

**EVALUACIÓN SENSORIAL Y ANÁLISIS QUÍMICO DE CAFÉ DE ORIGEN
NARIÑENSE, ENRIQUECIDO CON BIOMASA MICELIAL DE *Ganoderma lucidum*
PRODUCIDO POR FERMENTACIÓN LÍQUIDA**

ROBINSON BYRON MUESES MAFLA

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRARIAS
SAN JUAN DE PASTO-COLOMBIA**

2022

**EVALUACIÓN SENSORIAL Y ANÁLISIS QUÍMICO DE CAFÉ DE ORIGEN
NARIÑENSE, ENRIQUECIDO CON BIOMASA MICELIAL DE *Ganoderma lucidum*
PRODUCIDO POR FERMENTACIÓN LÍQUIDA**

ROBINSON BYRON MUESES MAFLA

**TRABAJO DE GRADO presentado como requisito parcial para optar al título de
MAGISTER EN CIENCIAS AGRARIAS – ÉNFASIS EN PRODUCCIÓN DE
CULTIVOS**

ASESORES

OLGA LUCIA BENAVIDES CALVACHE

JESUS ROMO RAMOS

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRARIAS

SAN JUAN DE PASTO-COLOMBIA

2022

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en el presente trabajo de grado son de responsabilidad exclusiva de los autores”.

Artículo 1o del acuerdo No.324 del 11 de octubre de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

PhD. Lina Rocío Dávila Giraldo

Jurado.

PhD. Jaime Fernando Martínez Suárez

Jurado

PhD. William Albarracín Hernández

Jurado

MSc. Olga Benavides Calvache

Asesora

MSc. Jesus Romo Ramos

Asesor

San Juan de Pasto, 17 de octubre de 2022

AGRADECIMIENTOS

Expreso mis sinceros agradecimientos a la Fundación Ceiba y la Gobernación de Nariño por el apoyo de las becas otorgadas mediante el proyecto “Fortalecimiento de Capacidades Regionales en Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación en el Departamento de Nariño”. Este trabajo de grado en modalidad de investigación no hubiera sido posible sin el apoyo de estas entidades.

Igualmente expreso mis sinceros agradecimientos a:

Grupo de Investigación Biotecnología Agroindustrial y Ambiental (BIOTA) por facilitar materiales, reactivos y el uso de su laboratorio.

M.Sc. Olga Benavides Calvache por su apoyo, dirección y colaboración para hacer posible que esta investigación haya culminado con éxito

M.Sc. Jesús Romo Ramos director del Grupo de Investigación de Bioquímica-Estudios Genéticos (BIOGEN), por su apoyo como asesor y recomendaciones brindadas.

Ph.D. William Albarracín Hernández; PhD. Lina Rocío Dávila Giraldo y PhD. Jaime Fernando Martínez Suárez por sus recomendaciones y asesoría brindada.

A las personas que de alguna manera colaboraron en la realización y culminación de este trabajo de grado.

DEDICATORIA

Al haber alcanzado mi carrera profesional, dedico este trabajo especialmente a mi madre María

Graciela Mafla por ser la gran persona que me motiva e impulsa a seguir adelante, siempre viviré agradecido por tu amor, consejos y tu apoyo incondicional. A mi padre José Guillermo Mueses por sus consejos, paciencia y tiempo dedicado para hacer posible alcanzar esta meta, lo que he logrado en mi vida ha sido gracias a Ustedes, mis padres.

A mis hermanos Wilmer Alexander Mueses, Jose Camilo Mueses y Andrés Fernando Mueses, en especial a Wilmer gracias por apoyarme y ayudarme en todos los proyectos que emprendemos.

A mi familia, muy en especial a mis tías Isabel, Patricia y Zoila Mafla, gracias por siempre creer y confiar en mí.

A mis compañeros de Maestría por los gratos e inolvidables momentos compartidos.

RESUMEN

G. lucidum también conocido como Reishi, es un hongo medicinal que contiene diversos compuestos bioactivos como los polisacáridos, polifenoles, triterpenos, entre otros, de los cuales se ha reportado poseen efectos beneficiosos en la salud humana. Este estudio tuvo como objetivo general optimizar, evaluar la cinética de crecimiento y la calidad química de la biomasa micelial de *G. lucidum* obtenida por fermentación en medio líquido con residuos de café y el efecto sensorial por su inclusión en una bebida de café de origen nariñense. En la optimización se realizó de acuerdo a un diseño central compuesto 2^3 . Los resultados indicaron que las condiciones que maximizan las respuestas para la biomasa fueron: 3,86 % (A), 1,85 % (B) y pH inicial (C) del medio de 5,4 con un rendimiento máximo de biomasa 0,0032 g/mL y para la producción de polisacáridos las condiciones óptimas fueron: 4,84 % (A), 2,46 % (B) y pH inicial (C) del medio de 4,6 con un rendimiento máximo de 34,58 mg/g MS. En el estudio cinético de crecimiento micelial y formación de producto los resultados estadísticos de crecimiento micelial se ajustaron con éxito al modelo de raíz cubica (R^2 de 0,9195) y al modelo logístico de regresión no lineal (R^2 de 0,9506), pero en el estudio cinético de formación de producto solo se ajustó con éxito al modelo Luedeking–Piret con solución de la ecuación de raíz cubica (R^2 de 0,9654). En cuanto a la calidad química de la biomasa micelial de *G. lucidum*, se evaluó la actividad antioxidante por DPPH y el contenido de los polifenoles por Folin- Ciocalteu en extractos acuosos del cuerpo fructífero y en la biomasa micelial de *G. lucidum* obtenida bajo condiciones óptimas del cultivo líquido. Los resultados demostraron un mayor contenido de polifenoles y una mayor actividad antioxidante para la biomasa micelial ($44,16 \pm 0,92$ mg EAG/g y $6,96 \pm 0,76$ μ mol Eq Trolox/g extracto) en comparación con el cuerpo fructífero ($14,66 \pm 2,47$ mg EAG/g y $4,80 \pm 0,25$ μ mol Eq Trolox/g extracto). En los análisis FTIR realizados a: la biomasa micelial, cuerpo fructífero de *G. lucidum*

y producto comercial de café con extracto de *Ganoderma*, se encontró que los espectros infrarrojos de la biomasa micelial y cuerpo fructífero de *G. lucidum* presentaron una similitud entre los picos. Por último, el análisis sensorial del tratamiento correspondiente al 6% de biomasa micelial en café resultó en la disminución del puntaje de la bebida de café, manteniendo sus atributos cerca de los 6,0 puntos, que de acuerdo a la escala de evaluación SCAA, no corresponde a café especial. Los tratamientos con el 8 y 10% de biomasa micelial en café resultaron en el incremento de sus puntajes alcanzando casi los puntajes de la muestra control, y estos se mantuvieron relativamente constantes en los 8 y 9 puntos, manteniendo al café enriquecido dentro del rango de la SCAA en excelente y extraordinario, respectivamente.

Palabras clave: Polisacáridos, polifenoles, actividad antioxidante, basidiomicetos

ABSTRACT

G. lucidum, known as Reishi, is a medicinal fungus that contains various bioactive components such as polysaccharides, triterpene polyphenols among others that have been reported have healthy effects. The aim of this research was to optimize, evaluate growth kinetics and chemical quality of the mycelial biomass of *G. lucidum* obtained by liquid fermentation with coffee residues and the sensory effect of its inclusion in a coffee drink of Nariño origin. For the optimization was evaluated using a central composite design 2^3 . The results showed that the conditions that maximize the responses for biomass were: 3,86 % (A), 1,85 % (B) and initial pH (C) of the medium of 5,4, with a maximum biomass yield of 0,0032 g/mL and for the total polysaccharides production the optimal conditions were: 4,84 % (A), 2,46 % (B) and initial pH (C) of the medium of 4,6, with a maximum yield of 34,58 mg/g DW. The kinetic study of mycelial growth and product formation were realized, the statistical results of mycelial growth were successfully fitting to the cube root model (R^2 de 0,9195) and to the logistic nonlinear regression model (R^2 de 0,9506), but in the kinetic study of product formation only was fitted to the Luedeking–Piret model with solution of the cubic root equation (R^2 of 0,9654). On the chemical quality of the mycelial biomass of *G. lucidum*, the antioxidant activity by DPPH and the content of polyphenols by Folin- Ciocalteu were evaluated for both aqueous extracts of the fruiting body and mycelial biomass of *G. lucidum* obtained under optimal conditions of the liquid culture. The results found showed higher polyphenol content and higher antioxidant activity for mycelial biomass ($44,16 \pm 0,92$ mg GAE/g y $6,96 \pm 0,76$ μ mol Eq Trolox/g extract) compared to the fruiting body ($14,66 \pm 2,47$ mg GAE/g y $4,80 \pm 0,25$ μ mol Eq Trolox/g extract). The FTIR analyzes of: the mycelial biomass, fruit body of *G. lucidum* and commercial coffee product with *Ganoderma* it was found that extract the infrared spectra of the mycelial biomass and fruit body of *G. lucidum*

were similar. Finally, the sensory analysis of the treatment corresponding to the 6% mycelial biomass in coffee result in lower score of the coffee beverage, keeping its attributes near to 6.0 points, which according to the SCAA evaluation scale, does not correspond to specialty coffee. The treatments with 8 and 10% mycelial biomass in coffee resulted in an increase in their scores, almost reaching the scores of the control sample, and these remained relatively constant at 8 and 9 points, keeping the enriched coffee within the range of the SCAA in excellent and extraordinary range, respectively.

Keywords: Polysaccharides, polyphenols, antioxidant activity, basidiomycetes

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	3
1.1. Planteamiento del problema	3
1.2. Formulación del problema	5
1.3. Justificación	5
2. ESTADO DEL ARTE	10
2.1. Residuos de Café	10
2.1.1. Usos de los residuos del café	11
2.2. <i>Ganoderma lucidum</i>	13
2.2.1. <i>Ganoderma</i> como fuente de compuestos bioactivos	15
2.2.2. Cultivo de <i>Ganoderma lucidum</i>	16
2.2.3. Modelado de la cinética de crecimiento micelial	19
2.3. Los nutraceuticos y alimentos funcionales a partir de <i>Ganoderma</i>	25
2.4. Propiedades antioxidantes de <i>Ganoderma lucidum</i>	30
2.5. Antecedentes del Tema	32
2.5.1. Aplicaciones de <i>G. lucidum</i> a los alimentos	32
2.5.2. Fuentes no convencionales en el cultivo sumergido de <i>Ganoderma lucidum</i>	35
3. OBJETIVOS	38
3.1. Objetivo General	38
3.2. Objetivos específicos	38
4. METODOLOGÍA	39
4.1. Localización de la investigación	39

4.2.	Diseño Experimental.....	39
4.3.	Adquisición del residuo de café	39
4.4.	Métodos empleados	40
4.4.1.	Cultivo <i>in vitro</i> de <i>G. lucidum</i>	40
4.4.2.	Acondicionamiento de los residuos de café y su montaje en fermentación líquida para la producción de biomasa micelial de <i>G. lucidum</i>	41
4.4.3.	Determinación de biomasa micelial	43
4.4.4.	Determinación de polisacáridos totales solubles en agua	44
4.4.5.	Modelado de la cinética de crecimiento de <i>G. lucidum</i>	45
4.4.6.	Cuantificación de polifenoles totales y la actividad antioxidante de la biomasa de <i>G. lucidum</i>	47
4.4.7.	Análisis por FTIR de <i>G. lucidum</i>	49
4.4.8.	Dosificación de biomasa micelial de <i>G. lucidum</i> al café	50
4.4.9.	Análisis sensorial	50
5.	RESULTADOS Y DISCUSION	53
5.1.	Optimización del medio de fermentación sumergida de <i>G. lucidum</i>	53
5.1.1.	Optimización de la producción de biomasa micelial	54
5.1.2.	Optimización de la producción de polisacáridos totales	60
5.2.	Modelado cinético de <i>G. lucidum</i> bajo condiciones optimas	68
5.2.1.	Modelado cinético de crecimiento micelial	70
5.2.2.	Modelado cinético de formación de producto	73
5.3.	Determinación de la actividad antioxidante	79
5.4.	Análisis FTIR de <i>G. lucidum</i>	86

5.5. Análisis Sensorial.....	89
CONCLUSIONES	94
RECOMENDACIONES	95
Bibliografía	96
ANEXOS.....	112

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Matriz experimental.....	42
Tabla 2. Clasificación del café de acuerdo al puntaje obtenido en el análisis sensorial...	51
Tabla 3. Resultados de biomasa micelial y polisacáridos totales de <i>G. lucidum</i>	52
Tabla 4. Validación de los modelos usando las condiciones optimas.....	67
Tabla 5. Valores coeficientes cineticos modelos de raiz cubica y logistico.	69
Tabla 6. Valores coeficientes cineticos modelos de raiz cubica y logistico.	75
Tabla 7. Comparativo valores de EAG/g y actividad antioxidante de <i>G. lucidum</i>	78
Tabla 8. Comparativo de polifenoles totales frente otras investigaciones.....	96
Tabla 9. Comparativo de actividad antioxidante frente a otras investigaciones.....	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas del café desde su cosecha hasta la obtención del grano.....	11
Figura 2. <i>Ganoderma lucidum</i>	14
Figura 3. Cascarilla de café empleada en este estudio.	39
Figura 4. Cultivo <i>in vitro</i>	40
Figura 5. Fermentación líquida de <i>G. lucidum</i>	41
Figura 6. Determinación de la biomasa.....	44
Figura 7. Determinación de polisacáridos totales solubles en agua de <i>G. lucidum</i>	44
Figura 8. Obtención de extractos acuosos de <i>G. lucidum</i>	47
Figura 9. Evaluación de polifenoles de <i>G. lucidum</i>	48
Figura 10. Análisis FTIR.	49
Figura 11. Análisis sensorial.....	51
Figura 12. Superficies de respuesta (A, B, C) y gráficos de contorno (a, b, c) que muestran los efectos de las tres variables en la producción de biomasa micelial de <i>G. lucidum</i>	Error!
Bookmark not defined.	
Figura 13. Superficies de respuesta (A, B, C) y gráficos de contorno (a, b, c) que muestran los efectos de las tres variables en la producción de polisacáridos totales de <i>G. lucidum</i>	62
Figura 14. Morfología de crecimiento en forma de pellet de <i>G. lucidum</i> , bajo condiciones de cultivo con cascarilla de café.....	67
Figura 15. Cinética de datos experimentales para la biomasa micelial.....	Error! Bookmark not defined.
Figura 16. Cinética de datos experimentales para la producción de polisacáridos totales	76
Figura 17. Espectros FTIR.	86

Figura 18. Gráfico de probabilidad Normal para la biomasa micelial de <i>G. lucidum</i>	113
Figura 19. Grafica de Probabilidad normal para polisacáridos totales solubles en agua de <i>G. lucidum</i>	113
Figura 20. Grafica de residuos para la biomasa de <i>G. lucidum</i>	113
Figura 21. Grafica de residuos para polisacáridos totales solubles en agua de <i>G. lucidum</i>	113

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>G. lucidum</i>	<i>Ganoderma lucidum</i>
SCAA	Specialty Coffee Association of America (SCAA por sus siglas en inglés)
g/L	Unidades de gramos por litro
mg/g MS	Unidades de miligramos por gramos de “muestra seca” (MS)
mg EAG /g	Unidades de miligramos de equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de extracto
μmol Eq Trolox/g extracto	Unidades de micromoles equivalentes a Trolox por gramo de extracto crudo
DPPH	Método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo
FTIR	Método de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha aumentado considerablemente el cultivo y consumo de hongos y se prevé que la tendencia de consumo siga una línea ascendente a nivel mundial y aunque los hongos son consumidos en todo el mundo por su sabor, aroma y textura, son poco conocidos por su gran potencial como alimentos con propiedades funcionales (Fernández & Morales, 2020). A pesar de que existe una gran cantidad de literatura que describe las propiedades medicinales de los hongos y su uso potencial o comercial en nuevos productos farmacéuticos en forma purificada de los compuestos bioactivos, su aplicación en los alimentos como componentes funcionales no se ha estudiado ampliamente (Giavasis, 2014).

En general, los macrofungi se han utilizado para desarrollar productos alimenticios innovadores con un valor agregado mejorado, sin embargo, pocas son las investigaciones que se han centrado en las aplicaciones actuales de macrofungi y de cómo estos mejoran el contenido antioxidante a los alimentos (Lu, Lou, Hu, Liu & chen, 2020) a pesar de ello, en los últimos años han aparecido varios productos alimenticios que mencionan tener propiedades funcionales debido a la presencia de un compuesto bioactivo obtenido de algún hongo (Fernández & Morales, 2020) y en los últimos años alimentos funcionales a base de hongos han ganado mucha atención, por lo que ha conllevado a una demanda creciente de cuerpos fructíferos y micelios (Rathore *et al.*, 2019) y *G. lucidum* no es la excepción, pues este es un hongo popular por sus usos medicinales, y tiene una gran demanda en todo el mundo a pesar de sus grandes costos, ya que los productos a base de *Ganoderma* disponibles en el mercado son costosos debido a que los procesos requeridos para el cultivo son intensivos (Sudheer, Alzorqi, Manickam & Ali, 2019).

El consumo de *G. lucidum* depende en gran medida de sus beneficios medicinales que a su vez dependen de sus compuestos activos, por lo tanto, el contenido de compuestos activos se ha

vuelto de gran preocupación tanto para los investigadores, cultivadores y consumidores. Dada la gran aceptación de *Ganoderma* en los últimos años, se ha visto necesario desarrollar métodos eficientes para la producción de compuestos bioactivos y en tiempos más cortos (Ye, Liu, Xie, Zhao & Wu, 2018), es aquí donde la fermentación en estado líquido ha tomado importancia, pues en este tipo de cultivo se obtiene biomasa micelial rica en compuestos bioactivos tales como los polisacáridos y polifenoles, además el proceso se puede estandarizar fácilmente. La estandarización de las condiciones de cultivo y la composición del medio influyen fuertemente en el crecimiento micelial y la producción de compuestos bioactivos en *Ganoderma* (Sudheer *et al.*, 2019). Por lo anterior, en esta investigación se evaluó las condiciones del cultivo líquido de *G. lucidum* adecuado con residuos de café (cascarilla) con el objetivo de optimizar la producción de biomasa micelial y polisacáridos totales de *G. lucidum*, para posteriormente realizar su evaluación química y su inclusión en café de origen nariñense para el desarrollo y evaluación sensorial de una bebida de café que incorpora biomasa micelial con un aporte importante de compuestos bioactivos propios de la biomasa que puedan ser aprovechados en términos de salud humana y con características sensoriales deseables entre los consumidores.

1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

Colombia es el tercer productor mundial de café (Escobar, Arteaga, Belalcázar & Burbano, 2019); en Nariño es la actividad agropecuaria más representativa, la cual aporta el 3,4% del PIB sectorial y el 4,16% de la producción nacional (Escobar *et al.*, 2016), dentro de sus 64 municipios en 41 municipios se cultiva café, con la participación de 39.619 caficultores en todo el departamento (Minagricultura, 2021), además el café de Nariño es muy apreciado en el comercio internacional, por su denominación de origen (Escobar *et al.*, 2016). Pero a pesar de que el cultivo de café ha sido, durante muchos años, motor importante para el desarrollo de las regiones no solo de Nariño sino también de los demás departamentos productores de café de Colombia, mediante la generación de empleo, el desarrollo industrial, el fortalecimiento de las finanzas públicas e inclusive el mejoramiento del tejido social, el sector se ha visto en franco deterioro por diferentes factores como: los altos costos de insumos, el precio bajo en el mercado internacional, el alto precio de los jornales y la revaluación del peso, entre otros (Silva & Trejos, 2016). Por lo tanto, uno de los principales aspectos que se debe tomar en consideración para abordar el tema de café es su proyección a futuro dentro del territorio nariñense, teniendo en cuenta mayores niveles de productividad y competitividad en el mercado nacional e internacional. Para ello es importante que el concepto de cadena productiva se empiece no solamente a modelar sino a aplicar entre los diversos actores que en ella intervienen, para lograr una mayor fortaleza a nivel de cultivo, procesamiento y comercialización del mismo, sin dejar a un lado el aprovechamiento de los residuos que estos generan (Silva & Trejos, 2016), entre los que se encuentran la pulpa y la cascarilla como principales subproductos (Ochoa & Guzmán, 2021). Éstos representan un problema ambiental debido a que en la mayoría de los casos son liberados como residuos (Paz *et*

al., 2013), además se estima que en Colombia se genera 784.000 t/año de biomasa residual, que incluyen el mucilago, la pulpa, cascarilla, entre otros (Ochoa & Guzmán, 2021) y solo en Nariño se producen 166.924 t/año de residuos de café (Escalante *et al.*, 2011), cifra representativa para buscar un potencial de aprovechamiento para solucionar el problema de su vertimiento.

Si bien, el uso de los residuos de café en la producción de alimentos para animales como piensos y forrajes es limitado debido a la presencia de componentes antinutricionales, como la cafeína que está relacionada con efectos fisiológicos sobre el sistema nervioso central del animal y los taninos que confieren astringencia a los alimentos y proteínas complejas, lo que afecta al alimento en digestibilidad y disminución de la utilización de nitrógeno en animales (Mazzafera, 2002), se ve la necesidad de desarrollar investigaciones que busque mejorar procesos y productos que deriven en valores agregados, con el fin de captar la verdadera dimensión de las posibilidades comerciales que tienen los residuos de la agroindustria del café. Es por ello, que en este trabajo de investigación se obtuvo biomasa micelial de *G. lucidum* por fermentación líquida con residuos de café, para el desarrollo y evaluación sensorial de una bebida de café que incorpora su biomasa, con un aporte importante de principios activos como polisacáridos y fenoles propios del hongo, que puedan ser aprovechados en términos de salud humana y con características sensoriales deseables entre los consumidores, para lograr un producto de alto potencial de competitividad en un posible contexto comercial.

Además, resulta de gran interés la incorporación de biomasa micelial en la formulación de diferentes alimentos convencionales para aportar efectos beneficiosos (Rathore, Prasad, Kapri, Tiwari & Sharma, 2019), pues pese a que se puede encontrar en el mercado productos enriquecidos con extractos o compuestos puros fúngicos como los polisacáridos, hasta ahora solo se comercializan unos pocos, en parte debido a los altos costos de producción, purificación y bajos

rendimientos de polisacáridos. Dichos problemas, sin embargo, pueden mejorarse en cierta medida mediante el uso de micelio de hongos producidos en cultivos sumergidos en condiciones controladas de proceso (Giavasis, 2014).

1.2. Formulación del problema

¿Cuáles son las condiciones óptimas del cultivo líquido de *Ganoderma lucium* en residuos de café para la producción de biomasa micelial y de polisacáridos totales; cuál es la calidad química del extracto acuoso del micelio producido en condiciones de optimización, en términos de su actividad antioxidante, cuantificación de fenoles totales y análisis por FTIR y cómo se afecta sensorialmente la bebida de café nariñense, debido a la inclusión de biomasa micelial en diferentes concentraciones?

1.3. Justificación

En Nariño el cultivo de café genera anualmente 27.000 empleos directos (Escobar *et al.*, 2019). Sin embargo, en la cadena de café, los residuos derivados de la obtención del grano café representan un enorme problema ambiental, debido a que más del 50% de la fruta del café son liberados como residuos (Paz *et al.*, 2013), además hay pocos estudios que aborden el uso en aplicaciones rentables de los residuos de café (Bonilla, Duarte & Schwan, 2014). Sin embargo, la producción de hongos comestibles y medicinales utilizando residuos de café es una buena opción para recuperar estos subproductos debido a la capacidad de los hongos para degradar estos compuestos y convertir los residuos lignocelulósicos en alimentos con alto valor comercial y nutricional (Kasuya *et al.*, 2015). Dentro de los hongos medicinales *G. lucidum* es una especie abundante en numerosos polisacáridos y otras biomoléculas, por lo que es superior y más atractivo

entre otras especies de hongos medicinales (Obodai *et al.*, 2017), por lo tanto, el aprovechamiento de los residuos de la industria cafetera con *G. lucidum* no solo generaría una nueva fuente de ingresos sino también aportaría soluciones a problemas alimenticios y medicinales, ya que *G. lucidum* tiene carácter nutracéutico y por otro lado contribuiría a disminuir los residuos que son una potencial fuente de contaminación de los recursos naturales (Tabares & Toro, 2013).

Igualmente, en la actualidad se están explorando aplicaciones innovadoras para los alimentos macrofúngicos basados en los cuerpos fructíferos y micelios para mejorar el sabor y la nutrición de los alimentos (Lu, Lou, Hu, Liu and Chen, 2020). Actualmente, *G. lucidum* es utilizado como materia prima para la producción de alimentos funcionales (Rojas, Palacio, Ospina, Zapata & Atehortúa, 2012) y suplementos dietéticos, (Wu, Deng, Chen, Zhao, Bzhelyansky, & Li, 2017) que mejoran el sistema inmunológico del cuerpo y las funciones metabólicas (Hapuarachchi *et al.*, 2018). Sin embargo, muchos de los productos a base de *G. lucidum* normalmente se producen a partir del cuerpo fructífero obtenido mediante fermentación en estado sólido; lo que implica un tiempo de cultivo extenso (alrededor de seis meses), dificultad para controlar la calidad del producto y la susceptibilidad del cultivo a los cambios ambientales (Subedi, Basnet, Panday, Neupane & Tripathi, 2021). Por lo tanto, es importante desarrollar e implementar procesos que garanticen altos rendimientos y estabilidad funcional de la biomasa (Araque, Niño & Gelves, 2020), ya que, el precio de los productos de *Ganoderma* en el mercado son altos y su homogeneidad en términos de calidad es deficiente (Hapuarachchi *et al.*, 2018); pues se ha encontrado que el contenido de polisacáridos y triterpenoides en los cuerpos fructíferos de *G. lucidum* es bajo, a menudo alrededor del 0,5% y 1%, respectivamente, lo que puede limitar la eficacia terapéutica del hongo (Ye, Liu, Xie, Zhao & Wu, 2018); por otro lado se ha reportado que la bioactividad de este hongo es mucho más alta en micelios que en cuerpos fructíferos y esporas

(Cui, Yang, He, 2015), por lo que es necesario desarrollar métodos eficientes para la producción de biomasa micelial y por ende de metabolitos de interés biológico a partir de este hongo (Ye, Liu, Xie, Zhao & Wu, 2018).

Una forma rápida, económica y confiable para la producción de biomasa y bioactivos en hongos es el cultivo sumergido, un proceso de fermentación en matraz o biorreactor donde se adecua un medio líquido para el desarrollo de micelio y la producción de metabolitos (Tang, Zhang, Liu, Zhu and Zhong, 2011), con las ventajas en la reducción de costos de obtención, separación y purificación de los metabolitos de interés (Araque *et al.*, 2020), menos tiempo de procesamiento, pues un cultivo sólido de *Ganoderma* toma meses, mientras que el cultivo en medio líquido toma alrededor de siete días, sin embargo, los estudios en medio sumergido han sido escasos y se han enfocado principalmente al cultivo a nivel de matraz y biorreactores menores a 7.5 L de volumen útil (Hu *et al.*, 2018); pese a ello, la fermentación sumergida es considerado un método prometedor para la producción eficiente y en gran escala de biomasa micelial y metabolitos bioactivos con un tiempo de incubación más corto y con menor riesgo de contaminación (Cui, Yang, He, 2015), igualmente a pesar de que una de las preocupaciones para la utilización de cultivos sumergidos, principalmente en los países del Tercer Mundo, es el alto costo de los procesos a gran escala, no obstante, un punto clave para comenzar a subsanar este problema es formular medios de cultivo alternativos y más económicos, en reemplazo de los costosos medios tradicionales (Hu *et al.*, 2018), con fuentes de carbono que incluyen exclusivamente glucosa, sacarosa, fructosa o lactosa (Zhou, 2017).

Cabe mencionar que la biomasa de hongos se considera como un "complemento dietético o alimenticio", mientras que los extractos de hongos se consideran compuestos farmacéuticos o "nutracéuticos". Sin embargo, la biomasa micelial contiene todos los nutrientes y compuestos

activos, incluyendo enzimas, metabolitos secundarios y beta-glucanos, por lo que la biomasa micelial hace parte de los "alimentos funcionales" o "suplementos dietéticos" (Barros, Bell, Ferrão, Calabrese & Fernandes, 2016), además, se ha encontrado que los extractos de biomasa micelial tienen propiedades antioxidantes, siendo los compuestos fenólicos los que contribuyen en mayor proporción a las propiedades antioxidantes (Sudheer *et al.*, 2019). Estas propiedades mantienen el equilibrio fisiológico en las personas, lo que da una alta valoración a la biomasa micelial como fuente de alimentos funcionales (Rašeta *et al.*, 2016). Por lo tanto, el polvo de biomasa micelial que se usa en la formulación de tabletas y cápsulas para la salud (Suberu, Lateef, Bello & Daudu, 2014), también puede ser empleada en la formulación de alimentos, de esta forma se resalta su potencial para ser consumido como alimentos funcionales, por su naturaleza rica en compuestos bioactivos.

Por esta razón, en esta investigación se planteó obtener el hongo *G. lucidum* a partir de residuos de café en medio líquido, en búsqueda de alternativas que permitan la producción de biomasa y bioactivos, de forma rápida, económica y confiable en términos de calidad, de esta manera brindar solución a los problemas que presenta la producción tradicional de hongos medicinales, y a la vez formular un nuevo producto de café con valor agregado y competitivo, con potencial comercial para el mercado nacional e internacional. Ya que, si bien el consumo y cultivo de macromicetes en Colombia es bajo, en la última década se ha registrado un aumento en la comercialización de productos en fresco y procesados, en especial con hongos del género *Ganoderma*, debido a que sus propiedades curativas son más difundidas y por ende se espera el incremento de su cultivo (Tabares & Toro, 2013). Por otro lado, la oferta de los productos a base de *Ganoderma*, podría enfrentar serias limitaciones, debido a los riesgos en la disponibilidad de recursos madereros (Hu *et al.*, 2018), por lo tanto, se justifica la necesidad de generar un proceso

de producción en fermentación sumergida de *Ganoderma* adaptado a contextos locales, el cual permita optimizar los rendimientos y de esta forma proyectar a futuro un proceso rentable y escalable para la obtención de biomasa micelial.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1. Residuos de Café

En la producción industrial de café se emplea un método de procesamiento en seco o en húmedo para eliminar la cáscara y las partes mucilaginosas de las cerezas de café resultando en la producción de cascarilla y pulpa de café respectivamente (Figura 1) (Shemekite *et al.*, 2014). Estos residuos pueden alcanzar hasta 1 tonelada y la cantidad de agua residual varía entre 5000 y 15000 L por tonelada de café (Villa *et al.*, 2019). La pulpa y la cascarilla de café representan el 29% y el 12% de su peso seco (Janissen & Huynh, 2017), estos subproductos tienen una composición química similar; la pulpa y la cascarilla son ricas en carbohidratos (32–35%), proteínas (7–15%) y minerales (10,7%), aunque la composición química de estos residuos varía con la variedad del café, las condiciones de cultivo, el modo de procesamiento y la etapa de desarrollo en la que se cosecharon los granos (Moreira, Melo, Coimbra, dos Reis, Schwan & Silva, 2018). Por consiguiente, se han reportado diferentes valores en la composición química, Villa *et al.* (2019) reporta que la pulpa y cascarilla de café tienen un alto contenido de carbohidratos (70%), de los cuales 16-43% están en forma de celulosa y 7-29% de hemicelulosa. Esta composición química de los carbohidratos en la pulpa y las cáscaras indica que estos residuos son muy prometedores para su uso en muchos procesos biotecnológicos (Moreira *et al.*, 2018).



Figura 1. Etapas del café desde su cosecha hasta la obtención del grano. a) Planta de café, b) pulpa de café, c) grano de café con cascarilla, d) grano de café, e) cascarilla. Recuperado de “Characterization of NaOH-Treated Colombian Silverskin Coffee Fiber as a Composite Reinforcement” por D.R. Hernández, J.A. Rojas & Y. Costa, 2017. BioResources. p. 8804.

2.1.1. Usos de los residuos del café

Hay pocos estudios sobre el uso en aplicaciones rentables de los residuos de café, ya que su pulpa y la cáscara contienen cierta cantidad de cafeína y taninos que lo hace tóxico y resulta en un problema para su aprovechamiento. Sin embargo, es rico en materia orgánica, que lo convierte en un sustrato ideal para procesos microbianos para la generación de productos de valor agregado (Padmapriya, Tharian & Thirunalasundari, 2013). Por lo tanto, varias soluciones y usos alternativos de la pulpa y la cáscara de café se han evaluado, estos incluyen fertilizantes, alimento para el ganado, compost, etc. Pero, para estas aplicaciones solo se utiliza una fracción de la cantidad disponible y no es técnicamente muy eficiente, por consiguiente, se han realizado intentos para desintoxicarlo para una aplicación mejorada como alimento, y para producir varios productos como: enzimas, ácidos orgánicos, sabor y aroma a partir de pulpa y/o cáscara de café (Pandey *et al.*, 2000).

En cuanto a investigaciones realizadas en Colombia sobre los residuos de café, el Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé), toma relevancia. Cenicafé ha reportado que de 100 Kg de café cereza se pueden obtener 6% de melaza, por extracción y concentración del jugo de pulpa y del mucílago, con un contenido del 35% de azúcares totales y por fermentación alcohólica de este jugo se puede obtener en promedio 1,2 L de alcohol etílico, también han reportado producciones promedio de etanol de 25,2 mL, a partir de 1 kg de pulpa fresca con un contenido de etanol del 98,19% y para el mucílago los resultados de los experimentos permiten estimar una producción aproximada de 58 mL con un contenido de 98,6% de etanol (López, 2017).

Pero a pesar de los buenos resultados la producción de bioetanol no representa la forma ideal para la explotación de sustratos orgánicos, pues se deben buscar estrategias más innovadoras para la valorización de los residuos para aumentar la sostenibilidad de sus gestiones y de su valor de mercado para permitir la creación de nuevas oportunidades de trabajo. En particular, el aprovechamiento de los residuos agroalimentarios, en extracción de biomoléculas (incluso en pequeñas cantidades) para aplicaciones farmacéuticas, químicas, cosméticas, agronómicas y la producción de compuestos de alto valor agregado son prioritarios (Battista, Strazzera, Zanzoni, Andreolli & Bolzonella, 2020).

En este sentido los avances en la biotecnología industrial ofrecen oportunidades potenciales para la utilización económica de los residuos agroindustriales de café (Rodríguez, Oliveira, das Neves, Sarmento, Amaral & Oliveira, 2014), ya que, es claro que la industria del café libera grandes cantidades de subproductos (Paz *et al.*, 2013), y si no se hace un uso eficaz de estos residuos conduce a varios problemas de carácter ambiental, por lo tanto, pese a que se menciona que la producción de bioetanol que ha sido ampliamente investigado no es una buena forma de explotación de los residuos, se ve necesario evaluar otro posible potencial como la producción de

biomoléculas y en particular de una región, de esta forma establecer si estos procesos tienen potencial industrial. Igualmente, la obtención de biomoléculas mediante procesos fermentativos con micelios fúngicos que tienen la capacidad de utilizar compuestos complejos como los residuos agroindustriales para la producción de biomoléculas, estas han sido de gran interés como suplementos nutricionales y para el sector farmacéutico (Ogidi *et al.*, 2020), de igual forma, hoy en día existe un creciente interés en los metabolitos secundarios de *Ganoderma* que pueden obtenerse por fermentación sólida o líquida en residuos agroindustriales y los metabolitos obtenidos están siendo explorados como nuevos fármacos (Zhou, Su & Zhang, 2012).

2.2. *Ganoderma lucidum*

Las especies de *Ganoderma* son hongos basidiomicetos degradantes de la madera con cuerpos fructíferos duros (Figura 2) (Boh, Berovic, Zhang & Bin, 2007). *Ganoderma lucidum* es una especie de la clase Agaricomycetes, que pertenece a la familia Ganodermataceae del orden Polyporales (Liu, Zhu, Li, Shan & Gao, 2014), esta especie es rica en compuestos bioactivos, principalmente triterpenoides, polisacáridos y polifenoles (Cör *et al.*, 2018), con potencial medicinal (Taofiq *et al.*, 2017). Tradicionalmente este hongo se lo ha utilizado para mejorar la salud, longevidad (Zhu, Yao, Ahmad & Chang, 2019), capacidad intelectual, la memoria, potenciar la sexualidad, promover la agilidad y para tratar enfermedades como la hepatitis, hipertensión, hipercolesterolemia, cáncer gástrico (Pan, Jiang, Liu, Miao & Zhong, 2013), distrofia muscular, neurastenia, nefritis, hiperlipemia, artritis, asma, bronquitis, úlcera gástrica, arteriosclerosis, leucopenia, diabetes, insomnio y anorexia (Bidegain, 2017). *Ganoderma* se denomina "Reishi" en Japón, "Ganoderma" en los Estados Unidos y "Lingzhi" en China (Zhou, Lin, Yin, Zhao, Sun & Tang, 2007).



Figura 2. *Ganoderma lucidum*. Recuperado de “Bioactive Compounds of the Wonder Medicinal Mushroom “*Ganoderma lucidum*”” por S. Sudheer, I. Alzorqi, S. Manickam, and A. Ali, 2019. *Bioactive Molecules in Food*, p. 1865.

Las especies de *Ganoderma* no están clasificadas como hongos comestibles, ya que, tienen un sabor amargo y dureza en sus cuerpos fructíferos y no tienen la textura carnosa característica de los hongos comestibles, pero su importante valor económico, se debe a sus propiedades medicinales (Hapuarachchi *et al.*, 2018). Actualmente, *G. lucidum* es utilizado como materia prima para la producción de alimentos funcionales (Rojas *et al.*, 2012), y de las diferentes partes de su cuerpo fructífero, micelios o esporas se pueden encontrar en productos como: capsulas blandas, inyecciones, tabletas, bebidas (Liu & Zhang, 2018), polvo (Yang *et al.*, 2019), extractos (Artunduaga, 2016), chocolate, té (Fernández & Morales, 2020), suplementos dietéticos, (Wu, Deng, Chen, Zhao, Bzhelyansky, & Li, 2017) café (Benković, Srećec, Špoljarić, Mršić & Bauman, 2014), productos de esporas, jarabes, pastas de dientes, jabones y lociones, también se han comercializado como alimentos y suplementos farmacológicos que mejoran el sistema inmunológico del cuerpo y mejoran las funciones metabólicas (Hapuarachchi *et al.*, 2018). Pero más recientemente, los efectos farmacológicos de *Ganoderma* han atraído una atención considerable por parte de la comunidad de investigación mundial (Zhao, Zhang, Xing, Ahmad, Li

& Chang, 2018), en especial por ser una fuente natural prometedora de compuestos inmunomoduladores y anticancerígenos como los polisacáridos y triterpenoides (Boh, 2013).

2.2.1. *Ganoderma* como fuente de compuestos bioactivos

Diferentes investigaciones se han orientado al descubrimiento e identificación de los diferentes macromicetos y los diferentes compuestos bioactivos contenidos dentro de ellos. Un interés particular ha apuntado en el hongo *G. lucidum*, debido a sus propiedades medicinales, ya que este contiene más de 150 antioxidantes y fitonutrientes y también se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, analgésicas, inmunomoduladoras y antitumorales (Gurung *et al.*, 2012). El cuerpo fructífero, los micelios y las esporas de *G. lucidum* contienen más de 400 compuestos bioactivos diferentes (Veljović, Nikićević & Nikšić, 2019) y varios autores han demostrado que los triterpenos y polisacáridos son los principales componentes fisiológicamente activos de *G. lucidum* y están presentes en su cuerpo fructífero, micelio, así como sus extractos que han sido ampliamente probados por sus diversas propiedades antitumorales (Kao *et al.*, 2013), pero dentro de los componente de *G. lucidum*, los polisacáridos son considerados como el grupo principal de compuestos activos, estos se encuentran entre el 10-50% de la materia seca de los cuerpos fructíferos y presentan notables propiedades farmacológicas, en particular tienen características inmunomoduladoras y anticancerígenas (Ahmad, 2018), por tanto, se ha incrementado el interés en *Ganoderma* que no solo es un alimento saludable rico en polisacáridos y triterpenoides sino también una fuente de compuestos biológicamente activos de valor medicinal (Zhou, Su & Zhang, 2012), como los compuestos fenólicos cuyos estudios recientes los han reconocido como importantes compuestos bioactivos de *G. lucidum* con propiedades antioxidantes, anticancerígenas y antiinflamatorias que se relacionan principalmente con los posibles beneficios para la salud

frente a las patologías como la hipertensión, la obesidad, las enfermedades cardiovasculares, la diabetes y el cáncer (Veljović *et al.*, 2019), por lo anterior, se ha impulsado considerablemente la atención de *Ganoderma* como potencial en medicamentos, además, en investigaciones preliminares realizadas sobre basidiomicetos se ha encontrado que la proporción de los compuestos activos varía tanto con el estadio del hongo como en el medio que es cultivado (Arango & Nieto, 2015), por tanto, ha despertado el interés en el desarrollo de procesos en cultivo líquido en especial de *G. lucidum*, para la producción comercial de compuestos bioactivos, ya que la cepa de *Ganoderma* es difícil de encontrar en la naturaleza y su cultivo sólido toma meses (Keller, 2009) y las diferencias cualitativas y cuantitativas en la composición química de *Ganoderma* como de sus productos dependen del proceso de extracción y las condiciones de cultivo (Zhou *et al.*, 2012).

2.2.2. Cultivo de *Ganoderma lucidum*

Los cuerpos fructíferos de *G. lucidum* se producen principalmente por cultivo artificial en troncos de árboles de hoja ancha bajo tierra en invernaderos (Hu *et al.*, 2018). Su proceso de producción se divide en los siguientes pasos: preparación de materias primas (corte y selección del tronco de madera), ensacado y atado, esterilización, inoculación, incrustación en suelo (o transferencia a casa de setas), manejo de fructificación y cosecha (Zhou, 2017), en este método se mantienen los parámetros de crecimiento como temperatura, contenido de agua, humedad relativa, pH e intensidad de luz. Este método se utiliza para producir un cuerpo entero de *Ganoderma* y se denomina cultivo tradicional de basidiocarpio (Pinya, Ferriol, Tejada & Sureda, 2019) y desde la década de 1980 se ha empleado este método para la producción de cuerpos fructíferos de *Ganoderma* en muchos países (Zhou, 2017). También se han probado otros métodos como el

cultivo en aserrín al igual que se han probado varios sustratos diferentes, como: residuos de té, cáscara de semillas de algodón, cáscara de semillas de girasol, residuos de mazorcas de maíz, tortas de prensa de aceite de oliva, paja de trigo, etc (Bijalwan *et al.*, 2020). En definitiva, las tecnologías de cultivo consisten en el cultivo tradicional de cuerpos fructíferos en troncos de madera o sobre sustratos a base de residuos (Boh, 2013), pero debido a la baja tasa de transformación de la biomasa, consumo de madera extremadamente elevado, se ha desarrollado cultivos modernos de micelios en biorreactores, por cultivo sumergido en medios líquidos (Boh, 2013).

2.2.2.1. Cultivo sumergido de *Ganoderma lucidum*

La fermentación en estado líquido o fermentación sumergida es llevada a cabo en biorreactores o en matraz de vidrio donde hay por lo menos la misma concentración de agua y de sustrato sólido (nutrientes) en el proceso, es decir, que hay una solución de los nutrientes, del cual microorganismos lo aprovechan para producir biomasa y metabolitos. En el medio líquido los microorganismos se desarrollan flotando en el medio y en el caso de los hongos miceliales, estos pueden formar pequeñas esferas de micelio denominadas “pellets” cuando hay agitación, de otra forma, crecen en la superficie (Arango & Nieto, 2013). Los pellets se caracterizan por el desarrollo de micelios en agregados esféricos estables que consisten en una red de hifas relativamente densa, ramificada y parcialmente entrelazada (Mohtara, Kadir & Saari, 2016).

La fermentación sumergida en biorreactores con composiciones de sustrato optimizadas y parámetros de proceso controlados permite un tiempo de cultivo más corto y una producción a gran escala bajo un control del proceso (Berovic & Podgornik, 2016). En los últimos años, el cultivo sumergido de *G. lucidum* se ha desarrollado para obtener biomasa micelial, ácido ganodérico y polisacáridos que pueden utilizarse para producir medicamentos (Jayasinghe *et al.*, 2008), dado que el cultivo sumergido tiene un gran potencial para una mayor producción de

micelios en un espacio más compacto y más corto, con pocas posibilidades de contaminación, se ha considerado una alternativa prometedora para la producción de polisacáridos y ácidos ganodericos de *Ganoderma*. Por lo tanto, se han realizado varios estudios, como la optimización de las condiciones de fermentación y el desarrollo de nuevas estrategias de bioprocesamiento para aumentar la producción de los metabolitos de *Ganoderma* (Ye, Liu, Xie, Zhao, Wu, 2018).

Dentro de los estudios de optimización para las condiciones de fermentación las variables estudiadas en cultivos sumergidos se encuentran: la temperatura, el pH, la agitación y los medios de cultivo (Arango & Nieto, 2013), como las fuentes de carbono y nitrógeno del cual las fuentes de carbono están muy extendidas, que incluyen como única fuente la glucosa, sacarosa, fructosa, lactosa, azúcar de cebada, entre otras como fuentes de carbono más complejas como: harina de maíz, harina de soja, granos de destilería, etc. En cuanto a los requerimientos de nitrógeno, la fuente de nitrógeno orgánico es más adecuada para la producción de biomasa micelial de *Ganoderma* y polisacáridos extracelulares en comparación con las fuentes de nitrógeno inorgánico (Zhou, 2017). Igualmente, en el cultivo de *G. lucidum*, se han estudiado variables como: el efecto de la concentración de inoculación, oxígeno disuelto, fermentación alimentada por lotes integrada con cambio de pH y transferencia de oxígeno disuelto, entre otras han sido las estrategias para la optimización de la fermentación sumergida de *G. lucidum*, pues su fermentación y control es muy deseado desde una perspectiva industrial (Mohtara, Kadir & Saari, 2016), pero desafortunadamente, muchos estudios se han dedicado a explorar solo la relación entre la morfología del crecimiento y la producción de metabolitos con el efecto de cambiar una variable y no esclarecen el mecanismo subyacente que causa el efecto (Wagner, Mitchell, Sasaki, Amazonas & Berovič, 2003). Por consiguiente, el modelamiento de los cultivos que es útil para el control del proceso como la optimización, también permite la compresión de la dinámica del

proceso (Feng *et al.*, 2014), pues en el modelamiento a menudo implican la introducción de variables de bioprocesos que no se pueden estimar de manera confiable. Sin embargo, a pesar de la gran necesidad de desarrollar procesos de cultivo de biomasa de hongos a gran escala para la producción eficiente de metabolitos útiles, hasta el momento no ha habido reportes de su modelado de bioprocesos, sin mencionar el caso específico de cultivos miceliales de *G. lucidum* (Tang & Zhong, 2004).

2.2.3. Modelado de la cinética de crecimiento micelial

Un modelo matemático es el conjunto de relaciones entre las variables del sistema que se está estudiando para predecir las variables de salida a partir de las variables de entrada (Nielsen, Villadsen & Lidén 2003), pero en el modelamiento matemático no se trata de formar un sistema de ecuaciones extremadamente complejo en un intento de reflejar la realidad, sino el objetivo es reducir un sistema complejo (biológico) a un sistema más simple (matemático) que pueda analizarse con mucho más detalle y a partir del cual se puedan identificar propiedades claves. Por lo tanto, el arte del modelado matemático no se trata de qué incluir, sino de qué se puede omitir (Boswell, Jacobs, Gadd, Ritz & Davidson, 2003). En la fermentación de hongos filamentosos es ampliamente reconocido como un proceso complejo (Cui *et al.*, 1998), por consiguiente, los intentos de modelización matemática del crecimiento micelial se han centrado en el nivel de micelio, utilizando cantidades como el rendimiento de biomasa y formación de producto (Boswell *et al.*, 2003).

Los modelos de crecimiento micelial se refieren generalmente a cultivos sumergidos en fermentadores y la producción de metabolitos para las aplicaciones de la biotecnología (Gutarowska & Żakowska, 2009). El modelamiento describe las relaciones entre las principales

variables de estado y explica cuantitativamente el comportamiento del sistema. Hay dos tipos de modelos disponibles: los estructurados y no estructurados. Los modelos estructurados tienen en cuenta algunos aspectos básicos como la composición de las células y la estructura (Benkortbi, Hanini & Bentahar, 2007), donde la estructura puede ser cualquier cosa, desde sumergir la masa celular en unos pocos compartimentos hasta una vista microscópica de la célula formada por enzimas individuales y grupos macromoleculares (Nielsen *et al.*, 2003), por otro lado, los modelos no estructurados implican solo masa celular para describir el sistema biológico (Benkortbi *et al.*, 2007), es decir la biomasa se describe por una sola variable y no se considera segregación en la población celular, es decir, se supone que la población celular es completamente homogénea (Nielsen *et al.*, 2003). Tanto los modelos estructurados como los no estructurados se han aplicado generalmente para el modelado cinético del crecimiento microbiano, la absorción del sustrato y la formación del producto. Aunque el primero puede describir un sistema microbiano complejo a nivel molecular, los modelos cinéticos no estructurados son relativamente más simples y se han utilizado comúnmente para aplicaciones prácticas (Gharibzahedi, Razavi & Mousavi, 2013), pues los modelos no estructurados pueden describir los perfiles de fermentación de productos como polisacáridos, ácido giberélico, triterpenoides y flavonoides con una precisión satisfactoria (Fei, Li, Zhang & Xu, 2019), además en los procesos fermentativos si el objetivo es modelar la concentración de la biomasa, los modelos no estructurados son suficientes, aunque estos modelos son completamente empíricos, son valiosos para problemas de diseño simples y para extraer parámetros cinéticos claves de la cinética de crecimiento (Nielsen *et al.*, 2003).

En cuanto al modelamiento cinético de crecimiento micelial de hongos, es difícil utilizar un enfoque cinético mediante el modelamiento no estructurado dado a la morfología de crecimiento (Kowalska, Boruta & Bizukojc, 2019) y el metabolismo primario de los hongos que

es más complejo que las bacterias (Wang, Ridgway, Gu & Young, 2008), además la estructura multicelular del micelio, la heterogeneidad morfológica y la heterogeneidad en fisiología y diferenciación a lo largo de la longitud de las hifas y durante la fermentación dificulta la construcción de modelos matemáticos de fermentaciones fúngicas para usar en simulaciones predictivas o control de procesos (Papagianni, 2004). No obstante, en la última década se han publicado unos pocos artículos sobre el modelamiento de crecimiento de hongos (Kowalska *et al.*, 2019), donde se han propuesto expresiones cinéticas diferentes para la tasa de crecimiento específico de la biomasa (Nielsen *et al.*, 2003), con distintos modelos cinéticos como: la ley de la raíz cubica, ley exponencial, ley de crecimiento logístico y la cinética de Monod (Osadolor, Nair, Lennartsson & Taherzadeh, 2017).

La llamada ley de la raíz cúbica se acepta generalmente para describir el crecimiento de los pellets miceliales (Prosser & Tough, 1991). En el cultivo líquido (matraz o fermentador), un organismo micelial puede crecer como fragmentos de hifas dispersos o como pellets (Stanbury, Whitaker & Hall, 2017), pero la formación de pellets miceliales se considera como un requisito previo para la producción exitosa de ciertos metabolitos, por lo tanto, se ha asumido tradicionalmente que los cultivos en pellets siguen la cinética de la raíz cúbica, mediante la siguiente ecuación 1:

$$M^{1/3} = M_0^{1/3} + kt \quad (1)$$

Donde M representa la concentración de la biomasa y k es una constante (Papagianni, 2004). Emerson fue el primero en demostrar una relación lineal entre la raíz cúbica de la concentración de biomasa y el tiempo para cultivos de *N. crassus*, a partir de esto se han observado cinéticas similares para cultivos en pellets de varios hongos (Prosser & Tough, 1991). La cinética de la raíz cubica considera heterogeneidad dentro de los pellets como una masa esférica de micelios

que no crece rodeada por una capa externa de hifas activas. Por lo tanto, se supone que un pellet aumenta de radio a una tasa constante a través del crecimiento exponencial de micelios dentro de la capa exterior de las hifas activas (Papagianni, 2004). El crecimiento exponencial de los pellets será exponencial hasta que la densidad del pellet dé como resultado una limitación de la difusión; bajo tal limitación, la biomasa central del pellet no recibirá un suministro de nutrientes, por lo que el crecimiento del pellet procede de la capa exterior de biomasa que es la zona de crecimiento activo (Stanbury, Whitaker & Hall, 2017).

La cinética de la raíz cúbica se ha observado experimentalmente, pero las dificultades prácticas para medir con precisión las concentraciones de biomasa dificultan la distinción de diferentes tipos de cinética de crecimiento, por lo tanto, se han estudiado otros modelos cinéticos para hongos filamentosos (Papagianni, 2004), entre los que se encuentran los modelos no estructurados de crecimiento de Monod y Logística que se han utilizado ampliamente como ecuaciones básicas para describir el crecimiento micelial en la ingeniería de bioprocesos. En el caso de la ecuación de Monod, la tasa de crecimiento específica está gobernada por un nutriente limitante, con una forma matemática similar a la ecuación de Michaelis-Menten (Xu, 2020). El modelo Monod fue introducido por primera vez por Jacques Monod en 1942 para describir la relación entre la tasa de crecimiento específico y la tasa de utilización del sustrato en un biorreactor. El modelo se define de dos formas: basado únicamente en la concentración de sustrato y basado en la concentración de sustrato y biomasa. Las dos formas del modelo están definidas por las ecuaciones 2 y 3:

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{k_s + S} \quad (2)$$

$$\mu = \frac{\mu_{max} XS}{k_s + S} \quad (3)$$

Donde, $\mu_{\max}$ es la tasa máxima de crecimiento, S concentración de sustrato, K_s la constante de media saturación, μ tasa de crecimiento específicas y X la concentración de biomasa (Muloiwa, Byakika & Dinka, 2020). Para usar el modelo Monod se necesita determinar los valores de $\mu_{\max}$ y K_s , donde una práctica común es graficar la tasa de crecimiento específica versus la concentración del sustrato y mediante el ajuste de la curva se pueden obtener los valores de $\mu_{\max}$ y K_s . Sin embargo, cuando se obtienen de esta manera, estos valores pueden no ser precisos debido al impacto de otros factores como el pH y metabolitos acumulados en la tasa de crecimiento (Hu, 2017), además en el modelo Monod se asume que solo hay un sustrato limitante del crecimiento en el biorreactor (Muloiwa *et al.*, 2020), por lo que el modelo solo será adecuado para describir el crecimiento limitado de la biomasa con poblaciones bajas de microorganismo, y cabe mencionar que en los procesos de fermentación no se ajustan bien (Gu *et al.*, 2006).

En cuanto al modelo logístico que también se conoce como modelo Verhulst, este se basa en la suposición de que la tasa de crecimiento de un organismo es proporcional a la población actual y los recursos no utilizados en un hábitat cerrado (Muloiwa *et al.*, 2020). La ecuación logística se ha utilizado durante muchos años para describir el número de individuos en una población, pero en el caso de los sistemas microbianos, la ecuación se interpreta como la cantidad de biomasa en lugar del número de organismos (Classen, Engler, Kenerley & Whittaker, 2000). El modelo logístico es un modelo independiente del sustrato que describe el crecimiento cinético basado únicamente en la concentración de biomasa. El modelo tiene en cuenta la inhibición del sustrato. El modelo logístico se define mediante la ecuación 4.

$$\mu = \mu_{\max} \left[1 - \frac{x}{x_m} \right] \quad (4)$$

Donde, μ es la tasa de crecimiento específico, X concentración de biomasa, X_m concentración máxima de biomasa y $\mu_{\max}$ es la máxima tasa de crecimiento específico (Muloiwa

et al., 2020). La ecuación logística asume una tasa de crecimiento exponencial, pero incluye un factor que inhibe el crecimiento a medida que aumenta la población (Classen *et al.*, 2000). En el caso de la ecuación logística, la tasa de crecimiento específica que está determinada por la capacidad de carga del sistema, pueden ser los factores inhibidores del crecimiento, es decir, acumulación de sustancias químicas tóxicas, distintos del nivel de nutrientes (Xu, 2020), y a pesar de que varios autores han usado este modelo para predecir la tasa de crecimiento específico, la falta de literatura sobre el desempeño de este modelo hace que sea difícil sacar una conclusión sobre su capacidad para describir el crecimiento cinético (Muloiwa *et al.*, 2020).

Pese a lo anterior, sobre la base del modelo logístico, se desarrolló la ecuación de Luedeking-Piret, combinada de contribuciones asociadas al crecimiento y no asociadas al crecimiento (Fang *et al.*, 2018) y es usada ampliamente para modelar la velocidad de formación del producto metabólico deseado (Benkortbi *et al.*, 2007). En este modelo se establece que la tasa de formación de producto depende tanto de la concentración instantánea de biomasa X como de la tasa de crecimiento dX/dt de forma lineal (Altıok, Tokatli & Harsa, 2006), por lo tanto, se puede usar una ecuación cinética de formación de producto de la siguiente manera (Ec 5):

$$\frac{dp}{dt} = \alpha \frac{dx}{dt} + \beta X \quad (5)$$

Donde P representa la concentración de producto, α es la constante asociada al crecimiento y β es la constante no asociada al crecimiento (Fang *et al.*, 2018). El modelo cinético de Luedeking-Piret fue diseñado originalmente para la producción de ácido glucónico utilizando células bacterianas y afirma que la formación del producto depende del crecimiento microbiano (dX/dt) durante el proceso de fermentación de manera lineal. Desde entonces, la ecuación se ha aplicado para caracterizar la cinética del producto del cultivo en monocultivo de hongos filamentosos bajo fermentación sumergida (Olorunnisola, Jamal & Alam, 2018).

El modelamiento matemático puede ser una herramienta útil para el diseño racional y la optimización de sistemas de cultivo micelial de hongos en fermentación sumergida, pero la selección del tipo de modelo dependerá del propósito final del modelo, la complejidad del modelo, el tiempo de solución y lo más importante la naturaleza de los datos experimentales disponibles (López *et al.*, 2016), pues para la cualquier aplicación de un modelo cinético los datos experimentales brindan parámetros cinéticos, tasas específicas de crecimiento y coeficientes de rendimientos, los cuales deben ser precisos y que se perfeccionan continuamente a medida que se acumulan resultados experimentales. Una vez todos los resultados experimentales están en su lugar, podrán usarse para generar una simulación, calcular el perfil de la tasa de alimentación del sustrato, explorar diferentes escenarios de proceso, probar hipótesis o incluso optimizar el proceso (Hu, 2017), por lo todo anterior, el análisis cinético y el modelado matemático se consideran un paso clave en el desarrollo de los bioprocesos industriales (Gharibzahedi, Razavi & Mousavi, 2013), pero a pesar de la gran necesidad de desarrollar procesos de cultivo miceliales de hongos a gran escala para la producción eficiente de metabolitos, hasta ahora son pocos los informes de modelamiento en bioprocesos, y más particularmente para cultivos miceliales de *G. lucidum* (Feng *et al.*, 2014), un hongo importante de la industria biotecnológica que se encuentra en expansión (Zhou, Su & Zhang, 2012), además, el micelio y sus bioproductos producidos por la fermentación líquida son productos alternativos o sustitutos del cuerpo fructífero que están siendo empleados en la formulación de nutraceuticos y alimentos funcionales (Uriza, 2014).

2.3. Los nutraceuticos y alimentos funcionales a partir de *Ganoderma*

En la actualidad la demanda de productos naturales con actividad farmacológica y usos medicinales está aumentando notablemente, tal es el caso de los hongos del género *Ganoderma*

(Suberu *et al.*, 2014), donde *G. lucidum* es el más reconocido por la industria alimentaria (Marek *et al.*, 2017), el cual es una especie de hongo medicinal que producen efectos beneficiosos en la salud (Wasser, 2014) por lo que se lo considera como un alimento saludable, y también como fuente de compuestos biológicamente activos de valor medicinal (Zhou *et al.*, 2012). Por lo tanto, una nueva clase de productos con nombres diferentes como: suplementos dietéticos, alimentos funcionales, nutraceuticos, micofarmacéuticos, que brindan beneficios saludables a través del uso diario han surgido a base de *Ganoderma* (Wasser, 2014; Zhou *et al.*, 2012; Venturella, Ferraro, Cirlincione & Gargano, 2021), pero, cabe mencionar que son muchas las especies de hongos que se han convertido en suplementos, nutraceuticos y alimentos funcionales en los últimos años. Para algunos hongos, se ha realizado varias investigaciones sobre los posibles beneficios en la salud, mientras que para otros hay muy poco apoyo científico (Frost, 2016), a pesar de lo anterior, los hongos se han venido convertido en una importante materia prima para el desarrollo de suplementos dietéticos, alimenticios y funcionales (nutraceuticos) (Morris *et al.*, 2016).

En el caso de los hongos, los términos "nutraceutico" y "alimento funcional" son sinónimos (Morris *et al.*, 2016), pues un alimento funcional es aquel que contiene uno o más compuestos biológicamente activos y tiene un beneficio fisiológico en la salud de los organismos, además de su valor nutricional (Espinosa *et al.*, 2021), mientras que el término nutraceutico se define igual como "un alimento (o parte de un alimento) que proporciona beneficios médicos o a la salud, incluida la prevención y/o tratamiento de una enfermedad". Según estas definiciones, un alimento funcional sería un tipo de nutraceutico y en algunos países los dos términos se usan indistintamente (Morris *et al.*, 2016), no existe una definición legislativa de los términos (Bigliardi & Galati, 2013) y en términos generales, los nutraceuticos abarcan los alimentos funcionales, los componentes activos de los alimentos funcionales, los suplementos dietéticos y los alimentos medicinales

(Bishop, Kao, Xu, Glucina, Paterson & Ferguson, 2015), pero en la comunidad científica de los hongos, el término nutraceutico y en específico "nutraceutico de hongos" es un extracto refinado o parcialmente refinado de la biomasa seca del micelio o del cuerpo fructífero de un hongo, que se consume en forma de cápsulas o tabletas como suplemento dietético (no como alimento) y tiene posibles aplicaciones terapéuticas (Morris *et al.*, 2016). Tal es el caso de *G. lucidum* que se ha convertido en un nutraceutico popular en todo el mundo (Yang *et al.*, 2019), y su polvo seco y los extractos acuosos o etanólicos se utilizan en todo el mundo como suplementos dietéticos (Gargano *et al.*, 2017), y se venden en una forma que permite la dosificación (tabletas, cápsulas, líquidos en dosis específicas) (Ratajczak, Kaminska, Błaszkiwicz & Matysiak, 2020).

Pero a pesar de que lo común es el empleo del micelio o carpóforos deshidratados y empacados en tabletas como suplementos, alrededor del mundo pocos estudios han realizado la inclusión de los carpóforos o micelios a los alimentos con el fin de adicionar un elemento funcional al alimento (Suárez, 2012), de esta forma los alimentos convencionales se convierten en funcionales al estar fortificados con compuestos beneficiosos que aumentan su actividad funcional (Espinosa *et al.*, 2021). Los alimentos desarrollados abarcan desde yogures, bebidas alcohólicas, productos cárnicos, de panadería, así como salsas para sazonar alimentos. La mayoría de los alimentos corresponden al resultado de tecnologías de fermentación en las que el micelio y el carpóforo son aprovechados para la producción de alimentos mediante la adición de éstos a un alimento, previa deshidratación del material fúngico (Suárez, 2012).

Por lo tanto, desde el año 2005, se han registrado entre 250 y 350 patentes para productos y procesos de *G. lucidum* (Wasser, 2014), pues el número creciente de publicaciones científicas, las nuevas posibilidades tecnológicas para el cultivo comercial y el uso de hongos de la especie de *Ganoderma* ha sido los motivos que han dado lugar a las numerosas patentes. Las invenciones se

refieren principalmente a nuevos métodos de cultivo biotecnológico de cuerpos fructíferos y/o biomasa micelial, extracción y aislamiento de compuestos activos, preparación de formulaciones, aplicaciones en productos farmacéuticos o complementos alimenticios y diversos métodos para aumentar o apoyar la inmunidad del organismo por *G. lucidum* en preparaciones solas o en combinación con otros productos farmacéuticos (Boh, 2013).

De los productos a base de *Ganoderma* que existen en el mercado aproximadamente el 80 al 85% se derivan de los cuerpos fructíferos del hongo provenientes de cultivos comerciales o recolectados del medio silvestre (Chang, 2008), mientras que el 15 al 20% de los productos de *Ganoderma* se basan en extractos miceliales y en un menor porcentaje se basan en filtrados de cultivos líquidos, teniendo como ventaja estos cultivos que es el método principal para la producción a gran escala de compuestos bioactivos de *Ganoderma* en la industria (Zhou *et al.*, 2012), pero hay relativamente pocos estudios sobre extractos de micelio cultivado en medio líquido (Paterson, 2006). No obstante, se han realizado investigaciones para obtener suplementos nutritivos a partir de la biomasa micelial de *G. lucidum* y han demostrado que el valor nutritivo de la biomasa micelial es enorme debido al contenido de proteínas, carbohidratos y sales minerales (M. Petre, V. Petre, Teodorescu & Pătrulescu, 2013), por lo tanto, la biomasa micelial ha ganado interés como productos alternativos o sustitutos de cuerpos fructíferos, para uso en la formulación de nutraceuticos y alimentos funcionales (Heleno, Barros, Martins, Queiroz, Buelga & Ferreira, 2012).

La ventaja de utilizar la biomasa micelial en lugar de los cuerpos fructíferos como fuente de compuestos bioactivos, es que se garantiza un producto más confiable con un mayor nivel de control de su composición (Antunes *et al.*, 2020), por lo tanto, el desarrollo de micelio en tipo de hifas o pellets está siendo utilizado por las compañías farmacéuticas para desarrollar suplementos

dietéticos/nutracéuticos y para extraer polisacáridos, compuestos bioactivos, antioxidantes, sabores, etc. Aunque el uso de micelio de hongos en este contexto se ha explorado con éxito, los estudios se limitan a unas pocas variantes de productos y se ha prestado relativamente menos atención al valor nutritivo de los micelios de hongos cultivados en cultivo sumergido (Rathore *et al.*, 2019).

Sin embargo, estudios previos indican que la biomasa micelial es eficaz en la formulación de alimentos, debido a que ofrece una mezcla de compuestos bioactivos saludables y aprovechables (Zhou, Su & Zhang, 2012), además entre los diferentes compuestos de la biomasa micelial se encuentran los polifenoles, y son los principales componentes antioxidantes naturales (Cheng *et al.*, 2013) que pueden ser usados para mejorar el contenido antioxidante a los alimentos (Lu *et al.*, 2020), pues al ser una fuente potencial de importantes antioxidantes puede usarse como alimento nutracéutico y/o funcional (Heleno *et al.*, 2012). Igualmente el consumo de biomasa de hongos por vía oral es eficaz al promover una mejor ingestión y absorción de polisacáridos a nivel intestinal, aportando en un alto porcentaje al sistema inmunológico (Barros *et al.*, 2016); por otro lado, los compuestos bioactivos de *G. lucidum* en varios solventes presentan actividad anti-diabética, antioxidante y actúan como eliminadores de radicales libres (Sharif, Shahid, Mushtaq, Akram & Rashid, 2017), y están relacionados con su mecanismo terapéutico para prevenir y tratar enfermedades, como bronquitis crónica, hipertensión, hiperlipidemia, diabetes, hepatitis, patología tumoral y envejecimiento (Lin, & Deng, 2019). Lo anterior, respalda la importancia del desarrollo de métodos alternativos para la producción de biomasa micelial (Liu & Zhang, 2018), pero sobre la adición del polvo de micelio para producir productos alimenticios funcionales que hay pocos estudios y se necesita más investigación para ser adoptados por las industrias de procesamiento de alimentos, de modo que puedan ser mejor aprovechados (Rathore *et al.*, 2019).

2.4. Propiedades antioxidantes de *Ganoderma lucidum*

Dada la mayor demanda e importancia de los antioxidantes naturales en la vida cotidiana, la búsqueda de compuestos naturales eficaces, no tóxicos con actividad antioxidante se ha convertido en un tema de interés cada vez mayor (Smina, Mathew, Janardhanan & Devasagayam, 2011), pues los antioxidantes naturales tienen la capacidad de proteger a los organismos y las células del daño provocado por el estrés oxidativo, el cual causa envejecimiento y enfermedades degenerativas. Al igual que las plantas, los hongos acumulan una variedad de metabolitos secundarios con actividad antioxidante (Kalyoncu, Oskay & Kayalar, 2010) y recientemente se ha informado que varios hongos polypolares medicinales poseen una actividad antioxidante significativa (Smina *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2019), como *G. lucidum* cuya actividad antioxidante se ha relacionado con la presencia de compuestos de bajo peso molecular como los polifenoles y también al contenido de triterpenos y polisacáridos de alto peso molecular (Santillán, Ovando, Delgadillo, Garza, Bautista & Valencia, 2017). Los diversos metabolitos secundarios están presentes tanto en el micelio como en los carpóforos, que pueden actuar de manera sinérgica o no sinérgica, sobre diversas funciones biológicas del organismo humano (Venturella *et al.*, 2021).

Entre los diversos compuestos bioactivos de *G. lucidum* (incluidos triterpenoides, esteroides, polisacáridos, taninos y ácidos grasos), los polisacáridos y los compuestos fenólicos se consideran componentes activos y se informa que poseen muchos efectos beneficiosos, como antitumorales, cardiovasculares, respiratorios (Thuy & Tuyen, 2015), además diversos estudios han concluido que los polisacáridos de *G. lucidum* son potentes antioxidantes (Wu & Wang, 2009) y sus compuestos triterpénicos tiene alta actividad captadora de radicales libres, que son utilizados como mecanismo de defensa contra sustancias oxidantes (Wang, X. Liu, Lian, Ke & J. Liu, 2019). Los

radicales libres y las especies reactivas de oxígeno, se producen como productos secundarios de varios procesos metabólicos, pueden dañar gravemente las células a través de los procesos de oxidación. La presencia a largo plazo de radicales libres y especies reactivas de oxígeno acelera el envejecimiento y numerosas enfermedades asociadas a la edad (Cör, Knez & Hrnčič, 2018), por lo tanto, la eliminación de radicales libres es el factor principal para controlar el proceso degenerativo o patológico de varias enfermedades graves en el cuerpo humano, como el envejecimiento, cáncer, Alzheimer, enfermedades del corazón, los trastornos neurodegenerativos, aterosclerosis e inflamación (Rawat, Mohsin, Negi, Sah & Singh, 2013), por consiguiente, los efectos de eliminación de radicales libres por *G. lucidum* están relacionados con su mecanismo terapéutico para prevenir y tratar dichas enfermedades (Lin & Deng, 2019) y la función principal de los productos de *G. lucidum* es inhibir las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Rawat, Mohsin, Negi, Sah & Singh, 2013; Lin & Deng, 2019), mediante la actividad de varios de sus compuestos como los fenólicos, polisacáridos y triterpenos (Oludemi *et al.*, 2018).

La medición de la actividad antioxidante se realiza por varios métodos químicos diferentes, como la actividad de eliminación de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), poder reductor, capacidad quelante, actividad de eliminación de radicales hidroxilo, actividad captadora de radicales superóxido y actividad captadora del peróxido de hidrógeno, entre otros, pero en cada método la actividad antioxidante puede arrojar resultados diferentes dependiendo del método empleado, por lo tanto, es aconsejable un enfoque con múltiples ensayos (Cör *et al.*, 2018), pues la medición de la actividad antioxidante en un ensayo individual refleja solo la reactividad química bajo ciertas condiciones de la prueba, por lo que es inapropiado generalizar los datos de un método de medición en particular como indicador de la actividad antioxidante total, por ende se deben

realizar ensayos más profundos de actividad antioxidante que impliquen varios métodos de la actividad antioxidante (González, 2017).

2.5. Marco de Referencia, Antecedentes del Tema

2.5.1. Aplicaciones de *G. lucidum* a los alimentos

Como ya se mencionó anteriormente lo común de *G. lucidum* es encontrar su polvo seco bien sea del cuerpo fructífero o micelio en forma de cápsula, que se emplea como un nutraceutico. Por tanto, desde principios de la década de 1970, el cultivo de *G. lucidum* se ha convertido en una fuente importante de hongos (Galor, Yuen, Buswell & Benzie, 2011), debido a la alta demanda en el mercado global (Hassan *et al.*, 2019), en el que hoy en día existen innumerables suplementos de *Ganoderma* (Venturella *et al.*, 2021). Sin embargo, en la actualidad, se están explorando aplicaciones novedosas para los alimentos macrofúngicos basados en el cuerpo fructífero y los micelios para mejorar el sabor y la nutrición de los alimentos (Lu *et al.*, 2020).

La aplicación de los hongos en los alimentos procesados se realiza de forma directa como ingrediente o de forma indirecta como fuente de fermentación (Moon & Lo, 2013). Una forma directa de aplicación de los hongos es su utilización en productos a base de harina como panes y galletas, que mejoran el contenido antioxidante y nutricional (Lu *et al.*, 2020). Por ejemplo, en Corea, se ha empleado extractos *G. lucidum* durante el proceso de elaboración de pan para producir un producto saludable con una textura mejorada (Nguyen, Johnson, Jeffery, Danner & Bastian, 2018), por otra parte, una forma indirecta de aplicación de los hongos, el uso de *G. lucidum*, en la fermentación de leche de soja, cuyo producto mostró una mejor aceptabilidad y mayores propiedades para la salud después de la fermentación por *G. lucidum* (Moon & Lo, 2013).

La investigación, el aseguramiento de la calidad y el control de los productos de *Ganoderma* dependen del aislamiento/purificación de los ingredientes activos y las separaciones analíticas/preparativas (Paterson, 2006). Compuestos puros o extractos, por ejemplo, extractos ricos en β -glucano de *G. lucidum* se utilizan como suplemento dietético, pero también tienen potencial de uso como ingrediente alimentario (Lu *et al.*, 2020). Los β -glucanos son polisacáridos de β y D-glucosa, que se encuentran de forma natural en la pared celular de los hongos (Hwang *et al.*, 2018) y actualmente están siendo empleados como extractos de inclusión en algunos alimentos. Un estudio evaluó la inclusión de β -glucanos de *Ganoderma* en yogur batido en cinco niveles de concentración (0-1,25%) en dos momentos diferentes de adición (antes de la pasteurización, y después de la inoculación), los resultados indicaron que ni el nivel de concentración ni el momento de adición afectan significativamente las propiedades microbiológicas y sensoriales del yogur. Además, la concentración de β -glucanos fue mantenida durante la vida útil del producto, lo cual indicó que es posible elaborar un yogur funcional con β -glucanos derivados de *G. lucidum*, aportando beneficios potenciales para desarrollos científicos e industriales (Uriza, 2014), pese a lo anterior, la aplicación de *G. lucidum* como extracto en los alimentos es limitada, no ha sido ampliamente investigada (Tabares & Toro, 2013) y representa un desafío adicional, ya que en el empleo de extractos de polisacáridos fúngicos en una matriz alimentaria en el procesamiento de los alimentos se pueden tener interacciones con otros componentes alimentarios que influyen en la eficacia de los polisacáridos en el producto alimenticio (Giavasis, 2014).

Además, uno de los principales problemas en la obtención de polisacáridos bioactivos de hongos y su incorporación en alimentos es la dificultad en la liberación de dichos compuestos a partir de la ubicación intracelular y la matriz compleja del cuerpo fructífero, pues los métodos convencionales de extracción de polisacáridos de hongos, como la extracción con agua caliente

(HWE) y la extracción ácida o alcalina (AE), requieren un tiempo de tratamiento prolongado (hasta 24 h) y una temperatura de funcionamiento alta (50 -100 °C), lo que provoca la coagulación de las proteínas, la modificación estructural del polisacárido y la degradación de los compuestos sensibles a la temperatura; mientras que el tiempo de tratamiento prolongado provoca la liberación de grandes cantidades de componentes indeseables de la pared celular (Leong, Yang & Chang, 2021), pero debido al constante uso de extractos de *G. lucidum* para la producción de alimentos y nutraceuticos, se han intensificado las investigaciones en nuevos métodos de extracción más rápidos y eficientes. Los extractos empleados para el desarrollo de nuevos productos con características funcionales mejoradas, son en forma de jarabe o polvo concentrado (Veljović *et al.*, 2019). No obstante, la separación de componentes individuales es difícil, requiere mucho tiempo y es costoso; por lo tanto, las industrias solo buscan el aislamiento aleatorio de compuestos en forma de extracto crudo de hongos (Sudheer *et al.*, 2019).

En los últimos años, ha sido un desafío desarrollar metodologías para la obtención, recuperación, extracción y análisis de compuestos bioactivos de *G. lucidum* (Sudheer *et al.*, 2019), por lo que la investigación en la tecnología de producción de bioactivos para que sea rentable, se ha centrado en la producción en masa de micelio de *Ganoderma* utilizando un tanque de fermentación en medio líquido (Li, Dong, Wen & Liu, 2016), ya que los altos costos de producción o purificación, bajos rendimientos o erráticos y características químicas inestables (es decir, composición), han hecho viable la producción de biomasa micelial (Giavasis, 2014) en parte dado a que *G. lucidum* la producción de compuestos bioactivos como los polisacáridos en cultivos sumergidos requieren menos pasos y el proceso de extracción es más simple (Y. Jeong, S. Jeong, Yang, Islam & Song, 2009), pues en la fermentación sumergida, se recupera la biomasa generalmente por filtración bajo succión o centrifugación y cuando se pretende cuantificar la

biomasa, ésta se filtra a través de un papel de filtro previamente pesado o una membrana con un tamaño estándar de poro. Algunos autores filtran la biomasa, la lavan con agua destilada, centrifugan y luego secan la biomasa hasta peso constante a temperaturas que van desde los 50 a los 105 °C (Wagner *et al.*, 2003); esta biomasa seca, la emplean directamente a una matriz alimentaria o se obtiene un extracto y/o se extrae algún compuesto bioactivo individual (Kalyoncu, Oskay & Kayalar, 2010). Por lo anterior, las investigaciones han dirigido sus esfuerzos en la producción de sustancias bioactivas en fermentación sumergida, principalmente mediante el estudio de las condiciones de cultivo y los medios formulados para producir biomasa y metabolitos, empleados en el desarrollo de productos basados en micelios como los alimentos macrofúngicos. Actualmente los estudios de crecimiento micelial de *G. lucidum* en función de la composición cualitativa del medio nutritivo ha tomado gran importancia y está siendo ampliamente investigada (Avtonomova, Krasnopol'skaya & Maksimov, 2006).

2.5.2. Fuentes no convencionales en el cultivo sumergido de *Ganoderma lucidum*

La fermentación sumergida de *Ganoderma* es una alternativa prometedora porque tiene un ciclo de producción más corto, un mayor rendimiento del producto, una calidad constante y un costo más bajo (Li, Dong, Wen & Liu, 2016), por lo anterior los productos a base de micelios y caldos de cultivo de *G. lucidum* han adquirido una mayor importancia (Galor *et al.*, 2011). En la fermentación sumergida varios autores han utilizado diferentes composiciones de sustrato para el cultivo de *G. lucidum* (Boh *et al.*, 2007), pero para la producción de biomasa de hongos medicinales, las fuentes de carbono más utilizadas son glucosa, maltosa, galactosa y lactosa, compuestos puros que incrementan los costos de obtención de biomasa micelial y de bioactivos (Zapata *et al.*, 2007). Sin embargo, son pocos los estudios en el que se ha utilizado fuentes de

carbón poco convencionales en el cultivo sumergido de *G. lucidum*. Ciu *et al* (2015) evaluó cinco fuentes de carbón (glucosa, extracto de maíz en polvo, mosto, sacarosa y almidón soluble) en el cultivo sumergido de *G. lucidum*, la biomasa micelial y la producción de triterpenoides intracelulares se utilizaron como indicadores de selección. En la fermentación sumergida de *G. lucidum* utilizando mosto se obtuvieron 1,87 g/100mL y 93,21 mg/100mL de biomasa micelial y triterpenoides intracelulares, respectivamente. Los autores establecieron que el mosto, que es barato y abundante, puede reemplazar a la glucosa más comúnmente utilizada como única fuente de carbohidratos en la fermentación sumergida de *G. lucidum*. Por otra parte, Wang *et al* (2018) evaluaron el crecimiento de *G. lucidum* en jugo de caña de azúcar durante 14 días, encontrando que las concentraciones de sacarosa en el jugo de caña se redujeron por debajo de 15 g/L durante los 14 días de fermentación y que *G. lucidum* puede convertir efectivamente el azúcar en polisacáridos y proteínas funcionales indicando que el jugo de caña de azúcar es un medio de cultivo adecuado para *G. lucidum*. Otra fuente no convencional poco estudiada ha sido el permeado de suero de leche como medio de crecimiento alternativo para el cultivo de micelios de *G. lucidum*, investigadores han encontrado las condiciones óptimas de: concentración de sustrato (25 a 45 g de lactosa / L), pH (3,5 a 5,5) y temperatura (25 a 35 °C), para el crecimiento micelial máximo, lo que da resultados promisorios que benefician el uso de este subproducto de la industria de fabricación de queso (Behera & Gupta, 2015). En cuanto a fermentaciones líquidas de *Ganoderma* en Colombia, han sido muy escasas las investigaciones y aún más el estudio de medios no convencionales, en este campo se han realizado estudios con *Ganoderma sp*, aislado de la región andina, para la producción de polisacáridos, utilizando como sustrato un residuo lignocelulósico de la industria agrícola suplementado con glucosa y lactosa, en este estudio encontraron que las condiciones más adecuadas y viables para la producción de biomasa y polisacáridos de *Ganoderma*

sp., son: 10 días de incubación, lactosa 10%, pH=4,0, T= 30°C, 300 rpm y 1 vvm (volumen de aire por volumen de medio por minuto) (López *et al.*, 2016).

En este contexto se puede decir que la fermentación líquida con fuentes no convencionales brinda la oportunidad de optimizar los rendimientos, además, como la mayoría de los metabolitos se sintetizan extracelularmente, su recuperación también es mucho más sencilla. Sin embargo, la eventual explotación de la fermentación líquida estará determinada por su productividad y eficacia biológica (Antunes *et al.*, 2020), pero cabe mencionar que el cultivo sumergido de macrohongos da como resultado un procesamiento mucho más rápido y, por lo tanto, ofrece una herramienta prometedora para la producción industrial de compuestos bioactivos de valor agregado. No obstante, todavía existe una gran necesidad de una investigación exhaustiva sobre los sistemas de cultivo en medio líquido que garanticen la efectividad de los bioprocesos (Jaros, Köbsch & Rohm, 2018).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Evaluar la cinética de optimización y la calidad química de la biomasa micelial de *Ganoderma lucidum* obtenida por fermentación en medio líquido con residuos de café y el efecto sensorial por su inclusión en una bebida de café de origen nariñense.

3.2. Objetivos específicos

- Evaluar la cinética de optimización de la producción de biomasa micelial y polisacáridos totales de *Ganoderma lucidum*, obtenidos por fermentación líquida con residuos de café.
- Determinar la actividad antioxidante, la cuantificación de fenoles totales y el análisis por FTIR del extracto acuoso del micelio de *Ganoderma lucidum*, producido en condiciones de optimización.
- Determinar el perfil sensorial de la bebida de café nariñense, con adición de biomasa micelial de *Ganoderma lucidum* producido en condiciones de optimización, en diferentes concentraciones.

4. METODOLOGÍA

4.1. Localización de la investigación

Las pruebas de laboratorio como de los cultivos *in vitro* y líquido se desarrollaron en el laboratorio del grupo de Investigación en Biotecnología Agroindustrial y Ambiental (BIOTA) de la Universidad de Nariño.

4.2. Diseño Experimental

Se estudiaron las condiciones de optimización de la producción de biomasa y polisacáridos totales solubles en agua de *G. lucidum* en función de su medio de fermentación. Para el diseño experimental se desarrolló un diseño central compuesto 2^3 con base en la metodología de superficie de respuesta con 5 puntos centrales y cuatro puntos axiales, empleando la biomasa micelial producida y polisacáridos totales como respuesta, evaluando los factores de pH, fuente de carbono (cascarilla de café) y fuente de nitrógeno (extracto de levadura), para la optimización del medio de cultivo de *G. lucidum*. Los resultados se analizaron de acuerdo a los valores obtenidos en el ANOVA, mediante el empleo del paquete estadístico (STATGRAPHICS CENTURION XVI) con un nivel de significancia menor o igual a 5%.

4.3. Adquisición del residuo de café

La cascarilla de café (Figura 3) se adquirió de los cultivos de café variedad Colombia de la finca El Mango, ubicada en el corregimiento de Tunja Grande municipio de la Florida, departamento de Nariño.



Figura 3. Cascarilla de café empleada en este estudio. (Fuente: Esta investigación)

4.4. Métodos empleados

4.4.1. Cultivo *in vitro* de *G. lucidum*

Para el desarrollo del cultivo sumergido primeramente se obtuvo micelio *in vitro* a partir del cuerpo fructífero de *G. lucidum* (Figura 4a). Los cuerpos fructíferos empleados en la investigación fueron de la cepa de *G. lucidum* WC806 de la Universidad de Pensilvania, la cual se adquirió de la Universidad de Caldas. Los cuerpos fructíferos del hongo se trasladaron al Laboratorio del Grupo de Investigación en Biotecnología Agroindustrial y Ambiental (Biota) de la Universidad de Nariño, se desinfectaron y conservaron en refrigeración hasta los posteriores ensayos. En el cultivo *in vitro* se tomó un pequeño trozo de tejido interno del carpóforo de *G. lucidum* y se colocó en un medio de agar papa dextrosa (PDA) esterilizado en placas de Petri (Figura 4b), el medio inoculado se incubó a 25-30 °C durante 14 días hasta invasión completa del micelio. La incubadora empleada en la investigación fue adaptada a escala de laboratorio; la cual fue construida con recipientes plásticos y el control de la temperatura se realizó mediante un termostato digital w1-209 (Figura 4c).

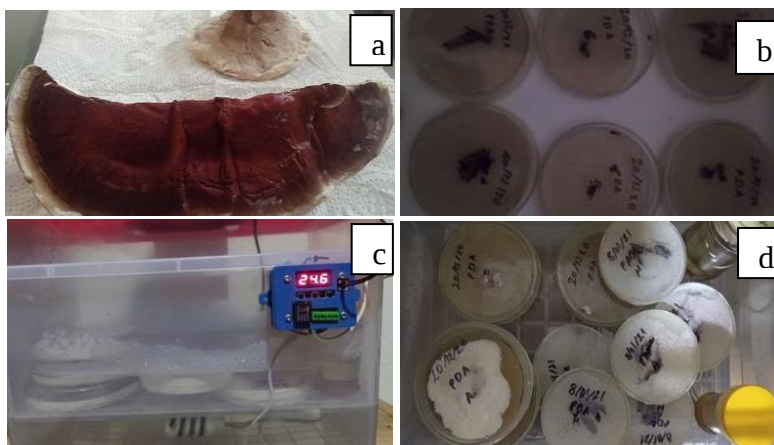


Figura 4. Cultivo *in vitro*. a) Cuerpo fructífero de *G. lucidum*. b) Tejido interno de *G. lucidum* en caja Petri con PDA. c) Incubadora adaptada a laboratorio. d) Invasión micelial. (**Fuente:** Esta investigación)

Una vez lograda la invasión completa del micelio de *G. lucidum* en cajas Petri, estos se llevaron a refrigeración hasta los posteriores ensayos de inoculación al medio líquido.

4.4.2. Acondicionamiento de los residuos de café y su montaje en fermentación líquida para la producción de biomasa micelial de *G. lucidum*

La cascarilla de café se lavó y secó al ambiente; una vez seca se molió en un molino manual marca Corona y se tamizó a través de un tamiz de malla 40 para obtener un polvo fino (Liu & Zhang, 2019). Este polvo fino se adicionó al medio líquido para el cultivo sumergido de *G. lucidum*, que se llevó a cabo en recipientes de vidrio de 100 mL (Figura 5), en el medio previamente esterilizado en autoclave a 1 atm y 121 °C durante 15 min (Giorgio *et al.*, 2015). Para la inoculación se utilizó como inóculo un cubo de 1x1 cm de micelio de *G. lucidum* en PDA el cual se transfirió asépticamente al medio de fermentación líquido previamente acondicionado (Kausar *et al.*, 2019). En los recipientes además se introdujo una esfera de cristal que permitió realizar una agitación manual. Los matraces inoculados se mantuvieron a 28 °C por 14 días, tiempo requerido para el desarrollo del micelio.

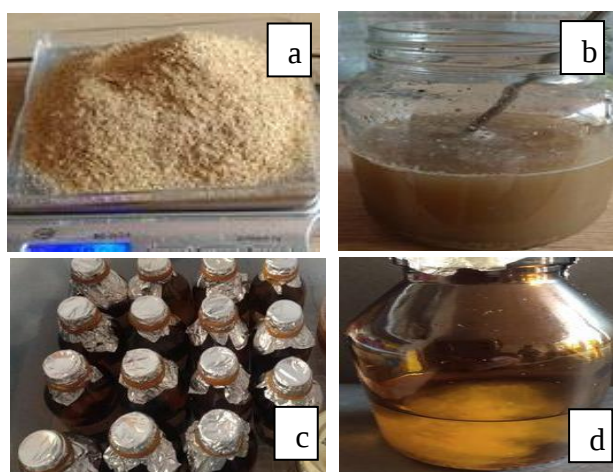


Figura 5. Fermentación líquida de *G. lucidum*. a) Adecuación cascarilla de café. b) Preparación del medio líquido con el residuo de café. c) Medio líquido preparado con inoculación de micelio en PDA de *G. lucidum*. d) Formación del micelio en el medio líquido. **(Fuente:** Esta investigación)

El medio de fermentación líquido de *G. lucidum*, se preparó con algunas modificaciones de acuerdo a la metodología empleada por Tang y Zhong (2002), con los siguientes componentes: sacarosa, 35g/L; KH_2PO_4 , 1g/L; MgSO_4 , 0,5g/L. Se aclara en el medio líquido el componente de sacarosa, se lo hace como suplemento, pero en este caso se empleó azúcar de cocina. En un medio líquido donde se trabaje con una fuente de carbono compleja se suplementa con un carbohidrato (sacarosa) con el objetivo de activar la cepa y darle oportunidad para su adecuación a la nueva fuente de carbono más compleja (Vega, 2016). El medio con los componentes mencionados, se los complemento con polvo de cascarilla de café y extracto de levadura, ya que el objetivo de esta investigación fue la optimización de la producción de biomasa micelial y de polisacáridos en función de la composición del medio, donde las variables de: cascarilla de café como fuente de carbono, extracto de levadura como fuente de nitrógeno y modificación del pH inicial del medio; los niveles se usaron con base en los valores usados por Cui *et al.* (2015): 3,5-4,5% de fuente carbono, 1,5-2,3% de extracto de levadura y pH de 5-6; el pH fue ajustado con ácido láctico antes de la esterilización. La matriz experimental se indica en la Tabla 1. Para cada variable a analizar se realizaron dos réplicas para un total de 38 corridas experimentales.

Tabla 1.

Matriz experimental

No Corridas	%Cascarilla (A)	%Extracto levadura (B)	pH (C)
1	4	1,9	5,5
2	4	1,9	5,5
3	4	1,9	5,5
4	4	1,9	5,5
5	4	1,9	5,5
6	3,5	1,5	5
7	4,5	1,5	5
8	3,5	2,3	5

(Continúa)

Tabla 1. (Continuación)

No Corridas	%Cascarilla (A)	%Extracto levadura (B)	pH (C)
9	4,5	2,3	5
10	3,5	1,5	6
11	4,5	1,5	6
12	3,5	2,3	6
13	4,5	2,3	6
14	3,16	1,9	5,5
15	4,84	1,9	5,5
16	4	1,23	5,5
17	4	2,57	5,5
18	4	1,9	4,66
19	4	1,9	6,34

Fuente. Esta investigación

Una vez desarrollado el micelio en los medios preparados acorde a la matriz experimental, se realizó la determinación de la biomasa micelial y la determinación de polisacáridos totales solubles en agua.

4.4.3. Determinación de biomasa micelial

La biomasa obtenida en las diferentes corridas de la matriz experimental (Tabla 1), se filtró a través de papel de filtro Whatman No. 1 (Figura 6). La biomasa obtenida se lavó con agua destilada hasta obtener un filtrado transparente, luego se secó en estufa hasta peso constante a 50 °C (Feng, Li, Wu, Cheng & Ma, 2010). Se registró el peso y luego se molió cada muestra hasta obtener un polvo fino, el cual se almacenó para las posteriores pruebas químicas.



Figura 6. Determinación de la biomasa. a) Filtración de la biomasa. b) Peso de la biomasa seca. (**Fuente:** Esta investigación)

4.4.4. Determinación de polisacáridos totales solubles en agua

La evaluación de los polisacáridos totales solubles en agua se basó en el color de reacción de los polisacáridos y sus derivados con fenol y ácido sulfúrico concentrado (Prasetyo, Jatmiko, Poeloengasih & Kismurtono, 2017). Para esto, el polvo de biomasa micelial de *G. lucidum* (100 mg) se sometió a extracción con agua caliente a 95°C; del extracto acuoso de biomasa de *G. lucidum* se tomó 10 ml y se añadió 1 ml de fenol al 5% (Figura 7). La mezcla se agitó durante 2 min, luego se añadió a la solución 5 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) (98% v / v) y se agitó durante 5 min. La concentración de polisacáridos solubles en agua en la solución de extracto se determinó cuantitativamente midiendo la absorbancia a 490 nm. La curva estándar para la determinación de polisacáridos totales solubles en extracto acuoso de *G. lucidum* se cuantificó usando glucosa grado analítico y agua destilada como solución en blanco (Prasetyo *et al.*, 2017).

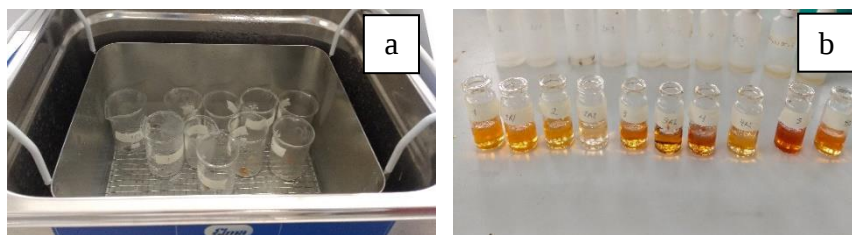


Figura 7. Determinación de polisacáridos totales solubles en agua de *G. lucidum*. a) Obtención de extractos. b) Rx de extractos acuosos con fenol y ácido sulfúrico listas para medición de absorbancia. (**Fuente:** Esta investigación)

4.4.5. Modelado de la cinética de crecimiento de *G. lucidum*

Una vez determinados los puntos óptimos de producción de biomasa micelial y polisacáridos totales de *G. lucidum* en función de su medio, se tomaron los puntos que maximizan su producción, para el estudio del modelado de crecimiento micelial mediante la cinética de la raíz cúbica y la ecuación logística de no linealidad y para la formación de producto (polisacáridos totales) se basó en la ecuación de Luedeking-Piret. Para el estudio del modelo cinético se corrieron múltiples matraces al mismo tiempo y se tomaron dos matraces para el muestreo diario por separado hasta la invasión del micelio en el medio.

4.4.5.1. Estudio del modelado cinético de crecimiento micelial

La relación matemática de producción micelial de *G. lucidum* es muy interesante para predecir y controlar el proceso en la fermentación industrial. Se asume tradicionalmente que los cultivos en pellet siguen la cinética de la raíz cúbica. Por lo tanto, para la presente investigación se utilice la expresión biocinética de Emerson para el modelado del crecimiento cinético de *G. lucidum* (Feng, Li, Wu, Cheng & Ma, 2010), pero para tener un mejor ajuste de los modelos de cinética de crecimiento también se empleó la ecuación logística de no linealidad. Las ecuaciones se indican a continuación:

Ecuación 1 ya mencionada anteriormente para la cinética de la raíz cúbica, expresión de Emerson:

$$M_t^{1/3} = k_c t + M_0^{1/3} \quad (1)$$

Donde M es la biomasa (g/l), k_c es una constante ((g/l)^{1/3} · h)), y t es el tiempo de fermentación (h) (Narkprasom, Guo, Huang, & Guu, 2012).

Ecuación 6 logística de no linealidad:

$$y = \frac{A}{(1+B_e^{-kx})} \quad (6)$$

Donde y es el crecimiento expresado como peso seco del micelio (g/l), A es la tasa de crecimiento máxima de la variable dependiente a modelar (g/l), B es la escala constante de la ecuación, k es la relación relativa instantánea tasa de crecimiento de la ecuación, e es la base logarítmica natural (Wang *et al.*, 2018).

4.4.5.2. Modelado de la formación del producto

La cinética de la producción de polisacáridos totales se basó en la ecuación de Luedeking-Piret, que son usadas para modelar el crecimiento celular y la tasa de formación del producto metabólico deseado, pues a partir de este se puede describir las relaciones entre las principales variables de estado y se explica cuantitativamente el comportamiento del sistema (Benkortbi, Hanini & Bentahar, 2007). Por lo tanto, la cinética de generación de polisacáridos, se basó en la siguiente ecuación:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dx}{dt} + \beta \quad (5)$$

Donde P representa la concentración del producto, α es la constante asociada al crecimiento para la ecuación de Luedeking-Piret, y β es la constante no asociada al crecimiento (Feng J, Feng N, Zhang, Yang, Jia & Lin, 2016).

Las ecuaciones (1), (6) y (5) se utilizaron para modelar los resultados experimentales, la estimación de parámetros cinéticos de crecimiento micelial, como de formación de producto de las ecuaciones mencionadas, se realizó mediante el software MATLAB R2014. En todos los casos se tomaron dos repeticiones ($n = 2$) durante los diferentes tiempos de crecimiento micelial.

4.4.6. Cuantificación de polifenoles totales y la actividad antioxidante de la biomasa de *G. lucidum*

La cuantificación de polifenoles totales y la actividad antioxidante se realizaron para la biomasa micelial producida en condiciones óptimas de producción de *G. lucidum*, de igual forma se evaluó la actividad antioxidante al cuerpo fructífero de *G. lucidum* del cual se obtuvo micelio en PDA y el cual fue el inóculo para la fermentación sumergida; se realizó esto con el fin de comparar la eficacia del proceso de fermentación en fase líquida. Para la biomasa micelial como para el cuerpo fructífero de *G. lucidum*, primeramente, se obtuvieron extractos acuosos que se prepararon de acuerdo a la metodología de Mueses y Benavides (2022). 2 g de cuerpo fructífero seco al ambiente y 2 g de biomasa micelial en polvo se adicionaron por separado en 100 ml de agua destilada, se llevaron a ebullición por 3 minutos, una vez transcurrido el tiempo de ebullición se dejaron en reposo los extractos hasta la temperatura ambiente, se filtraron con papel filtro Whatman No. 1 y se aforaron a 100 ml con agua destilada (Figura 8). Los extractos acuosos obtenidos son los que se emplean para la cuantificación de polifenoles totales y actividad antioxidante.

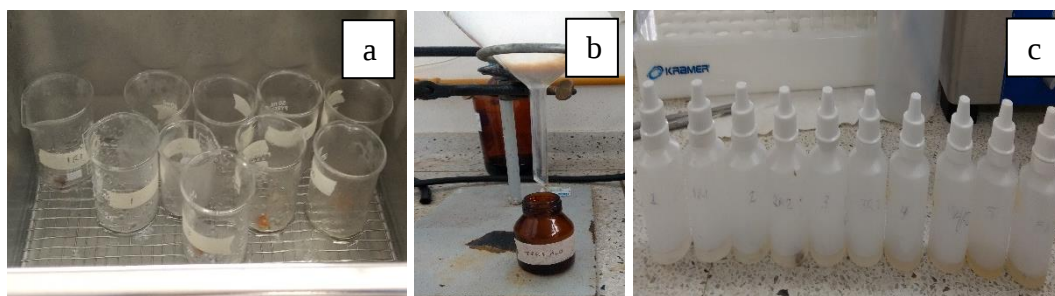


Figura 8. Obtención de extractos acuosos de *G. lucidum*. a) Ebullición de las muestras. b) Filtración de las muestras. c) Extractos acuosos. (**Fuente:** Esta investigación)

4.4.6.1. Cuantificación de polifenoles totales

La cuantificación se realizó por el método de Folin Ciocalteu (F-C), utilizando como buffer Na_2CO_3 al 20% p/v, la curva de calibración se hizo utilizando como estándar una solución de ácido gálico (AG) a 1000 ppm, y a partir de esta solución se prepararon soluciones de 50, 100, 300, 500 y 700 ppm de AG en agua destilada (ver Anexo B). En un matraz se colocó 1 mL de muestra (extracto acuoso de biomasa micelial y extracto acuoso de cuerpo fructífero del hongo, respectivamente), 1 mL de reactivo de F-C, 4 mL de solución de Na_2CO_3 y se aforó a 10 mL con agua destilada, se calentó a 50 °C en un baño María por 10 min y se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro marca Thermo scientific genesys 10 UV (Figura 9). Los ensayos se realizaron por duplicado, los resultados promedio de las lecturas se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG/g) (Santillán *et al.*, 2017).

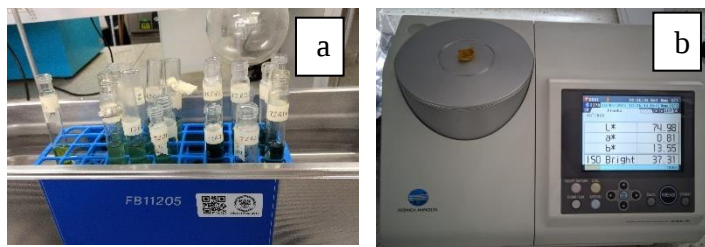


Figura 9. Evaluación de polifenoles de *G. lucidum*. a) Rx de muestras acuosas con reactivo de F-C. b) Medición de absorbancia de las muestras. **(Fuente:** Esta investigación)

4.4.6.2. Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH

Se preparó una solución de DPPH a 0,1 mM en etanol absoluto, para ello se pesó 0.01 g de DPPH en un matraz aforado, previamente tarado y protegido contra la luz. Se disolvió en 50 mL de etanol absoluto. La solución se ubicó en un lugar oscuro durante 20 min con la finalidad de lograr una adecuada disolución. La solución de DPPH (3,9 ml) en etanol se mezcló con la solución de cada extracto acuoso (0,1 ml) en concentraciones en intervalos de 0,25-2 % p/v. La reacción

para eliminar radicales DPPH• se realizó a temperatura ambiente y la disminución de la absorbancia se midió a 515 nm luego de transcurridos 30 minutos de reacción. Los resultados se expresaron en valores $\mu\text{mol TEAC/g}$ extracto crudo (μmol equivalentes de Trolox por g de extracto crudo), mediante la construcción de una curva patrón usando como antioxidante TROLOX en etanol en concentraciones de 100 a 1500 μM (Ver Anexo B), con 870 μL de etanol y 130 μL de solución de DPPH.

4.4.7. Análisis por FTIR de *G. lucidum*

Los análisis FTIR se realizaron para la biomasa micelial y el cuerpo fructífero de *G. lucidum*, con el fin de hacer un comparativo y establecer la eficacia del proceso fermentativo en fase líquida, adicionalmente se realizó el análisis FTIR de un producto comercial de *Ganoderma* para observar los grupos orgánicos que se encuentren presente de *Ganoderma* y de esta forma poder establecer una eficacia de emplear la biomasa micelial obtenida en el café nariñense. El cuerpo fructífero en polvo y la biomasa micelial (del proceso de producción optimizado) y Ganocafe se mezclaron uniformemente con polvo de bromuro de potasio (KBr), respectivamente. La mezcla se presionó en una tableta ejerciendo una presión manual mediante una prensa manual (Figura 10), hasta formar una tableta, la medición se realizó en un espectrofotómetro IR Affinity 1S en el rango de frecuencia 4000-400 cm^{-1} (Kan *et al.*, 2014).

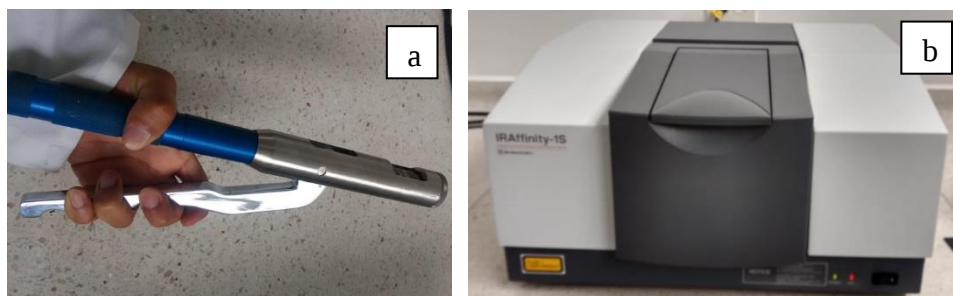


Figura 10. Análisis FTIR. a) Prensa manual. b) Medición en el espectrofotómetro IR Affinity (Fuente: Esta Investigación)

4.4.8. Dosificación de biomasa micelial de *G. lucidum* al café

Para la dosificación del *G. lucidum* al café se tomó como referencia la metodología empleada previamente en el grupo de investigación Biota de la Universidad de Nariño, en el cual se establecen 3 niveles de concentración para el polvo del cuerpo fructífero del hongo *G. lucidum* en la bebida de café (6, 8 y 10%), valores que están en el rango de concentración recomendada para obtener beneficios en una dieta normal de consumo. Sin embargo, en esta investigación se realizó la inclusión de biomasa micelial obtenida del proceso de fermentación optimizado en fase líquida del hongo. El café en polvo empleado en la inclusión de la biomasa fue proporcionado por la empresa Café de Altura S.A.S de la ciudad de Pasto, el cual se mezcló con la biomasa a las concentraciones establecidas.

4.4.9. Análisis sensorial

El análisis sensorial de las muestras de café con la dosificación de biomasa micelial de *G. lucidum* se realizó en la empresa Café de Altura S.A.S de la ciudad de Pasto, con el apoyo de un panel experto de catación de café que cuenta con certificación en “Q. grader” del Coffee Quality Institute (CQI). El análisis sensorial se realizó de acuerdo a las recomendaciones del juez entrenado. Para la preparación de las bebidas de café se empleó un café originario del municipio de Yacuanquer-Nariño con tosti3n media, se anexa su ficha t3cnica (Ver anexo A). En la preparaci3n de las muestras se tomaron 10 g de caf3 en 110 mL de agua, en total se prepararon 9 muestras, 3 correspondieron al control (Caf3 sin adici3n de biomasa micelial) y dos muestras para cada una de las diferentes concentraciones (6, 8 y 10%) (Figura 11).



Figura 11. Análisis sensorial. a) Muestras de café nariñense molido y adicionado biomasa micelial a diferentes concentraciones. b) Muestras preparadas para el análisis sensorial. **(Fuente:** Esta investigación)

Para determinar el perfil de taza o perfil de sabores, se evaluaron los atributos relacionados con el sabor del café: Fragancia/aroma, sabor, sabor residual, acidez, cuerpo, balance, uniformidad, taza limpia, dulzura, defectos y nota global; por parte del experto de catación. Los atributos corresponden a los análisis que se realizan bajo el protocolo de la SCAA (siglas en ingles que significa Asociación de Cafés Especiales de América). El análisis sensorial del perfil de taza se determinó de acuerdo a la clasificación por puntajes establecida por el protocolo SCAA, y mediante la comparación del gráfico radar o araña. La clasificación de puntajes se indica a continuación:

Tabla 2.

Clasificación del café de acuerdo al puntaje obtenido en el análisis sensorial

Clasificación			
6,00 Bueno	7,00 Muy Bueno	8,00 Excelente	9,00 Extraordinario
6,25	7,25	8,25	9,25
6,50	7,50	8,50	9,50
6,75	7,75	8,75	9,75

Fuente. Formato protocolo SCAA

Los perfiles descriptivos de las muestras de café con biomasa micelial de *G. lucidum* evaluadas se realizaron mediante la utilización del gráfico de tipo radar araña haciendo uso del software STATGRAPHICS CENTURION XV.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. Optimización del medio de fermentación sumergida de *G. lucidum*

Se evaluaron los efectos del porcentaje de la fuente de carbono (A), nitrógeno (B) y pH inicial (C) del medio de cultivo sobre la biomasa y la producción polisacáridos totales de *G. lucidum*. Se utilizaron 19 conjuntos distintos con dos réplicas sobre las condiciones de cultivo para la optimización en la metodología de superficies de respuesta (Tabla 3).

Tabla 3.

Matriz experimental con resultados para la producción de biomasa micelial y polisacáridos totales de G. lucidum

No Corridas	Variables			Respuesta		
	%Cascarilla	%Extracto levadura	pH	Biomasa g/mL		Polisacáridos mg/g MS
1	4	1,9	5,5	0,003202	± 0,001325	2,5407 ± 0,064
2	4	1,9	5,5	0,003242	± 0,000023	3,9068 ± 0,080
3	4	1,9	5,5	0,003152	± 0,000098	4,1739 ± 0,121
4	4	1,9	5,5	0,003246	± 0,000209	5,9636 ± 0,836
5	4	1,9	5,5	0,002974	± 0,000328	4,1284 ± 0,088
6	3,5	1,5	5	0,001418	± 0,000260	8,2136 ± 0,820
7	4,5	1,5	5	0,000889	± 0,000720	6,4864 ± 0,129
8	3,5	2,3	5	0,001444	± 0,000153	6,4125 ± 0,104
9	4,5	2,3	5	0,001139	± 0,000276	19,1795 ± 0,900
10	3,5	1,5	6	0,000599	± 0,000607	7,0148 ± 0,153
11	4,5	1,5	6	0,000937	± 0,000751	6,4239 ± 0,699
12	3,5	2,3	6	0,000955	± 0,000680	7,2136 ± 0,016
13	4,5	2,3	6	0,001182	± 0,000557	10,2080 ± 1,165
14	3,16	1,9	5,5	0,002846	± 0,002096	4,5375 ± 0,153
15	4,84	1,9	5,5	0,001132	± 0,000042	7,0489 ± 0,426
16	4	1,23	5,5	0,002327	± 0,002324	2,7648 ± 0,747
17	4	2,57	5,5	0,000709	± 0,000083	15,7761 ± 1,213
18	4	1,9	4,66	0,001369	± 0,000909	13,0602 ± 0,346
19	4	1,9	6,34	0,000687	± 0,000075	6,4295 ± 0,177

Fuente. Esta investigación

5.1.1. Optimización de la producción de biomasa micelial

La tabla ANOVA (Anexo C) para la producción de biomasa micelial, indica que los coeficientes lineales y los coeficientes de interacción no son significativos ($p\text{-valor} > 0,05$), mientras que los coeficientes del término cuadrático ($A \times A$, $B \times B$ y $C \times C$), que resultaron ser efectos negativos, son significativas ($p\text{-valor} < 0,05$) con un nivel de significancia del 95%, lo cual quiere decir que tienen una influencia significativa sobre la respuesta. El estadístico R^2 del 87,34% y un R^2 ajustado de 74,67% indicó que el modelo es estadísticamente significativo, más del 80% de los resultados están representados en el modelo, es decir más del 80% puede explicar la variabilidad en la respuesta, mientras que la variabilidad restante no. El $p\text{-valor}$ del estadístico Durbin Watson fue 0,6945 con lo cual se pudo probar, que no existe autocorrelación o correlación serial significativa. La adecuación del modelo por medio del análisis de los residuos se presenta en el Anexo C.

La Ecuación 7 corresponde al modelo de segundo orden que se ajustó a los datos experimentales.

$$\begin{aligned} \text{Biomasa [g/mL]} = & -0,120516 + 0,011169*\% \text{Cascarilla} + 0,0138046*\% \text{Levadura} + \\ & 0,0328858*\text{pH} - 0,00195149*\% \text{Cascarilla}^2 + 0,000070625*\% \text{Cascarilla}*\% \text{Levadura} + \\ & 0,0006995*\% \text{Cascarilla}*\text{pH} - 0,00408997*\% \text{Levadura}^2 + 0,000203125*\% \text{Levadura}*\text{pH} - \\ & 0,00331054*\text{pH}^2 \end{aligned} \quad \text{Ec. 7}$$

El modelo de segundo orden que se ajustó a los datos experimentales se representó como gráficos de superficies de respuestas y gráficos de contorno que se muestra en la Figura 12, e ilustra los efectos de la combinación de la fuente de carbono, nitrógeno y pH inicial del medio sobre la variable de respuesta, en este caso la biomasa micelial producida. Cada figura presenta el efecto

de dos variables en la producción de biomasa micelial mientras que la otra variable se mantuvo en el nivel cero.

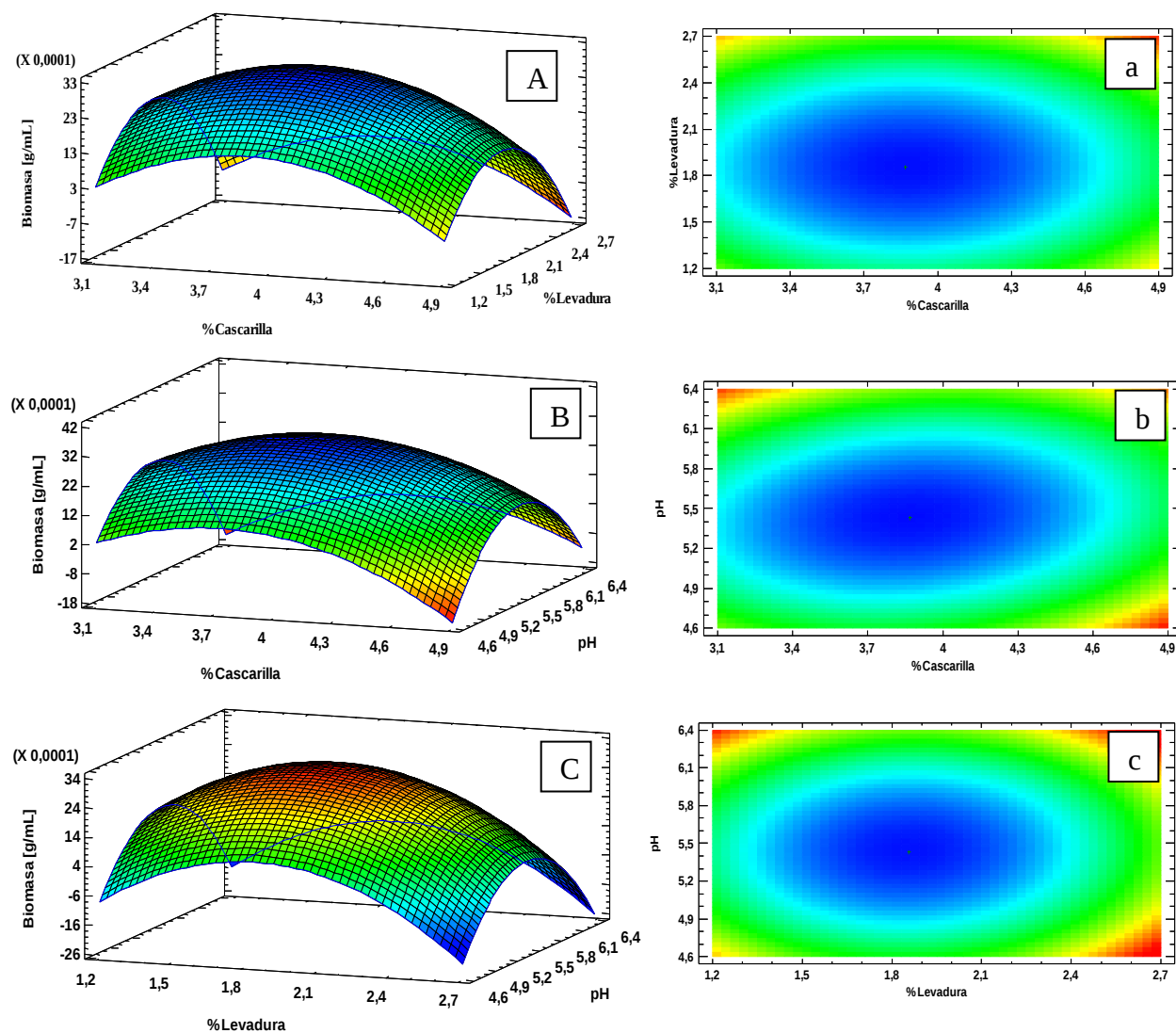


Figura 12. Superficies de respuesta (A, B, C) y gráficos de contorno (a, b, c) que muestran los efectos de las tres variables en la producción de biomasa micelial de *G. lucidum* (**Fuente:** Esta investigación)

A partir de los gráficos de superficie de respuesta, es fácil comprender las interacciones entre dos factores. La Figura 12 (A) muestra el efecto de la fuente de carbono (%Cascarilla) y la fuente de nitrógeno (%Extracto de levadura), la Figura 12 (B) muestra el efecto de la fuente de carbono y el pH inicial del medio y la Figura 12 (C) muestra el efecto de la fuente de nitrógeno y pH inicial del medio sobre la producción de biomasa micelial de *G. lucidum*. Como se ilustra en las Figuras 12 (A, B, C), el rendimiento de la biomasa se ve reducido en los niveles altos y bajos de las tres variables evaluadas. Por su parte los gráficos de contorno (Figura 12 (a, b, c)) ilustran la región óptima donde hay mayor rendimiento de la biomasa, pero de acuerdo al modelo (Ec. 7) se predijo el máximo rendimiento de biomasa bajo las condiciones óptimas de: %Cascarilla 3,86; %Extracto de levadura 1,85 y pH inicial del medio de 5,4 con un rendimiento máximo de biomasa 0,0032 g/mL.

En las gráficas de superficie de respuestas (Figura 12 (A, B, C)) se observa que para las tres variables de estudio el rendimiento de la biomasa incrementa al aumentar sus niveles, pero disminuyen cuando las concentraciones de las variables son excesivas. Similares resultados fueron encontrados por Cui *et al.* (2015) quienes optimizaron el medio de cultivo sumergido de *G. lucidum*, pero en este estudio el mosto de cebada fue empleado como fuente de carbono; los autores encontraron que el rendimiento de la biomasa incrementa significativamente al aumentar los niveles de mosto y extracto de levadura, pero disminuye cuando las concentraciones de las variables son excesivas es decir a concentraciones de 4,8% de fuente de carbono y 2,5% de fuente de nitrógeno, estas concentraciones las fuentes de carbono y nitrógeno es desfavorable para el crecimiento micelial y la biosíntesis de metabolitos de *G. lucidum*, debido a que provocan una mayor presión osmótica a causa de la alta concentración. Lo anterior explica los resultados obtenidos en la investigación, pues si bien se encontró que la biomasa incrementa a medida que

aumenta la concentración de cascarilla y el extracto de levadura, ésta disminuye con niveles excesivos, siendo la composición química del medio de cultivo un factor importante que influye en el desarrollo de la biomasa micelial de *G. lucidum*.

En la fermentación líquida de *G. lucidum* la glucosa es la fuente de carbono preferida para la acumulación de biomasa y polisacáridos en comparación con otras fuentes de carbono como la lactosa, xilosa, galactosa, manosa, maltosa y sacarosa (Hu *et al.*, 2018). La preferencia de la glucosa sobre otras fuentes de carbono puede deberse a la rápida metabolización de la glucosa por parte de los hongos para producir energía celular fácilmente (Jayasinghe, Imtiaj, Hur, G. Lee, T. Lee & Y. Lee, 2008). Sin embargo, otras fuentes de carbono no convencionales y más complejas como los cereales presentan elementos trazas que influyen en la biosíntesis de muchos metabolitos, pero son pocos los trabajos que han realizado la evaluación de su efecto sobre la producción de la biomasa de hongos medicinales (López, Díaz & Garcés, 2011) y aún más escasos son los estudios en el que se empleen residuos en la fermentación líquida de *G. lucidum*; en la presente investigación se empleó como fuente de carbono cascarilla de café un residuo agroindustrial que de acuerdo a la literatura presenta un alto contenido de carbohidratos con potencial para ser aprovechado en la fermentación líquida; pues los carbohidratos pueden favorecer un eficaz desarrollo celular de los macromicetos (Chaves *et al.*, 2013), además *G. lucidum* depende completamente de la descomposición de la madera para obtener sus nutrientes de crecimiento, por ello este hongo ha sido adaptable a docenas de residuos agroindustriales (Hu *et al.*, 2017). Sin embargo, en la investigación se encontró que en la fermentación líquida de *G. lucidum*, el uso de residuos lignocelulósicos como la cascarilla de café produce un bajo rendimiento de la biomasa, pues bajo las condiciones óptimas se puede obtener 3,22 g/L de biomasa. Varios artículos sobre fermentación líquida de *G. lucidum* han reportado rendimientos de biomasa de 3,99 a 7,9 g/L

cuando se emplea glucosa como fuente de carbono (Tang & Zhong, 2002), también se han publicado valores de micelio de 12 g de peso seco/L durante un periodo de cultivo de 10 días (Avtonomova, Krasnopol'skaya & Maksimov, 2006), en cuanto a rendimientos de biomasa de *G. lucidum* cuando se emplean fuentes no convencionales, se han reportado valores de biomasa de 18,7 g/L al usar mosto de cebaba y extracto de levadura (Cui *et al.*, 2015), $23,49 \pm 0,37$ g/L y $24,44 \pm 0,37$ g/L de biomasa cuando se emplea harina de cebada y harina de avena respectivamente (Zapata, Rojas & Atehortua, 2012). En el cultivo sumergido los rendimientos de biomasa van desde unos pocos gramos hasta aproximadamente 39 g/L, pero estos valores dependerán de la especie del hongo, la duración y escala del cultivo (Gargano *et al.*, 2017).

El crecimiento de micelio en cultivos líquidos se ve afectado en gran medida por las fuentes de carbono y nitrógeno (Dudekula, Doriya & Devarai, 2020). Varios estudios han indicado que los hongos, cuando se cultivan en condiciones de fermentación líquida, tienen preferencia por las fuentes orgánicas de nitrógeno, como el extracto de levadura y la peptona, en lugar de las inorgánicas, la preferencia puede explicarse por la combinación compleja de aminoácidos y carbohidratos presentes en los compuestos orgánicos, lo que da como resultado un crecimiento fúngico mejorado (Kirsch, de Macedo, Teixeira, 2016). En cuanto a las fuentes de carbono, los rendimientos de biomasa micelial en la fermentación líquida varían de acuerdo a la composición y dependiendo de esto los rendimientos pueden ser bajos o altos, en el caso de Cui *et al.* (2015) emplearon mosto de cebada como una fuente de carbono no convencional, con una composición compleja y que contiene más azúcar (maltosa, dextrinas, glucosa, etc), nitrógeno soluble, nitrógeno amínico, gomas y sustancias inorgánicas, lo que indicó que el mosto por su composición compleja favorece el crecimiento de biomasa micelial en el cultivo líquido. Por su parte Zapata *et al.* (2012) menciona que los cereales que en la mayoría de los casos son empleados como harina para el

cultivo de *G. lucidum* están compuestos principalmente de fibras de celulosa, que contiene vitamina B1, tiamina, además dentro del grano de cereal se encuentran el germen y el núcleo, con abundante proteína de alto valor biológico, rica en grasas insaturadas que contienen ácidos grasos esenciales, lo cual mejora la producción de biomasa y también los metabolitos más importantes. En el caso de la presente investigación se usó cascarilla de café, que está compuesta en su mayoría por carbohidratos principalmente de celulosa y hemicelulosa. La degradación de estos compuestos en el medio líquido afectó el rendimiento de la biomasa, pues estos compuestos conllevan en la expresión de enzimas fúngicas, es decir un complejo enzimático que degrada diferentes componentes incluyendo celulosa, hemicelulosa y lignina para la obtención de nutrientes (Dudekula *et al.*, 2020); la expresión de enzimas para degradar la cascarilla de café en el medio líquido pudo haber inducido a un bajo rendimiento de la biomasa, pues el tiempo de expresión de las enzimas pudieron haber llevado al agotamiento del oxígeno en el medio, lo que influyó en el desarrollo del micelio, además porque en la investigación en el medio líquido solo se contó con agitación manual y no se desarrolló por medio de una agitación mecánica dado a que en el laboratorio no se contaba con los equipos necesarios para este fin. La agitación mecánica del medio de cultivo promueve la homogenización adecuada de los componentes, aumenta la oxigenación y mejora la transferencia de masa y de calor; generar estas condiciones tienen una influencia positiva en el crecimiento del micelio de los hongos por fermentación líquida (Kirsch *et al.*, 2016), mientras que la agitación mínima o nula, resulta en una producción en masa deficiente de micelios (Kim *et al.*, 2011).

En cuanto al pH inicial del medio, diversas investigaciones ponen en manifiesto la capacidad de los macromicetos de crecer en un amplio rango de pH, sin embargo, recomiendan usar un pH de 5 o inferior para evitar la contaminación bacteriana. Asimismo, cuando el pH es

bajo (pH 4) se incentiva la producción de biomasa y el consumo de glucosa, mientras que un pH de 6 puede estimular la producción de exopolisacáridos (Arango y Nieto, 2013), para *G. lucidum* se ha encontrado que éste crece en condiciones ácidas (Cui *et al.*, 2015), pero diferentes cepas de *G. lucidum* crecen en un amplio rango de pH que van de 5-9 (Jayasinghe *et al.*, 2008). No obstante, la mayor cantidad de biomasa micelial de cepas de *G. lucidum* se da cuando el pH inicial es de 5,5 a 6, siendo el pH de 5,5 el más óptimo (Zhou, Yang, Lin & Guo, 2015). Igualmente, Jayasinghe *et al.* (2008) determinó que 8 cepas de *G. lucidum* tienen un crecimiento micelial óptimo a pH de 5. Cui *et al.* (2015) encontró que la biomasa micelial de *G. lucidum* alcanza su máxima producción a un pH de 5,5 y disminuye rápidamente fuera del rango de pH de 4,5 a 6,5. Los resultados obtenidos en la investigación fueron consistentes, pues el pH inicial óptimo para obtener mayor rendimiento de biomasa micelial en el cultivo sumergido, se obtuvo en un valor de pH de 5,4; dato que cae dentro de los valores de pH que se reporta ampliamente en la literatura.

5.1.2. Optimización de la producción de polisacáridos totales

Los polisacáridos de los micelios de *G. lucidum* también tienen una eficacia similar al cuerpo fructífero (Sudheer *et al.*, 2019), por lo tanto, se evaluó los polisacáridos totales solubles en agua de *G. lucidum* que se extrajeron del micelio obtenido en la fermentación líquida con las 3 variables de estudio acorde la matriz experimental (Tabla 2). Los análisis estadísticos de acuerdo a la tabla ANOVA (Anexo C) para la producción de polisacáridos totales indicaron que solo el coeficiente de término cuadrático (AxA) y los coeficientes de interacción AxC y BxC no son significativos (p-valor > 0,05), mientras que los demás coeficientes son significativos (p-valor < 0,05) con un nivel de significancia del 95%, lo cual quiere decir que tienen una influencia significativa sobre la respuesta. Las tres variables de estudio (%Cascarilla (A), %Levadura (B) y

pH (C)) mostraron un efecto significativo (p-valor < 0,05), el %Extracto de levadura exhibió la mayor significancia (p-valor = 0,0011), seguido del pH (p-valor = 0,0263) y luego el %Cascarilla (p-valor = 0,0486). El estadístico R^2 del 88,42% y el R^2 ajustado de 76,84% indicó que el modelo es estadísticamente significativo, más del 80% de los resultados están representados en el modelo, es decir más del 80% puede explicar la variabilidad en la respuesta, mientras que la variabilidad restante no. El p-valor del estadístico Durbin Watson fue 0,5014 con lo cual se pudo probar, que no existe autocorrelación o correlación serial significativa. La adecuación del modelo por medio del análisis de los residuos se presenta en el Anexo C.

La Ecuación 8 corresponde al modelo de segundo orden que se ajustó a los datos experimentales.

$$\begin{aligned} \text{Polisacáridos Tot} = & 277,799 - 16,3587*\% \text{Cascarilla} - 59,6722*\text{Levadura} - 68,1971*\text{pH} + \\ & 2,65331*\% \text{Cascarilla}^2 + 11,2997*\% \text{Cascarilla}*\text{Levadura} - 4,31818*\% \text{Cascarilla}*\text{pH} + \\ & 11,8295*\text{Levadura}^2 - 4,31818*\text{Levadura}*\text{pH} + 8,24182*\text{pH}^2 \end{aligned} \quad \text{Ec. 8}$$

El modelo de segundo orden que se ajustó a los datos experimentales se representó como gráficos de superficies de respuestas y gráficos de contorno que se muestra en la Figura 13. Cada figura presenta el efecto de dos variables en la producción de polisacáridos mientras que la otra variable se mantuvo en el nivel cero. La Figura 13 (A) muestra el efecto de la fuente de carbono (%Cascarilla) y la fuente de nitrógeno (%Extracto de levadura), la Figura 13 (B) muestra el efecto de la fuente de carbono y el pH inicial del medio y la Figura 13 (C) muestra el efecto de la fuente de nitrógeno y pH inicial del medio sobre la producción de polisacáridos totales solubles en agua de *G. lucidum*.

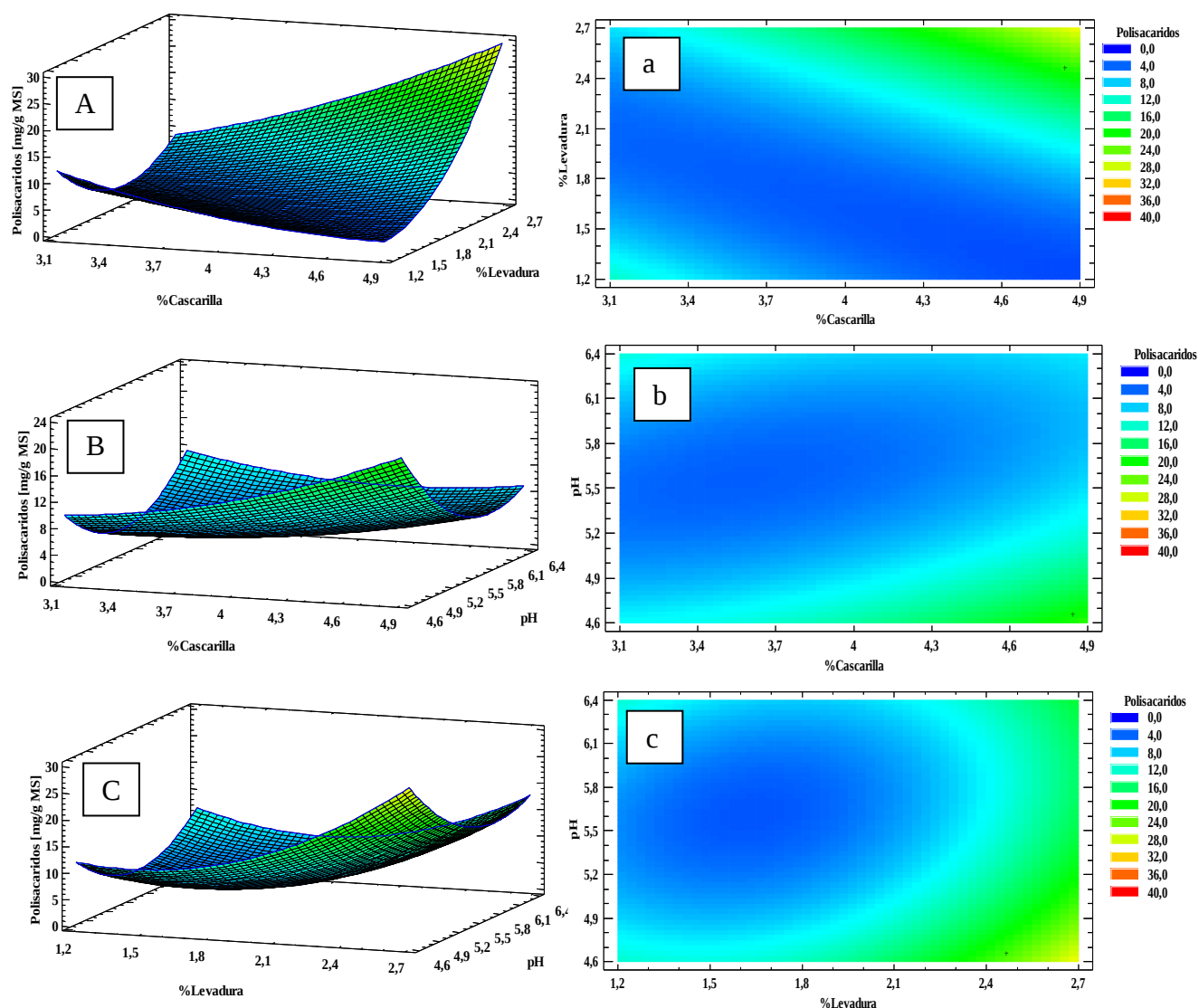


Figura 13. Superficies de respuesta (A, B, C) y gráficos de contorno (a, b, c) que muestran los efectos de las tres variables en la producción de polisacáridos totales de *G. lucidum* (**Fuente:** Esta investigación)

En la Figura 13 (A) se puede observar que el aumento de la concentración del %Cascarilla condujo a un descenso de la producción de los polisacáridos, pero al aumentar el %Extracto de levadura la producción de los polisacáridos aumento significativamente. La Figura 13 (B) se observa que el aumento del %Cascarilla aumenta levemente la producción de polisacáridos, caso contrario del pH a medida que se aumenta el pH la producción de polisacáridos disminuye

levemente. Las otras variables (%Levadura y pH) exhibió efectos similares a los aparentes en la Figura 13 (B). Por su parte los gráficos de contorno (Figura 13 (a, b, c)) ilustran la región óptima donde hay mayor rendimiento de los polisacáridos, pero de acuerdo al modelo (Ec. 8) se predijo el máximo rendimiento bajo las condiciones óptimas de: %Cascarilla 4,84; %Extracto de levadura 2,46 y pH inicial del medio de 4,6 con un rendimiento máximo de 34,58 mg/g MS (MS = Muestra seca).

Los carbohidratos y el nitrógeno son fuentes importantes de nutrientes en un proceso de cultivo y pueden afectar significativamente el crecimiento celular y la formación de metabolitos (Wang *et al.*, 2019; Yuan, Chi & Zhang, 2012; Sánchez & Montoya, 2020). Esto se observa en la Figura 13 (A) el aumento de la concentración de la cascarilla produce el descenso de la producción de polisacáridos totales de *G. lucidum*, caso contrario el aumento de la concentración del extracto de levadura aumenta la producción de los polisacáridos. Los basidiomicetos asimilan más fácilmente las fuentes de nitrógeno orgánico, lo que garantiza la máxima producción de biomasa micelial y la formación de polisacáridos en cultivos sumergidos (Sánchez & Montoya, 2020), además, el nitrógeno es un componente esencial de las proteínas y los ácidos nucleicos, y la deficiencia de nitrógeno afecta el crecimiento de hongos y la producción de metabolitos (Zhu *et al.*, 2015), por lo anterior, acorde a los resultados obtenidos en esta investigación se puede decir que la mayor concentración de la fuente de nitrógeno, en este caso el extracto de levadura junto con sus otros nutrientes favoreció la producción de polisacáridos. En cuanto a la fuente de carbono, se ha encontrado que los basidiomicetos pueden degradar sustratos fenólicos complejos y utilizarlos como fuente de carbono para mantener su crecimiento (Zerva, Papaspyridi, Christakopoulos & Topakas, 2017), pero dentro de los sustratos fenólicos se debe tener en cuenta que estos además tienen compuestos aromáticos libres (no poliméricos) que son tóxicos para la

mayoría de los hongos incluso en concentraciones relativamente bajas (100 ppm). Esto plantea varios desafíos para los hongos que estén expuestos a estos compuestos mientras utilizan la biomasa vegetal (principalmente polisacáridos), como fuente de carbono (Mäkelä *et al.*, 2015). Lo anterior explica los resultados obtenidos en este estudio, pues al emplear como fuente de carbono un residuo más complejo, posiblemente la composición química del mismo pudo haber resultado tóxica, dado que el crecimiento micelial a concentraciones excesivas disminuye y sucedió de manera similar que la producción de polisacáridos totales disminuyó a niveles altos de la concentración de la cascarilla de café en el medio, lo que puede ser debido a sus compuestos fenólicos como los taninos u otros compuestos como la cafeína. En la cascarilla de café la cafeína y los taninos se reporta en la literatura concentraciones aproximadas del 1,3% y 4,5% respectivamente (Pandey *et al.*, 2000). Se ha encontrado que el crecimiento micelial de macrohongos decrece al aumentar la concentración de cafeína en el medio de cultivo, pues estos no son capaces de degradar la cafeína, pero si absorberla parcialmente en el desarrollo de su cuerpo fructífero, por otra parte, los taninos en concentraciones altas pueden tener un efecto tóxico (Fan, A. Soccol, Pandey, Vandenberghe & C. Soccol, 2006), pero en la producción de metabolitos, aún no está claro cómo las fuentes de carbono afectan a los polisacáridos debido al complicado proceso biosintético (Wang, Cheong, Wu, Meng, Zhao & Li, 2015), igualmente los efectos de la suplementación de residuos lignocelulósicos al medio de cultivo líquido en *G. lucidum* han recibido poca atención.

Los resultados de este estudio indicaron que bajo las condiciones óptimas de cultivo se puede obtener hasta 34,58 mg/g MS de polisacáridos totales solubles en agua cuando *G. lucidum* es cultivado en cascarilla de café. Las investigaciones donde se evalúan los polisacáridos solubles en agua de *Ganoderma*, solo se reportan en estudios de secado. Frente a ello los resultados de la

investigación indican que el contenido de polisacáridos totales solubles en agua es alto. Chin & Law (2014) reportan valores de retención de polisacáridos solubles en agua de 0,39 mg/g MS en rodajas de cuerpo fructífero de *G. lucidum* que fueron sometidas a secado con bomba de calor por 10 minutos seguido de secado en horno por 50 minutos. Chin *et al.* (2011) reportan valores de polisacáridos solubles en agua de $0,653 \pm 0,012$ mg/g dry wt (dry wt abreviaturía en inglés “peso seco”) por secado por convección en cuerpos fructíferos de *G. lucidum*. Pero otras tecnologías de secado se han estudiado, con el objetivo de retener la mayor cantidad de polisacáridos solubles en agua de cuerpos fructíferos de *G. lucidum*. Cui *et al.* (2006) reporta valores de $83,13 \pm 1,33$ mg/g dry wt con secado convencional al vacío, $105,45 \pm 0,76$ mg/g dry wt por liofilización y $98,25 \pm 1,21$ mg/g dry wt por secado al vacío por microondas, seguido de un secado convencional al vacío, pese a encontrar mayor contenido de polisacáridos solubles en agua en los cuerpos fructíferos con estas tecnologías de secado se debe tener en consideración que aplicar procesos más tecnológicos como el secado al vacío o la liofilización en términos económicos es más costoso, por lo que la biomasa micelial de *G. lucidum* obtenida por fermentación líquida indica ser una mejor opción económica. Igualmente, en el cultivo líquido de *G. lucidum* los estudios reportan contenidos de exo e intra polisacáridos y al emplear medios sintéticos se han reportado valores máximos de intrapolisacáridos de $69,44 \pm 11,34$ mg/g dry wt después de 7 días de cultivo y a un pH inicial de 7, y un máximo de $69,93 \pm 1,62$ mg/g dry wt después de 14 días de cultivo y aun pH inicial de 5,5 (Vukojević, Stajić, Laušević & Simonić, 2006), pero se debe tener en cuenta que en los cultivos líquidos muchos factores pueden afectar la producción de polisacáridos, en los que se incluye el pH, la velocidad de agitación, la tasa de transferencia de oxígeno, la concentración de glucosa y la temperatura (Supramani, Ahmad, Ilham, Annuar, Klaus & Mohtar, 2019).

El pH del cultivo es uno de los parámetros más importantes que afectan las fermentaciones de polisacáridos (Shu, Lin & Wen, 2004), por lo tanto, el pH fue la otra variable de estudio de esta investigación, donde se observa en la Figura 13 (B y C) que a medida que se aumenta el pH al medio de cultivo disminuye levemente la producción de polisacáridos, pero en el nivel más alto de pH vuelve a aumentar muy leve la producción de los polisacáridos totales, sin embargo, se observa que la mayor producción se da al pH más bajo (4,6). Valores bajos de pH en la producción de polisacáridos han sido reportados. Tang *et al.* (2009) encontraron la producción máxima de intrapolisacáridos de *G. lucidum* en fermentación líquida de 2,70 g/L a los 10 días de fermentación y a un pH de 3. Fan y Zhong (2002) reportan que el pH inicial de 6,5 en la fermentación líquida de *G. lucidum* se reduce gradualmente hasta llegar a un valor de pH de 3,5 pero esto conduce gradualmente a una mayor producción de polisacáridos intracelulares. El pH del cultivo es uno de los factores más importantes en la fermentación fúngica, ya que puede afectar el crecimiento celular, la producción de metabolitos, la morfología celular (Kim, Park & Yun, 2005), la solubilidad de las sales, el estado iónico de los sustratos y la absorción de varios nutrientes (Fang & Zhong, 2002). En general, las células solo crecen dentro de un cierto rango de pH y la formación de metabolitos suele verse afectada por el pH (Kim, Hwang, Xu, Sung, Choi & Yun, 2003), pero en cuanto a los hongos éstos crecen en un amplio rango de pH inicial, dado que pueden regular la acidez media a niveles que apoyen su crecimiento (Fazenda, Seviour, McNeil & Harvey, 2008), por tanto diferentes cepas de hongos y los diferentes valores de intrapolisacáridos miceliales reportados, pueden atribuirse a los cambios en el metabolismo del micelio y la morfología, pero en comparación con los polisacáridos bacterianos, el conocimiento sobre las vías y los mecanismos moleculares de la síntesis de polisacáridos fúngicos es todavía limitado (Tao *et al.*, 2018).

Por lo anterior, de acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación se puede decir que el pH influyó en la morfología de crecimiento de *G. lucidum* y por ende en el rendimiento de los polisacáridos. Varios investigadores afirman que la diferente morfología de los micelios de los hongos bajo un valor de pH inicial es el factor crítico en la acumulación de biomasa y la formación de metabolitos (Pokhrel & Ohga, 2007; Kim *et al.*, 2003); se ha encontrado que en el cultivo líquido la morfología de los hongos a un pH inicial de 6 cambia de una forma de pellet a una forma filamentosa (Fazenda *et al.*, 2008). En los resultados obtenidos el crecimiento de *G. lucidum* se dio en forma de pellet (Figura 14), por lo que se puede decir que el valor bajo de pH inicial no solo benefició la producción de polisacáridos sino también pudo haber influido en la morfología del crecimiento. No obstante, la morfología en el cultivo líquido en hongos su formación de pellet estará influenciado por otros factores como: tamaño de inóculo, nivel de oxígeno disuelto, la agitación, la temperatura, los tipos de biorreactores entre otros (Nair, Lennartsson & Taherzadeh, 2016), por lo que, además del pH se requiere de más estudios donde se evalúen los otros factores ya mencionados para determinar si solo el pH puede tener una fuerte influencia o no en la morfología de crecimiento micelial.



Figura 13. Fotografía del medio líquido, morfología de crecimiento en forma de pellet de *G. lucidum*, bajo condiciones de cultivo con cascarilla de café. (Fuente: Esta investigación)

Además, se requiere más información estructural cuantitativa detallada de las morfologías de forma filamentosa y pellets para una mejor comprensión de la relación entre la morfología y la producción de metabolitos (Kim *et al.*, 2003), además, también se ha encontrado que la producción de intrapolisacáridos está altamente correlacionada con las actividades enzimáticas, que se sintetizan de manera más eficiente bajo ciertos valores de pH (Zhu *et al.*, 2015). Los polisacáridos fúngicos son bien conocidos por sus funciones como moléculas de almacenamiento de energía en las células y elementos estructurales de las paredes celulares (Zhu *et al.*, 2015), y en los micelios éstos forman una envoltura a su alrededor lo que proporciona soporte para la adhesión de las enzimas (Camelini, Rossi, Cardozo, Gomes, Campos & Giachini, 2014). Por lo anterior, los resultados indican que la máxima producción de polisacáridos en *G. lucidum*, en relación a valores bajos de pH, posiblemente estuvo influenciada por la síntesis de enzimas necesarias para degradar la fuente de carbono compleja (cascarilla de café), no obstante, es necesario realizar más estudios en el que se realicen cuantificaciones enzimáticas en el medio para verificar esta afirmación.

5.2. Modelado cinético de *G. lucidum* bajo condiciones optimas

Para verificar la efectividad de los modelos de optimización y la existencia de los puntos óptimos de la producción de biomasa micelial y polisacáridos totales solubles en agua de *G. lucidum*, se realizaron los ensayos de validación por duplicado empleando los puntos óptimos encontrados (Tabla 4) y a la vez se realizó el estudio cinético de crecimiento micelial y de formación de producto.

Tabla 4*Validación de los modelos usando las condiciones óptimas*

	Variables		Respuesta		
	%Cascarilla	%Levadura	pH	Biomasa [g/mL]	Polisacáridos [mg/g MS]
Biomasa	3,86	1,85	5,4	0,0032	-
polisacáridos	4,84	2,46	4,6	-	34,58
Biomasa+Polisacáridos	3,86	2,46	5	0,00065	17,55

Fuente: Esta investigación

Dado que en la investigación se encontró que la fuente de carbono en altas concentraciones (4,84%) influyó negativamente en el crecimiento de biomasa micelial y producción de polisacáridos totales de *G. lucidum*, para el estudio de la validación de los modelos de optimización y el estudio cinético se tomó el punto de maximización de la biomasa es decir la concentración 3,86%. Para la fuente de nitrógeno se encontró que a medida que aumenta su concentración se favorece la producción de polisacáridos, por tanto, se tomó el valor más alto de los puntos óptimos, el cual fue del 2,46% y por último, para el pH se decidió tomar el valor de 5 dado que este valor se recomienda en la literatura, además es un pH óptimo para evitar la contaminación bacteriana. Los resultados de biomasa+polisacáridos son los resultados obtenidos del estudio cinético que se indican a continuación.

5.2.1. Modelado cinético de crecimiento micelial

La Figura 15 representa el rendimiento de biomasa bajo las condiciones óptimas encontradas en el diseño de superficie de respuesta. Se empleó la ecuación cinética de raíz cúbica y la ecuación logística para simular los cambios en la biomasa y estimar el perfil del crecimiento.

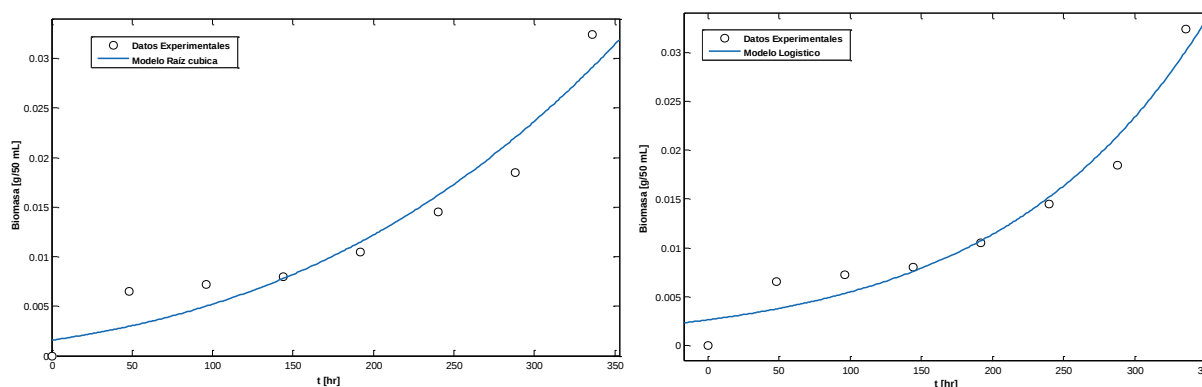


Figura 14. Cinética de datos experimentales para la biomasa micelial y ajuste de modelos Ec. 6 raíz cubica y Ec. 15 logística. (Fuente: Esta investigación)

La cinética de crecimiento de *G. lucidum* en fermentación líquida bajo las condiciones óptimas encontradas se estudió durante 14 días. La curva de crecimiento se ajustó al modelo logístico y al modelo de la raíz cubica (Figura 15). La fase de latencia del crecimiento del micelio se prolongó hasta las 150 h alrededor de los 6 días. La fase exponencial se observó después de los 6 días de cultivo, durante esta fase la biomasa comenzó a aumentar, sin embargo, dado que el cultivo se realizó en matraces los pellets presentaron disminución de la transferencia de masa de oxígeno, por tanto, se evidenció un bajo rendimiento y una fase de latencia con un periodo de tiempo largo. Además, si el inóculo se coloca en un medio con un sustrato más complejo, se observará una fase de latencia más prolongada, dado a que las células se reorganizan y sintetizan enzimas apropiadas para su catabolismo (Maier, 2008). Sin embargo, los modelos se ajustaron

utilizando los datos experimentales obtenidos de la fase de latencia y la fase exponencial. En la Tabla 5 se muestran los coeficientes cinéticos de los modelos evaluados en el estudio.

Tabla 5

Valores de los coeficientes cinéticos de los modelos de raíz cúbica y logístico

Modelo raíz cúbica		Modelo logístico	
Parámetros cinéticos	Valor	Parámetros cinéticos	Valor
Mo	0,001556	C ₀	0,002551
k	0,0005713	C _m	0,2989
		μ _m	0,007649
Estadísticos		Estadísticos	
R ² = 0,9195	RMSE = 0,002796	R ² = 0,9506	RMSE = 0,002592

Fuente: Esta investigación

Los datos experimentales obtenidos se ajustaron a los modelos evaluados y mostraron que fueron aplicables a este proceso en particular. Los resultados estadísticos mostraron que el crecimiento micelial se ajustó con éxito a los modelos con un R² de 0,9195 para el modelo de raíz cúbica y un R² de 0,9506 para el modelo logístico de regresión no lineal, siendo éste el que mejor se ajustó a los datos experimentales. Los hongos exhiben diferentes formas morfológicas de crecimiento en el cultivo líquido, principalmente dispersas como filamentos miceliales y masas de micelio densamente entrelazadas (pellets) (Feng *et al.*, 2010). En el modelo de raíz cúbica los hongos filamentosos deben crecer en forma de pellet, dado a que el crecimiento está restringido por la difusión del material desde la fase líquida al centro del pellet, mientras que el crecimiento sin restricciones se limita a las hifas en una capa periférica externa, por lo tanto, en el cultivo, la biomasa (M) aumenta como una función cúbica del tiempo (Enshasy, 2007) y el mantenimiento de la cinética dependerá de que los pellets aumenten de diámetro a una tasa de velocidad constante

(Trinci, 1970). Asimismo, se asume que el crecimiento micelial es equivalente a los microorganismos unicelulares por lo cual, las concentraciones de la biomasa micelial, sustrato y formación del producto son uniformes en todo el cultivo y se considera que la biomasa micelial es homogénea. Bajo estas condiciones la cinética de la raíz cúbica de crecimiento es similar a la de los microorganismos unicelulares, por ende, se tendrá la fase de latencia y exponencial, en este contexto para los hongos filamentosos el crecimiento en forma de pellet se supone aumenta de radio a una tasa constante durante la fase exponencial (Prosser, 1995), pero el crecimiento estará determinado por la distancia a la que los nutrientes pueden penetrar en el pellet (Prosser & Tough, 1991). Como se observó en esta investigación los datos experimentales del crecimiento micelial de *G. lucidum* en su fermentación líquida se ajustaron a la cinética de la raíz cubica, igualmente Narkprasom *et al.* (2012) encontraron un buen ajuste de la cinética de la raíz cubica de la fermentación líquida de *G. tsugae*. Feng *et al.* (2010) encontraron que el perfil cinético de crecimiento de *L. edodes* en cultivo líquido es bien descrito por la cinética de la raíz cubica. No obstante, es muy limitada las investigaciones sobre modelamiento de la cinética de la raíz cubica en hongos filamentosos en cultivo líquido. Esto puede responder a que este modelo pese a que es aplicable al crecimiento de pellets y ha sido demostrado experimentalmente, los mismos datos a veces pueden ser descritos por más de un modelo (Patnaik, 2000).

Por lo anterior, en esta investigación también se evaluó la cinética de crecimiento mediante la ecuación logística. El modelo logístico describe el crecimiento de las poblaciones microbianas en función de la densidad de la población inicial, el tiempo, la tasa de crecimiento y la densidad de la población final (Wachenheim, Patterson & Ladisch, 2003), pero este modelo es independiente del sustrato (Benkortbi, Hanini & Bentahar, 2007). Los resultados de la investigación indicaron que los datos experimentales presentaron un alto grado de ajuste ($R^2 >$

90%) para la ecuación logística en comparación con la ecuación de la raíz cubica. Un aspecto importante de la función logística es que permite predecir el tiempo de la fase estacionaria o la densidad máxima de la población (Wachenheim *et al.*, 2003). El valor de la concentración máxima de la biomasa ($C_m = 0,2989\text{g}/100\text{mL} = 0,0029\text{g}/\text{mL}$) con la ecuación logística se obtuvo casi el mismo valor de los datos experimentales de optimización de $0,00324\text{ g}/\text{mL}$. Igualmente los mecanismo de crecimiento y el metabolismo de los hongos son más complejos que los de las bacterias, incluso el crecimiento de los hongos filamentosos es único entre los hongos, por lo tanto, en la literatura se han propuesto varios modelos matemáticos de crecimiento de hongos (Wang, Ridgway, Gu, & Young, 2008). Sin embargo, los estudios de modelamiento de hongos filamentosos como ya se mencionó son muy escasos y más si es en una especie en específico como *G. lucidum*, no obstante los resultados de este estudio demostraron que los modelos evaluados describen el crecimiento de *G. lucidum* en fermentación líquida. La tasa máxima de crecimiento específica ($\mu_{\max}$) estimada con la ecuación logística fue de $0,007649\text{ h}^{-1}$. La ecuación logística es una aproximación matemática con una constante de velocidad bastante insignificante (Kargi, 2009). Fei *et al.* (2019) encontró una tasa máxima de crecimiento específico de $0,01875\text{ h}^{-1}$, de *G. lucidum* en fermentación líquida, un valor poco mayor al obtenido en esta investigación. Pero es importante apreciar que el valor de $\mu_{\max}$ cambia en respuesta a fluctuaciones como la concentración de nutrientes, metabolitos, oxígeno, temperatura, pH y otros factores (Hu, 2018; Stanbury, 2017).

5.2.2. Modelado cinético de formación de producto

El estudio cinético de la formación de producto de *G. lucidum* en fermentación líquida bajo las condiciones óptimas encontradas en la investigación, se realizó empleando la ecuación de Luedeking-Piret. Según este modelo, la tasa de formación del producto depende tanto de la

concentración de la biomasa (M), como de la tasa de crecimiento, dM/dt , de manera lineal (Liu *et al.*, 2003). Por tanto, el modelo de Luedeking-Piret (E. 8) se resolvió sustituyendo variables con la ecuación de raíz cubica y la ecuación logística y realizando su respectiva integración, lo cual se detalla a continuación.

La ecuación de la raíz cúbica (Ec. 1) para el modelado del crecimiento micelial se reorganizó obteniendo la ecuación 9.

$$M_t^{1/3} = k_c t + M_0^{1/3} \quad (1)$$

$$M_t = (k_c t + M_0^{1/3})^3$$

$$\therefore M_t = k_c^3 t^3 + 3k_c^2 t^2 M_0^{1/3} + 3k_c t M_0^{2/3} + M_0 \quad (9)$$

La ecuación de Luedeking-Piret (Ec. 5) se integró con la ecuación cinética de raíz cúbica obteniendo la siguiente ecuación 10:

$$\begin{aligned} \int_0^t dP &= \int_0^t \left(\alpha \frac{dM_t}{dt} + \beta M_t \right) dt \\ \alpha \frac{d(k_c^3 t^3 + 3k_c^2 t^2 M_0^{1/3} + 3k_c t M_0^{2/3} + M_0)}{dt} &= \alpha [3k_c^3 t^2 + 6k_c^2 t M_0^{1/3} + 3k_c M_0^{2/3}] \\ \therefore \int_0^t dP &= \int_0^t [\alpha (3k_c^3 t^2 + 6k_c^2 t M_0^{1/3} + 3k_c M_0^{2/3}) + \beta (k_c^3 t^3 + 3k_c^2 t^2 M_0^{1/3} + \\ &3k_c t M_0^{2/3} + M_0)] dt \\ P_t - P_0 &= \alpha k_c^3 t^3 + 3\alpha k_c^2 t^2 M_0^{1/3} + 3\alpha k_c t M_0^{2/3} + \frac{1}{4} \beta k_c^3 t^4 + \beta k_c^2 t^3 M_0^{1/3} + \\ &\frac{3}{2} \beta k_c t^2 M_0^{2/3} + \beta M_0 \quad (10) \end{aligned}$$

Por lo tanto, la ecuación cinética que describió la relación entre los polisacáridos totales solubles en agua y la biomasa de *G. lucidum* se reescribe de la siguiente forma (Ec. 11):

$$\begin{aligned} P_t &= \frac{1}{4} \beta k_c^3 t^4 + (\alpha k_c^3 + \beta k_c^2 M_0^{1/3}) t^3 + (3\alpha k_c^2 M_0^{1/3} + \frac{3}{2} \beta k_c M_0^{2/3}) t^2 + (3\alpha k_c M_0^{2/3} + \\ &\beta M_0) t + P_0 \quad (11) \end{aligned}$$

Donde: α es la constante asociada al crecimiento, β es la constante no asociada al crecimiento, k_c es una constante de la ecuación de la raíz cúbica y P_0 es el producto inicial formado a analizar.

Por otra parte, la ecuación logística de no linealidad se evaluó mediante la ecuación 7, para ajustar la curva de biomasa. Esta ecuación es un modelo independiente del sustrato y es un modelo no estructurado, ampliamente utilizado para describir el crecimiento celular (Feng *et al.*, 2010). Sin embargo, la ecuación presentada en la metodología corresponde a la solución integral de la ecuación logística (Ec. 12).

$$\frac{dC}{dt} = \mu_m \left(1 - \frac{C}{C_m}\right) C \quad (12)$$

Donde C es el crecimiento expresado como peso seco del micelio (g/l), μ_m es la tasa máxima específica de crecimiento (h^{-1}), C_m es la concentración máxima de biomasa. Reescribiendo la solución integral de la ecuación 12 se obtiene:

$$C(t) = \frac{C_m}{1 + \left(\left(\frac{C_m}{C_0}\right) - 1\right)e^{-\mu_m t}} \quad (Ec. 13)$$

Sustituyendo la ecuación 13 y 12 en la ecuación de Luedeking-Piret (Ec. 5) y su solución integral se obtiene la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \int_0^t dP &= \int_0^t \left(\alpha \frac{dC}{dt} + \beta C \right) dt \\ \int_0^t dP &= \int_0^t \left(\alpha \frac{C_m}{1 + \left(\left(\frac{C_m}{C_0}\right) - 1\right)e^{-\mu_m t}} + \beta \frac{C_m}{1 + \left(\left(\frac{C_m}{C_0}\right) - 1\right)e^{-\mu_m t}} \right) dt \\ P(t) &= P_0 + \alpha [C(t) - C_0] + \beta C_m \left\{ \ln \left[\frac{C_0}{C(t)} \right] + \mu_m t \right\} / \mu_m \quad (Ec. 14) \end{aligned}$$

Donde P_0 , es la concentración del producto i en $t = 0$.

La Figura 16 representa la formación del producto en este caso los polisacáridos totales solubles en agua de *G. lucidum*, bajo las condiciones óptimas encontradas en el diseño de superficie de respuesta. Se empleó la ecuación 11 para simular los cambios en la formación de los polisacáridos totales y estimar su perfil de la formación, pero en cuanto la ecuación 14 los resultados experimentales no se ajustaron a la ecuación por lo tanto no se presenta su grafica..

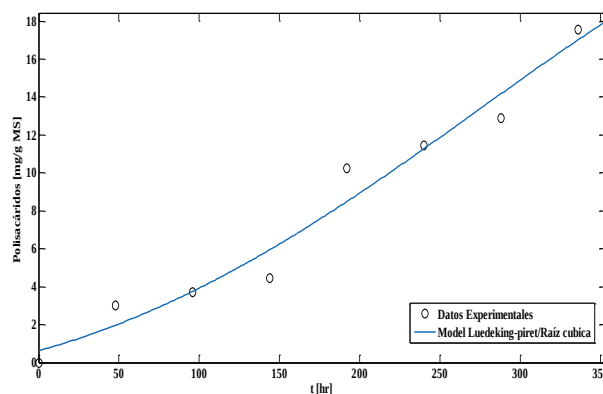


Figura 15. Cinética de datos experimentales para la producción de polisacáridos totales y ajuste de modelos Ec. 11 raíz cubica y Ec. 14 (**Fuente:** Esta investigación)

La formación del producto de *G. lucidum* en fermentación líquida se puede observar en la Figura 16. la producción de polisacáridos totales aumenta lentamente con el crecimiento celular y alcanzó un máximo de 17,55 mg/g MS a los 14 días, esta baja tasa de formación del producto puede deberse a la baja tasa de crecimiento micelial que se encontró en este estudio, debido a que los cultivos se realizaron en matraces sin agitación mecánica continua con baja transferencia de masa de oxígeno. Feng *et al.* (2010), menciona que la falta de transferencia de masa de oxígeno conlleva a una baja tasa de crecimiento y en paralelo a un rendimiento más bajo de la formación de producto. En cuanto al ajuste de los modelos en la Figura 16 se puede observar que solo la curva del modelo de Luedeking–Piret con la ecuación de raíz cubica se ajustó a los datos experimentales. En la Tabla 6 se muestran los coeficientes cinéticos de los modelos evaluados en este estudio.

Tabla 6*Valores de los coeficientes cinéticos del modelo de Luedeking–Piret*

Luedeking–Piret/Raíz cubica		Luedeking–Piret/Logístico	
Parámetros cinéticos	Valor	Parámetros cinéticos	Valor
P_0	0,6288	P_0	0,2505
α	1430	α	29,13
β	-5,996	β	0,06207
Estadísticos		Estadísticos	
$R^2 = 0,9654$	RMSE = 1,321	$R^2 = 0,5733$	RMSE = 4,638

Fuente: Esta investigación

Los resultados estadísticos mostraron que la formación del producto solo se ajustó al modelo Luedeking–Piret con solución de la ecuación de raíz cúbica con un R^2 de 0,9654; mientras que el modelo Luedeking–Piret con solución de la ecuación logística, no se ajustó a los datos experimentales ($R^2 = 0,5733$). Los coeficientes cinéticos se obtienen gracias a una estimación razonable según los datos experimentales y dado a que solo un modelo se ajustó con éxito a los datos, se realiza el análisis de los parámetros cinéticos de Luedeking-Piret de α y β con el modelo ajustado. Donde α (g g^{-1}) y β ($\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) son el coeficiente de formación del producto asociado al crecimiento (fase de crecimiento) y el coeficiente de formación del producto no asociado al crecimiento (fase estacionaria), respectivamente (Gharibzahedi, Razavi & Mousavi, 2013). El modelo Luedeking–Piret con solución de la ecuación de raíz cúbica mostraron que el grado de la constante de formación de producto asociada al crecimiento (α) es mucho mayor que la constante de formación del producto no asociado al crecimiento (β), por lo tanto, en este estudio la producción de polisacáridos totales solubles en agua de *G. lucidum* en fermentación líquida, se presenta asociada al crecimiento y los resultados demuestran que este modelo podría predecir la

producción de los polisacáridos totales en el cultivo sumergido. Según este modelo, la tasa de formación del producto depende linealmente de la tasa de crecimiento celular, pero los parámetros cinéticos α y β , dependen y varían con la dinámica de la fermentación (Surendhiran, Vijay, Sivaprakash & Sirajunnisa, 2015).

Con respecto a los modelos de estudio cinético en lo consultado no existen informes sobre modelamiento del cultivo líquido en pellets y la producción de polisacáridos totales de *G. lucidum*, las investigaciones de modelamiento en macromicetos son muy escasas pocos estudios se han reportado. Narkprasom *et al.* (2012) evaluó modelos cinéticos para la producción de biomasa y formación de producto (exopolisacáridos) de *G. tsugae* en fermentación líquida, el modelo evaluado para la formación de producto correspondió al modelo Luedeking–Piret con solución de la ecuación de raíz cubica y encontraron que este modelo describe adecuadamente la relación matemática entre biomasa y la formación de exopolisacaridos. Por otra parte Feng *et al.* (2010) evaluó los modelos para la formación de exopolisacaridos con el modelo de Luedeking–Piret con solución de la ecuación de raíz cubica para el crecimiento en pellet y el modelo de Luedeking–Piret con solución de la ecuación logística para el crecimiento de forma filamentosa de *L. edodes* en fermentación líquida, ambos modelos describieron perfectamnete la fermentación de *L. edodes* ($R^2 > 0,95$) y además en ambos modelos α fue mayor a β lo que indicó que la producción de exopolisacaridos de *L. edodes* se asoció con el crecimiento. Estos resultados fueron similares a los de la presente investigación, en la cual se encontró que la formación del producto de *G. lucidum* se asoció al crecimiento, sin embargo el modelo de Luedeking–Piret con solución de la ecuación logística no se ajustó a los datos experimentales y de acuerdo a la investigación de Feng *et al.* (2010), si bien este modelo se ajustó a los datos experimentales de *L. edodes* en fermentación líquida se debe tener en cuenta que este modelo se aplicó para su estudio cinetico en forma

filamentosa y en el caso de esta investigación solo se realizó el estudio cinético de *G. lucidum* en fermentación líquida en forma de pellets, por lo tanto, para poder comparar los resultados se hace necesario ampliar el estudio sobre el comportamiento del crecimiento de hongos en las morfologías de pellets y filamentoso. Esta información será útil para ampliar los estudios de cinética de micromicetos en fermentación líquida de importancia como uno de los parámetros clave en la producción industrial.

5.3. Determinación de la actividad antioxidante

G. lucidum, es una fuente muy potente de varios antioxidantes naturales (Mohsin & Ahmed, 2011), siendo los polisacáridos y los polifenoles los principales compuestos activos (Lin *et al.*, 2015), pero los polifenoles pueden ser los principales determinantes de su potencial antioxidante (Rašeta *et al.*, 2017). Por lo tanto, en la presente investigación se evaluó la actividad antioxidante y el contenido de los polifenoles en extractos acuosos del cuerpo fructífero y a la biomasa micelial de *G. lucidum* obtenida bajo condiciones óptimas del cultivo líquido. El contenido de los polifenoles se estandarizó frente al ácido gálico y los datos se expresaron como miligramos de equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de extracto (mg EAG/g) (curva de calibración ver Anexo B). En cuanto a la actividad antioxidante se determinó por el método espectrofotométrico por DPPH y los resultados de los extractos con tres replicas cada uno fueron interpolados de la curva de calibración, para lo cual se usaron soluciones patrón de Trolox en etanol en concentraciones de 2 a 70 μM , con 870 μL de etanol y 130 μL de solución de DPPH. Los resultados se expresaron en micromoles equivalentes a Trolox por gramo de extracto crudo ($\mu\text{mol Eq Trolox/g extracto}$). En la Tabla 7 se muestran los resultados.

Tabla 7

Comparativo de los valores de EAG/g y actividad antioxidante de G. lucidum

Muestra	Polifenoles mg EAG/g	$\mu\text{mol Eq Trolox/g extracto}$
Cuerpo fructífero	$14,66 \pm 2,47$	$4,80 \pm 0,25$
Biomasa	$44,16 \pm 0,92$	$6,96 \pm 0,76$

Fuente: Esta investigación

Para utilizar la biomasa micelial de los hongos es necesario demostrar que poseen valores nutricionales y medicinales comparables a los de los cuerpos fructíferos de los hongos (Carvajal *et al.*, 2012), por lo anterior, la cuantificación de polifenoles como la actividad antioxidante se realizó para el cuerpo fructífero y biomasa micelial de *G. lucidum*; el cuerpo fructífero corresponde al cuerpo del cual se obtuvo el micelio en PDA para los cultivos líquidos. Los resultados obtenidos del contenido de polifenoles y la actividad antioxidante de los extractos acuosos de *G. lucidum* analizados se indican en la Tabla 7. Aunque tanto el extracto acuoso del micelio y cuerpo fructífero poseen propiedades antioxidantes, los extractos acuosos del micelio demostraron un mayor contenido de polifenoles y una mayor actividad antioxidante que el del cuerpo fructífero. El micelio de *Ganoderma* parece contener muchos de los compuestos bioactivos como el del cuerpo fructífero (Sudheer *et al.*, 2019), esto fue demostrado en esta investigación en términos de polifenoles totales y la actividad antioxidante evaluada por el método DPPH, los resultados no solo indican ser comparables con el cuerpo fructífero de *G. lucidum* sino que también se demostró que la biomasa micelial obtenida por fermentación líquida es más apropiada para aumentar el potencial antioxidante de *G. lucidum*. Igualmente se ha confirmado que los compuestos antioxidantes que se encuentran en los cuerpos fructíferos, el micelio y el caldo extracelular son principalmente compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides), seguidos de otros compuestos como ergotioneínas, glucósidos, polisacáridos y vitaminas (tocoferoles, carotenoides y ácido ascórbico) (Rašeta *et al.*, 2017). No obstante, solo algunos estudios han demostrado que la

biomasa micelial de diferentes hongos medicinales posee propiedades farmacológicas comparables a las de los cuerpos fructíferos de los hongos, pero hasta ahora, no se han realizado esfuerzos para comparar los bioactivos antioxidantes de los cuerpos fructíferos y los micelios (Carvajal *et al.*, 2012), dado a que la mayoría de los estudios se han enfocado en optimizar los medios de cultivos líquidos para aumentar el rendimiento de la biomasa micelial y el contenido de los compuestos bioactivos.

Tradicionalmente, los compuestos bioactivos de los hongos se han extraído de los cuerpos fructíferos, no obstante, la producción de biomasa micelial constituye un proceso futuro prometedor para la producción estandarizada de productos alimenticios seguros a base de biomasa micelial rica en compuestos bioactivos (Kaur, Sharma, Khanna & Kapoor, 2015), como los polifenoles, que se ha demostrado constituyen una clase importante de fitoquímicos, responsables de inhibir el daño oxidativo causado por los radicales libres (Mohsin, Negi & Ahmed, 2011). El daño oxidativo juega un papel importante en la etiología y el curso de numerosas enfermedades como diabetes, aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad renal crónica y enfermedad pulmonar obstructiva crónica, por lo tanto una forma de prevenir estos trastornos relacionados con el daño oxidativo es llevar una dieta rica en antioxidante como los polifenoles (Podkowa, Poprawa, Opoka & Muszyńska, 2021), pues la actividad antioxidante aumenta con el aumento del contenido de los polifenoles (Lin *et al.*, 2015) y su consumo puede ser beneficioso para la salud (Carvajal *et al.*, 2012). En esta investigación se evaluó el contenido de polifenoles del cuerpo fructífero y la biomasa micelial de *G. lucidum* encontrado un valor más alto para la biomasa; una explicación de esto es la posible implicación de los compuestos fenólicos en el mecanismo de defensa de las setas cuando se están desarrollando en la naturaleza o en un cultivo en fase sólida, por lo cual, su concentración se verá reducida en la maduración de los

cuerpos fructíferos (Delgado, Quevedo, Domínguez, Corbal & Maury, 2020). Lo anterior, demuestra el potencial del proceso de la fermentación líquida para la obtención de biomasa micelial, ya que los resultados indican que la biomasa micelial es rica en polifenoles en comparación con el cuerpo fructífero de *G. lucidum*. El alto contenido de los polifenoles en la biomasa micelial reportado en este estudio fue comparable frente a otras investigaciones donde se reportan valores altos de polifenoles en muestras de *G. lucidum*, los valores se indican a continuación en la Tabla 8.

Tabla 8.

Comparativo de polifenoles totales frente otras investigaciones

Muestra	Polifenoles totales	Fuente
Extracto acuoso <i>G. lucidum</i>	32,44 ± 0,70 mg EAG/g	Mueses & Benavides, 2022
Extracto acuoso <i>G. lucidum</i>	30,96 ± 3,38 mg EAG/g	Mueses & Benavides, 2022
Extracto acuoso <i>G. lucidum</i>	29,71 ± 2,12 mg EAG/g	Mueses & Benavides, 2022
Extracto acuoso <i>G. lucidum</i>	33,1 ± 1,9 mg EAG/g	Lee & Lim 2019
Extracto acuoso <i>G. lucidum</i> Originario de Serbia	60,74 ± 0,57 mg GAE/g dry wt	Rašeta <i>et al.</i> 2017
extractos acuosos de micelio <i>G. lucidum</i> silvestre de la India	9,081± 0,073 mg GAE/g peso seco	Mohsin <i>et al.</i> 2011
Extractos metanólicos de micelios de <i>G. lucidum</i> en caldo extracto de malta	16,92 ± 0,87 6,46 ± 0,27 mg GAE/g extracto	Jiamworanunkul, 2019
Extractos metanólicos de micelios de <i>G. lucidum</i> en caldo de papa dextrosa	11,27 ± 1,36 6,46 ± 0,27 mg GAE/g extracto	Jiamworanunkul, 2019
Extractos metanólicos de micelios de <i>G. lucidum</i> en caldo de sacarosa de extracto de levadura	6,46 ± 0,27 mg GAE/g extracto	Jiamworanunkul, 2019
50 especies de hongos polacos	1,64 - 53,13 mg EAG/g de extracto seco	Jechalke, Olech & Nowak, 2018
Frutas	0,47 a 7,95 mg de GAE/g	Wu <i>et al.</i> 2004
Vegetales	0,24 a 12,47 mg de GAE/g	Wu <i>et al.</i> 2004

De acuerdo con los valores que se indican en la Tabla 8 frente a otras investigaciones se demuestra el potencial de la biomasa micelial de *G. lucidum* obtenida por fermentación líquida, como una fuente viable de antioxidantes por su contenido en polifenoles. Pero si bien los compuestos fenólicos representan uno de los grupos más importantes con efecto bioactivo de *G. lucidum*, solo se han realizado pocos estudios en determinar el contenido y composición de los polifenoles (Veljović *et al.*, 2017).

En cuanto la actividad antioxidante de *G. lucidum* por el método DPPH se demostró que el extracto acuso tanto de biomasa micelial como del cuerpo fructífero de *G. lucidum* tienen la capacidad de eliminar los radicales DPPH, pero se observó que la actividad antioxidante es levemente más alta en la biomasa micelial que en el cuerpo fructífero de *G. lucidum* (Tabla 7). No obstante, son muy escasos los estudios donde se reporten la capacidad antioxidante en macromicetes evaluada por el método DPPH expresados en μmol Eq Trolox/g extracto, la mayor parte de los estudios se reporta por el IC50. Sin embargo, investigaciones donde se reporten las mismas unidades de actividad antioxidante empleadas en esta investigación se indican en la Tabla 9.

Tabla 9.

Comparativo de actividad antioxidante frente a otras investigaciones

Muestra	Actividad antioxidante	Fuente
Extracto etanólico de soja fermentada por micelio de <i>G. lucidum</i>	$4,246 \pm 0,010 \mu\text{mol}$ Trolox/g de polvo seco	Suruga <i>et al.</i> 2020
Extracto etanólico de cuerpo fructífero de <i>Ganoderma</i> sp	229,656 μmol de Trolox/g	Pérez <i>et al.</i> , 2016
Extracto etanólico de micelio de <i>G. frondosa</i>	28,69 μmol Trolox/g	Suruga <i>et al.</i> , 2015
Muestras de pulpas de frutos (mora, uva, guayaba, fresa, mango entre otros)	4 a 13 μmol de Trolox /g	Kuskoski, Asuero & Troncoso, 2005

De acuerdo con los valores reportados en la Tabal 9 se destaca el potencial antioxidante de *G. lucidum* dado a que los valores de la actividad antioxidante pese a que es bajo cae dentro del rango reportado para el caso de las pulpas de frutas. Igualmente, en diversas investigaciones se ha encontrado que los extractos de *G. lucidum* tienen propiedades antioxidantes, que podrían atribuirse a polisacáridos, péptidos, complejos de polisacárido-péptido y compuestos fenólicos (Ahmad, 2018).

Las diferencias publicadas de los valores encontrados para la actividad antioxidante y concentración de polifenoles totales en los hongos, en general, varia con los géneros, las especies, las cepas e incluso las diferentes fases fisiológicas de crecimiento (Delgado *et al.*, 2020), al igual que el tipo de nutrientes, sustrato donde se desarrollan y de las condiciones climáticas que los rodean, haciendo que se altere su metabolismo, generando una amplia diversidad de compuestos químicos (González, 2017), de hecho se ha demostrado que el cultivo *in vitro* en PDA es el medio más indicado para aumentar el potencial antioxidante del micelio de *G. lucidum* (Heleno *et al.*, 2012), pero también se ha encontrado que el método de extracción afecta la actividad antioxidante de los extractos de hongos (Sharpe *et al.*, 2021), pues las propiedades químicas de los solvente son importantes no solo para incrementar la selectividad de los componentes extraídos a partir de las setas, sino que también mejoran el rendimiento de extracción (Delgado *et al.*, 2013). En la presente investigación se obtuvo extractos acuosos de micelio y cuerpo fructífero de *G. lucidum* y se determinó la actividad antioxidante en estos extractos. Los extractos de agua de hongos contienen varios polisacáridos, compuestos fenólicos y pequeñas proteínas como las lectinas, cada uno de los cuales puede tener sus propios efectos biológicos (Kozarski *et al.*, 2012); por ejemplo, los polisacáridos tienen capacidad antioxidante (Cör *et al.*, 2018) y su mecanismo antioxidante podría ser similar al de los compuestos fenólicos por transferencia de electrones (Quintero *et al.*, 2021),

también se ha reportado que los polisacáridos de los micelios tienen una eficacia similar a la del cuerpo fructífero. (Sudheer *et al.*, 2019). Esto explica la actividad antioxidante encontrada en los extractos acuosos de esta investigación, ya que los extractos se obtuvieron por la ebullición de la biomasa y cuerpo fructífero *G. lucidum*. Los extractos acuosos en caliente de *G. lucidum* concentran mejor los polisacáridos y diversos estudios han concluido que estos compuestos son potentes antioxidantes (Wu & Wang, 2009). De igual forma con los resultados obtenidos se demuestra que la técnica de extracción acuosa puede ser preferible a los métodos tradicionales de extracción, ya que, los métodos tradicionales se basan en extracciones en alcohol que requieren mayor tiempo de maceración y en algunos casos purifican algún compuesto individual lo que aumenta los costos de proceso (Sharpe *et al.*, 2021). Esto es ventajoso en la preparación de infusiones y tés de carácter alimentario, pues asegura el consumo de compuestos bioactivos con actividad antioxidante que hacen parte de *G. lucidum*, y que son beneficiosos para la salud humana (Santa Rosa, 2016).

Todo lo anterior indica el potencial de la fermentación líquida, pues los resultados muestran que la actividad antioxidante de la biomasa es levemente más alta que en el cuerpo fructífero de *G. lucidum*, esto da lugar a ventajas económicas para una mayor producción de metabolitos en un espacio compacto, más fácil de controlar, menor tiempo y menor probabilidad de contaminación en comparación con el cultivo de fermentación sólida para la obtención de cuerpos fructíferos, además la fermentación líquida puede proporcionar una biomasa valiosa rica en metabolitos que se pueden separar fácilmente, someter a un proceso de secado y molienda y ser adicionada a una matriz alimentaria para el desarrollo de alimentos funcionales.

5.4. Análisis FTIR de *G. lucidum*

El análisis FTIR se utilizó para obtener los espectros de vibración para: la biomasa micelial, cuerpo frutífero de *G. lucidum* y producto comercial de café con extracto de *Ganoderma*. Los espectros FTIR de diferentes muestras se indican en la siguiente Figura 17.

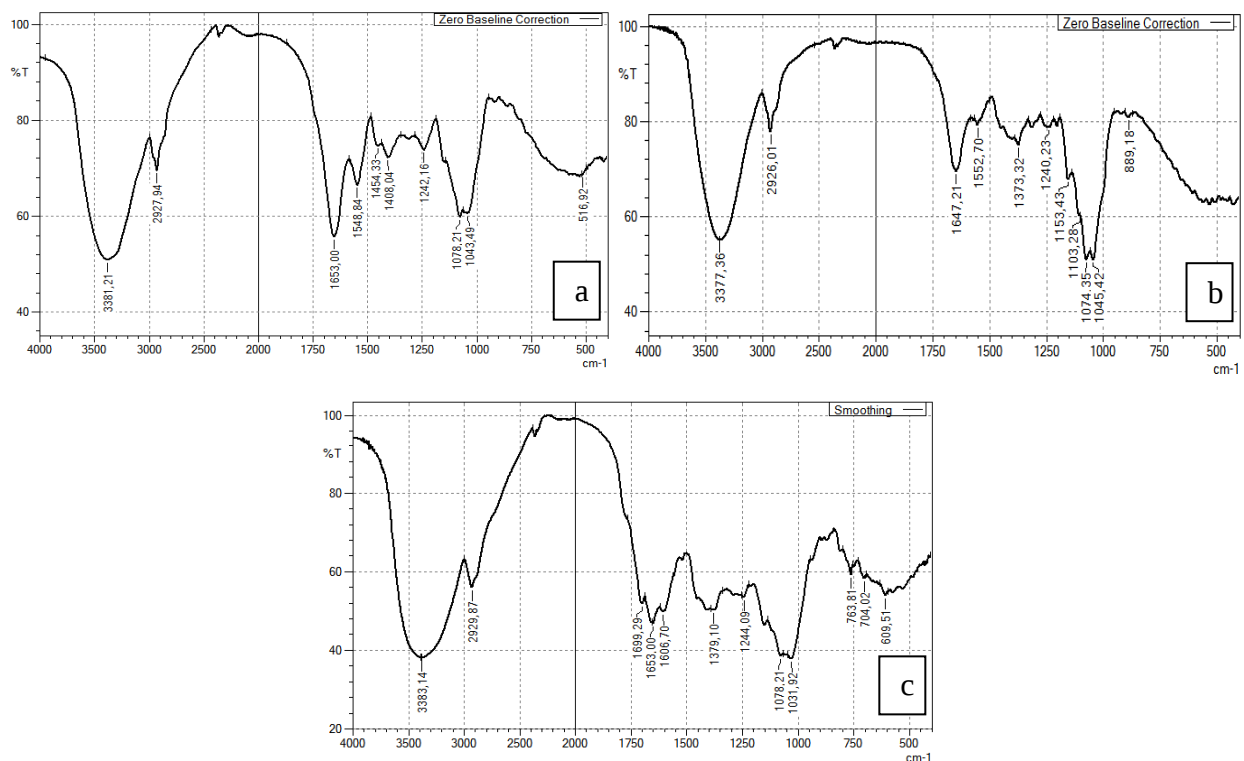


Figura 16. Espectros FTIR de a) Biomasa micelial y b) Cuerpo frutífero de *G. lucidum*. c) Producto comercial de café con extracto de *G. lucidum*. (Fuente: Esta investigación).

Los espectros infrarrojos de la Figura 17. indican que hay una similitud entre los picos, además, las bandas anchas y fuertes se encuentran en las mismas regiones para las tres muestras evaluadas. La Figura 17 a y 17 b corresponden a la biomasa micelial y cuerpo frutífero de *G. lucidum* respectivamente, los cuales presentan similitud de los picos en las mismas regiones entre los espectros. Cui *et al.* (2015) señalan que la bioactividad es mucho más alta en micelios que en cuerpos frutíferos y esporas de *G. lucidum*. Igualmente, de acuerdo con diferentes estudios se ha

encontrado que *G. lucidum* contiene varios compuestos activos, pero que difieren durante las diferentes etapas de crecimiento (Yang *et al.*, 2019), pero de acuerdo con los espectros obtenidos en esta investigación se puede decir que la composición tanto en la biomasa micelial y el cuerpo fructífero de *G. lucidum* es similar, pues las bandas encontradas en ambos espectros se reportan como: bandas anchas en la región de 3400 y 3200 cm^{-1} , un pico en la región de 2900 a 3000 cm^{-1} y varios picos en la región de 1000 a 1700 cm^{-1} . Igualmente, los espectros obtenidos son similares a los reportados por Choong *et al.*, (2013) de un producto comercial con Lingzhi 100% natural y por Mueses y Benavides (2021) del cuerpo fructífero de *G. lucidum*. En cuanto a las asignaciones de composición de las bandas las investigaciones reportan que las bandas anchas y fuertes en la región de 3400–3200 cm^{-1} se asignan al modo de estiramiento O–H, el pico en la región de 2900–3000 cm^{-1} corresponde al estiramiento C–H y en el espectro desde 1750 cm^{-1} a 1500 cm^{-1} los picos corresponden a amida de proteína (Choong *et al.*, 2013). Las bandas entre 1000 y 1100 cm^{-1} indican la presencia de polisacáridos, más exactamente la banda 1080 cm^{-1} se ha asignado al estiramiento de CO en β -glucanos y carbohidratos (Kozarski *et al.*, 2012) asimismo en el intervalo de 750–950 cm^{-1} a α y β - glucanos (Sangeetha *et al.*, 2019). En cuanto en la región 1600–1700 cm^{-1} se puede observar una banda fuerte de 1653 (Figura 16 a) y 1647,21 cm^{-1} (Figura 17 b) respectivamente posiblemente corresponda a la absorción de compuestos aromáticos, probablemente de los polifenoles, pero es necesario aislar estos compuestos para poder analizar por FTIR y evaluar si en efecto corresponde a esta asignación. Kozarski *et al.*, (2012) encontraron una banda fuerte en 1635 cm^{-1} en compuestos aislados de *G. lucidum*, la cual indicó la presencia de compuestos fenólicos.

Por otra parte, en el espectro FTIR de la muestra comercial de café con extracto de *Ganoderma*, se observan las siguientes bandas: 3383,14 cm^{-1} ; 2929,87 cm^{-1} ; y se observan varios

picos seguidos entre 1000-1700 cm^{-1} y en la región de 600-800 cm^{-1} . La composición química del café verde se compone principalmente de carbohidratos, lípidos, proteínas, compuestos fenólicos, minerales, ácidos grasos, y los alcaloides cafeína y trigonelina, pero durante el proceso de tostado, el cambio de lípidos, minerales, ácidos grasos, cafeína y trigonelina es pequeño, solo los carbohidratos, proteínas y fenoles se reducen (Mendes & Duarte, 2021). En cuanto a estudios cualitativos de composición química del café por el método de espectroscopia de infrarrojo se han identificado picos de interés asociados a diferentes compuestos químicos como cafeína, carbohidratos, agua y proteínas, los cuales han sido reportados en diferentes estudios, igualmente el espectro obtenido en esta investigación es similar a los reportados en los diferentes estudios.

Las investigaciones por FTIR realizadas en café tostado reportan bandas anchas en la región de 3200-3400 cm^{-1} y las han atribuido a un pico de agua es decir al contenido de humedad de la muestra (Rodríguez, Escobar & Guzmán, 2021). En las regiones a 2920 y a 2850 cm^{-1} las han asociado con la vibración del enlace C-H del grupo metilo de la molécula de la cafeína, mientras que la trigonelina ha sido asociada a picos en la región entre 1600-1300 cm^{-1} (Rodriguez, Calderon & Hernández, 2020) y los picos entre 1600–1650 cm^{-1} , las han asociado a los ácidos clorogénicos (ACG) (Barrera, Gutiérrez & Orozco, 2019).

En el espectro infrarrojo de café con extracto de *Ganoderma* (Figura 17 c) evaluado en esta investigación se puede observar dos picos en 1653 y 1699,29 cm^{-1} , algunos de los cuales podría corresponder probablemente a los polifenoles, en este caso a los polifenoles propios de *Ganoderma*, pues Kozarski *et al.*, (2012) indican en esa región la presencia de compuestos fenólicos de *G. lucidum*. Por otra parte, los picos reportados entre 1153-1150 cm^{-1} en café tostado se asocian a los polisacáridos (Rodriguez *et al.*, 2020), no obstante, en el espectro de la muestra comercial de café con *Ganoderma* de esta investigación se puede observar tres picos más en la

región de 600-800 cm^{-1} que de acuerdo a Sangeetha *et al.* (2019) menciona pueden corresponder a los α y β - glucanos de *G. lucidum*, por tanto, estos picos encontrados posiblemente correspondan a los glucanos proporcionados por el extracto de *Ganoderma* adicionado al café. Sin embargo, se requiere de más ensayos y otras pruebas analíticas para poder corroborar cuáles compuestos bioactivos enriquecen el café cuando se le adiciona extracto de *G. lucidum*, ya que el empaque del café comercial con extracto de *G. lucidum* evaluado no menciona el tipo de compuestos del hongo que mejoran la composición del producto. No obstante, en esta investigación si bien no se puede establecer con exactitud que compuesto bioactivo fue proporcionado al café por la adición de extracto de *Ganoderma*, al analizar los espectros FTIR de la biomasa micelial y del cuerpo fructífero de *G. lucidum* se encuentra similitudes entre ellos. Esto es de importancia para futuros estudios que surjan a partir de esta investigación, dado que en esta investigación fue posible establecer un método más rentable con viabilidad de producción de biomasa micelial de *G. lucidum* con aporte importante de compuestos bioactivos en mayor concentración que en los cuerpos fructíferos.

5.5. Análisis Sensorial

En el análisis sensorial se buscó calificar en qué proporción es más agradable el sabor de la bebida, teniendo en cuenta tres diferentes concentraciones de biomasa micelial de *G. lucidum* adicionada al café. Por su parte, el café empleado en esta investigación de acuerdo al juez entrenado es un café con notas de fruto rojo, manzana, caramelo, coco, limón, especias y yogurt. De cuerpo sedoso, acidez alta y residual prolongado, con notas de fruto rojo, mantequilla, caramelo y limón. Igualmente, conforme a los resultados del análisis realizado bajo el protocolo de la SCAA, el café empleado presentó un puntaje de 85,75 que de acuerdo a los protocolos del SCAA, es un

café excelente y se clasifica como de origen especial. En cuanto al análisis sensorial de este café cuando se le adicionó biomasa micelial de *G. lucidum*, el catador experto lo evaluó en una escala de 6 a 10 puntos atendiendo la escala de la SCAA. Las muestras que obtienen puntuaciones por debajo de seis puntos, no son consideradas cafés especiales. Los resultados se muestran a continuación.

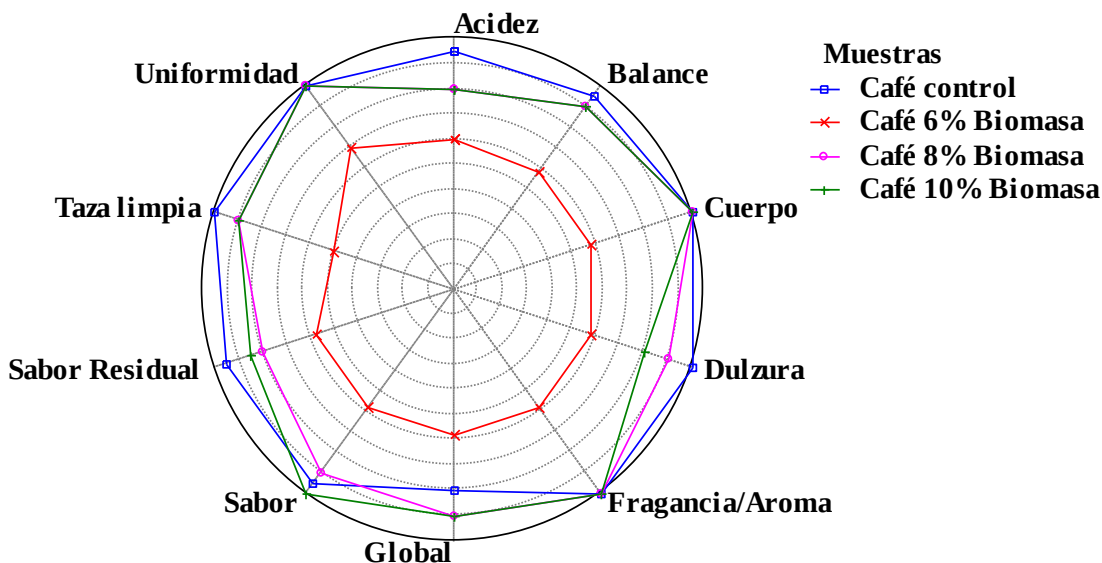


Figura 17. Gráfico radar araña escala 0-10 para las muestras de café con biomasa micelial de *G. lucidum*. (Fuente: Esta investigación).

Mediante el análisis sensorial bajo los atributos de sabor de las bebidas de café evaluadas se determinaron fallas, defectos en el café, así como atributos y sabores agradables. En la Figura 18 se muestra el perfil descriptivo de las cuatro muestras evaluadas, donde se puede observar que la muestra de café con 6% de biomasa micelial disminuyó su puntaje, sus atributos se mantienen casi relativamente constante alrededor de los 6,0 puntos, es decir la disminución de su puntaje causada por la adición de biomasa micelial hace que se mantenga en el mínimo valor de café especial de acuerdo a la escala de evaluación SCAA (Borém *et al.*, 2013). En cuanto a las muestras

con adición de 8 y 10% de biomasa micelial se puede observar en la Figura 18 que sus atributos aumentan de puntaje, alcanzando casi los puntajes de la muestra control, y éstos se mantienen relativamente constante en los 8 y 9 puntos, manteniéndose el café dentro del rango excelente y extraordinario, respectivamente. Los resultados encontrados son opuestos a los reportados por Benavides *et al.* (2017) quienes evaluaron el perfil sensorial de café de Nariño enriquecido con cuerpo fructífero de *G. lucidum*, y encontraron que a medida que aumenta la concentración de *Ganoderma*, menor es la calificación del perfil de taza debido al sabor amargo característico del hongo que le proporcionó al café. Este sabor amargo reporta Veljović *et al.* (2011) puede ser debido a los triterpenoides de *G. lucidum*. por ende, los alimentos enriquecidos con el hongo adquirirán un sabor amargo. No obstante, en esta investigación al emplear la biomasa micelial de *G. lucidum* obtenida por fermentación líquida, el sabor amargo característico del hongo no se percibió y en los análisis sensoriales las concentraciones más altas de 8 y 10% resultaron en una mayor puntuación del perfil de taza.

Sin embargo, la adición de biomasa micelial en concentración del 6% al café, disminuyó considerablemente su puntuación del perfil de taza. La explicación de lo anterior es que probablemente se produjo una reacción de las melanoidinas del café con los tioles que posiblemente contenía la biomasa micelial de *G. lucidum*. Las melanoidinas son la parte predominante de los compuestos no volátiles de la infusión de café e interactúan con compuestos volátiles del sabor (Andriot, Quéré & Guichard, 2004) y de acuerdo a las investigaciones se ha encontrado que las melanoidinas del café pueden unirse a los tioles y tener capacidad de retención de los compuestos aromáticos, lo que puede afectar el perfil final del sabor en la bebida de café, principalmente aromas tostados y/o sulfurosos (Zheng *et al.*, 2021), responsables de la disminución en la calidad del café (Hofmann & Schieberle, 2002). Pero caso contrario, al emplear mayor

concentración de biomasa micelial del 8 y 10% en el café, se mejoran considerablemente los atributos del perfil de taza. La posible explicación, es que la biomasa micelial puede contener trazas de lacasas; unas enzimas capaces de oxidar tioles y compuestos que producen mal olor (Xu, 2005), además, se ha reportado que las lacasas operan a mayor temperatura, lo que favorece altas velocidades de reacción en varios procesos, por ejemplo a altas temperaturas ($>60\text{ }^{\circ}\text{C}$) producen altas tasas iniciales de oxidación de fenol, pero la inactivación térmica de la enzima supera rápidamente este beneficio y detiene la oxidación (Delorme, Andanson & Verney, 2020). Por lo tanto, dado que la preparación del café se hizo a una temperatura del agua de $93\text{ }^{\circ}\text{C}$, y al incrementar el contenido de biomasa micelial, también incrementó el contenido de lacasas y por la temperatura ocurrió una reacción rápida donde posiblemente se oxidaron los tioles u otros compuestos responsables de ocasionar disminución de la calidad sensorial del café y por ende se mejoraron los atributos sensoriales, incluso hasta casi obtener la misma puntuación que la muestra control. No obstante, es necesario realizar un análisis químico más analítico en términos de composición en la bebida de café cuando se adiciona biomasa micelial para corroborar esta hipótesis.

Por otro lado, al emplear la biomasa micelial del hongo ésta no sintetiza por completo los compuestos responsables de darle el sabor amargo a los cuerpos fructíferos de los hongos, pues Veljović *et al* (2019) señala que *Ganoderma* al tener su estructura similar a la madera presenta compuestos similares a la misma como los taninos, y que éstos confieren el sabor amargo. Además, el cuerpo fructífero de *G. lucidum* es altamente lignificado lo que le da el sabor amargo fuerte (Hu *et al.*, 2017). Por consiguiente, en la presente investigación se demuestra un método prometedor del uso directo de la biomasa micelial en los alimentos, ya que, a mayor concentración de su adición en este caso al café, indicó ser una aplicación prometedora para el desarrollo de alimentos

funcionales con un contenido importante de compuestos bioactivos y que por ende aportan beneficios a la salud de los consumidores. Además, el análisis sensorial realizado en esta investigación es de importancia estratégica para el sector cafetero de Nariño, para la toma de decisiones en el desarrollo de generación de valor agregado al café mediante la adición de hongos medicinales que brinden propiedades antioxidantes y beneficios adicionales para los consumidores sin que se disminuya la calidad del café.

CONCLUSIONES

La composición del medio tiene una influencia significativa en la producción de biomasa micelial y polisacáridos totales de *G. lucidum* por fermentación sumergida. Las condiciones óptimas predijeron una producción de 3,2 g/L de biomasa micelial y 34.58 mg/g de polisacáridos totales en base seca.

Los modelos cinéticos seleccionados de la literatura permitieron ajustar los datos experimentales de la fermentación líquida de *G. lucidum* con cascarilla de café como medio no convencional para la cinética de crecimiento micelial, sin embargo, de los modelos para la formación de producto solo el modelo Luedeking–Piret con solución de la ecuación de raíz cubica se ajustó con éxito, esto demuestra que este modelo puede predecir la producción de los polisacáridos totales en la fermentación líquida.

La concentración de polifenoles totales y la actividad antioxidante de los extractos acuosos de la biomasa micelial de *G. lucidum* fue más alta en comparación con el cuerpo fructífero, esto puede confirmar lo que se reporta en la literatura que menciona que la bioactividad es mucho más alta en micelios que en cuerpos fructíferos y esporas de *G. lucidum*.

Las bandas de los espectros de absorción FTIR para la biomasa micelial y el cuerpo fructífero de *G. lucidum* resultaron comparables con los resultados de otras investigaciones.

La adición de biomasa micelial de *G. lucidum* en el café a mayor concentración, aumenta la calificación de sus atributos en el perfil de taza, esto demuestra el potencial de emplear la biomasa en la adición en alimentos, pues en el caso de café, mejora su calidad funcional.

Se deben realizar más investigaciones en la industria alimentaria para incentivar el diseño y desarrollo de productos a base de hongos medicinales, así como concientizar a los consumidores sobre los efectos beneficiosos de los compuestos bioactivos derivados de los hongos.

RECOMENDACIONES

Se recomienda evaluar otros tipos de sustratos para optimizar la producción de biomasa micelial de *G. lucidum* en fermentación líquida y que se tenga en cuenta como variable de estudio la agitación mecánica, ya que esta variable se evidencio influyó en el rendimiento del crecimiento micelial.

Las investigaciones futuras se deben centrar en la optimización de las técnicas de extracción de los compuestos bioactivos de *Ganoderma* para maximizar la actividad antioxidante y la estabilidad (es decir, modificando las técnicas de extracción, la temperatura y concentración del solvente y la relación muestra/solvente).

Se recomienda aplicar la biomasa micelial de *G. lucidum* a otro tipo de alimentos y evaluar su perfil nutricional y sensorial que permita aumentar su aplicación en la industria alimentaria.

Bibliografía

- Ahmad, M. F. (2018). *Ganoderma lucidum*: Persuasive biologically active constituents and their health endorsement. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 107(April), 507–519. <http://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.036>
- Andriot, I., Le Quéré, J.L. & Guichard, E. (2004). Interactions between coffee melanoidins and flavour compounds: impact of freeze-drying (method and time) and roasting degree of coffee on melanoidins retention capacity. *Food Chemistry*, 85(2), 289–294. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.007>
- Arango, S. C., & Nieto, J. (2015). Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Rev Iberoam Micol*, 30(1), 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.riam.2012.03.011>
- Araque, J., Niño, L., & Gelves, G. (2020, October). Industrial Scale Bioprocess Simulation for *Ganoderma Lucidum* Production using Superpro Designer. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1655, No. 1, p. 012077). IOP Publishing.
- Artunduaga, J. (2016). Evaluación de b-glucanos de *Ganoderma lucidum* como sustituto de grasa en tortas. Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/54218/>
- Avtonomova, A. V., Krasnopol'skaya, L. M., & Maksimov, V. N. (2006). Optimization of nutrient medium for submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. *Microbiology*, 75(2), 148–153. doi:10.1134/s002626170602007x
- Bakratsas, G., Polydera, A., Katapodis, P., & Stamatis, H. (2021). Recent trends in submerged cultivation of mushrooms and their application as a source of nutraceuticals and food additives. *Future Foods*, 4, 100086. <http://doi.org/10.1016/J.FUFO.2021.100086>
- Barbin, D. F., Felicio, A. L. de S. M., Sun, D.-W., Nixdorf, S. L., & Hirooka, E. Y. (2014). Application of infrared spectral techniques on quality and compositional attributes of coffee: An overview. *Food Research International*, 61, 23–32. doi:10.1016/j.foodres.2014.01.005
- Behera, S., & Gupta, N. (2015). Utilization of vegetable waste for biomass production of some wild edible mushroom cultures. *Tropical Plant Research*, 2(November 2014), 5–9.
- Benavides, O.L., Jarrín, V.F., Portilla, J.G., & Benavides, M.F. (2017, octubre, 4). Perfil sensorial de café de Nariño (Colombia) enriquecido con *Ganoderma lucidum* proveniente del cultivo en aserrín y granza de avena [Presentación en Póster]. V Simposio Internacional Agroalimentario. Universidad del Atlántico, Colombia.
- Bidegain, M. (2017). Optimización del cultivo de *Ganoderma lucidum*. Evaluación de actividad y desarrollo de nutraceuticos. Universidad Nacional del Sur.

- Bidegain M, Postemsky P, Gonzáles R, Figlas D, Devalis R, Delmastro S, and Cubitto MA. (2014). Optimización de la producción del hongo medicinal Reishi (*Ganoderma lucidum*) para el desarrollo de nutracéuticos y fitoterápicos. Red Vitec.
- Bishop, K. S., Kao, C. H. J., Xu, Y., Glucina, M. P., Paterson, R. R. M., & Ferguson, L. R. (2015). From 2000years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. *Phytochemistry*, 114, 56–65. doi:10.1016/j.phytochem.2015.02.015
- Boh, B., Berovic, M., Zhang, J., & Bin, L. (2007). *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnology Annual Review* (Vol. 13). [http://doi.org/10.1016/S1387-2656\(07\)13010-6](http://doi.org/10.1016/S1387-2656(07)13010-6)
- Boh, B. (2013). *Ganoderma lucidum*: A Potential for Biotechnological Production of Anti-Cancer and Immunomodulatory Drugs. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 8, 255–287.
- Bustillos R, Camilles F, and Dulay RM. Liquid culture and antioxidant properties of *Ganoderma lucidum* and *Pleurotus djamor*. *IJBPAS* 2018; 7(4): 576–583.
- Carvajal, A. E. S. S., Koehnlein, E. A., Soares, A. A., Eler, G. J., Nakashima, A. T. A., Bracht, A., & Peralta, R. M. (2012). Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of *Agaricus brasiliensis* (A.blazei) and their antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*, 46(2), 493–499. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.11.018>
- Classen, J. J., Engler, C. R., Kenerley, C. M., & Whittaker, A. D. (2000). A logistic model of subsurface fungal growth with application to bioremediation. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 35(4), 465–488. doi:10.1080/10934520009376982
- C  r, D., Knez,   ., & Knez Hrn  i  , M. (2018). Antitumour, Antimicrobial, Antioxidant and Antiacetylcholinesterase Effect of *Ganoderma Lucidum* Terpenoids and Polysaccharides: A Review. *Molecules* (Basel, Switzerland), 23(3), 649. <https://doi.org/10.3390/molecules23030649>
- Cui, Z. W., Xu, S. Y., Sun, D. W., & Chen, W. (2006). Dehydration of concentrated *Ganoderma lucidum* extraction by combined microwave-vacuum and conventional vacuum drying. *Drying Technology*, 24(5), 595–599. <http://doi.org/10.1080/07373930600626792>
- Cui, M., Yang, H., & He, G. (2015). Submerged fermentation production and characterization of intracellular triterpenoids from *Ganoderma lucidum* using HPLC-ESI-MS. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 16(12), 998–1010. <http://doi.org/10.1631/jzus.b1500147>
- Chang, S.T. (2008). Overview of Mushroom Cultivation and Utilization as Functional Foods. In *Mushrooms as Functional Foods*, P.C.K. Cheung (Ed.). <https://doi.org/10.1002/9780470367285.ch1>
- Cheng, P. G., Phan, C. W., Sabaratnam, V., Abdullah, N., Abdulla, M. A., & Kuppasamy, U. R. (2013). Polysaccharides-rich extract of *Ganoderma lucidum* (M.A. Curtis:Fr.) P. Karst

- accelerates wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. <http://doi.org/10.1155/2013/671252>
- Chin, S. K., Law, C. L., & Cheng, P. G. (2011). Effect of drying on crude ganoderic acids and water-soluble polysaccharides content in *ganoderma lucidum*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(January 2011), 38–43.
- Chin, S. K., & Law, C. L. (2014). Maximizing the Retention of Ganoderic Acids and Water-Soluble Polysaccharides Content of *Ganoderma lucidum* Using Two-Stage Dehydration Method. *Drying Technology*, 32(6), 644–656. <http://doi.org/10.1080/07373937.2013.850434>
- Choong, Y. K., Sun, S. Q., Zhou, Q., Lan, J., Lee, H. L., & Chen, X. D. (2013). Verification of *Ganoderma* (lingzhi) commercial products by Fourier Transform infrared spectroscopy and two-dimensional IR correlation spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 1069(1), 60–72. <http://doi.org/10.1016/j.molstruc.2013.11.049>
- De Melo Pereira, G. V., Karp, S. G., Letti, L. A. J., Pagnoncelli, M. G. B., Finco, A. M., Machado, M. R., & Soccol, C. R. (2019). Bioactive Polysaccharides Produced by Microorganisms: Production and Applications. *High Value Fermentation Products*, 231–251. [doi:10.1002/9781119555384.ch12](https://doi.org/10.1002/9781119555384.ch12)
- Delorme, A.E., Andanson, J.M., & Verney, V. (2020). Improving laccase thermostability with aqueous natural deep eutectic solvents. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163(15), 919–926. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.022>
- Delgado, Y., Quevedo, H., Domínguez, O. D., Corbal, P., & Maury, G. (2021). Composición micoquímica y actividad antioxidante de la seta *Pleurotus ostreatus* en diferentes estados de crecimiento. *Acta Biologica Colombiana*, 26(1), 89–98. <http://doi.org/10.15446/abc.v26n1.84519>
- Enshasy, H. A. (2007). Filamentous Fungal Cultures-Process Characteristics, Products, and Applications. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*, 225–261. <http://doi.org/10.1016/B978-044452114-9/50010-4>
- Escobar, H. C., Ibarra, T. B., Santa, S., & Parte, H. (2016). Caracterización de los sistemas productivos de café en Nariño, Colombia. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 19(1), 105–113.
- Escobar, H., Arteaga, D., Belalcázar, J., & Burbano, T.C. (2019). Caracterización socioeconómica de fincas cafeteras del departamento de Nariño, Colombia. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 22(2).
- Escalante H, Orduz J, Zapata H, Cardona MC, y Duarte M. (2011). Atlas del potencial energético de la biomasa residual en Colombia. Bucaramanga, Colombia. Ediciones Universidad Industrial de Santander, 180: 1-180.

- Fang, X., Zhao, G., Dai, J., Liu, H., Wang, P., Wang, L., Song, J., & Zheng, Z. (2018). Macro-morphological characterization and kinetics of *Mortierella alpina* colonies during batch cultivation. *PloS one*, 13(8), e0192803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192803>
- Fei, Y., Li, N., Zhang, D.-H., & Xu, J.-W. (2019). Increased production of ganoderic acids by overexpression of homologous farnesyl diphosphate synthase and kinetic modeling of ganoderic acid production in *Ganoderma lucidum*. *Microbial Cell Factories*, 18(1). doi:10.1186/s12934-019-1164-3
- Feng, Y. L., Li, W. Q., Wu, X. Q., Cheng, J. W., & Ma, S. Y. (2010). Statistical optimization of media for mycelial growth and exo-polysaccharide production by *Lentinus edodes* and a kinetic model study of two growth morphologies. *Biochemical Engineering Journal*, 49(1), 104–112. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2009.12.002>
- Frost, M. (2016). Three Popular Medicinal Mushroom Supplements: A Review of Human Clinical Trials. Faculty Publications. 1609. <https://scholarsarchive.byu.edu/facpub/1609>
- Gargano, M. L., van Griensven, L. J. L. D., Isikhuemhen, O. S., Lindequist, U., Venturella, G., Wasser, S. P., & Zervakis, G. I. (2017). Medicinal mushrooms: Valuable biological resources of high exploitation potential. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, 151(3), 548–565. doi:10.1080/11263504.2017.1301590
- Gharibzahedi, S. M. T., Razavi, S. H., & Mousavi, M. (2013). Kinetic analysis and mathematical modeling of cell growth and canthaxanthin biosynthesis by *Dietzia natronolimnaea* HS-1 on waste molasses hydrolysate. *RSC advances*, 3(45), 23495-23502. <https://doi.org/10.1039/C3RA44663H>
- Gu, S.-B., Yao, J.-M., Yuan, Q.-P., Xue, P.-J., Zheng, Z.-M., & Yu, Z.-L. (2006). Kinetics of *Agrobacterium tumefaciens* ubiquinone-10 batch production. *Process Biochemistry*, 41(8), 1908–1912. doi:10.1016/j.procbio.2006.04.002
- Guo, S.S., Cui, X.L. & Rausch, W.D. (2016). *Ganoderma Lucidum* polysaccharides protect against MPP (+) and rotenone-induced apoptosis in primary dopaminergic cell cultures through inhibiting oxidative stress. *Am J Neurodegener Dis*. 5(2):131-144.
- Gutarowska, B. & Żakowska, Z. (2009), Mathematical models of mycelium growth and ergosterol synthesis in stationary mould culture. *Letters in Applied Microbiology*, 48: 605-610. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02577.x>
- Heleno, S. A., Barros, L., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Fruiting body, spores and in vitro produced mycelium of *Ganoderma lucidum* from Northeast Portugal: A comparative study of the antioxidant potential of phenolic and polysaccharidic extracts. *Food Research International*, 46(1), 135–140. doi:10.1016/j.foodres.2011.12.009

- Hernández, F. A. (2009). Producción de β -glucanos utilizando el hongo basidiomiceto *Schizophyllum commune*. Instituto Politecnico Nacional.
- Hikichi, S. E., Andrade, R. P., Dias, E. S., & Duarte, W. F. (2017). Biotechnological applications of coffee processing by-products. *Handbook of Coffee Processing By-Products*, pp. 221–244. doi:10.1016/b978-0-12-811290-8.00008-6
- Hu, G., Zhai, M., Niu, R., Xu, X., Liu, Q., & Jia, J. (2018). Optimization of Culture Condition for Ganoderic Acid Production in *Ganoderma lucidum* Liquid Static Culture and Design of a Suitable Bioreactor. *Molecules*, 23(10), 2563. <http://doi.org/10.3390/molecules23102563>
- Hu, W.-S. (2017). Kinetics of Cell Growth Processes. In *Engineering Principles in Biotechnology*, W.-S. Hu (Ed.). <https://doi.org/10.1002/9781119159056.ch5>
- Hsieh, C., Hsu, T.-H., & Yang, F.-C. (2005). Production of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* by reusing thin stillage. *Process Biochemistry*, 40(2), 909–916. doi:10.1016/j.procbio.2004.02.004
- Hsieh, C., Tseng, M.-H., & Liu, C.-J. (2006). Production of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (CCRC 36041) under limitations of nutrients. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1-2), 109–117. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.05.004
- Hwang, I.W., Kim, B.M., Kim, Y.C., Lee, H.S. & Chung, S.K. (2018). Improvement in β -glucan extraction from *Ganoderma lucidum* with high-pressure steaming and enzymatic pre-treatment. *Appl Biol Chem* 61, 235–242 (2018). <https://doi.org/10.1007/s13765-018-0350-z>
- Jaros, D., Köbsch, J., & Rohm, H. (2018). Exopolysaccharides from Basidiomycota: Formation, isolation and techno-functional properties. *Engineering in Life Sciences*, 18(10), 743–752. <http://doi.org/10.1002/elsc.201800117>
- Jayasinghe, C., Imtiaj, A., Hur, H., Lee, G. W., Lee, T. S., & Lee, U. Y. (2008). Favorable Culture Conditions for Mycelial Growth of Korean Wild Strains in *Ganoderma lucidum*. *Mycobiology*, 36(1), 28. doi:10.4489/myco.2008.36.1.028
- Jechalke, N., Olech, M., & Nowak, R. (2018). Mushroom polyphenols as chemopreventive agents. *In Polyphenols: Prevention and treatment of human disease* (pp. 137-150). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813008-7.00011-4>
- Jiamworanunkul, S. (2019). Effective antioxidant production through submerged fermentation of edible mushrooms. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 43(4), 213–218.
- Kalyoncu, F., Oskay, M., & Kayalar, H. (2010). Antioxidant activity of the mycelium of 21 wild mushroom species. *Mycology*, 1(3), 195–199. <http://doi.org/10.1080/21501203.2010.511292>

- Karaman M, Atlagić K, Novaković A, Šibul F, Živić M, Stevanović K, Pejin B. Fatty Acids Predominantly Affect Anti-Hydroxyl Radical Activity and FRAP Value: The Case Study of Two Edible Mushrooms. *Antioxidants*, 8 (10): 480. <https://doi.org/10.3390/antiox8100480>
- Kasuya, M. C. M., da Luz, J. M. R., Nunes, M. D., da Silva, M. D. C. S., de Carvalho, D. R., de Assunção, L. S., ... & Bento, C. B. P. (2015). Production of Selenium-Enriched Mushrooms in Coffee Husks and Use of This Colonized Residue. In *Coffee in Health and Disease Prevention* (pp. 301-309). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00033-4>
- Kao Chi H.J., Amalini C. Jesuthasan, Karen S. Bishop, Marcus P. Glucina, & Ferguson, L. R. (2013). Anti-cancer activities of *Ganoderma lucidum* active ingredients and pathways. *Functional Foods in Health and Disease*, 3(2), 48–65. <http://doi.org/10.3390/molecules19045360>
- Kausar, S., Zia, S., Nadeem, Z., Murtaza, M. A., Hafiz, I., Shaheen, B. A., ... Khan, F. (2019). Submerged cultivation of medicinal mushroom in hydrolysate of ligno-cellulosic material. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(6), 2835–2841.
- Kim, S.-W., Hwang, H.-J., Xu, C.-P., Sung, J.-M., Choi, J.-W. and Yun, J.-W. (2003). Optimization of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Cordyceps militaris* C738. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 120-126. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01754.x>
- Kim, H. M., Park, M. K., & Yun, J. W. (2006). Culture pH Affects Exopolysaccharide Production in Submerged Mycelial Culture of *Ganoderma lucidum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 134(3), 249–262. doi:10.1385/abab:134:3:249
- Kim, K., Choi, B., Leskosek I., Lee, H., Kwon, S., Oh, K., & Kim, A. Y. (2011). Bioproduction of mushroom mycelium of *Agaricus bisporus* by commercial submerged fermentation for the production of meat analogue. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(9), 1561–1568. doi:10.1002/jsfa.4348
- Kowalska, A., Boruta, T. & Bizukojc, M. (2019). Kinetic model to describe the morphological evolution of filamentous fungi during their early stages of growth in the standard submerged and microparticle-enhanced cultivations. *Eng Life Sci.* 2019; 19: 557– 574. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900013>
- Kuskoski, M. E., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 25(4), 726–732. <http://doi.org/10.1007/s10877-009-9165-0>
- Lau, M.-F., Chua, K.-H., Sabaratnam, V. y Kuppusamy, UR (2021), *In vitro* and *in silico* anticancer evaluation of a medicinal mushroom, *Ganoderma neo-japonicum* Imazeki, against human colonic carcinoma cells. *Biotechnol Appl Biochem.* 68(4):902-917 <https://doi.org/10.1002/bab.2013>

- Lee, H. R., & Lim, H. Bin. (2019). Antimutagenic and antioxidative effects of polysaccharides isolated from the water extract of *Ganoderma lucidum*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 9(4), 1–7. <http://doi.org/10.7324/JAPS.2019.90401>
- Lin, Z., & Deng, A. (2019). Antioxidative and Free Radical Scavenging Activity of *Ganoderma* (Lingzhi). In *Ganoderma and Health* (Vol. 1182). Retrieved from <http://www.springer.com/series/5584>
- Liu, D. Z., Zhu, Y. Q., Li, X. F., Shan, W. G., & Gao, P. F. (2014). New triterpenoids from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* and their bioactivities. *Chemistry and Biodiversity*, 11(6), 982–986. <http://doi.org/10.1002/cbdv.201400004>
- Liu, S. R., & Zhang, W. R. (2018). Hyperproduction of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* using a solid seed grown in fine-powder of wheat bran and in vitro evaluation of the antioxidant activity of the exopolysaccharides produced. *Food Science and Biotechnology*, 27(4), 1129–1136. <http://doi.org/10.1007/s10068-018-0343-z>
- López, A. M., Díaz, J. C., & Garcés, L. (2011). Efecto de nutrientes sobre la producción de biomasa del hongo medicinal *Ganoderma lucidum*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1), 103–109.
- López-Meza, J., Hernández, D., Cocom, L.M., Pacheco, F.L., Pizaña, M.R. & Alvares, M.M. (2016). Using simple models to describe the kinetics of growth, glucose consumption, and monoclonal antibody formation in naive and infliximab producer CHO cells. *Cytotechnology*, 68, 1287–1300 (2016). <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9889-2>
- Lu, H, Lou, H, Hu, J, Liu, Z, Chen, Q. (2020). Macrofungi: A review of cultivation strategies, bioactivity, and application of mushrooms. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 19, 2333– 2356. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12602>
- Maier, R. M., & Pepper, I. L. (2015). Bacterial Growth. *Environmental Microbiology*, 37–56. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00003-X>
- Marek, S., Piotr, R., Przemysław, ... Mirosław, M. (2017). Comparison of multielemental composition of Polish and Chinese mushrooms (*Ganoderma* spp.). *Eur Food Res Technol* 243, 1555–1566. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2864-8>
- Mäkelä, M. R., Marinović, M., Nousiainen, P., Liwanag, A. J. M., Benoit, I., Sipilä, J., ... Hildén, K. S. (2015). Aromatic Metabolism of Filamentous Fungi in Relation to the Presence of Aromatic Compounds in Plant Biomass. *Advances in Applied Microbiology*, 63–137. [doi:10.1016/bs.aambs.2014.12.001](https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.12.001)
- Mendes, E., & Duarte, N. (2021). Mid-Infrared Spectroscopy as a Valuable Tool to Tackle Food Analysis: A Literature Review on Coffee, Dairies, Honey, Olive Oil and Wine. *Foods*, 10(2), 477. <https://doi.org/10.3390/foods10020477>

- Ministerio de Agricultura (2021). Cadena café. Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales. Recuperado de: <https://sioc.minagricultura.gov.co/Cafe/Documentos/2021-03-31%20Cifras%20Sectoriales.pdf>
- Mohsin, M., Negi, P. S., & Ahmed, Z. (2011). Determination of the Antioxidant Activity and Polyphenol Contents of Wild Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt. Fr.) P. Karst. (Higher Basidiomycetes) from Central Himalayan Hills of India. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 13(6), 535–544. doi:10.1615/intjmedmushr.v13.i6.50
- Moon, B., & Lo, Y. M. (2013). Conventional and Novel Applications of Edible Mushrooms in Today's Food Industry. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(5), 2146–2153. doi:10.1111/jfpp.12185
- Morris, H. J., Llauradó, G., Beltrán, Y., Lebeque, Y., Bermúdez, R. C., García, N., ... Moukha, S. (2016). The Use of Mushrooms in the Development of Functional Foods, Drugs, and Nutraceuticals. *Wild Plants, Mushrooms and Nuts*, 123–157. doi:10.1002/9781118944653.ch5
- Mueses, R. B., & Benavides, O. L. (2022). Polifenoles totales de *Ganoderma lucidum* cultivado en residuos de *Pandala talaumanariñensis* y *Avena sativa*. *Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 20(1), 18–26. <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v20.n1.2022.1491>
- Muloiwa, M., Nyende-Byakika, S., & Dinka, M. (2020). Comparison of unstructured kinetic bacterial growth models. *South African Journal of Chemical Engineering*. doi:10.1016/j.sajce.2020.07.006
- Nair, R. B., Lennartsson, P. R., & Taherzadeh, M. J. (2016). Mycelial pellet formation by edible ascomycete filamentous fungi, *Neurospora intermedia*. *Amb Express*, 6(1), 1-10.
- Nakagawa, T., Zhu, Q., Tamrakar, S., Amen, Y., Mori, Y., Suhara, H., ... Shimizu, K. (2018). Changes in content of triterpenoids and polysaccharides in *Ganoderma lingzhi* at different growth stages. *Journal of Natural Medicines*, 72(3), 734–744. doi:10.1007/s11418-018-1213-y
- Narkprasom, N., Guo, J.-H., Huang, T.-C., & Guu, Y.-K. (2012). The Kinetic Models for Biomass and Extracellular Polysaccharide of *Ganoderma tsugae*. *APCBEE Procedia*, 2, 7–11. <http://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.002>
- Nielsen J., Villadsen J., Lidén G. (2003) Modeling of Growth Kinetics. In: Bioreaction Engineering Principles. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0767-3_7
- Nowacka-Jechalke, N., Olech, M., & Nowak, R. (2018). Mushroom Polyphenols as Chemopreventive Agents. *Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease*, 137–150. doi:10.1016/b978-0-12-813008-7.00011-4

- Obodai, M., Mensah, D. L., Fernandes, Â., Kortei, N. K., Dzomeku, M., Teegarden, M., Schwartz, S. J., Barros, L., Prempeh, J., Takli, R. K., & Ferreira, I. C. (2017). Chemical Characterization and Antioxidant Potential of Wild *Ganoderma* Species from Ghana. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(2), 196. <https://doi.org/10.3390/molecules22020196>
- Ochoa, J. P., & Guzmán, N. (2021). Llamado a realizar un adecuado uso de los subproductos del café. *Erasmus Semilleros de Investigación*, (Extra), 58-64.
- Ogidi, C.O., Oyetayo, V.O & Akinyele, B.J. (2020). Wild Medicinal Mushrooms: Potential Applications in Phytomedicine and Functional Foods, An Introduction to Mushroom, Ajit Kumar Passari and Sergio Sánchez, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.90291.
- Olarte, C. (2013). Proceso para potenciar la producción de sustancias de *Ganoderma lucidum* y actividad antifúngica. (Tesis de pregrado). Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
- Oludemi, T., Barros, L., Prieto, M. A., Heleno, S. A., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Extraction of triterpenoids and phenolic compounds from: *Ganoderma lucidum*: Optimization study using the response surface methodology. *Food and Function*, 9(1), 209–226. <http://doi.org/10.1039/c7fo01601h>
- Olorunnisola, K. S., Jamal, P., & Alam, M. Z. (2018). Growth, substrate consumption, and product formation kinetics of *Phanerochaete chrysosporium* and *Schizophyllum commune* mixed culture under solid-state fermentation of fruit peels. *3 Biotech*, 8(10), 429. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1452-3>
- Orozco, B., Islas, R. E., Peregrina, J., & Velazquez, S. (2011). Efectos inmunoestimulantes y antibióticos de los bioproductos del caldo de cultivo sumergido de micelio de *Ganoderma sichuanense* en ratones inoculados con Linfoma Murino L5178Y en fase sólida. *Revista de Ciencias de La Salud*, 4(10), 1–12.
- Pan, K., Jiang, Q., Liu, G., Miao, X., & Zhong, D. (2013). Optimization extraction of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its immunity and antioxidant activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 55, 301–306. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.01.022>
- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., Brand, D., Mohan, R., & Roussos, S. (2000). Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, 6(2), 153–162. doi:10.1016/s1369-703x(00)00084-x
- Paterson, R. R. M. (2006). *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*, 67(18), 1985–2001. doi:10.1016/j.phytochem.2006.07.004
- Patnaik, P. R. (2000). Penicillin Fermentation: Mechanisms and Models for Industrial-Scale Bioreactors. *Critical Reviews in Biotechnology*, 20(1), 1–15. doi:10.1080/07388550091144168

- Pérez, C. A., Santafé, G. G., Torres, M. G., Torres, O. L., Montaña, M. C., & Robledo, S. M. (2016). Composición lipídica y evaluación de las actividades antioxidante y leishmanicida del basidiomiceto *Ganoderma* sp. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(3), 1–11. Retrieved from <http://scielo.sld.cu>
- Petre, M., Petre, V., Teodorescu, A., & Patrulescu, F. (2013). Nutritive Mushroom Biomass Producing Through Submerged Fermentation of Agricultural Organic Waste. *Studia UBB Ambientum*, LVIII, 79–86.
- Pinya, S., Ferriol, P., Tejada, S., & Sureda, A. (2019). Mushrooms reishi (*Ganoderma lucidum*), shiitake (*Lentinula edodes*), maitake (*Grifola frondosa*). Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements, 517–526. doi:10.1016/b978-0-12-812491-8.00068-0
- Pokhrel, C., & Ohga, S. (2007). Submerged culture conditions for mycelial yield and polysaccharides production by *Lyophyllum decastes*. *Food Chemistry*, 105(2), 641–646. doi:10.1016/j.foodchem.2007.04.033
- Podkowa, A., Poprawa, A., Opoka, W & Muszyńska, B. (2021). Culinary–medicinal mushrooms: a review of organic compounds and bioelements with antioxidant activity. *Eur Food Res Technol* 247, 513–533. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03646-1>
- Prasetyo, D. J., Jatmiko, T. H., Poeloengasih, C. D., & Kismurtono, M. (2017). Drying Characteristics and Water-soluble Polysaccharides Evaluation of Kidney Shape *Ganoderma lucidum* Drying in Air Circulation System. *ICONPROBIOS*, 101(1). <http://doi.org/10.1088/1755-1315/101/1/012012>
- Prosser, J. I. (1995). Kinetics of Filamentous Growth and Branching. *The Growing Fungus*, 301–318. doi:10.1007/978-0-585-27576-5_14
- Prosser, J. I., & Tough, A. J. (1991). Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology*, 10(4), 253–274. <http://doi.org/10.3109/07388559109038211>
- Quintero, K. P., Lugo, M. A., Rivera, P., Silva, B. A., González, G. A., Esqueda, M., ... Ayala, F. J. (2021). Antioxidant properties and industrial uses of edible polyporales. *Journal of Fungi*, 7(3). <http://doi.org/10.3390/jof7030196>
- Ratajczak, M., Kaminska, D., Świątły-Błaszkiwicz, A., & Matysiak, J. (2020). Quality of Dietary Supplements Containing Plant-Derived Ingredients Reconsidered by Microbiological Approach. *International journal of environmental research and public health*, 17(18), 6837. <https://doi.org/10.3390/ijerph17186837>
- Rojas, D., Palacio, A., Ospina, S., Zapata, P., & Atehortúa, L. (2012). Biotecnología de hongos basidiomicetes en el desarrollo de alimentos funcionales: procesos de secado vs. capacidad antioxidante. *Vita*, 19(Supl. 1).

- Rojas, D. F., Zapata, P. A., Palacio, A. M., Ospina, S. P., & Atehortúa, L. (2013). Basidiomycetes Mushroom Biotechnology for the Development of Functional Products: The Effect of Drying Processes on Biological Activity. *Family and Community Health*, 4, 93–98. <http://doi.org/10.1097/00003727-200404000-00009>
- Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., ... Langley, E. (2010). Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*, 36(2), 146–167. doi:10.3109/10408410903489576
- Sánchez, C. (2017). Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2(1), 13–22. <http://doi.org/10.1016/j.synbio.2016.12.001>
- Sánchez, Ó. J., & Montoya, S. (2020). Assessment of polysaccharide and biomass production from three white-rot fungi by solid-state fermentation using wood and agro-industrial residues: A kinetic approach. *Forests*, 11(10), 1–23. <http://doi.org/10.3390/f11101055>
- Sangeetha, B., Krishnamoorthy, A. S., Amirtham, D., Sundara Sharmila, D. J., Renukadevi, P., & G. Malathi, V. (2020). FT-IR Spectroscopic Characteristics of *Ganoderma lucidum* Secondary Metabolites. *Current Journal of Applied Science and Technology*, 38(6), 1–8. <http://doi.org/10.9734/cjast/2019/v38i630453>
- Santillán, M. Á., Castañeda Ovando, A., Álvarez Delgadillo, A., Valenzuela Garza, R., Romero Bautista, L., & Torres Valencia, J. M. (2017). Estudio preliminar de la actividad antioxidante de tres especies del género *Ganoderma* (Polyporaceae) nativas del estado de Hidalgo, México. *Scientia Fungorum*, 46, 37–45. <http://doi.org/10.33885/sf.2017.46.1175>
- Sapan, K.S., Nandini, G.N., & Singh, Atri. (2015). Optimization, Composition, and Antioxidant Activities of Exo- and Intracellular Polysaccharides in Submerged Culture of *Cordyceps gracilis* (Grev.) Durieu & Mont. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2015, Article ID 462864. <https://doi.org/10.1155/2015/462864>
- Silva, C. A., & Trejos, C. R. (2016). Prospectiva del café en Nariño: Sabor y aroma Prospective coffee in Nariño: Flavor and scent of a tradition. *Revista Estrategia Organizacional*, 5(1), 11–28.
- Suárez Arango, C. (2012). Utilización de la fermentación líquida de *lentinula edodes* (shiitake), para la producción de metabolitos secundarios bioactivos y evaluación de su potencial empleo en la producción de un alimento funcional.
- Subedi K., Basnet B.B., Panday R., Neupane M., Tripathi G.R. (2021). Optimization of Growth Conditions and Biological Activities of Nepalese *Ganoderma lucidum* Strain Philippine. *Adv Pharmacol Pharm Sci*, 4888979. doi: 10.1155/2021/4888979.

- Sudheer, S., Alzorqi, I., Manickam, S., & Ali, A. (2019). Bioactive Compounds of the Wonder Medicinal Mushroom “*Ganoderma lucidum*.” In *Bioactive Molecules in Food*, 1863–1893. http://doi.org/10.1007/978-3-319-78030-6_45
- Supramani, S., Ahmad, R., Ilham, Z., Annuar, M. S. M., Klaus, A., & Wan-Mohtar, W. A. A. Q. I. (2019). Optimisation of biomass, exopolysaccharide and intracellular polysaccharide production from the mycelium of an identified *Ganoderma lucidum* strain qrs 5120 using response surface methodology. *AIMS Microbiology*, 5(1), 19–38. <http://doi.org/10.3934/microbiol.2019.1.19>
- Suruga, K., Tomita, T. & Kadokura, K. (2020). Soybean fermentation with basidiomycetes (medicinal mushroom mycelia). *Chem. Biol. Technol. Agric.* 7, 23. <https://doi.org/10.1186/s40538-020-00189-1>
- Suruga, K., Kadokura, K., Sekino, Y., Nakano, T., Matsuo, K., Irie, K., ... Komatsu, Y. (2015). Effects of Comb Tooth Cap Medicinal Mushroom, *Hericium ramosum* (Higher Basidiomycetes) Mycelia on DPPH Radical Scavenging Activity and Nerve Growth Factor Synthesis. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 17(4), 331–338. doi:10.1615/intjmedmushrooms.v17
- Sharpe, E., Farragher-Gnadt, A. P., Igbanugo, M., Huber, T., Michelotti, J. C., Milenkowic, A., ... Bou-Abdallah, F. (2021). Comparison of antioxidant activity and extraction techniques for commercially and laboratory prepared extracts from six mushroom species. *Journal of Agriculture and Food Research*, 4, 100130. <http://doi.org/10.1016/J.JAFR.2021.100130>
- Shemekite, F., Gómez-Brandón, M., Franke-Whittle, I. H., Praehauser, B., Insam, H., & Assefa, F. (2014). Coffee husk composting: an investigation of the process using molecular and non-molecular tools. *Waste management (New York, N.Y.)*, 34(3), 642–652. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.11.010>
- Shu, C.-H., Lin, K.-J., & Wen, B.-J. (2004). Effects of culture pH on the production of bioactive polysaccharides by *Agaricus blazei* in batch cultures. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 79(9), 998–1002. doi:10.1002/jctb.1083
- Shu, C.H. (2007). Fungal Fermentation for Medicinal Products. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*, 447–463. doi:10.1016/b978-044452114-9/50018-9
- Smina, T. P., Mathew, J., Janardhanan, K. K., & Devasagayam, T. P. A. (2011). Antioxidant activity and toxicity profile of total triterpenes isolated from *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst occurring in South India. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32(3), 438–446. doi:10.1016/j.etap.2011.08.011
- Speciality Coffee Association of America (SCAA). (2008). *Protocolos de catación*. USA
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2017). Microbial growth kinetics. *Principles of Fermentation Technology*, 21–74. doi:10.1016/b978-0-08-099953-1.00002-8

- Surendhiran, D., Sivaprakash, V., Sirajunnisa, A. (2015). Kinetic modeling of microalgal growth and lipid synthesis for biodiesel production. *3 Biotech*, 5, 663–669. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0264-3>
- Suruga, K., Tomita, T. & Kadokura, K. (2020). Soybean fermentation with basidiomycetes (medicinal mushroom mycelia). *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 7(23), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s40538-020-00189-1>
- Tabares, A. F., & Toro, C. A. (2013). Actividad antiinflamatoria y antioxidante del extracto etanólico del hongo *Ganoderma lucidum* cultivado en residuos de la industria cafetera y fructificado bajo radiaciones del espectro visible de longitudes de onda específica. Universidad Tecnológica de Pereira.
- Tang, Y. J., & Zhong, J. J. (2002). Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(1–2), 20–28. [http://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00066-2](http://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00066-2)
- Tang, Y.-J., Zhang, W., & Zhong, J.-J. (2009). Performance analyses of a 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. <http://doi:10.1016/j.biortech.2008.10.005>
- Tang, Y. J., Zhang, W., Liu, R. S., Zhu, L. W., & Zhong, J. J. (2011). Scale-up study on the fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for the hyperproduction of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides. *Process Biochemistry*, 46(1), 404-408.
- Tao, TL., Cui, FJ., Chen, X.X., ... Liu, W.M. (2018). Improved mycelia and polysaccharide production of *Grifola frondosa* by controlling morphology with microparticle Talc. *Microb Cell Fact* 17(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0850-2>
- Taofiq, O., Heleno, S. A., Calhella, R. C., Alves, M. J., Barros, L., González-Paramás, A. M., ... Ferreira, I. C. F. R. (2017). The potential of *Ganoderma lucidum* extracts as bioactive ingredients in topical formulations, beyond its nutritional benefits. *Food and Chemical Toxicology*, 108, 139–147. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2017.07.051>
- Trinci, A.P.J. (1970). Kinetics of the growth of mycelial pellets of *Aspergillus nidulans*. *Archiv für Mikrobiologie*, 73, 353–367. <https://doi.org/10.1007/BF00412302>
- Thuy, M., & Tuyen, N. (2015). Extraction of bioactive compounds and spore powder collection from *Ganoderma lucidum*. *Can Tho University Journal of Science*, 1(January), 53. <http://doi.org/10.22144/ctu.jen.2015.001>
- Uriza, P. J. (2014). Evaluación de la inclusión de los β - glucanos de *Ganoderma lucidum* en yogur. Trabajo de Grado Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C., Colombia.

- Valverde, M. E., Hernández-Pérez, T., & Paredes-López, O. (2015). Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. *International journal of microbiology*, 2015, 376387. <https://doi.org/10.1155/2015/376387>
- Veljović, S., Veljović, M., Nikićević, N., Despotović, S., Radulović, S., Nikšić, M., & Filipović, L. (2017). Chemical composition, antiproliferative and antioxidant activity of differently processed *Ganoderma lucidum* ethanol extracts. *Journal of food science and technology*, 54(5), 1312–1320. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2559-y>
- Veljović, S. P., Tomić, N. S., Belović, M. M., Nikićević, N. J., Vukosavljević, P. V., Nikšić, M. P., & Tešević, V. V. (2019). Volatile Composition, Colour, and Sensory Quality of ¹¹SEP Spirit-Based Beverages Enriched with Medicinal Fungus *Ganoderma lucidum* and Herbal Extract. *Food technology and biotechnology*, 57(3), 408–417. <https://doi.org/10.17113/ftb.57.03.19.6106>
- Wachtel-Galor, S., Yuen, J., Buswell, J.A. & Benzie, I.F. (2011). *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi): A Medicinal Mushroom. In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2011. Chapter 9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92757>
- Wagner, R., Mitchell, D. A., Sasaki, G. L., Amazonas, A. L. D. A., & Berovic, M. (2003). Current Techniques for the Cultivation of. *Food Technol. Biotechnol*, 41(4), 371–382.
- Wang, L., Ridgway, D., Gu, T., & Moo-Young, M. (2008). Kinetic modeling of cell growth and product formation in submerged culture of recombinant *Aspergillus niger*. *Chemical Engineering Communications*, 196(4), 481–490. doi:10.1080/00986440802483947
- Wang, L.-Y., Cheong, K.-L., Wu, D.-T., Meng, L.-Z., Zhao, J., & Li, S.-P. (2015). Fermentation optimization for the production of bioactive polysaccharides from *Cordyceps sinensis* fungus UM01. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 180–185. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.04.040
- Wang, Q., Huang, Q., Liang, L., Zhang, L., Ping, Z., Hu, B., & Ma, N. (2018). Research on sugarcane juice fermentation by *Ganoderma lucidum* and assay of antioxidant activity of exopolysaccharide. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(9), 1–8. <http://doi.org/10.1111/jfpp.13761>
- Wang, Z., Gao, W., Liu, X., ... Zhang, H. (2019). Efficient production of polysaccharide by *Chaetomium globosum* CGMCC 6882 through co-culture with host plant *Gynostemma pentaphyllum*. *Bioprocess Biosyst Eng* 42, 1731–1738. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02169-8>
- Wang, C., Liu, X., Lian, C., Ke, J., & Liu, J. (2019). Triterpenes and Aromatic Meroterpenoids with Antioxidant Activity and Neuroprotective Effects from *Ganoderma lucidum*. *Molecules*, 24(23), 1–11.

- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2004). Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 4026–4037. doi:10.1021/jf049696w
- Wu, D.-T., Deng, Y., Chen, L.-X., Zhao, J., Bzhelyansky, A., & Li, S.-P. (2017). Evaluation on quality consistency of *Ganoderma lucidum* dietary supplements collected in the United States. *Scientific Reports*, 7(1), 7792. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-06336-3>
- Wu, Y., & Wang D.A. (2009). New Class of Natural Glycopeptides with Sugar Moiety Dependent Antioxidant Activities Derived from *Ganoderma lucidum* Fruiting Bodies. *J. Proteome Res*, 71, 241-245. <https://doi.org/10.1021/pr800554w>
- Xu, F. (2005). Applications of oxidoreductases: Recent progress. *Industrial Biotechnology*, 1(1), 38-50. <https://doi.org/10.1089/ind.2005.1.38>
- XU, Q., LIU, Z., SUN, Y., DING, Z., LÜ, L., & LI, Y. (2012). Optimization for Production of Intracellular Polysaccharide from *Cordyceps ophioglossoides* L2 in Submerged Culture and Its Antioxidant Activities in vitro. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 20(2), 294–301. doi:10.1016/s1004-9541(12)60391-7
- Xu, P. (2020). Analytical solution for a hybrid Logistic-Monod cell growth model in batch and continuous stirred tank reactor culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 117, 873– 878. <https://doi.org/10.1002/bit.27230>
- Yang, Y., Zhang, H., Zuo, J., Gong, X., Yi, F., Zhu, W. & Li, L. (2019). Advances in research on the active constituents and physiological effects of *Ganoderma lucidum*. *Biomed Dermatol*, 3, 6. <https://doi.org/10.1186/s41702-019-0044-0>
- Ye, L., Liu, S., Xie, F., Zhao, L., & Wu, X. (2018). Enhanced production of polysaccharides and triterpenoids in *Ganoderma lucidum* fruit bodies on induction with signal transduction during the fruiting stage. *PLoS ONE*, 13(4), 1–15. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0196287>
- Yuan, B., Chi, X., & Zhang, R. (2012). Optimization of exopolysaccharides production from a novel strain of *Ganoderma lucidum* CAU5501 in submerged culture. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 43(2), 490–497. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000200009>
- Zapata, P., Rojas, D., Fernández, C., Ramírez, D., Restrepo, G., Orjuela, V., ... Atehortúas, L. (2007). Producción de biomasa y exopolisacáridos de *Grifola frondosa* bajo cultivo sumergido utilizando fuentes de carbono no convencionales. *Revista EIA*, 7, 137–144.
- Zapata, P. A., Rojas, D. F., & Atehortua, L. (2012). Production of Biomass, Polysaccharides, and Ganoderic Acid using Non-conventional Carbon Sources under Submerged Culture of the Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.)P. Karst. (Higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 14(2), 197–203. doi:10.1615/intjmedmushr.v14.i2.80

- Zárate-Chaves, Carlos Andrés, Romero-Rodríguez, María Camila, Niño-Arias, Fabián Camilo, Robles-Camargo, Jorge, Linares-Linares, Melva, Rodríguez-Bocanegra, María Ximena, & Gutiérrez-Rojas, Ivonne. (2013). Optimizing a culture medium for biomass and phenolic compounds production using *Ganoderma lucidum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1), 215-223. Epub May 17, 2013. <https://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822013005000032>
- Zerva, A., Papaspyridi, L.-M., Christakopoulos, P., & Topakas, E. (2017). Valorization of Olive Mill Wastewater for the Production of β -glucans from Selected Basidiomycetes. *Waste and Biomass Valorization*, 8(5), 1721–1731. doi:10.1007/s12649-017-9839-7
- Zheng, L., Chuntang, Z., Yuan, Z., Wei, Z., Igor, C. (2021). Coffee cell walls-composition, influence on cup quality and opportunities for coffee improvements. *Food Quality and Safety*, 5. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyab012>
- Zhao, C., Zhang, C., Xing, Z., Ahmad, Z., Li, J. S., & Chang, M. W. (2018). Pharmacological effects of natural *Ganoderma* and its extracts on neurological diseases: A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 1160–1178. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.076>
- Zhou, X., Lin, J., Yin, Y., Zhao, J., Sun, X., & Tang, K. (2007). *Ganodermataceae*: Natural Products and Their Related Pharmacological Functions. *The American Journal of Chinese Medicine*, 35(4), 559–574. <http://doi.org/10.1142/s0192415x07005065>
- Zhou, X. W., Su, K. Q., & Zhang, Y. M. (2012). Applied modern biotechnology for cultivation of *Ganoderma* and development of their products. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(3), 941–963. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3780-7>
- Zhou, Q., Yang, W., Lin, J.-F., & Guo, L.-Q. (2015). Optimization of Medium pH, Growth Media Compositions and Analysis of Nutritional Components of *Ganoderma lucidum* in Submerged Culture Fermentation. *European Journal of Medicinal Plants*, 6(1), 17–25. <http://doi.org/10.9734/ejmp/2015/14828>
- Zhou, X.-W. (2017). Cultivation of *Ganoderma lucidum*. *Edible and Medicinal Mushrooms*, 385–413. <http://doi.org/10.1002/9781119149446.ch18>
- Zhu, Z.-Y., Liu, X.-C., Dong, F.-Y., Guo, M.-Z., Wang, X.-T., Wang, Z., & Zhang, Y.-M. (2015). Influence of fermentation conditions on polysaccharide production and the activities of enzymes involved in the polysaccharide synthesis of *Cordyceps militaris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(9), 3909–3921. doi:10.1007/s00253-015-7235-4
- Zhu, L.-F., Yao, Y., Ahmad, Z., & Chang, M.-W. (2019). Development of *Ganoderma lucidum* spore powder based proteoglycan and its application in hyperglycemic, antitumor and antioxidant function. *Process Biochemistry*, (May), 0–1. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.025>

ANEXOS

ANEXO A. Ficha técnica del café

Viviana Enríquez Cabrera Nit: 37080034 - 7 Dirección: Calle 21 No. 22 - 21 Local 4 Centro Pasto - Colombia e-mail: coffeemasters.pasto@gmail.com CEL: 300 7820776						
FICHA TÉCNICA DEL PRODUCTO						
Cliente:	ID				Cód. Muestra	
Byron Mueses	1.085.933.114				N/A	
DATOS GENERALES DE LA MUESTRA						
DATOS DEL PRODUCTOR						
Nombre		Vereda	Altura	Municipio		
Fabián Erazo		Anguello	2100 msnm	Yacuanquer		
METODO DE PROCESAMIENTO						
Variedad (es)		Café			Fermentación despulpado	
		Lavado	Honey	Natural	Seca	Humeda
Colombia		X			48hrs	
Sistema de secado						
Patio	Camas o zarandas	Parabólico	Soberado	Silo	Otro	Cual
	X					
Tiempo de secado:		Densidad Gramos/Litro	D. Baja (Rango)	< 650	Volumen	
			D. Media (Rango)	651 - 700		
Días	Horas	694	D. Alta (Rango)	701 - 750	Cantidad Gramos	Cantidad kg lote
15	360		D. Muy alta (Rango)	> 750		
INFORMACION DE LA MUESTRA						
CPS (Café Pergamino Seco)		Verde (Almendra)		Conclusión		
Olor	Color	Olor	Color			
Característico	Amarillo pálido	Característico	Verde oliva	Características normales en la muestra.		
Tamaño muestra en gramos (CPS)	Almendra bruta	Merma% en trilla	Rango normal estimado	Humedad (%)	Rango normal estimado	
300	241	20%	16 - 22% - Promedio general 20%	10,60%	10 - 12%	
ANÁLISIS SENSORIAL						
Técnica de análisis	Análisis realizado bajo el protocolo de la SCAA Asociación de Cafés Especiales de América, para la interpretación de los valores promedio del análisis, la escala y equivalencias son las siguientes:					
Puntuación total	Descripción del grado de calidad			Clasificación del grado de calidad		
95 - 100	Ejemplar o único			Especialidad Super Premium		
90 - 94	Extraordinario			Especialidad Premium		
84 - 89	Excelente			Especialidad		
79 - 83	Muy bueno			Premium		
Descriptor	Valor	Comentarios Es un café con notas de fruto rojo, manzana, caramelo, coco, limón, especias y yogurt. De cuerpo sedoso acidez alta y residual prolongado con notas de fruto rojo, mantequilla caramelo y limón.				
Fragancia/Aroma	8					
Sabor	8					
Sabor Residual	7,5					
Cuerpo	8					
Dulzura	8					
Acidez	7,75					
Global	8,5					
Balance	10					
Uniformidad	10					
Taza limpia	10					
PUNTAJE TOTAL	85,75					

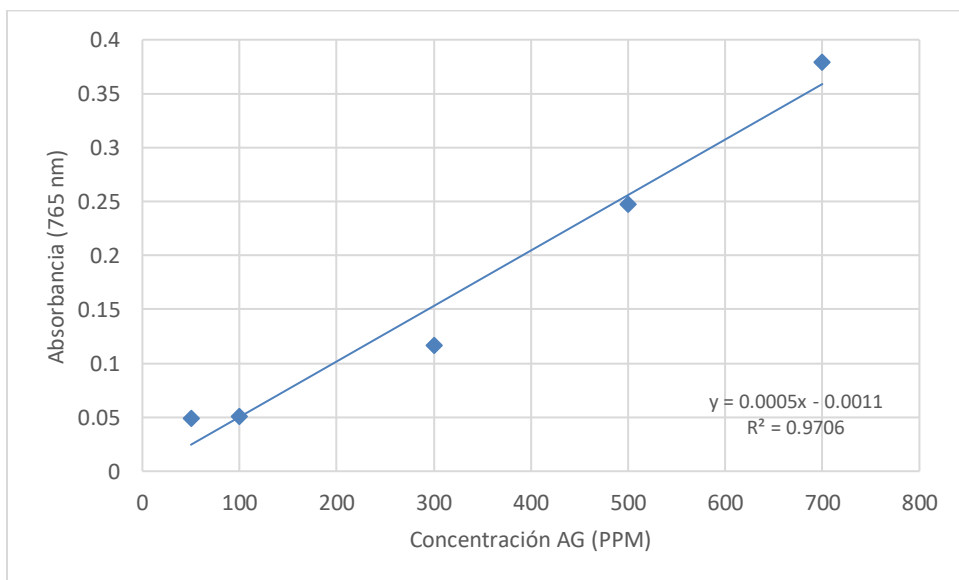
ANEXO B. Curvas de calibración

Figura 18. Curva de calibración para polifenoles totales

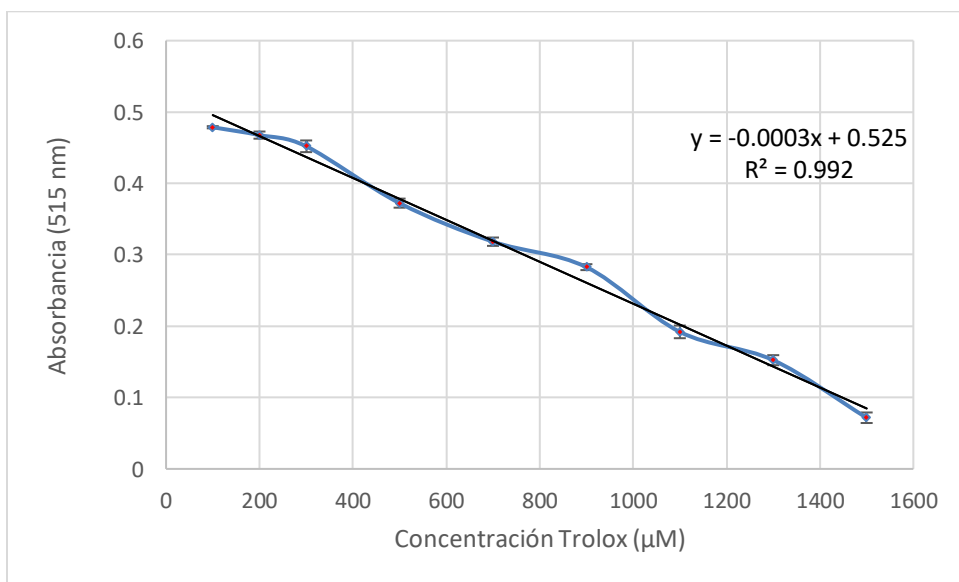


Figura 20. Curva de calibración para DPPH

ANEXO C. Análisis de varianzas

Tabla A-1

Análisis de Varianza para Biomasa micelial de G. lucidum

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:%Cascarilla	7,27296E-7	1	7,27296E-7	2,78	0,1296
B:%Levadura	2,49024E-7	1	2,49024E-7	0,95	0,3544
C:pH	4,09202E-7	1	4,09202E-7	1,57	0,2423
AA	0,0000032490	1	0,0000032490	12,44	0,0064
	7		7		
AB	1,59612E-9	1	1,59612E-9	0,01	0,9394
AC	2,4465E-7	1	2,4465E-7	0,94	0,3585
BB	0,0000058455	1	0,0000058455	22,38	0,0011
	5		5		
BC	1,32031E-8	1	1,32031E-8	0,05	0,8272
CC	0,0000093502	1	0,0000093502	35,79	0,0002
	4		4		
Error total	0,0000023512	9	2,61249E-7		
	4				
Total (corr.)	0,0000185679	18			

Fuente: Esta investigación

Tabla A-2

Análisis de Varianza para polisacáridos totales solubles en agua de G. lucidum

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A: %Cascarilla	22,8541	1	22,8541	5,19	0,0486
B: %Levadura	98,9327	1	98,9327	22,48	0,0011
C: pH	31,0226	1	31,0226	7,05	0,0263
AA	6,00623	1	6,00623	1,36	0,2727
AB	40,8587	1	40,8587	9,28	0,0139
AC	9,32335	1	9,32335	2,12	0,1795
BB	48,9009	1	48,9009	11,11	0,0087
BC	5,96694	1	5,96694	1,36	0,2742
CC	57,9523	1	57,9523	13,17	0,0055
Error total	39,6051	9	4,40057		
Total (corr.)	342,141	18			

Fuente: Esta investigación

ANEXO C. Análisis estadísticos

A continuación, se presentan las gráficas de probabilidad normal y los residuales para cada uno de los diseños estadísticos.

Supuesto de normalidad: En la Figura 19 y 20, se muestra el gráfico de probabilidad normal de los efectos para la biomasa micelial y polisacáridos totales, observándose en ambos similitud del comportamiento entre los resultados obtenidos y los predichos por el programa estadístico utilizado, se puede observar que tanto la biomasa y polisacáridos los residuos parecen ajustarse a una línea recta.

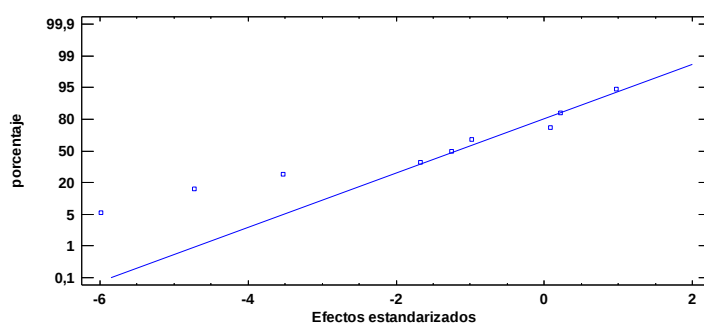


Figura 21. Gráfico de probabilidad Normal para la biomasa micelial de *G. lucidum* (**Fuente:** Esta investigación)

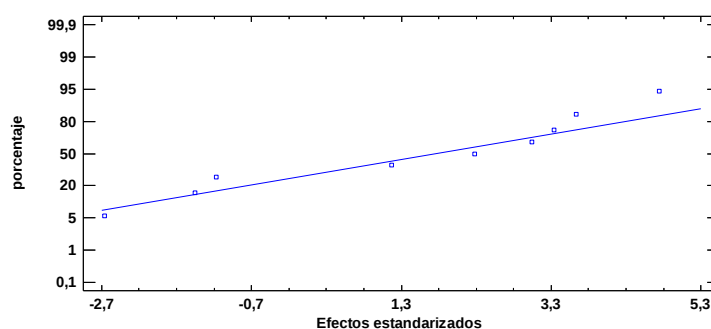


Figura 22. Grafica de Probabilidad normal para polisacáridos totales solubles en agua de *G. lucidum* (**Fuente:** Esta investigación)

Supuesto de homocedasticidad: De la Figura 21 y 22. y la gráfica de los residuos en función de los valores predichos, no se aprecia una tendencia clara tanto para la biomasa como para los polisacáridos totales. Los residuos no presentan una estructura definida respecto de los valores predichos por el modelo, por lo que no se debe rechazar la hipótesis de homocedasticidad.

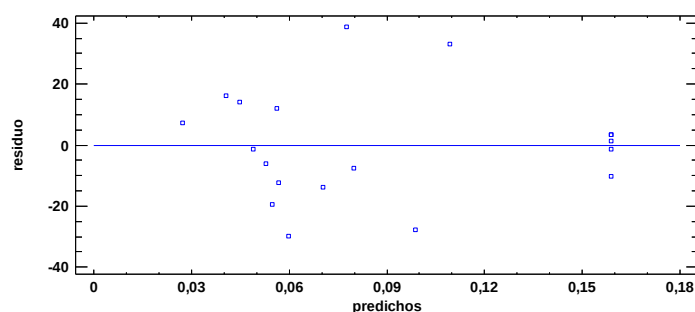


Figura 23. Grafica de residuos para la biomasa de *G. lucidum* (**Fuente:** Esta investigación)

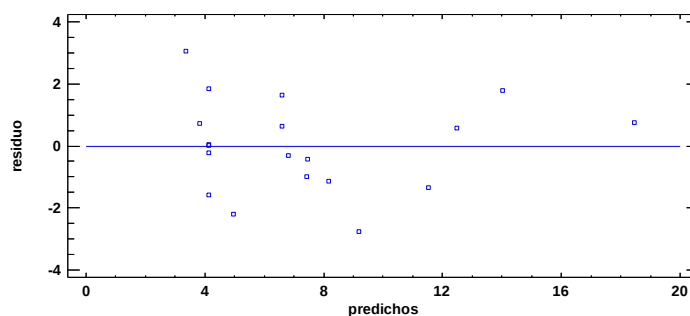


Figura 194. Grafica de residuos para polisacáridos totales solubles en agua de *G. lucidum* (**Fuente:** Esta investigación)