

# Producción de biomasa y caracterización química de *Lentinula edodes* cultivado en biorreactor bajo diferentes condiciones

## Biomass production and chemical characterization of *Lentinula edodes* grown in a bioreactor under different conditions

Diego N. Mancera-Martinez\*, Carolina Chegwin Angarita\*\*, Juan Carlos Serrato Bermudez\*\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v25n1.96477

### RESUMEN

La ingeniería bioquímica juega un papel importante en el desarrollo tecnológico de los procesos de obtención ya sea de cuerpos fructíferos de setas con potencial medicinal para el consumo directo, o en la fabricación de nutracéuticos y/o suplementos dietarios. Esta investigación implementó una metodología en biorreactor para el cultivo del hongo macromiceto *Lentinula edodes*, conocido comúnmente como Shiitake, con el objetivo de evaluar el efecto que tienen la velocidad de agitación y el flujo de aire en la producción de biomasa y de metabolitos de mediana y baja polaridad. Se determinó que el rendimiento y la productividad más altos de producción de biomasa se logra a unas condiciones de 80 rpm y 0,50 vvm obteniendo 0,0260 g/g y 0,00433 g/L\*h respectivamente. Igualmente, en cuanto a la composición de esta biomasa, se concluyó que se genera un máximo contenido de proteína (33,4% del micelio liofilizado) a unas condiciones de 140 rpm y 0,75 vvm, los esteroides alcanzaron un porcentaje de 89,32% del extracto en DCM a 80 rpm y 0,5 vvm. Los resultados del análisis por GC-MS confirman la amplia variedad de compuestos que se pueden obtener a partir de un cultivo en biorreactor del hongo *Lentinula edodes*.

**Palabras clave:** Macromiceto, esteroides, azúcares, proteína, biotecnología.

### ABSTRACT

Biochemical engineering plays an important role in the technological development of the processes for obtaining either mushroom fruiting bodies with medicinal potential for direct consumption, or in the manufacture of nutraceuticals and/or dietary supplements. This research implemented a methodology in a bioreactor for the cultivation of the *Lentinula edodes* macromycete fungus, commonly

\* Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Orcid: 0009-0006-5392-3628

\*\* PhD., Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Orcid: 0000-0002-3150-9972

\* Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Orcid: 0000-0002-9092-0585

known as Shiitake, with the aim of evaluating the effect of agitation speed and air flow on the production of biomass and metabolites of median and low polarity. Thus, it was found that the highest yield and productivity of biomass production is achieved at conditions of 80 rpm and 0,50 vvm, obtaining 0,0260 g/g and 0,00433 g/L\*h respectively. Likewise, in the study of the content of metabolites it was concluded that for the protein 33,4% of the lyophilized mycelium was reached at conditions of 140 rpm and 0,75 vvm, the sterols reached a percentage of 89,32% of the extract. in DCM at 80 rpm and 0,5 vvm. The results of the GC-MS analysis confirm the wide variety of compounds that can be obtained from a bioreactor culture of the *Lentinula edodes* fungus.

**Key words:** Macromycete, sterols, sugars, protein, biotechnology.

**Recibido:** junio 21 de 2021 **Aprobado:** mayo 12 de 2023

## INTRODUCCIÓN

Los hongos macromicetos se destacan por la amplia variedad de actividades biológicas comprobadas atribuidas a la presencia de proteínas y metabolitos como ácidos grasos, triterpenos, alcaloides, flavonoides, polisacáridos, entre otros (Bhambri *et al.*, 2022). Estas cualidades, además de la comestibilidad que tienen algunos de ellos y su alto valor nutricional, han despertado el interés de la comunidad científica por desarrollar herramientas que permitan aumentar la eficiencia de su cultivo, en términos de producción de biomasa y composición (Das *et al.*, 2021; Okuda, 2022).

Entre estas herramientas se encuentra el cultivo biotecnológico a través de fermentaciones en estado líquido (FEL) el cual, a diferencia de otras metodologías como el cultivo tradicional o la fermentación en estado sólido, facilita la variación de diferentes condiciones o factores que impactan directamente el desarrollo del hongo (Berovic *et al.*, 2022). El cultivo en biorreactor permite controlar variables como la temperatura, la cantidad de inóculo y de fuente de nutrientes, la relación C/N, el pH, el tiempo de la fermentación, la agitación y la aireación (Petre y Petre, 2015). Estos dos últimos son factores determinantes para garantizar que la cantidad de oxígeno disuelto necesaria esté efectivamente disponible, así como que exista un balance entre la transferencia de oxígeno y el esfuerzo cortante en el medio. En caso de que esto no ocurra, no se dará el crecimiento óptimo de las células fúngicas, causando una reducción en la cantidad de biomasa producida y por ende en los metabolitos que esta contenga (Bakratsas *et al.*, 2021).

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de condiciones como la agitación y la aireación sobre la generación de biomasa y de metabolitos de mediana y baja polaridad del hongo *Lentinula edodes* cultivado en biorreactor. Los resultados de este trabajo, además de contribuir al conocimiento químico del macromiceto objeto de estudio y de su producción biotecnológica, permitieron determinar el potencial de la biomasa del

*Lentinula edodes* para su posible uso en diferentes áreas de la industria alimenticia y/o de nutracéuticos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Fúngico

Se utilizó una cepa foránea (EE. UU.) de *Lentinula edodes* de tipo comercial, donada al Laboratorio de Química de Hongos Macromicetos de la Universidad Nacional de Colombia. Para su activación, se cultivó en agar Papa Dextrosa (PDA), a una temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , en una incubadora WISD modelo WIG-155, en total oscuridad durante un periodo de 10 a 15 días (Suárez, 2012).

Posterior a la activación desde la cepa madre, se realizaron diferentes repiques en cajas de Petri, utilizando PDA como medio de cultivo y manteniendo las condiciones anteriormente descritas para su incubación.

### Obtención del preinóculo

El cultivo por fermentación en estado líquido se llevó a cabo en Erlenmeyer de 250 mL, utilizando como volumen de trabajo 100 mL con el medio GPY (Glucosa 20 g/L, peptona 2.5 g/L y extracto de levadura 2.5 g/L). Se ajustó el pH inicial a 5,0 y se inoculó con 15 discos de 0,5 a 1,0 cm de diámetro colonizados por micelio provenientes del proceso de activación de la cepa. Posteriormente los Erlenmeyer fueron llevados a un agitador orbital marca VWR modelo Incubating mini shaker, por un periodo de 15 días a una temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  y 180 rpm, según las condiciones de cultivo preestablecidas (Chegwin-Angarita y Nieto-Ramírez, 2014).

### Obtención del inóculo

Para producir los inóculos para la fermentación en estado líquido en biorreactor se preparó medio GPY, el cual se inoculó con 1,5 g del micelio fresco obtenido en el paso anterior por cada 100 mL de medio líquido, para su posterior incubación en el agitador orbital, a una temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  y 180 rpm durante 5 días. Se emplearon cuatro Erlenmeyer con micelio desarrollado para la inoculación del biorreactor y los tres restantes se cosecharon, filtraron y se almacenó la biomasa para su

posterior liofilización, con el objetivo de determinar el peso seco inicial usado para cada experimento.

### Cultivo en biorreactor

Se empleó un biorreactor Applikon Biotechnology, equipado con un agitador Rushton, medidor y controlador de temperatura y una capacidad de 3 L, usando como volumen de trabajo 2,5 L. Para cada una de las diferentes condiciones evaluadas, el equipo se esterilizó vacío durante una hora y el medio GPY, fue esterilizado por 30 minutos en un autoclave eléctrico, adicionando posteriormente 2,1 L de medio fresco y 400 mL de inóculo obtenido según la descripción del punto anterior y en las cantidades mencionadas en la tabla 1 para cada condición de cultivo. Este procedimiento se realizó en una cabina de flujo laminar ESCO modelo LHS-5CG-F9, para asegurar las condiciones de asepsia.

De acuerdo a los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento por (Vega-Oliveros, 2019) con la misma cepa y bajo las mismas condiciones de cultivo, el proceso de cultivo se mantuvo durante 5 días.

### Determinación de la producción de biomasa

El producto de la fermentación en estado líquido bajo cada una de las condiciones analizadas, se filtró, la biomasa se lavó y se almacenó a  $-4^{\circ}\text{C}$  durante un día, luego a  $-80^{\circ}\text{C}$  para ser liofilizada en un equipo LABCONCO FreeZone 2,5 a 0,12 mBar y  $-50^{\circ}\text{C}$ , pesada y conservada hasta su posterior análisis.

Los cálculos de rendimiento y productividad del proceso se obtuvieron de acuerdo al trabajo de Kirsch *et al.*, (2016). El rendimiento fue expresado en gramos de biomasa micelial producida por gramos de sustrato inicialmente presente en el medio de cultivo ( $\text{g g}^{-1}$ ), según la ecuación 1 donde  $X_f$  y  $X_i$  corresponden a la concentraciones final e inicial de biomasa y  $S_i$  a la concentración de azúcar inicial. La productividad de biomasa fue expresada en gramos de biomasa micelial por el tiempo ( $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), siendo  $t$  el tiempo del cultivo (ecuación 2).

$$Y\left(\frac{\text{g}}{\text{g}}\right) = \frac{X_f - X_i}{S_i} \quad (1)$$

$$P_x = \frac{X_f - X_i}{t} \quad (2)$$

### Diseño Experimental

Los experimentos llevados a cabo en el biorreactor siguieron un diseño factorial con dos factores (flujo de aire y velocidad de agitación) en dos niveles para cada uno, con el objetivo de determinar las condiciones más adecuadas

tanto para el crecimiento del hongo como para favorecer la biosíntesis de metabolitos de interés. Después de evaluar diferentes fuentes bibliográficas (Agudelo-Escobar *et al.*, 2017; Domingos *et al.*, 2017; Enman *et al.*, 2008; Özdemir *et al.*, 2017), se ajustaron los rangos de las variables de estudio de la siguiente manera: flujo de aire entre 0.5 vvm a 1.0 vvm y velocidad de agitación entre 80 rpm y 200 rpm, con lo cual se definieron seis experimentos elaborando un diseño central compuesto, tal como se puede apreciar en la tabla 1.

### Análisis de la composición de las biomásas

#### Proceso de extracción

Las biomásas liofilizadas y maceradas con nitrógeno se extrajeron usando diclorometano y ultrasonido en un baño marca Elma modelo E 30H, por 30 minutos a temperatura ambiente. Las biomásas remanentes posteriormente se extrajeron con etanol (96% de pureza) y ultrasonido durante 30 minutos y una temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$ . Las biomásas finales se extrajeron con agua en ebullición ( $95^{\circ}\text{C}$ ), posterior precipitación de los polisacáridos con etanol frío y centrifugación con refrigeración ( $8^{\circ}\text{C}$ ) a 10000 rpm por 10 min (Koutinas *et al.*, 2003).

#### Perfiles de los extractos en diclorometano por CG-EM

Los extractos en diclorometano de las biomásas obtenidas bajo cada condición de operación del biorreactor, se analizaron en un cromatógrafo Hewlett Packard modelo HP 6890 con una columna marca Zebron ZB1, usando como gas de arrastre helio a un flujo de 1,1 mL/min, con inyección en modo Split relación 10:1. La temperatura de inyección fue de  $300^{\circ}\text{C}$ , programando una rampa de calentamiento que inició en  $60^{\circ}\text{C}$  manteniendo esta temperatura durante 1 minuto, para luego calentar a una velocidad de  $7,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta lograr una temperatura de  $310^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. La temperatura de la interfase fue de  $250^{\circ}\text{C}$  y la del cuadrupolo de  $150^{\circ}\text{C}$ . Este cromatógrafo está acoplado a un espectrómetro de masas 5973 con una fuente de ionización de 70 eV. El análisis de los espectros de masas se realizó usando tanto las librerías del grupo de investigación como las del espectrómetro, estas últimas tomando los espectros de masas que tuviesen un porcentaje de similitud superior al 90%. En cuanto a las áreas relativas, los porcentajes se calcularon con base en los resultados obtenidos desde el cromatograma total de iones (TIC).

#### Determinación del contenido de proteína

A las biomásas secas se les realizó un análisis elemental (Microanalizador Flash 2000) para determinar el porcentaje de N y posteriormente se calculó el contenido de proteína con el factor de 4,38 empleado para hongos (Smiderle *et al.*, 2012).

**Tabla 1.** Rendimiento y productividad de la biomasa de *L. edodes* cultivada bajo diferentes condiciones de aireación y agitación.

\* Es el promedio aritmético de dos réplicas.

Ensayo	Agitación (rpm)	Aireación (VVM)	Cantidad de inóculo (g/L)	Biomasa final (g/L)	Rendimiento (g biomasa/g glucosa)	Productividad (g biomasa/L*h)
1	80	0,50	0,14	0,66	0,0260	0,00433
2	80	1,00	0,15	0,64	0,0245	0,00408
3	200	0,50	0,19	0,53	0,0170	0,00283
4	200	1,00	0,18	0,60	0,0210	0,00350
5	140*	0,75	0,09	0,57	0,0240	0,00400

#### *Determinación del contenido de esteroides totales*

Se empleó el método colorimétrico de Lieberman-Burchard (Mubbasher Sabir *et al.*, 2003), a partir de una curva de calibración con estigmasterol (Sigma®). Las lecturas de las soluciones de los extractos en diclorometano se realizaron espectrofotométricamente a una longitud de onda de 640 nm en un espectrofotómetro Thermo scientific Evolution 201.

#### *Determinación del contenido de azúcares totales*

El contenido de azúcares totales se determinó empleando el método colorimétrico de Dubois modificado (Ávila *et al.*, 2012), utilizando una curva de calibración con glucosa a 490 nm.

#### *Análisis estadísticos*

Los datos experimentales fueron normalizados para la realización de múltiples regresiones lineales, con el objetivo de medir el impacto de las variables estudiadas sobre la producción de biomasa, porcentaje de esteroides y azúcares. Esto fue posible mediante un análisis de varianza de cada uno de los modelos estudiados, con un valor de significancia estadística  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se mencionó anteriormente, la agitación y la aireación se encuentran entre los factores de mayor relevancia al momento de diseñar un proceso de cultivo en biorreactor de un macromiceto (Bakratsas *et al.*, 2021). Con el objetivo de determinar el efecto sobre la producción de biomasa y el perfil químico de hongo *L. edodes* cultivado, para cada una de las combinaciones de condiciones ensayadas, se cuantificó la biomasa, se analizó el perfil cromatográfico de los extractos en diclorometano por CG-EM, se cuantificó el contenido de proteína por análisis elemental, y el de esteroides y azúcares por un método espectrofotométrico.

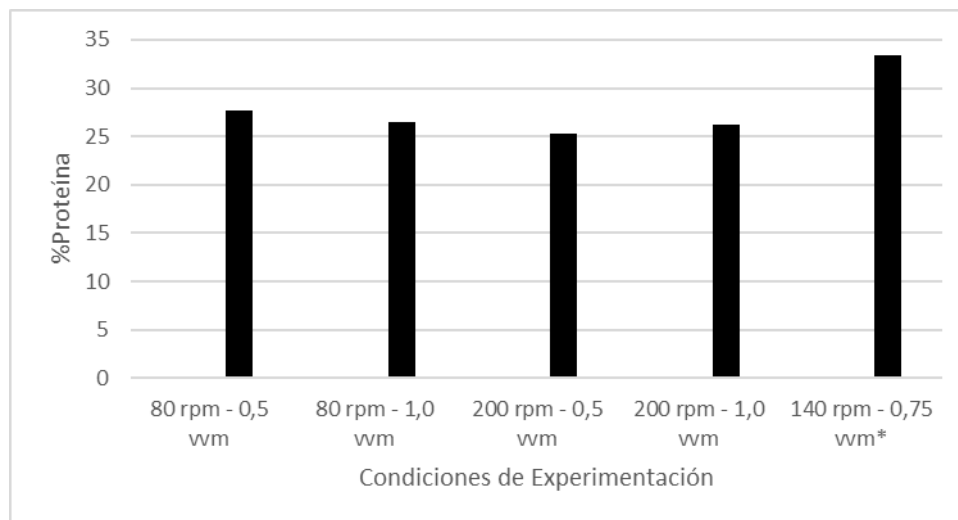
### **Efecto de la agitación y la aireación sobre la producción de biomasa**

Del análisis de la tabla 1 se puede concluir que el hongo *L. edodes* tiene su máxima producción de biomasa tanto en términos de productividad (0,00433 g biomasa/L\*h) como de eficiencia de la conversión de biomasa (0,0260 g biomasa/g glucosa) a una agitación de 80 rpm y un flujo de aire de 0,50 vvm (ensayo 1). Se observa claramente que el aumento en la velocidad de agitación (ensayos 1 y 3, 2 y 4), genera un efecto negativo sobre el rendimiento y la productividad. Esto debido posiblemente a una ruptura de las hifas causada por el agitador tipo Rushton, teniendo en cuenta que las células de los hongos son generalmente sensibles al esfuerzo cortante. Una manera de confirmar si este fenómeno está ocurriendo, es con la medición de la viscosidad del fluido, puesto que un incremento en la producción de hifas se relaciona con un medio de cultivo más viscoso. De igual forma, una disminución en la longitud de las hifas tendrá como consecuencia una reducción de la viscosidad. En el caso de la formación de pellets, la agitación también tiene un efecto directo: estudios muestran una aparente relación entre la intensidad de la agitación y el tamaño del pellet, pues con el incremento en la velocidad de agitación se obtienen pellets más pequeños y compactos (Gibbs *et al.*, 2000).

### **Efecto de la aireación y agitación sobre la composición de las biomásas**

#### *Contenido de proteína*

Los hongos macromicetos se caracterizan por tener no solo un alto contenido proteico, por lo que se destacan como una excelente fuente alimenticia para personas vegetarianas o veganas, sino que adicionalmente dichas proteínas se han destacado por poseer importantes actividades biológicas (Xu *et al.*, 2011). En el presente estudio se determinó que el contenido de proteína del micelio de *L. edodes* cultivado en biorreactor no varía significativamente al cambiar la agitación y la aireación, te-



**Figura 1.** Porcentaje de proteína en cada uno de los tratamientos realizados en las fermentaciones (\*Promedio aritmético de dos réplicas).

niendo un máximo de producción a 140 rpm y 0,75 vvm con un porcentaje del 33.41% (Figura 1).

Los resultados obtenidos del porcentaje de proteína de la biomasa cultivada en biorreactor son superiores a los valores obtenidos por cultivo en Erlenmeyer, como se reporta en el trabajo publicado por Vega-Oliveros *et al.* (2019), donde de acuerdo a la cinética de crecimiento evaluada, a los 6 días se obtuvo un contenido de proteína de 8% aproximadamente y a 10 días de 8,1%, demostrando de esta manera que el uso de tecnologías como los biorreactores aumentan el valor nutricional de este organismo, además del aporte medicinal sustentado en los reportes de las actividades biológicas de las proteínas aisladas de hongos (Xu *et al.*, 2011).

Por otro lado, la mayoría de estudios reportan el contenido proteico en los sombreros y estípites de los cuerpos fructíferos de *Lentinula edodes*. Li y colaboradores (2018) determinaron en el sombrero un contenido de proteína de 28,4% y en el estípite de 18,9%, Çağlarirmak, (2007) menciona un rango entre 20,7% y 29,4%, y López y colaboradores (2013) valores de 22,7% y 23,4%, para las fructificaciones cultivadas con dos tratamientos diferentes. De esta manera, la estrategia de cultivar Shiitake en un biorreactor produce contenidos de proteína ligeramente mayores a los que se logran en el cultivo tradicional, en menor tiempo y bajo condiciones controladas de una manera más eficiente.

#### Determinación de Esteroles

Los esteroides hacen parte de los metabolitos secundarios más ampliamente distribuidos en el reino fungi, responsables de diferentes actividades biológicas reporta-

das para estos organismos (Kour *et al.*, 2022). El estudio del efecto de la aireación y la agitación sobre la producción de este grupo de metabolitos, permitió determinar que con una agitación de 80 rpm y una aireación de 0.5 vvm, se alcanza una concentración de esteroides del 89.32%, y a su vez un alto nivel de aireación y de agitación resultan en un decrecimiento en la producción de los metabolitos, particularmente, el aumento en la agitación genera disminuciones cercanas a un 20%. De igual forma, el aumento en el flujo de aire reduce aproximadamente en un 10%, con respecto al máximo, la capacidad del hongo de producir esteroides (Figura 2).

No es posible hacer una comparación directa de estos resultados con estudios previos, debido a que no hay reportes de investigaciones similares. No obstante, resultados como el reportado por Jasinghe y Perera (2005), quienes calcularon el porcentaje de ergosterol en diferentes partes del hongo Shiitake, con valores en las láminas del sombrero del 10,6%; en la capa externa del sombrero un 5,34% y en el tallo de la seta un 2,97%, permiten establecer que el procedimiento de cultivar micelio del *L. edodes* en biorreactor es más eficiente que el cultivo tradicional.

#### Determinación de polisacáridos

Los hongos son considerados por la medicina moderna una fuente ilimitada y poco explorada de polisacáridos con un alto potencial terapéutico debido entre otras a sus propiedades antitumorales e inmuoestimulantes (Wasser S. 2002; Maity P. *et al.*, 2021). Por esta razón, evaluar el efecto de variables del proceso como en el caso de la presente investigación, sobre la producción de este grupo de metabolitos, genera un aporte valioso

**Tabla 2.** Resultados del análisis de varianza, para cada uno de los modelos evaluados.

Modelo	Y = Biomasa	Y = %Esteroles
$Y = \beta_0 + \beta_1 C_{A_i}$	R <sup>2</sup> ajustado: 0,2805 Valor F: 2,9490 Valor P: 0,1611	R <sup>2</sup> ajustado: 0,2864 Valor F: 2,6059 Valor P: 0,2049
$Y = \beta_0 + \beta_1 C_{A_i} + \beta_2 C_{A_{r_i}}$	R <sup>2</sup> ajustado: 0,1239 Valor F: 1,3539 Valor P: 0,3810	R <sup>2</sup> ajustado: 0,5543 Valor F: 4,1089 Valor P: 0,1383
$Y = \beta_0 + \beta_1 C_{A_i} + \beta_2 C_{A_{r_i}} + \beta_3 C_{A_i} C_{A_{r_i}}$	R <sup>2</sup> ajustado: 0,0673 Valor F: 1,1202 Valor P: 0,5036	R <sup>2</sup> ajustado: 0,3332 Valor F: 1,8328 Valor P: 0,3721
$Y = \beta_0 + \beta_1 C_{A_i} + \beta_2 C_{A_{r_i}} + \beta_3 C_{A_i} C_{A_{r_i}} + \beta_4 C_{A_i}^2$	R <sup>2</sup> ajustado: -0,1653 Valor F: 0,8227 Valor P: 0,6679	R <sup>2</sup> ajustado: -0,1895 Valor F: 0,8001 Valor P: 0,6736
$Y = \beta_0 + \beta_1 C_{A_i} + \beta_2 C_{A_{r_i}} + \beta_3 C_{A_i} C_{A_{r_i}} + \beta_4 C_{A_{r_i}}^2$	R <sup>2</sup> ajustado: -0,1653 Valor F: 0,8227 Valor P: 0,6679	R <sup>2</sup> ajustado: -0,1895 Valor F: 0,8001 Valor P: 0,6736

$C_{A_i}$  = Componente de agitación,  $C_{A_{r_i}}$  = Componente de aireación

al conocimiento de la biotecnología y la bioprospección fúngica. En la figura 3 se puede apreciar el efecto de variar la agitación y la aireación sobre los azúcares totales presentes en las biomásas del *L. edodes*. Del análisis de los resultados se puede concluir que, a diferencia de la producción de esteroides, la aireación es un factor que se debe tener en cuenta si se quiere producir una mayor cantidad de polisacáridos. Con cualquier nivel de agitación, al tener un mayor flujo de aire se logra obtener una mayor cantidad de polisacáridos, un 15% más al variar la aireación de 1,0 a 0,5 vvm. Se han reportado porcentajes de azúcares totales para *L. edodes* del 14,2%; 38,3% en polvo; 111,6% en el sombrero y 125,0% en el estípite.

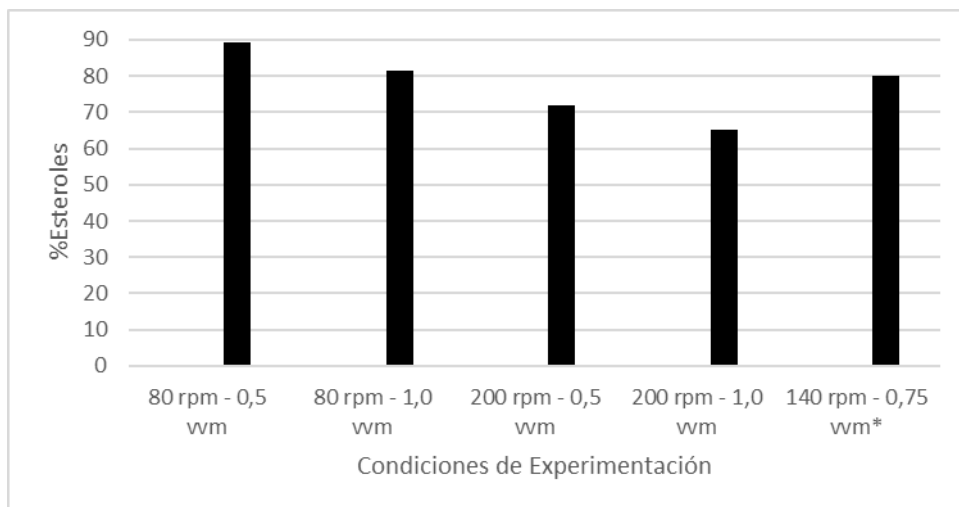
Generalmente, el contenido total de azúcares en los hongos varía ampliamente entre el 5 y el 25% del peso seco (Kalač, 2016). Para el biorreactor de estudio, una óptima producción de azúcares se encontraría en los 80 rpm de agitación y 1,0 vvm de aireación. Los datos obtenidos se encuentran entre los rangos reportados en literatura, en este sentido se puede afirmar que el biorreactor no promueve una mayor generación de polisacáridos comparado con el cultivo en estado sólido o sumergido. No se encuentra en la literatura un análisis del con-

tenido de polisacáridos totales del micelio del hongo cultivado en biorreactor, los evaluados se centran en la determinación de exopolisacáridos, por lo que esta investigación da a conocer nuevos datos de referencia para futuros trabajos en la determinación de polisacáridos con bioactividad producidos en un biorreactor.

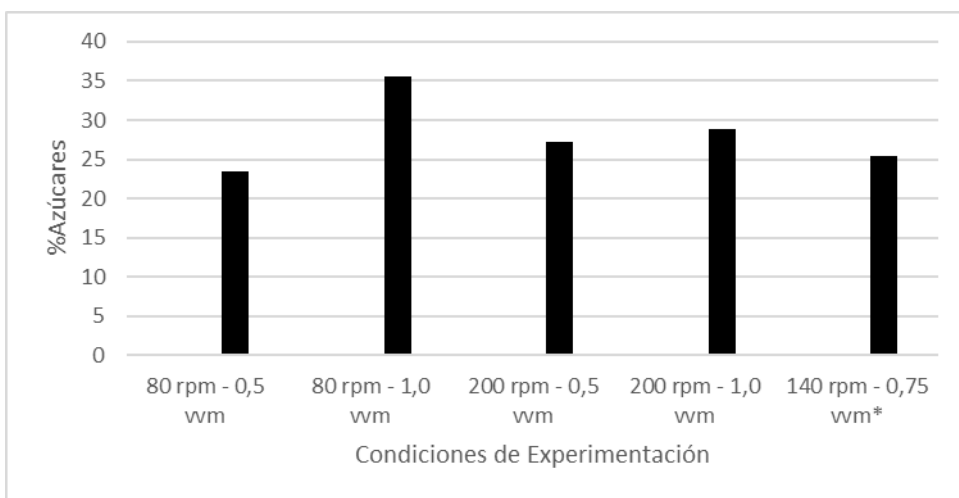
Con los resultados obtenidos en términos de cantidad de biomasa y de composición se procedió a realizar los análisis estadísticos para determinar la correlación de las condiciones estudiadas con las respuestas.

#### **Análisis estadístico del diseño central compuesto**

Como se describió en la metodología, se realizó un análisis (ANOVA) generando un modelo de regresión con una significancia estadística del 95%. En la tabla 2 se resumen cada uno de los modelos probados, con su respectivo análisis de varianza mostrando los valores F y P para la toma de decisión (relación con significancia estadística entre las variables, valor  $p < 0,05$ ). Para cada variable de respuesta, biomasa y porcentaje de esteroides, no hay un efecto significativo de la aireación o la agitación, ni una combinación de primer orden, ni una de segundo orden representan el modelo trabajado.



**Figura 2.** Porcentaje de esteroides en cada uno de los tratamientos realizados en las fermentaciones (\*Promedio aritmético de dos réplicas).



**Figura 3.** Porcentaje de azúcares totales en cada uno de los tratamientos realizados en las fermentaciones. (\*Promedio aritmético de dos réplicas).

Si se escogiera el mejor de cada caso, para la producción de biomasa podría ajustarse una línea recta, la cual explicaría tan solo el 28,05% de la variabilidad de los datos, de acuerdo al valor de  $R^2$  ajustado, el cual es más apropiado para comparar modelos con diferentes números de variables independientes (Agudelo-Escobar *et al.*, 2017). En el caso del porcentaje de esteroides podría emplearse una ecuación lineal con efecto de ambos parámetros explicando el 55,43% de la variabilidad en la respuesta.

No se generan modelos estadísticamente confiables para un posterior proceso de optimización. Una posible razón por la cual no fue posible detectar un efecto con-

siderable de las variables pudo ser debido a que los rangos de agitación y aireación escogidos eran demasiado grandes como para obtener diferencias significativas en cada una de las fermentaciones. Como se discutió anteriormente, niveles altos de agitación provocan una disminución en el rendimiento en cuanto a producción de biomasa y metabolitos. Así, se consideraría la posibilidad de diseñar experimentos para los rangos menores y así confirmar esta hipótesis. Aunque los resultados obtenidos muestran que existe un punto de máxima producción de biomasa, no hay una confiabilidad estadística para generar modelos que permitan predecir y/o representar el comportamiento de la fermentación realizada.

**Tabla 3.** Compuestos determinados bajo cada una de las condiciones evaluadas en los extractos en DCM de las biomásas de *Lentinula edodes* cultivadas en el biorreactor.

COMPUESTO	ÁREA RELATIVA					
	80 rpm 0,5 vvm	80 rpm 1,0 vvm	140 rpm – 0,75 vvm		200 rpm 0,5 vvm	200 rpm 1,0 vvm
			Réplica 1	Réplica 2		
<b>ÁCIDOS GRASOS</b>						
Ácido octadeca-9,12-dienoico (Ácido linoleico)	++++	-	++	+++	-	+
<b>ÉSTERES</b>						
9,12- Octadecadienoato de butilo (Butil éster del ácido linoleico)	-	+++	+++	++	+++	++++
9,12-Octadecadienoato de etilo (Etil éster del ácido linoleico)	-	-	+	++	-	+
Hexadecanoato de etilo (Etil éster del ácido hexadecanoico)	-	-	+	+	-	-
<b>HIDROCARBUROS</b>						
Eicosano	-	-	-	-	+++	-
Heptadecano	-	-	-	-	++	-
<b>TRITERPENOIDES</b>						
Ergosta-5,7,22-trien-3-ol (Ergosterol)	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
Estigmasta-5,7,22-trien-3-ol	+++	-	++++	++++	+++	++++
Ergosta-7,22-dien-3,5,6-triol	-	-	+	++	-	-

Cantidades relativas calculadas a partir del área del pico (%) + < 1%, 1% < ++ < 5% , 5% < +++ < 10%, 10% < ++++ < 20%, 50% < +++++, - = No detectado

Finalmente, el estudio de los perfiles obtenidos por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas permitió evaluar el efecto de las variaciones en los factores sobre la variedad de metabolitos de mediana polaridad presentes en las biomásas.

**Análisis de los perfiles de los extractos por CG-EM**

Los análisis de los cromatogramas y espectros de masas de los extractos obtenidos del micelio en diclorometano

para cada una de las condiciones evaluadas, permitieron determinar los compuestos presentes y su porcentaje de área relativa.

A partir del análisis de la tabla 3, se puede evidenciar que los esteroides conforman la mayor parte de los metabolitos presentes en los extractos analizados, representados en su mayoría por el ergosterol, corroborando los resultados obtenidos de la determinación espectrofotométrica discutida anteriormente y reforzando el poten-



cial que tienen los procesos biotecnológicos en biorreactor para el cultivo de una biomasa fúngica con un alto potencial en bioprospección, debido a la variedad de actividades biológicas atribuidas a este grupo de compuestos (Cheung, 2010; Prajapati *et al.*, 2021).

El segundo grupo de constituyentes mayoritario es el ácido linoleico y sus ésteres. Los ácidos grasos juegan un rol importante en el metabolismo del hongo, encontrándose en forma de ácidos libres y ésteres, particularmente del glicerol, funcionan como metabolitos almacenadores de energía mientras que los fosfolípidos son constituyentes de la membrana celular del hongo (Cheung, 2009). Se han identificado más de 40 ácidos grasos en varias especies de hongos, los cuales son en su mayoría alifáticos y monocarboxílicos, además, los ácidos insaturados presentes son de configuración *cis* (Cheung, 2010). Otros estudios como el de Mohammad Rahman y colaboradores reportan la presencia de ácidos grasos en cuerpos fructíferos de *Lentinula edodes* como el ácido oleico y linoleico, resaltando que este último tiene propiedades antiarterioscleróticas al disminuir los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en la sangre (Rahman *et al.*, 2018). P. Miles reporta diferentes porcentajes de composición de ácidos grasos totales en cuerpos fructíferos de diferentes cepas de Shiitake, encontrando niveles de ácido linoleico entre 53,62% y 76,25%, y composiciones elevadas de ácido mirístico del 11,31% al 20,94% (Miles & Chang, 2004), concluyendo de esta manera que el cultivo en biorreactor de este hongo macromiceto también es una fuente importante de ácidos grasos insaturados, los cuales son esenciales en la dieta, además, el ácido linoleico contribuye enormemente al sabor de los hongos debido a su rol como precursor del 1-octen-3-ol, el cual es el principal compuesto aromático conocido como alcohol fúngico (Cheung, 2010), lo que da la apertura a diferentes aplicaciones culinarias del micelio seco como alimento, especia y/o potenciador de sabor.

## CONCLUSIONES

El cultivo en biorreactor es una metodología que permite obtener biomasa de *L. edodes*, aumentando la eficiencia y eficacia del proceso. Debido a las pocas investigaciones llevadas a cabo con hongos macromicetos cultivados en biorreactor, este estudio amplió la información disponible.

Se evidencia que el cultivo de micelio en biorreactor aumenta la producción frente a los cultivos elaborados a nivel laboratorio en Erlenmeyer, llegando a un óptimo de producción de biomasa de 0,66 g/L a las condiciones de 80 rpm y 0,5 vvm. La producción de esteroides es má-

xima a las mismas condiciones, llegando a un porcentaje en el extracto de 89,32%. Lo contrario ocurre para la biosíntesis de polisacáridos, un aumento en el nivel de aireación promueve su producción. El mayor porcentaje de azúcares totales se encuentra a 80 rpm y 1,0 vvm, obteniendo un 35,58%. Finalmente, para la proteína total se evidencia nuevamente las mejores condiciones para una buena producción proteica son 80 rpm y 0,5 vvm, con un porcentaje de proteína total del 27,66%. Las biomásas cultivadas se caracterizan por tener un alto contenido de esteroides y de igual forma, se aprecia la formación de ácidos orgánicos como el ácido linoleico, y sus ésteres.

Finalmente, es importante resaltar la novedad de la presente investigación debido a la escasez de información y de reportes que puedan dar un mejor entendimiento a los procesos que se llevan a cabo al cultivar el *L. edodes* en biorreactor, con el fin de escalar la producción a niveles incluso industriales.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero brindado por la Vicerrectoría de Investigaciones, la Dirección de Investigaciones de la sede Bogotá (DIB) y la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia a través del proyecto con código 41634.

## REFERENCIAS

- Agudelo-Escobar, L. M., Gutiérrez-López, Y., Urrego-Restrepo, S. (2017). Efecto de la aireación, la agitación y el pH sobre la producción de biomasa micelial y exopolisacáridos del hongo filamentoso *Ganoderma lucidum*. *DYNA*, 84(200), 73–79. <https://doi.org/10.15446/dyna.v84n200.57126>
- Ávila, R., Rivas, B., Hernández, R., Chirinos, M. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease. *Multiciencias*, 12(2), 129–135. [www.redalyc.org](http://www.redalyc.org).
- Bakratsas, G., Polydera, A., Katapodis, P., & Stamatis, H. (2021). Recent trends in submerged cultivation of mushrooms and their application as a source of nutraceuticals and food additives. *Future Foods*, 4, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100086>
- Berovic, M., Podgornik, B. B., & Gregori, A. (2022). Cultivation technologies for production of medicinal mushroom biomass: Review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 24(2), 1–17. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2021042445>
- Bhambri, A., Srivastava, M., Mahale, V. G., Mahale, S., Karn, S. K. (2022). Mushrooms as potential sources of active metabolites and medicines. *Frontiers in*

- Microbiology, 13, 3–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.837266>
- Çağlarımak, N. (2007). The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula edodes* and *Pleurotus* species) and an estimated approach to the volatile compounds. *Food Chemistry*, 105(3), 1188–1194. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.021>
- Chegwin, C., Nieto, I. J. (2014). Effect of non-conventional carbon sources on the production of triterpenoids in submerged cultures of *Pleurotus* macrofungi. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 59(1), 2287–2293. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072014000100010>
- Cheung, P. (2010). The nutritional and health benefits of mushrooms. *Nutrition Bulletin*, 35(4), 292–299. <https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2010.01859.x>
- Cheung, Peter C. (2009). Mushrooms as functional foods. 130. <https://doi.org/10.1002/9780470367285>
- Das, A. K., Nanda, P. K., Dandapat, P., Bandyopadhyay, S., Gullón, P., Sivaraman, G. K., McClements, D. J., Gullón, B., & Lorenzo, J. M. (2021). Edible mushrooms as functional ingredients for development of healthier and more sustainable muscle foods: A flexitarian approach. *Molecules*, 26(9), 1–8. <https://doi.org/10.3390/molecules26092463>
- Domingos, M., Souza-Cruz, P. B. de, Ferraz, A., & Prata, A. M. R. (2017). A new bioreactor design for culturing basidiomycetes: Mycelial biomass production in submerged cultures of *Ceriporiopsis subvermispora*. *Chemical Engineering Science*, 170, 670–676. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2017.04.004>
- Enman, J., Hodge, D., Berglund, K. A., & Rova, U. (2008). Production of the bioactive compound eritadenine by submerged cultivation of shiitake (*Lentinus edodes*) mycelia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(8), 2609–2612. <https://doi.org/10.1021/jf800091a>
- Gibbs, P. A., Seviour, R. J., & Schmid, F. (2000). Growth of filamentous fungi in submerged culture: Problems and possible solutions. *Critical Reviews in Biotechnology*, 20(1), 17–48. <https://doi.org/10.1080/07388550091144177>
- Jasinghe, V. J., Perera, C. O. (2005). Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D2 by UV irradiation. *Food Chemistry*, 92(3), 541–546. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.022>
- Kalač, P. (2016). Edible Mushrooms: Chemical Composition and Nutritional Value. *Edible Mushrooms: Chemical Composition and Nutritional Value*, 1–207. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-00471-3>
- Kirsch, L. de S., de Macedo, A. J. P., & Teixeira, M. F. S. (2016). Production of mycelial biomass by the Amazonian edible mushroom *Pleurotus albidus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(3), 658–664. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.007>
- Koutinas, A. A., Wang, R., & Webb, C. (2003). Estimation of fungal growth in complex, heterogeneous culture. *Biochemical Engineering Journal*, 14(2), 93–100. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00154-7](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00154-7)
- Kour H., Kour D., Kour S., Singh S., Azhar S., Hashmi J., Nath A., Kumar K., Pal Y.
- Singh A. (2022). Bioactive compounds from mushrooms: Emerging bioresources of food and nutraceuticals. *Food Bioscience* 50 102124. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102124>
- Li, S., Wang, A., Liu, L., Tian, G., Wei, S., & Xu, F. (2018). Evaluation of nutritional values of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) stipes. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(3), 2012–2019. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9816-2>
- López, D., Gutiérrez, A., Esqueda, M. (2013). Cinética de crecimiento y composición química del micelio de. *Revista Mexicana de Micología*, 37, 51–59. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S018731802013000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018731802013000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Maity P., Sen I., Chakraborty I., Mondal S, Bar H, Bhanja S., Mandal S, Nath G. (2021). Biologically active polysaccharide from edible mushrooms: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. Volume 172. 408-417. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.081>
- Miles, P. G., & Chang, S.-T. (2004). Mushrooms : Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. <https://doi.org/10.1201/9780203492086>
- Mubbasher Sabir, S., Hayat, I., & Dilnawaz Ahmed, S. (2003). Estimation of sterols in edible fats and oils. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2(3), 178–181. <https://doi.org/10.3923/pjn.2003.178.181>
- Okuda, Y. (2022). Sustainability perspectives for future continuity of mushroom production: The bright and dark sides. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.1026508>
- Özdemir, S., Heerd, D., Quitmann, H., Zhang, Y., Fraatz, M. A., Zorn, H., & Czermak, P. (2017). Process parameters affecting the synthesis of natural flavors by shiitake (*Lentinula edodes*) during the production of a non-alcoholic beverage. *Beverages*, 3(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/beverages3020020>
- Petre, M., Petre, V. (2015). Biotechnology of mushroom growth through submerged cultivation. *Mushroom Biotechnology: Developments and Applications*, 1–

15. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802794-3.00001-1>
- Prajapati D., Bhatt A., Gupte S., Gupte A. Mushroom secondary metabolites: chemistry and therapeutic applications. *IJPSR*, 2021; 12(11): 5677-5689. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.12\(11\).5677-89](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.12(11).5677-89)
- Rahman, M. A., Abdullah, N., & Aminudin, N. (2018). *Lentinula edodes* (shiitake mushroom): An assessment of in vitro anti-atherosclerotic bio-functionality. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(8), 1515–1523. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.021>
- Smiderle, F. R., Olsen, L. M., Ruthes, A. C., Czelusniak, P. A., Santana-Filho, A. P., Sasaki, G. L., Gorin, P. A. J., & Iacomini, M. (2012). Exopolysaccharides, proteins and lipids in *Pleurotus pulmonarius* submerged culture using different carbon sources. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 368–376. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.063>
- Suárez, C. (2012). Utilización de la fermentación líquida de *Lentinula edodes* (shiitake), para la producción de metabolitos secundarios bioactivos y evaluación de su potencial empleo en la producción de un alimento funcional. In Universidad Nacional de Colombia. <http://bdigital.unal.edu.co/8989/1/01107463.2012.pdf>
- Wasser, S. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60, 258–274 <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1076-7>.
- Vega-Oliveros, C., Chegwin-Angarita, C., Ardila-Barrantes, H. D. (2019). Conditions for protein analysis of *Lentinula edodes* mycelium obtained from liquid state fermentation. *Revista Colombiana de Química*, 48(3), 3–12. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v48n3.74843>
- Xu, X., Yan, H., Chen, J., & Zhang, X. (2011). Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnology Advances*, 29(6), 667–674. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.003>.