

Producción de polisacáridos a partir de *Ganoderma* sp., aislado en la región andina

Polysaccharides production by *Ganoderma* sp., isolated from andina region

Xiomara López Legarda*, Carolina Arboleda Echavarría**,
Freimar Segura Sánchez***

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.47060

Resumen

Los hongos de la podredumbre blanca de la madera, como *Ganoderma* sp., han sido utilizados alrededor del mundo por sus propiedades medicinales, ya que poseen compuestos bioactivos como los triterpenos y los polisacáridos. Esta investigación se centra en la producción de polisacáridos a escala de laboratorio y de biorreactor, a partir de *Ganoderma* sp., aislado en la región andina, utilizando como sustrato un residuo ligninocelulósico de la industria agrícola suplementado con glucosa y lactosa. Se encontró que las condiciones más adecuadas y viables para la producción de biomasa y polisacáridos de *Ganoderma* sp., son: medio Bio 3%, 10 días de incubación, lactosa 10%, pH= 4,0, T= 30°C, 300 rpm y 1 vvm. Los ensayos espectrofotométricos (fenol ácido sulfúrico y escaneo en UV entre 200 y 400 nm), enzimáticos y de infrarrojo permitieron identificar y cuantificar glucanos y algunas proteínas en los extractos, sugiriendo que los hongos endógenos de la región Andina poseen características propias de metabolitos importantes a nivel medicinal. Adicionalmente se demostró el efecto antiproliferativo en células J774, especialmente del extracto GIPSi (IC50= 86%) similar al efecto generado por estándares comerciales.

Palabras clave: fermentación, polisacáridos, hongos de la podredumbre blanca de la madera, antitumoral.

Abstract

The white rot wood fungi like *Ganoderma* has been used worldwide because it has triterpenoids and polysaccharides with medicinal properties. This research focuses on determining the polysaccharide production conditions and laboratory and bioreactor scale, from the aforementioned fungi, isolated in the Andean region. It was used agricultural lignin-residue supplemented with glucose and lactose. We found that the most appropriate and feasible production conditions for biomass and *Ganoderma* polysaccharides are: Bio medium 3%, t = 10 days, 10% lactose, pH= 4,0, T= 30°C, 300 rpm and 1 vvm. The spectrophotometric, enzymatic and IR tests; allowed us to identify the presence of polysaccharides and proteins in some extracts, suggesting that the endogenous mushrooms in the Andean region also have characteristics similar to those of metabolites that are important in medicine. Additionally, the antiproliferative effect was observed in J774 sarcoma cells, particularly GIPSi extract (IC50= 86%) similar to the effect generated by commercial standards.

Key words: fermentation, polysaccharides, white rot fungi, antitumoral.

Recibido: enero 18 de 2015

Aprobado: octubre 1 de 2015

* MSc., Biotecnología, Corporación Académica Ambiental. Microbióloga Industrial y Ambiental. Grupo de investigación Biopolimer, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia (UdeA), Calle 70 #. 52-21, Medellín, Colombia. Autor de correspondencia: xiomara.lopezl@udea.edu.co

** MSc., PhD Ciencias Químicas. Grupo de Investigación Biopolimer, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia (UdeA), Calle 70 No. 52-21, Medellín, Colombia. carolina.arboleda@udea.edu.co

*** MSc., Ciencias Farmacéuticas, PhD Farmacotecnia y Biofarmacia. Grupo de Investigación Biopolimer, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia UdeA, Calle 70 No. 52-21, Medellín, Colombia. freimar.segura@udea.edu.co

Introducción

Durante siglos, diversas culturas alrededor del mundo han empleado a los hongos como fuente nutricional, medicinal y en procesos ambientales gracias a su composición y a los metabolitos que producen tanto en su ambiente natural como en el laboratorio (Zhao *et al.*, 2010).

Se ha encontrado que muchos hongos macromicetos tienen potencial anticancerígeno entre los cuales se destacan géneros como *Ganoderma*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Agaricus*, *Schizophyllum*, entre otros (Chen *et al.*, 2012; Benzie and Wachtel-Galor, 2011; Bishop *et al.*, 2015; deVere *et al.*, 2002); los cuáles están siendo utilizados en la actualidad por diversas empresas alrededor del mundo, especialmente en Asia Oriental, Australia y Norteamérica, para la producción y comercialización del hongo y de sus extractos como alimento funcional o como suplemento dietario.

La especie *Ganoderma lucidum* (Reishi en Japonés y Lingzhi en Chino) ha sido ampliamente estudiada a nivel mundial por sus propiedades alimenticias y medicinales. Históricamente se ha conocido como el “elixir de la vida”. Este hongo basidiomicete hace parte de los hongos de la podredumbre blanca de la madera y es reconocido por sus enzimas ligninolíticas y por sus propiedades medicinales tales como prevención de la obesidad; el mantenimiento de la salud intestinal; reducción de la hipertensión; control de la diabetes y la estimulación de probióticos (Bishop *et al.*, 2015). La mayor parte de las investigaciones se han desarrollado en los países del este de Asia (Korea, China, Japón) en temáticas relacionadas con la producción, extracción e identificación de las sustancias bioactivas que posee *Ganoderma*. Sin embargo es necesario implementar más estudios para ampliar el conocimiento acerca de estos hongos en países con gran biodiversidad como Colombia.

Los polisacáridos de *Ganoderma*, han llamado la atención de la comunidad científica por los efectos que poseen sobre el sistema inmune, inflamaciones y cánceres exhibiendo efectos *in vitro* e *in vivo* como lo demuestran diversas investigaciones (deVere *et al.*, 2002; Daba and Ezeronye, 2003). A nivel estructural, los polisacáridos fúngicos pueden encontrarse en forma de homopolisacáridos, heteropolisacáridos y glicoproteínas. En cultivos sumergidos se pueden obtener tanto intra como exopolisacáridos. Los intrapolisacáridos (IPS) se encuentran principalmente en la pared celular fúngica y los exopolisacáridos (EPS) son polisacáridos extracelulares liberados al ambiente donde se encuentran que los hongos utilizan principalmente como mecanismo de protección (Donot *et al.*, 2012). Las propiedades medicinales de dichos polisacáridos dependen no solo de su estructura química, peso molecular, la conformación y configuración de los enlaces glucosídicos; sino también de las características biológicas y fisicoquímicas de la fermentación como

medios de cultivo utilizados, agitación, temperatura, pH entre otros (Donot *et al.*, 2012; Fraga *et al.*, 2014). Aunque no hay consenso sobre las mejores condiciones, la mayoría de los autores sugieren que la mayor producción de EPS se da a pH bajos y utilizando glucosa como sustrato (Donot *et al.*, 2012).

A la fecha más de 200 polisacáridos han sido aislados a partir de basidiocarpos, esporas, micelio y cultivos líquidos de *Ganoderma* siendo éstos últimos los de preferencia para la explotación comercial, ya que encontrar el hongo en la naturaleza es difícil y la producción de basidiocarpo tarda varios meses. Adicionalmente, los cultivos sumergidos son más fáciles de controlar y se obtiene producción en poco tiempo, pero en la mayoría de los casos debido al proceso de producción y a los sustratos utilizados el producto final es muy costoso y de difícil acceso para la población general (Wagner *et al.*, 2004; Benzie and Wachtel-Galor, 2011). Por lo tanto, se hace importante evaluar diferentes sustratos para la producción de polisacáridos y con mayor viabilidad económica; de manera que se traduzca en un producto más accesible y de buena calidad. Una alternativa es reducir los costos de producción utilizando residuos agroindustriales que sirven como fuente de carbono y nutrientes necesarios para el desarrollo del hongo y la generación de metabolitos como los polisacáridos.

Esta investigación se centra en la producción de polisacáridos en cultivo sumergido a escala de laboratorio y de biorreactor, a partir de un aislamiento de *Ganoderma* sp., tomado de la región andina, utilizando como sustrato un residuo lignocelulósico de la industria agrícola suplementado con glucosa y lactosa. A pesar de que algunos autores no han llegado a un consenso sobre la fuente de carbono óptima, se ha encontrado que la glucosa favorece el rendimiento de los EPS comparado con otros azúcares (Wagner *et al.*, 2004; Fraga *et al.*, 2014). Este hongo, fue elegido por su gran importancia a nivel industrial y medicinal, además de su potencial ligninolítico corroborada en investigaciones previas realizadas en el grupo de investigación Biopolimer (Arboleda *et al.*, 2008; Arboleda and Mejía, 2010).

Materiales y métodos

Aislamiento fúngico

La cepa de *Ganoderma* sp., empleada para la realización de este trabajo, fue recolectada de un bosque húmedo del municipio de Puerto Berrío (Antioquia, Colombia), gracias a un permiso de recolección de hongos otorgado por el ANLA (Permiso No. 17, 2012) al grupo Biopolimer que tiene el interés de utilizar microbiota autóctona. Se realizaron preinóculos en el medio ligninolítico KIRK (Kirk, Croan *et al.*, 1986) y agar papa dextrosa (PDA). El tiempo de incubación fue de $30 \pm 1^\circ\text{C}$. La cepa fue preservada a 4°C en el medio

de cultivo extracto de malta (MEA). Se realizaron tinciones con azul de lactofenol, rojo congo y KOH, para identificar las estructuras del hongo y llevar un seguimiento del cultivo tanto a nivel de Erlenmeyer como de biorreactor.

Evaluación de sustratos para producción de biomasa y polisacáridos

Se utilizó como sustrato base una mezcla de residuos orgánicos que contienen carbono, nitrógeno y factores de crecimiento apropiados para el desarrollo del hongo. Para efectos de la investigación se asegura la uniformidad en la composición del medio y se le denominará sustrato Bio ya que es un medio de cultivo indefinido que fue patentado por el grupo de investigación Biopolimer ante la Superintendencia de Industria y Comercio de Colombia (Rad N°11-160567, 2014) y fue licenciado a la spin off BIOINNCO SAS; empresa creada a partir de resultados de investigación del grupo Biopolimer.

Se evaluaron independientemente como inductores de polisacáridos glucosa y lactosa a tres niveles (1, 10 y 20 % p/v). Al finalizar la fermentación (10 días) se tomaron como variables de respuesta la biomasa producida en g/L y la concentración de EPS e IPS en g/L. El tratamiento de los datos se realizó mediante los análisis estadísticos de ANOVA y el procedimiento de la mínima diferencia significativa LSD de Fisher, utilizando el software STATGRAPHICS Centurion XVI versión 16.1.02.®

Fermentación en cultivo sumergido a nivel de laboratorio

Se realizaron fermentaciones en Batch en Erlenmeyers de 250 mL de boca ancha con tapones de algodón-gasa, para facilitar la transferencia de gases, ya que el oxígeno es indispensable para el crecimiento del hongo. Las fermentaciones se llevaron a cabo en un agitador orbital de 25 puestos con control de temperatura. Se tomó como unidad experimental cada Erlenmeyer. Los ensayos fueron independientes y se realizaron triplicados de cada uno para hallar la desviación estándar.

En todos los casos se utilizó como inóculo 3 discos de 5 mm de diámetro a partir de la trofofase del preinóculo en medio Kirk con 8 días de incubación y se adicionaron en condiciones asépticas a Erlenmeyers de 250 mL, utilizando como volumen de fermentación 40 mL, se adicionó sustrato Bio al 3% p/v, y los azúcares correspondientes para cada ensayo, todos se ajustaron a un pH inicial de $4,0 \pm 0,1$ y se incubaron bajo agitación orbital a 150 rpm, y 30 ± 1 °C, durante 10 días.

El peso seco de la biomasa se obtuvo mediante filtración. Se utilizó primero un tamiz de 100 μ m, se lavó la biomasa tres veces con agua desionizada y se filtró por Whatman No. 1, para luego secarla a 70°C hasta peso constante.

El proceso de extracción de polisacáridos se representa en la figura 1. Los polisacáridos se cuantificaron por el método de fenol-ácido sulfúrico con algunas modificaciones que se detallan a continuación (Masuko et al., 2005; DuBois et al., 1956): Se preparó una solución madre de glucosa a una concentración de 400 ppm y se realizaron cuatro diluciones entre 10 y 80 ppm con las cuáles se elaboró la curva de calibración. Para las lecturas se tomaron 400 μ L de solución de glucosa, se adicionaron 200 μ L de fenol e inmediatamente se adicionó sobre el líquido 1000 μ L de ácido sulfúrico concentrado cuya reacción genera una coloración amarillenta. Se leyó la absorbancia a 490 nm, longitud de onda indicada para las hexosas, utilizando un espectrofotómetro (UV-Vis Varian CARY 50 Bio) (DuBois et al., 1956).

Fermentación en cultivo sumergido a nivel de biorreactor de 5L

Se utilizó un biorreactor de marca BIOSTAT® Aplus de 7 L. Las condiciones fueron: 30 ± 1 °C, 300 rpm, 5 L y 1 vvm. El preinóculo utilizado fue a partir de *Ganoderma* sp., en medio Bio + glucosa al 10% con 5 días de incubación y cuya cantidad fue del 10% del volumen de trabajo del Biorreactor. La determinación de biomasa y polisacáridos se hizo de igual forma que con el producto obtenido en Erlenmeyers con algunas modificaciones que se detallan a continuación. Luego del proceso de extracción detallado en la figura 1, se toma una muestra de extracto crudo de polisacárido, se hizo diálisis durante 3 días con agua desionizada a 4 °C. Seguidamente se liofilizaron las muestras obteniéndose 4 extractos denominados de la siguiente manera: GEPSs: Exopolisacárido soluble de *Ganoderma*, GEPSi: Exopolisacárido insoluble de *Ganoderma*, GIPSS: Intrapolisacárido soluble de *Ganoderma*, GIPSi: Intrapolisacárido insoluble de *Ganoderma*.

Para los ensayos en UV, se tomaron 20 mg/mL de cada uno de los extractos; GEPSs y GIPSS se diluyeron en agua desionizada, y GEPSi y GIPSi se solubilizaron en NaOH 1M. Se hizo un escaneo de sus fracciones entre las longitudes de onda 200 y 400 nm para identificar proteínas (280 nm) y ácidos nucleicos (260 nm) (Zhao et al., 2015). Seguidamente se halló el porcentaje de α y β glucanos presente en los extractos, mediante el kit enzimático K-YBGL ® (Megazyme). Posteriormente, se utilizó la técnica instrumental de infrarrojo para identificar enlaces característicos de polisacáridos en los rangos. La muestra se preparó con KBr en polvo grado espectroscópico para formar una pastilla de 1 mm y posteriormente realizar las mediciones de infrarrojo entre las longitudes de onda 1000 - 4000 cm^{-1} (Ramos, 1990; Zhao et al., 2015).

Ensayo de actividad biológica

Se realizaron ensayos de bioactividad (Zhao et al., 2015; Nie et al., 2013) de los extractos para la deter-

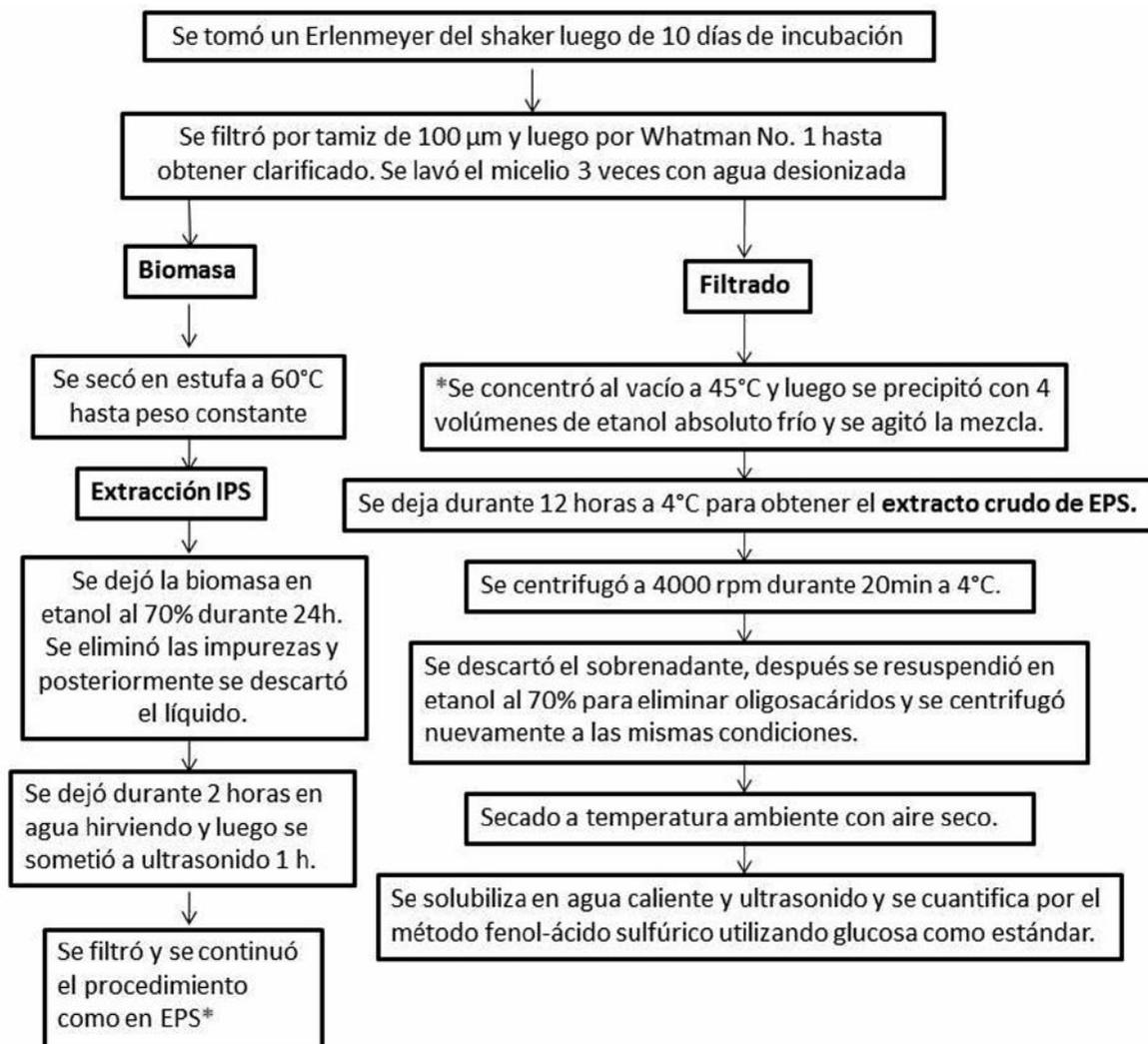


Figura 1. Procedimiento utilizado para la extracción de polisacáridos de cultivo sumergido de *Ganoderma* sp., fue realizado a partir de la modificación de procedimientos de varios autores (Donot *et al.*, 2012; Nie *et al.*, 2013; Ruthes *et al.*, 2015).

minación de su capacidad antitumoral en cultivos de líneas celulares cancerígenas con la ayuda y experticia del grupo de investigación GIM de la Universidad de Antioquia. Se utilizaron las líneas celulares, sarcoma de ratón J774 para evaluar el efecto antitumoral y VERO para evaluar la citotoxicidad en células humanas; gentilmente donadas por el laboratorio 6, del Centro de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca, España. Éstas, fueron crecidas en el medio RPMI 1640 (Gibco®) y suplementadas con 10% de FBS (Fetal Bovine serum), 1000 U/mL de Penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Para el tratamiento con los extractos, las células se cultivaron a 1500 células/pozo en platos de 96 a 37 °C y 5 % de CO₂. Para calcular la concentración inhibitoria 50 (IC50) se realizó un ensayo colorimétrico (MTT) el cual mide la proliferación celular. Las células fueron resuspendidas en

medio RPMI con 10 % de SFB y cultivadas en platos de 96 pozos (100 µL de volumen final por pozo) a 37 °C y 5 % de CO₂ por 72 horas en presencia de diferentes concentraciones de cada uno de los polisacáridos (3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL) (Zhao *et al.*, 2015; Nie *et al.*, 2013). Cada una de las concentraciones se hizo por triplicado.

Resultados y discusión

Cepa de *Ganoderma* sp.

En la figura 2 se presenta el cultivo de *Ganoderma* sp., en medio Kirk y las observaciones microscópicas en azul de lactofenol, donde se pudo identificar las hifas septadas y clamidosporas características del hongo.

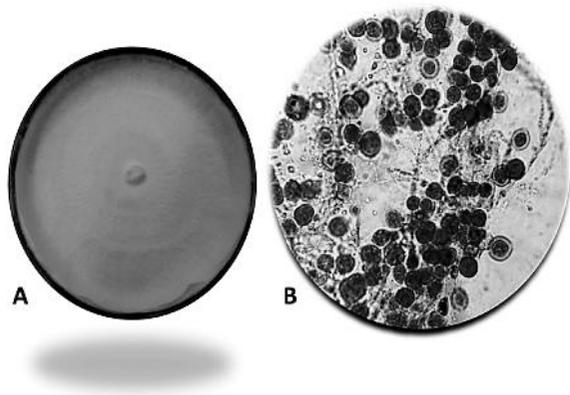


Figura 2. Macroscopía y microscopía de *Ganoderma* sp., A. Micelio (Kirk), B. Clamidosporas (azul de lactofenol, 100X)

Evaluación de sustratos para la producción de polisacáridos y biomasa de *Ganoderma* sp.

Se ha encontrado que el sustrato incide en la producción de metabolitos fúngicos y entre ellos los polisacáridos, ya que algunas investigaciones han demostrado que parte de la composición química de EPS e IPS dependen en cierta medida del medio de cultivo en el que se incuba el microorganismo, principalmente de la fuente de carbono (Donot et al., 2012; Kagimura et al., 2015).

Evaluación de sustratos para la producción de biomasa de *Ganoderma* sp.

Sustratos utilizados: Bio 3%, Bio 3% + Lactosa (Lac: 1, 10 y 20 %), Bio 3% + Glucosa (Glu: 1, 10 y 20%), Bio 3% + Glucosa + Lactosa (Bio 3% + 10% Gluc + 10% Lac). Los medios de cultivo que generaron mayor producción de biomasa fueron Bio 3% + Glucosa 20% y Bio 3% + Lactosa 10%.

Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los triplicados de cada variable.

Las letras sobre las barras representan las diferencias significativas entre grupos. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas y letras diferentes indican que si hay diferencias significativas ($P < 0,05$).

El sustrato Bio, se utilizó en este trabajo en aras de aprovechar residuos biodegradables que pueden ser utilizados por las enzimas fúngicas, beneficiando la producción de metabolitos, disminuyendo costos de producción, obteniéndose buenos rendimientos y como valor agregado la contribución al cuidado del ambiente.

Al inicio de la fermentación, el medio de cultivo Bio presentó solubilidad parcial en agua, evidenciando cambios durante el proceso de fermentación, observándose una transformación y solubilidad del medio

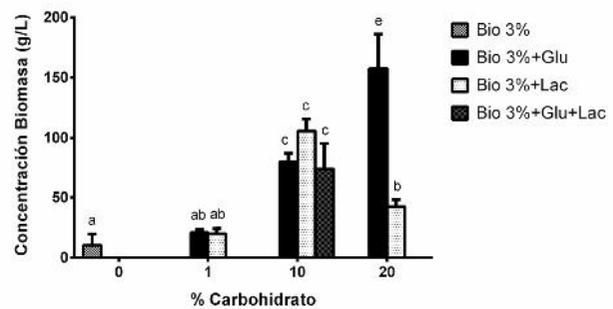


Figura 3. Efecto de la concentración de diferentes sustratos para la producción de biomasa de *Ganoderma* sp.

al transcurrir el tiempo, indicando que el hongo estaba consumiendo el sustrato, comparado con el control sin inocular. En la figura 3 se aprecia que dicho sustrato por sí solo, no es suficiente para alcanzar altas concentraciones de biomasa en menor tiempo, obteniéndose un promedio de 12 g/L a los 10 días de fermentación (figura 3 Bio 3%). Otras investigaciones como la de Fang y Zhong (2002), utilizaron fuentes de carbono convencionales como glucosa al 20, 35, 50 y 65 g/L, encontrando que a la concentración de 35 g/L (3.5 % p/v aprox.) se produjeron 14.1 g/L de biomasa de *G. lucidum* a los 8 días de fermentación. Por otra parte, Tang y Zhong (2002) evaluaron la producción de biomasa con lactosa inicial al 20, 35, 50 y 65 g/L obteniendo un máximo de 14,39 g/L de biomasa de *G. lucidum* a 65 g/L de lactosa (6,5% p/v aprox.) a los 14 días.

En la presente investigación con el medio Bio al 3% sin suplementación con glucosa o lactosa, se produjo 12 g/L y con glucosa o lactosa al 1% se produjeron 20,97 y 20,02 g/L respectivamente a los 10 días; sugiriendo que es posible utilizar sustratos alternativos, económicos y amigables con el ambiente con resultados similares o mejores que los medios convencionales, para la producción de hongos de importancia biotecnológica.

En la figura 3 y en los análisis de comparación de medias mediante el procedimiento de LSD de Fisher, se puede concluir que la concentración de la biomasa es similar al utilizar glucosa o lactosa al 1% y al 10% (tanto independientes como combinadas), siendo la concentración del 10% la que mayor favoreció la producción de biomasa. Otros investigadores como Papinutti (Papinutti, 2010) también demostraron que no hay diferencias significativas en el desarrollo de la biomasa cuando se utiliza glucosa o lactosa como única fuente de carbono a una concentración inicial del 1% p/v.

Adicionalmente, se observó que el sustrato influye de una forma altamente significativa en el crecimiento del hongo. En todos los porcentajes de adición de glucosa y lactosa, hubo un incremento en la concentración

de la biomasa, siendo directamente proporcional en el caso de la glucosa. Al utilizar lactosa, se observó incremento hasta el 10% y de ahí en adelante pareciese haber una inhibición por sustrato. En otras investigaciones se ha demostrado que altas concentraciones de algunos nutrientes inhiben el crecimiento de los hongos en procesos de fermentación (Fang and Zhong, 2002; Chen *et al.*, 2008; Papinutti, 2010).

Pese a que la mayor concentración de biomasa se obtiene al 20% de glucosa (200 g/L), es una cantidad muy alta de sustrato para un proceso de fermentación que se piensa utilizar a escala industrial, donde el objetivo es disminuir costos de producción por lote, utilizar sustratos alternativos y obtener buenos rendimientos (costo-beneficio). Por otra parte, la lactosa al 20 % es poco soluble en agua y desfavoreció el crecimiento del hongo.

Evaluación de sustratos para la producción de IPS de *Ganoderma sp.*

Sustratos utilizados: Bio, Bio + Lactosa (Lac: 1, 10 y 20 %), Bio + Glucosa (Glu: 1, 10 y 20%), Bio + Glucosa + Lactosa (Bio + 10% Glu + 10% Lac). El medio de cultivo que generó mayor producción de EPS fue Bio + Lac 20%.

Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los triplicados de cada variable.

Las letras sobre las barras representan las diferencias significativas entre grupos. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas y letras diferentes indican que si hay diferencias significativas ($P < 0,05$).

En la figura 4 se puede observar que la producción de EPS es dosis dependiente, presentándose una mayor concentración cuando se adicionó glucosa o lactosa al 20%.

Revisando resultados de otros autores, se encontró que Fang y Zhong (2002) produjeron $0,43 \pm 0,05$ g/L de EPS de *G. lucidum* a los 6 días de fermentación utilizando glucosa a 20 g/L (2% p/v) como fuente de

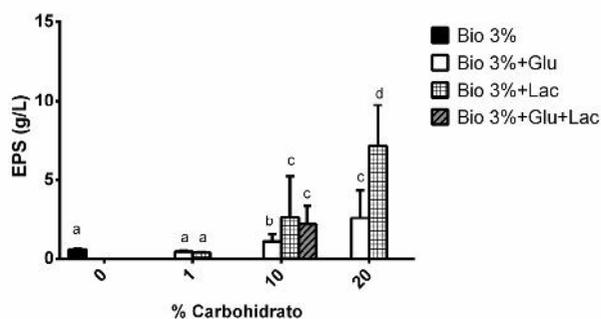


Figura 4. Efecto de la concentración de diferentes sustratos para la producción de EPS de *Ganoderma sp.*

carbono, mientras que Tang y Zhong (2002) produjeron $0,32 \pm 0,04$ g/L de EPS de *G. lucidum* el día 12 de fermentación utilizando lactosa a 20 g/L (2% p/v). En esta investigación con el medio Bio al 3% suplementado con glucosa o lactosa al 1% se produjeron $0,47 \pm 0,06$ g/L y $0,40 \pm 0,04$ g/L de EPS respectivamente a los 10 días de fermentación.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se utilizó lactosa al 10% o glucosa en combinación con lactosa al 10%. Al utilizar lactosa o glucosa al 10% y lactosa al 20% se observan diferencias significativas en la producción de EPS, siendo mayor en el caso de la lactosa. Lo anterior demuestra que la producción de EPS es dosis-dependiente con respecto a la adición de estos azúcares tal y como lo han demostrado otros autores (Fang and Zhong, 2002; Tang and Zhong, 2002; Lee *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta lo anterior, para producir EPS de una forma viable y económica, se sugiere utilizar una combinación del sustrato Bio con lactosa al 10% (2,65 g/L).

Evaluación de sustratos para la producción de IPS de *Ganoderma sp.*

Sustratos utilizados: Bio + Lactosa (Lac: 1, 10 y 20 %), Bio + Glucosa (Glu: 1, 10 y 20%), Bio + Glucosa + Lactosa (Bio + 10% Glu + 10% Lac). El medio de cultivo que generó mayor producción de IPS fue Bio + Glu 10% + Lac 10%.

Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los triplicados de cada variable.

Las letras sobre las barras representan las diferencias significativas entre grupos. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas y letras diferentes indican que si hay diferencias significativas ($P < 0,05$).

En la figura 5 se muestra que no hay diferencias significativas en utilizar la mayoría de los sustratos para la producción de IPS, excepto cuando se utiliza lactosa al 20% y la combinación de lactosa y glucosa al 10%, como se observa en la diferencia de letras sobre las barras.

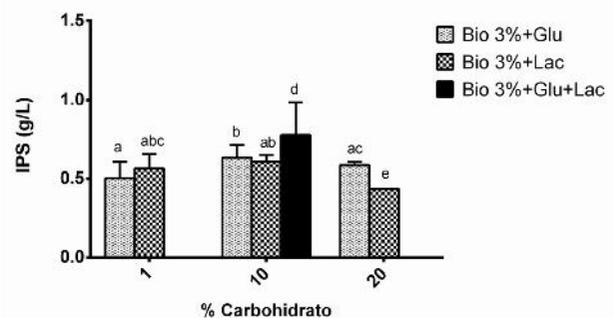


Figura 5. Efecto de la concentración de diferentes sustratos para la producción de IPS de *Ganoderma sp.*

Fan y Zhong (2002) cuando utilizaron glucosa a 20 g/L (2% p/v) como fuente de carbono, produjeron $0,55 \pm 0,028$ g/L de IPS de *G. lucidum* a los 6 días, mientras que Tang y Zhong (2002) produjeron $0,92 \pm 0,00$ g/L de IPS de *G. lucidum* utilizando lactosa como fuente de carbono. En la presente investigación se logró producir $0,5 \pm 0,1$ g/L y $0,56 \pm 0,09$ g/L de IPS utilizando el medio Bio con glucosa y lactosa al 1% respectivamente a los 10 días de fermentación. Para el caso de la glucosa se obtuvo el mismo resultado que los autores mencionados, utilizando un residuo agroindustrial como sustrato y a la mitad de la concentración de glucosa que ellos utilizaron.

Utilizando el medio Bio con 1, 10, y 20 % p/v de glucosa, la productividad de IPS en relación con la biomasa fue de $25,7 \pm 2,8$; $8,72 \pm 1,8$; $3,73 \pm 0,76$ mg/ 100 mg de biomasa, respectivamente; y utilizando el medio Bio con 1, 10, 20 % p/v de lactosa se obtuvieron $33,95 \pm 6,3$; $9,06 \pm 2,2$; $11,05 \pm 2,3$ mg/100 mg de biomasa, respectivamente; indicando que la producción de IPS es inversamente proporcional a la concentración del carbohidrato adicionado, similar a lo obtenido por Lee *et al.* (2007) en la producción de IPS de *G. applanatum*.

El efecto estimulador de los carbohidratos en la producción de polisacáridos, ya se ha observado en investigaciones previas (Fang and Zhong, 2002; Tang and Zhong, 2002; Lee *et al.*, 2007; Papinutti, 2010). De los resultados obtenidos, se puede concluir que la producción de Biomasa y EPS en la mayoría de los casos es dosis-dependiente con respecto al carbohidrato suplementado y en el caso de IPS, no se observan grandes diferencias entre los tratamientos. La mayor producción de IPS se observa al combinar el medio Bio con lactosa y glucosa al 10% ($0,78 \pm 0,1$ g/L). Esto quiere decir que no necesariamente la producción de biomasa y polisacáridos están directamente relacionadas. Por lo tanto para fines de producción simultánea de biomasa, EPS e IPS, obteniendo los mejores rendimientos y de una forma económica, se decide continuar los

ensayos en biorreactor con el medio Bio suplementado con lactosa al 10%

Producción de biomasa y polisacáridos a nivel de biorreactor de 5L

A nivel de biorreactor de 5 L se decidió trabajar con lactosa al 10% como sustrato para fomentar tanto la producción de biomasa como de polisacáridos. No se modifican variables porque la producción se realiza con el fin de obtener grandes cantidades de biomasa y polisacáridos para los posteriores análisis de identificación. Se realizaron seguimientos del cultivo en el microscopio cada 2 días, observándose una buena formación y tamaño de pellets, lo cual es muy positivo a la hora de realizar el escalado de una fermentación (figura 6). Al finalizar la fermentación (5 días) se obtuvo una biomasa de 153 g/L. El tiempo de fermentación fue menor que a escala de Erlenmeyer, porque a días posteriores se generaba gran cantidad de polisacárido, cambiando las propiedades reológicas del medio y dificultando la agitación y disminuyendo la transferencia de oxígeno (datos no mostrados).

En la figura 7 para *Ganoderma sp.*, se observa la cantidad de polisacárido producido por volumen de biorreactor. La mayor cantidad de carbohidratos obtenidos con el medio Bio suplementado con lactosa, se da en el extracto GIPSi y la menor cantidad en GIPSS. La sumatoria total de polisacáridos producidos en el biorreactor fue de 26,9 g/L. Debido a la gran cantidad de biomasa producida, se obtuvo mayor concentración de IPS insoluble, ya que a nivel estructural la pared celular fúngica posee polisacáridos insolubles como la quitina y los glucanos (Chan *et al.*, 2009; Donot *et al.*, 2012). De los EPS liberados al medio, se obtuvo mayor proporción de solubles que de insolubles, probablemente porque el hongo se encontraba en un medio acuoso que favoreció la liberación de sustancias solubles.

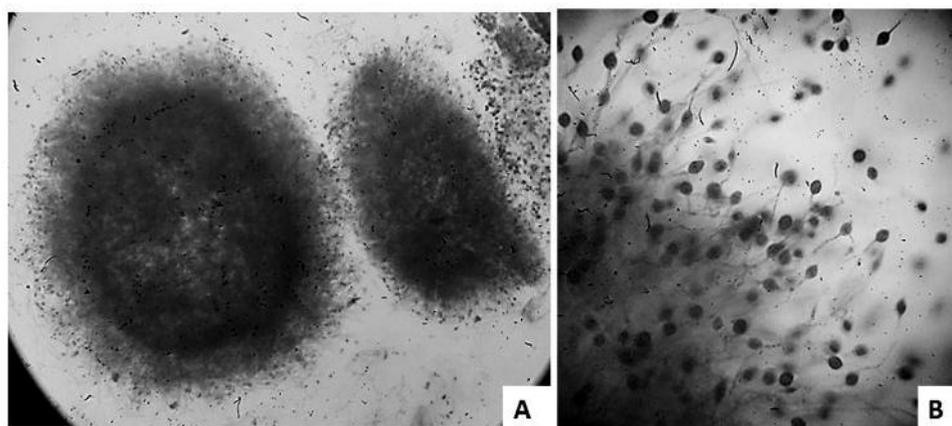


Figura 6. Seguimiento de los pellets de *Ganoderma sp.*, en cultivo sumergido. Micrografías a 40X (A) y 400X (B) con azul de lactofenol.

Tabla 1. Porcentaje peso/peso de α y β glucanos en los extractos fúngicos. El porcentaje se obtiene con base en el peso seco del extracto crudo.

Muestra	Tipo de glucano	% w/w de beta glucano
GEPSs	Glucano total	39,63
	α -glucano	5,66
	β -glucano	33,98
GEPSi	Glucano total	40,39
	α -glucano	5,09
	β -glucano	35,30
GIPSi	Glucano total	59,44
	α -glucano	8,21
	β -glucano	51,23
GIPSSs	Glucano total	9,65
	α -glucano	1,67
	β -glucano	7,99

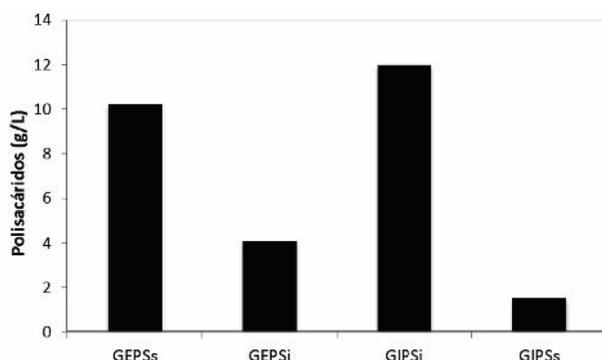


Figura 7. Producción de EPS e IPS a nivel de Biorreactor. *Ganoderma* sp.: GEPSs: EPS soluble, GEPSi: EPS insoluble, GIPSi: IPS insoluble, GIPSSs: IPS soluble.

Se cuantificaron los α y β glucanos para determinar las diferencias entre la concentración de azúcares obtenida por el método del fenol ácido sulfúrico y la cantidad de alfa y beta glucanos presentes en los extractos de acuerdo al método enzimático que es más específico. Como se presenta en la tabla 1 se confirma la presencia de beta y alfa glucanos en los extractos de *Ganoderma* sp. El extracto GIPSi fue el que presentó mayor porcentaje de glucanos totales. En todas las muestras se encontró que de los polisacáridos totales de las diferentes fracciones, en general, entre el 40% y el 60% son tipo glucanos, lo cual es muy satisfactorio, ya que éstos presentan buena actividad biológica (Zhao *et al.*, 2015; Nie *et al.*, 2013; Ruthes *et al.*, 2015).

Se encontró que más del 80% de los glucanos totales en todas las muestras son β -glucanos, lo cual es acorde a lo reportado para éstos hongos, debido a que los β -glucanos hacen parte de su pared celular (Ruthes *et al.*, 2015). Esta situación es muy satisfactoria ya que los β -glucanos han sido los más estudiados, aislados y utilizados por sus propiedades bioactivas.

Análisis por ultravioleta

En la figura 8 se aprecian los espectros ultravioleta de cada uno de los extractos a λ entre 200-400 nm. Se compararon los extractos contra un estándar de proteína, todos a una concentración de 2 mg/mL. Se puede observar que no hay picos característicos de ácidos nucleicos (260 nm), y el extracto GIPSi presentó un pico a 280 nm, lo que permite inferir la presencia de proteínas que pueden estar unidas a polisacáridos, aunque en pequeña proporción por su baja absorción en el espectro. Para la determinación de polisacáridos por el método de fenol-ácido sulfúrico se debe tener en cuenta la pureza de las muestras ya que el método es sensible a altas concentraciones de proteínas. Para purificarlas, es común utilizar el método de Sevag (Staub, 1965), el cual consume mucho tiempo, reactivos y es muy laborioso. Como no se observaron altas concentraciones de proteína y en el presente trabajo el interés primordial es la bioprospección de hongos endógenos de Antioquia y la identificación de metabolitos de interés farmacéutico, se decidió no purificar el extracto, para conocer sus características y no excluir metabolitos posiblemente bioactivos que se pierden en los procesos de purificación.

Análisis por infrarrojo

La determinación de la configuración anomérica de los monosacáridos fue analizada mediante espectroscopía de infrarrojo (IR). Se analizaron todos los extrac-

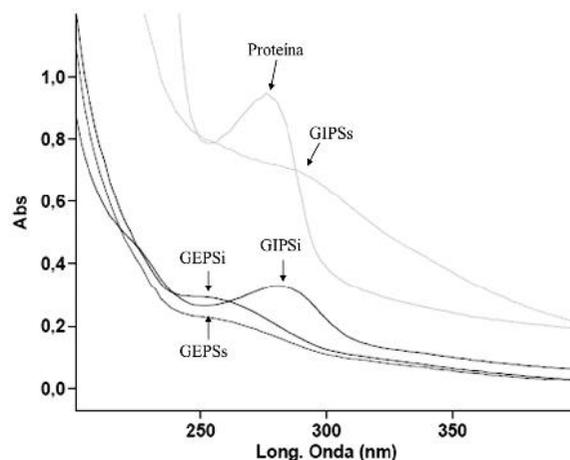


Figura 8. Espectro ultravioleta a longitudes de onda entre 200-400 nm de cada uno de los extractos.

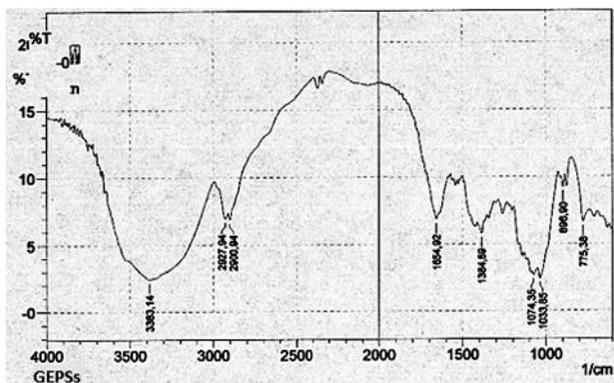


Figura 9. Espectro IR de GEPSs

tos, y se observó que presentaban un patrón similar, por lo cual sólo se presenta el espectro de GEPSs.

El espectro obtenido para el extracto GEPSs presentado en la figura 9 fue el esperado para un β -glucano, mostrando una banda de absorción de alrededor de 890 cm^{-1} la cual es característica de los enlaces β -glicosídicos. Además el espectro carece de las bandas 850 y 930 cm^{-1} que son bandas normalmente atribuidas a los alfa glicosídicos (Limberger-Bayer, de Francisco *et al.*, 2014).

En este espectro, también se observan bandas a 1650 cm^{-1} que son características de los enlaces CO-NH, relacionados con péptidos o amino-azúcares (Zechner-Krpan *et al.*, 2010).

Actividad biológica

Muchos estudios se han concentrado en la producción y bioactividad de los polisacáridos solubles en agua, por ser más fáciles de manejar, cuantificar y caracterizar. Por el contrario, la actividad de los polisacáridos insolubles en agua ha sido poco estudiada (Papinutti, 2010). Es por esto que en este estudio se evalúa la ac-

tividad de polisacáridos solubles e insolubles, ampliando un poco más el conocimiento de éstos últimos.

En los ensayos realizados en las células VERO, no se observó inhibición de crecimiento a la mayor concentración utilizada. Indicando así, que los polisacáridos no poseen actividad citotóxicas en células humanas a las concentraciones evaluadas ($IC_{50} > 100\text{ }\mu\text{g/mL}$) (Datos no mostrados) (OPS 2013). En sarcoma de células reticulares de ratón (J774) hubo un cambio de morfología e inhibición de crecimiento en las células a una concentración de $200\text{ }\mu\text{g/mL}$ (figura 10).

El comportamiento fue similar en todos los extractos.

En esta investigación se observó un efecto dosis-dependiente, similar a lo reportado por otros autores con respecto a la actividad antitumoral de los polisacáridos *in vitro* (Chen *et al.*, 2008).

El mecanismo de acción de los polisacáridos sobre las líneas celulares cancerígenas no está completamente elucidado (Zhao *et al.*, 2015).

Se puede observar que el efecto es dosis-dependiente y todos los extractos poseen una actividad similar a la del estándar de β -glucano.

En la figura 11 se observa un efecto de los extractos de *Ganoderma sp.*, sobre el porcentaje de proliferación de células de sarcoma J774. Se toma como 100% el control de las células sin tratamiento. Casi todos los extractos incluyendo el estándar de β -glucano (Chromadex®), cuya promesa de venta es poseer bioactividad, presentan un comportamiento similar. El efecto es dosis-dependiente, donde a bajas concentraciones no hay efectos en las células de J774 y a concentraciones entre 100 y $200\text{ }\mu\text{g/mL}$ se observa efecto inhibitorio en la proliferación. El extracto que tuvo mayor efecto en las células y presentó un comportamiento similar al estándar ($IC_{50}= 81,8$) fue el GIPSi ($IC_{50}= 86$) (tabla 2). Este extracto presentó un espectro similar en el IR al GEPSs (figura 9), lo cual indica que tiene enlaces

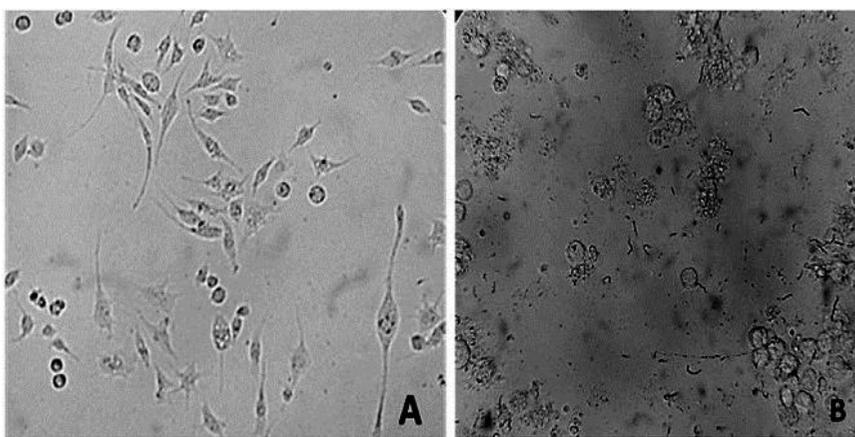


Figura 10. A. Sarcoma de ratón J774 antes del tratamiento con los extractos. B. Sarcoma J774 después del tratamiento con los extractos a 100 y $200\text{ }\mu\text{g/mL}$.

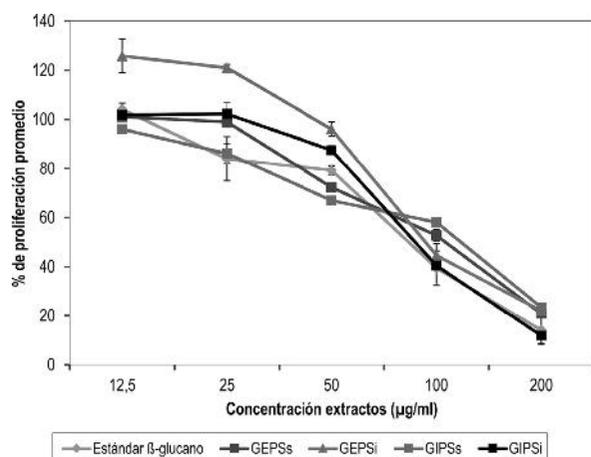


Figura 11. Efecto de los extractos de *Ganoderma* sp., en el % de proliferación de Sarcoma J774.

característicos de los polisacáridos fúngicos. Adicionalmente, fue el extracto con mayor concentración de azúcares por volumen de biorreactor, al igual que mostró presencia de proteínas en el espectro UV y fue del que se obtuvo mayor porcentaje de glucanos (59%) (tablas 1, 2 y figura 8). Lo anterior indica la importancia de continuar evaluando este extracto, porque con los ensayos realizados hasta el momento posee todas las características de un polisacárido bioactivo. De igual forma, se hace necesario realizar ensayos posteriores con otras líneas celulares donde se evalúe su capacidad antitumoral directa o si su efecto es inmunomodulador como han demostrado otras investigaciones (Feng *et al.*, 2010).

Tabla 2. IC50 de los extractos de *Ganoderma* sp.

Muestra	IC50	SD
Estándar	81,8	6,79
GEPSs	105	7,07
GEPSi	88	2,83
GIPSi	86	2,83
GIPSi	106,5	19,09

Conclusiones

Comúnmente en las investigaciones se utilizan cepas comerciales para la producción de metabolitos de importancia industrial y farmacéutica. En este trabajo, se logró obtener altos rendimientos de biomasa y de polisacáridos a partir de una cepa colombiana de *Ganoderma* sp., aislada en la región Andina tanto a escala de Erlenmeyer como de biorreactor de 5 L.

Con el sustrato Bio utilizado se lograron mayores cantidades de biomasa y polisacáridos que las reportadas en investigaciones que utilizan sustratos convencio-

nales. Adicionalmente, al utilizar suplementos de carbohidratos como la glucosa y la lactosa, se mejoró la producción simultánea de biomasa y polisacáridos, obteniéndose grandes cantidades. Entre los medios evaluados, se eligió como mejor sustrato al medio Bio suplementado con lactosa al 10%.

Este trabajo muestra que es posible utilizar residuos agroindustriales en procesos biotecnológicos como sustratos de bajo costo y que contribuyen a la utilización de estrategias limpias que permitan el cuidado del ambiente y con los que se pueden obtener mayores rendimientos.

Los ensayos de fenol-ácido sulfúrico, ultravioleta, % de glucanos e IR, permitieron detectar la presencia de polisacáridos y algunas proteínas en los extractos, sugiriendo que los hongos endógenos de nuestra región también poseen características y metabolitos importantes a nivel medicinal como los reportados en países orientales. Se encontró que más del 80% de los glucanos totales obtenidos, son β-glucanos, los cuáles han sido ampliamente estudiados por ser moléculas bioactivas.

Adicionalmente se demostró que los extractos de polisacáridos a menos de 200 µg/mL no presentaron toxicidad en líneas celulares VERO y poseen efecto antiproliferativo en células de sarcoma J774, especialmente con el extracto GIPSi que tuvo un efecto similar al generado por estándares comerciales de β-glucanos.

Es necesario realizar posteriores ensayos que permitan caracterizar los polisacáridos aislados y determinar su actividad biológica, especialmente cuando se trata de aprovechar la biodiversidad colombiana.

Agradecimientos

Los autores agradecen al grupo de Catalizadores y Adsorbentes y al Grupo de Inmuno Modulación de la Universidad de Antioquia por su colaboración, y a la Universidad de Antioquia y a Colciencias por la financiación de este proyecto (Convocatoria 521-2010 - Banco de Proyectos de Investigación Científica o Tecnológica).

Referencias

- Arboleda, C. y A. I. Mejía. (2010). Inducción de la actividad lacasa en *Ganoderma* sp., y actividad antioxidante de su biomasa. *Revista cubana de farmacia*, 44(4), 519-532.
- Arboleda, C., Mejía, A.I.; Franco-Molano, A.E., Jiménez, G.A; Pennington, M.J. (2008). Autochthonous white rot fungi from the tropical forest of Colombia for dye decolourisation and lignolytic enzymes production. *Sydowia*, 60(2), 165-180.
- Benzie, I. F., & Wachtel-Galor, S. (Eds.). (2011). *Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects*. CRC Press.
- Bishop, K. S., Kao, C. H., Xu, Y., Glucina, M. P., Paterson, R. R. M., & Ferguson, L. R. (2015). From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. *Phytochemistry*, 114, 56-65.
- Chan, G. C., Chan, W.K., Sze, D.M. (2009). The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology and Oncology*, 10, 2-25.

- Chen, H., Ju, Y., Li, J., Yu, M. (2012). Antioxidant activities of polysaccharides from *Lentinus edodes* and their significance for disease prevention. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(1), 214-218.
- Chen, W., Zhao, Z., Chen, S.F., Li, Y.Q. (2008). Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect *in vitro*. *Bioresource technology*, 99 (8), 3187-3194.
- Daba, A. S. y O. U. Ezeronye. (2003). Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 672-678.
- deVere White, R. W., Hackman, R. M., Soares, S. E., Beckett, L. A., & Sun, B. (2002). Effects of a mushroom mycelium extract on the treatment of prostate cancer. *Urology*, 60(4), 640-644.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J.C., Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 951-962.
- 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.
- Fang, Q.-H. y J.-J. Zhong. (2002). Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry*, 37(7), 769-774.
- 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.
- Fraga, I., Coutinho, J., Bezerra, R.M., Dias, A.A., Marques, G., Nunes, F.M. (2014). Influence of culture medium growth variables on *Ganoderma lucidum* exopolysaccharides structural features. *Carbohydrate Polymers*, 111, 936-946.
- Kagimura, F.Y., da Cunha, M.A., Barbosa, A.M., Dekker R.F., Malfatti, C.R. (2015). Biological activities of derivatized D-glucans: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 588-598.
- Kirk, T. K., Croan, S., Tien, M., Murtagh, K. E., & Farrell, R. L. (1986). Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme and Microbial technology*, 8(1), 27-32.
- Lee, W. Y., Park, Y., Ahn, J.K., Ka, K.H., Park, S.Y. (2007). Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(2), 249-254.
- Limberger-Bayer, V. M., de Francisco, A., Chan, A., Oro, T., Ogliari, P. J., & Barreto, P. L. (2014). Barley β -glucans extraction and partial characterization. *Food chemistry*, 154, 84-89.
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S.I., Lee, Y. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical biochemistry*, 339(1), 69-72.
- Nie, S., Zhang, H., Li, W., Xie, M. (2013). Current development of polysaccharides from *Ganoderma*: Isolation, structure and bioactivities. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 1(1), 10-20.
- Papinutti, L. (2010). Effects of nutrients, pH and water potential on exopolysaccharides production by a fungal strain belonging to *Ganoderma lucidum* complex. *Bioresource technology*, 101(6), 1941-1946.
- Permiso No. 17. Autoridad Nacional de Licencias Ambientales-ANLA, Identificación, recolección y clasificación taxonómica y molecular de hongos basidiomicetes productores de enzimas ligninolíticas 22 de mayo de 2012.
- Radicado No. 11-160567. Superintendencia de Industria y Comercio, resolución No. 49744 por la cual se otorga una patente de invención, Bogotá D.C., 22 de Agosto de 2014.
- Ramos M. (1990). Utilidad del análisis térmico en microbiología. Aplicación de las técnicas TG-DTG, DTA y DSC en la caracterización de polisacáridos de paredes fúngicas. España: Universidad de Valladolid.
- Ruthes, A. C., Smiderle, F. R., Iacomini, M. (2015). D-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. *Carbohydrate Polymers*, 117, 753-761.
- Organización Panamericana de la Salud-OPS. (2013). Cáncer en las Américas: perfiles de país 2013. Washington, D.C. Recuperado de: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=24076&Itemid=
- Staub, A.M. (1965). Removeal or Protein-Sevage Method. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 5, 5-6.
- Tang, Y.J. y J.J. Zhong. (2002). Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(1-2), 20-28.
- Wagner, R., Mitchell, D.A., Sasaki G.L, de Almeida Amazonas, M.A. (2004). Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharide. *Journal of Biotechnology*, 114(1-2), 153-164.
- Zechner-Krpan, V; Petravić-Tominac, V., Gospodarić, I., Sajli, L., Đaković, S., Filipović-Grčić, J. (2010). Characterization of β -Glucans Isolated from Brewer's Yeast and Dried by Different Methods. *Food Technology and Biotechnology*, 48(2), 189-197.
- 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.