



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN I.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

“ESTUDIO DEL PROCESO DE CULTIVO DE LOS HONGOS MEDICINALES *LENTINULA EDODES* Y
GANODERMA CURTISII EN LA FERMENTACIÓN SÓLIDA A NIVEL DE BIOREACTOR”

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

PRESENTA:

I.Q. LUISA FERNANDA CISNEROS GARCIA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ROSALÍA CERECERO ENRIQUEZ

CODIRECTOR DE TESIS:

DRA. DULCE MARÍA G. SALMONES BLÁSQUEZ



AGRADECIMIENTOS

Dra. Rosalía Cerecero Enríquez

Le agradezco la oportunidad de trabajar con usted, por su apoyo, comprensión y ayuda en el desarrollo del proyecto. Gracias por brindarme su amistad, por sus consejos y apoyo.

Dra. Dulce María G. Salmones Blázquez

Le agradezco por darme la oportunidad de trabajar con usted en el INECOL, por su ayuda incondicional en el desarrollo del proyecto y compartir conmigo su conocimiento. Le agradezco por su confianza, consejos y apoyo.

Dra. Leticia Lopez Zamora

Le agradezco por las aportaciones para la elaboración del trabajo de tesis y por las enseñanzas dentro del aula de clases.

Dr. Eusebio Bolaños Reynoso

Le agradezco las aportaciones realizadas para el trabajo de tesis y por las enseñanzas en mi formación tanto de Licenciatura como de Maestría.

A el personal de Red Manejo Biotecnológico de Recursos del INECOL

A los Maestros Carlos y Yamel por brindarme su ayuda y conocimiento durante mi estancia.

A CONACYT

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada con número de registro 885747.

DEDICATORIAS

A mi mamá:

Cada logro es por ti y para ti. Gracias por tu amor incondicional y por enseñarme a luchar por mis sueños. Gracias por creer en mí, cuando ni yo misma creía.

A Ulises:

Gracias por tu amor, por tu confianza y por impulsarme a ser mejor persona. Gracias por tu apoyo en todo momento y por estar a mi lado mientras lucho por mis sueños.

A mis amigos:

Ana, gracias por siempre estar conmigo, por tu amistad incondicional, por darme ánimos en todo momento y por las risas y tristezas juntas.

Águeda, gracias por tus consejos, por impulsarme a luchar por mis sueños. Gracias por no dejar que me rindiera, por estar siempre conmigo y enseñarme a ser fuerte.

Marco, gracias por darme ánimos, por tu ayuda, por las risas infinitas. Gracias por el apoyo que me has dado y por la confianza.

RECONOCIMIENTOS

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

2019	Ponencia	Retention of β -glucans in <i>Lentinula edodes</i> drying by refractance window. Meeting of food engineering 2019. VI Jornada de Ingeniería de Alimentos. Tuxtepec, Oaxaca, México. 16 Octubre 2019
2019	Póster	Comparación del crecimiento micelial de <i>Ganoderma Curtisii</i> empleando un biorreactor de columna-charola e incubación tradicional. VI Encuentro internacional sobre Biotecnología en la UAT. Tlaxcala, México. 1-4 Diciembre 2019

RESUMEN

Estudio del proceso de cultivo de los hongos medicinales *Lentinula edodes* y *Ganoderma curtisii* en la fermentación sólida a nivel de bioreactor

Realizado por: IQ Luisa Fernanda Cisneros Garcia

Dirigido por: Dra. Rosalía Cerecero Enríquez

Dra. Dulce María G. Salmones Blásquez

Lentinula edodes y *Ganoderma curtisii* son especies ampliamente cultivadas en el sureste de Asia debido a su valor nutricional y medicinal ya que contienen polisacáridos y otros metabolitos con propiedades antibacterianas, antioxidantes y efectos inmunomoduladores. El objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento de los hongos medicinales *Lentinula edodes* y *Ganoderma curtisii* empleando un bioreactor de columna-charolas, en comparación con la forma tradicional de reproducir el micelio (cámaras de incubación), esto con la finalidad de determinar la factibilidad del uso del bioreactor para incrementar los índices de productividad de los hongos. El crecimiento de los micelios se detectó en fermentación en medio líquido MDA a nivel de bioreactor con una inyección de aire de 0.3 vvm a temperatura controlada de 26°C y 70% humedad, y cámaras de incubación 26±1°C, sin agitación, ambos con incubación de 14 días. Para el crecimiento del micelio por fermentación en medio sólido, se utilizó semilla de sorgo estéril como sustrato, incubándose a 26°C y 70% humedad con inyección de aire de 0.3 vvm en el bioreactor y, cámara de incubación por 21 días. En la validación de biomasa crecida, se realizaron pruebas de actividad enzimática por lacasas (UAE). En la etapa de fructificación del hongo, mediante fermentación en medio sólido a 26°C y 75% de humedad y flujo de aire a 0.3 vvm, se utilizaron muestras elaboradas con diferente formulación de sustrato para *G. curtisii* (69% de paja, 1% de peat moss, 20% de encino, 10% de salvado de trigo) incubado durante 2 meses, en tanto que, *L. edodes* (90% de bagazo de caña y 10% de encino) incubado durante 3 meses. Las propiedades nutricionales de los hongos desarrollados en bioreactor fueron evaluadas mediante FTIR. Un mayor crecimiento de micelio se observó en medio líquido y en bioreactor para *G. curtisii* con 16% de biomasa, mientras que, *L. edodes* obtuvo 5.3% a 14 días de incubación. En cuanto a la actividad de lacasas a los 7 días de incubación, se alcanzó una actividad enzimática de 61.1564 µm/g min para *G. curtisii* y, de 35.778 µm/g min para *L. edodes* mientras que, las muestras incubadas en forma tradicional, la actividad enzimática fue de 34 µm/g min para *G. curtisii* a partir de inóculo primario y de 34.5 µm/g min para *L. edodes* a partir de una cepa crecida en PDA. La eficiencia biológica de la cepa *G. curtisii* fue de 16.7% de y, de 47.14 para *L. edodes*. El análisis por FTIR de los hongos crecidos en bioreactor y cámaras de incubación determinó los mismos grupos funcionales con vibraciones que mostraron compuestos de grupo funcionales, hidroxilo, proteínas (grupos amino), lípidos (CH₂ y CH₃) y polisacáridos como β-glucano.

ABSTRACT

Study of the culture process of the medicinal mushrooms *Lentinula edodes* and *Ganoderma curtisii* in the solid fermentation at bioreactor level

By: IQ Luisa Fernanda Cisneros Garcia

Advisors: Dra. Rosalía Cerecero Enríquez

Dra. Dulce María G. Salmones Blásquez

Lentinula edodes and *Ganoderma curtisii* are species widely cultivated in Southeast Asia due to their nutritional and medicinal value since they contain polysaccharides and other metabolites to which antibacterial, antioxidant and immunomodulatory properties have been attributed, among others. The aim of this work was to evaluate the growth of the medicinal mushrooms *L. edodes* and *G. curtisii* using a column-charola bioreactor, in comparison with the traditional way of reproducing the mycelium (incubation chambers), in order to determine the feasibility of using the bioreactor to increase the productivity rates of the mushroom. Mycelium growth was detected in MDA liquid medium fermentation (1) Bioreactor level with an air injection of 0.3 vvm at controlled temperature of 26°C and 70% humidity, (2) Incubation chambers 26±1°C and without agitation, both with 14 day incubation. For mycelium growth by fermentation in solid medium, sterile sorghum seed was used as substrate, incubated at 26°C and 70% humidity with an air injection of 0.3 vvm in the bioreactor and, incubation chamber for 21 days. In the validation of the grown biomass, enzyme activity tests were performed by laccases (UAE). In the fructification stage of the mushrooms through fermentation in solid medium at 26°C and 75% humidity and air flow at 0.3 vvm, samples made with different substrate formulation were used for *G. curtisii* (69% straw, 1% peat moss, 20% oak, 10% wheat bran) incubated for 2 months, while *L. edodes* (90% bagasse and 10% oak) incubated for 3 months. The nutritional properties of the mushrooms developed in the bioreactor were evaluated by FTIR. A higher mycelium growth was observed in liquid medium and in bioreactor for *G. curtisii* with 16% biomass, while, *L. edodes* obtained 5.3% at 14 days of incubation. Regarding the activity of laccases at 7 days of incubation, an enzymatic activity of 61.1564 µm/g min was reached for *G. curtisii* and, 35.778 µm/g min for *L. edodes* while, the samples incubated in traditional way (incubation chambers), the enzymatic activity was of obtaining 34 µm/g min for *G. curtisii* from primary inoculation and 34.5 µm/g min for *L. edodes* from a strain grown in PDA. The biological efficiency of the *G. curtisii* strain was 16.7% of and, 47.14 for *L. edodes*. The FTIR analysis of the mushrooms grown in bioreactor and hatching chambers determined the same functional groups with vibrations that showed functional group compounds, hydroxyl, proteins (amino groups), lipids (CH₂ and CH₃) and polysaccharides such as β-glucan.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABLAS	vi
NOMENCLATURA	vii
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1	Generalidades de los hongos comestibles y medicinales	4
1.1.1	Cultivo de hongos medicinales	5
1.1.2	<i>Lentinula edodes</i>	9
1.1.3	<i>Ganoderma curtisii</i>	11
1.2	Fermentación en medio sólido	13
1.2.1	Sustratos	16
1.3	Bioreactor	18
1.3.1	Bioreactores en medio sólido	19
1.3.2	Instrumentación de bioreactores	22
1.4	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	24
1.5	Antecedentes	25

CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1	Desarrollo experimental	29
2.2	Instrumentación de bioreactor	29
2.2.1	Calibración de termopares y sensor de humedad	32
2.2.2	Esterilización del equipo	37
2.3	Activación, inoculación e incubación de cepas	37
2.3.1	Activación de cepa	37
2.3.2	Fermentación en medio líquido para la inoculación de bioreactor o cámaras de incubación	38
2.3.2.1	Determinación biomasa	38
2.3.3	Inoculación en medio sólido en bioreactor o cámaras de	39

incubación	
2.3.3.1 Caracterización del sustrato	39
2.3.3.2 Inoculación del hongo en medio sólido	39
2.3.4 Cuantificación indirecta de la biomasa mediante la medición de la actividad enzimática de las lacasas	40
2.4 Fermentación en medio sólido en bioreactor para fructificación del hongo	41
2.4.1 Caracterización del sustrato en bioreactor para fructificación del hongo	41
2.4.2 Determinación de las condiciones para la fermentación en medio sólido	41
2.4.3 Condiciones para la fermentación en medio sólido para <i>Lentinula edodes</i>	41
2.4.4 Determinación de la fermentación para <i>Ganoderma curtisii</i>	42
2.4.5 Eficiencia biológica	42
2.4.6 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	43
CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1 Instrumentación del bioreactor para desarrollo del micelio y crecimiento de macromicetos	46
3.2 Valoración de las condiciones de esterilización en el Bioreactor de columna	47
3.3 Resultados de la inoculación mediante fermentación en medio líquido	48
3.3.1 Resultados del crecimiento de micelio de <i>Ganoderma curtisii</i> en bioreactor y cámara de incubación	48
3.3.2 Resultados del crecimiento de micelio de <i>Lentinula edodes</i> en bioreactor y cámara de incubación	49
3.3.3 Resultados de la actividad enzimática en <i>Ganoderma curtisii</i> y <i>Lentinula edodes</i>	50

3.4	Resultados de la inoculación mediante fermentación en medio sólido a nivel de bioreactor y de cámaras de incubación	52
3.4.1	Resultados del crecimiento de micelio de <i>Ganoderma curtisii</i> en medio sólido	52
3.4.2	Resultados del crecimiento de micelio de <i>Lentinula edodes</i> en medio sólido	54
3.4.3	Resultados de la actividad enzimática en medio sólido	55
3.5	Fermentación en medio sólido en bioreactor de columna-charola	57
3.5.1	Eficiencia biológica	58
3.5.2	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	59
	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	64
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pag
1.1	Diagrama general en la producción de hongos	7
1.2	<i>Lentinula edodes</i>	10
1.3	<i>Ganoderma curtisii</i>	13
1.4	Bioreactor de columna (Guerrero 2014)	20
1.5	Reactor de columna-charolas (Padey <i>et al.</i> 2008)	21
2.1	Diagrama general para el proceso de cultivo de hongos (<i>Lentinula edodes</i> y <i>Ganoderma curtisii</i>) en fermentación sólida nivel de bioreactor	29
2.2	Diagrama de bioreactor de columna-charola utilizado en el estudio	30
2.3	a) Placa de ARDUINO MEGA b) Termopar tipo K	31
2.4	a) Sensor de Temperatura y Humedad DHT 22 b) Adaptador de memoria SD para Arduino	31
2.5	a) Reloj para Arduino b) Display LCD 20x24	31
2.6	Calibración de termopares en baño térmico	32
2.7	Calibración termopar 1	33
2.8	Calibración termopar 2	33
2.9	Calibración termopar 3	34
2.10	Calibración del sensor de humedad DHT22 en cabina de higrómetro de caratula	35
2.11	Calibración de humedad en NaCl	36
2.12	Calibración de humedad en LiCl	36
2.13	Activación de cepas a) <i>Ganoderma curtisii</i> b) <i>Lentinula edodes</i>	37
2.14	Bolsas para fermentación de <i>Lentinula edodes</i>	42
2.15	Bolsas para fermentación de <i>Ganoderma curtisii</i>	43
3.1	Diagrama de instrumentación de bioreactor columna-charola	46

3.2	Etapas de desarrollo de <i>Lentinula edodes</i> a) micelio en medio líquido, b) medio sólido, c) fructificación en bioreactor columna-charola.	48
3.3	Evolución del micelio en fermentación líquida de <i>Ganoderma curtisii</i>	49
3.4	Evolución del micelio en fermentación líquida de <i>Lentinula edodes</i>	50
3.5	a) Inóculo de cepa de <i>Ganoderma curtisii</i> crecido en bioreactor, b) cámara de incubación	53
3.6	<i>Ganoderma curtisii</i> a partir de inóculo primario a) Incubado en bioreactor, b) cámara de incubación	53
3.7	<i>Lentinula edodes</i> inoculado con cepa a) Incubado en bioreactor, b) cámara de incubación	54
3.8	<i>Lentinula edodes</i> a partir de inóculo primario a) incubado en bioreactor, b) cámara de incubación	55
3.9	Producción de lacasas cuantificada en cultivos de <i>Ganoderma curtisii</i>	56
3.10	Producción de lacasas cuantificada en cultivos de <i>Lentinula edodes</i>	57
3.11	Fructificación de a) <i>Ganoderma curtisii</i> y, b) <i>Lentinula edodes</i>	58
3.12	Espectro FTIR de <i>Ganoderma curtisii</i>	60
3.13	Espectro FTIR de <i>Lentinula edodes</i>	62

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pág
1.1	Comparativo entre la fermentación sumergida y en soporte sólido	14
1.2	Ventajas y desventajas de bioreactor de columna	22
3.1	Resultados de la actividad enzimática por lacasas	51
3.2	Evaluación de la eficiencia biológica	58

NOMENCLATURA

Símbolo	Descripción	Unidades
EB	Eficiencia biológica	%
MDA	Agar malta dextrosa	
PDA	Agar papa dextrosa	
UAE	Cantidad de μmol de siringaldazina oxidados por el micelio contenido en 1 gramo de sustrato seco por minuto	$\mu\text{mol} / \text{g min}$
VVM	Volumen de aire /(volumen de medio/ minuto)	vvm

INTRODUCCIÓN

Los hongos comestibles y medicinales son organismos del reino Fungi que producen estructuras macroscópicas comúnmente denominadas como cuerpos fructíferos o fructificaciones, a partir de una fase vegetativa llamada micelio, cuyo crecimiento es indefinido en condiciones apropiadas (Martínez *et al.*, 2016). El cultivo de hongos se ha convertido en una estrategia para producir alimentos para consumo humano de alta calidad proteica, que contribuyen a la economía mundial y a la diversificación de la producción agrícola (Gaitán *et al.*, 2006).

Los hongos *Lentinula edodes* y *Ganoderma curtisii*, son especies de gran interés comercial por sus propiedades alimentarias, medicinales y terapéuticas, el primero de ellos ocupa el primer lugar de producción a nivel mundial, debido a que es una fuente de vitaminas, minerales, aminoácidos y proteínas importantes para el ser humano (Hinertroza y López, 2018). Mientras que, el interés de cultivo de la segunda especie es debido a que han encontrado metabolitos secundarios que podrían potencialmente ser utilizados en la industria farmacológica para el tratamiento de diferentes enfermedades y aplicaciones en el sector agroindustrial (Huerta *et al.*, 2016).

En el proceso del cultivo de los hongos, la fase de crecimiento micelial *in vitro* para su posterior propagación masiva, es una etapa decisiva para alcanzar una eficiente producción de fructificaciones, por lo que se requiere seleccionar métodos que incrementen la capacidad de producción de biomasa de los hongos, bajo condiciones estériles y sin riesgo de contaminación (Huerta *et al.*, 2016).

Por otro lado, los bioreactores son adecuados para producir metabolitos, enzimas y cultivar células, por lo cual son empleados para el crecimiento de micelio de hongos medicinales (López, *et al.*, 2012). Son capaces de crecer microorganismos de manera rápida, en mayor volumen y generando el menor residuo posible. Un bioreactor debe asegurar homogeneidad en el sistema y para obtener condiciones

óptimas de crecimiento microbiano es importante que cuente con sensores que permitan validar y controlar las variables de un proceso fermentativo (Hariharan y Nambisan 2013).

En un trabajo anterior de Hernández (2016), estudió la fermentación en medio sólido en un bioreactor columna-charolas con la cepa *A. niger*, obteniendo resultados favorables para este microorganismo, sin embargo es necesario realizar ajustes al bioreactor para el crecimiento de diferentes microorganismos. Por lo cual este trabajo propone instrumentar un bioreactor de columna-charolas y estudiar las etapas del cultivo (activación de micelio, preparación de inóculo y fermentación por fermentación en medio sólido) de los hongos medicinales *L. edodes* y *G. curtisii*, para incrementar los índices de productividad.

CAPITULO 1
FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 Generalidades de los hongos comestibles y medicinales

Los hongos constituyen el principal grupo de organismo desintegradores, de organización unicelular y, cuerpo vegetativo que recibe el nombre de talo, están constituidos por filamentos o hifas cuyo conjunto reciben el nombre de micelio, el cual puede ser uninucleado, binucleado, multinucleado o bien pluricelular, con crecimiento radial, paredes celulares constituidas principalmente por quitina y glucanos embebidos en una matriz de polisacáridos y glucoproteínas, y carecen de clorofila (Perdomo, 2007). Se alimentan mediante enzimas, por absorción directa de nutrientes, que se conoce como osmotrofia (Silva *et al.*, 2010). Debido a que el crecimiento del hongo se da en el micelio, éste tiene la capacidad de desplazarse y colonizar diferentes sustratos que contengan nutrientes necesarios para su crecimiento. El micelio acumula nutrientes del sustrato y los aprovecha para formar la masa micelial (estado vegetativo), después de acumular nutrientes y mediante la estimulación a cierta temperatura y por efecto de la humedad se forman los primordios, que al desarrollarse formarán los cuerpos fructíferos (estado reproductivo) (Figlas y Curvetto, 2015).

Los hongos han sido utilizados desde tiempo remotos como alimento y uso medicinal, principalmente en Oriente son altamente apreciados en la medicina tradicional. Los hongos son alimentos con propiedades nutricionales apreciables, con bajo aporte calórico dado al contenido en agua (80-90%). El 10% de materia seca está compuesta por, 27-48% de proteína, 60% carbohidratos: β -glucano, quitina y sustancias específicas, 2-8% lípidos como ácido linoleico, contienen de 26-35 kcal por cada 100 g (peso seco) (Cano y Romero, 2016). Son una buena fuente de proteína, ya que el contenido de aminoácidos incluidos, especialmente los esenciales es parecida a la proteína animal. Con alto contenido en fibra y bajo aporte lipídico son alimentos saludables (Ramos, 2015).

Los hongos medicinales son fuente abundante de una amplia gama de productos naturales, con compuestos biológicos (Tang *et al.*, 2009). El cuerpo fructífero de los

hongos es de utilidad en la medicina, la investigación de estos ha incrementado debido, a que se han encontrado metabolitos para el tratamiento de enfermedades y aplicaciones en el sector agroindustrial (Guzmán *et al.*, 2013). Los polisacáridos (β -glucano, letinan, etc.) obtenidos de los hongos son considerados como componentes capaces de modular la respuesta inmune en humanos y animales, e inhibir el crecimiento tumoral (Ramos, 2015).

1.1.1 Cultivo de hongos medicinales

Los hongos no pueden crecer directamente en el suelo como las plantas porque no son organismos fotosintetizadores, sino que requieren sustratos orgánicos, crudos o compostados, de modo que no compiten con las plantas por espacio de una plantación. Estos sustratos son los residuos agrícolas e industriales, subproductos generalmente inútiles que pueden ser reciclados para producir un alimento con compuestos bioactivo (enzimas, polisacáridos, vitaminas) o un producto con propiedades medicinales (Figlas y Curvetto, 2015).

El cultivo de los hongos se llama micocultura, y se practica por interés económico o científico (Silva *et al.*, 2010). El proceso del cultivo de hongos en fermentación en medio sólido convierte a los residuos lignocelulósicos en soporte o alimento para la generación de productos con alto valor agregado. Además de generar compuestos bioactivos (por ejemplo, enzimas, polisacáridos, vitaminas), por lo cual se considera una actividad rentable (Ríos *et al.*, 2017). Entre los hongos medicinales, las especies *Lentinula edodes* y *Ganoderma lucidum* son ampliamente cultivadas y bien conocidas por el valor nutricional y medicinal, son colonizadores y bioconvertidores eficientes de residuos lignocelulósicos con características biológicas y farmacológicas únicas, como polisacáridos extraídos con propiedades antibacterianas y antioxidantes prometedoras, así como efectos inmunomoduladores (Economou *et al.*, 2017).

En el desarrollo de hongos medicinales se debe llegar a una eficiente producción de biomasa y de metabolitos de interés, depende en gran medida de las fuentes de nutrientes, composición y adecuado balance entre estas fuentes (Torres *et al.*, 2011).

Un factor importante para asegurar el crecimiento y desarrollo de los hongos es un ambiente adecuado para crecer, tanto vegetativo como reproductivo. Debido que los hongos no tienen piel, son fácilmente afectados por las condiciones de crecimiento, puede decirse que el éxito o fracaso del cultivo depende del control de las condiciones de crecimiento por parte del fungicultor. Los factores ambientales que afectan al cultivo incluyen temperatura, humedad, pH, luminosidad, oxígeno y ventilación (Silva *et al.*, 2010).

Las etapas para la producción de hongos (Figura 1.1) deben mantenerse en condiciones asépticas y manejarse con material esterilizado. El cultivo de hongos inicia con la obtención de la cepa, que es la masa del micelio desarrollada en un medio apropiado en caja Petri, una vez que la cepa crece, se desarrolla masivamente el micelio para la preparación del inóculo en frascos o bolsas, que sirve para el cultivo del hongo en el sustrato seleccionado. El micelio desarrollado en la caja Petri se cuadrícula en porciones de 1 cm² aproximadamente, y se coloca en un frasco o bolsa con semilla hidratadas y estéril, por ej. trigo, sorgo, centeno, cebada o mijo. El inóculo preparado permanece en obscuridad a una temperatura de 25-27°C. Después de 10-20 días de incubación y el micelio ha cubierto las semillas, es cuando el inóculo está listo. El inóculo se puede almacenar en refrigeración a 5°C, con un tiempo de vida de 3 a 6 meses (Guzmán *et al.*, 2008).

Una vez desarrollado el inóculo, se prepara el sustrato (ej. paja de cebada, trigo, pulpa de café, rastrojo de maíz, olote de maíz, etc.), este material proporciona la alimentación al hongo por lo que, la selección del sustrato para cultivo depende de las exigencias nutricionales del hongo, de su disponibilidad tanto temporal como geográfica y también de la tecnología que se utilice para acondicionarlo (Silva *et al.*, 2010). Los sustratos pasan por un proceso de pasteurización o esterilización para disminuir o eliminar microorganismos existentes que pueden competir con el crecimiento del hongo. Para el caso de *Pleurotus* (setas), en bolsas de plástico se mezcla uniformemente el sustrato pasteurizado con el inóculo crecido, se llena la bolsa aproximadamente 5 kg y se cierra. Para otras especies como *Lentinula* (shiitake) o *Ganoderma* (reishi), se

emplean bolsas de polietileno que resisten la esterilización, por lo que la siembra o inoculación deberá ser en condiciones estrictamente asépticas, de preferencia acondicionadas con equipos de filtración de aire estéril. Las bolsas se colocan en oscuridad, a una temperatura entre 25 a 28°C, dependiendo de la especie. Cuando el inóculo invade el sustrato, las bolsas son colocadas en áreas con condiciones adecuadas de temperatura, iluminación, humedad y ventilación, dependiendo del hongo cultivado. Los primordios (masas algodonosas iniciadoras del cuerpo fructífero) pueden alcanzar su estado adulto en 5 a 10 días, entonces estarán listos para su cosecha. Cada bolsa produce varias cosechas, en intervalos de 10 días. Una vez cosechados los hongos están listos para consumo o procesamiento (Guzmán *et al.*, 2008).

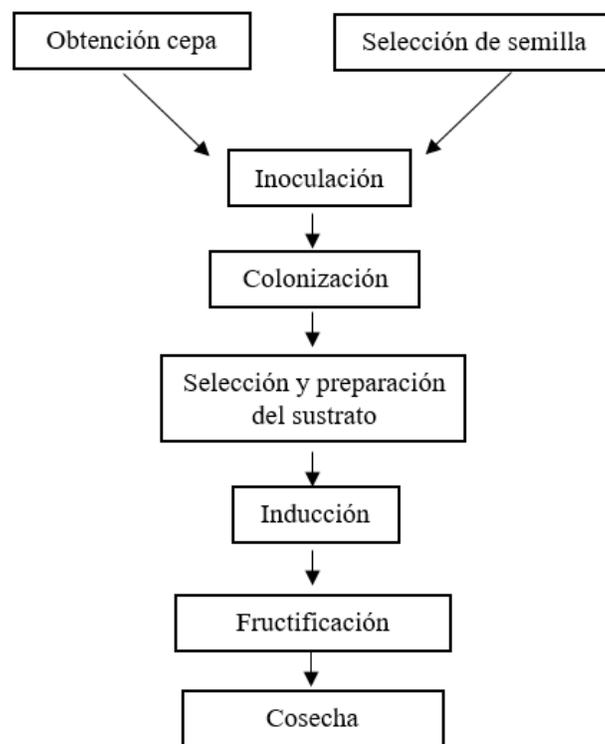


Figura 1.1 Diagrama general en la producción de hongos

Una vez desarrollado el inóculo, se prepara el sustrato (ej. paja de cebada, trigo, pulpa de café, rastrojo de maíz, olote de maíz, etc.), este material proporciona la alimentación al hongo por lo que, la selección del sustrato para cultivo depende de las exigencias

nutricionales del hongo, de su disponibilidad tanto temporal como geográfica y también de la tecnología que se utilice para acondicionarlo (Silva *et al.*, 2010). Los sustratos pasan por un proceso de pasteurización o esterilización para disminuir o eliminar microorganismos existentes que pueden competir con el crecimiento del hongo. Para el caso de *Pleurotus* (setas), en bolsas de plástico se mezcla uniformemente el sustrato pasteurizado con el inóculo crecido, se llena la bolsa aproximadamente 5 kg y se cierra. Para otras especies como *Lentinula* (shiitake) o *Ganoderma* (reishi), se emplean bolsas de polietileno que resisten la esterilización, por lo que la siembra o inoculación deberá ser en condiciones estrictamente asépticas, de preferencia acondicionadas con equipos de filtración de aire estéril. Las bolsas se colocan en oscuridad, a una temperatura entre 25 a 28°C, dependiendo de la especie. Cuando el inóculo invade el sustrato, las bolsas son colocadas en áreas con condiciones adecuadas de temperatura, iluminación, humedad y ventilación, dependiendo del hongo cultivado. Los primordios (masas algodonosas iniciadoras del cuerpo fructífero) pueden alcanzar su estado adulto en 5 a 10 días, entonces estarán listos para su cosecha. Cada bolsa produce varias cosechas, en intervalos de 10 días. Una vez cosechados los hongos están listos para consumo o procesamiento (Guzmán *et al.*, 2008).

La producción del inóculo en el cultivo de hongos es crucial, aunque a menudo reciben una atención menor. La viabilidad y homogeneidad del inóculo pueden afectar significativamente el rendimiento en la fermentación y, por lo tanto, deberán estandarizarse para obtener un proceso reproducible (Wagner *et al.* 2013). Para que el hongo se desarrolló exitosamente necesita de una temperatura definida, pH, humedad tanto del aire como del sustrato, un sustrato adecuado y aireación (Salmon *et al.*, 2016):

- Temperatura: influye en el metabolismo de las células directamente en la capacidad enzimática del organismo. La sensibilidad a la temperatura no sólo varía entre las especies cultivables de hongo, sino también en las diferentes etapas de ciclo de cultivo. Las especies templadas pueden cultivarse alrededor

de 20 °C, mientras que en las subtropicales el intervalo puede variar de 24 a 28°C, incluso arriba de 30°C para hongos de origen tropical.

- pH: influye sobre el sustrato o medio de cultivo directamente e incide sobre el carácter iónico del medio, influye directamente en las proteínas de la membrana y actividad enzimática ligada a la pared celular. Además, mantener un pH adecuado para el hongo a cultivar le provee resistencia ante la presencia de especies contaminantes, en promedio, pHs de 4 a 7 son convenientes para el crecimiento de los hongos.
- Sustrato: se debe elegir un sustrato o combinación de materiales orgánicos con una estructura homogénea y adecuada para la invasión del micelio. Si es compacto (rígido), se obtienen pocos espacios intercelulares y, presentarán problemas de aireación, por otra parte, un sustrato blando y/o con alta capacidad de absorción de agua podrá alcanzar porcentajes recomendables de humedad, ya que se empasta, presentando problemas de aireación.
- Humedad: durante la etapa de incubación del micelio en el sustrato (incubación) y si el cultivo se realiza en bloques o bolsas plásticas, la humedad ambiental no es importante, dado que, la bolsa mantiene la humedad requerida, pero si deben mantenerse en un lugar fresco. Durante la etapa de fructificación, una humedad ambiental alta (80-90%) es recomendable para lograr el desarrollo adecuado de las fructificaciones.
- Aireación: estos organismos demandan diferentes niveles de O₂ y CO₂ según el estado fisiológico en que se encuentren. La concentración puede estimular o inhibir la fructificación, crecimiento micelial, germinación de esporas entre otros, por lo cual, es importante realizar perforaciones a las bolsas, al segundo día después de la siembra.

1.1.2 *Lentinula edodes*

Hongo comestible y medicinal procedente de Asia oriental, conocido como “Shiitake” que proviene de los vocablos japoneses, “Shii” =madera y “take” =hongo. Es un hongo de pudrición blanca que se cultiva alrededor del mundo en subproductos agrícolas y

forestales. Tiene alto interés económico debido a que presenta oportunidades en el mercado por sus características sensoriales como aroma, sabor y propiedades medicinales (Hinestroza y Lopez, 2009). Es el segundo hongo cultivado a nivel mundial, la mayor parte de producción se obtiene en formulaciones sintéticas con base en viruta de encino suplementada, pero esto presenta un riesgo ecológico por lo cual se busca sustratos alternativos que generen rendimientos altos y productos de buena calidad (Ruiz *et al.*, 2007). En la Figura 1.2 se muestra la imagen del hongo *Lentinula edodes* ya cosechado (Silva *et al.* 2010).



Figura 1.2 *Lentinula edodes*

Lentinula edodes tiene un píleo o sombrero de 5-25 cm de diámetro y grosor de 8-13 mm, convexo o casi plano con una superficie seca y fibrosa apesada, de color café claro a pardo rojizo oscuro. El estipíe o pie de 3 a 5 cm de largo con 5-15 cm de grosor. Produce esporas blancas de 3 a 3.5 μm de forma ovoide. El basidio (estructura donde se forman las estructuras de reproducción sexual o esporas) es tetráesporado, es decir, produce 4 esporas (Hinestroza y Lopez, 2009).

Lentinula edodes crece en climas húmedos y templado, en maderas duras de árboles muertos o en decadencia, principalmente de la familia Fagaceae (encinos), en la

naturaleza fructifica principalmente en otoño y primavera (Hinestroza y Lopez, 2009). Sin embargo, si el cultivo se realiza en invernadero con condiciones controladas, la fructificación ocurre en cualquier época del año (Silva *et al.*, 2010).

Lentinula edodes contiene el doble de proteínas que los vegetales, es bajo en calorías, alto en hierro, fibra, minerales, vitaminas esenciales como B1, B2, B6, B12 y D2, con altas cantidades de riboflavina, niacina, que son activadores del sistema inmune (Arenas *et al.*, 2015). El consumo de *Lentinula edodes* tiene efectos beneficiosos para el ser humano, porque algunos de sus componentes tienen beneficios a la salud, atribuyéndole las siguientes propiedades medicinales:

- Anticancerígena: tiene un componente conocido como letinan que es un polisacárido con acción anti-infeccioso y anti-cancerígeno.
- Anti oxidativa: posee vitaminas A, E, C y selenio.
- Anti-infeccitiva: estimula la producción en los organismos de interferón, el cual tiene efectos antiviral.
- Anti degenerativa: limita algunos de los factores que causan envejecimiento en el ser humano.
- Anticolesterólica: produce eritadenina y quitina, estas propiedades son aumentadas por la lentinan.
- Hipoglucémica: posee bajos niveles de hidratos de carbono y lisina que previenen la acumulación de azúcar en la sangre.

1.1.3 *Ganoderma curtisii*

Ganoderma curtisii proviene del griego “ganos”=brillo y “dermos”=piel, es denominado en China como “Ling zhi”, y en Japón como “Reishi”. Donde ha sido ampliamente usado como ingrediente en alimentos y materia prima para el desarrollo de medicamentos debido a efectos comprobados como estimulador del sistema inmunológico y actividad anticancerígena, entre otros (Huerta *et al.*, 2016).

Es un hongo que presenta una estructura costrosa en su estado adulto, el píleo es de forma circular a reniforme, dimidiado o circular de 6 a 17 cm al inicio es amarillento,

que con el tiempo vira a marrón y adulto marrón oscuro, de superficie lisa, generalmente es opaco en especímenes inmaduros y con brillo en adultos. El estípite de longitud irregular de 3 a 14 cm, cilíndrico de 3 cm de espesor y color caoba como el sombrero. Las hifas formadas con tubos alargados de color blanco, se van oscureciendo paulatinamente a tono canela, con un tamaño de 5 µm. Las esporas de 6 a 7.5 µm x 5 a 5.8 µm de color amarillento a marrón, tienen un recubrimiento externo que hace difícil su germinación (Bhosle *et al.*, 2010).

Ganoderma curtisii crece en cualquier época del año, en bosques densos, con alta humedad y poca luz, a la altura de la base de los árboles, raíces enterradas de diversos árboles muertos como robles y encinos. Es un hongo no tan abundante en la naturaleza, por lo que la cantidad de hongos silvestres no sería suficiente para su explotación comercial. El cultivo en sustratos sólidos se ha convertido en la mejor opción para satisfacer la demanda creciente en mercados internacionales (Han *et al.*, 2005), en la Figura 1.3 se muestra un espécimen de *Ganoderma curtisii* cultivado en fermentación en medio sólido. Es el hongo de la pudrición blanca, el suministro nutricional para el desarrollo del cuerpo fructífero de *Ganoderma curtisii* proviene de la degradación de lignina y celulosa por secreción de enzimas extracelulares, como la peroxidasa de lignina, lacasa y celulasa (Huerta *et al.*, 2016).

Este hongo posee numerosos componentes bio-activos como adenosina, proteínas, vitaminas, fenoles, oligoelementos, polisacáridos y triterpenoides. Entre los componentes químicos más estudiados son triterpenoides y polisacáridos (β -glucano), que desarrollan actividades biológicas que lo hacen antioxidante e inmunoestimulante, además potencialmente útiles para la prevención y el tratamiento de enfermedades como hipertensión, diabetes, cáncer, hepatitis, artritis, hipercolesterol, bronquitis, asma, gastritis, VIH (Moreno *et al.*, 2011). Importante fuente de materia prima para la elaboración de complementos alimenticios y bebidas funcionales, además posee propiedades terapéuticas demostradas (Salmones y Mata, 2012).



Figura 1.3 *Ganoderma curtisii*

1.2 Fermentación en medio sólido

La fermentación en medio sólido (SSF por sus siglas en inglés), se define como un proceso en el cual, los microorganismos se cultivan en sustratos sólidos en ausencia de agua libre. La acción de las enzimas ligninolíticas para la degradación de lignina en bioprocesos industriales requiere de la utilización de un sistema de producción eficiente (Hariharan y Nambisan, 2013). La SSF recientemente se utiliza en la producción de enzimas y mejorar los valores de los alimentos existentes, especialmente los alimentos orientales, los hongos filamentosos parecen ser más adecuados en la SSF que los microorganismos unicelulares como las bacterias y las levaduras (Han *et al.*, 2005).

Los procesos de fermentación se pueden dividir en: (1) fermentación sumergida (SMF), que se basa en el cultivo de microorganismos en medio líquido nutritivo, (2) fermentación en estado sólido (SSF), que consiste en el crecimiento microbiano y la formación de productos en partículas sólidas en ausencia (o casi ausencia) de agua; sin embargo, el sustrato contiene la humedad suficiente para permitir el crecimiento y metabolismo de los microorganismos. En los últimos años, SSF ha tomado un mayor interés varios estudios han demostrado que este proceso conduce a rendimientos y productividad más alta o mejores características de los productos que SMF. El bajo

volumen de agua en la SSF también tiene un gran impacto en la economía del proceso, principalmente debido al menor tamaño del fermentador, la reducción del procesamiento posterior, la menor agitación y bajos costos de esterilización (Martins *et al.*, 2011). En la Tabla 1.1 se muestran las ventajas de la SSF en comparación con la SMF.

Tabla 1.1 Comparativo entre la fermentación sumergida y en soporte sólido

Fermentación en medio sólido	Fermentación en medio líquido
Simplicidad en medios de cultivo, generalmente el sustrato proporciona todos los nutrientes necesarios.	Preparación previa medio de cultivo
Mayor recuperación de productos	Recuperación de productos por filtración
Menor utilización de reactivos y energía	Utilización de varios reactivos y energía para realizar agitación
Menor riesgo de contaminación y espumas, debido a los bajos niveles de humedad en el medio.	Medios de cultivo contaminables
Mayor rendimiento de biomasa	Menor rendimiento de biomasa
Biomasa agotada es reutilizada para la alimentación de animales de granja	Biomasa agotada es desechada

Los principales factores que afectan la SSF son: selección de microorganismo, tipo de sustrato, tratamiento del sustrato, tamaño de partícula (espacio interpartículas y área superficial) del sustrato, contenido de humedad y actividad de agua (a_w) del sustrato, humedad relativa, tipo y tamaño del inóculo, temperatura de la materia de fermentación, eliminación del calor metabólico generado por la respiración del organismo, período de cultivo, mantenimiento de la uniformidad en el medio ambiente de la SSF, tasa de consumo de oxígeno y tasa de evolución del dióxido de carbono. Los factores más importantes a considerar en la SSF se describen a continuación (Padey *et al.*, 2008):

- 1 Selección de microorganismos. Seleccionar la cepa adecuada es el criterio más importante, en microorganismos tipo silvestres, es decir aquellos que no han sido manipulados genéticamente, en la mayoría de los casos son incapaces de producir rendimientos comercialmente aceptables. Es importante asegurarse que la cepa seleccionada sea adecuada para SSF. La cepa microbiana debe ser eficiente para producir el producto final deseado como único producto.
- 2 Selección del sustrato, esto depende de varios factores, como costo y disponibilidad. Los residuos agroindustriales presentan estas ventajas para su aplicación como sustratos, además de que su composición química, rica en polisacáridos como celulosa, lignina y hemicelulosa, no sólo suministran nutrientes al cultivo que crece en él, sino también sirve como anclaje para las células.
- 3 Tamaño de partícula del sustrato. Las partículas de sustrato más pequeñas proporcionan un área de superficie más grande para el ataque microbiano, lo cual se considera como un factor deseable.
- 4 Humedad y actividad de agua del sustrato. Se consideran el parámetro fundamental para la transferencia de agua y solutos a través de la membrana celular. La humedad del medio puede variar entre 30 y 80% en función del residuo utilizado, del microorganismo y objetivo del proceso. La actividad de agua puede usarse para controlar y modificar la actividad metabólica del microorganismo.
- 5 Temperatura. Los procesos biológicos se caracterizan por el hecho de que se desarrollan en un intervalo de temperatura relativamente estrecho. Los límites de temperatura alta para el desarrollo son de 60 a 80°C y en cepas particulares 120°C. La importancia de la temperatura en un proceso biológico, es tal que, puede determinar efectos importantes como desnaturalización de proteínas, inhibición enzimática, promoción o inhibición de la producción de un metabolito particular, muerte celular, etc.
- 6 pH. Es uno de los factores más importantes, cada microorganismo necesita un pH definido para su crecimiento y actividad con un valor óptimo. Un pH bajo evita el crecimiento de microorganismo parásitos que podrían dañar el material. En tanto que, los hongos tienen rangos de pH entre 3.5-6.

1.2.1 Sustratos

Un sustrato es el material sobre el que crecen los hongos, al cual degradan para su alimentación (Guzmán *et al.*, 2008). Los sustratos de cultivo a utilizar provienen normalmente de actividades agrícolas, agroindustriales y forestales. Dentro de la amplia gama de estos subproductos agrícolas o agroindustriales predominan los de naturaleza lignocelulósica. Para su utilización a nivel de producción, estos sustratos deben cumplir algunas condiciones: disponibilidad, características fisicoquímicas, precio, facilidad de manejo y transporte (Andrino *et al.*, 2011).

La pared celular de los tejidos vegetales de los sustratos está compuesta de celulosa, hemicelulosa y lignina, sustancias químicas muy complejas, difíciles de degradar, que solamente hongos y bacterias descomponen debido a que poseen enzimas que rompen tales moléculas y liberan celulosa y hemicelulosa de la lignina (Guzmán *et al.*, 2008). Es por esto que la formulación de un sustrato para cultivo debe ser específico con condiciones adecuadas del cultivo y dependientes de cada cepa, son factores determinantes para la optimización del cultivo. Los sustratos de mayor colonización del hongo son aquellos que tienen mayor contenido de carbohidratos estructurales (Ríos *et al.*, 2017).

Los hongos medicinales, se pueden cultivar básicamente sobre dos tipos de sustratos: naturales y artificiales (Guzmán *et al.*, 2008):

- Sustratos naturales: corresponden principalmente a troncos y ramas e inoculados directamente, sin realizar ningún tipo de tratamiento de esterilización. Se puede realizar sin problemas porque durante la incubación y fructificación del cultivo se realiza manteniendo la corteza de los propios troncos, que constituyen una barrera física y química muy efectiva contra la invasión de hongos contaminantes. A pesar de lo anterior, muchos troncos se contaminan por los cortes, estas contaminaciones se consideran tolerables en el cultivo, siendo posibles de controlar con el uso de desinfectantes adecuados.

- Sustratos artificiales: mezcla de distintas sustancias orgánicas e inorgánicas sobre una matriz de material lignocelulósico, en conjunto o por separado tienen alto valor nutritivo para un gran número de microorganismos y, son sustancias relativamente simples a las cuales estos microorganismos pueden acceder sin dificultad. Estos sustratos no pueden ser inoculados directamente sin tratamiento térmico previo (esterilización o pasteurización), ya que los microorganismos presentes pueden invadir la totalidad del sustrato de cultivo a una velocidad de crecimiento mayor que el hongo que se intenta cultivar.

Los sustratos artificiales para el cultivo de hongos se clasifican de la siguiente manera (Guzmán *et al.*, 2008):

1. Pajas de ajonjolí, arroz, cártamo, cebada, sorgo, trigo, avena y zacates en general.
2. Rastrojos de maíz, mijo, garbanzo, frijol, etc.
3. Pulpas de café, cardamomo.
4. Bagazos de caña de azúcar, citronela, maguey tequilero, henequén, uva, etc.
5. Forestales, tales como aserrín, viruta, troncos y ramas.
6. Otros: papel, olote y tamo de maíz, hojas (brácteas) de piña, fibra de coco, lirio acuático, hojas y tallos de plátano, de caña de azúcar, desechos de la industria textil como algodón, etc.

Los sustratos se deben someter a un tratamiento físico o químico que elimine o disminuya la carga de microorganismos contaminantes, este tratamiento junto con los nutrientes que posee la mezcla, convierten al sustrato en una matriz altamente selecta para inoculación y crecimiento de hongos. Los sustratos deben tener una cierta relación Carbono:Nitrógeno (C:N), pH, humedad, grado de compactación, granulometría, etc., que permiten el rápido crecimiento vegetativo y reproductivo del hongo que es inoculado sobre o dentro de él, más las condiciones ambientales, determinan finalmente el éxito del cultivo (Silva *et al.*, 2010).

1.3 Bioreactor

Los reactores se emplean en la manufactura de productos comerciales como metabolitos primarios, metabolitos secundarios, enzimas industriales y cultivo de células (López *et al.*, 2012).

El diseño de un bioreactor debe ser tal que asegure homogeneidad entre los componentes del sistema y condiciones óptimas para el crecimiento microbiano y, la obtención del producto deseado. Se deben tomar en cuenta los problemas de transferencia de calor y oxígeno sobre la cama de sustrato, los cuales dependen de las características de la matriz que se esté utilizando para la fermentación, siendo éste uno de los principales factores que afectan el diseño y las estrategias de control. Dado lo anterior, los biorreactores deben ser optimizados para obtener la máxima concentración de productos de la fermentación, como son, biomasa microbiana y metabolitos en un tiempo mínimo y menor costo de producción (Ruiz *et al.* 2007).

Se ha desarrollado el diseño, operación y escalamiento de biorreactores para la fermentación en medio sólido (Ruiz *et al.*, 2007). Los biorreactores de menor escala son denominados cultivadores, reciben al inóculo del laboratorio microbiológico y se realiza la propagación del cultivo, hasta llevarlo a una escala 10 veces mayor (Lorenzo *et al.*, 2016). Estos bioreactores a escala de laboratorio eliminan adecuadamente el calor metabólico generado por la fermentación, manteniendo al reactor en un ambiente de temperatura controlada gracias a un baño de agua o al uso de una camisa de enfriamiento (Padey *et al.*, 2008).

Los criterios más importantes a considerar para el diseño de un bioreactor son: (Ruiz *et al.*, 2007)

- Debe estar diseñado para que funcione asépticamente durante numerosos días, para evitar la aparición de contaminantes en las operaciones de bioprocesos de larga duración.

- Debe permitir una mayor área de contacto entre las fases abiótica del sistema, se debe proporcionar un sistema adecuado de aireación y agitación para cubrir las necesidades metabólicas de los microorganismos.
- Entradas para la adición de nutrientes y el control del pH.
- El crecimiento microbiano es generalmente exotérmico, el biorreactor debe facilitar la transferencia de calor, del medio hacia las células y viceversa, a medida que se produce el crecimiento celular, además de mantener estable la temperatura deseada.
- Su diseño debe favorecer la distribución homogénea de las células en todo el volumen de cultivo.
- Debe tener la capacidad de suministrar oxígeno a una velocidad tal que satisfaga el consumo requerido.
- El bioreactor debe mantener el cultivo puro; una vez que todo el sistema ha sido esterilizado y posteriormente inoculado con el microorganismo deseado.

1.3.1 Bioreactores en medio sólido

Los bioreactores usados para SSF son llamados también fermentadores. Los tipos de bioreactores más estudiados han sido de bandeja y tambor rotatorio. Se han introducido un nuevo tipo de bioreactores en fermentación en medio sólido denominados de cama empacada o columna de lecho fijo y columna-charolas (Guerrero, 2014).

El bioreactor de columna fue desarrollado en 1975 en Francia y consiste de una o varias columnas, elaboradas a base de vidrio y que disponen de:

- Un sistema de aireación forzada a través de compresores.
- Un sistema de regulación de temperatura a través de un termostato de agua.
- Un sistema de monitoreo de gases.

Los bioreactores de columna estéril (Padey *et al.*, 2008), se basan en el diseño de fermentadores en forma de columna, pero difieren en la toma de muestra, que se

realiza en forma aséptica a través de la tapa superior del sistema. En la Figura 1.4 se muestra un bioreactor de columna conformado por (1) Tapa de calefacción, (2) termómetro, (3) tamiz de acero, (4) sensor de temperatura del aire en la entrada, (5) sensor de humedad relativa, (6) resistencia, (7) sensor de temperatura de agua, (8) medidor de flujo másico, (9) medidor de nivel, (10) chaqueta aislante.

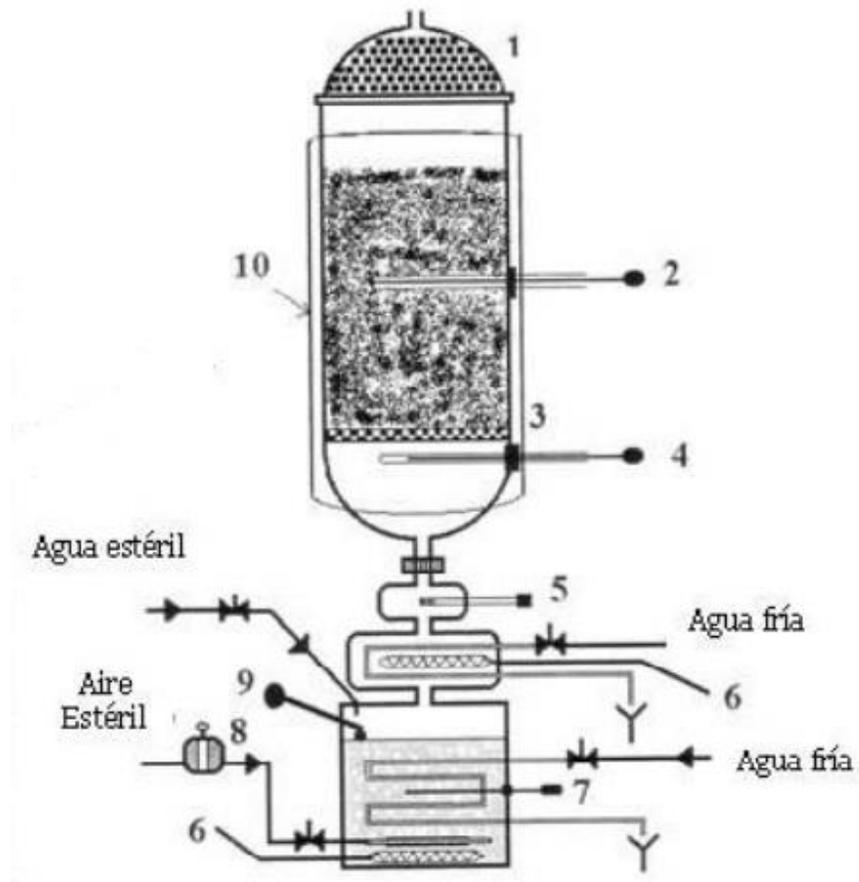


Figura 1.4 Bioreactor de columna (Guerrero, 2014)

El bioreactor de columna-charola o fermentador de bandeja está formado por un contenedor cilíndrico en cuyo interior se encuentra charolas perforadas con la finalidad de una mejor distribución de oxígeno por aireación entre las charolas. El bioreactor de columna-charola (Guerrero, 2014), dispone de:

- Sistema de burbujeo que suministra oxígeno al medio.

- Sistema de regulación de temperatura a través de una chaqueta de enfriamiento o calentamiento.

En la Figura 1.5 se muestra el bioreactor de columna charola utilizado en el presente estudio, el cuál está conformado de: (1) entrada de aire estéril, (2) entrada de agua estéril, (3) distribuidor de aire, (4) entrada para el termómetro, (5) charolas, (6) chaqueta para el control de temperatura, (7) cubierta de acrílico, (8) entrada de agua, (9) salida de agua.

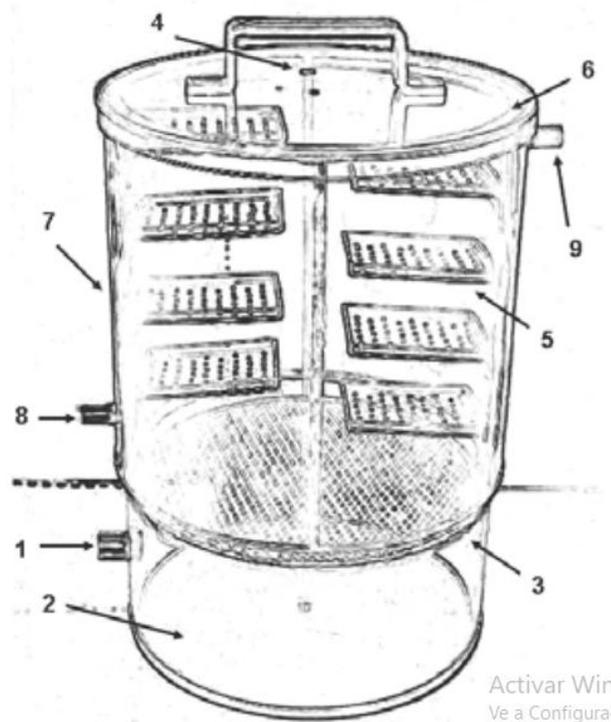


Figura 1.5 Reactor de columna-charolas (Padey *et al.* 2008)

Las ventajas y desventajas de usar un bioreactor en columna para el crecimiento de hongos se muestra en la tabla 1.2:

Tabla 1.2 Ventajas y desventajas de bioreactor de columna

Ventajas	Desventajas
Económico y de fácil montaje	Dificultad en la toma de muestra
Monitoreo de temperatura, biomasa y CO ₂	Formación de gradientes de O ₂ y nutrientes
Sistema esterilizado previo inoculación	Para un funcionamiento adecuado deben ser optimizados
Alta transferencia de O ₂ y aireación	Problemas en la eliminación de calor
Mayor transferencia de nutrientes	

1.3.2 Instrumentación de bioreactores

El control del proceso se sigue mediante un sistema automático donde las principales variables son monitoreadas con la finalidad de mantener valores próximos a los deseados a pesar de las posibles perturbaciones. Proporcionan medidas para conseguir un comportamiento óptimo en sistemas dinámicos, para mejorar la productividad, simplificar el trabajo de operaciones manuales y, son esenciales en operaciones industriales para el control de la presión, temperatura, humedad, flujo, etc. Todo lazo de control requiere de sensores, transmisores, controladores y elementos finales de control (Ogata, 2010).

La instrumentación y control de un bioreactor requiere de sensores que permitan validar y controlar las variables de un proceso fermentativo, y sistemas que ajusten el equipo a un punto óptimo de operación, idealmente. Los sensores deben estar en línea, para determinar las propiedades físicas del cultivo, estos sensores deben ser fácilmente esterilizados para asegurar la asepsia del proceso (Hariharan y Nambisan, 2013). Los instrumentos de medición sirven para determinar las propiedades de los componentes y, productos finales. Estos se emplean cada vez para controlar, regular, automatizar y supervisar procesos. Los instrumentos inteligentes, deben cumplir con los requisitos específicos del proceso, y donde el control realice las funciones de:

- Adquisición de datos en tiempo real.

- Algoritmos de control y regulación PID autoajustables o de inteligencia artificial.
- Accionamientos analógicos y digitales.

Las variables más importantes que hay que medir y/o controlar en un bioreactor, para garantizar el crecimiento microbiano son temperatura, pH, el suministro o ausencia de oxígeno y humedad (Lorenzo *et al.*, 2016).

La temperatura es un parámetro muy importante de automatizar durante la incubación del organismo, ya que se debe mantener la temperatura en intervalos óptimos del desarrollo del microorganismo a una temperatura que sea económicamente factible, sin que afecte apreciablemente la concentración de microorganismos en la propagación. La variación de la velocidad de crecimiento en función de la temperatura de cultivo se caracteriza por presentar una temperatura mínima, por debajo de la cual no hay crecimiento. A mayor temperatura, se produce un incremento lineal de la velocidad de crecimiento con la temperatura del cultivo, hasta que se alcanza la temperatura óptima. Por encima de ésta, la velocidad de crecimiento decae bruscamente hasta que se produce la muerte celular (Lorenzo *et al.*, 2016).

En el caso de la humedad existe una relación inversa de la temperatura con la humedad, por lo que a elevadas temperaturas aumenta la presencia de vapor de agua y, por ende, disminuye la humedad, en tanto que, a baja temperatura, el contenido de humedad aumenta. Una humedad alta hace que el cultivo se desarrolle de manera óptima, debido a que disminuye la presencia de vapor de agua. La humedad que se debe controlar en un reactor para el crecimiento de células es del 60-80% para evitar la muerte celular (Ríos, 2016). El controlar la humedad adecuada para el crecimiento de microorganismos optimiza la eficiencia biológica del producto.

El pH es un parámetro crítico en el crecimiento de los microorganismos, cada tipo de célula tiene un intervalo óptimo en que se desarrolla y un rango de aceptación, fuera del cual muere rápidamente. Por esta razón, se tiende a utilizar como un método de control frente a la contaminación. Durante el cultivo de microorganismo, el pH del medio de crecimiento tiende a bajar como consecuencia de los procesos metabólicos

de los organismos, por lo que es fundamental mantener su control (Lorenzo *et al.*, 2016).

1.4 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La integración de la microscopia óptica y la espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier, permite realizar un análisis global del estado bioquímico de células, monitoreando los niveles de las principales biomoléculas presentes en el interior de la célula (Gonzada *et al.* 2013). El principio básico está dado en la excitación de grupos moleculares por un haz de luz infrarrojo (2.5 a 15 μm ; equivalentes a número de onda entre 4000 a 650 cm^{-1}), que genera movimientos vibracionales en los enlaces de la molécula. Los movimientos vibracionales se distinguen por el tipo de desplazamiento generado en los enlaces, conociéndose como vibraciones de tensión o flexión (Huang *et al.*, 2013). Las tensiones provocan un estiramiento o estrechamiento del enlace y las flexiones generan una deformación del enlace. Si el número de átomos que forman un enlace es de tres o más, los movimientos también pueden presentarse como simétricos y asimétricos. Los movimientos simétricos se caracterizan porque los enlaces se desplazan en direcciones contrarias y los movimientos asimétricos se caracterizan por un movimiento en la misma dirección o sentido (Kannan, 2014).

El análisis de una muestra por FTIR provee como resultado un espectro de absorción de infrarrojo el cual proporciona información de la estructura y concentración molecular. Todas las moléculas pueden manifestar una serie de bandas de adsorción, cada banda corresponde con un movimiento de vibración de un enlace específico dentro de la molécula (Alzorqi *et al.*, 2016). La mayoría de los componentes de un enlace químico tienen movimientos vibracionales con frecuencias dentro del infrarrojo medio (4000 a 650 cm^{-1}), moléculas tales como lípidos, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y otras presentes en una muestra biológica tienen cada una un espectro de infrarrojo específico (Kim *et al.*, 2011). La radiación es absorbida por un enlace cuando la frecuencia vibracional de la onda electromagnética usada es la misma que la del propio enlace, haciendo posible la asignación de picos de absorción

a grupos funcionales específicos. Estructuras químicas grandes como es el caso de las biomoléculas tienen picos de absorción predecibles, los cuales pueden variar ligeramente dependiendo de las distintas interacciones moleculares y propiedades físicas de las muestras. El número de onda absorbida por un enlace vibracional depende de los átomos que forman el enlace, el tipo de enlace formado y el tipo de vibración inter e intra-molecular (Yao *et al.*, 2017).

1.5 Antecedentes

Hernández. (2016), estudiaron la fermentación en medio sólido usando como sustrato bagazo de caña, cascarilla pulpa de café, construyeron un bioreactor a escala semi-piloto con la cepa *A. niger*. Los residuos fueron secados ($\%H < 10$, $a_w < 0.1$) usado como soporte para fermentación en medio sólido en mezcla (70% pulpa, 15% cascarilla y 15% bagazo). Evaluaron el tamaño de partícula para la fermentación a nivel laboratorio (1.18 mm, 1 mm y 850 μm). Usaron concentración de inóculo de 1.1×10^7 esporas/mL, 10 mL de solución nutritiva durante 7 días, con variable de respuesta tamaño de partícula de los sustratos evaluado en el crecimiento de la cepa *A. niger*, el análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre los tres tamaños, teniendo un crecimiento del tamaño 1.18 mm (5.7×10^6 esporas/mL) maximizando el crecimiento. Diseñaron y construyeron un bioreactor columna-charola, instrumentada con un higrómetro, con flujo de aire estéril (100-120 mL/min) humidificado (60-65%) a 25-28°C, generando biomasa de *A. niger*, por 3 fermentaciones (inóculo 1.2×10^6 esporas/mL, 8 días, 40 mL de solución nutritiva) teniendo un rendimiento máximo al día 6 con un promedio de 23.3 g de biomasa/g de sustrato, en base a 40 g de materia prima, obteniendo 58.25% de la mezcla de sustratos.

Lorenzo *et al.* (2016), automatizaron diferentes áreas en plantas biotecnológicas, considerando las variables de fermentación airlift y del producto que se obtiene: el control de datos en tiempo real, con algoritmos de control PID ajustables y actuadores analógicos y digitales en un sistema PLC y SCADA. En el fermentador airlift controlaron temperatura, pH del medio, oxígeno disuelto, velocidad de agitación, presión interna, control de nivel de espuma, suministro de nutrientes. Al controlar la

fermentación se alcanza una recuperación segura de los productos y se garantizó la seguridad y productividad del proceso. Se utilizaron algoritmos de control PID cumpliendo con los requisitos específicos del proceso, además usaron autómatas programables (PLC) y sistema de control distribuidos (DCS), con sistemas de adquisición de datos y control (SCADA).

Salmon *et al.* (2016), optimizaron la composición del medio de cultivo utilizando diferentes bioreactores para aumentar la producción de fitasa a través del cultivo sumergido de una cepa de *Ganoderma sp.* MR-56. Evaluaron las fuentes de sales metálicas y la relación C/N para la producción global de enzimas en medio de salvado de trigo. Los resultados mostraron un aumento del 81, 95 y 36% de actividad de fitasa, versus el control, mediante la suplementación de melaza de soja, extracto de levadura y CaCl_2 , respectivamente. La actividad de fitasa en medio optimizado alcanzó 14.5 U mL^{-1} , un incrementándose al 5.8%. Además, en medio optimizado, los efectos asociados de las condiciones de cultivo como el tipo de vaso y la aireación lograndolo a 30°C , pH 6 y una tasa de inóculo del 3%. La producción máxima de fitasa la reportan en botellas Dreschel a 2 vvm, lo que resultó en 20.9 U mL^{-1} en 264 h y productividad de $0.08 \text{ U mL}^{-1}\text{h}^{-1}$, mientras que, en Erlenmeyer obtuvieron $11.1 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a 96 horas (productividad de $0.12 \text{ U mL}^{-1}\text{h}^{-1}$). La mayor productividad que obtuvieron fue de $0.14 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ fue obtenida en un reactor de tanque agitado alcanzado 10.3 U mL^{-1} de actividad de fitasa a las 72 h. Además comprobaron que *Ganoderma sp.* MR-56 puede producir con éxito fitasa en diferentes bioreactores en cultivo sumergido usando como medio de subproducto.

Economou *et al.* (2017), complementaron el sustrato para la fermentación de hongos de *Pleurotus ostreatus* por fermentación en estado sólido lo complementaron con salvado de trigo y harina de soja en varias proporciones obteniendo relaciones C/N de 10, 20 y 30 y evaluaron el efecto en el cultivo de las cepas de *Pleurotus pulmonarius*, *Gonoderma Adspersum*, *Gonoderma resinaceum* y *Lentinula edodes* con respecto a la tasa de crecimiento del micelio, concentración de biomasa, recuperación de enzima lacasa y exopolisacáridos crudos. La tasa de crecimiento más altas en SMS no

modificados (C/N 30), *Gonoderma resinaceum* colonizó más rápido, mientras que la concentración de biomasa se maximizó en C/N 10. La suplementación afectó la actividad de lacasa, donde *Pleurotus pulmonarius* obtuvo el valor más alto (44,363.22 µg) en C/N 20. *Lentinula edodes* su fructificación y secreción de lacasa no se vieron favorecidos por la suplementación. Del sustrato sólido los cuerpos fructíferos se promovieron en C/N 30 para *Gonoderma resinaceum* y en C/N 20 para *Pleurotus pulmonarius*. Observando que la utilización de sustrato agotados y suplementados favorecen la producción de lacasa de *Gonoderma resinaceum* y cuerpos fructíferos de *Pleurotus pulmonarius*.

Mendez. (2017), evaluaron el proceso de deshidratación que permitan conservar las propiedades nutricionales de *Pleurotus pulmonarius* cultivado en paja de cebada, evaluaron eficiencia biológica y tamaño de cuerpos fructíferos, evaluaron las condiciones de secado para prolongar su vida de anaquel en secado por bandejas (55 y 65°C) y liofilización (-20 y -20/-80 °C). Cuantificaron β-glucano, contenido bromatológico (humedad, actividad de agua, proteínas), su apariencia física (talla, diferencia de color y capacidad de deshidratación), así como su actividad enzimática (antioxidantes, poder reductor, fenoles, lacasas y polifenol oxidasas). El secado de bandejas a 55°C y liofilizado a -20°C obtuvieron retención de proteínas, antioxidantes, poder reductor, polifenol oxidasas, lacasas y rehidratación. El secado por bandejas a 55°C fue el tratamiento óptimo para la deshidratación del hongo y seleccionado para la suplementación de harina de trigo y arroz con 10, 30 y 50%, para la elaboración de pan de miga y galletas, respectivamente. Las formulaciones del 10% de harina de *P. pulmonarius* presentaron una mayor aceptación entre el panel de consumidores.

CAPÍTULO 2
MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Desarrollo experimental

La metodología general, comprende tres etapas: (1) instrumentación y validación de señales en el bioreactor, (2) adquisición de cepa, preparación y propagación de inóculo del hongo y (3) determinación de las condiciones para la fermentación en medio sólido, tal como se muestra en la Figura 2.1.

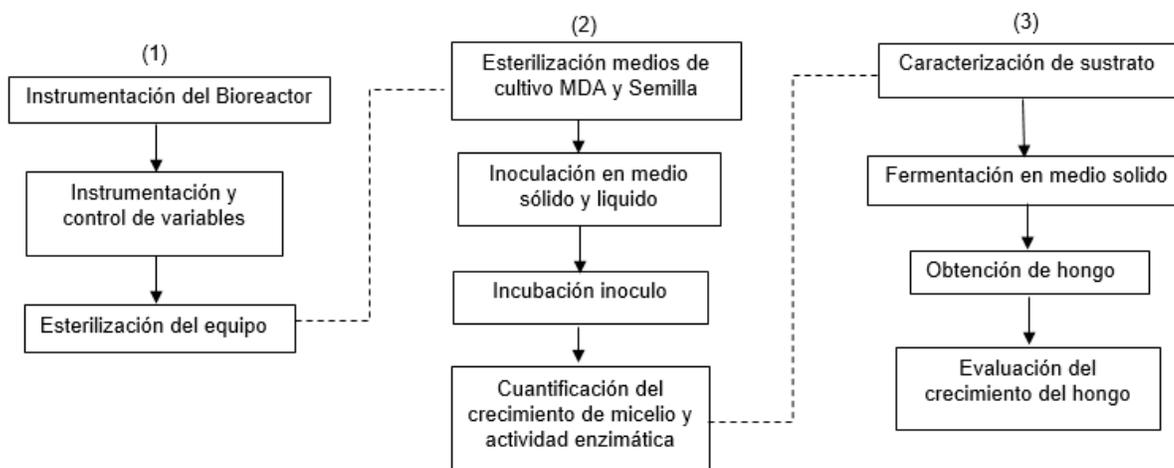


Figura 2.1 Diagrama general del proceso de cultivo de hongos (*Lentinula edodes* y *Ganoderma curtisii*) en fermentación sólida a nivel de bioreactor

2.2 Instrumentación de bioreactor

El bioreactor consiste en una columna de vidrio con dos tapas perforadas, que permiten el montaje de termopares y sensor de humedad, cuenta con 9 charolas de malla de acero inoxidable con un diámetro 16.5 cm c/u. El diseño del bioreactor se muestra en la Figura 2.2, conformado por A) un compresor de 48 L., B) un filtro de 5 μm (con manómetro y válvula para regulación del flujo de aire), C) manguera de poliuretano de $\frac{1}{4}$ ", D) tren de filtrado con filtros micrónicos de 0.5 μm , 0.3 μm y 0.01 μm , E) vaso humidificador, f) conexión al bioreactor de $\frac{1}{4}$ ", G) sensores de humedad y temperatura y H) bioreactor de columna-charola.

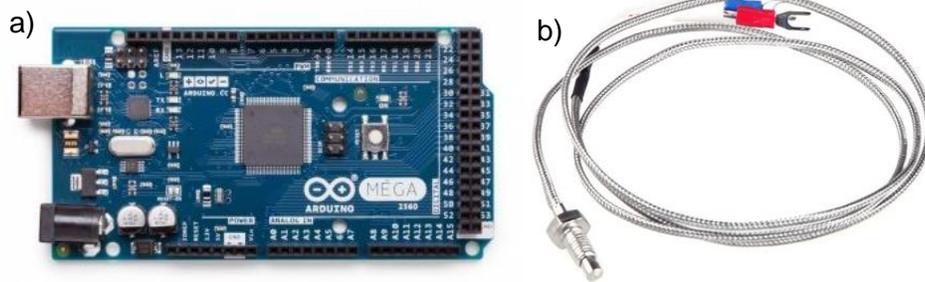


Figura 2.3 a) Placa de ARDUINO MEGA b) Termopar tipo K

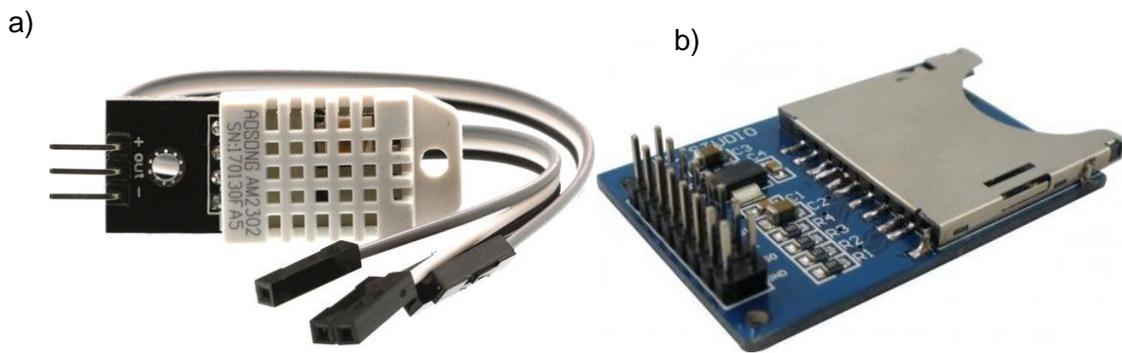


Figura 2.4 a) Sensor de Temperatura y Humedad DHT 22 b) Adaptador de memoria SD para Arduino

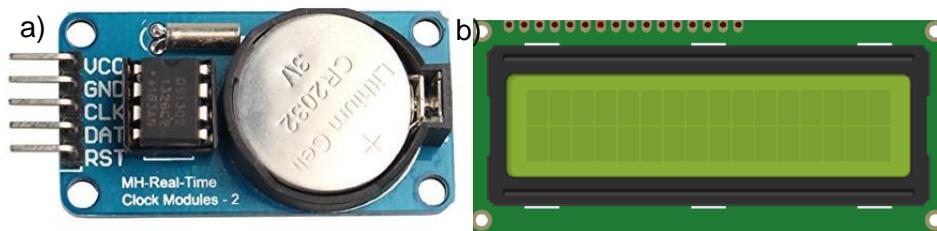


Figura 2.5 a) Reloj para Arduino b) Display LCD 20x24

Cada dispositivo fue cableado a la placa programada en arduino 1.8.8, ya que este software está escrito en programación Java, admite lenguaje en C y C++. Esta programación por dispositivo, se almacena en un código que permite obtener y mostrar los datos en forma agrupada.

2.2.1 Calibración de termopares y sensor de humedad

Los 3 termopares tipo K se calibraron en un baño térmico Thermo Scientific NESLAB X7 con agua, en un barrido de temperatura (0 a 70 °C). Los valores de temperatura registrados fueron validados mediante un calibrador de temperatura marca FLUKE 724, con un termopar tipo K (ver Figura 2.6).



Figura 2.6 Calibración de termopares en baño térmico

En la calibración de termopares tipo K, se realizó una regresión lineal para obtener la corrección de cada termopar. En la Figura 2.7 se puede observar que los datos experimentales se ajustan al calibrador en la predicción de la respuesta, obteniendo una de R^2 del 0.9989. De la misma manera en la figura 2.8 se muestra el termopar 2 calibrado, los valores calibrados se ajustan a los valores de la temperatura de referencia, con una R^2 del 0.9995. Por último, la figura 2.9 se observa el termopar 3 calibrado observando una tendencia de los datos experimentales a la regresión lineal que se realizó, con una R^2 del 0.9996.

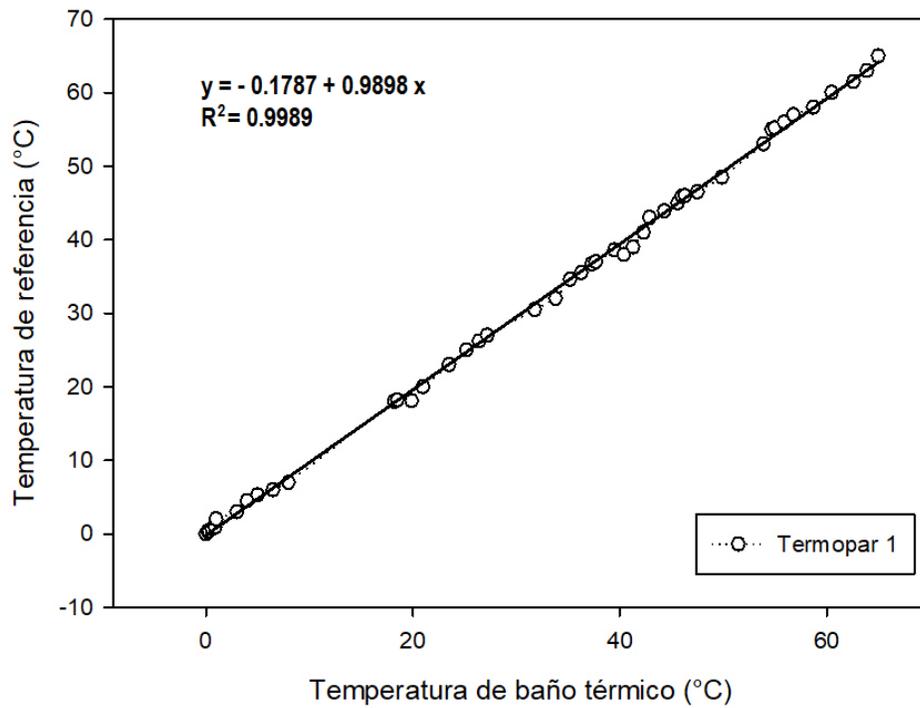


Figura 2.7 Calibración termopar 1

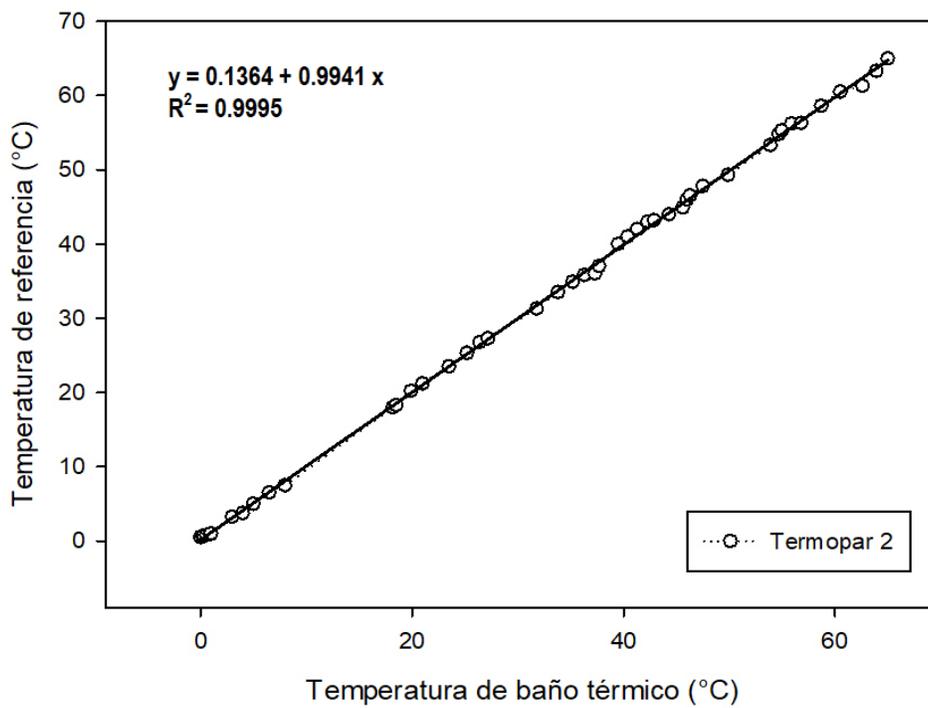


Figura 2.8 Calibración termopar 2

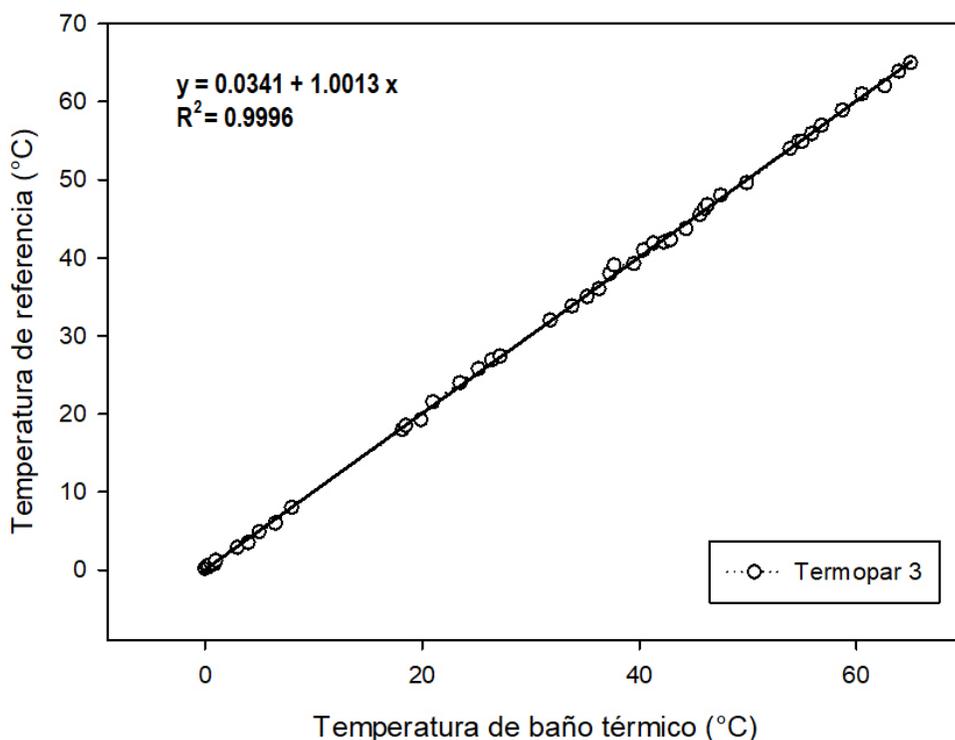


Figura 2.9 Calibración termopar 3

De manera general se puede observar que la calibración da valores cercanos a los reales reduciendo el error que presentan en los datos experimentales. Esto justifica que una correcta calibración es importante en los cultivos de hongos medicinales, para obtener mayor grado de confianza en los datos obtenidos experimentalmente. Los 3 termopares se ajustan a la curva de calibración con un error del $\pm 0.05\%$ como lo reportan Boix, (2014) y González *et al.*, (2012).

El procedimiento de calibración del sensor de humedad DTH 22 está basado en la "Guía técnica de trazabilidad e incertidumbre de medición en la calibración de higrómetros de humedad relativa" por el Centro Nacional de Metrología. Este se calibró en una cámara - desecador de poliacrilamida equipada con un higrómetro de caratula. Al mismo tiempo, la humedad fue valorada con un termohigrómetro (Figura 2.10), utilizando soluciones salinas. La composición de las soluciones consistió, por cada 100 ml de agua se adicionó 1 g de sal de NaCl o LiCl. Se inició con una humedad de 1% y

llegando a 11.9%. En esta humedad maxima 11.9% se introducen 1 L de agua destilada con 10 g de LiCl. Para calibrar el intervalo mayor de humedad (30 a 75%), equivale a 1.5 L de agua se agregarin 15 g de NaCl.



Figura 2.10 Calibración del sensor de humedad DHT 22 en cabina con higrómetro de caratula

En la Figura 2.11 se muestra la calibracion del sensor de humedad calibrado con NaCl el cual se ajusta a las mediciones del calibrador, comenzando en 30.3% y llegando al 75.3% de humedad con una R^2 de 0.9998. En la Figura 2.12 semuestra la calibracion del sensor utilizando LiCl la cual llegó a 11.9% de humedad relativa, el cual se ajustó al calibrador utilizado con una R^2 de 0.9995 . El sensor de humedad se ajustó al calibrador empleado con un error del $\pm 0.03\%$ como las reportadas para soluciones sal-agua por Rios (2016), Boix (2014), Meza Barcena (2015) y Linares *et al.*, (2017).

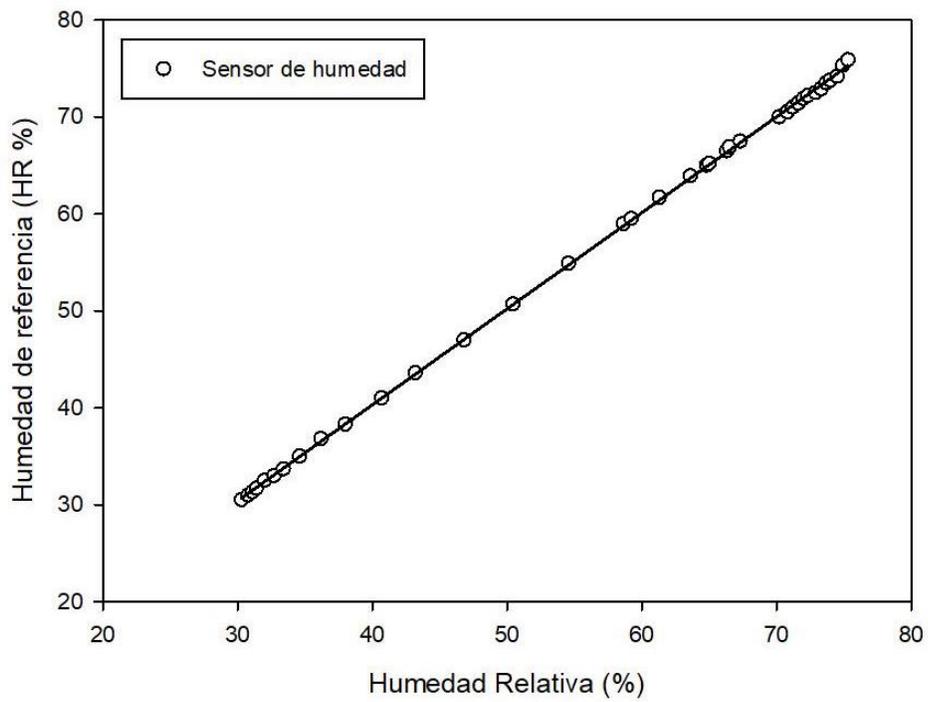


Figura 2.11 Calibración de humedad en NaCl

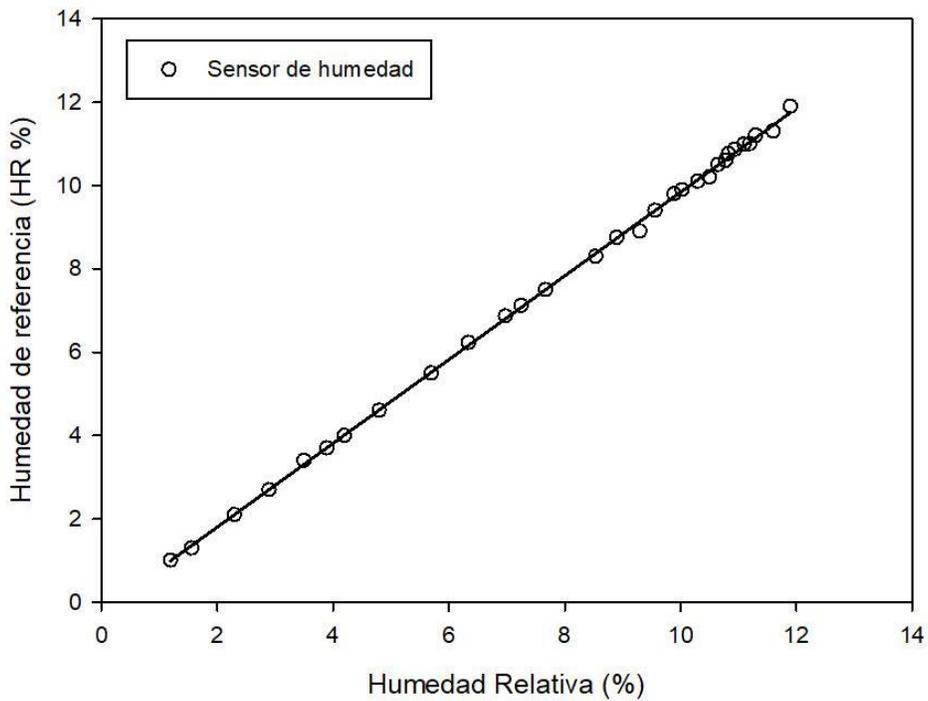


Figura 2.12 Calibración de humedad con LiCl

2.2.2 Esterilización del equipo

Las charolas, soportes del bioreactor y vaso humidificador fueron esterilizados en una cámara de rayos UV por 3 h. En tanto que, sensores fueron sanitizados con una toalla humedecida en alcohol etílico desnaturalizado, así como el resto del equipo.

2.3 Activación, inoculación e incubación de cepas

2.3.1 Activación de cepa

Las cepas de *Lentinula edodes* (IE105) y *Ganoderma curtisii* (IE811) proceden del Cepario de hongos del INECOL (Figura 2.13). Ambas cepas se conservaron en cajas petri con medio PDA (marca Bioxon). Este medio de cultivo se preparó 36 g de agar/1000 ml de agua destilada a 40°C, se disolvió el agar y, después se esterilizó a 121°C por 20 min. Una vez enfriado a la temperatura ambiental del laboratorio (~25°C), se colocaron 20 ml. De medio en cajas petri. Posteriormente, se inocula con 1 cm² de la cepa, manteniéndose en incubación a 25°C, en una estufa.

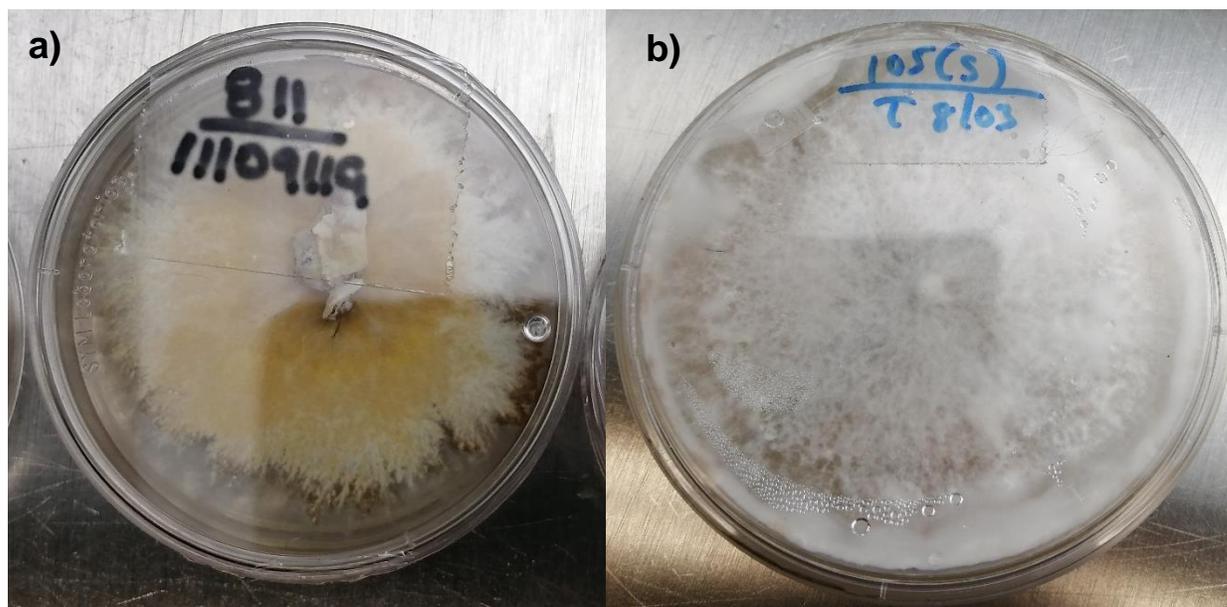


Figura 2.13 Activación de cepas a) *Ganoderma curtisii* b) *Lentinula edodes*

2.3.2 Fermentación en medio líquido para la inoculación en bioreactor o cámaras de incubación

En la cuantificación del crecimiento y producción de micelio, tanto de *Lentinula edodes* como *Ganoderma curtisii*, se preparó medio líquido MDA (Bioxon). El medio se preparó con 20 g de extracto de malta y 2 g de dextrosa, disueltos en 1 L de agua destilada. Se depositaron 50 ml del medio en frascos de cristal (6 x 6.5 cm), esterilizados en autoclave a 15 lb por 20 min, destinando 500 ml por especie (10 frascos para cada tipo de hongo). Una vez que el medio disminuyó temperatura 25°C, se inocularon con 3 cm² tanto de *Lentinula edodes* como *Ganoderma curtisii* sobre los medios. Los frascos se taparon con papel filtro esterilizado para evitar contaminaciones en el tiempo de incubación. Se colocaron 5 frascos inoculados de cada hongo en las charolas del bioreactor. Se alimentó el bioreactor con un flujo de aire intermitente a 0.3 vvm para favorecer la homogeneización del aire en el ambiente, en tanto que, en otros 5 frascos se depositan en cámaras de incubación en el INECOL. Estos permanecen en un ambiente estéril y sin agitación. En ambos casos las muestras se incubaron a ± 26 °C y $\pm 50\%$ de humedad.

2.3.2.1 Determinación biomasa

La biomasa se cuantificó a los 7 y 14 días de incubación, bajo la norma NMX-1978 para la determinación de cenizas en alimentos, filtrando el medio líquido a través de una membrana (papel filtro Whatman no. 1) previamente pesada. El papel junto con el micelio del hongo, se secó a 40°C por 8 h en una estufa. El porcentaje de biomasa se obtuvo con la siguiente formula:

$$\% \text{ biomasa} = \frac{((P - p) \times 100)}{M} \quad (2.1)$$

Donde: P es masa de papel filtro con micelio del hongo en (g), p es masa de papel filtro vacío en (g) y M es masa del micelio del hongo en (g).

2.3.3 Inoculación en medio sólido en bioreactor o cámaras de incubación

2.3.3.1 Caracterización del sustrato

La semilla empleada para la preparación del inóculo de ambos hongos fue sorgo (*Sorghum vulgare*). El tratamiento de la semilla consistió inicialmente en una separación de los granos enteros, con su posterior lavado en agua fría y posterior remojo durante 12 h. Al día siguiente el grano fue sumergido durante 5 min en agua caliente a 85°C, con la finalidad de reblandecer la semilla. Posteriormente, se eliminó el exceso de agua, tratando de alcanzar el 30% humedad. Una vez enfriada la semilla a temperatura ambiente (~25°C), se colocaron 30 g de semilla en frascos de cristal de 6 x 6.5 cm, se sellaron y esterilizaron en autoclave a 121°C por 90 min.

Los granos de sorgo esterilizados fueron inoculados con una porción de micelio de cada una de las cepas, *L. edodes* y *G. curtisii*. Crecidas previamente en medio de cultivo PDA. Las muestras inoculadas se mantuvieron en incubación a 25°C en la oscuridad, hasta que los micelios cubrieron completamente los granos. Esta etapa del proceso se denomina inóculo primario.

2.3.3.2 Inoculación del hongo en medio sólido

Para el desarrollo de esta parte de la metodología se preparó semilla de sorgo de manera similar al descrito en la sección anterior. Los granos fueron colocados para su esterilización en 20 frascos de vidrio con boca ancha. Estos frascos fueron sembrados con 5 g de inóculo primario de cada cepa (10 por cada especie de hongo) previamente preparadas. La mitad de frascos inoculados de cada hongo fueron colocados en las charolas del bioreactor para su incubación, en tanto que, la otra mitad se dejó en cámaras de incubación. Todos los frascos se incubaron por 21 días, con control de la temperatura (25-28°C) y humedad (55-70%). El bioreactor se mantuvo recubierto con una funda negra de polietileno, mientras que las muestras colocadas en las cámaras de incubación se mantuvieron en oscuridad. A las muestras incubadas en el bioreactor se inyectó aire (0.3 vvm) humidificado y estéril a través del tren de filtrado pasando previamente por un vaso humidificador con agua destilada. Debido a la fotosensibilidad

de los inóculos, se mantuvo una exposición mínima a la luz, con la finalidad de favorecer la propagación de los micelios.

2.3.4 Cuantificación indirecta de la biomasa mediante la medición de la actividad enzimática de las lacasas

Debido a que el micelio forma junto con las semillas del sorgo una matriz compacta, difícil de separar, la cuantificación de la biomasa se debe realizar utilizando un método indirecto, en este caso se optó por cuantificar la actividad de la enzima lacasa, una de las enzimas ligninolíticas presente en las etapas tempranas de colonización del sustrato. Para ello, se debe obtener inicialmente un extracto crudo del inóculo. La actividad enzimática de las lacasas en el inóculo se midió empleando la técnica de Leonowicz y Grzywnowicz (1981), modificada por Velázquez *et al.* (2002), la cual consiste en colocar en una celda de prolipropileno 1 ml de extracto, 2 ml de solución buffer (fosfato-citrato 0.1 M, pH 5), 0.05 ml de siringaldazina (0.45 μM), la lectura de absorbancia se realizó a 540 nm por 2 min. Los resultados fueron expresados en unidades de actividad enzimática (UAE), cantidad μM de siringaldazina oxidados por el micelio en 1 g de sustrato por minuto ($\mu\text{M}/\text{g min}$) calculados con la ec. 2.2.

$$UAE = \frac{DO}{CAM} VTC \frac{10}{VEEU} \quad (2.2)$$

Donde: UAE es la cantidad de μmol de siringaldazina oxidados por el micelio contenido en 1 gramo de sustrato seco por minuto ($\mu\text{M}/\text{g min}$), DO es la absorbancia de la muestra, CAM es el coeficiente de absorción molar de siringaldazina ($0.065 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$), VTC es el volumen total contenido en la cubeta y VEEU es el volumen de extracto enzimático utilizado.

Las mediciones de la actividad enzimática se realizaron para ambos inóculos crecidos en medio líquido a los 7 días de incubación y los inoculados en medio sólido a los 3 y 5 días.

2.4 Fermentación en medio sólido en bioreactor para frutificación del hongo

2.4.1 Caracterización del sustrato en la fermentación en medio sólido

El sustrato utilizado en la fermentación en medio sólido de *Lentinula edodes* con composición 34% paja, 34% bagazo de caña, 1% peat moss, 20% encino, 10% salvado de trigo y 1% de cal (base pedo húmedo). En tanto que, el sustrato usados para *Ganoderma curtisii* contenían 90% bagazo de caña y 10% de viruta de encino (*Quercus spp*). Todos los sustratos fueron proporcionados por el INECOL. La paja se tamizó para seleccionar un tamaño de partícula en (6 ± 1 cm), después son hidratados por 24 h, y elimina el exceso de humedad. Estos sustratos se colocaron en bolsas de polipropileno de 7 x 15 cm, con una masa de 100 g de sustrato donde cada bolsa fue sellada y esterilizada a 121°C por 90 min.

2.4.2 Determinación de las condiciones para la fermentación en medio sólido

Las bolsas de polietileno con sustrato a 25°C fueron inoculadas en una relación 1:15, estas bolsas se comprimieron manualmente para retirar el exceso de aire. La mitad de las muestras sembradas se introdujeron en el bioreactor aplicando una inyección de aire de 0.5 vvm; el resto de las muestras (5 por cada hongo) se llevaron a cuartos de incubación con condiciones controladas de temperatura y oscuridad adecuadas para cada tipo de hongo.

2.4.3 Condiciones para la fermentación en medio sólido para *Lentinula edodes*

Lentinula edodes fermentó durante 3 meses, a temperatura ~ 25°C y humedad ~ 70%, observando primordios, esto es, primeras masas algodonosas color café en la semana 12. En la semana 16, llegaron a ser hongos adultos y fueron cortados del pie del hongo con un bisturí estéril. Los hongos fueron pesados y medidos para obtener los rendimientos. En la Figura 2.14 se muestran las bolsas con sustrato e inoculadas con *Lentinula edodes*.



Figura 2.14 Bolsas para fermentación de *Lentinula edodes*

2.4.4 Determinación de la fermentación para *Ganoderma curtisii*

La fermentación de *G. curtisii* comprende 6 semanas se mantuvieron en un ambiente de 25°C y 70% de humedad. Los primordios de *Ganoderma curtisii* aparecieron a la semana 3, estos fueron de color café caoba con un margen amarillos, después de 20 días llegaron a ser adultos. Se cortaron del pie del hongo con un bisturi estéril, se midió el sombrero del hongo y su estípite, se dejó fermentar 2 cosechas más para obtener los rendimientos finales. En la Figura 2.15 se muestra las bolsas con sustato e inóculo, para la fermentación en sólido de *Ganoderma curtisii*.

2.4.5 Eficiencia biológica

En la evaluación biológica de los hongos se midió el tamaño del píleo desarrollados en estado maduro, así como la eficiencia biológica, que es la medida aproximada de la producción, y capacidad de los hongos de convertir un sustrato en cuerpos fructíferos, expresado en porcentaje. En este estudio se calculó de la siguiente manera:

$$EB = \frac{\text{Peso hongo fresco}}{\text{peso seco del sustrato}} \times 100 \quad (2.3)$$



Figura 2.15 Bolsas para fermentación de *Ganoderma curtisii*

2.4.6 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

El FTIR es la principal herramienta para determinar la estructura de especies orgánicas y bioquímicas, debido a que determina de manera cualitativa especies moleculares de todo tipo. La mayoría de los compuestos orgánicos presentan numerosas bandas de absorción en toda la región del infrarrojo, por lo cual la muestra sólida se debe pulverizar hasta que el tamaño de sus partículas sea menor que la longitud de onda de la radiación para evitar los efectos de dispersión de la radiación.

Se analizaron los dos tipos de hongos cultivados dentro del bioreactor *Ganoderma curtisii* y *Lentinula edodes* y se compararon con los hongos crecidos en el Instituto de Ecología de forma tradicional, realizando duplicados de las lecturas. Las muestras se pulverizaron en un mortero de porcelana y, fueron montadas en una porta muestra para ser observadas.

Para el análisis de la muestra se limpió el cristal de Diamante del ATR (Attenuated Total Reflection) de un espectrofotómetro IR (Thermo Scientific Nicolet iS 5), se colocó una muestra del hongo de 1mm en el cristal y se observó el espectro con el software del equipo. Las muestras se analizaron con un rango de frecuencia 4000 a 400 cm^{-1} con 60 barridos por espectro.

CAPÍTULO 3
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Instrumentación del bioreactor para desarrollo del micelio y crecimiento de macromicetos

La instrumentación del bioreactor de columna-charola, comprendió las siguientes adecuaciones: se implementó una tarjeta ARDUINO que facilita la adquisición de datos en tiempo real (humedad y temperatura) y la comunicación de los sensores con el computador. En la Figura 3.1 se muestra el diagrama de instrumentación realizada al bioreactor para el cultivo de *Lentinula edodes* y *Ganoderma curtisii*.

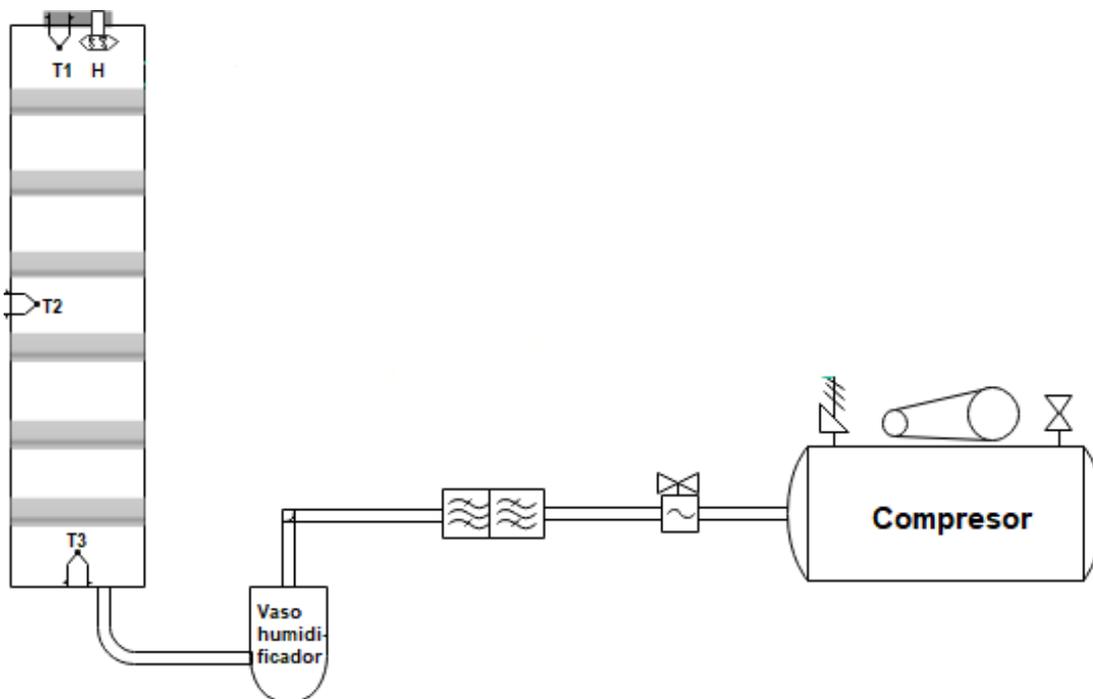


Figura 3.1 Diagrama de instrumentación de bioreactor columna-charola

Esta instrumentación del biorreactor comprende sensores que permiten monitorear las variables (tiempo de flujo de aire, humedad), para el crecimiento de los hongos medicinales.

El reactor columna-charolas fue implementado con 3 termopares tipo K colocados en tres posiciones diferentes a lo largo de la columna (en la parte superior, media y base de la columna), además del sensor humedad-temperatura colocado en la parte superior del bioreactor. La calibración de los termopares y sensor de humedad fueron reportados en el Capítulo II, sección 2.2.1. Con una confiabilidad $\pm 0.05\%$ en los termopares (calibrador fluke 724) y, el sensor de humedad se ajustó al calibrador Fluke empleado, con un error del $\pm 0.03\%$.

3.2 Valoración de las condiciones de esterilización en el Bioreactor de columna

Para las diferentes etapas del desarrollo experimental fue necesario establecer un protocolo de trabajo que permitiera asegurar condiciones de inocuidad para conservar a las cepas de los hongos libres de microorganismos invasores. Esto consistió en que todos los accesorios del bioreactor fueran esterilizados y el bioreactor fue montado en una zona aseptica, después de lo cual se añadió una masa promedio de 1000 g en 5 charolas de inóculo de hongo, colocando aprox. 250 g por charola, conservando la esterilidad mediante el paso de aire pasando por un vaso y un tren de filtrado de 0.5, 0.3 y 0.01 μm que es alimentado a través de un compresor de aire de 48 L. Se monitoreó temperatura y humedad del bioreactor, estos datos fueron almacenados en una memoria SD. A los hongos medicinales (crecimiento micelial y fructificaciones) desarrollados en el bioreactor fueron suministrados con el mínimo de aire (0.3 vvm) debido a que *Lentinula edodes* y *Ganoderma curtisii* son del tipo anaerobio y la función del aire humidificado era humedecer el ambiente de crecimiento, sin afectar a los macromicetos, estas condiciones se adecuaron para el crecimiento de los hongos a humedad de $\pm 70\%$ y 25°C , siendo el aire el mecanismo de transporte para conservar la tasa de humedad idónea al hongo.

En la Figura 3.2 se muestran las tres etapas desarrolladas en el bioreactor columna-charolas (desarrollo de inóculo por fermentación en medio líquido y en medio sólido, y la fructificación del hongo por fermentación en medio sólido), las cuales no presentaron ningún tipo de contaminación por microorganismos invasivos.

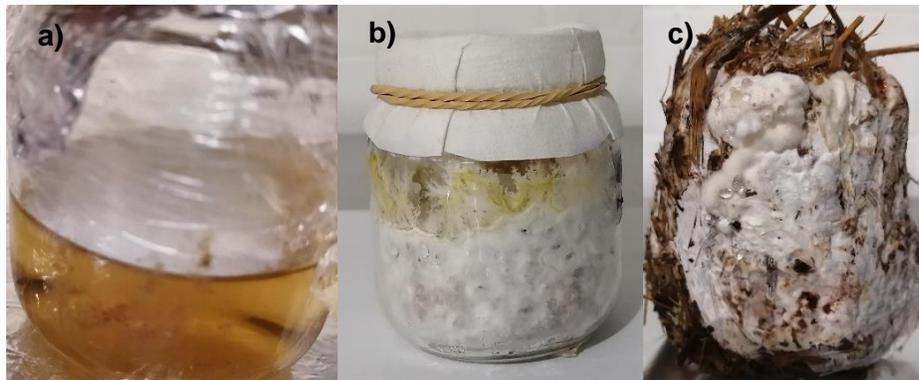


Figura 3.2 Etapas de desarrollo de *Lentinula edodes* a) micelio en medio líquido, b) medio sólido, c) fructificación en bioreactor columna-charola

3.3 Resultados de la inoculación mediante fermentación en medio líquido

Este apartado muestra las comparaciones del desarrollo de micelio en medio líquido para *Ganoderma curtisii* y *Lentinula edodes* cultivados en bioreactor columna-charolas y en cámaras de incubación.

3.3.1 Resultados del crecimiento de micelio de *Ganoderma curtisii* en bioreactor y cámara de incubación

En el crecimiento de biomasa en medio líquido MDA se observó un mayor desarrollo en bioreactor, esto debido a que *Ganoderma curtisii* se benefició con la inyección de aire como agitación. Las muestras de *Ganoderma curtisii* mantenidas en cámara de incubación presentaron un 42% menos de crecimiento que en el bioreactor. En la Figura 3.3 se muestra la evolución de *Ganoderma curtisii* crecido en bioreactor en comparación con la cámara de incubación. Se observó un crecimiento micelial del 15.6% dentro del bioreactor columna-charolas, que es mayor a las reportadas por Salmon *et al.* (2016) para *Ganoderma sp.* crecido en malta dextrosa, que alcanzaron 15.1% de biomasa crecida a los 14 días de incubación utilizando un bioreactor Dreschek bottles a 2 vvm. Por otra parte Wagner *et al.* (2013) reportó un crecimiento micelial del 15.8% utilizando muestras de 50 ml de MDA a 100 rpm durante 14 días de incubación; mientras que, Ospina *et al.* (2014) reportaron el crecimiento de *Ganoderma* en un bioreactor Bioflo 110 Reactor New Brunswick obteniendo 12% de biomasa aplicando 5 vvm a 26 °C por 14 días de incubación.

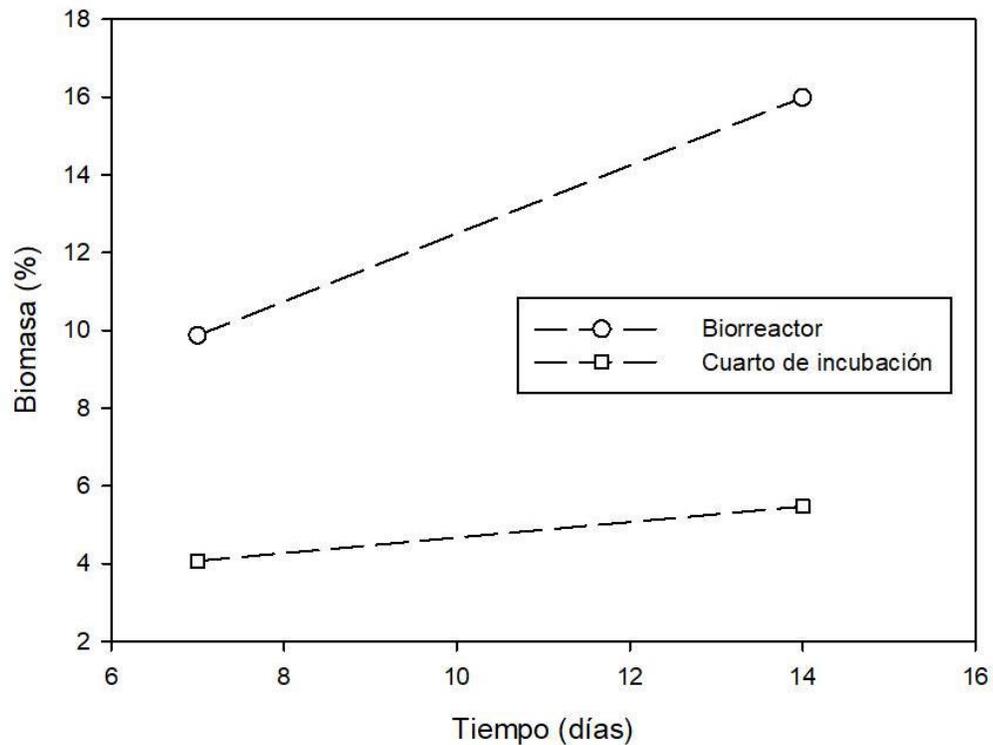


Figura 3.3 Evolución del micelio en fermentación líquida de *Ganoderma curtisii*

3.3.2 Resultados del crecimiento de micelio de *Lentinula edodes* en bioreactor y cámara de incubación

En cuanto a la producción biomasa desarrollada de *Lentinula edodes* se incubó por 14 días en medio líquido MDA. La producción de biomasa cuantificada en los cultivos de la cepa de *Lentinula edodes* a los 7 días de incubación, no se observó variación significativa del crecimiento entre el inóculo incubado en cámara como el bioreactor. Las diferencias fueron significativas de un 13% más de producción de biomasa en las muestras cultivadas en el bioreactor de *Lentinula edodes* a los 14 días de incubación. Las diferencias del crecimiento de biomasa para *Lentinula edodes* para ambos métodos de incubación se muestran en la Figura 3.4. Los resultados indican que la inyección de aire en bioreactor actuó como un modo de agitación, lo cual favoreció una mayor producción de biomasa en cultivo en medio líquido, sin embargo se obtuvieron resultados menores (5.5% de biomasa) que en trabajos previos como Umeo *et al.* (2015) que creció *Lentinula edodes* en MDA en un bioreactor airlift, logrando una

producción de biomasa del 25.9% en 14 días de incubación con 100 rpm, mientras que, Hermann *et al.* (2013) reportaron un crecimiento micelial de biomasa de 8% en 15 días de incubación y Enman *et al.* (2008) crecieron micelio de *Lentinula edodes* en un bioreactor BR 12, Belach Bioteknik AB, con 50 rpp a 25°C por 14 días de incubación, reportando una producción de biomasa obtenida de 9%.

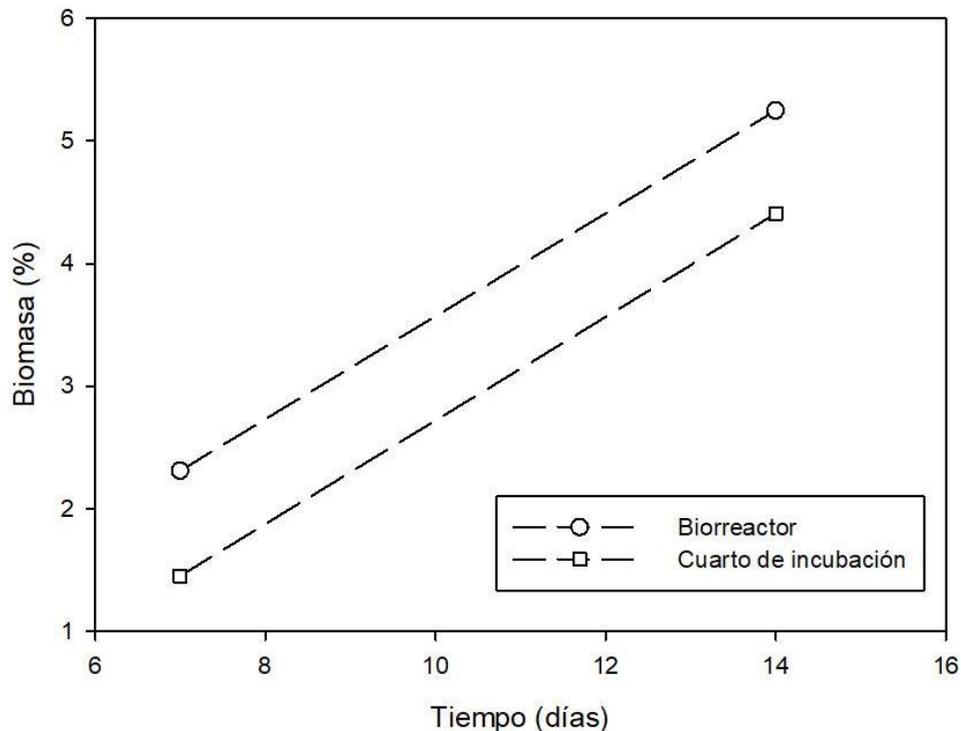


Figura 3.4 Evolución del micelio en fermentación líquida de *Lentinula edodes*

3.3.3 Resultados de la actividad enzimática en *Ganoderma curtisii* y *Lentinula edodes*

Se detectó actividad enzimática de lacasas para el inóculo de *Ganoderma curtisii* y *Lentinula edodes* desarrollado en el bioreactor y en cámaras de incubación, a los 7 días de incubación, obteniendo como resultado que en *Ganoderma curtisii* se obtuvo mayor actividad de lacasas (61.1564 $\mu\text{M/g min}$) (UAE) en el inóculo crecido dentro del bioreactor con una diferencia del 10% con el inóculo crecido en cámara de incubación, al igual que *Lentinula edodes* obtuvo resultados significativos para el inóculo crecido

en el bioreactor (35.778 $\mu\text{M/g min}$ de UAE) con una diferencia del 20% en comparación con el inóculo desarrollado en cámara de incubación. En la Tabla 3.1 se observa la comparación de actividad enzimática del inóculo crecido en bioreactor contra el crecido en cámara de incubación y la desviación estándar de los resultados obtenidos.

Tabla 3.1 Resultados de la actividad enzimática por lacasas

Se obtuvo mayor actividad enzimática por lacasas en *Ganoderma curtisii* en el bioreactor de columna-charolas que las reportadas por Arboleda y Mejia (2010) quienes citan que las mejores condiciones de actividad enzimática (UAE de 15 $\mu\text{M/g min}$) se detectaron a los 7 días de incubación del hongo *Ganoderma spp*, empleando como sustrato para la cuantificación de la enzima al ácido 2.2'-azanobis-3-etil-benzotiazonila-6-sulfónico (ABTS), mientras que Ding *et al.* (2012) reportaron para *G. Lucidum* en MDA una actividad enzimática de 10 $\mu\text{M/g min}$ a los 7 días de incubación. En *Lentinula edodes* se cuantificó mayor actividad enzimática en el bioreactor que las reportadas por Montoya *et al.* (2014), con una actividad enzimática de 9.489 $\mu\text{M/g min}$, detectada con ABTS.

3.4 Resultados de la inoculación mediante fermentación en medio sólido a nivel de bioreactor y de cámaras de incubación

En este apartado se muestran los resultados obtenidos en el desarrollo de micelio en medio sólido, en dos condiciones: a partir de cepa y a partir de inóculo primario, para ambos tipos de hongos (*Ganoderma curtisii* y *Lentinula edodes*). Este inóculo se incubó en biorreactor columna-charola y en cámaras de incubación.

3.4.1 Resultados del crecimiento de micelio de *Ganoderma curtisii* en medio sólido

El inóculo desarrollado en medio sólido utilizando sorgo como sustrato e inoculado con cepa de *Ganoderma curtisii*, se incubó por 21 días, en la Figura 3.5 se muestra la comparación de la apariencia física del inóculo crecido en bioreactor (a) y cámara de incubación (b), observándose la formación de primordios (masas algodonosas color café), *Ganoderma curtisii* incubado en bioreactor presentó un mayor desarrollo micelial dentro del bioreactor en comparación con el método tradicional. Es decir, se observó que la cepa de *Ganoderma curtisii* se benefició de la inyección de aire aplicada dentro del bioreactor.

En la incubación de *Ganoderma curtisii* a partir de inóculo primario (grano) favoreció una invasión más rápida del micelio sobre los granos, ya que el cubrimiento de micelio se dió en menor tiempo (14 días), en comparación con la inoculación a partir de cepa en medio de cultivo (21 días). Esto se debe a que en la inoculación a partir de grano se tienen más puntos de dispersión, lo que facilita la invasión más rápidamente del micelio. En la Figura 3.6 se muestra la comparación de los frascos incubados en bioreactor con inyección de aire en comparación con las muestras mantenidas en la cámara de incubación, en ambos métodos observa formación de primordios a los 21 días de incubación. *Ganoderma curtisii* incubado en bioreactor presentó una mayor colonización de la semilla en forma algonodosa blanca y maduración en las masas algonodosas de color amarillo.

Figura 3.5 a) Inóculo de cepa de *Ganoderma curtisii* crecida en bioreactor, b) cámara de incubación

Figura 3.6 *Ganoderma curtisii* a partir de inóculo primario a) incubado en bioreactor b) cámara de incubación

3.4.2 Resultados del crecimiento de micelio de *Lentinula edodes* en medio sólido

Lentinula edodes inoculado a partir de la cepa creciendo en medio de cultivo, creció de manera parecida en ambos métodos de incubación, sin embargo, se presentó mayor invasión de micelio algodonoso de color blanco en las muestras cultivadas en bioreactor, aunque en ninguno de los dos tipos de incubación se observó la formación de primordios. En la Figura 3.7 b) se muestra a *Lentinula edodes* crecido en cuarto de incubación, observando a los 21 días de incubación que no logró invadir por completo el sustrato (semilla de sorgo representado por las manchas café-oscuras de la figura), en comparación con el crecido dentro del bioreactor, el cuál logro invadir la mayoría de la semilla (Figura 3.7 a)).

Figura 3.7 *Lentinula edodes* inoculado con cepa a) Incubado en bioreactor, b) Cámara de incubación

En el caso de *Lentinula edodes* inoculado a partir de inóculo primario (grano), el crecimiento micelial se observó de manera similar para ambos métodos de incubación, el micelio no logró invadir por completo el sustrato a los 21 días de incubación, sin

embargo, *Lentinula edodes* incubado en el bioreactor comenzó a formar masas algodonosas agrandadas de color café pardo e irregulares indicando el inicio de la formación de primordios del hongo. En la Figura 3.8 se muestra la comparación de ambos métodos de incubación para *Lentinula edodes* a partir de inóculo primario.

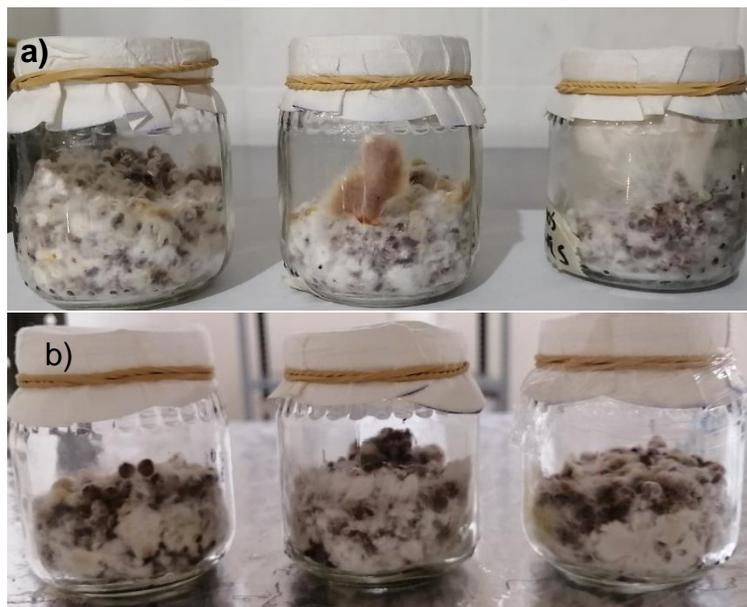


Figura 3.8 *Lentinula edodes* a partir de inóculo primario a) Incubado en bioreactor, b) Cámara de incubación

3.4.3 Resultados de la actividad enzimática en medio sólido

La lacasa es una enzima oxido-reductasa, la cual, contiene cobre y está implicada en la degradación de lignina contenida en el sustrato mediante reacciones de óxido-reducción. Los hongos comestibles degradan la lignina mediante la acción de diferentes enzimas, siendo las estudiadas las lacasas (Velázquez *et al.*, 2002). En la Figura 3.9 se muestra la actividad enzimática producida por el hongo versus el tiempo en que éstas se midieron (3 y 5 días de incubación). En los cultivos de *Ganoderma curtisii* se obtuvo mayor producción de lacasa para el micelio que permaneció en cámaras de incubación, tanto para el inoculado con cepa como el elaborado a partir del inóculo primario (25 $\mu\text{M/g min}$ y 35 $\mu\text{M/g min}$ respectivamente), se observó que el hongo inoculado con cepa e incubado en el bioreactor tuvo 50% menos de producción de lacasas que *Ganoderma curtisii* inoculado con cepa e incubado de manera

tradicional. *Ganoderma curtisii* inoculado con inóculo primario (IP) a los 3 días de incubación dentro del bioreactor registró una actividad enzimática de lacasas con 40% más en comparación a las cámaras de incubación, sin embargo, a los 5 días de incubación, *Ganoderma curtisii* inoculado por IP crecido en cámara de incubación obtuvo 50% más producción de lacasas. *Gganoderma curtisii* desarrollado en bioreactor presentó mayor actividad enzimática que las reportadas por Murugesan *et al.* (2007) para *Ganoderma lucidum* inoculado en semilla de sorgo a 7 días de incubación con una actividad enzimática de 12 $\mu\text{M/g min}$.

Figura 3.9 Producción de lacasas cuantificada en cultivos de *Ganoderma curtisii*

La producción de lacasas en *Lentinula edodes* para los dos tipos de inoculación (cepa e inóculo primario) en incubación en el bioreactor y cámara de incubación se muestra en la Figura 3.10 donde la mayor producción de lacasas se observan en el hongo que creció en las cámaras de incubación (35 $\mu\text{M/g min}$) con un 35% más de producción de lacasas que las obtenidas en el hongo incubado en el bioreactor (20 $\mu\text{M/g min}$), Lateef y Adeeyo, (2015) reportaron actividad enzimática por el método de Leonowicz

y Grzywnowicz, (1981) obteniendo para *Lentinula edodes* 10.6 $\mu\text{M/g min}$ de actividad enzimática a 7 días de incubación, obteniendo mayor actividad enzimática de *Lentinula edodes* dentro de cámara de incubación y en las condiciones del bioreactor.

Figura 3.10 Producción de lacasas cuantificada en cultivos de *Lentinula edodes*

3.5 Fermentación en medio sólido en bioreactor de columna-charola

La fermentación en medio sólido para fructificación de los hongos medicinales se realizó en el bioreactor columna-charola, fermentando por 3 meses a *Lentinula edodes* y 6 semanas a *Ganoderma curtisii*. Debido a que el bioreactor es a escala semi-piloto, la morfología de los macromicetos cultivados se observó afectada, esto debido a que no contaron con el espacio adecuado para su desarrollo. *Ganoderma curtisii* se desarrolló de manera alargada y delgada, mientras que *Lentinula edodes* sólo desarrolló primordios (masa algodonosa), los macromicetos se muestran en la Figura 3.11. Sin embargo, se obtuvieron resultados significativos en cuanto a EB y compuestos bioactivos.

Figura 3.11 Fructificación de a) *Ganoderma curtisii* y, b) *Lentinula edodes*

3.5.1 Eficiencia biológica

Para conocer el rendimiento del sustrato en función de las cepas utilizadas, se evaluó la Eficiencia Biológica (EB). En la Tabla 3.2 se muestra el porcentaje de EB de la fermentación en medio sólido en el bioreactor de columna-charola para cada tipo de hongo. Para *Lentinula edodes* la cosecha obtenida fue del 80% de la producción total correspondiente a la primera cosecha. Para *Ganoderma curtisii* la primera cosecha fue del 95%, por lo cual no se obtuvo una segunda cosecha de las fructificaciones. El uso de sustratos selectivos favorece una alta eficiencia biológica, por lo cual con las combinaciones específicas para cada tipo de hongo se obtuvieron resultados favorables para la primera cosecha.

Tabla 3.2 Evaluación de la eficiencia biológica

	EB (%)	Desviación estándar
<i>Ganoderma curtisii</i>	16.7	4.58
<i>Lentinula edodes</i>	47.14	7.49

Otros autores reportan EB para *Ganoderma* usando diferentes sustratos como Cilerdzic *et al.* (2018) quienes usaron como sustrato paja de trigo y alcanzaron una EB

del 13%, que es menor que las reportadas en este trabajo. En el caso de *Lentinula edodes* algunos autores reportan diferentes sustratos alcanzando EB menor o igual que la reportada en este trabajo (47.16%), entre ellos Hermann *et al.* (2013) utilizaron aserrín de eucalipto como sustrato, 95% de aserrín y 5% de harina de soja, y 75% de aserrín, 5% de harina de soja, 10% bagazo de yuca y 10 % de paja de maíz obteniendo una EB del 4.77, 47.03 y 44.29% respectivamente.

3.5.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

En la Figura 3.12 se muestra el espectro FTIR de *Ganoderma curtisii* crecido dentro del bioreactor (B) y el desarrollado de manera tradicional en cámaras de incubación (CI) en el Instituto de ecología. Las muestras se realizaron con un intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} a 60 barridos y una resolución de 4 cm^{-1} .

Las fructificaciones de *Ganoderma curtisii* cosechadas en ambas condiciones de crecimiento presentaron los mismos picos de número de onda, el pico de 3300 cm^{-1} representa la vibración de grupos hidroxilo ($-\text{OH}$) los cuales intervienen en las características organolépticas del hongo como color y sabor, reportadas por Kim *et al.* (2011), Yao *et al.* (2017) y Gonzada *et al.* (2013) y Alzorqi *et al.* (2016) en la misma región. Se presenta vibración de tensión asimétrica del enlace en lípidos (CH_2 y CH_3), los cuales son grasas buenas presentes como omega-6, en el número de onda 2920 cm^{-1} como lo reportó Choong *et al.* (2011), Yao *et al.* (2017), Khan *et al.* (2015), Gonzada *et al.* (2013) y Alzorqi *et al.* (2016). El pico de 2358 cm^{-1} se atribuye a proteínas (NH), reportadas por Barraza *et al.* (2013), Huang *et al.* (2013) e Israilides *et al.* (2008). Los números de onda 1649 y 1539 cm^{-1} corresponden al tipo de vibración de tensión del enlace para amida I y II, moléculas de composición de las proteínas con aminoácidos muy similares a la proteína animal, estas regiones las reportan Choong *et al.* (2011), Yao *et al.* (2017) y Thetsrimuang *et al.* (2011).

El pico pequeño que corresponde al número de onda de 1379 cm^{-1} corresponde a lípidos (CH_3 simétrico) con tipo de vibración de flexión simétrica del enlace reportadas por Barraza *et al.* (2013), Gonzada *et al.* (2013) e Israilides *et al.* (2008). Un pequeño

pico a 1240 cm^{-1} corresponde a lignina (encargada de aportar el sabor leñoso al macromiceto) y ácidos orgánicos, los cuales impiden el desarrollo de bacterias en el hongo, descrito por Choong *et al.* (2011). El pico más grande corresponde al número de onda 1036 cm^{-1} que representa vibración al grupo hidroxilo (alcohol primario OH) reportadas por Gonzada *et al.* (2013) y Choong *et al.* (2011).

Figura 3.12 Espectro FTIR de *Ganoderma curtisii*

El pico denotado a 890 cm^{-1} hace referencia a las vibraciones de β -glucan el cual proporciona al hongo las propiedades inmunoestimuladoras, anticancerígenas, antiviral, antiinflamatorias, antioxidante, hipoglucémicas y analgésicas, tal como lo

describe Akram *et al.* (2012), Gonzada *et al.* (2013), Thetsrimuang *et al.* (2011) y Kim *et al.* (2011). El pico que abarca el número de onda entre 824-554 cm^{-1} se atribuye a la vibración de flexión de un anillo sacárido, presente en forma de quitina que se encuentra en la pared celular de hongo, descrito por Choong *et al.* (2011).

La Figura 3.13 muestra el espectro FTIR de *Lentinula edodes* crecido dentro del bioreactor (B) y el desarrollado de manera tradicional en cámaras de incubación (CI). Para ambas condiciones de crecimiento presentaron un comportamiento similar en los picos, presentando el mismo número de onda. El pico correspondiente a 3277 cm^{-1} representa la vibración flexible del enlace hidróxilo (OH), este grupo aporta el color oscuro al hongo, señalado por Yao *et al.* (2017), Khan *et al.* (2015), Gonzada *et al.* (2013) y Alzorqi *et al.* (2016). El pico mostrado en 2927 cm^{-1} por vibración con tensión asimétrica del enlace de lípidos (CH_2 Asimétrico), que son ácidos grasos insaturados (omega), los cuales actúan como reductores de triglicéridos y colesterol en humanos, reportado por Israilides *et al.* (2008), Yao *et al.* (2017), Khan *et al.* (2015), Gonzada *et al.* (2013) y Alzorqi *et al.* (2016).

El número de onda 2361 cm^{-1} corresponde al grupo de lípidos ($\text{C}=\text{O}$) reportadas por Barraza *et al.* (2013) y Kannan (2014). Los números de onda 1638 y 1543 cm^{-1} corresponden al tipo de vibración de tensión de enlace en proteínas (amida I y II) que aportan un alto valor nutricional a *L. edodes*, las reportan Barraza *et al.* (2013), Thetsrimuang *et al.* (2011), Yao *et al.* (2017), e Israilides *et al.* (2008). El número de 1389 corresponde al enlace nitro aromáticos (NO_2), son los encargados de aportar el olor leñoso al hongo, señalado por Choong *et al.* (2011). El pico a 1237 cm^{-1} corresponde a lignina (aporta proteína y sabor a *L. edodes*), y ácidos orgánicos estos evitan el ataque de bacterias al hongo, descrito por Choong *et al.* (2011).

La vibración por tensión del enlace CO corresponde a moléculas de lípidos en 1039 cm^{-1} reportada por Yao *et al.* (2017), Gonzada *et al.* (2013) y Philip (2009). El número de onda 870 cm^{-1} hace referencia a las vibraciones de β -glucano, el cual es un polisacárido con compuestos activos (regula el sistema inmune, actúa como

antibiotico, antiinflamatorio y anticancerigeno), tal lo describe Thetsrimuang *et al.* (2011), Akram *et al.* (2012), Kim *et al.* (2011) y Gonzada *et al.* (2013).

Figura 3.13 Espectro FTIR de *Lentinula edodes*

**CONCLUSIONES
Y
RECOMENDACIONES**

CONCLUSIONES

La fermentación en medio líquido para el crecimiento de micelio de *Lentinula edodes* y *Ganoderma curtisii* muestran diferencias significativas favorables a nivel bioreactor. Esto es, el micelio desarrollado de *Ganoderma curtisii* obtuvo un rendimiento o biomasa alcanzó un 16% contrario al 6% en cámaras de incubación. En tanto que, *Lentinula edodes* presenta 5.5% de biomasa en bioreactor contrario al 4.3% en cámaras de incubación, esta diferencia se puede atribuir al flujo de aire suministrado.

La actividad enzimática por lacasas obtenida a los 7 días de incubación presenta resultados significativos para *Ganoderma curtisii* con UAE de 61.1564 $\mu\text{M/g min}$ y, para *Lentinula edodes* una UAE de 35.778 $\mu\text{M/g min}$, ambos incubados en bioreactor. Esta actividad se favoreció con el flujo de aire que homogeniza el ambiente del bioreactor, permitiendo al medio de cultivo se desarrolle en condiciones de inocuidad.

El crecimiento de micelio en medio sólido incubado por 21 días mostró resultados favorables para *Ganoderma curtisii* a partir de cepa obteniendo un rendimiento del 20% más en bioreactor que en cámara de incubación, mientras que, *Ganoderma curtisii* a partir de inóculo primario obtuvo un 15% más de biomasa en bioreactor que en cámaras de incubación. En tanto que, el micelio desarrollado de *Lentinula edodes* a partir de cepa, obtuvo mejor desarrollo en el bioreactor, con un crecimiento de micelio del 23% más que cámaras de incubación, por otro lado, el micelio de *Lentinula edodes* a partir de inóculo primario se desarrolló de forma similar para ambos métodos de incubación, sin embargo, el incubado en bioreactor presentó primordios, esto quiere decir, que tuvo mayor madurez del micelio en los 21 días de incubación. En la producción de lacasas en medio sólido no se obtuvieron resultados favorables para el micelio desarrollado en el bioreactor, la mayor producción UAE se obtuvo a partir de inóculo primario desarrollado en cámara de incubación, para *Ganoderma curtisii* fue de 35 $\mu\text{M/g min}$ y, para *Lentinula edodes* fue de 36 $\mu\text{M/g min}$, lo que indica que estos

hongos desarrollados en bioreactor degradaron menos lignina, probablemente debido al flujo de aire deshidrato la semilla de sorgo.

La fermentación en medio sólido para la fructificación de *Ganoderma curtisii* y *Lentinula edodes*, fue limitada por el espacio del bioreactor, lo cual afectó la morfología de los hongos desarrollados, sin embargo, se obtuvieron resultados significativos de EB con 80% de producción total de *Lentinula edodes* y 95% para *Ganoderma curtisii*, estos altos rendimientos permitieron sólo tener una cosecha de los hongos.

El contenido de moléculas bioactivas cuantificadas en los hongos desarrollados a través del espectrofotómetro de la transformada de Fourier para las diferentes condiciones estudiadas fueron similares destacando la presencia de lípidos, proteínas y polisacáridos como β -glucanos, los cuales tienen beneficios a la salud, actuando como inmunomoduladores, anticancerígenos, cardioprotectores, hepatoprotectores y antimicrobianos.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar otros estudios cualitativos y cuantitativos (SEM, DSC, UV-visible, rayos X, RMN), a los macromicetos desarrollados en bioreactor para evaluar su actividad molecular, morfología, estructuras y, validar los compuestos bioquímicos propios de la especie, tanto en, inóculo como en los cuerpos fructificados.

Los resultados alcanzados, indican la factibilidad del uso del bioreactor y validan como medio para incrementar la capacidad de crecimiento y desarrollo de micelios de hongos macroscópicos de diferentes cepas, con la posibilidad de lograr fructificaciones en menor tiempo de incubación y consecuentemente, acortar el ciclo de cultivo de la cepa. Por lo que, en el uso del bioreactor se recomienda para trabajar con microorganismos de interés alimentario, medicinal o farmacéuticos.

El uso de aire inyectado dentro del bioreactor tuvo un efecto negativo sobre el contenido de humedad de las muestras cultivadas en los sustratos, por lo cual el crecimiento de fructificaciones fue lento y lo hacía propenso a contaminaciones (generalmente de mohos del género *Trichoderma*), por lo cual se recomienda para fermentación en medio sólido no aplicar flujo de aire dentro del bioreactor, sino sólo controlar las variables de temperatura y humedad.

Una propuesta interesante es el desarrollo de un bioreactor columna-charola a nivel planta piloto, partiendo del aporte de los trabajos desarrollados a nivel de bioreactor columna-charola (Hernández 2017, Cisneros 2020). De un tamaño aproximado de 2m x 100cm de hxd, en vidrio pyrex- acero inoxidable 304, para asegurar la inocuidad de los medios de cultivo. La automatización sería necesaria para garantizar una respuesta oportuna de control y, de compensación ante las variaciones del sistema o del entorno (temperatura, humedad y flujo de aire, en función de las condiciones del microorganismo y garantizar su funcionalidad).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akram, K., Ahn, J., y Kwon, J. 2012. Identification and characterization of Gamma-Irradiated Dried *Lentinus edodes* Using ERS, SEM, and FTIR Analyses. Food Chemistry , **77**(6), 690-696.
- Alzorqi, I., Sudheer, S., Lu, T., y Manickam, S. 2016. Ultrasonically extracted B-D-glucan from artificially cultivated mushroom, characteristic properties and antioxidant activity. Ultrasonics Sonochemistry, **35**, 531-540.
- Andrino, A., Morte, A., y Honrubia, M. 2011. Caracterización y cultivo de tres cepas de *Pleurotus eryngii* (Fries) Quélet sobre sustratos basados en residuos agroalimentarios. Anales de Biología, **33** 53-66.
- Arboleda-Echaverría, C., y Mejía-Gallón, A. (2010). Introduction of lacasa activity un *Ganoderma sp* and the antioicidant activity of its biomass. Revista Cubana de Farmacia, **44**(4), 519-532.
- Arenas, R., Romero-Arenas , O., Martinez-Guerrero , M., Damián Huato, M., Ramirez Valverde, B., y Lopez olguin, F. 2015. Producción del hongo Shiitake (*Lentinula edodes Pegler*) en bloques sintéticos utilizando residuos agroforestales. Revista mexicana de ciencias agrícolas, **6**(6), 1229-1238.
- Barraza-Garza, G., De la Rosa, L., Martinez-Martinez, A., Castillo-Michel, H., Cotte, M., y Alvarez-Parrilla, E. 2013. La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de fourier (FTRM) en el estudio de sistemas biológicos . Revista Latinoamericana de Química, **41**(3), 125-148.
- Bhosle, S., Ranadive, K., Bapat, G., Garad, S., Deshpande, G., y Vaidya, J. 2010. Taxonomy and Diversity of *Ganoderma* from the Westernparts of Maharashtra (India). Mycosphere, **1**(3), 249-262.
- Boix, J. 2014. Metodología y calibración de variables de control utilizadas en sistemas navales e industriales. Tesis en Maestría. Universidad Politécnica de Catalunya. España.
- Cano-Estrada, A., y Romero-Bautista, L. 2016. Economic, nutritional and medicinal value of edible wild mushrooms. Rev Chil Nutr, **43**(1), 75-80.

- Centro Nacional de Metrología. 2012. Guía técnica de trazabilidad metrológica e incertidumbre de medida en la calibración de higrómetros de humedad relativa. www.gob.mx/cenam (consultado en Abril, 2019)
- Choong, Y., Sun, S. Q., Zhpu, Q., Ismail, Z., Rashid, B., y Tao, J. X. 2011. Setermination of storage stability of the crude extracts of *Ganoderma lucidum* using FTIRand 2D-IR spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, **57**, 87-96.
- Cilerdzic, J., Vukojevic, J., Klaus, A., Ivanovic, Z., Blagojevic, J., y Stajic, M. 2018. Wheat Straw- Apromissin substrate for *Ganoderma lucidum* cultivation . *Acta. Sci. Pol. Hortorum Cultus*, **17**(1), 13-22.
- Ding, Z., Peng, L., Chen, Y., Zhang, L., Gu, Z., Shi, G., y Zhang, K. 2012. Production and characterization of thermostable lacasse from the mushroom, *Ganoderma lucidum*, using submerged fermentation. *African Journal of Microbiology Research* , **6**(6), 1147-1157.
- Economou, C., Diamantopoulou, P., y Philippoussis, A. 2017. Valorization of spent oyster mushroom subtrate and laccase recovery through successive solid state cultivation of *pleurotus*, *Ganoderma* and *Lentinula* strains. *Enviromental Biotechnology* **101**, 5213-5222.
- Enman, J., Hodge, D., Berglund, K., y Rova, U. 2008. Production of the bioactive compound eritadenine by submerged cultivation of Shiitake (*Lentinula edodes*) mycela. *J. Agric. Food Chem*, **56**, 2609-2612.
- Figlas, D., y Curvetto, N. 2015. Monografía sobre las propiedades medicinales del hongo Reishi (*Ganoderma lucidum*). *Revista de quimica farmaceutica*, **5**, 10-35.
- Gonzada, M., Menezes, T., Souza, J., Nágila, M., y Soares, S. 2013. Structural characterization of B glucans isolated from *Agaricus blazei* Murill using NMR and FTIR spesctroscopy. *Bioactive Carbohydrates and dietary fibre*, **2**, 152-156.
- González-Coneo, J., Nuñez-Pérez , B., y Viloría-Molinares, P. 2012. Sistema de monitoreo en tiempo real para la medición de temperatura . *Scientia Et Technia*, **17**(50), 128-131.
- Guerrero-Mata, A. 2014. Comparación cinética de la producción de xilanas por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A empleando biorreactores de plaza y de columna. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México.

- Guzmán, M., Santafé, G., Salcedo, M., Angulo, A., y Torres Ayaso, O. 2013. Estudio químico y actividades antioxidante y bactericida de *Ganoderma applanatum*. *Biotecnología en el sector Agropecuario y Agoindustrial*, **11**(1), 88-94.
- Guzmán, G., Mata, G., Salmones, D., Soto, C., y Guzmán, L. 2008. El cultivo de los hongos comestibles. Instituto Politécnico Nacional. Mexico, DF.
- Han, J., An, C., y Yuan, J. 2005. Solid-state fermentation of cornmeal with the basidiomycete *Ganoderma lucidum* for degrading starch and upgrading nutritional value. *Journal of Applied Microbiology*, **80**(1), 910-915.
- Hariharan, S., y Nambisan, P. 2013. Optimization of Lignin Peroxidase, Manganese Peroxidase, and Lac Production from *Ganoderma lucidum* Under Solid State Fermentation of pineapple Leaf. *Bioresources*, **8**(1), 250-271.
- Hermann, K., Costa, A., Helm, C., De lima, E., y Tavares, L. 2013. Expression of manganese peroxidase by *Lentinula edodes* and *Lentinula boryana* in solid state and submerged system fermentations. *Anais da Academia Brasileira de ciencias*, **85**(3), 965-973.
- Hernández-Avelino, E. A., 2016. Estudio de la fermentación en mediosólido con *Aspergillus niger* en un reactor tipo semi-piloto. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.
- Hinestroza-Cordoba, L., y Lopez Malo, A. 2009. Aspectos relacionados con la producción de *Lentinula edodes* (shiitake): una seta con alto potencial alimenticio y medicinal. *Ingeniería de alimentos*, **2**, 16-21.
- Huang, J., Liu, J., Chen, J., Xie, W., Kio, J., Lu, X., y Evrendilek, F. 2013. Combustion behaviors of spent mushroom substrate using TG-MS and TG-FTIR: thermal conversion, kinetic, thermodynamic and emission analyses. *Bioresource technology*, **266**, 389-397.
- Huerta-Aguilar, I., Molina-Torres, J., Garnica-Romo, M., & Yaguaca-Juárez, B. 2016. Total Polyphenols and Antioxidant Activity of *Ganoderma Curtisii* extracts. *Journal of medicinal Plants Studies*, **4**(4), 136-141.
- Israilides, C., Kletsas, D., Arapoglou, D., Philippoussis, A., Pratsinis, H., Ebringerova, y A., Harding, S. 2008. In vitro cytostatic and immunomodulatory properties of the medicinal mushroom *Lentinula edodes*. *Phytomedicine*, **15**, 512-519.

- Kannan, S. 2014. FT-IR and EDS analysis of the seaweeds *Sargassum wightii* (brown algae) and *Gracilaria corticata* (red algae). *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, **3**(4), 341-351.
- Khan , A., Gani, A., Shah, A., Masodi, F., Peerzada, R., Wani, I., y Khanday, A. 2015. Efect of γ -irradiation on structural, functional and antioxidant properties of B-glucan from button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **31**, 123-130.
- Kim, J., Mi-Lee, S., Bae, I., Park, H. G., Lee, H., y Lee, S. 2011. (1-3)(1-6)-B-Glucan-enriched materials from *Lentinus edodes* mushroom as a high-fibre and low-calorie flour substitute for baked foods. *SCI*, **91**, 1915-1919.
- Lateef, A., y Adeeyo, A. 2015. Green synthesis and antibacterial activities of silver nanoparticles using extracellular Laccase of *Lentinus edodes*. *Notulae Scientia Biologicae*, **7**(4), 405-411.
- Leonowicz, A., y Grzywnowicz, K. 1981. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. *Enzyme Microbiology, technology*, **3**, 55-58.
- Linares-Enriquez, A., Lopez-Sanchez, M., y Caballero-Torres, P. 2017. Diseño y control de un biorreactor tipo batch para la generación de biogas . *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*, **4**(13), 11-18.
- López-Gómez, O., Morales-Noriega, J., Ventura-Canseco, L., Gutierrez-Miceli, F., y Castañom-Gonzalez, J. 2012. Caracterización hidrodinámica de un biorreactor multifuncional . *Quehacer Científico*, 19-28.
- Lorenzo-Maiquez, M., Mesa-Mena, G., Díaz de los Ríos, M., y Saura-Laria, G. 2016. Automatización de plantas biotecnológicas para producción de derivados de la industria azucarera. *Instituto Cubano de Investigación de los Derivados de la Caña de Azúcar Cuba*, **50**(13), 13-26.
- Malarvizhi, K., Murugesan, K., y Kalaichelvan, P. 2013. Xylanase production by *Ganoderma lucidum* on liquid and solid state fermentation . *Indian Journal of Experimental Biology*, **41**, 620-626.
- Martins, S., Mussato, S., Martínez Avila, G., Montalez Saenz, J., Aguilar, C., y Teixeira, J. 2011. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. *Biotechnology Advances*, **29**(3), 305-373.

- Mendez-Carpio, L. 2017. Extracción de B-glucano de *Pleurotus pulmonarius* deshidratado para la formulación de harinas enriquecidas. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.
- Meza-Barcena, R. 2015. Implementación de una cámara isohigrométrica para la calibración de higrómetros analógicos y digitales. Tesis en Maestría. Universidad Nacional de Ingeniería. Perú.
- Montoya, S., Sánchez, O., y Levin, L. 2014. Evaluation of endoglucanase, exoglucanase, laccase, and lignin peroxidase activities on ten white-rot fungi. *Biotecnología en el sector Agropecuario y agroindustrial*, **12**(2), 115-124.
- Moreno, H., Martínez, A., y Fujimoto, Y. 2011. Aislamiento e identificación de dos esteroides y un triterpenoide del cuerpo fructífero de *Ganoderma lucidum* cultivado en Colombia. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, **18**(1), 11-15.
- Murugesan, K., Nam, I. H., Kim, Y. M., y Chang, Y. S. 2007. Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. *Enzyme and microbial technology*, **40**, 1662-1672.
- NMX-1978. Determinación de ceniza en alimentos. (NMX-F-066-s-1978). <http://www.cofepris.gob.mx> (Consultada Octubre, 2019)
- Ogata, K. 2010. Ingeniería de control moderna. Pearson. Madrid.
- Ospina-Álvarez, S., Ramírez-Cadavid, D., Escobar-Sierra, D., Ossa-Orozco, C., Rojas-Vahos, D., Zapata-Ocampo, P., y Atehortúa, L. 2014. Comparación de métodos de extracción de quitina de *Ganoderma lucidum* (Mushroom) obtenida en cultivo sumergido. *BioMed Research International*, **14**(2), 71-78.
- Padey, A., Soccol, C., y Larroche, C. 2008. Curren Developments in Solid-state Fermentation. Springer Science Business Media. India.
- Perdomo, O. 2007. Hongos comestibles de la República Dominicana. Ingráfica. República Dominicana.
- Philip, D. 2009. Biosynthesis of Au, Ag and Au-Ag nanoparticles using edible mushroom extract. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **73**, 371-381.

- Ramos, I. R. 2015. Propiedades nutricionales y saludables de los hongos. Centro Tecnológico del Champiñón de la Rioja. Rioja, España.
- Ríos-Ruíz, W., Valdez-Nuñez, A., y Jiménez-Flores, J. 2017. Aislamiento, propagación y crecimiento de hongos comestibles nativos en residuos agroindustriales. *Scientia Agropecuaria*, **8**(4), 327-335.
- Ríos-Suarez, E. 2016. Diseño e implementación de un sistema de control de humedad relativa y absoluta en un invernadero. Tesis de ingeniería. Universidad Distrital Francisco Jose de Caldas. Colombia.
- Ruiz-Leza, H., Rodríguez-Jasso, R., Rodríguez-Herrera, R., Contreras-Esquivel, J., y Aguilar, C. 2007. Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. *Revista mexicana de ingeniería química*, **6**(1), 33-40.
- Salmon, D., Cancio-Frendrich, R., Cruz, M., Weingartner-Montibeller, V., Porto-Souza, L., Soccol, C., y Rigon-Spier, M. (2016). Bioprocess for phytase production by *Ganoderma sp.* MR-56 in different types of bioreactors through submerged cultivation. *Biochemical Engineering Journal*, **114**, 288-297.
- Salmones, D., y Mata, G. 2012. Ceparios de hongos en Mexico. *Hongos comestibles y medicinales en iberoamérica*, 69-77.
- Silva, R., Fritz, C., Cubillos, J., y Díaz, M. 2010. Manual para la producción de hongos comestibles. CONAMA. Santiago.
- Singhania, R., Patel, A., Soccol, C., y Pandey, A. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, **44**(1), 13-18.
- Tang, Y., Zhang, W., y Zhong, J. 2009. Performance analyses of pH, shift and DOT-shift integrated fed-batch fermentation process for the production of ganoderic acid and *Ganoderma polysaccharides* by medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Bioresource Technology*, **100**(5), 1852-1859.
- Thetsrimuang, C., Khammuang, S., y Sarnthima, R. 2011. Antioxidant Activity of Crude Polysaccharides from Edible Fresh and Dry Mushroom Fruiting Bodies of *Lentinus sp.* Strain RJ-2. *International Journal of Pharmacology*, **7**(1), 58-65.
- Torres-López, A., Quintero-Díaz, J., y Atehortua-Garcés, L. 2011. Efecto de nutrientes sobre la producción de biomasa del hongo medicinal *Ganoderma Lucidum*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, **13**(1), 103-109.

- Umeo, S., Souza, G., Rapachi, P., Garcia, D., Paccola-Melrelles, L., Valle, J., y Linde, G. 2015. Screening of basidiomycetes in submerged cultivation based on antioxidant activity. *Genetics and molecular Research*, **14**(3), 9907-9914.
- Velázquez-Cedeño, M., Mata, G., y Savoie, J. 2002. Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **18**, 201-207.
- Vihidi, H., Shah Reza, M., y Kobarfard, F. 2017. Protein enrichment of olive cake substrate by solid fermentation of *Lentinus edodes*. *Trends in peptide and protein sciences*, **1**(4), 177-182.
- Wagner, R., Mitchell, D., Sasaki, G., Lopes de Almeida, M., y Berovic, M. 2013. Current Techniques for the Cultivation of *Ganoderma lucidum* for the production of Biomass, Ganoderic Acid and Polysaccharides. *Food technology and biotechnology*, **41**(4), 371-382.
- Yao, S., Li, T., Liu, H., Li, J., y Wang, Y. 2017. Traceability of Boletaceae Mushrooms Using Data Fusion of UV-Vis and FT-IR combined with Chemometrics Methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **98**(6), 155-167.

