH inicial de 4.5 se observa (figura 7) que el pH se mantiene constantes entre 4.0 y 5.0 durante toda la cinética, esto podría sugerir que debido a que la fuente de carbono no se agota durante el cultivo, no se activan los mecanismos de secreción de proteasas utilizadas para degradar otras fuentes de nitrógeno o carbono complejas. Finalmente algunos autores coinciden en que los pH óptimos para la producción de biomasa y compuestos de interés oscila entre el pH 3.5 y 6.5, esto debido a que en diferentes cultivos realizados en matraz con hongos como *G. lucidum* el pH inicial con el que se obtienen mejor cantidad de biomasa oscila entre 5.5-6.5, para IPS 5.7-7.0 y para EPS 3.5-4.5 (Fang y Zhong 2002). En hongos como *Sparassis cripa* y *A. cinnamomea* el pH óptimo para el cultivo fue 5.0. En cultivos de *Cordyceps militaris* realizados en biorreactor con el controlado a pH 6.0, se observó mejor producción de EPS que en cultivos sin controlar (Fazenda *et al* 2008). Finalmente se debe tomar en cuenta que el pH óptimo dependerá de varios factores entre ellos el tipo o especie de organismo con el que se trabaja.

Otro de los factores químicos importantes es el medio de cultivo que a menudo es la clave para el exitoso desarrollo del hongo durante el cultivo. Elegir el medio correcto puede promover el crecimiento y la formación de productos, por eso es importante considerar que cuando se trata de hongos basidiomicetos algunas características como altas concentraciones de carbohidratos son necesarias para lograr un alto crecimiento del micelio, la relación carbono nitrógeno también es importante, debido a que influye en el rendimiento y eficiencia para la producción de biomasa y metabolitos de interés (Hsieh y Yang 2004; Lee *et al* 2004; Park *et al* 2002; Rogalski *et al* 2006). También es importante tomar en cuenta si otras fuentes son usadas, como los suplementos de nitrógeno o minerales que son a menudo requeridos (Hsieh y Yang 2004; Lee *et al* 2004). La composición de muchos de los polisacáridos producidos por los hongos dependen de la fuente de carbono utilizada en el medio de cultivo (Hsieh y Yang 2004; Kim *et al* 2006; Lee *et al* 2004).

Los cultivos de *H. coffeata* fueron llevados a cabo utilizando dos medios de cultivo, la variación entre los medios de cultivo radica en la fuente de carbono usada y la cantidad de fuente de nitrógeno total. En el medio FZM se usó glucosa como fuente de carbono y 7.5 g/L de fuente de nitrógeno total (extracto de levadura 5.0 g/L, Peptona 1g/L), en el medio MPO se usó lactosa como fuente de carbono y 10 g/L de fuente de nitrógeno total (extracto de levadura 5.0 g/L, peptona 5.0 g/L). Los resultados de los cultivos mostraron que cuando se usa el medio MPO se obtienen mejores resultados en la velocidad específica de crecimiento, obtención de biomasa y EPS con respecto a los obtenidos en los cultivos en medio FZM, estos resultados tienen perfiles similares a lo reportado por Rahman *et al* (2012) donde cultivó al hongo *L. rhinocerus* en medio de cultivo usando 6 diferentes fuentes de carbono (Glucosa, Fructosa, Maltosa, Lactosa, sacarosa y xilosa), los mejores resultados fueron observados en el medio que usó como fuente de carbono lactosa, sus resultados sugieren que la lactosa al ser un disacárido, tiene un alto porcentaje de carbono a diferencia de un azúcar monosacárido como la glucosa, y este alto contenido de carbono en lactosa es el que ocasiona notable crecimiento de la biomasa. Sin embargo, poco se sabe acerca de la regulación y del metabolismo de la lactosa en hongos filamentosos. En hongos como *G. lucidum*, *M. esculenta*, *L. edodes*, *Pleurotus sp.* Se probaron diferentes fuentes de carbono y aunque en todas las fuentes de carbono usadas mostraron crecimiento, los mejores resultados fueron obtenidos usando glucosa como fuente de carbono (Fazenda *et al* 2008; Elisashvili 2012), en algunos cultivos de hongos como *A. niger* la lactosa se metaboliza lentamente y en algunos casos no se consume por completo, es considerada como una fuente de carbono pobre para el crecimiento de hongos ya que puede actuar como un represor catabólico (Fekete *et al* 2008).

Otro de los factores que pueden estar contribuyendo a una mejor producción de biomasa y EPS en medio MPO es la fuente de nitrógeno, debido a que la fuente de nitrógeno (nitrito, nitrato, sales de amonio, peptona, extracto de levadura) juega un importante rol en la sobreproducción de metabolitos fúngicos (Fazenda *et al* 2008) debido a que el nitrógeno es un factor crítico en la síntesis de algunas enzimas fúngicas involucradas en el metabolismo primario y secundario (Elisashvili 2012). En

algunos reportes es señalado que fuentes orgánicas de nitrógeno incrementan los rendimientos de biomasa en cultivos sumergidos de *G. lucidum* (Fang y Zhong 2002) y *Tremella mensenterica* donde se observó que diferentes tipos y concentraciones de fuentes de nitrógeno influyen el crecimiento celular y la producción de polisacáridos (Elisashvili 2012). Por lo tanto es importante señalar que la concentración de nitrógeno en el medio puede afectar la producción de biomasa y de diferentes metabolitos, resultado de diversos mecanismos metabólicos.

Uno de los factores biológicos importantes que pueden afectar la producción de biomasa y EPS en cultivos fúngicos es el inóculo. En los cultivos realizados con *H. coffeata* se utilizaron dos formas de inocular, la primera consistió en inocular un disco de agar con micelio de 5mm de diámetro en cada matraz, la segunda forma consistió en preparar un inóculo en matraz bafleado en medio (FZM o MPO según se requirió en cada cultivo) durante 4 días, de este preinóculo se tomaron 1 mL del medio con pequeños agregados y se inocularon en matraces de 250 mL con 50 mL de medio. Los resultados mostraron que existen una diferencia significativa cuando se usó como inóculo un disco de agar y cuando se usó como inóculo un preinóculo de matraz proveniente de matraz bafleado, siendo mejor este último (tabla 4, figura 5 y 6). Esto podría deberse a que cuando un inóculo proveniente de un medio de cultivo líquido, el micelio puede homogenizarse asépticamente, incrementando el número de puntos de crecimiento (Stanbury *et al* 1995), y es extensamente conocido que la concentración y forma del inóculo ejercen una gran influencia en cultivos sumergidos, de hecho la cantidad, tipo (esporas, vegetativo), edad, y viabilidad del inóculo pueden afectar la morfología celular, en especial la forma y el tipo de agregados miceliales que se forman durante el cultivo (Gibbs *et al* 2000; Fang *et al* 2002). Cuando ocurre el crecimiento en forma de agregados, la producción de metabolitos de interés depende del tamaño del agregado el cual determina la difusión de oxígeno en el centro del agregado. El tamaño del agregado es autoinfluido por variables como concentración de azúcares en el medio, agitación, y densidad del inóculo (Elisashvili 2012). Desafortunadamente existen pocos reportes que ayuden a comprender mejor los efectos del inóculo en cultivos sumergidos en hongos basidiomicetos.

Todos estos factores son importantes, debido a que benefician o afectan los cultivos de hongos y la producción de biomasa y metabolitos de interés como los exopolisacáridos. En los cultivos de *H. coffeata* se observó que las mejores condiciones para la obtención de mejores cantidades de biomasa y EPS fueron utilizar el inóculo tipo 2, y lactosa como fuente de carbono. Sin embargo, aunque la síntesis de EPS depende de diversos factores inmersos en las condiciones de cultivo (temperatura, pH, fuentes de nitrógeno, agitación, aireación) la fuente de carbono tiene un rol importante en la producción y constitución de los EPS, debido a que se ha demostrado que las fuentes de carbono pueden afectar la proporción de monosacáridos y grupos funcionales amino, sulfuro y fosfato que constituyen a los EPS (Wu *et al* 2014). Generalmente la glucosa es la mejor fuente de carbono para el crecimiento de micelio y producción de EPS de varios hongos. Wu *et al* (2014) realizó cultivos de *Paecilomyces hepiali* usando diferentes fuentes de carbono (glucosa, manosa, lactosa, sacarosa) y observaron que los EPS producidos tenían un rango de distribución de pesos moleculares entre 5.7×10^3 - 2.0×10^6 Da, donde los EPS cultivados en medio con glucosa y manosa presentaron los mayores pesos moleculares, sugiriendo que esto podría deberse a que la manosa y la glucosa son monosacáridos que se metabolizan de manera más rápida para sintetizar EPS, a diferencia de las otras fuentes de carbono probadas. En hongos como los del género *Ganoderma* se ha observado que el peso molecular de los EPS obtenidos de cultivos donde se usa glucosa o maltosa como fuente de carbono es de 2000 kDa, los obtenidos de cultivos en medios donde se usa lactosa, sacarosa o fructosa como fuente de carbono fueron más bajos que 2000 kDa (Reshetnikov *et al* 2001). Adicionalmente se ha observado que en la etapas iniciales del cultivo los EPS producidos son menores a 500 kDa, sin embargo, en fase estacionaria se incrementan hasta 1000 kDa y en la fase de muerte el peso molecular se puede elevar hasta alcanzar 2000 kDa (Elisashvili 2012). Este es un importante descubrimiento para el control del tipo de EPS requerido, ya que se ha reportado que la actividad del polisacárido puede verse afectada por el peso molecular (Reshetnikov *et al* 2001). La literatura sugiere que la función de los polisacáridos está basada en sus propiedades fisicoquímicas y en su composición. La variación

estructural existente en la secuencia de azúcares de los residuos y modificaciones como acetilación, sulfatación y la fosforilación tienen un rol dominante en la regulación de diversos procesos biológicos tales como en la supervisión del sistema inmune, adhesión celular, proliferación, apoptosis y desarrollo celular (Wu et al 2014).

Los ensayos de bioactividad (citotoxicidad del EPS sobre la línea celular K562) se realizaron tomando en cuenta los pesos moleculares promedio, donde el de mayor peso molecular fue el proveniente de cultivo realizado en reactor día 10 medio FZM (47666 Da), este EPS fue el que mostró una mayor efecto citotóxico en todas las concentraciones usadas, siendo mejor en concentraciones entre 15 y 10 µg/mL de EPS. Por otro lado los EPS obtenidos de cultivos en matraces mostraron un efecto citotóxico menor, sin embargo, los mejores resultados se observaron en las concentraciones 10 y 20 µg/mL. Esto podría deberse a la afinidad que presentan los EPS de *H. coffeata* con los receptores de las células K562 para inducir el efecto citotóxico dado que se sabe que por su peso molecular, los polisacáridos no son capaces de penetrar las células como las del sistema inmune para activarlo directamente, por lo tanto la estimulación de mecanismos por polisacáridos envuelve diferentes receptores celulares como dectina-1, receptor de complemento 3 (CR3), lactosilceramida (LacCer) y receptores tipo Toll (TLR) 2. En tales casos la eficiencia de los polisacáridos es gobernada por su afinidad con el receptor de las células (Chen y Serviour 2007). En general polisacáridos de alto peso molecular usualmente exhiben mayor actividad, esta actividad superior, podría atribuirse a una mejor afinidad con los receptores de carbohidratos de la células (El Hesham *et al* 2013), sin embargo, se ha reportado que algunos polisacáridos de pesos moleculares bajos también exhiben fuerte efecto inmunoestimulador incrementando la secreción de TNF α y proliferación de linfocitos (Bimczok *et al* 2009).

Será necesario realizar más estudios, para aislar e identificar metabolitos de *H. coffeata*, y de esta forma entender mejor el mecanismo citotóxico de estos compuestos sobre las líneas celulares K562 y Jurkat.

XII. CONCLUSIONES

- Se evaluó el método de conservación de micelio en agua destilada estéril, en la búsqueda de un método que no mostrara ser agresivo con el micelio de *H. coffeata* (como los métodos que utilizan congelación). Este método permitió reactivar el aislado, mostró tener bajos cambios morfológicos, no presentó contaminación durante las pruebas realizadas para mostrar su eficiencia en la reactivación de la colonia y fue viable durante 18 meses.
- Se evaluaron dos tipos de inóculo para los cultivos de *H. coffeata*: uno proveniente de un disco tomado de una placa de agar (inóculo 1) y otro tomado de un preinóculo realizado en matraz bafleado (inóculo 2). cuando se crecieron en las mismas condiciones (medio FZM, 30°C, 150 rpm) se observaron diferencias en la producción de biomasa y EPS. Los mejores resultados óptimos fueron obtenidos cuando se usa el inóculo de tipo 2.
- Se presentaron diferencias en las cinéticas de crecimiento y producción de EPS. Se compararon los cultivos donde se usaron diferentes fuentes de carbono (lactosa y glucosa) y diferente geometrías de matraz (convencional y bafleado). Las mejores concentraciones de biomasa y EPS fueron obtenidas de cultivos realizados en medio que utiliza lactosa como fuente de carbono. Sin embargo, los EPS provenientes de medio de cultivo con lactosa, presentaron PMP bajos y los obtenidos utilizando glucosa como fuente de carbono fueron altos. Con respecto a la geometría de matraz, no parece tener un impacto en la producción de EPS y biomasa, pero sí en la morfología de *H. coffeata* durante el cultivo.
- Finalmente los cinco diferentes EPS obtenidos en diversas condiciones de cultivo de *H. coffeata* (matraz bafleado, convencional, medio FZM, MPO, inóculo 1 y 2) tuvieron un importante efecto inhibitorio en el crecimiento de la células K562 cuando se utilizaron bajas concentraciones del EPS liofilizado. Los EPS provenientes del cultivo en reactor agitado a 450 rpm, que presentaron un alto PMP (47666 Da), tuvieron un efecto citotóxico en todas las concentraciones utilizadas. Esto podría sugerir que el efecto citotóxico de los

EPS obtenidos de *H. coffeata*, podrían estar ligados al tamaño del peso molecular; que a su vez está influenciado por las condiciones de cultivo.

XIII. PERSPECTIVAS

- Evaluar la cinética de crecimiento celular y la producción de exopolisacáridos e intrapolisacáridos, de *H. coffeata* en cultivos sumergidos en biorreactor.
- Aislar Intrapolisacáridos de micelio de *H. coffeata*.
- Determinar la estructura química de los EPS e IPS.
- Determinar el IC₅₀ de los IPS y EPS en células K562 y Jurkat.
- Probar los EPS e IPS en células sanas.
- Analizar la distribución de las fases del ciclo celular de las células K562 y Jurkat sometidas a diferentes concentraciones de EPS e IPS de *H. coffeata*.

XIV. BIBLIOGRAFÍA

- Asatiani MD, Elisashvili V, Wasser SP, Reznick AZ, Nevo E. Antioxidant activity of submerged cultured mycelium extracts of higher basidiomycetes mushrooms. *Int J Med Mushrooms*. 2007; 9: 151–58
- Baskar G, Sathya SR, Jinnah RB, Sahadevan R. Statistical optimization of polysaccharide production by submerged cultivation of Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt.: Fr.) P. Karst. MTCC 1039 (Aphyllophoromycetideae). *Int J Med Mushrooms*. 2011; 13:41-9
- Bautista TDC. Efecto de la energía de disipación media en el crecimiento del hongo filamentoso *Humprheya coffeata* y la producción de exopolisacáridos. Tesis para obtener el título de Ingeniera Química. Universidad Nacional de Colombia. 2013
- Berg MJ, Tymoczko JL, Strayer L. Bioquímica. Editorial Reverte. Sexta edición. Barcelona 2008; 68-69
- Bimczok D, Wrenger J, Schirrmann T, Rothkötter HJ, Wray V, Rau U. Short chain regioselectively hydrolyzed scleroglucans induce maturation of porcine dendritic cells. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009; 82:321-31
- Bounous DI, Campagnoli R, Brown J. Comparison of MTT colorimetric assay and tritiated thymidine uptake for lymphocyte proliferation assays using chicken splenocytes. *Avian Dis*. 1992; 36:1022–1027
- Borman AM, Szekely A, Campbell CK, Johnson EM. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia*. 2006; 161:361–368
- Borchers AT, Keen CL, Gershwin ME. Mushrooms, tumors, and immunity: an update. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 2004; 229: 393-406.
- Bueno L, Gallardo R. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Rev Iberoam Micol*. 1998; 15:166-168

-
- Carvajal CDM, Rendón LLA. Evaluación de la Producción de exopolisacáridos en fermentación sumergida a partir de *Ganoderma lucidum*. Proyecto de grado para optar al título de Ingeniero de Procesos. Universidad EAFIT. Medellín 2004
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity. Testing. Cancer. Res. 1987; 47:936–942.
- Castellani A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. J Trop Med. 1939; 42:225-226.
- Castellani A. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. Mycopathologia. 1963; 20:1-6.
- Castellani A. The "water cultivation" of pathogenic fungi. Ann Soc Belg Med trop. 1964; 44:217-220
- Chang R. Bioactive polysaccharides from traditional Chinese medicine herbs as anticancer adjuvants. J Altern Complement Med. 2002; 8: 559-565.
- Chang WY, Lu JT. Molecular characterization of polysaccharides in hot-water extracts of *Ganoderma lucidum* fruiting bodies. J food drug anal. 2004; 12:59-67.
- Chan GC, Wing KC, Sze DM. The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. J Pediatr Hematol Oncol. 2009, 2: 25
- Chen RY, Yu DQ. Studies on the triterpenoid constituents of the spores of *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetidae). Int. J. Med. Mush. 1999; 1: 147–152
- Chen J, Servioir R. Medicinal importance of fungal β (1-3), (1-6) glucan. Mycol Res. 2007; 111:635-652
- Chen W, Zhao Z, Chen S-F, Li Y-Q. Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect in vitro. Bioresour Technol. 2008; 99: 3187–94

-
- Cun Z, Mizuno T, Ito H, Shimura K, Sumiya T, Kawade M. Antitumor activity and immunological property of polysaccharides from the mycelium of liquid-cultured *Grifola frondosa*. J JPN SOC FOOD SCI 1994; 41: 724-733
- de Capriles CH, Mata S, Middelveen M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. Mycopathologia 1989; 106:73-79.
- Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods. 1986; 2: 271-7.
- Deshmukh SK, Rai MK. Biodiversity of fungi; their role in human life. Science Publishers, Inc. EUA. 2005; 289-328.
- Diogo HC, Sarpieri A, Pires MC. Fungi preservation in distilled water. An Bras Dermatol. 2005; 80: 591-594
- Dubois M, Gilles K A, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Div biochem. 1956; 28:350-356
- El Enshasy HA, Hatti-Kaul R. Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. Trends Biotechnol. 2013; 31: 668-77
- Ellis JJ. Preserving fungus strain in sterile water. Mycologia. 1979; 71: 1072-1075
- Elisashvili V, Kachlishvili ET, Wasser SP. Carbon and nitrogen source effects on basidiomycetes exopolysaccharide production. Prikl Biokhim Mikrobiol. 2009; 45: 592-6.
- Elisashvili V. Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products (review). Int J Med Mushrooms. 2012; 14:211-239
- Eo SK, Kim YS, Lee CK, Han SS. Antiherpetic activities of various protein bound polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum*. J. Ethnopharmacol. 1999; 68: 175–181.

-
- Fang QH, Zhong JJ. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites-ganoderic acid and polysaccharide. *Biochem. Eng. J.* 2002; 10: 61-65.
- Fazenda ML, Seviour R, McNeil B, Harvey LM. Submerged culture fermentation of "higher fungi": the macrofungi. *Adv Appl Microbiol.* 2008; 63: 33-103.
- Fekete E, Padra J, Szentirmai A, Karaffa L. Lactose and D-galactose catabolism in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2008; 55: 119-24
- 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; 111: 936-946
- García-García M., Rocha-Zavaleta, L, Valdez-Cruz NA, Trujillo-Roldan, MA. Conservation of the mycelia of the medicinal mushroom *Humphreya coffeata* (Berk.) Stey. in sterile distilled water. *MethodsX.* 2014; 1: 19-22
- Gamboa-Suasnavart R, Valdez-Cruz N, Córdova-Dávalos L, Martínez-Otelo J Servín-Gonzalez L, Espitia C, Trujillo Roldán MA. The O-mannosylation and production of recombinant APA (45/47 KDa) protein from *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans* is affected by culture conditions in shake flasks. *Microb. Cell Fact.* 2011; 10: 110
- Gao XX, Fei XF, Wang BX, Zhang J, Gong YJ, Minami M, Nagata T, Ikejima T. Effects of polysaccharides (FI0-b) from mycelium of *Ganoderma tsugae* on proinflammatory cytokine production by THP-1 cells and human PBMC (I). *Acta Pharmacol. Sin.* 2000; 21: 1179–1185
- Gao JJ, Min BS, Ahn EM, Nakamura N, Lee HK, Hattori M. New triterpene aldehydes, lucialdehydes A-C, from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against murine and human tumor cells. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2002; 50: 837–840.
- Giavasis I. Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. *Curr Opin Biotechnol.* 2014; 162-173

-
- Gibbs PA, Serviour RJ, Schmid F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: Problems and possible solutions. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2000; 20: 17-48.
- González AG, León F, Rivera A, Padron JI, González-Plata J, Zuluaga JC, Quintana J, Estévez F, Bermejo J. New lanostanoids from the fungus *Ganoderma concinna*. *J. Nat. Prod.* 2002; 65: 417–421
- Herrera T, Ulloa M. El Reino de los Hongos Micología básica y aplicada. Editorial fondo de cultura económica segunda edición .México. 2005; 328-329.
- Hikino H, Ishiyama M, Suzuki Y, Konno C. Mechanisms of hypoglycemic activity of ganoderan B: a glycan of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Med.* 1989; 55: 423–428.
- Hikino H, Mizuno T. Hypoglycemic actions of some heteroglycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Med.* 1989; 55: 385.
- Homolka L. Preservation of live cultures of basidiomycetes. *Fungal biol.* 2014; 118: 107-125
- Hsieh C, Yang FC. Reusing soy residue for the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Bioresour. Technol.* 2004; 91: 105–109
- Jie-Quin Liu, Cui-Fang Wang, Yan Li, Huai-Rong Luo and Ming-Hua Qiu. Isolation and Bioactivity Evaluation of Terpenoids from the Medicinal Fungus *Ganoderma sinense*. *Planta Med.* 2011; 78: 368-376.
- Kanayama H, Togami M, Adachi N, Fukai Y, Okumoto T. Studies on the antitumor active polysaccharides from the mycelia of *Poria cocos*: III. Antitumor activity against mouse tumors. *Yakugaku Zasshi.* 1986; 106: 307-319
- Kao HJC, Jesuthasan AC, Bishop KS, Glucina PM, Fergus LR. Anti-cancer activities of *Ganoderma lucidum*: active ingredients and pathways. *FFHD* 2013; 3: 48-65
- Kawagishi H, Ando M, Mizuno T. Hericenone A and B as cytotoxic principles from the mushroom *Hericium erinaceus*. *Tetrahedron Lett.* 1990; 31: 373-386.

-
- Kawagishi H, Mitsunaga SI, Yamawaki M, Ido M, Shimada A, Kinoshita T, Murata T, Usui T, Kimura A, Chiba S. A lectin from mycelia of the fungus *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* .1997; 44: 7–10.
- Kiho T, Shiose Y, Nagai K, Ukai S. Polysaccharides in fungi. XXX. Antitumor and immunomodulating activities of two polysaccharides from the fruiting bodies of *Armillariella tabescens*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 1992; 40: 2110-2114.
- Kim DH, Shim SB, Kim NJ, Jang IS. Beta-glucuronidaseinhibitory activity and hepatoprotective effect of *Ganoderma lucidum*. *Biol. Pharm. Bull.* 1999; 22: 162–164
- Kim YS, Eo SK, Oh KW, Lee C, Han SS. Antiherpetic activities of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* alone and in combinations with interferons. *J. Ethnopharmacol.* 2000; 72: 451–458.
- Kim YO, Han SB, Lee HW, Ahn HJ, Yoon YD, Jung JK, Kim HM, Shin CS. Immunostimulating effect of the endo-polysaccharide produced by submerged culture of *Inonotus obliquus*. *Life Sci.* 2005; 77: 2438-2456.
- Kim HM, Paik SY, Ra KS, Koo KB, Yun JW, Choi JW. Enhanced production of exopolysaccharides by fed-batch culture of *Ganoderma resinaceum* DG-6556. *J. Microbiol.*2006; 44: 233–242.
- Kimura Y, Taniguchi M, Baba K. Antitumor and antimetastatic effects on liver of triterpenoid fractions of *Ganoderma lucidum*: mechanism of action and isolation of an active substance. *Anticancer Res.* 2002; 22: 3309–3318.
- Kimura T. Natural products and biological activity of the pharmacologically active cauliflower mushroom *Sparassis crispa*. *Biomed Res Int.* 2013; 1-9.
- Kleinwächter P, Anh N, Kiet TT, Schlegel B, Dahse HM, Hartl A, Grafe U. Colossolactones, new triterpenoid metabolites from a Vietnamese mushroom *Ganoderma colossum*. *J. Nat. Prod.*2001; 64: 236–239.

-
- Komoda Y, Shimizu M, Sonoda Y, Sato Y. Ganoderic acid and its derivatives as cholesterol synthesis inhibitors. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1989; 37: 531–533
- Lai KN, Chan LY, Tang SC, Leung JC. *Ganoderma* extract prevents albumin-induced oxidative damage and chemokines synthesis in cultured human proximal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant*. 2006; 21: 1188-97.
- Lee S, Park S, Oh JW, Yang C. Natural inhibitors for protein prenyltransferase. *Planta Med*. 1998; 64: 303–308.
- Lee JM, Kwon H, Jeong H, Lee JW, Lee SY, Baek SJ, Surh YJ. Inhibition of lipid peroxidation and oxidative DNA damage by *Ganoderma lucidum*. *Phytother Res*. 2001; 15: 245–249
- Lee BC, Bae JT, Pyo HB, Choe TB, Kim SW, Hwang HJ, Yun JW. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola fondosa*. *Enzyme Microbiol. Technol*. 2004; 35: 369–376.
- Li P, Zhang K. Isolation, purification and bioactivities of exopolysaccharides from fermented broth of *Ganoderma lucidum*. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 2000; 40: 217–220.
- Li WJ, Chen Y, Nie SP, Xie MY, He M, Zhang SS, Zhu KX. *Ganoderma atrum* polysaccharide Induces anti-tumor activity via the mitochondrial apoptotic pathway related to activation of host immune response. *J Cell Biochem*. 2011; 112: 860–871
- Li N, Yan C, Hua D, Zhang D. Isolation, purification, and structural characterization of a novel polysaccharide from *Ganoderma capense*, *Int J Biol Macromol*. 2013; 57: 285-90
- Liao SF, Liang CH, Ho MY, Hsu TL, Tsai TI, Hsieh YS, Tsai CM, Li ST, Cheng YY, Tsao SM, Lin TY, Lin ZY, Yang WB, Ren CT, Lin KI, Khoo KH, Lin CH, Hsu HY, Wu CY, Wong CH. Immunization of fucose-containing polysaccharides

-
- from Reishi mushroom induces antibodies to tumor-associated Globo H-series epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110: 13809-14
- Lin CN, Tome WP, Won SJ. Novel cytotoxic principles of Formosan *Ganoderma lucidum*. *J. Nat. Prod.* 1999; 54: 998–1002.
- Lin X, Cai YJ, Li ZX, Liu ZL, Yin SF, Zhao JC. *Cladonia furcata* polysaccharide induced apoptosis in human leukemia K562 cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2001; 22: 716-20.
- Lin ES. Submerged culture medium composition for the antioxidant activity by *Grifola frondosa* TFRI1073. *Sci Biotechnol.* 2010; 19: 917–22.
- Liu RM, Li YB, Zhong JJ. Cytotoxic and pro-apoptotic effects of novel ganoderic acid derivatives on human cervical cancer cells in vitro. *Eur J Pharmacol.* 2012; 1-11
- López LA, Barba CJM, Márquez OAE, Sánchez GMC, López-Cruz JI. Método de conservación acuosa del micelio de hongos. s.f. 01/05/12 http://docencia.izt.uam.mx/sgpe/files/users/uami/jaislocr/BIOQUIMICA_I/Ejemplo_de_Articulo.pdf consultado.
- Lowman DW, Greene RR, Bearden DW, Kruppa MD, Pottier M, Monteiro MA, Soldatov DV, Ensley HE, Cheng SC, Netea MG, Williams DL. Novel structural features in *Candida albicans* hyphal glucan provide a basis for differential innate immune recognition of hyphae versus yeast. *J Biol Chem.* 2014; 6: 3432-43
- Lozzio BB, Lozzio CB. Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line. *Leuk Res.* 1979; 3: 363-70.
- Lu YQ, Jin YS, Zhang Q, Zhang Z, Heber D, Go VLW, Li PF, Rao YJ. *Ganoderma lucidum* extracts inhibit growth and induce actin polymerization in bladder cancer cells in vitro. *Cancer Lett.* 2004; 216: 9-20

-
- Ma Y, Mizuno T, Ito H. Antitumor activity of some polysaccharides isolated from a Chinese mushroom, "huangmo", the fruiting body of *Hohenbuehelia serotina*. *Agri. Biol. Chem.* 1991; 55: 2701-2710.
- Mata G, Salmones D. Preservación del Spawn de shiitake por almacenamiento criogénico. 2005. Translation Handbook 2, capítulo 2 parte I
- Mau JN, Tsai SY, Tseng YH, Huang SJ. Antioxidant properties of hot water extracts from *Ganoderma tsugae* Murrill. *LWT.* 2005; 38: 589-97.
- Miller GL. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.* 1959; 31: 426-428.
- Mizuno T. Antitumor active polysaccharides isolated from the fruiting body of *Hericium erinaceum*, and edible and medicinal mushroom called Yamabushitake or Houtou. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1992; 56: 349-357
- Mizuno T, Saito H, Nishitoba T, Kawagashi H. Antitumoractive substances from mushrooms. *Food Chem.* 1995; 11: 23-61.
- Mizuno T. Antitumor mushrooms *Ganoderma lucidum* *Grifora frondosa* *Lentinus edodes* and *Agaricus blazei*. Gendaishorin Tokyo. 1997; 188-193.
- Mizuno T. Bioactive substances in Yamabushitake, the *Hericium erinaceum* fungus and its medicinal utilization. *FFIJournal.* 1998;167: 69-81
- Mizuno M, Shiomi Y, Minato K, Kawakami S, Ashida H, Tsuchida H. Fucogalactan isolated from *Sarcodon aspratus* elicits release of tumor necrosis factor α and nitric oxide from murine macrophages. *Immunopharmacology.* 2000; 46: 113-121.
- Miyazaki T, M Nishijima. Studies on fungal polisaccharides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* 1981; 29: 3611-3616.

-
- Morigiwa A, Kitabatake K, Fujimoto Y, Ikekawa N. Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1986; 34: 3025–3028.
- Mothana RAA, Awadh Ali NA, Jansen R, Wegner U, Mentel R, Lindequist U. Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus *Ganoderma pfeifferi*. Fitoterapia. 2003; 74: 177–180.
- Ngai PHK, Ng TB, A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells. Biochem Biophys. Res. Commun. 2004; 314: 988–993.
- Nakasone KK, Peterson SW, Jong, SC. Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods. Amsterdam Elsevier Academic Press.2004; 37-47.
- Oh KW, Lee CK, Kim YS, Eo SK, Han SS. Antiherpetic activities of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* alone and in combinations with acyclovir and vidarabine. J Ethnopharmacol. 2000; 72: 221–227.
- Oh JY, Cho EJ, Nam SH, Choi JW, Yun JW. Production of polysaccharide–peptide complexes by submerged mycelial culture of an entomopathogenic fungus *Cordyceps sphecocephala*. Process Biochem.2007; 42: 352–362.
- Palleschi A, Bocchinfuso G, Coviello T, Alhaique F. Molecular dynamics investigations of the polysaccharide scleroglucan: first study on the triple helix structure. Carbohydr Res. 2005; 340: 2154-2162
- Park EJ, Ko G, Kim J, Sohn DH. Antifibrotic effects of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*, glycyrrhizin, and pentoxifylline in rats with cirrhosis induced by biliary obstruction. Biol. Pharm. Bull. 1997; 20: 417–420.

-
- Park JP, Kim YM, Kim SW, Hwang JH, Cho YT, Lee YS, Song CH, Yun JW. Effect of aeration rate on the mycelial morphology and exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. Proc. Biochem. 2002; 37: 1257-1262.
- Papagianni M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial process. Biotechnol. Adv. 2004; 22: 189–259
- Peng Y, Zhang L, Zeng F, Kennedy J. Structure and antitumor activities of the water-soluble polysaccharides from *Ganoderma tsugae* mycelium. Carbohydr Polym. 2005; 59: 385-392.
- Phan CW1, David P, Naidu M, Wong KH, Sabaratnam V. Therapeutic potential of culinary-medicinal mushrooms for the management of neurodegenerative diseases: diversity, metabolite, and mechanism. Crit Rev Biotechnol. 2014; 1-14
- Porras ASM. Evaluación in vitro de una cepa de *Amauroderma coffeatum* en cultivo sumergido. Informe final para obtener título de Magister en Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. 2007
- Porras ASM, Valdez-Cruz. NA, Rojano B, Aguilar C, Rocha-Zavaleta L, Trujillo-Roldan MA. Mycelial submerged culture of new medicinal mushroom, *Humphreya coffeata* (Berk) Stey. (aphyllophoromycetideae) for the production of valuable bioactive metabolites with citotoxicit, genotoxicity and antioxidante ctivity. Inter J Med Mush. 2009; 11:335-350.
- Prakash O, Nimonkar Y, Shouche YS. Practice and prospects of microbial preservation. FEMS Microbiol Lett. 2013; 339: 1-9.
- Rahman NA, Daud F, Kalil MS, Ahmad S. Tiger milk mushroom cultivation by using submerged culture technique. Wseas Trans Biol Biomed. 2012; 3: 2224-2902.
- Rhetnikov SV, Wasser SP, Tan KK. Higher basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides. Int J Med Mushr. 2001; 3: 361-394

-
- Rogalski J, Szczodrak J, Janusza G. Manganese peroxidase production in submerged cultures by free and immobilized mycelia of *Nematoloma frowardii*. *Bioresour. Technol.* 2006; 97: 469–476.
- Russel R, M. Paterson. *Ganoderma* a therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry.* 2006; 67: 1985-2001.
- Ruthes AC, Carbonero ER, Córdova MM, Baggio CH, Santos AR, Sasaki GL, Cipriani TR, Gorin PA, Iacomini M. *Lactarius rufus* (1→3),(1→6)-β-D-glucans: structure, antinociceptive and anti-inflammatory effects *Carbohydr Polym.* 2013; 1: 129-36.
- Shimizu A, Yano T, Saito Y, Inada Y. Isolation of an inhibitor of platelet aggregation from a fungus, *Ganoderma lucidum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1985; 33: 3012–3015.
- Shiao MS. Triterpenoid natural products in the fungus *Ganoderma lucidum*. *J. Chin. Chem. Soc.* 1992; 39: 669–674.
- Smania AJ, Delle Monache F, Smania EFA, Cuneo RS. Antibacterial activity of steroidal compounds isolated from *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (aphyllophoromycetidae) fruit body. *Int. J. Med. Mush.* 1999; 1: 325–330
- Stanbury PF, Whitaker A, Hall SJ. *Principles of fermentation technology.* Oxford UK, 2da ed. Butterworth-Heinenmann. (1995) 147-166
- Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol.* 2001, Appendix 3: Appendix 3B.
- Su HJ, Fann YF, Chung MI, Won SJ, Lin CN, New lanostanoids of *Ganoderma tsugae*. *J. Nat. Prod.* 2000; 63: 514–516.
- Sugiyama K, Kawagishi H, Tanaka A, Saeki S, Yoshida S, Sakamoto H, Ishiguro Y. Isolation of plasma cholesterol-lowering components from ningyotake (*Polyporus confluentis*) mushroom. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 1992; 38: 334-335

-
- Tomoda M, Gonda R, Kasahara Y, Hikino H. Glycan structures of ganoderans b and c, hypoglycemic glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Phytochemistry*. 1986; 25: 2817–2820.
- Trujillo-Roldán MA, Peña C, Ramírez OT, Galindo E. Effect of oscillating dissolved oxygen tension on the production of alginate by *Azotobacter vinelandii*. *Biotechnol Prog*. 2001; 17:1042-8.
- Trujillo-Roldán MA. El papel del complejo polimerasa, la alginato liasa y el oxígeno disuelto en la biosíntesis y en la determinación del peso molecular del alginato producido por *Azotobacter vinelandii*. Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México 2003.
- Trujillo-Roldán MA, Moreno S, Espín G, Galindo E. The roles of oxygen and alginate-lyase in determining the molecular weight of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004; 63: 742-7.
- Trujillo-Roldán MA, Valdez-Cruz NA, Gonzalez-Monterrubio CF, Acevedo-Sánchez EV, Martínez-Salinas C, García-Cabrera RI, Gamboa-Suasnavart RA, Marín-Palacio LD, Villegas J, Blancas-Cabrera A. Scale-up from shake flasks to pilot-scale production of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* for preparing a liquid inoculant formulation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013; 97:9665-74.
- Tsai S, Huang S, Mau J. Antioxidant properties of hot water extracts from *Agrocybe cylindracea*. *Food Chem*. 2006, 98:670–77
- Ukai T, Kiho T, Hara C, Morita M, Goto A, Imaizumi N, Hasegawa Y. Polysaccharides in fungi: XIII. Antitumor activity of various polysaccharides isolated from *Dictyophora indusiata*, *Ganoderma japonicum*, *Cordyceps cicadae*, *Auricularia auricula-judae* and *Auricularia* sp. *Chem. Pharm. Bull*. 1983; 31: 741-749.
- Ukai S, Kiho T, Hara C, Kuruma I, Tanaka Y. Polysaccharides in fungi. XIV. Anti-inflammatory effect of the polysaccharides from the fruit bodies of several fungi. *J Pharmacobiodyn*. 1983; 6: 983–990.

-
- Ukawa Y, Ito H, Hisamatsu M. Antitumor effects of b-(1-3)-D-glucan and b-(1-6)-D-glucan purified from newly cultivated mushroom, Hatakeshihimej (*Lyophyllum Decastes* Sing.). J Biosci Bioeng. 2000; 90: 98-104.
- Ulloa M, Hanlin RT. Atlas de micología básica. México D.F Concepto S.A. (1978) 9-15.
- van der Hem LG, van der Vliet JA, Bocken CF, Kino K, Hoitsma AJ, Tax WJ. Ling Zhi-8: studies of a new immunomodulating agent. Transplantation 1995; 60: 438–443.
- Wagner R, Mitchell DA, Sasaki GL, de Almeida Amazonas MA. Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharides. J Biotechnol. 2004; 114: 153-64.
- Wang G, Zhang J, Mizuno T, Zhuang C, Ito H, Mayuzumi H, Okamoto H, Li J. Antitumor active polysaccharides from the Chinese mushroom *Songshan lingzhi*, the fruiting body of *Ganoderma tsugae*. Biosci Biotechnol Biochem. 1993; 57: 894-900.
- Wang J, Hu S, Liang Z, Yeh C. Optimization for the production of water-soluble polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* in submerged culture and its antitumor effect. Appl Microbiol Biotechnol. 2005, 67: 759-766.
- Wasser SP Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Appl Microbiol Biotechnol. 2002; 60: 258-74.
- Wu TS, Shi LS, Kuo SC, Cytotoxicity of *Ganoderma lucidum* triterpenes. J. Nat. Prod. 2001; 64: 1121–1122.
- Wu PQ, Xie YZ, Li ZS, La Pierr DP, Deng Z, Chen Q, Li C, Zhang Z, Guo J, Wong AKC, Lee YD, Yee A, Yang BB. Tumour cell adhesion and integrin expression affected by *Ganoderma lucidum*. Enzyme Microb Technol. 2006; 40: 32-12.
- Wu Z, Yang Z, Gan D, Fan J, Dai Z, Wang X, Hu b, Ye H, Abid M, Zeng X. Influences of carbon sources on the biomass, production and compositions of

-
- exopolysaccharides from *Paecilomyces hepiali* HN1. *Biomass and Bioenergy*, 2014; 67:260-269.
- Xie YZ, Yee A, La Pierr DP, Deng Z, Yang BB. *Ganoderma lucidum* inhibits tumour cell proliferation and induce tumor cell death. *Enzyme Microb Technol.* 2006; 40: 85-177
- Xie J, Zhao J, Hu DJ, Duan JA, Tang YP, Li SP. Comparison of polysaccharides from two species of *Ganoderma*. *Molecules* 2012; 17: 740-752.
- Xu Z, Chen X, Zhong Z, Chen L, Wang Y. *Ganoderma lucidum* polysaccharides: immunomodulation and potential anti-tumor activities. *Am J Chin Med.* 2011; 39: 15-27.
- Xu X, Wu Y, Chen H. Comparative antioxidative characteristics of polysaccharide-enriched extracts from natural sclerotia and cultured mycelia in submerged fermentation of *Inonotus obliquus*. *Food Chem.* 2011; 127: 74–79
- Yang FC, Liau CB. The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. *process biochem.* 1998, 33: 547-553.
- Yamamoto T. Inhibition of pulmonary metastasis of lewis lung carcinoma by a glucan, schizophyllan. *Invasion Metastasis.* 1981; 32: 71.
- Zeng, Q. The antitumor activity of *Flammulina velutipe* polysaccharide (FVP), edible fungi of China. *Szechuan Institute of Materia Medica*, 1990; 10: 2-19.
- Zhang GL, Wang YH, Ni W, Teng HL, Lin ZB,. Hepatoprotective role of *Ganoderma lucidum* polysaccharide against BCG-induced immune liver injury in mice. *World J Gastroenterol.* 2002; 8: 728–733.
- Zhang M, Zhang L, Cheung PCK. Molecular weight and anti-tumor activity of the water-soluble mushroom polysaccharides isolated by hot water and ultrasonic treatment from the sclerotia and mycelia of *Pleurotus tuber-regium*. *Carbohydr res.* 2003; 56: 123-128.

-
- Zhang HN, Lin ZB, Hypoglycemic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. *Acta Pharmacol Sin.* 2004; 25: 191–195.
- Zhang M, Cui SW, Cheung PCK and Wang Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends Food Sci Technol.* 2007; 18: 4-19.
- Zhang G, Sun J, Wang H, Ng TB. First isolation and characterization of a novel lectin with potent antitumor activity from a *Russula* mushroom. *Phytomedicine.* 2010; 17: 775–81.
- Zhao HB, Wang SZ, He QH, Yuan L, Chen AF, Lin ZB. *Ganoderma* total sterol (GS) and GS1 protect rat cerebral cortical neurons from hypoxia/reoxygenation injury. *Life Sci.* 2005; 76: 1027–1037
- Zhao JK, Wang HX, Ng TB. Purification and characterization of a novel lectin from the toxic wild mushroom *Inocybe umbrinella*. *Toxicon.* 2009; 53: 360–66.
- Zhou XW, Lin J, Yin YZ, Zhao JY, Sun XF, Tang KX: Ganodermataceae: Natural products and their related pharmacological functions. *AM J Chinese Med.* 2007; 35: 559-574.
- Zhou XW, Su KQ, Zhang YM .Applied modern biotechnology for cultivation of *Ganoderma* and development of their products. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012; 93:941-963.
- Zhou J, Chen Y, Xin M, Luo Q, Gu J, Zhao M, Xu X, Lu X, Song G. Structure analysis and antimutagenic activity of a novel salt-soluble polysaccharide from *Auricularia polytricha*. *J Sci Food Agric.* 2013; 13: 3225-30
- Zhou H, Liu G, Huang F, Wu X, Yang H. Improved production, purification and bioactivity of a polysaccharide from submerged cultured *Ganoderma lucidum*. *Arch Pharm Res.* 2014; 1-10
- Zhu M, Chang Q, Wong LK, Chong FS, Li RC. Triterpene antioxidants from *Ganoderma lucidum*. *Phyther Res.* 1999; 13: 529–531.

-
- Zhu XL, Liu JH, Li WD, Lin ZB. Promotion of myelopoiesis in myelosuppressed mice by *Ganoderma lucidum* Polysaccharides. *Front Pharmacol.* 2012; 3: 20.
- Zhu ZY, Liu N, Si CL, Liu Y, Ding LN, Jing C, Liu AJ. Structure and anti-tumor activity of a high-molecular-weight polysaccharide from cultured mycelium of *Cordyceps gunnii*. *Carbohydr polym.* 2012b; 88: 1072–1076
- Zhuang C, Mizuno T, Ito H, Shimura K, Sumiya T, Kawade M. Antitumor activity and immunological property of polysaccharides from the mycelium of liquid-cultured *Grifola frondosa*. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 1994; 41: 724-735.
- Zong A, Cao H, Wang F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. *Carbohydr polym.* 2012; 90:1395– 1410

Anexos

Anexo 1. La cantidad de sustrato consumido por *H. coffeata* durante la fermentación se obtuvo por medio de una correlación lineal utilizando una curva patrón. Figura 1 curva utilizada para medio FZM (fuente de carbono glucosa), figura 1.2 curva utilizada para medio MPO (fuente de carbono Lactosa).

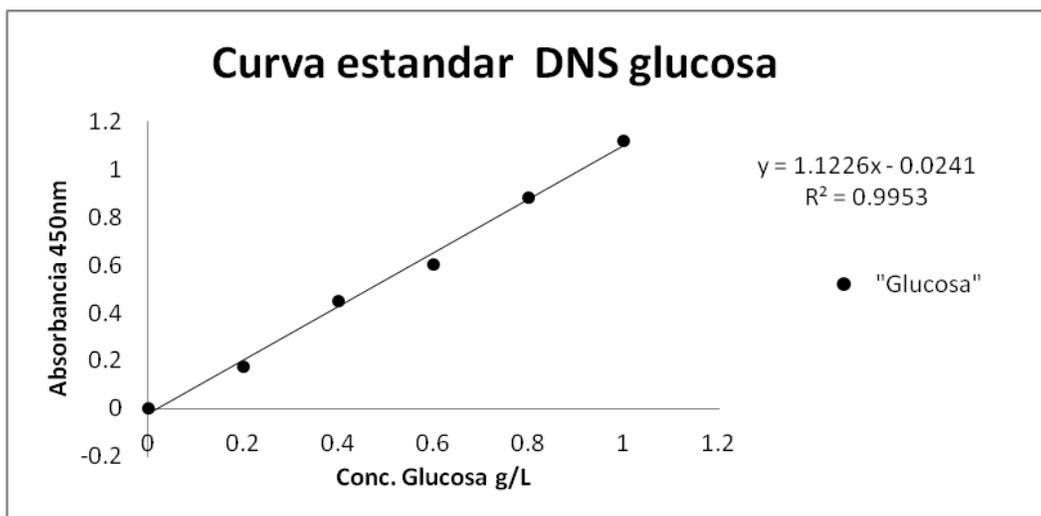


Figura 1.1 Curva estándar utilizada para el cálculo de consumo de glucosa por *H. coffeata* en medio FZM.

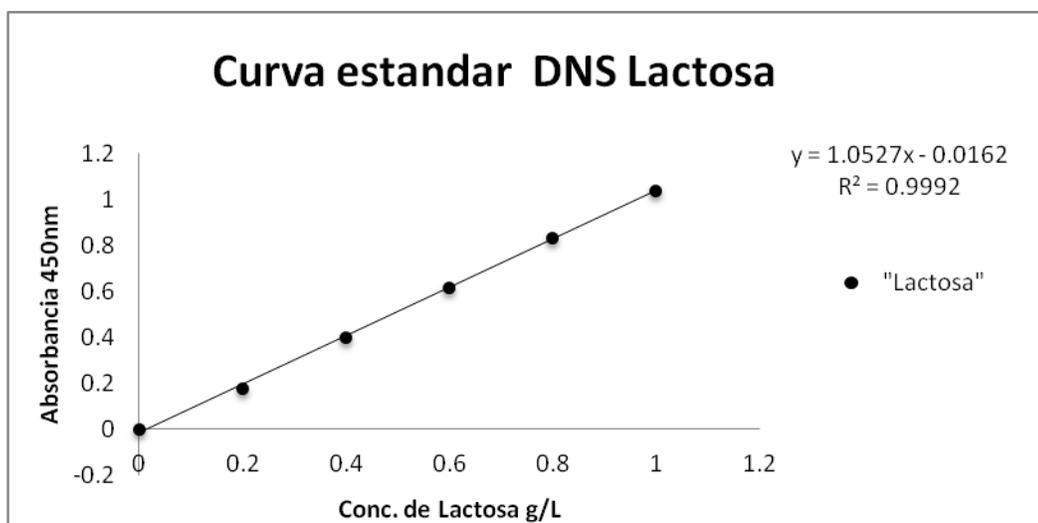


Figura 1.2 Curva Patrón utilizada para el cálculo de consumo de Lactosa por *H. coffeata* en medio MPO.

Anexo 2. Al realizar el ensayo de MTT la cantidad de células K562 viables posterior a la exposición de los diferentes EPS de *H. coffeata* se obtuvo por medio de una correlación lineal utilizando una curva estándar.

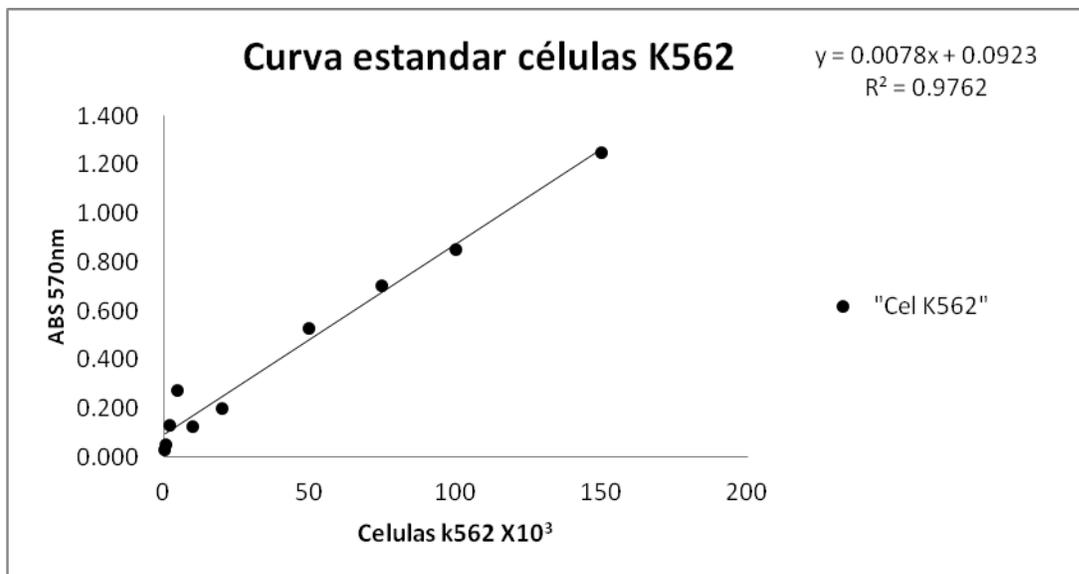


Figura 2.1 Curva estándar utilizada para el cálculo de células k562 viables.

Anexo 3. Se realizó el análisis de Tukey para comparar entre tipos de inóculo, geometría de matraz y fuentes de carbono.

Tabla 3.1. Resultado de las prueba de Tukey. Comparación de μ Inóculo 1 con Inóculo 2 FZM

Condición		Prueba de Tukey
Convencional 1	Bafleado 1	no hay diferencias
Convencional 1	Convencional 2	si hay diferencias $P < .05$
Convencional 1	Bafleado 2	si hay diferencias $P < .01$
Bafleado 1	Bafleado 2	si hay diferencias $P < .05$
Bafleado 1	Convencional 2	si hay diferencias $P < .01$
Convencional 2	Bafleado 2	no hay diferencias

Tabla 3.2. Resultado de las prueba de Tukey. Comparación μ Medio de cultivo MPO vs FZM Inóculo 2

Condición		Prueba de Tukey
MPO Convencional	MPO Bafleado	no hay diferencias
MPO Convencional	FZM convencional	si hay diferencias $P < .01$
MPO Convencional	FZM bafleado	si hay diferencias $P < .01$
MPO bafleado	FZM convencional	si hay diferencias $P < .01$
MPO bafleado	FZM bafleado	si hay diferencias $P < .01$
FZM convencional	FZM bafleado	no hay diferencias

Tabla 3.3 Resultado de las prueba de Tukey. Comparación de rendimientos Y x/s Inóculo 1 con Inóculo 2 medio de cultivo FZM

Condición		Prueba de Tukey
Convencional 1	Bafleado 1	$P < .01$
Convencional 1	convencional 2	$P < .01$
Convencional 1	Bafleado 2	$P < .05$
Bafleado 1	Convencional 2	No hay diferencias
Bafleado 1	bafleado 2	$P < .05$
Convencional 2	Bafleado 2	No hay diferencias

Tabla 3.4 Resultado de las prueba de Tukey. Comparación de rendimiento Y x/s Medio de cultivo MPO con FZM Inóculo 2

Condición		Prueba de Tukey
Convencional FZM	Bafleado FZM	No hay dif
Convencional FZM	Convencional MPO	P<.01
Convencional FZM	Bafleado MPO	P<.05
Bafleado FZM	Convencional MPO	P<.01
Bafleado FZM	Bafleado MPO	P<.05
Convencional MPO	Bafleado MPO	P<.05

Tabla 3.5 Resultado de las prueba de Tukey. Comparación rendimiento Y p/s Inóculo 1 con Inóculo 2 medio de cultivo FZM

Condición		Prueba de Tukey
Convencional 1	Bafleado 1	No hay dif.
Convencional 1	Convencional 2	P<.05
Convencional 1	Bafleado 2	P<.01
Bafleado 1	Convencional 2	No hay dif.
Bafleado 1	Bafleado 2	P<.05
Convencional 2	Bafleado 2	No hay dif.

Figura 3.6. Resultado de las prueba de Tukey. Comparación rendimiento Y p/s medio de cultivo MPO con FZM Inóculo 2

Condición		Prueba de Tukey
Convencional FZM	Bafleado FZM	No hay dif.
Convencional FZM	Convencional MPO	P<.01
Convencional FZM	Bafleado MPO	P<.01
Bafleado FZM	Convencional MPO	P<.01
Bafleado FZM	Bafleado MPO	P<.01
Convencional MPO	Bafleado MPO	No hay dif.

Anexo 4. Se realizó la prueba de Tukey a los resultados de viabilidad obtenidos en el ensayo de MTT con células K562 sometidas a diferentes concentraciones de EPS.

Tabla 4.1. Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD Filtrado completo día 20 FZM. Se identificaron 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

Concentración	Casos	Media	Grupos homogéneos		
Control +	3	1.32	X		
2500	3	65.64		X	
1500	3	73.88		X	
1000	3	74.45		X	
500	3	78.21		X	
Control -	3	105.2			X

Tabla 4.2. Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD Filtrado completo día 20 MPO. Se identificaron 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

Concentración	Casos	Media	Grupos homogéneos		
Control +	3	1.33	X		
2500	3	73.98		X	
1500	3	76.8		X	
1000	3	79.41		X	
500	3	87.95		X	X
Control -	3	105.8			X

Tabla 4.3. Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD EPS 16 FZM. Se identificaron 5 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos				
C+	2	33.45	X				
9.75	2	47.3	X	X			
1250	2	75.5	X	X	X		
312.5	2	82.36	X	X	X	X	
10000	2	105.12		X	X	X	X
78.1	2	105.76		X	X	X	X
625	2	111.53			X	X	X
5000	2	113.9			X	X	X
19.5	2	115.18			X	X	X
2500	2	120.19			X	X	X
156.2	3	122.32			X	X	X
C-	3	135.3				X	X
39	3	157.36					X

Tabla 4.4 Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD EPS 16 MPO. Se identificaron 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos				
C+	2	18.52	X				
9.75	2	32.53	X	X			
10000	3	68.72		X			
625	2	115.28				X	
C-	3	135.3				X	
312.5	3	137.01				X	
5000	3	137.72				X	
78.1	3	138.08				X	
1250	3	138.68				X	
2500	3	141.54				X	
156.2	3	143.93				X	
19.5	3	179.75				X	X
39	2	216.62					X

Tabla 4.5 Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD EPS 18 FZM. Se identificaron 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos			
C+	3	3.5	X			
9.75	2	63.48		X		
10000	3	84.19		X	X	
625	2	100.72		X	X	X
312.5	3	108.89			X	X
78.1	3	110.21			X	X
156.2	3	112.69			X	X
5000	3	114.14			X	X
39	3	115.47			X	X
1250	2	122.45			X	X
2500	2	128.35				X
19.5	2	133.99				X
C-	3	135.29				X

Tabla 4.6 Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD EPS 18 MPO. Se identificaron 5 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos				
C+	3	3.5	X				
9.75	3	23.33	X	X			
10000	3	55.51		X	X		
156.2	2	88.04			X	X	
312.5	3	92.52			X	X	
78.1	3	94.53			X	X	
2500	2	103.42			X	X	X
625	3	104.53				X	X
1250	2	120.09				X	X
5000	2	132.53				X	X
C-	3	135.3				X	X
19.5	2	150.28					X
39	2	153.98					X

Tabla 4.7 Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD EPS reactor 450 rpm tiempo final cultivado en medio FZM. Se identificaron 6 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos						
C+	3	0.72	X						
9.75	3	11.66	X						
19.5	3	30.81		X					
39	3	32.82		X					
2500	3	44.87		X	X				
1250	3	49.83			X	X			
78.1	3	50.34			X	X			
312.5	3	57.64			X	X			
10000	3	58.8			X	X	X		
5000	3	60.17				X	X		
156.2	3	62.56				X	X		
625	3	72.03					X		
C-	3	114.7							X

Tabla 4.8 Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD EPS día 16 cultivado en medio FZM. Se identificaron 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

Concentración	Casos	Media	Grupos homogéneos			
Control +	3	1.11	X			
10	3	58.78		X		
20	3	60.64		X		
15	3	64.02		X	X	
5	3	78.39			X	
Control -	3	98.39				X
2.5	3	106.16				X

Tabla 4.9 Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD EPS día 16 cultivado en medio MPO. Se identificaron 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas.No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos		
Control +	3	1.11	X		
20	3	74.14		X	
2.5	3	81.55		X	
10	3	84.54		X	
control -	3	110.69			X
5	3	118.74			X
15	3	124.31			X

Tabla 4.10 Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD EPS día 18 cultivado en medio FZM. Se identificaron 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas.No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos		
control +	3	16.5433	X		
20	3	61.1187		X	
10	3	68.9767		X	
5	3	114.96			X
2.5	3	115.303			X
control -	3	117.653			X
15	3	125.39			X

Tabla 4.11 Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD EPS día 18 cultivado en medio MPO. Se identificaron 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas.No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's

Condición	Casos	Media	Grupos Homogéneos		
control +	3	1.20767	X		
20	3	48.85		X	
10	3	56.4133		X	
2.5	3	82.0533			X
5	3	84.15			X
15	3	98.08			X
control -	3	117.653			X

Tabla 4.12 Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD EPS reactor 450 rpm tiempo final cultivado en medio FZM. Se identificaron 6 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas.No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos		
Control +	3	1.11	X		
15	3	50.97		X	
10	3	51.95		X	
2.5	3	54.46		X	
20	3	54.87		X	
5	3	64.51		X	
control -	3	118.04			X

Anexo 5. Los datos obtenidos del método de conservación en agua destilada usando papel filtro se publicaron en el artículo "Conservation of the mycelia of the medicinal mushroom *Humphreya coffeata* (Berk.) Stey. in sterile distilled water" García-García M, Rocha-Zavaleta L, Valdez-Cruz N, Trujillo Roldan M.A.MethodsX, 2014



Contents lists available at ScienceDirect

MethodsX

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mex

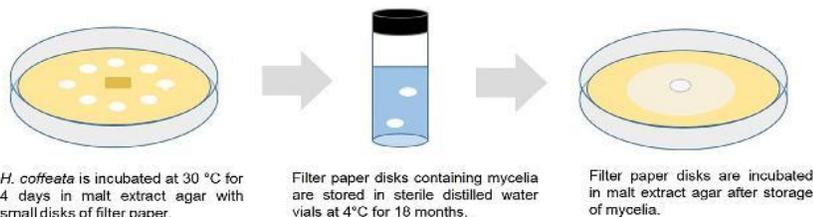
Conservation of the mycelia of the medicinal mushroom *Humphreya coffeata* (Berk.) Stey. in sterile distilled water



Monserrat García-García, Leticia Rocha-Zavaleta,
Norma A. Valdez-Cruz, Mauricio A. Trujillo-Roldán*

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, CP 04510, México, D.F., México

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

Currently, there is a growing interest in obtaining and studying the biologically active compounds from higher basidiomycetes, such as *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Inonotus obliquus* [1], but the techniques for safe long-term storage are time-consuming, susceptible to contamination, and do not prevent genetic and physiological changes during long-term maintenance [2]. A recent strategy for obtaining biologically active compounds is using mycelia submerged cultures of these mushrooms, cultured under controlled laboratory conditions [1]. However, obtaining spores of these fungi under these conditions is difficult, and in most cases the way to obtain the spores is unknown [1]. Therefore, the strategy for mycelium storage seems to be more appropriated and simple.

- A modification of Castellani's method [3–7] is proposed for higher basidiomycetes, by using the mycelium of *Humphreya coffeata* (Berk.) Stey., whose culture filtrates demonstrated bioactivity against lymphoma cells [8].
- *H. coffeata* (Berk.) Stey. was grown on malt extract agar with filter paper disks that were removed after 4 days, placed in tubes with sterile distilled water, and stored at 4 °C.

* Corresponding author at: Unidad de Bioprocesos, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, CP 04510, México, D.F., México. Tel.: +52 55 56229192; fax: +52 5 6223369.
E-mail addresses: maurotru@gmail.com, maurotru@biomedicas.unam.mx (M.A. Trujillo-Roldán).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mex.2014.04.002>

2215-0161/© 2014 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

- Filter paper disks with *H. coffeata* (Berk.) Stey. stored at 4 °C were confirmed to be viable for up to 18 months, with no visible morphological alterations.
- © 2014 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

ARTICLE INFO

Method name: Preservation of mycelial cultures of basidiomycetes

Keywords: Filamentous fungi, Water storage, Mycelium cultures, Castellani's method, Higher basidiomycetes

Article history: Received 18 March 2014; Accepted 28 April 2014

Method details

There are various methods of conservation, some of the most commonly used are repeated subculturing, lyophilization (unsuitable for most basidiomycetes) and cryopreservation [2,9–11]. However, some of these methods are not compatible with all fungi due to the particular characteristics of each species [1]. We used the method described by Castellani [3–5] with some modifications for the conservation of the mycelia of the higher basidiomycete *Humphreya coffeata* (Berk.) Stey., since it has been reported that this method ensures the viability of isolates for 1–20 years depending on the species [5,6,12,13]; however, it has not been used for higher basidiomycetes.

Preparation of the malt extract agar, FZM agar and vials

Petri dishes measuring 110 mm × 25 mm were filled with 30 mL of malt extract agar (MEA) or FZM agar; filter paper disks of 5 mm diameter (Whatman[®] No. 4) were manually prepared and sterilized, and then placed on the filled Petri dishes with the mycelia. MEA contains (in g/L) malt extract 20.0, peptone 1.0, dextrose 20.0, and agar 20.0. [14]. FZM agar [8] contains (in g/L) glucose 35.0, yeast extract 2.5, peptone 5.0, KH₂PO₄·H₂O 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, thiamine 0.05, and bacteriological agar 18.0, pH 5.5 [15]. Then, 10 mL sterile glass vials were pre-sterilized for 21 min at 121 °C (TOMY ES-315 autoclave), and 4.0 mL of distilled sterile water was added to each vial.

Inoculation of mycelia in malt extract agar

The central area of the Petri dishes with MEA or FZM agar media was inoculated with *H. coffeata* (Berk.) Stey. (Fig. 1a), and the 5-mm filter paper disks (Whatman[®] No.4) were placed around the inoculum. Thereby, on growing the mycelium of *H. coffeata* would cover the Petri dish, including the filter paper disks, as seen in Fig. 1b. The Petri dishes were incubated at 30 °C for 4 days (FELISA FE-293A, México).

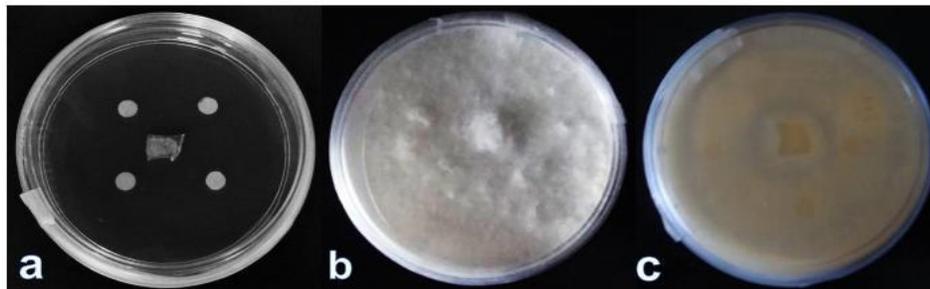


Fig. 1. (a) Petri dish with malt extract agar inoculated with *Humphreya coffeata* (Berk.) Stey., showing how the filter paper disks are placed. (b) Cultivation of *H. coffeata* (Berk.) Stey. growing in the Petri dish. (c) The bottom of the Petri dish with filter paper disks covered by mycelium.



Fig. 2. Vials ready to store, containing sterile distilled water and the filter paper disks carrying mycelium of *H. coffeata* (Berk.) Stey. that were removed from the Petri dish under sterile conditions.

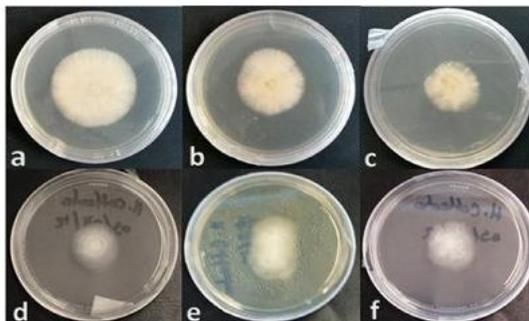
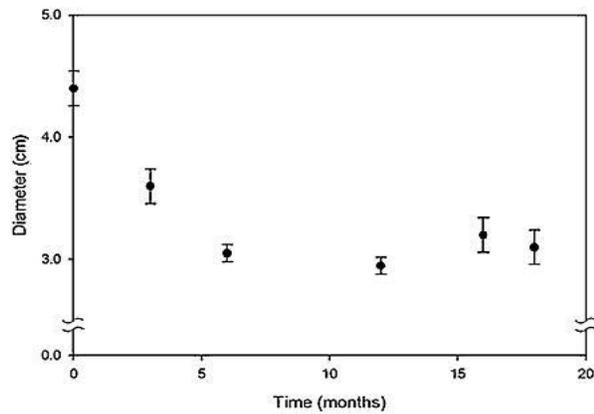


Fig. 3. Shelf life test. Filter paper disks stored in sterile distilled water for 0 (a), 3 (b), 6 (c), 12 (d), 15 (e), and 18 (f) months were inoculated in Petri dishes containing FZM agar medium and incubated at 30°C for 4 days. Upper panel – plot showing the growth (diameter) of *H. coffeata* (Berk.) Stey. mycelium after 4 days of incubation. Lower panel – representative photograph of *H. coffeata* (Berk.) Stey. mycelium growing after preservation in distilled water for the indicated months. All viability trials were made at least in triplicate.

Storage in sterile distilled water

After a 4-day period the mycelial growth covered the Petri dish. Then the filter paper disks were carefully removed under sterile conditions, and placed into vials containing 4.0 mL of sterile distilled water. A minimum of 50 vials were prepared. All vials were closed and sealed with 2 cm Parafilm[®] M (Sigma–Aldrich, USA) strips. Finally, all vials were stored at 4 °C (Fig. 2).

Viability of the basidiomycetes in sterile distilled water

The shelf life of *H. coffeata* (Berk.) Stey. attached to filter paper disks (Whatman[®] No. 4) and stored in sterile distilled water at 4 °C was evaluated at 0, 3, 6, 12, 15 and 18 months. All viability trials were made at least in triplicate. The culture medium for the evaluation was FZM agar. Growth was assessed macroscopically (Fig. 3), viability was determined by measuring the growth diameter formed by the mycelial culture in FZM agar, and the culture was incubated at 30 °C (FELISA FE-293A, México) for 4 days [4,8].

The conservation of mycelium in filter paper disks of *H. coffeata* in sterile distilled water assured a high viability of cultivation for 18 months (Fig. 3). There were no visible morphological changes, or contamination by bacteria or other fungi. This suggests that this method, in addition to being easy and economical, is suitable for the conservation of higher basidiomycetes such as *H. coffeata*. It should be taken into consideration that the time of viability to ensure this method depends on the species of fungus to store [3–7].

Acknowledgements

This work was partially financed by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 178528, CONACYT-INNOVAPYME 214404), and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT-UNAM IN-210013 and IN-209113). MGG thanks the scholarship from CONACYT-México. We also thank Ana Carmen Delgado for reviewing the English version of the manuscript.

MethodsX thanks the reviewers of this article (Sreerama Kumar Prakya and a second reviewer who would like to remain anonymous) for taking the time to provide valuable feedback.

References

- [1] V. Elisashvili, Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products, *Int. J. Med. Mushrooms* 14 (3) (2012) 211–239 (review).
- [2] L. Homolka, Preservation of live cultures of basidiomycetes, *Fungal Biol.* 118 (2) (2014) 107–125.
- [3] A. Castellani, The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water, *J. Trop. Med.* 42 (1939) 225–226.
- [4] A. Castellani, Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water, *Mycopathologia* 20 (1) (1963) 1–6.
- [5] A. Castellani, The “water cultivation” of pathogenic fungi, *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 44 (2) (1964) 217–220.
- [6] A.M. Borman, A. Szekeley, C.K. Campbell, E.M. Johnson, Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods, *Mycopathologia* 161 (6) (2006) 361–368.
- [7] L. Bueno, R. Gallardo, Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril, *Rev. Iberoam. Micol.* 15 (3) (1998) 166–168.
- [8] A.S.M. Porras, N.A. Valdez-Cruz, B. Rojano, C. Aguilar, L. Rocha-Zavaleta, M.A. Trujillo-Roldan, Mycelial submerged culture of new medicinal mushroom, *Humphreya coffeata* (Berk.) Stey. (aphyllophoromycetideae) for the production of valuable bioactive metabolites with cytotoxicity, genotoxicity and antioxidant activity, *Int. J. Med. Mushrooms* 11 (4) (2009) 335–350.
- [9] C.H. Hartung de Capriles, S. Mata, M. Middelveen, Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years, *Mycopathologia* 106 (2) (1989) 73–79.
- [10] O. Prakash, Y. Nimonkar, Y.S. Shouche, Practice and prospects of microbial preservation, *FEMS Microbiol. Lett.* 339 (1) (2013) 1–9.
- [11] K.K. Nakasone, S.W. Peterson, S.C. Jong, Preservation and distribution of fungal cultures, in: G.M. Mueller, G.F. Bills, M.S. Foster (Eds.), *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*, Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2004 pp. 37–47, 777 pp.
- [12] H.C. Diogo, A. Sarpieri, M.C. Pires, Fungi preservation in distilled water, *An. Bras. Dermatol.* 80 (6) (2005) 591–594.
- [13] J.J. Ellis, Preserving fungus strains in sterile water, *Mycologia* 71 (1979) 1072–1075.
- [14] M. Ulloa, R.T. Hanlin, *Atlas de micología básica*, vol. 15, Editorial Concepto S.A., México, D.F., 1978p. 158 pp.
- [15] Q.H. Fang, J.J. Zhong, Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites – ganoderic acid and polysaccharide, *Biochem. Eng. J.* 10 (1) (2002) 61–65.

“Lo último que uno sabe, es por dónde empezar.”

Blaise Pascal