Efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción y actividad biológica de exopolisacáridos de *Amauroderma omphalodes* en cultivo sumergido

Jacobo Gallo-Machado[1], Luz Deisy Marín-Palacio[1(*)]
[1] Departamento de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia

[(*)] *Email:* lmarinpa@eafit.edu.co

Resumen

Amauroderma omphalodes es un basidiomiceto que pertenece a la familia Ganodermataceae para el cual no se ha encontrado reportes de literatura de producción de biomasa o metabolitos en cultivo sumergido. En este trabajo se evaluó la influencia de la tasa de aireación y la intensidad de la agitación en un biorreactor de tanque agitado sobre la producción de biomasa y exopolisacáridos (EPS) de *A. omphalodes*. La mayor concentración de biomasa y EPS se obtuvo a 100 rpm y 2 vvm (13.03 ± 0.19 g/l) y a 200 rpm y 1.5 vvm (325.96 ± 36.41 mg/l), respectivamente. Adicionalmente, el peso molecular promedio de los EPS fue de 6.91 ± 0.31 kDa con una fuerte actividad antioxidante contra los radicales libres 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH) y 2,2-ácido azinobis-3-etil-benzotiazolin-6 sulfónico (ABTS), no exhibiendo actividad antitumoral contra las líneas celulares Hep-G2 y MDA-MB-231. En conclusión, *A. omphalodes* podría tener potencial para la producción de EPS con actividad antioxidante con aplicación en la industria cosmética, alimenticia o farmacéutica.

Palabras clave: *Amauroderma omphalodes*, Actividad antioxidante, DPPH, ABTS, Polisacáridos.

Abstract

Amauroderma omphalodes is a basidiomycete belonging to the Ganodermataceae family which has not found reports in the literature of biomass production or metabolites in submerged culture. In this work, the influence of the aeration rate and the intensity of agitation in a stirred tank bioreactor on the biomass and exopolysaccharides (EPS) production of *A. omphalodes* was evaluated. The highest concentration of biomass and EPS was obtained at 100 rpm and 2 vvm (13.03 ± 0.19 g/l) and at 200 rpm and 1.5 vvm (325.96 ± 36.41 mg/l), respectively. Additionally, the average molecular weight of the EPS was 6.91 ± 0.31 kDa with strong antioxidant activity against the free radicals DPPH and ABTS, did not exhibit antitumor activity against the Hep-G2 and MDA-MB-231 cell lines. In conclusion, *A. omphalodes* could have potential to production of polysaccharides with a great radical scavenging activity with application in the cosmetic, food or pharmaceutical industry.

Key words: *Amauroderma omphalodes*, Antioxidant activity, DPPH, ABTS, Polysaccharides.

1. Introducción

Los hongos son organismos que se distribuyen en casi todos los ecosistemas con la función de degradar materia orgánica, como los residuos de lignocelulosa, haciendo parte importante en el reciclaje de nutrientes (Hyde et al., 2019; Osińska-Jaroszuk et al., 2015). Durante miles de años han sido empleados por su valor nutricional y propiedades medicinales y se estima que existen entre 150000 especies de hongos en la tierra, de los cuales solo se conoce el 10% (Wasser, 2011; Zhong & Tang, 2004). Muchos de estos hongos pertenecen a la división de los Basidiomicetos, un grupo altamente diverso en su taxonomía, ecología y fisiología, que constituye una gran fuente de productos naturales de los cuales, como sugieren estudios, en aproximadamente 650 especies de este grupo se derivan importantes propiedades terapéuticas tales como: antitumoral, inmunoestimulante, inmunomodulatoria, antiinflamatoria, hipoglucémica, cardiovascular, antibacterial, antiviral, antiparasitaria y hepatoprotectiva (Fazenda et al., 2010; Tang & Zhong, 2002a; Wei et al., 2016; Yang et al., 2009). También se ha identificado que los compuestos responsables de estas actividades son proteínas, polisacáridos, compuestos fenólicos, terpenos, esteroides, alcaloides y ácidos grasos, los cuales se encuentran en el cuerpo fructífero y micelio (Elisashvili, 2012; Fang & Zhong, 2002; Ruthes et al., 2016; Sun et al., 2010; Wang et al., 2017)

Entre estos compuestos, los polisacáridos son unas de las principales moléculas con actividades biológicas, las cuales dependen de su estructura y composición (Ai-lati et al., 2017). Reconocidos como biopolímeros están formados por subunidades de monosacáridos que se clasifican en homopolisacáridos y heteropolisacáridos, de acuerdo con la composición y secuencia de sus monómeros, así como por su configuración y el tipo de enlaces glucosídicos que presentan. Entre sus funciones biológicas se encuentran: la inmovilización de enzimas, el almacenamiento de nutrientes, la estructuración de la pared celular, la prevención de la deshidratación, la degradación de la lignina y la señalización celular (Elisashvili, 2012; Jaros et al., 2018; Osińska-Jaroszuk et al., 2015; Ruthes et al., 2016; Wang et al., 2017). Adicionalmente, ha aumentado el interés en productos naturales como es el caso de los exopolisacáridos (EPS) de *Lentinus edodes*, *Schizophyllum commune* y *Coriolus versicolor* con actividades biológicas tales como antitumoral, inmunoestimulante, antioxidante e hipoglicémico (Jaros et al., 2018; Kim, Kim, et al., 2006; Park et al., 2001; Sun et al., 2010).

Del mismo modo, *Ganoderma lucidum* es un basidiomiceto que pertenece al orden poliporales y la familia Ganodermataceae conocido por sus propiedades medicinales y nutricionales, empleado para el tratamiento y prevención de varias enfermedades humanas en la práctica de la Medicina Tradicional China, ya que tiene la capacidad de producir más de 400 compuestos biológicamente activos, incluyendo proteínas, terpenos y polisacáridos. Los polisacáridos 1,3-β-glucanos y 1,6-β-glucanos se encuentran en mayor proporción y tienen actividades antioxidantes, inmunoestimulantes, antiinflamatorias y antitumorales (Elisashvili, 2012; Fazenda et al., 2010; Tang & Zhong, 2002b; Wei et al., 2016). La ruta de

síntesis de estos polisacáridos parte de la glucosa-6-fosfato que es catalizada por la enzima fosfoglucomutasa en glucosa-1-fosfato, luego la UDP-glucosa pirofosforilasa cataliza la reacción entre UTP y la glucosa-1-fosfato para generar UDP-D-glucosa que será empleada como sustrato en la producción de β-glucanos mediada por la 1,3-β-glucano sintasa (Tang & Zhong, 2002a; Wang et al., 2017; Wei et al., 2016).

Actualmente, el 85% de los productos derivados de hongos provienen del cultivo sólido del cuerpo fructífero, el 10% de extractos de micelio y filtrado de cultivo sumergido (Elisashvili, 2012). El cultivo sumergido ha recibido gran atención y se considera un medio prometedor para la producción eficiente de micelio y polisacáridos, pues tarda entre 2 a 3 semanas en comparación a los 4 a 6 meses que demora el cultivo sólido. Además, permite controlar mejor las condiciones de cultivo que influyen en la calidad del producto, la acumulación de biomasa y la disminución de las probabilidades de contaminación. (Elisashvili, 2012; Fang & Zhong, 2002; Park et al., 2001).

El biorreactor de tanque agitado constituye la herramienta tecnológica para el desarrollo del cultivo sumergido y las principales variables de operación que afectan el desempeño de la producción de biomasa y polisacáridos son el pH, el medio de cultivo, la agitación y la aireación (Fazenda et al., 2010; Tang & Zhong, 2002b, 2003a; Yang et al., 2009). En cuanto a la agitación, este es un parámetro importante en la operación de biorreactores porque afecta el correcto mezclado de los componentes en el medio de cultivo y la transferencia de masa del sustrato, productos y oxígeno. La aireación hace referencia al suministro de oxígeno que se requiere para el metabolismo de los microorganismos aerobios, el cual constituye un sustrato favorecedor del crecimiento celular y la síntesis de productos (Park et al., 2002). También, el ambiente de cultivo y el estrés hidrodinámico, influyen sobre la morfología del hongo que puede reconocerse por la formación de agregados denominados pellets, micelios dispersos, o ambas, y de esta forma afectar el crecimiento celular y la producción de EPS (Fang & Zhong, 2002; Kim, Park, et al., 2006; Tang et al., 2009). En consecuencia, los parámetros de operación agitación y aireación que favorecen el crecimiento celular y la producción de metabolitos se encuentran en un balance entre el suministro de oxígeno, relacionado con el coeficiente volumétrico de transferencia de masa (K_La), y el esfuerzo cortante que a niveles altos podría generar daños en las estructuras celulares (Kim, Kim, et al., 2006; Park et al., 2002).

En contexto, a nivel de laboratorio se ha estudiado *G. lucidum* en biorreactores de 1-20 l a velocidades de agitación y tasas de aireación de 100 a 400 rpm y de 0.063 a 2 vvm, respectivamente. Bajo estas condiciones de operación en cultivo batch se han obtenido valores de K_La de 10 a 120 h^{-1}, concentraciones de biomasa de 5 a 20 g/l y EPS de 0.3 a 4.5 g/l en fermentaciones de 3 a 20 días.

Amauroderma omphalodes es un basidiomiceto perteneciente a la clase Agaricomycetes, orden poliporales y familia Ganodermataceae, al pertenecer a esta familia cabe esperar que pudiera producir metabolitos con actividades biológicas similares a *G. lucidum.* Sin embargo

y de acuerdo con la literatura científica en este basidiomiceto no ha sido reportada la producción de biomasa o metabolitos en cultivo sumergido. Por consiguiente, el propósito de este trabajo ha sido la valoración en el biorreactor de tanque agitado de los efectos de la agitación y aireación sobre la producción de biomasa y EPS de *A. omphalodes* y su actividad biológica, específicamente antioxidante y antitumoral.

2. Metodología

2.1. Cultivo celular

El cuerpo fructífero de *A. omphalodes* fue colectado en Sopetrán (Antioquia, Colombia). El hongo fue aislado y conservado en circunferencias de papel filtro (Whatman #2) de 0.5 cm de diámetro en agua desionizada estéril a 4 °C (García-García et al., 2014). La activación se llevó a cabo en medio PDA (OXOID, Basingstoke, Reino Unido) a 30 °C durante 7 días. Luego, se transfirieron 3 discos de micelio de 0.5 cm de diámetro en matraces Erlenmeyer con bafles de 250 ml con un volumen de 50 ml a 150 rpm, 30°C y pH 5.5 durante 3 días. El medio de cultivo empleado en las etapas de inóculo, cinética en matraz y biorreactor, contiene (en g/l): glucosa (PanReac AppliChem, Darmstadt, Alemania), 35; peptona (Merck, Darmstadt, Alemania), 5; extracto de levadura (OXOID, Basingstoke, Reino Unido), 2.5; KH_2PO_4 (CARLO ERBA Reagents, Milán, Italia), 1; $MgSO_4.7H_2O$ (Honeywell, Seelze, Alemania), 0.5; y vitamina B_1 (Fisher Scientific, Alberta, Canadá), 0.05 (Fang et al., 2002; Fang & Zhong, 2002).

En la cinética de crecimiento a nivel de matraz se emplearon matraces Erlenmeyer convencionales con 45 ml de medio de cultivo y 5 ml de inóculo que fueron incubados a 120 rpm, 30 °C y pH 5.5 durante 12 días, se sacrificaron los matraces por triplicado cada día.

2.2. Condiciones de cultivo

Los cultivos en biorreactor de *A. omphalodes* se llevaron a cabo en un biorreactor de tanque agitado de 3 l de volumen nominal con dos impulsores tipo Rushton y 4 bafles, y volumen de trabajo de 2 l. Las condiciones de cultivos se evaluaron mediante un diseño factorial con repeticiones al centro, las condiciones evaluadas fueron agitación 100 y 300 rpm, aireación 1 y 2 vvm, centro a 200 rpm y 1.5 vvm, por duplicado. Se empleó un inóculo del 10% en volumen. El tiempo de cultivo fue de 12 días a 30°C, tomando muestras de 10 ml cada día.

2.3. Cuantificación de biomasa

La separación de la biomasa y el sobrenadante libre de células (SLC) se llevó a cabo mediante filtración al vacío con papel filtro cualitativo Whatman #2. Los filtros con la biomasa retenida fueron secados a 60°C hasta peso constante y para obtener el valor de la concentración de biomasa el peso seco obtenido fue divido por el volumen filtrado. El SLC fue almacenado a -20 °C para análisis posteriores.

2.4. Determinación del consumo de sustrato

Una muestra de 10 µl de SLC fue completada con 490 µl de agua desionizada equivalente a una dilución 1:50. Estos 500 µl fueron empleados para cuantificar el consumo de sustrato usando método de determinación de azúcares reductores siguiendo el protocolo del ácido dinitrosalicílico descrito por Miller (1959).

2.5. Determinación de EPS

De acuerdo con lo reportado por Tang y Zhong (2003), para la cuantificación de EPS se mezclaron 300 µl de SLC y 4 volúmenes de etanol al 96% a 4°C, se agitaron vigorosamente y fueron dejados en precipitación por 24 h a 4 °C. Después, se centrifugaron las muestras a 14000 rpm por 10 min descartando el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 ml de NaOH 1 M y se incubó a 60 °C por una hora. Posteriormente, se empleó el método modificado de fenol-ácido sulfúrico, con glucosa como estándar, para la determinación de la concentración de EPS (Dubois et al., 1956).

2.6. Preparación de EPS

Los SLC obtenidos de las fermentaciones a nivel de biorreactor fueron precipitados como se describió anteriormente, lavados con etanol al 75% dos veces a 4500 rpm durante 10 min y, posteriormente, se liofilizaron para análisis posteriores.

2.7. Ensayo de actividad antioxidante por DPPH

El efecto de los EPS sobre el radical libre 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH) (Sigma Aldrich, San Luis, Estados Unidos) fue estimado con el método modificado de S. R. Liu & Zhang, (2018). Se preparó el DPPH en una mezcla de metanol y buffer acetato (0.1 M, pH 5.5), se ajustó a 0.300 ± 0.005 a 517 nm en el espectrofotómetro GENESYS 150 UV-Vis (Termo Fisher Scientific, Waltham, MA; USA) (Sharma & Bhat, 2009). Se evaluaron concentraciones finales entre 0-700 mg/l de EPS al mezclar 10 µl de una solución madre de cada muestra con 990 µl de DPPH, se agitó vigorosamente, incubó durante 30 min a

temperatura ambiente en oscuridad y se midió la absorbancia. Se empleó como blanco una mezcla con 10 µl de cada muestra de EPS y 990 µl metanol con buffer acetato, como control 10 µl de agua desionizada y 990 µl de la solución de DPPH y la calibración se llevó a cabo empleando Trolox (Sigma Aldrich, San Luis, Estados Unidos) como estándar (0-10 µM).

La capacidad antioxidante fue calculada mediante la ecuación (1), donde AM corresponde a la absorbancia de la muestra, ABM a la absorbancia del blanco de la muestra y ABR a la absorbancia del blanco de referencia o control. La concentración efectiva que inhibe el 50% del radical libre (EC_{50}) corresponde a la concentración de EPS que inhibe el 50% del radical libre DPPH.

$$(\%)\ \text{Inhibición DPPH} = \left[1\text{-}\left(\frac{\text{AM-ABM}}{\text{ABR}}\right)\right]*100 \qquad (1)$$

2.8. Ensayo de actividad antioxidante por ABTS

Para evaluar el efecto de los EPS sobre el radical libre 2,2-ácido azinobis-3-etil-benzotiazolin-6 sulfónico (ABTS) (Sigma Aldrich, San Luis, Estados Unidos) se generó ABTS* mediante la reacción de la solución stock de ABTS (1.94 mM) y persulfato de potasio (0.18 mM) durante 12 a 16 horas en oscuridad. Luego, se ajustó la absorbancia con PBS (5 mM, pH 7.4) a 0.700 ± 0.005 a 734 nm. La capacidad antioxidante de los EPS se evaluó en un rango de concentración final de 0-700 mg/l al mezclar 10 µl de la solución madre de cada muestra con 990 µl de la solución de ABTS*, se agitó vigorosamente, incubó durante 6 min a temperatura ambiente en oscuridad y se midieron las absorbancias. Se empleó como blanco 10 µl de cada muestra y 990 µl de PBS, como control 10 µl de agua desionizada y 990 µl de la solución de ABTS* y la calibración se llevó a cabo empleando Trolox como estándar (0-18 µM).

La capacidad antioxidante fue calculada mediante la ecuación (2), donde AM corresponde a la absorbancia de la muestra, ABM a la absorbancia del blanco de la muestra y ABR a la absorbancia del blanco de referencia o control. El índice EC_{50} correspondiente a la concentración de EPS que inhibe el 50% del radical libre ABTS*.

$$(\%)\ \text{Inhibición ABTS} = \left[1\text{-}\left(\frac{\text{AM-ABM}}{\text{ABR}}\right)\right]*100 \qquad (2)$$

2.9. Determinación de peso molecular

El peso molecular de los EPS obtenidos de *A. omphalodes* se determinó por cromatografía de permeación en gel usando dos columnas Ultrahydrogel en serie (UG 500 y 2000, Waters). Las condiciones de análisis fueron: flujo de inyección 0.9 ml/min, temperatura de las columnas 35°C, detector índice de refracción (RID), fase móvil 0.1 N $NaNO_3$ (PanReac

AppliChem, Darmstadt, Alemania), concentración de la muestra 1.5 g/l y volumen de inyección 50 µl (Peña et al., 1997).

2.10. Ensayo de citotoxicidad

El análisis de citotoxicidad se determinó usando dos líneas celulares humanas: línea celular de cáncer de hígado Hep-G2 y línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231. Estas células fueron mantenidas en medio DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF). Los cultivos se incubaron a 37°C, 5% de CO_2 y 90% de humedad relativa (HR), las células confluentes se desprendieron con tripsina al 0.25% y EDTA al 0.05% por 5 min y fueron sub cultivadas cada tres días a una concentración de $1x10^4$ células/ml.

Se seleccionaron los EPS obtenidos de *A. omphalodes* bajo condiciones de cultivo de agitación y aireación, de 100 rpm y 1 vvm, 100 rpm y 2 vvm y 200 rpm y 1.5 vvm, y se prepararon soluciones stock en PBS. De la solución stock de cada una de las sustancias de prueba, se prepararon 5 soluciones de trabajo de manera que en los tratamientos quedaron suplementados al 10 % y las concentraciones finales fueron 2000 mg/l, 200 mg/l, 20 mg/l, 2 mg/l y 0.2 mg/l.

Para los experimentos de proliferación celular la suspensión celular de 100 µl a una concentración de $1x10^4$ células/ml fueron sembradas en cajas de cultivo de 96 pozos, de acuerdo con las condiciones de cultivo previamente descritas y se dejaron en cultivo durante 24 horas. Una vez cumplido este tiempo inicial, se hizo un cambio de medio de cultivo con los diferentes tratamientos, el control negativo se realizó con PBS 10%, el control positivo con metil metanosulfonato (MMS) a 200 mg/l y las diferentes concentraciones de la sustancia de prueba descritas, por un periodo de 24 horas, una vez finalizado este periodo, se retiró el medio con los tratamientos y se adicionó medio de cultivo fresco, suplementado con 100 µl de MTT (5 mg/ml en PBS) al cultivo. Las células fueron incubadas en la oscuridad durante 3 horas. Posteriormente, se removió el medio de cultivo y se adicionó 100 µl de DMSO a cada pozo para disolver los cristales morados de formazán y se midió la absorbancia en un lector de microplatos a 570 nm por triplicado.

2.11. Determinación del K_La

La determinación del K_La se realizó a las condiciones de agitación (100-300 rpm) y aireación (1-2 vvm) a escala de biorreactor de tanque agitado por el método dinámico con medio de cultivo sin células. Los valores de K_La se determinaron mediante la resolución de la ecuación (3), donde C_{O2} corresponde a la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo con respecto al tiempo y C_{O2*} a la concentración de saturación de oxígeno en el medio de cultivo.

$$\frac{dC_{O2}}{dt} = K_L a * (C_{O2*} - C_{O2}) \quad (3)$$

3. Resultados y discusión

3.1. Cinética de crecimiento celular de *A. omphalodes* en matraces Erlenmeyer

La caracterización cinética del crecimiento de *Amauroderma omphalodes* en cultivo sumergido a nivel de matraz Erlenmeyer se presenta en la Figura 1. Bajo condiciones estudiadas, el cultivo presenta una fase de latencia de 1 día, mostrando una fase exponencial que llega hasta el día 9 y una fase estacionaria hasta el final del cultivo.

La máxima concentración de biomasa, que corresponde al día 9 del cultivo, la productividad y conversión de glucosa en biomasa fueron de 14.09 ± 0.16 g/l, 1.41 g/l d^{-1} y 0.41 g/g, respectivamente (Tabla 1). Estos resultados son superiores a lo encontrado por Tang & Zhong (2002b) para *G. lucidum*, con el mismo medio y condiciones de cultivo usado en este trabajo, con una concentración celular de 10.08 ± 0.52 g/l en el día 10 y una conversión de 0.33 g/g. Además, el rendimiento de *A. omphalodes* fue superior a las cepas *G. lucidum* MTCC 1039, *G. lucidum* BGF4A1 y *G. lucidum* QRS 5120 cultivadas en medios o condiciones de cultivo que fueron optimizados estadísticamente y obtuvieron concentraciones de biomasa máxima de 5.71 (C: glucosa 50 g/l, N: extracto de levadura y cloruro de amonio), 3.12 (C: glucosa 15 g/l, N: extracto de levadura) y 5.19 g/l (C: glucosa 26.52 g/l, N: extracto de levadura), respectivamente (Hassan et al., 2019; Shah & Modi, 2018; Supramani et al., 2019). Sin embargo, concentraciones de biomasas superiores también han sido reportadas en *G. lucidum* CCRC 36124 cultivada en un medio optimizado con una concentración celular de 18.70 g/l en el día 7 (Chang et al., 2006).

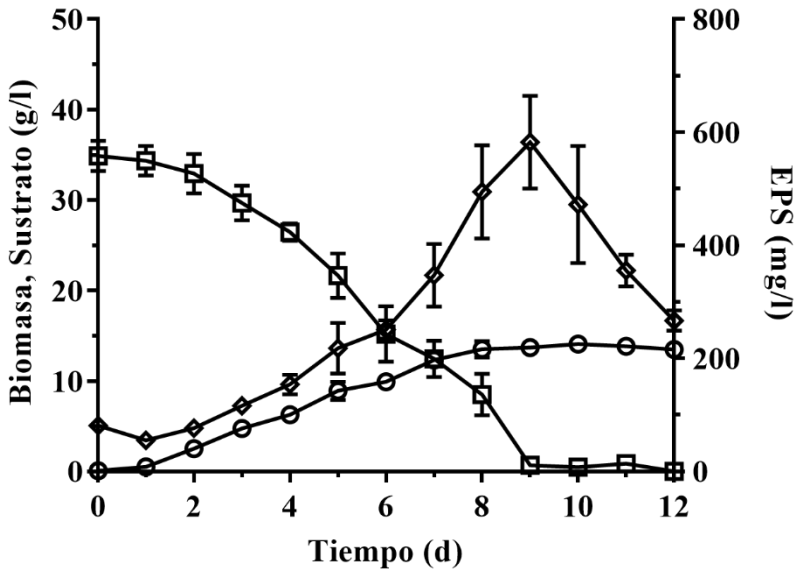

Figura 1. Cinética de crecimiento celular, producción de EPS y consumo de sustrato de *A. omphalodes* a nivel de matraz a 120 rpm y 30°C durante 12 días. Biomasa (○), sustrato (□) y EPS (◊). Se presenta el promedio ± error estándar (n=3).

La cinética de consumo de glucosa y producción de EPS son presentados en la Figura 1. La velocidad específica de consumo de glucosa fue de 0.27 g/g d^{-1}, alcanzándose un consumo total alrededor del día 9 del cultivo lo que coincide con el inicio de la fase estacionaria de la cinética de crecimiento celular. La máxima producción de EPS alcanzó una concentración de 501.03 ± 81.95 mg/l en el día 9 de cultivo, presentando una disminución después de este día, lo que coincide con el agotamiento de la fuente de carbono y el inicio de la fase estacionaria, lo que podría sugerir que *A. omphalodes* estaría empleando estos polisacáridos para su mantenimiento y a partir de este día es posible que los EPS sean empleados como fuente de carbono y por esta razón disminuya su concentración hasta el final de la fermentación (Figura 1), como se ha observado en algunos cultivos de *G. lucidum* (Fang & Zhong, 2002; Tang & Zhong, 2002b; Wei et al., 2016).

Esta concentración de EPS (501.03 ± 81.95 mg/l) en *A. omphalodes* es similar a lo encontrado para *G. lucidum* con 470 mg/l en el día 10, empleando el mismo medio que se utilizó en este trabajo (S. R. Liu & Zhang, 2018; Tang & Zhong, 2002b). Además, fue superior a lo reportado por Chang et al., (2006) con 420 mg/l e inferior en comparación a otras cepas de *G. lucidum* con concentraciones de EPS de 1960 y 2640 mg/L (Hassan et al., 2019; Supramani et al., 2019). Esto indicaría que *A. omphalodes* tiene el potencial de mejorar su producción de biomasa y EPS a nivel de matraz mediante la optimización del medio o condiciones de cultivo por métodos estadísticos.

3.2. Efecto de la agitación y la aireación sobre la producción de biomasa y EPS

La producción de biomasa de *A. omphalodes* en biorreactor de tanque agitado a diferentes condiciones de agitación y aireación y determinadas al final del cultivo (día 12) se presentan en la Tabla 1. Las mayores concentraciones de biomasa fueron encontradas para las condiciones de operación de mayor aireación con concentraciones de 13.03 ± 0.19 g/l a 100 rpm y 2 vvm y 10.46 ± 1.16 g/l para 300 rpm y 2 vvm. Sin embargo, no se presentan diferencias significativas al hacer comparaciones con el análisis prueba de Tukey y LSD.

Tabla 1. Parámetros de las fermentaciones de *A. omphalodes* en matraz Erlenmeyer y biorreactor.

Condiciones de operación (rpm-vvm)	**K_La (h^{-1})**	**Biomasa (g/l)**	**$Y_{X/S}$ (g/g)**	**EPS (mg/l)**	**$Y_{P/S}$ (x 10-3 g/g)**	**Productividad biomasa (g/l d^{-1})**
100-1	10.41	9.62 ± 1.14[ab]	0.28	200.60 ± 1.83[a]	5.84	0.80
100-2	18.92	13.03 ± 0.19[a]	0.37	220.12 ± 12.78[a]	6.32	1.09
300-1	17.29	9.02 ± 1.19[b]	0.26	164.61 ± 2.11[a]	4.78	0.75
300-2	31.45	10.46 ± 1.16[ab]	0.32	320.76 ± 10.15[b]	9.88	0.87
200-1.5	16.84	7.18 ± 0.92[b]	0.22	325.96 ± 36.41[b]	10.17	0.60
Erlenmeyer 250mL	-	14.09 ± 0.16[a]*	0.41	501.03 ± 81.95[c]**	14.51	1.41

*Máxima producción de biomasa en el día 10.
**Máxima producción de EPS en el día 9.
Los valores para EPS reportados en esta tabla corresponden a la diferencia entre la concentración del día 12 y 0.
Resultados con la misma letra no muestran diferencias significativas con la prueba de Tukey y LSD.

La caracterización cinética de consumo de sustrato y producción de EPS de *A. omphalodes* a nivel de biorreactor para las condiciones de operación de 100 rpm y 300 rpm y volúmenes de aire de 1 vvm y 2 vvm se presentan en la Figura 2. El consumo de glucosa para los cultivos agitados a 100 rpm inicia aproximadamente después del tercer día de cultivo, presentando velocidades de consumo de 0.52 g/g d^{-1} para 100 rpm y 1 vvm y 0.30 g/g d^{-1} para 100 rpm y 2 vvm (Figura 2 A), mientras que para los cultivos agitados a 300 rpm el consumo de sustrato inicia después del primer día de cultivo con velocidades específicas de consumo de 0.35 g/g d^{-1} para 300 rpm y 1 vvm y 0.26 g/g d^{-1} para 300 rpm y 2 vvm (Figura 2 B). Los cultivos con volúmenes de aireación de 1 vvm presentan agotamiento de la fuente de carbono en el día 10 de cultivo, coincidiendo con menores producciones de biomasa, rendimientos biomasa sustrato $Y_{x/s}$ y productividad (Tabla 1). La máxima concentración de EPS producidos se

obtuvo al final del cultivo (Figura 2), alcanzándose la mayor producción de polisacárido a 300 rpm y 2 vvm con una concentración de 320.76 ± 10.15 mg/l, sin diferencias significativas a 200 rpm y 1.5 vvm. Para las demás condiciones evaluadas no se presentan diferencias estadísticamente significativas en la producción de polisacárido obteniéndose una concentración promedio de 194 mg/l (Tabla 1).

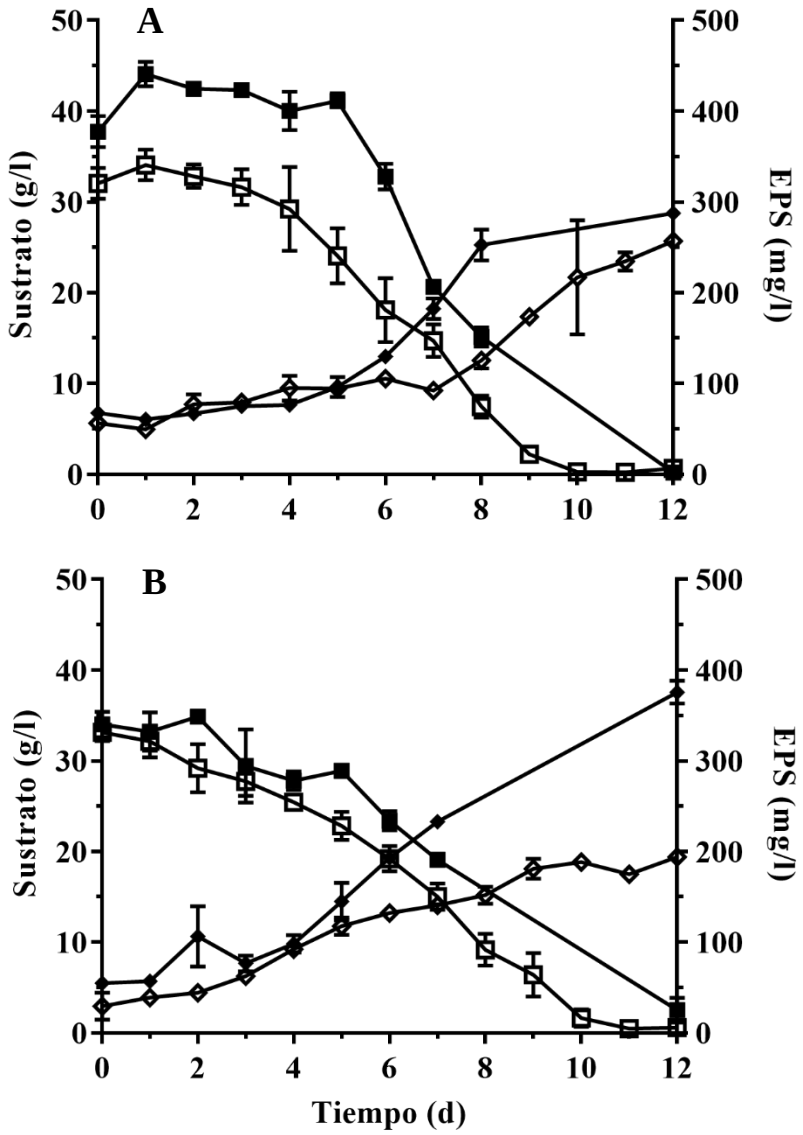

Figura 2. Cinéticas de producción de EPS y consumo de sustrato de *A. omphalodes* a nivel de biorreactor a condiciones de agitación de 100 rpm (A), 300 rpm (B). Para la aireación de 1 vvm: EPS (◊) y sustrato (□); para 2 vvm: EPS (♦) y sustrato (■). Se presenta el promedio ± error estándar (n=2).

El consumo de glucosa en las condiciones de cultivo del punto central (200 rpm, 1.5 vvm) (Figura 3), presentan una velocidad específica de consumo de sustrato de 0.45 g/g d^{-1}, no generándose agotamiento del sustrato en el tiempo evaluado, aunque la producción de biomasa no se favoreció bajo estas condiciones alcanzando concentraciones de 7.18 ± 0.92 g/l (Tabla 1). Aun así, a estas condiciones se obtuvo la máxima producción de EPS con 325.96 ± 36.41 mg/l. Con base en estos resultados, se puede decir, que la intensidad de agitación en un rango de 100 a 300 rpm no tiene un efecto significativo sobre la producción de biomasa y EPS de *A. omphalodes*. Caso contrario es la aireación que presenta un efecto significativo con la máxima concentración de EPS y la menor producción de biomasa con valores de 325.96 ± 36.41 mg/l y 7.18 ± 0.92 g/l, respectivamente a 1.5 vvm y 200 rpm, por lo que se observa curvatura sobre el modelo estudiado (Figura 4). Además, las condiciones de agitación y aireación que favorecen la producción de biomasa son 100 rpm y 2 vvm con una concentración de 13.03 ± 0.19 g/l y la menor producción de EPS a 300 rpm y 1 vvm con 164.61 ± 2.11 mg/l (Tabla 1). Estos resultados divergen de lo obtenido por Kim et al., (2006) en *G. lucidum* donde la agitación y la aireación presentan un efecto significativo sobre la producción de biomasa alcanzando concentraciones de biomasa de 12.7 g/l a 50 rpm (2 vvm) y 18.1 g/l a 0.5 vvm (300 rpm).

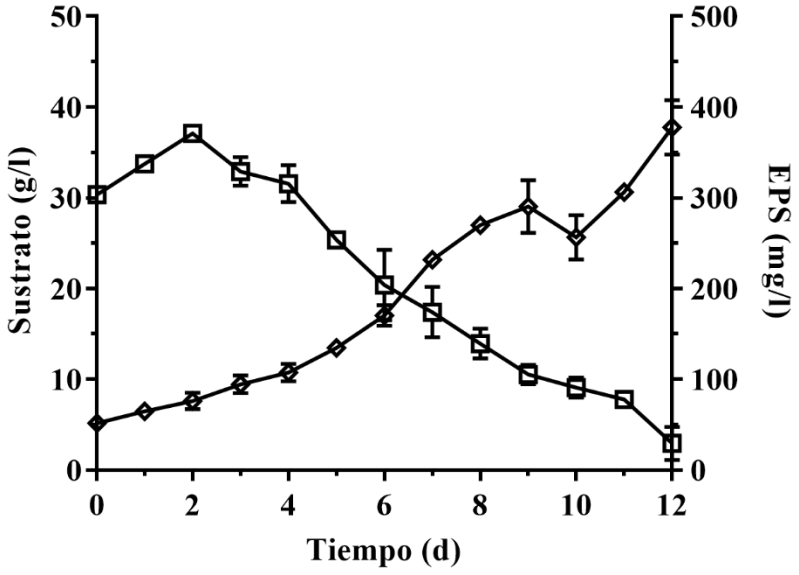

Figura 3. Cinética de producción de EPS y consumo de sustrato de *A. omphalodes* a nivel de biorreactor a condiciones de agitación de 200 rpm y aireación de 1.5 vvm. EPS (◊) y sustrato (□). Se presenta el promedio ± error estándar.

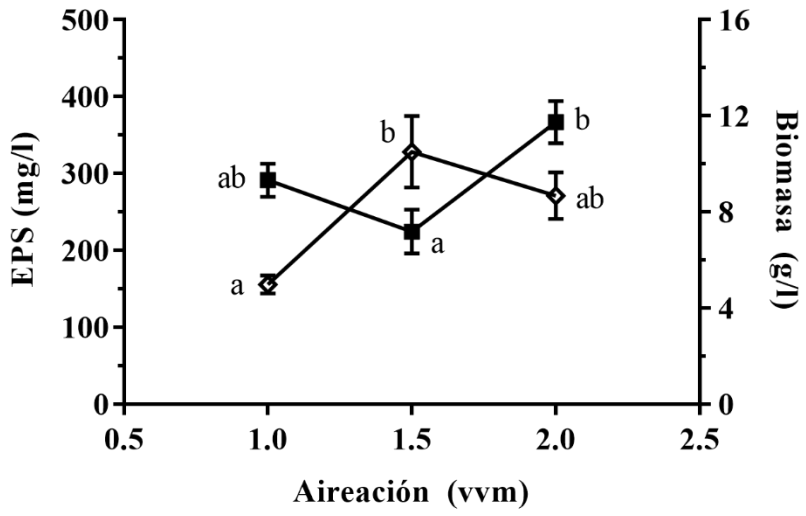

Figura 4. Efecto de la aireación sobre la producción de biomasa (■) y EPS (◊) de *A. omphalodes*. Resultados con la misma letra no muestran diferencias significativas con la prueba de Tukey y LSD (n=4).

Adicionalmente, en los cultivos sumergidos la agitación y la aireación son parámetros importantes para mantener la homogeneidad y una buena transferencia de calor y masa (Kim, Kim, et al., 2006; Tang et al., 2009). El K_La, influenciado por estos parámetros, se relaciona con la producción de biomasa y EPS, pues la velocidad de transferencia y disponibilidad de oxígeno permite el crecimiento del hongo pero el estrés causado por condiciones hiperoxidantes o bajos niveles de oxígeno disuelto en la fermentación pueden favorecer la producción de biomasa o EPS (Tang & Zhong, 2003a).

Por esta razón, se determinó el K_La a los parámetros de operación estudiados, se presenta en la Tabla 1. A condiciones de 100 rpm y 2 vvm, 300 rpm y 1 vvm y 200 rpm y 1.5 vvm se obtuvieron coeficientes similares de 18.92, 17.29 y 16.84 h^{-1}, sin embargo, la producción de biomasa y EPS no presentan la misma tendencia. El menor coeficiente de transferencia de masa fue 10.41 h^{-1} (100 rpm y 1 vvm) y el mayor 31.45 h^{-1} (300 rpm y 2 vvm). Al comparar el efecto del K_La con la producción de biomasa y EPS (Tabla 1), no es posible afirmar que el K_La tenga un efecto significativo sobre la producción de estos parámetros. En contraste, con lo obtenido por Tang & Zhong, (2003) para *G. lucidum* en un biorreactor de 3.5 l, encontrándose que el K_La tiene un efecto significativo sobre la producción de biomasa alcanzándose concentraciones de 12.1 g/l y 15.6 g/l a 16.4 h^{-1} y 78.2 h^{-1} (0.063 vvm y 0.5 vvm a 200 rpm), respectivamente, pero no sobre la producción de EPS.

Sin embargo, el desempeño de *A. omphalodes* en la producción de biomasa fue superior a otras cepas de *G. lucidum*¸ como es el caso estudiado por Wan Mohtar et al. (2016), que obtuvo 5.66 g/l en el día 11 en un biorreactor con un volumen de 2 l a condiciones de operación de 100 rpm y 2 vvm. Pero en el caso de los EPS se obtuvo una producción muy

baja (325.96 ± 36.41 mg/l) en comparación con otros autores donde las concentraciones obtenidas a nivel de biorreactor fueron de 580 mg/l (100-180 rpm y 0.25-0.5 vvm), 810 mg/l (100-250 rpm y 0.25-1 vvm), 870 mg/l (100 rpm y 2 vvm) y 920 mg/l (200 rpm y 1 vvm) (Berovič et al., 2003; Tang & Zhong, 2002b, 2002a; Wan Mohtar et al., 2016).

Finalmente, al no presentarse una tendencia entre las variables de agitación, aireación y K_La, es posible que la morfología de *A. omphalodes* pueda tener un efecto, ya que en estos cultivos se observaron morfologías que van desde micelio disperso hasta pellets. Esta distribución morfológica puede depender de las condiciones hidrodinámicas y la tensión de oxígeno disuelto en el sistema de cultivo, que a su vez puede afectar la productividad del proceso, como lo han reportado varios autores encontrado que la morfología tiene relación con la transferencia de oxígeno, nutrientes y síntesis de productos (Tang & Zhong, 2003a, 2003b; Yang et al., 2009). Pues a nivel de matraz se observó pellets y en biorreactor una morfología entre pellets, micelios dispersos y agregados de gran tamaño adheridos en la pared del biorreactor, en el impulsor y en los bafles, donde los agregados representaron más del 90% de la biomasa cosechada. Por consiguiente, sería interesante en estudios posteriores determinar si la producción de polisacárido puede ser dependiente no solo de los niveles de biomasa sino también de los perfiles morfológicos del cultivo y de esta manera poder encontrar unas condiciones de operación que favorezcan el crecimiento celular y la formación de producto en biorreactor.

3.3. Actividad antioxidante

La actividad biológica, medida como actividad antioxidante de los EPS obtenidos de *A. omphalodes* se presentan en la Tabla 2, donde un mayor potencial antioxidante está dada por un menor EC_{50} y el mecanismo propuesto que explica esta actividad biológica en polisacáridos está dado por la capacidad de donar hidrógenos o electrones formando un radical estable y deteniendo las reacciones en cadena (Kao et al., 2012; Lu et al., 2020). La mayor actividad antioxidante determinada por el método ABTS, lo presentó el EPS obtenido a las condiciones de 200 rpm y 1.5 vvm, 100 rpm y 1 vvm y 300 rpm y 1 vvm, mientras que para DPPH, los polisacáridos que presentan mayor actividad se encontraron en los cultivos 100 rpm y 1 vvm y 200 rpm y 1.5 vvm. Las actividades antioxidantes de EPS de *A. omphalodes* no presentan diferencias significativas por el método de DPPH, aunque la mayor actividad se presenta a 100 rpm y 1 vvm con EC_{50} igual a 285.18 ± 114.95 mg/l. En el caso de la técnica ABTS la menor actividad fue de 191.04 ± 3.12 mg/l y la actividad más potente fue de 84.54 ± 30.56 mg/l, aunque las mejores actividades obtenidas con EPS generados a 100 o 300 rpm y 1 vvm o condiciones de 200 rpm y 1.5 vvm no presentaron diferencias significativas (Tabla 2).

Tabla 2. Actividades antioxidantes por DPPH y ABTS y peso molecular promedio de EPS de *A. omphalodes* obtenidos a nivel de biorreactor en el día 12. Se presenta el promedio ± error estándar.

Agitación-Aireación (rpm-vvm)	**EC_{50} ABTS (mg/l)**	**EC_{50} DPPH (mg/l)**	**PM (kDa)**
100-1	88.60 ± 12.32[b]	285.18 ± 114.95[a]	6.24 ± 0.69[a]
100-2	191.04 ± 3.12[a]	514.99 ± 115.13[a]	7.23 ± 0.06[a]
300-1	89.56 ± 7.34[b]	511.745 ± 321.04[a]	6.33 ± 0.27[a]
300-2	130.34 ± 21.14[ab]	505.955 ± 172.92[a]	7.04 ± 0.67[a]
200-1.5	84.54 ± 30.56[b]	410.64 ± 175.73[a]	7.71 ± 1.26[a]

Resultados con la misma letra no muestran diferencias significativas con la prueba de Tukey y LSD.

Adicionalmente, de acuerdo a Floegel et al., (2011) que evaluó la actividad antioxidante de alimentos reconocidos por poseer esta propiedad, como frutas, vegetales y bebidas, encontró que existe una relación directa entre la actividad antiradicalaria medida por la técnica DPPH y ABTS pero esta tendencia no se observó en los resultados obtenidos (Tabla 2). Esta discrepancia entre ambos métodos podría deberse a características fisicoquímicas de los EPS que no fueron identificadas en este trabajo (composición, secuencia de monosacáridos, tipo de enlaces glucosídicos, ramificaciones, conformación helicoidal, entre otros), y permitirían comprender mejor estos resultados (Deveci et al., 2019; Ferreira et al., 2015; Ruthes et al., 2016).

La propiedad fisicoquímica determinada en este trabajo fue el peso molecular promedio. En este caso, los EPS de *A. omphalodes* tienen un peso molecular promedio de 6.91 ± 0.31 kDa (Tabla 2) y no presentan diferencias estadísticamente significativas a las diferentes condiciones de cultivo por lo que la agitación y la aireación no tienen efecto sobre esta propiedad. Además, el peso molecular de estos EPS es mayor a los polisacáridos extraídos del cuerpo reproductivo de *G. lucidum* con 1.54, 5.2, 3.98 y 7 kDa (Kao et al., 2012; W. Liu et al., 2010; Xu et al., 2019; Ye et al., 2009) y menores a los EPS crudos de *G. lucidum* con pesos moleculares de 18.20, 21.60 y 74.56 kDa y con actividades antioxidantes EC_{50} mayores a 700 y 900 mg/l para DPPH y ABTS, respectivamente (Long et al., 2021; Si et al., 2019; Zeng et al., 2019).

Hay posiciones divididas sobre la relación que existe entre el peso molecular y el índice EC_{50} de actividad antioxidante de polisacáridos, las cuales pueden ser directa o inversa (Lu et al., 2020; Xu et al., 2019). De acuerdo con la Figura 5, se encontró que existe una relación directa entre el peso molecular de polisacáridos obtenidos de hongos cultivados por fermentación sólida y sumergida incluyendo varias especies de la familia Ganodermataceae, *Pleurotus ostreatus, Grifola frondosa, Morcella esculenta*, entre otros. Donde la actividad antioxidante

de los polisacáridos es mayor a medida que disminuye el peso molecular promedio, pues tendrían más terminales hidroxilo reductor para reaccionar con los radicales libres, y los EPS de *A. omphalodes* con un bajo peso molecular (6.91 ± 0.31 kDa) poseen una excelente actividad antioxidante (Figura 5) (Cör et al., 2018; Deveci et al., 2019; W. Liu et al., 2010; Long et al., 2021).

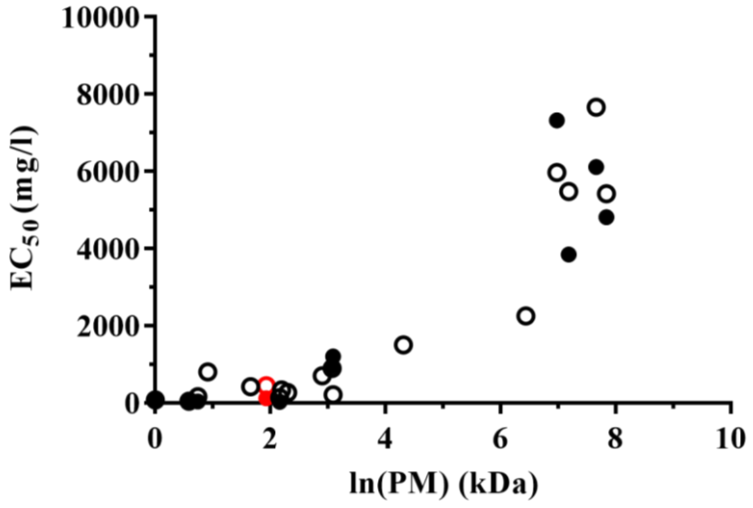

Figura 5. Actividad antioxidante de polisacáridos de hongos, cultivados en fermentación sólida y líquida, en función del peso molecular promedio. DPPH (○) y ABTS (●). Los EPS de *A. omphalodes* se presentan en color rojo. Elaboración propia con datos tomados de la literatura (Ai-lati et al., 2017; Deveci et al., 2019; Long et al., 2021; Ma et al., 2013; Si et al., 2019; Vamanu, 2012; Zeng et al., 2019).

3.4. Actividad citotóxica de EPS

Varios reportes sugieren que una variedad de compuestos como terpenos, proteínas y polisacáridos derivados de basidiomicetos superiores, como *G. lucidum*, *Lentinus edodes*, *Agaricus brasiliensis*, *Grifola frondosa*, entre otros, presentan actividad citotóxica contra diferentes líneas celulares (Chen et al., 2019; Cui et al., 2016; Y. J. Liu et al., 2012; Wasser, 2011). Con el fin de evaluar la actividad citotóxica de los EPS obtenidos de *A. omphalodes*, sobre las líneas celulares de cáncer de hígado Hep-G2 (Figura 6) y mama MDA-MB-231 (Figura 7), se emplearon los polisacáridos obtenidos en las condiciones de operación de biorreactor de 100 rpm y 1 vvm y 200 rpm y 1.5 vvm que presentaron la mejor actividad antioxidante por ABTS y DPPH y 100 rpm y 2 vvm con la menor actividad antioxidante. Los EPS son considerados citotóxicos si hay una reducción de la viabilidad relativa por debajo del 30% en alguna de las concentraciones evaluadas, si no se encuentra diferencia estadística

entre el control positivo y alguna de las concentraciones evaluadas o se observa una tendencia de reducción de la viabilidad relativa al incrementar la concentración de la sustancia.

Los resultados del ensayo de MTT de los EPS obtenidos de *A. omphalodes* no presentan una tendencia en la reducción de la viabilidad relativa sobre la línea celular Hep-G2 (Figura 6) y MDA-MB-231 (Figura 7), por lo tanto, estos EPS no tienen un efecto citotóxico sobre estas líneas celulares cuando son expuestas a las concentraciones evaluadas. Además, durante la ejecución del ensayo no se observaron cambios en la morfología de las células, para ambas líneas celulares, como granulaciones o vacuolizaciones asociadas a la exposición de los EPS, lo que podría ratificar un efecto no tóxico (Harrabi et al., 2017; Wu et al., 2016; Yu et al., 2020). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Silva et al., (2013) y Zhao et al., (2010) quienes encontraron que los polisacáridos de dos especies de la familia Ganodermataceae no inhibieron el crecimiento de las líneas celulares Hep-G2 y MDA-MB-231. Por el contrario, Y. W. Liu et al., (2009) encontraron que extractos etanólicos de *G. lucidum* muestran inhibición del crecimiento de 39.8% y 82.5% para las mismas líneas celulares, respectivamente.

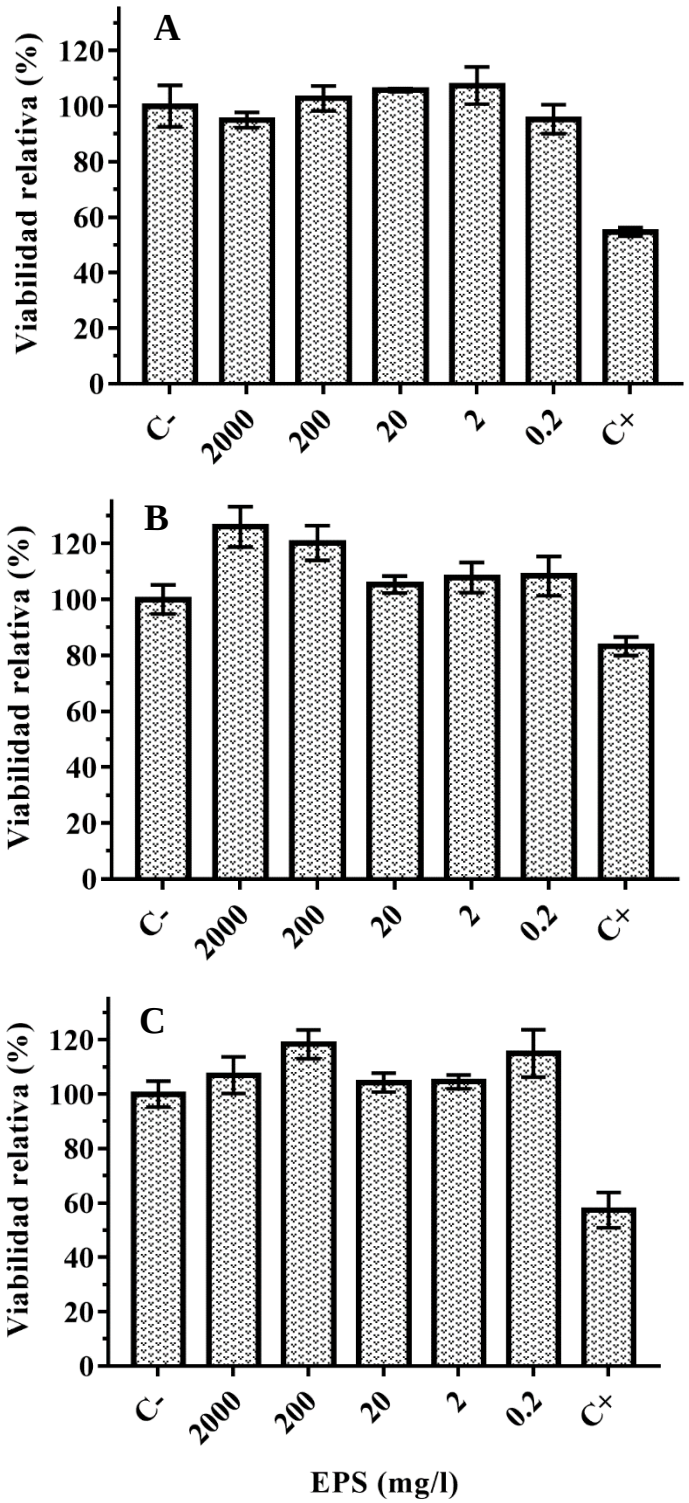

Figura 6. Viabilidad relativa de la línea celular de cáncer de hígado Hep-G2 en presencia de EPS obtenidos de *A. omphalodes* bajo condiciones de operación del biorreactor de 100 rpm y 1 vvm (A), 100 rpm y 2 vvm (B) y 200 rpm y 1.5 vvm (C).

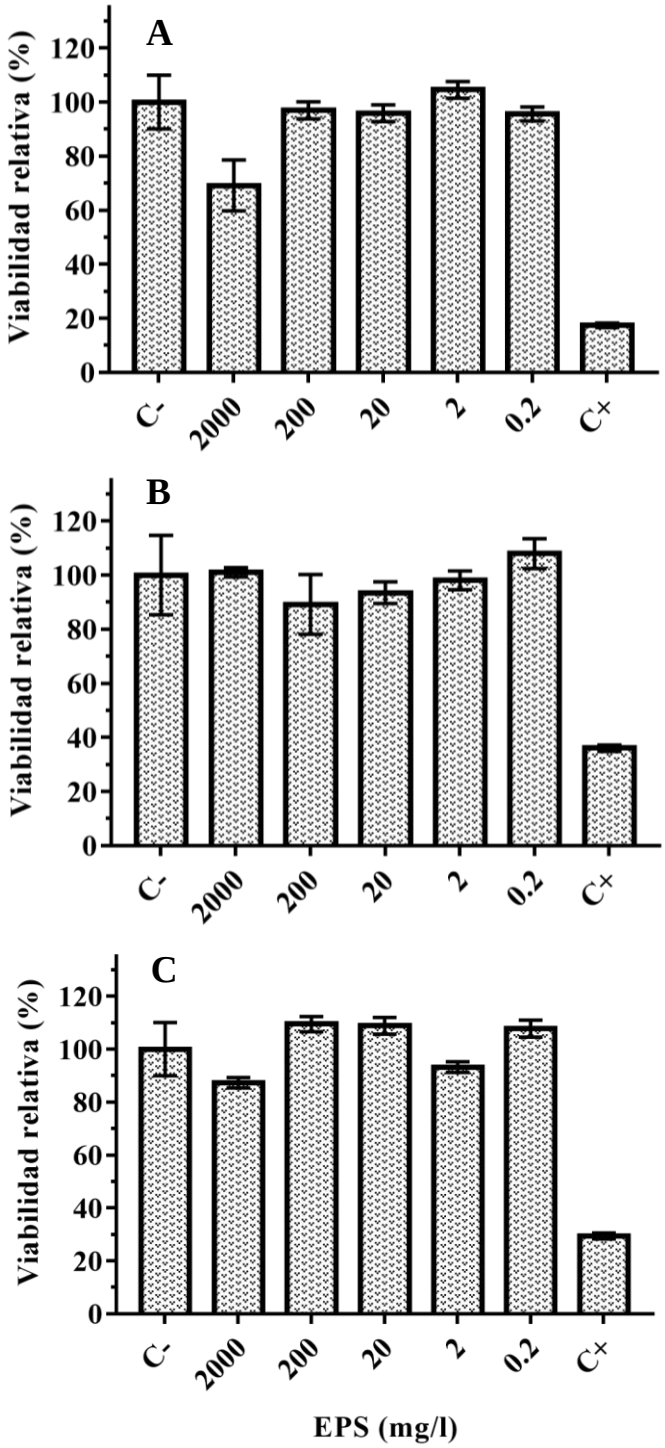

Figura 7. Viabilidad relativa de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 en presencia de EPS obtenidos de *A. omphalodes* bajo condiciones de operación de 100 rpm y 1 vvm (A), 100 rpm y 2 vvm (B) y 200 rpm y 1.5 vvm (C).

El mecanismo de acción de la actividad citotóxica de los polisacáridos de basidiomicetos no ha sido establecida pero está asociada con una alta actividad antioxidante (Ma et al., 2013; Sui et al., 2016; Wasser, 2011). Los polisacáridos de *G. lucidum* estudiados por Zhang et al., (2012) no presentaron actividad citotóxica *in vitro* contra la línea celular Hep-G2 pero *in vivo*, en ratones, con ocho dosis de 0.5 mg/kg d^{-1} obtuvo una inhibición del 33.66%, lo cual indicaría que esta actividad antitumoral no se debe a un efecto directo sobre la célula sino a un efecto inmunoestimulante al inducir la generación del factor TNF-α (factor de necrosis tumoral alfa) (Zhang et al., 2012). Por consiguiente, los EPS de *A. omphalodes* no presentaron una actividad citotóxica contra las células Hep-G2 y MDA-MB-231, pero la actividad inmunoestimulante, al ser el principal mecanismo antitumoral de los polisacáridos de basidiomicetos, podría ser estudiada en los EPS de este sistema biológico (Cör et al., 2018; Lu et al., 2020; Sui et al., 2016).

4. Conclusiones

En este estudio se encontró que la aireación tiene un efecto significativo sobre la producción de biomasa y EPS de *A. omphalodes* y la mayor concentración de estos parámetros fue 13.03 ± 0.19 g/l a 100 rpm y 2 vvm y 325.96 ± 36.41 mg/l a 200 rpm y 1.5 vvm, respectivamente. El peso molecular de los EPS no se ve afectado por las condiciones de operación a nivel de biorreactor de tanque agitado. Adicionalmente, *A. omphalodes* tiene la capacidad de producir polisacáridos con gran actividad antioxidante contra los radicales libres DPPH y ABTS comparado con otras especies de hongos que pertenecen a la familia Ganodermataceae. Los EPS obtenidos bajo condiciones de cultivo de 100 rpm y 1 vvm, 100 rpm y 2 vvm y 200 rpm y 1.5 vvm no presentan actividad citotóxica contra las líneas celulares de cáncer de hígado Hep-G2 y mama MDA-MB-231. Estos resultados sugieren que *A. omphalodes* podría tener potencial para la producción de EPS con actividad antioxidante con aplicación en la industria cosmética, alimenticia o farmacéutica.

Referencias

Ai-lati, A., Liu, S., Ji, Z., Zhang, H., & Mao, J. (2017). Structure and bioactivities of a polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* in submerged fermentation. *Bioengineered*, *8*(5), 565–571. https://doi.org/10.1080/21655979.2017.1283459

Berovič, M., Habijanič, J., Zore, I., Wraber, B., Hodžar, D., Boh, B., & Pohleven, F. (2003). Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. *Journal of Biotechnology*, *103*(1), 77–86. https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00069-5

Chang, M. Y., Tsai, G. J., & Houng, J. Y. (2006). Optimization of the medium composition for the submerged culture of *Ganoderma lucidum* by Taguchi array design and steepest ascent method. *Enzyme and Microbial Technology*, *38*(3–4), 407–414. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.06.011

Chen, P., Liu, H. P., Ji, H. H., Sun, N. X., & Feng, Y. Y. (2019). A cold-water soluble polysaccharide isolated from *Grifola frondosa* induces the apoptosis of HepG2 cells through mitochondrial passway. *International Journal of Biological Macromolecules*, *125*, 1232–1241. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.098

Cör, D., Knez, Ž., & Hrnčič, M. K. (2018). Antitumour, antimicrobial, antioxidant and antiacetylcholinesterase effect of *Ganoderma lucidum* terpenoids and polysaccharides: A review. *Molecules*, *23*(3), 649. https://doi.org/10.3390/molecules23030649

Cui, H., Wu, S., Sun, Y., Wang, T., Li, Z., Chen, M., & Wang, C. (2016). Polysaccharide from *Pleurotus nebrodensis* induces apoptosis via a mitochondrial pathway in HepG2 cells. *Food and Function*, *7*(1), 455–463. https://doi.org/10.1039/c5fo00884k

Deveci, E., Çayan, F., Tel-Çayan, G., & Duru, M. E. (2019). Structural characterization and determination of biological activities for different polysaccharides extracted from tree mushroom species. *Journal of Food Biochemistry*, *43*(9), 43. https://doi.org/10.1111/jfbc.12965

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related Substances. *Analytical Chemistry*, *28*(3), 350–356. https://doi.org/10.1021/ac60111a017

Elisashvili, V. (2012). Submerged cultivation of medicinal mushrooms: Bioprocesses and products (review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, *14*(3), 211–239. https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v14.i3.10

Fang, Q. H., Tang, Y. J., & Zhong, J. J. (2002). Significance of inoculation density control in production of polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* . *Process Biochemistry*, *37*(12), 1375–1379. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00017-1

Fang, Q. H., & Zhong, J. J. (2002). Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* . *Process Biochemistry*, *37*(7), 769–774. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00278-3

Fazenda, M. L., Harvey, L. M., & McNeil, B. (2010). Effects of dissolved oxygen on fungal morphology and process rheology during fed-batch processing of *Ganoderma lucidum* . *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *20*(4), 844–851. https://doi.org/10.4014/jmb.0911.11020

Ferreira, I. C. F. R., Heleno, S. A., Reis, F. S., Stojkovic, D., Queiroz, M. J. R. P., Vasconcelos, M. H., & Sokovic, M. (2015). Chemical features of Ganoderma polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities. *Phytochemistry*, *114*, 38–55. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.10.011

Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of

ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, *24*(7), 1043–1048. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008

García-García, M., Rocha-Zavaleta, L., Valdez-Cruz, N. A., & Trujillo-Roldán, M. A. (2014). Conservation of the mycelia of the medicinal mushroom *Humphreya coffeata* (Berk.) Stey. in sterile distilled water. *MethodsX*, *1*(1), 19–22. https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.04.002

Harrabi, B., Athmouni, K., Hamdaoui, L., Ben Mahmoud, L., Hakim, A., El Feki, A., Zeghal, K., & Ghozzi, H. (2017). Polysaccharides extraction from *Opuntia stricta* and their protective effect against HepG2 cell death and hypolipidaemic effects on hyperlipidaemia rats induced by high-fat diet. *Archives of Physiology and Biochemistry*, *123*(4), 225–237. https://doi.org/10.1080/13813455.2017.1307413

Hassan, N. A., Supramani, S., Azzimi Sohedein, M. N., Ahmad Usuldin, S. R., Klaus, A., Ilham, Z., Chen, W. H., & Wan-Mohtar, W. A. A. Q. I. (2019). Efficient biomass-exopolysaccharide production from an identified wild-serbian *Ganoderma lucidum* strain BGF4A1 mycelium in a controlled submerged fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *21*. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101305

Hyde, K. D., Xu, J., Rapior, S., Jeewon, R., Lumyong, S., Niego, A. G. T., Abeywickrama, P. D., Aluthmuhandiram, J. V. S., Brahamanage, R. S., Brooks, S., Chaiyasen, A., Chethana, K. W. T., Chomnunti, P., Chepkirui, C., Chuankid, B., de Silva, N. I., Doilom, M., Faulds, C., Gentekaki, E., … Stadler, M. (2019). The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity*, *97*(1). https://doi.org/10.1007/s13225-019-00430-9

Jaros, D., Köbsch, J., & Rohm, H. (2018). Exopolysaccharides from Basidiomycota: formation, isolation and techno-functional properties. *Engineering in Life Sciences*, *18*(10), 743–752. https://doi.org/10.1002/elsc.201800117

Kao, P. F., Wang, S. H., Hung, W. T., Liao, Y. H., Lin, C. M., & Yang, W. Bin. (2012). Structural characterization and antioxidative activity of low-molecular-weights beta-1,3-glucan from the residue of extracted *Ganoderma lucidum* fruiting bodies. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2012*. https://doi.org/10.1155/2012/673764

Kim, H. M., Kim, S. W., Hwang, H. J., Park, M. K., Mahmoud, Y. A. G., Choi, J. W., & Yun, J. W. (2006). Influence of agitation intensity and aeration rate on production of antioxidative exopolysaccharides from submerged mycelial culture of *Ganoderma resinaceum* . *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *16*(8), 1240–1247. https://www.koreascience.or.kr/article/JAKO200634718411501.page

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. https://doi.org/10.1385/ABAB:134:3:249

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. https://doi.org/10.1007/s10068-018-0343-z

Liu, W., Wang, H., Pang, X., Yao, W., & Gao, X. (2010). Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* . *International Journal of Biological Macromolecules*, *46*(4), 451–457. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.02.006

Liu, Y. J., Shen, J., Xia, Y. M., Zhang, J., & Park, H. S. (2012). The polysaccharides from *Ganoderma lucidum:* Are they always inhibitors on human hepatocarcinoma cells? *Carbohydrate Polymers*, *90*(3), 1210–1215. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.06.043

Liu, Y. W., Gao, J. L., Guan, J., Qian, Z. M., Feng, K., & Li, S. P. (2009). Evaluation of antiproliferative activities and action mechanisms of extracts from two species of ganoderma on tumor cell lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(8), 3087–3093. https://doi.org/10.1021/jf900011f

Long, Z., Xue, Y., Ning, Z., Sun, J., Li, J., Su, Z., Liu, Q., Xu, C., & Yan, J. K. (2021). Production, characterization, and bioactivities of exopolysaccharides from the submerged culture of *Ganoderma cantharelloideum* M. H. Liu. *3 Biotech*, *11*(3). https://doi.org/10.1007/s13205-021-02696-w

Lu, J., He, R., Sun, P., Zhang, F., Linhardt, R. J., & Zhang, A. (2020). Molecular mechanisms of bioactive polysaccharides from Ganoderma lucidum (Lingzhi), a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *150*, 765–774. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.035

Ma, C. wah, Feng, M., Zhai, X., Hu, M., You, L., Luo, W., & Zhao, M. (2013). Optimization for the extraction of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and their antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *44*(6), 886–894. https://doi.org/10.1016/j.jtice.2013.01.032

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, *31*(3), 426–428. https://doi.org/10.1021/ac60147a030

Osińska-Jaroszuk, M., Jarosz-Wilkołazka, A., Jaroszuk-Ściseł, J., Szałapata, K., Nowak, A., Jaszek, M., Ozimek, E., & Majewska, M. (2015). Extracellular polysaccharides from Ascomycota and Basidiomycota: production conditions, biochemical characteristics, and biological properties. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *31*(12), 1823–1844. https://doi.org/10.1007/s11274-015-1937-8

Park, J. P., Kim, S. W., Hwang, H. J., & Yun, J. W. (2001). Optimization of submerged culture conditions for the mycelial growth and exo-biopolymer production by *Cordyceps militaris* . *Letters in Applied Microbiology*, *33*(1), 76–81. https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00950.x

Park, J. P., Kim, Y. M., Kim, S. W., Hwang, H. J., Cho, Y. J., Lee, Y. S., Song, C. H., & Yun, J. W. (2002). Effect of agitation intensity on the exo-biopolymer production and mycelial morphology in *Cordyceps militaris* . *Letters in Applied Microbiology*, *34*(6),

433–438. https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01126.x

Peña, C., Campos, N., & Galindo, E. (1997). Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *48*(4), 510–515. https://doi.org/10.1007/s002530051088

Ruthes, A. C., Smiderle, F. R., & Iacomini, M. (2016). Mushroom heteropolysaccharides: A review on their sources, structure and biological effects. *Carbohydrate Polymers*, *136*, 358–375. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.061

Shah, P., & Modi, H. (2018). Statistical optimization of culture conditions for enhanced mycelial biomass production using *Ganoderma lucidum* . *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 41–45. https://doi.org/10.7324/jabb.2018.60408

Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, *113*(4), 1202–1205. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008

Si, J., Meng, G., Wu, Y., Ma, H. F., Cui, B. K., & Dai, Y. C. (2019). Medium composition optimization, structural characterization, and antioxidant activity of exopolysaccharides from the medicinal mushroom *Ganoderma lingzhi* . *International Journal of Biological Macromolecules*, *124*, 1186–1196. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.274

Silva, A. M., Miranda, A., Fernandes, E., Santos, S., Fraga, I., Santos, D. L., Dias, A. A., & Bezerra, R. M. (2013). Endopolysaccharides from *Ganoderma resinaceum*, *Phlebia rufa*, and *Trametes versicolor* affect differently the proliferation rate of HepG2 cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *169*(6), 1919–1926. https://doi.org/10.1007/s12010-013-0107-4

Sui, X. chen, Guo, Q. bin, Xia, Y. mei, Cui, S. W., Shen, J., Zhang, J., & Ding, Z. yang. (2016). Structure features of the intracellular polysaccharide from *Ganoderma lucidum* and the irrelative immune-anticancer activities of GLPs. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, *8*(2), 43–50. https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2016.11.001

Sun, Y. X., Liu, J. C., & Kennedy, J. F. (2010). Purification, composition analysis and antioxidant activity of different polysaccharide conjugates (APPs) from the fruiting bodies of *Auricularia polytricha* . *Carbohydrate Polymers*, *82*(2), 299–304. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.056

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. https://doi.org/10.3934/microbiol.2019.1.19

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. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.10.005

Tang, Y. J., & Zhong, J. J. (2002a). Exopolysaccharide biosynthesis and related enzyme activities of the medicinal fungus, *Ganoderma lucidum*, grown on lactose in a bioreactor. *Biotechnology Letters*, *24*(12), 1023–1026. https://doi.org/10.1023/A:1015677313598

Tang, Y. J., & Zhong, J. J. (2002b). Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, *31*(1–2), 20–28. https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00066-2

Tang, Y. J., & Zhong, J. J. (2003a). Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of Ganoderma polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, *32*(3–4), 478–484. https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00338-1

Tang, Y. J., & Zhong, J. J. (2003b). Role of oxygen supply in submerged fermentation of Ganoderma lucidum for production of Ganoderma polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, *32*(3–4), 478–484. https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00338-1

Vamanu, E. (2012). Biological activities of the polysaccharides produced in submerged culture of two edible *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2012*. https://doi.org/10.1155/2012/565974

Wan Mohtar, W. A. A. Q. I., Ab. Latif, N., Harvey, L. M., & McNeil, B. (2016). Production of exopolysaccharide by *Ganoderma lucidum* in a repeated-batch fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *6*, 91–101. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.02.011

Wang, Q., Wang, F., Xu, Z., & Ding, Z. (2017). Bioactive mushroom polysaccharides: A review on monosaccharide composition, biosynthesis and regulation. *Molecules*, *22*(6). https://doi.org/10.3390/molecules22060955

Wasser, S. P. (2011). Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *89*(5), 1323–1332. https://doi.org/10.1007/s00253-010-3067-4

Wei, Z. H., Liu, L., Guo, X. F., Li, Y. J., Hou, B. C., Fan, Q. L., Wang, K. X., Luo, Y., & Zhong, J. J. (2016). Sucrose fed-batch strategy enhanced biomass, polysaccharide, and ganoderic acids production in fermentation of *Ganoderma lucidum* 5.26. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *39*(1), 37–44. https://doi.org/10.1007/s00449-015-1480-x

Wu, J. G., Kan, Y. J., Wu, Y. Bin, Yi, J., Chen, T. Q., & Wu, J. Z. (2016). Hepatoprotective effect of ganoderma triterpenoids against oxidative damage induced by tert-butyl hydroperoxide in human hepatic HepG2 cells. *Pharmaceutical Biology*, *54*(5), 919–929. https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1091481

Xu, Y., Zhang, X., Yan, X. H., Zhang, J. L., Wang, L. Y., Xue, H., Jiang, G. C., Ma, X. T., & Liu, X. J. (2019). Characterization, hypolipidemic and antioxidant activities of degraded polysaccharides from *Ganoderma lucidum* . *International Journal of Biological Macromolecules*, *135*, 706–716. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.166

Yang, F. C., Yang, M. J., & Cheng, S. H. (2009). A novel method to enhance the mycelia production of *Ganoderma lucidum* in submerged cultures by polymer additives and agitation strategies. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *40*(2), 148–154. https://doi.org/10.1016/j.jtice.2008.09.003

Ye, L. Bin, Zhang, J. S., Yang, Y., Zhou, S., Liu, Y. F., Tang, Q. J., Du, X. J., Chen, H., & Pan, Y. J. (2009). Structural characterisation of a heteropolysaccharide by NMR spectra. *Food Chemistry*, *112*(4), 962–966. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.017

Yu, J., Liu, C., Ji, H. yu, & Liu, A. jun. (2020). The caspases-dependent apoptosis of hepatoma cells induced by an acid-soluble polysaccharide from *Grifola frondosa* . *International Journal of Biological Macromolecules*, *159*, 364–372. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.095

Zeng, X., Li, P., Chen, X., Kang, Y., Xie, Y., Li, X., Xie, T., & Zhang, Y. (2019). Effects of deproteinization methods on primary structure and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, *126*, 867–876. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.222

Zhang, J., Liu, Y. J., Park, H. S., Xia, Y. M., & Kim, G. S. (2012). Antitumor activity of sulfated extracellular polysaccharides of *Ganoderma lucidum* from the submerged fermentation broth. *Carbohydrate Polymers*, *87*(2), 1539–1544. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.051

Zhao, L., Dong, Y., Chen, G., & Hu, Q. (2010). Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* . *Carbohydrate Polymers*, *80*(3), 783–789. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.029

Zhong, J. J., & Tang, Y. J. (2004). Submerged cultivation of medicinal mushrooms for production of valuable bioactive metabolites. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, *87*, 25–59. https://doi.org/10.1007/b94367