UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

"Extracción, Purificación y Cuantificación de Metabolitos de mutantes de *Ustilago maydis* (Stevenson and Jonhson 1944) *(Ustilaginales, Ustilaginacea*)"

POR

QBP. GABRIELA SÁNCHEZ CASTILLO

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

2023

"Extracción, Purificación y Cuantificación de Metabolitos de mutantes de *Ustilago maydis* (Stevenson and Jonhson 1944) *(Ustilaginales, Ustilaginacea)*"

Comité de Tesis

Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal
Presidente

MC. Juan Manuel Adame Rodríguez
Secretario

Dr., Sergio Arturo Galindo Rodríguez
Vocal

Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna
Vocal

Dra. Itzá Eloísa Luna Cruz
Vocal

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO

Dra. Karushka Arévalo Niño
Subdirector de Posgrado

"Extracción, Purificación y Cuantificación de Metabolitos de mutantes de *Ustilago maydis* (Stevenson and Jonhson 1944) *(Ustilaginales, Ustilaginacea*)"

Director de Tesis

Dra. Elva teresa Aréchiga Carvajal
Director

DERECHOS RESERVADOS©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Programa SEP-CONACY, No. 252373.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-México) por el apoyo brindado durante la realización de este proyecto, porque gracias a esto fue posible para mi dedicarme a el desarrollo de mi educación finalizada con el CVU 1006464..

Agradezco a la Universidad autónoma de Nuevo León, por permitirme matricularme 1529094, para cumplir mis metas de vida.

Agradezco a la Facultad de Ciencias Biológicas, esta institución de enorme calidad, que me brindó todo el apoyo durante el desarrollo de mi maestría. Quiero agradecerle a mi asesora de tesis, la Doctora Elva Teresa Aréchiga Carvajal, por creer en mi potencial para desarrollar el proyecto, por apoyarme, comprenderme y por su amistad.

Agradezco enormemente a todos mis amigos que me ayudaron en el desarrollo del proyecto,a Mares, por compartirme su conocimiento, por brindarme su amistad siempre, por ayudarmea ver y comprender, no solo del proyecto si no en visión de vida, también quiero agradecerles a Juan y a Katia, por todo el apoyo , por aguantarme toda la maestría en mis altas y bajas, por hacerme reír y compartir entre los 4 la hora de cafecito , por apoyarme con mis experimentos dándome su guía y conocimientos, a los 3 los aprecio mucho y les agradezco infinitamente amigos, pues cuandonecesite una mano ustedes me brindaron dos.
A mis compañeros de maestría Cristina, Saul, Ceci, Ana Karen, Enrique, Oscar, Esteban y Nancy, quiero agradecer por apoyarme, ya fuera prestándome algún reactivo, algún equipo o alguna instrucción, por los momentos de risa y de frustración que compartimos como grupo, les agradezco y les deseo mucho éxito.

Agradezco al laboratorio de la Dra. Patricia Tamez, al laboratorio de la Dra. Norma L. Heredia y el Dr. José Santos G. y al laboratorio del Dr. Moisés Franco Molina que me prestaron muchas veces equipos desde una balanza a una centrifuga, sin estos muchas vecesme habría truncado el avanzar con mi proyecto.

Agradezco infinitamente a mis padres Mario y Silvia, por su apoyo, con el que eh logrado tantos sueños, por enseñarme a luchar por lo que uno quiere, por su cariño y amor siempre.

Agradezco a Dios por permitirme estar aquí hoy dando fin al proyecto.

Y, por último, pero no menos importante, quiero agradecerme a mí por vencer el autosabotaje y lograr avanzar en la vida.

DEDICATORIA

Este proyecto se formó gracias a la colaboración de muchos amigos que me brindaron su apoyo, por esto le dedico principalmente mi trabajo a la colaboración científica.

A mi familia, mis padres Silvia y Mario, a mis hermanos Vivian y Mario, este proyecto no se habría realizado sin ustedes en cada paso de mi vida.

A mis sobrinos Maximiliano y Miranda, quiero que sepan que lo que se propongan lo pueden lograr, no siempre lo lograran solos, se ocupa gente que te apoye, crea en ti y te guie, pero la voluntad propia te llevara lejos, los amo.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS ..... **i**
DEDICATORIA ..... **iii**
ÍNDICE ..... **iv**
INDICE DE TABLAS ..... **v**
ÍNDICE DE FIGURAS ..... **vi**
RESUMEN ..... **x**
ABSTRACT ..... **xi**
INTRODUCCIÓN **1**
ANTECEDENTES **4**
4.1 Bioproductos 4
4.1.1 Clasificación de bioproductos (Shan et *al*. 2020). 4
4.2.1 Exopolisacáridos 7
4.2.3 Biopolímeros Microbianos 8
4.2.4 Biopolímeros Fúngicos 8
4.3.1 Biosurfactantes 11
4.3.2 Clasificación de biosurfactantes 12
4.3.3 Glucolípidos 13
4.3.3.1 Ramnolípidos 14
4.3.3.2 Trehalolípidos 14
4.3.3.3 Soforolípidos 14
4.3.3.4 Lípidos de manosileritritol 15
4.4 Ustilago maydis 16
JUSTIFICACIÓN **20**
HIPÓTESIS **21**
OBJETIVO **22**
MATERIAL Y MÉTODOS **23**
DISCUSIÓN **39**
PERSPECTIVAS **44**
BIBLIOGRAFÍA **45**

INDICE DE TABLAS

Tabla No	Titulo	Pagina
1	Biopolímeros polisacáridos con características funcionales para la industria (Harada et al. 1968; Kulicke et al. 1982; Barrér et al. 1986; Daniel et al. 1994; Wan et al. 2004; Hassan et al. 2005; Chang et al. 2006; Adibkia 2007; Chang 2016).	22
2	Clasificación de biosurfactantes (Khan et al. 2014; Jiménez-Peñalver 2019).	29
3	El índice de emulsificación (% de IE) se midió en el sobrenadante en diferentes horas de cultivo FMA2 y U. maydis WT (FB2) y TX-100 y Solución 1 x 101 de TX-100 en agua destilada como control. El porcentaje medido con Xileno.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No	Titulo	Pagina
1	Figura 1. Estructuras químicas generales de los glicolípidos microbianos. (Yañez y Wong 2013).	30
2	Estructura general de los lípidos manosileritritol (MEL). MEL-A: R1 / R2 = acetil-; MEL-B: R1 = acetilo-, R2 = H; MEL-C: R1 = H, R2 = acetil-; MEL-D: R1 / R2 = H (Silva et al. 2020).	31
3	Estructuras químicas de (A) Ácidos ustilágicos y (B) Ustilípidos (Hewald et al. 2005).	34
4	Figura 4. Microscopia del biopolímero deshidratados. A) Biopolímero seco en placa Petri previo a tratamiento de purificación microscopia 40x. B) Biopolímero después del tratamiento de purificación microscopia 40x.	44
5	Comparación de la producción del biopolímero en peso seco a diferentes periodos de incubación de la cepa BMA2 (Aréchiga y colaboradores 2005).	44
6	Comparación de la Viscosidad aparente a diferente tiempo de incubación de las cepas BMA2 y FB2 (Aréchiga y col. 2005).	45
7	Caracterización de la digestión de β-glucanos. Cromatografía en capa fina realizada después de la digestión enzimática de 10 h y 24 h del biopolímero recuperado en MM pH9 con BMA2 a 72h de cultivo. Carril G-: glucosa sin tratamiento enzimático, Carril B-: biopolímero sin digestión enzimática, Carril G+: glucosa con tratamiento enzimático 10 h, Carril B+: biopolímero con tratamiento enzimático 10 h, Carril G2+ glucosa con tratamiento enzimático 24h y Carril B2+ biopolímero con tratamiento enzimático 24h.	45
8	Efecto del pH, fuente de carbono y de nitrógeno sobre la producción del biopolímero β-1-3 Glucano con las cepas U. maydis WT y BMA2. A: Sacarosa y urea a pH 3, 6 y 9; B: Dextrosa y urea a pH 3, 6 y 9; C: Sacarosa y Nitrato e amonio a pH 3, 6 y 9; D: Dextrosa y Nitrato de amonio a pH 3, 6 y 9.	46
9	Efecto del pH, fuente de carbono y de nitrógeno sobre la Viscosidad aparente del medio libre de células a 72 h de incubación a 28°C con las cepas U. maydis WT y BMA2. A: Dextrosa y Nitrato de amonio a pH 3, 6 y 9; B: Dextrosa y Urea a pH 3, 6 y 9; C: Sacarosa y Nitrato de Amono o Nitrato de Potasio a pH 3, 6 y 9 y D: Sacarosa y Urea a pH 3, 6 y 9	47
10	Microscopia de cultivo de FMA en medio YEPS a las 96 h, con presencia de los Glicolípidos insolubles (Escala 10 µm).	48
11	Actividad inhibitoria (mm) con los extractos obtenidos de Δnrg1 en medio YEPS a 24 h,48 h, 72 h y 96 h.	
12	Cromatografía en capa fina de extractos obtenidos de la cepa FMA2 en el medio de cultivo YEPS a diferentes periodos de incubación. Las flechas indican diferentes fracciones de Manosileritritol (MEL) y ácidos ustilaginicos (UA) (Hewald et al. 2005).	50

13 Índice de Emulsificación (%) a diferentes pH, fuentes de carbono y de nitrógeno sobre sobre el en los cultivos de las cepas U. maydis WT y FMA. 51
14 Influencia de la composición de los medios de cultivo y pH de los extractos obtenidos de U. maydis WT, FMA y BMA sobre la Actividad inhibitoria de E. coli. A: Extracto de Levadura y Sacarosa, B: Extracto de levadura y Dextrosa, C: Dextrosa y Nitrato de Amono o Nitrato de Potasio, D: Dextrosa y Urea, E: Sacarosa y Nitrato de Amono o Nitrato de Potasio y F: Sacarosa y Urea 52
15 Cromatografía en capa fina para observar el efecto de las diferentes composiciones del cultivo (fuente de C, N y pH), en la producción de Glicolípidos. Carril A). Control: FMA2 en YEPS 96 h sin modificar, Carril B). FMA2 en YEPS pH6, Carril C). FMA2 en MM con NH4NO3 y Dextrosa pH6, Carril D). U. maydis WT YEPS en pH3, Carril E). FMA2 en MM con NH4NO3 y Sacarosa pH6, Carril F). FMA2 MM con NH4NO3 y Dextrosa pH6, Carril G). FMA2 WT YEPS pH9, Carril H). U. maydis WT YPD en pH6, Carril I). FMA2 en MM con NH4NO3 y Sacarosa pH9, Carril J). U. maydis WT YEPS en pH 6, Carril K). FMA2en MM con Urea y Sacarosa pH9, Carril L). U. maydis en MM con Urea y Sacarosa pH9, Carril M). BMA2 MM con Urea y Sacarosa pH9 (Hewald et al. 2005). 53
16 Influencia de la composición del medio de cultivo sobre el peso seco obtenido de los extractos de FMA2 y U. maydis WT. A: Extracto de Levadura y Dextrosa, B: Extracto de Levadura y Sacarosa, C: Dextrosa y Nitrato de Amono o Nitrato de Potasio, D: Sacarosa y Urea, E: Dextrosa y Urea y F: Sacarosa y Nitrato de Amono o Nitrato de Potasio. 54

LISTA DE SIMBOLOS

$1x10^5$	**100,000**
°C	**Grados centígrados**
%	**Porcentaje**
±	**Más menos**
≤	**Menor o igual**
BLAST	**Basic Local Alignment Search Tool**
c /ml	**células por mililitro**
CAS	**Registro**
CAT	**Catalogo**
cm^2	**Centímetro cuadrado**
DE	**Desviación estándar**
DNA ó ADN	**Ácido desoxirribonucleico**
EDTA	**Ácido etilendiaminotetracetico**
Fig.	**Figura**
g	**Gramo**
mg	**Miligramo**
µg	**Microgramo**
h	**Hora**
EI%	**índice de emulsificación.**
ITS	**Espaciador Transcrito Interno / Internal Transcribed Spacer**
lb	**Libra**
M	**Molar**
mA	**Miliamperes**
min	**Minutos**
ml	**Mililitros**
mM	**Milimolar**
MM	**Medio mínimo**

PCR	**Reacción en Cadena de la Polimerasa / Polymerase Chain Reaction**
pH	**Potencial de hidrogeno**
rpm	**Revoluciones por minuto**
Tm	**Temperatura de fusión / Melting temperature**
Tris	**Clorhidrato 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol**
v	**Versión**
V	**Volt**
YEPS	**Yeast extract, Malt extract, Sucrose**
Δ	**Delta es el valor de referencia que se usó para la viscosidad aparente.**

RESUMEN

Los «bioproductos» o productos de base biológica son materiales, productos químicos y energías derivados de recursos biológicos renovables. Por eso, en los últimos años se han buscado alternativas renovables a diferentes áreas de oportunidad en la industria. El almidón, el alginato, la goma arábiga, el carragenano, el agar y la goma guar, son polisacáridos que se emplean ampliamente en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética. Los microorganismos sintetizan polisacáridos con diferentes complejidades estructurales, tienen ventajas sobre los polisacáridos intracelulares y de la pared celular, desde el punto de vista económico. Estos se clasifican en diferentes grupos de acuerdo con su afinidad sistemática, estructura, composición de azúcar e incluso, tipo de enlaces.Otro bioproducto que los microorganismos producen son los compuestos anfipáticos, estos son moléculas microbianas extracelulares que disminuyen la tensión superficial y las tensiones interfaciales en una superficie, estos compuestos ayudan a establecer emulsiones entre dos fases líquidas inmiscibles.

Ustilago maydis es un hongo dimorfo basidiomiceto, es el agente causal del carbón común del maíz. Como otros hongos *Ustilago maydis* tiene la capacidad de sintetizar tensoactivos naturales extracelulares (glicolípidos): lípidos o ustilípidos de manosileritritol (MEL) ylípidos celobioses también conocidos como ácido ustilagico. Ustilago maydis, como muchos otros basidiomicetos produce β-glucanos.

La mutante BMA2 (ΔRim10) es productora de un betaglucano que al parecer no se deposita en su pared, sino que se excreta al medio. Produce 12 mg/ml en 50 ml de medio MM a pH7 cultivado a 28°C en 120 rpm por 72 h. En este proyecto estandarizamos la producción reportada por Aréchiga-Carvajal & colaboradores (2005), así como optimizamos la producción de 18 mg/ml del betaglucano al cambiar la fuente de nitrógeno de Nitrato de potasio a Urea y controlar el pH a 6. La mutante FMA2 que Sánchez- Arreguin (2021) reporta con desregulaciones en el clúster de lípidos manosileritritol, es una cepa que produce MELS y UA desde las primeras 24 h de cultivo en 50 ml de medio YEPS sin control de pH cultivada a 28°C, con un máximo de producción a las 96 h de cultivo, que a las 96h el extracto de MELS a partir del medio de cultivo presenta capacidad inhibitoria del crecimiento de E. coli y un índice de emulsificación de 54%. Al cultivar FMA2 (-Nrg1) a pH6 en medio YEPS, la capacidad inhibitoria del extracto se mantuvo y obtuvo un índice de emulsificación de 59%.

ABSTRACT

"Bioproducts" or biobased products are materials, chemicals and energy derived from renewable biological resources. For this reason, in recent years, renewable alternatives have been sought in different areas of opportunity in the industry. Starch, alginate, gum arabic, carrageenan, agar, and guar gum are polysaccharides that are widely used in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries. Microorganisms synthesize polysaccharides with different structural complexities, called exopolysaccharides, they have advantages over intracellular and cell wall polysaccharides, from the economic point of view. These are classified into different groups according to their systematic affinity, structure, sugar composition, and even type of bonds. Another bioproduct that microorganisms produce are amphipathic compounds; these are extracellular microbial molecules that lower surface tension and interfacial tensions. on a surface, these compounds help to establish emulsions between two immiscible liquid phases. *Ustilago maydis* is a basidiomycete dimorphic fungus, it is the causative agent of corn smut. Like other fungi, *Ustilago maydis* can synthesize natural extracellular surfactants (glycolipids): mannosylerythritol (MEL) lipids or ustilipids, and cellobiose lipids also known as ustilagic acid. *Ustilago maydis*, like many other basidiomycetes, produces β-glucans.

The BMA2 mutant (ΔRim10) produces a beta-glucan that apparently is not deposited in its wall but is excreted into the medium. Produces 12 mg/ml in 50 ml of MM medium at pH7 grown at 28°C at 120 rpm for 72 h. In this project we standardized the production reported by Aréchiga-Carvajal & collaborators (2005), as well as we optimized the production of 18 mg/ml of beta-glucan by changing the nitrogen source from Potassium nitrate to Urea and controlling the pH to 6. The mutant FMA2 that Sánchez-Arreguin (2021) reports with deregulations in the mannosylerythritol lipid cluster, is a strain that produces MELS and UA from the first 24 h of culture in 50 ml of YEPS medium without pH control grown at 28°C, with a maximum production at 96 h of culture, which at 96 h the MELS extract from the culture medium shows inhibitory capacity for E. coli growth and an emulsification index of 54%. When cultivating FMA2 (-Nrg1) at pH6 in YEPS medium, the inhibitory capacity of the extract was maintained and an emulsification index of 59% was obtained.

INTRODUCCIÓN

La producción microbiana de productos químicos se ha centrado tradicionalmente en un único microorganismo a fin de permitir la bioconversión completa del sustrato al producto final . Los principales obstáculos en la aplicación industrial de bioproductos son la capacidad para cultivar y producir de manera estandarizada los bioactivos de interés. La propuesta actual es disminuir estos obstáculos mediante la aplicación de técnicas genéticas modernas, como la transformación de organismos con genes codificadores de metabolitos y/o pertenecientes a rutas metabólicas de importancia biológica, está superando estos obstáculos y podría ampliarse para la producción industrial.

Como resultado de modificaciones genéticas en *Ustilago maydis* se han generado mutantes con características que podrían facilitar la producción de distintos productos bioactivos. Aréchiga y colaboradores (2005), al modificar a *U. maydis* en la ruta pal/Rim obtuvo mutantes que expresan una desregulación en la producción de EPS. Fonseca y colaboradores (2011), logró caracterizar el biopolímero producido por la cepa Δrim13: cbx interrumpida en el gen Rim13, corroborando una producción desregulada de un biopolímero de interés en la industria farmacéutica /alimenticia (β-D-glucano). Hewald y colaboradores (2005), identifico los genes del clúster para la biosíntesis de lípidos de manosileritritol (tensoactivo natural) en *Ustilago maydis* y recientemente Sánchez- Arreguin y colaboradores (2021), interrumpieron el gen NRG1 en *U. maydis*, y observaron una producción desregulada de unemulsificante.

En este proyecto se utilizaron dos mutantes de *U. maydis* (BMA:a2b2 Δrim101::hyg (Aréchiga 2005) y FMA2::a2b2Δnrg1::Cbx (Sánchez- Arreguin et *al*. 2021), con el fin de utilizar las características de estas cepas, como ventaja para la producción desregulada de un polisacárido y un biosurfactante.

Los bioproductos o productos de base biológica son materiales químicos derivados de recursos biológicos renovables, que en los últimos años se han buscado como alternativas en diferentes áreas comerciales. La producción y el consumo de bioproductos crea oportunidades de trabajo, reducen la extracción y el consumo de combustibles fósiles y los impactos ambientales perjudiciales asociadas con él, mitigando así la dependencia social a dichos recursos. Expandir la industria con bioproductos tendría una variedad de impactos

positivos. La barrera clave para lograr estos impactos positivos es la falta de conocimiento sobre los factores que impiden o permiten que los bioproductos lleguen al mercado comercial y la falta de capital de riesgo para generar esta información.

A) Polisacaridos:

Los polisacáridos son monosacáridos ligados entre sí por enlaces glucosídicos. No solo tienen diferentes secuencias de unidades monoméricas, sino que también tienen diferentes secuencias de enlaces glucosídicos y diferentes tipos de ramificación. Todos estos factores juntos otorgan una gran diversidad de estructura, propiedad y funciones.

Entre las tres clases principales de polisacáridos microbianos, los EPS tienen ventajas sobre los polisacáridos intracelulares y de la pared celular, incluida una gran producción en poco tiempo, fácil aislamiento y purificación.

Los productores de EPS microbianos incluyen eucariotas y procariotas. Existen EPS fúngicos que ya son de uso comercial producidos por especies como *Aspergillus niger, Fusarium solani, Botryosphaeria rhodina, Coriolus versicolor, Ustilago maydis,* etc. Si bien los microbios pueden variar sustancialmente en su fisiología, el rendimiento en producción de EPS depende en gran medida de la optimización del crecimiento a partir de la variación de parámetros físicos / biológicos que influyen en el crecimiento. A partir de esto, se puede diseñar meticulosamente las características y contenidos de los medios de producción. Por ello, el conocer las propiedades estructurales, biológicas y el proceso de fermentación de los EPS microbianos con prospección biotecnológica, es muy importante para comprender sus actividades fisiológicas y al final del camino, su competitividad.

Los polisacáridos fúngicos son objeto de investigación en muchos campos de la ciencia, se clasifican en diferentes grupos de acuerdo con su afinidad sistemática, estructura, tipos de azúcar, tipo de enlaces entre los monómeros, etc.

Por otro lado, los microorganismos también producen compuestos anfipáticos con fracción hidrofóbicas e hidrofílicas, estos son compuestos microbianos extracelulares que disminuyen la tensión superficial y las tensiones interfaciales, este tipo de compuestos les permite absorber nutrientes hidrofóbicos y mejoran la fijación en superficies no polares. Ayudan a

formar emulsiones entre dos fases líquidas inmiscibles. Las propiedades químicas y la actividad biológica de estos tensoactivos naturales ha permitido su aplicación generalizada en las industrias alimentaria y química, pero también en la protección del medio ambiente y como agentes de biocontrol.

B) Tensoactivo: Los tensoactivos microbianos se pueden clasificar de acuerdo con la estructura química**.** Los glucolípidos son carbohidratos que se asocian con ácidos grasos hidroxilo o ácidos grasos de cadena larga conectados con un grupo éster o éter, están compuestos de mono u oligosacáridos con una parte lipídica (Jala et *al.* 2022)

ANTECEDENTES

4.1 Bioproductos

Los bioproductos o productos de base biológica son materiales, productos químicos y energías derivados de recursos biológicos renovables, por ello, en los últimos años se han buscado alternativas renovables a diferentes áreas de oportunidad en la industria. Gracias a el avance científico respecto a la fisiología de microorganismos, se han reportado un gran número de alternativas para satisfacer o mejorar productos que cumplan con las necesidades de la sociedad. La producción e introducción en el mercado de bioproductos crean oportunidades de trabajo, reducen la extracción y el consumo de combustibles fósiles y los impactos ambientales perjudiciales (por ejemplo, la destrucción del hábitat de la vida silvestre, la contaminación del aire y del agua, y el efecto invernadero por emisiones de gases) asociadas con él. Expandir la industria con bioproductos tendría una variedad de impactos positivos. La barrera clave para lograr estos impactos positivos es la falta de conocimiento sobre los factores que impiden o permiten que los bioproductos lleguen al mercado comercial (Goettel et *al.* 2008; Bonaterra et *al*. 2012; Liang et *al*. 2018; Shan et *al*. 2020).

4.1.1 Clasificación de bioproductos (Shan et *al*. 2020).

En la actualidad no existe un sistema de clasificación completamente aceptado para los bioproductos, en general se podrían separar en categorías como: a) Bioquímicos: Los productos bioquímicos se refieren a productos químicos industriales refinados a partir de materiales de biomasa o sintetizados con esos intermedios de base biológica, b) Biopolímeros: se refieren a materiales poliméricos sintetizados industrialmente que consisten en largas cadenas de unidades de construcción repetidas y unidas covalentemente derivadas originalmente de la biomasa, como el ácido poliáctico (PLA) (Li et *al*.2001), c) Bioadhesivos: se refieren al pegamento y los productos de cemento originados por biomasa (los llamados adherentes) capaces de mantener dos sustratos juntos a través de la fijación de la superficie y transferir la fuerza mecánica de un sustrato al otro, un ejemplo es la goma Guar (Andrade et *al*. 2010), d) Biomedicinas: Son compuestos de competencia farmacéutica y materiales terapéuticos fabricados, extraídos o semi - sintetizados con fuentes biológicas, el quitosan (Pochana 2002) es un ejemplo; e) Bioplaguicidas: se pueden dividir en pesticidas

bioquímicos (sustancias naturales capaces de controlar las plagas mediante mecanismos no tóxicos), pesticidas microbianos (compuestos por microorganismos capaz de suprimir plagas), y protectores incorporados a las plantas (producidos en plantas genéticamente modificadas) (Cerda et *al*. 2019).

4.2 Biopolímeros (polisacáridos)

Los carbohidratos (hidratos de carbono) son aldehídos o cetonas con múltiples grupos hidroxilo, constituyen la mayor parte de la materia orgánica de la tierra debido a sus funciones. Estos compuestos orgánicos evolutivos y biológicamente importantes están presentes en la Tierra en diferentes formas. En función del número de unidades de azúcar se pueden clasifican como: oligosacáridos y polisacáridos. Se conocen como polisacáridos a las macromoléculas naturales compuestas de varias unidades de monosacáridos (más de diez), que se sintetizan en diferentes etapas del ciclo de vida de cada organismo vivo para diferentes propósitos (Peña et *al*. 2007; Mahapatra y Banerjee, 2013).

Los polisacáridos, también conocidos como glucanos, son monosacáridos ligados entre sí por enlaces glucosídicos. Se clasifican como homopolisacáridos o heteropolisacáridos si presentan un solo tipo de azúcar en su estructura o más. No solo tienen diferentes secuencias de unidades monoméricas, sino que también tienen diferentes secuencias de enlaces glucosídicos y diferentes tipos de ramificación. Pueden ser amorfos o incluso insolubles en agua. Todos estos factores juntos les dan a los polisacáridos una gran diversidad de estructura, propiedad y funciones. Los homopolisacáridos pueden clasificarse a su vez según la identidad de su unidad monomérica. Por ejemplo, los glucanos son polímeros de glucosa, mientras que los galactanos son polímeros de galactosa. Aunque las secuencias de monosacáridos de los heteropolisacáridos en principio pueden ser tan variadas como las de las proteínas, suelen estar compuestas por solo algunos tipos de monosacáridos que alternan una secuencia alternativa. Al contrario de las proteínas y los ácidos nucleicos, forman polímeros ramificados y lineales. La mayoría de los polisacáridos son lineales y los que están ramificados lo hacen solo de algunas formas que han sido bien caracterizadas (Peña et *al*. 2007; Voet 2006; Mahapatra y Banerjee 2013).

En la naturaleza se encuentra ampliamente extendida la producción de polisacáridos, se ha encontrado en bacterias, algas, plantas superiores y animales. Estos polímeros de cadena larga y alto peso molecular, como el almidón, el alginato, la goma arábiga, el carragenano, el agar y la goma guar, se emplean ampliamente en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética, ya que se ven involucradas en actividades biológicas y farmacológicas importantes, incluida la inmunoestimulación y como antitumoral, antiviral, antiinflamatoria, antiulcerosa antioxidante e incluso como reguladores de la actividad biológica (Mahapatra y Banerjee 2013; Kan et *al.* 2019, Xu et *al.* 2019).

Los microorganismos poseen la capacidad de sintetizar polisacáridos con diferentes complejidades estructurales, estos permanecen unidos a la superficie celular o se encuentran en el medio extracelular. Muchas propiedades de los PS ya han sido confirmadas y la lista de funciones postuladas continúa creciendo. Entre las tres clases principales de polisacáridos microbianos, los EPS tienen ventajas sobre los polisacáridos intracelulares y de la pared celular, incluida una gran producción en poco tiempo, fácil aislamiento y purificación. (Mahapatra y Banerjee 2013; Osinska-Jaroszuk 2015).

Tabla 1. Biopolímeros polisacáridos con características funcionales para la industria (Harada et al. 1968; Kulicke et al. 1982; Barrér et al. 1986; Daniel et al. 1994; Wan et al. 2004; Hassan et al. 2005; Chang et al. 2006; Adibkia 2007; Chang 2016)

Biopolímero	Composición	Características
Celulosa	*β-(1-4)-* D *-glucosa* enlaces	- Hidrofílico - Propiedades dependen en la cadena longitud
Almidón	D *-glucosa residuos* vinculado por *enlaces α- (1, 4) glucosídicos*	- Soluble calentado agua - Viscoso, formación de gel.
Quitosano	*P-(1,4)-2-amino-2-desoxi-* D *-glucosa*	- Soluble en ácido disolventes - Bioadhesivo por (-) cargado superficies - Biodegradable
Xantana	$C_{35}H_{49}O_{29}$	- Alto viscosidad
Curdlan	$(C_6H_{10}O_5)_n$	- Formación de gel a través de calefacción en acuoso soluciones
Betaglucano	D -glucosa monómeros vinculado por enlaces *β-*	- Capaz de dar inmunidad activa en humanos - Capacidades absorción de colesterol
Poliacrilamida	(C_3H_5NO)	- Formación gel - Espesante

En otros casos, los productos microbianos tienen estructuras inusuales moleculares y conformaciones peculiares que les confieren propiedades únicas y potencialmente interesantes con posibles usos industriales.

4.2.1 Exopolisacáridos

Los EPS son biopolímeros que contienen principalmente carbohidratos, se definen por el método de separación / extracción utilizada, contienen no solo exudados de compuestos poliméricos de alto peso molecular, sino también productos de lisis celular e hidrólisis de macromoléculas. Los EPS microbianos con alto peso molecular y estructura variable son producidos y liberados en el ambiente externo por algunos microorganismos (Hussien 2019).

Existen EPS que por estudios en el área de biotecnología alimentaria se consideran prebióticos, por su naturaleza son biocompatibles y biodegradables, altamente hidrófilos, lo que indica la posibilidad de utilizarlos como pseudoplásticos en agua. Estas características reológicas indican que son buenos candidatos en diferentes industrias debido a que la viscosidad juega un papel importante en la aplicación a cosméticos, alimentos etc., además de ser útiles en la industria farmacéutica debido a sus particulares propiedades físicas y químicas como que modifican de la textura, capacidad de sustituir estabilizantes y emulsionantes, algunos EPS tienen propiedades biomédicas debido a su estructura molecular, pues esto les permite interactuar con diferentes receptores y transportadores en tratamientos contra el cáncer (Tabernero y Cardea, 2020).

En la actualidad, se ha explorado el uso una gran cantidad de EPS comerciales de origen microbiano como posibles biomateriales, algunos de ellos son el dextrano, pululano, alginato, curdlán, xantana y gellán (Sarwat et *al.* 2008; Fuji *et al.* 2009; Jiang et al. 2010; Kuo *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2018, Ostos-Ortíz 2019); abriendo la posibilidad de que tengan un papel importante en diferentes industrias de importancia económica.

4.2.3 Biopolímeros Microbianos

Los productores de biopolímeros microbianos incluyen eucariotas (fitoplancton, hongos, algas) y procariotas (eubacterias y arqueobacterias). De entre las bacterias productoras de EPS mejor estudiadas están: *Leuconostoc mesenteroides, Xanthomonas campestris, Acinetobacter calcoaceticus, Lactobacillus sp*. y *Alkaligenes sp*. Algunos EPS-fúngicos prominentes son producidos por *Aspergillus niger, Lentinula edodes, Fusarium solani, Botryosphaeria rhodina, Coriolus versicolor, Ustilago maydis, etc.*, y también se han puesto en uso comercial. Si bien los microbios pueden variar sustancialmente en su fisiología, la producción de EPS depende en gran medida de la optimización del crecimiento, lo cual se logra variando varios parámetros que influyen en el metabolismo de su síntesis y el diseño meticuloso de sus medios de producción (Mahapatra y Banerjee, 2013; Osinska-Jaroszuk, 2015; Ostos-Ortíz 2019).

Las funciones notables de los EPS en los microorganismos implican: agregación de células, formación de biopelícula, adhesión superficial, comunicación célula-célula, retención de agua, barrera protectora, actividad enzimática, fuente de nutrientes, lo cual confiere protección contra la desecación celular, inanición, depredación por protozoos, fagocitosis, biocidas oxidantes, algunos antibióticos, radiación UV y estrés ambiental como temperatura, pH extremo, sustancias tóxicas, desinfectante (Mahapatra y Banerjee 2013; Osinska-Jaroszuk, 2015; Xu *et al*. 2019).

Conocer las propiedades estructurales, biológicas y el proceso de fermentación de los EPS microbianos con características de interés biotecnológico, es muy importante, ya que, al comprender sus actividades fisiológicas elevamos las posibilidades de escalamientos y se facilita el proceso de transferencia de tecnología su aplicabilidad industrial.

4.2.4 Biopolímeros Fúngicos

Los polisacáridos (PS) fúngicos son objeto de investigación en muchos campos de la ciencia, se clasifican en diferentes grupos de acuerdo con su afinidad sistemática, estructura (lineal y ramificada), composición de azúcar (homopolisacáridos y heteropolisacáridos), tipo de enlaces entre los monómeros (β- (1-3), β - (1-6), y α- (1-3)) y su ubicación en la célula (PS de la pared celular, exoPS y endoPS). Dentro de los glucanos fúngicos más conocidos se destacan la escleroglucana y pululano sintetizados por *Sclerotium rolfsii* y *Aureobasidium*

pullulans respectivamente (Queiroz y Fontes, 2008). El Pullulano es un α-glucano lineal, con propiedades valiosas que incluyen alta resistencia mecánica y adhesividad (Cheng et *al.* 2011; Prajapati et *al.* 2013). Es comercializado por HayaShibara Co., Ltd. (Japón), como agente espesante y recubrimiento comestible.

La producción de PS a partir de hongos depende principalmente del tipo de cepa fúngica utilizada, las condiciones físicas y su variabilidad durante la fermentación y el tipo de componentes que se encuentran en los medios de producción. Las cepas fúngicas que producen EPS en la actualidad son un número considerable de hongos, incluidos basidiomicetos superiores, hongos filamentosos inferiores y levaduras de diferentes nichos ecológicos. La síntesis de los EPS ocurre intracelularmente y se secretan a los alrededores. La mayoría de las investigaciones sobre los EPS fúngicos se han enfocado en la optimización del medio de cultivo y las condiciones para producción en diferentes cepas de hongos. El estudio de las vías de biosíntesis de los EPS de interés industrial sigue siendo investigado, pero existen solo algunos EPS fúngicos cuya vía ya se ha reportado, en *Ganoderma lucidum* (un hongo utilizado en la medicina tradicional china), al ser cultivado con lactosa en un biorreactor se presenta la actividad de la *β*-galactosidasa elevada, lo que implica la existencia de un sistema de lactosa permeasa encendido inducido por lactosa también aumentó la actividad de la *α*-fosfoglucomutasa (catalizando la transformación de la glucosa-1-fosfato al carbono 6 de la glucosa-6-fosfato) lo que genera la acumulación de EPS (Tang 2002). Las condiciones de cultivo reportadas en diferentes estudios concuerdan en que el subcultivo sumergido líquido para la producción de EPS fúngico es la mejor opción, así como otros parámetros como la oxigenación, agitación de cultivo, la temperatura, la aeración, fuente C y N y el pH reflejan un impacto directo en el aumento de la producción de los EPS. (Sandford 1979; Shu y Lung, 2004; Xu y Yun, 2004; Lim *et al.* 2004; Kim *et al*. 2005; Abdel-Aziz *et al.* 2012; Mahapatra y Banerjee, 2013).

A su vez han reportado distintas aplicaciones biotecnológicas (en biomedicina, biopolímeros, bioadhesivos y bioplaguicidas) para los PS fúngicos. Por su bioactividad se estudian propiedades antioxidantes de los compuestos fúngicos, representados principalmente por compuestos fenólicos, *β*-tocoferol y *β*-caroteno, complejos de proteínas endoPS y EPS (Palacios et *al*. 2011).

Esta actividad antioxidante asignada a los PS consiste en la quelación de iones ferrosos Fe^{2+} o la prevención de la reacción de Fenton, la inhibición de la peroxidación de lípidos, así como la mejora de la actividad enzimática del sistema antioxidante como el superóxido dismutasa, la catalasa o el glutatión peroxidasa (Kozarski et *al.* 2014).

La elección de un método adecuado de extracción de los complejos PS y PS-proteína, especialmente el tipo de solventes aplicados afecta la actividad antioxidante de las preparaciones purificadas, las propiedades antibacterianas de los EPS fúngicos, especialmente las de cepas de Basidiomycota. El EPS de *Ganoderma applanatum* mostró propiedades antibacterianas contra *Staphyloccoccus aureus* y un efecto tóxico contra las células *Vibrio fischeri*, la vía de efecto toxico sigue en descripción, pero al realizar estudios FT-IR se ha sugerido que sea debido a las fracciones similares a antibióticos aminoglucósidos conocidos, en las muestras investigadas (Osinska-Jaroszuk et *al.* 2014).

Las actividades de inmunomoduladores e inmunoestimulantes de los PS fúngicos confieren propiedades antitumorales mediante la unión de β-glucanos con enlaces glucosídicos β(1→3). La acción de PS implica principalmente la estimulación de macrófagos y células dendríticas (Kim et *al.* 2010) para la producción de varios tipos de citocinas, incluidas TNF-a, IFN-c e IL-1b, y la estimulación de células NK, T y B, que está relacionado con la inhibición del crecimiento de células cancerosas (Lindequist et *al.* 2005; Lee et *al.* 2010: Kim et *al.* 2010).

Otra propiedad farmacológica de los EPS de hongos es la capacidad de reducir el nivel de colesterol y el contenido de lípidos en la sangre. Debido a que se ha comprobado que el consumo de glucanos fúngicos induce una mayor excreción de ácidos biliares y ácidos grasos de cadena corta, este proceso inhibe la incorporación de acetato a los lípidos del suero, un sustrato requerido para la síntesis de esteroles y ácidos grasos. Esto probablemente esté relacionado con las propiedades gelificantes de los glucanos, que también inhiben la absorción de colesterol y trigliceroles (Guillamon *et al.* 2010).

4.3 Surfactantes

Los surfactantes tienen carácter anfipático, esto les confiere propiedades que se encuentran relacionados con fenómenos interfaciales tan importantes como la emulsificación, solubilización, dispersión, detergencia, adherencia y adsorción, lo que permite un gran campo de aplicación como: la industria de jabones, detergentes, cuidado personal, farmacéuticos, agricultura, plásticos, minería, explotación petrolera y pinturas, entre otros. Es principalmente debido a su aplicación diversa y extensa que existe una creciente preocupación por sus impactos ambientales (Álvarez 2004; Singh 2018).

Los tensioactivos al ser moléculas anfipáticas comprenden restos hidrofílicos e hidrofóbicos, estos que se dividen entre interfaces líquidas con diferentes grados de polaridad y puentes de hidrógeno, como las interfaces de aceite / agua o aire / agua. La contraparte apolar es a menudo una cadena de hidrocarburos, mientras que, la polar puede ser iónica (catiónica o aniónica) o no iónica. La actividad de los tensoactivos aumenta la solubilidad de moléculas hidrofílicas, ocasionando la disminución de tensiones superficiales e interfaciales en la interfaz aceite / agua. Actualmente la mayoría de los tensioactivos utilizados en las industrias derivan químicamente del petróleo, por ende, estos agentes sintéticos son tóxicos y difíciles de descomponer mediante la acción de microorganismos (Santos 2016; Sharma 2016; Shen 2019)

4.3.1 Biosurfactantes

Los microorganismos producen compuestos que disminuyen la tensión superficial y las tensiones interfaciales (IFT), debido a su estructura anfipática, y grupos funcionales distintivos, presentan propiedades deseables para una variedad de aplicaciones, como humectabilidad, micelización, disminución de la tensión superficial y formación de microemulsiones entre dos fases diferentes. En una superficie, este tipo de compuestos les permite absorber nutrientes hidrofóbicos y mejoran la fijación en superficies no polares. Además de estas funciones más generales, algunos biosurfactantes también se unen a metales pesados, como el plomo (Pb), mercurio (Hg), arsénico (As), cadmio (Cd), cromo (Cr), zinc (Zn), cobre (Cu) y níquel (Ni). La propiedad de hacer biodisponibles este tipo de contaminantes hidrofóbicos aumenta su biodegradación mejorando la salud de los suelos contaminados.(Khan *et al*. 2008; Parizanganeh *et al.* 2010; Pacwa *et al.* 2011; Soberón y

Maier 2011; Ali y Al-Qahtani 2012 ; Luo *et al*., 2012; Amodu *et al*. 2014; Liu *et al.* 2015; Tang *et al.* 2015; Hu *et al*. 2017, Li y Qian, 2017; Liu *et al*. 2017), también muestran actividad antimicrobiana o juegan un papel importante en el desarrollo patogénico debido a la inhibición en la formación de biopelículas. La presencia de cápsula de polisacáridos en la fase saprofita protege al hongo o a la bacteria, contra varios tipos de estrés y deshidratación, además se ha demostrado que, en modelos murinos, la presencia de mutantes acapsulares de *Cryptococcus nefronans* no causan criptococosis o tienen una virulencia reducida (Decote-Ricardo *et al.* 2019). Por ello, sus propiedades químicas y la actividad biológica de estos tensioactivos naturales han provocado una aplicación generalizada en las industrias alimentaria y química, pero también en la protección del medio ambiente y como agentes de biocontrol.

Las propiedades bioactivas de los biosurfactantes aumentaron el interés de diferentes industrias ya que presentan ventajas tales como diversidad estructural, baja toxicidad, mayor biodegradabilidad, capacidad para funcionar en amplios rangos de pH, temperatura y salinidad, así como una mayor selectividad, menor concentración crítica de micelas y producción que involucra fuentes renovables / desechos y productos industriales. Esas son las razones principales por las cuales los biosurfactantes se consideran los materiales multifuncionales por excelencia en la industria (Ochoa-Loza 2001; Mulligan, 2004; Singh *et al.* 2007; Sharma *et al.* 2014; Sharma *et al.* 2015).

4.3.2 Clasificación de biosurfactantes

Los tensioactivos microbianos se identifican en ocasiones, de acuerdo con la estructura química (glicolípidos, complejo que contiene polisacárido-lípido, lipopéptidos y fosfolípidos) y su origen microbiano. También se pueden clasificar de acuerdo con su peso molecular como moléculas de alto peso y los tensioactivos de bajo peso (glicolípidos) (Rosenberg y Ron, 1999). Los biosurfactantes incluyen al menos una fracción hidrófilo y otro hidrófobo que les confiere su efecto anfipático. El resto hidrófobo contiene ácidos grasos saturados / insaturados, alcoholes y ácidos grasos, hidroxilos de una cadena de 8 o 18 átomos de carbono; El resto hidrofílico puede consistir en un éster simple, fosfato, carboxilo, grupo

hidroxilo, carbohidratos como mono, oligo o polisacáridos, y algunas veces también péptidos o proteínas (Sharma 2016).

Tabla 2. Clasificación de biosurfactantes (Khan et al. 2014; Jiménez-Peñalver 2019).

Grupo	Sub grupo	Composicion	Clases
Agentes activos de superficie con bajo peso molecular.	Glicolipidos	Mono, di, tri o tetra sacaridos + acidos grasos	Ramnolípidos, Lípidos de manosileritritol, Soforolípidos, etc.
	Lipopéptidos & Lipoproteinas	Fracción proteica unida a un ácido graso; Una corta cadena lineal o cíclica de heptapeptidos o decapeptidos unidosa una longitud de ácidos grasos variable.	Surfactina, Liquenisina, Viscosina, Péptido-lípido, etc.
	Acidos Grasos, Lipidos neutros y Fosfolipidos	Ácido carboxílico de cadena alifática, lipidos neutros, y una molécula de alcohol, a la que se unen dos ácidos grasos y un grupo fosfato	Ácido corynomycólico, Ácido spiculispórico, Fosfatidiletanolamina, etc.
Agentes activos de superficie con alto peso molecular.	Tensioactivos poliméricos	polímeros extracelulares compuestos por polisacáridos, lipopolisacáridos, proteínas, lipoproteínas o una mezcla compleja de estos	Emulsan, Biodispersante, Alsan, Liposan, etc.

4.3.3 Glucolípidos

Los glucolípidos son carbohidratos asociados con ácidos grasos hidroxilo o ácidos grasos de cadena larga conectados con un grupo éster o éter, están compuestos de mono u oligosacáridos con una parte lipídica. La parte de azúcar generalmente contiene unidades de glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa o manosa. La parte lipídica está compuesta de moléculas de ácidos grasos saturados o insaturados o de ácidos grasos hidroxilos. Los glicolípidos más estudiados son ramnolípidos, lípidos de trehalosa, soforolípidos y lípidos de manosileritritol (Sharma 2016; Santos 2016).

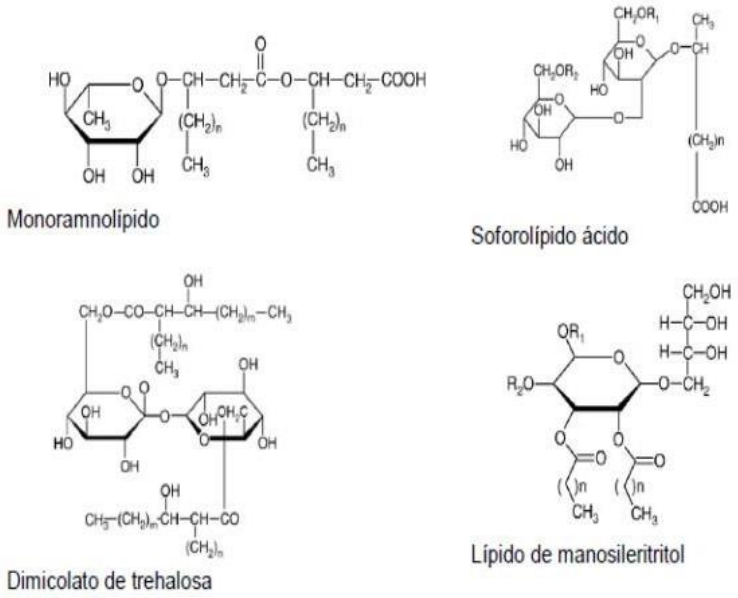


Figura 1. Estructuras químicas generales de los glicolípidos microbianos. (Yañez y Wong 2013).

4.3.3.1 Ramnolípidos

Los ramnolípidos contienen moléculas de azúcar ramnosa, presentan asociación con el ácido β-hidroxidecanoico. Su enlace glucosídico se produce entre el grupo OH de los ácidos grasos (ácido hidroxidecanoico) y la formación de enlaces éster involucran el extremo reductor del azúcar ramnosa y el grupo OH libre de otro ácido hidroxidecanoico (Abdel-Mawgoud *et al.* 2010; Saharan *et al.* 2011). Se encontraron como exoproductos del patógeno *P.aeruginosa*, pero también se han descrito en diferentes especies de bacterias pertenecientes a otras familias, clases o incluso phyla (Chrzanowski 2012; Santos 2016; Sharma 2016).

4.3.3.2 Trehalolípidos

Los trehalolípidos consisten en un disacárido de trehalosa unido a grupos de ácidos grasos por enlace éster. Se sabe que los diferentes tipos de trehalolípidos son producidos por varios microorganismos, incluidos los géneros de *Mycobacterium, Rhodococcus, Arthrobacter, Nocardia* y *Gordonia.* (Sharma 2016; Santos 2016).

4.3.3.3 Soforolípidos

Los soforolípidos están compuestos por un disacárido soforoso, β-glicosídico unido a un ácido graso hidroxilado de cadena larga. Se presenta en forma ácida, en la que la cola del ácido graso está libre, o en su forma lactónica donde el extremo carboxílico del ácido graso

está conectado a la cabeza de la soforosa por esterificación interna. Son producidos principalmente por levaduras como *Candida sp*. (Pekin *et al*., 2005; .(Sharma 2016; Santos 2016).

4.3.3.4 Lípidos de manosileritritol

Los lípidos de manosileritritol (MEL), consisten en un disacárido de manosileritritol acilado ($-COCH_3$) con ácidos grasos de cadena corta (C2 a C8) y de cadena media (C10 a C18). Dependiendo del número de grupos acetilo, los lípidos de manosileritritol pueden diferenciarse en MEL A (totalmente acetilado), MEL B y MEL C (mono acetilado en R-6 y R-4, respectivamente) y el MEL D completamente des acetilado (Fig 2). Se han identificado una variedad de especies fúngicas que son productoras de estos lípidos, como *Schizonella melanogramma*, *Candida antarctica*, *Kurtzmanomyces sp.* , *Pseudozyma aphidis* y *Ustilago maydis* (Hewald *et al*. 2005; Sharma 2016; Santos 2016; Shen 2019).

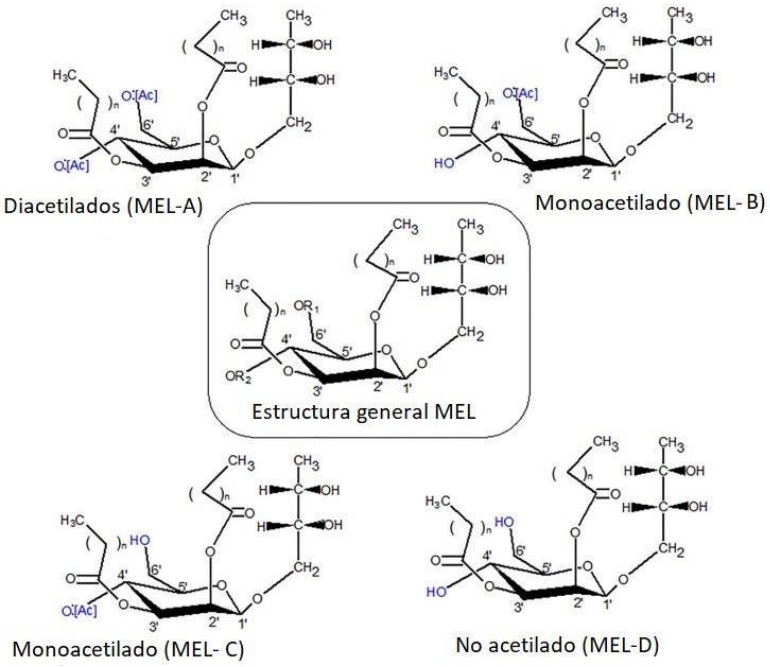


Figura 2. Estructura general de los lípidos manosileritritol (MEL). MEL-A: R1 / R2 = acetil-; MEL-B: R1 = acetilo-, R2 = H; MEL-C: R1 = H, R2 = acetil-; MEL-D: R1 / R2 = H (Silva et al. 2020).

La importancia en la producción ha generado atención económica debido a sus características como antimicrobiano, excelentes propiedades interfaciales, activador celular y antioxidante, por lo que se plantea como un importante producto para industrias farmacéuticas y

bioquímica (Isoda y Nakahara, 1997; Takahashi *et al*. 2012; Cortes-Sanchez *et al*. 2013; Fan *et al*. 2016; Nashida *et al*.2018; Wu *et al*.2018; Shu *et al*.2019).

Diferentes investigaciones han encontrado una relación en las fuentes de nutrientes ideales para los microorganismos productores mediante fermentación de MEL y sus diferentes estructuras. Como ocurre con gran variedad de glicolípidos, la estructura confiere diferentes actividades biológicas. Las fuentes de carbono principales que se han reportado para su producción se basan en aceites vegetales, como el aceite de soya para producir MEL con cadenas hidrófobas de diferentes longitudes. Al utilizar aceite de ricino, *P. tsukubaensis* produjo una forma diastereoisómero de MEL-B que contiene un ácido graso hidroxi. La producción de MEL-A en *Pseudozyma antartica* y *P. tsukubaensis* reporta una modificación en las cadenas hidrófobas, cuando la fuente de carbono es aceite de soya la cadena contenía 33.1% de ácidos grasos insaturados, utilizando cromatografía liquida de alta eficacia (HPLC) para cuantificación, la estructura del glicolípido purificado (MEL-A) se caracterizó por resonancia magnética nuclear (RMN) de ^{1}H y ^{13}C con un Varian INOVA 400 (400 MHz) y los ácidos grasos en MEL se analizaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas con un Hewlett Packard, mientras que la cadena hidrófoba obtenida con fuente de carbono por aceite de olivo contiene un 9.1% de ácidos grasos insaturados, Morita y colaboradores (2010) presentaron que el MEL-A obtenido de la fermentación con aceite de soja aumenta un 150% viabilidad de las células de fibroblastos en comparación con la de las células de control, por otro lado, no se observó activación celular por el tratamiento con MEL-A producido a partir de aceite de olivo. (Morita *et al.* 2006; Morita *et al.* 2013; Kitamoto *et al.* 2009; Cortes-Sánchez *et al.* 2013). El recurso de carbono como fuentes de aceites vegetales presenta retos como la presencia de subproductos químicos como ácidos grasos libres, monogliceroles y diacilgliceroles, que no se obtienen cuando la fuente de carbono es hidrofílica, por ejemplo, glucosa o glicerol. Morita y colaboradores (2009, 2010) presentaron que *U. scitaminea* NBRC32730 tiene la capacidad de producir grandes cantidades de MEL-B utilizando solo sacarosa, glucosa, fructosa o manosa como única fuente de carbono.

4.4 Ustilago maydis

Ustilago maydis es un hongo dimorfo basidiomiceto, es el agente causal del carbón común del maíz (*Zea mays*), es reconocido como huitlacoche en México, donde se consume como

un platillo culinario, ya que ofrece una composición química muy atractiva y atributos nutricionales deseables. Cuando se cultiva en el laboratorio, *U. maydis* muestra un ciclo de vida complejo (dimórfico), requiere de su hospedador para completar su ciclo de vida. En su fase saprófita forma células haploides (levaduras) que cambia a un crecimiento patógeno filamentoso en la etapa dicariótica después de la singamia con la habilidad de invadir el huésped (la planta) que finalmente se diferencia al formar teliosporas (también llamadas clamidosporas). La genética de *U. maydis* es especialmente interesante, debido a que se han logrado nuevos biotipos por hibridación y mutación, exhibiendo una variación genética considerable (Valverde, 1995; Banuett y Herskowitz, 1996; Bauer, 2001; Aréchiga, 2005 Juárez *et al.* 2011; Maribel 2012).

Es un microorganismo de interés biotecnológico, ya que los productos de fermentación de cultivos sumergidos de *Ustilago* pueden incluir aceites, aminoácidos esenciales, proteínas, vitaminas y saborizantes, etc. (Valverde *et al.* 1995; Spoeckner *et al.* 1999).

De la misma manera que otros hongos de interés biotecnológico (*Candida bombicola, Schizonella melanogramma* y *Geotrichum candidum) U. maydis* es productor de dos biosurfactantes extracelulares de tipo glicolípidos:

A) Lípidos o ustilípidos de manosileritritol (MEL), 4-O-β-D-manopiranosil-derythritol que se esterifica con cadenas cortas o medianas de ácidos grasos (C2 a C8 y C10 a C18, respectivamente), así como grupos acetilo.

B) Lípidos celobiosos también conocidos como ácido ustilaginico, el disacárido está unido a través de un enlace o-glucosídico a un grupo ω-hidroxi del 2,15,16-trihidroxi-o 15.16 - ácido dihidroxihexadecanoico (Spoeckner *et al.* 1999; Hewald *et al.* 2005; Bolker *et al.* 2008; Cortés *et al.* 2011). (Fig. 3)

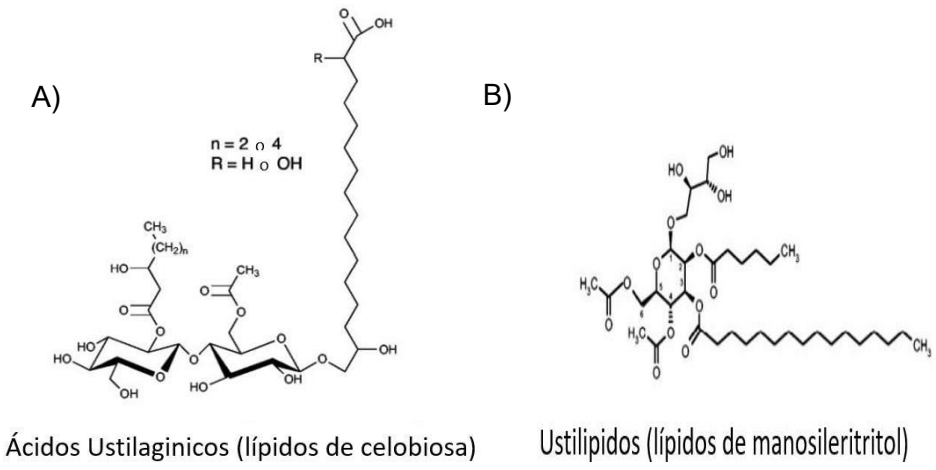


Figura 3. Estructuras químicas de (A) Ácidos ustilágicos y (B) Ustilípidos (Hewald et al. 2005).

Además, *Ustilago maydis*, como muchos otros basidiomicetos produce β-glucanos que son depositados en su pared celular, la producción y/o anclaje de esta molécula parece regulada por el factor de transcripción de respuesta a pH alcalino Rim101 y las condiciones de su producción se encuentran bien establecidas (Fonseca *et al.* 2011), sin embargo, hasta ahora solo se conoce que el polisacárido es un (1 → 3) β-d-glucano, y que no contiene (1 → 6) β-d-unido a glucosa. Basados en estudios *in vitro* las β-glucanos actúan sobre diferentes receptores inmunes incluyendo la dectina-1 y el receptor de complemento (CR3) y TLR-2/6 y disparan la acción de macrófagos, neutrófilos, monocitos, células mortales naturales y dendríticas. En estudios con animales, la columna principal de β-1-3glucanas, no se puede digerir lo que la califica como fibra soluble que es benéfica para la salud intestinal (Papaspyridi *et al*. 2005; Lee 2014).

En nuestro grupo de trabajo se han generado células modificadas de *Ustilago maydis* con características de alta producción de distintos productos bioactivos. Aréchiga y colaboradores (2005) al modificar a *U. maydis* en la ruta pal/Rim, demostraron que se generaba la desregulación en la producción de exopolisacáridos. Fonseca y colaboradores (2011) lograron caracterizar el biopolímero producido por Δrim13: cbx, corroborando una producción desregulada de un biopolímero de interés industrial (β-D-glucano). Por otro lado, Hewald y colaboradores (2005) identificaron los genes del cluster para la biosíntesis de lípidos de manosileritritol (tensoactivo natural) *Ustilago maydis.* Otro grupo de trabajo se encargó de interrumpir el gen NRG1 en mutantes de *U. maydis*, y observaron una producción

desregulada de un emulsificante y la sobreexpresión de la mayoría de los genes del Clúster en esta mutante (Sánchez-Arreguin *et al*. 2020).

En este proyecto se utilizaron dos células modificadas de *Ustilago maydis* (BMA: a2b2 Δrim101: hyg (Aréchiga 2005) y FMA2::a2b2Δnrg1::Cbx (Sánchez- Arreguin *et al.* 2020), con el fin de utilizar su capacidad de producción desregulada de un polisacárido (β-Glucano) y un biosurfactante.

El tamaño del mercado mundial para los bioproductos de interés que buscamos obtener en este proyecto equivale para los β-glucano a $410,6 millones dls proyectado para 2020 y se estima que alcanzará una valoración de $ 476,5 millones dls para finales de 2025, registrando una tasa compuesta anual de alrededor de 7,6% entre 2020 y 2025 (Market data Forecast 2019). Otra investigación de mercado proyectó que el mercado global de biosurfactantes superará los 5.52 mil millones para 2022, a una tasa compuesta anual de 5.6% de 2017 a 2022(Markets and Markets, 2017).

JUSTIFICACIÓN

La industrialización de los metabolitos biotecnológicos cuya capacidad de producción es factible dados los avances científicos, se ve afectada debido a la falta de estandarización, optimización, caracterización y escalamiento de estos. Los procesos de producción suelen ser complejos y el llevarlos a nivel industrial por hoy tiene un alto costo y requiere de inversión de riesgo. Es por esto por lo que el presente proyecto pretende estandarizar las condiciones a nivel laboratorio que resulten factibles de escalar, utilizando sustratos accesibles y de bajo costo. Los metabolitos de interés se producirán a partir de las mutantes de *Ustilago maydis* (β-glucano y del biosurfactante MEL)

Los bioproductos de interés para este proyecto se secretan al medio y pudiesen estar listos para ser utilizados en diferentes industrias como biomedicina, bio adhesivos, biopolímeros y bio plaguicidas. Emplear biotecnología en la industria proporciona una producción sostenible, sin huella de contaminación y con un impacto ecológico reducido o nulo, lo que genera un beneficio para la sociedad, la industrial y economía.

Los puntos críticos de este tipo de aproximaciones son la obtención de las condiciones de fermentación óptimas en escala matraz a fin de obtener concentraciones competitivas, comparadas con cepas utilizadas a nivel industrial y madurar un escalón más la biotecnología descrita.

Se estandarizaron condiciones de producción eficientes para producir y caracterizar de β-glucanos y lípidos de manosileritritol a partir de cepas genéticamente modificadas.

HIPÓTESIS

Las mutantes de *Ustilago maydis* BMA2::a2b2 Δrim101::hyg (Aréchiga, 2005) y FMA2::a2b2Δnrg1::Cbx (Sánchez-lArreguin et al. 2021) son organismos que producen β-glucano y lípidos de manosileritritol, respectivamente de forma competitiva.

OBJETIVO

7.1 Objetivo general

Estandarizar el proceso de producción del biopolímero β-Glucano BMA::a2b2 Δrim101::hyg y del biosurfactante FMA::a2b2Δnrg1::Cbx a nivel matraz.

7.2Objetivo específico

- Producir los metabolitos de interés (manosileritritol y β-glucano).
- Encontrar fuentes de Carbono y nitrógeno que optimicen la producción de los metabolitos
- Extraer, purificar y caracterizar analíticamente los metabolitos de interés.
- Caracterizar los puntos críticos de eficiencia en producción de los metabolitos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Crecimiento de las mutantes de *U. maydis (*Holliday, 1961; Ruiz y Aréchiga-Carvajal, 2005)

Las cepas se mantuvieron a -80 ◦C en glicerol al 50% (v / v). Las células de *U. maydis* se activaron en Medio Completo (Holliday, 1961). Al medio de cultivo se añadió higromicina a una concentración desde 500 µg/ml como agente selectivo para la mutante BMA (*a2b2* Δ*rim101*) y se añadió carboxina de 5 a 10 µg/ml para la mutante FMA2 (*a2b2* Δ*nrg1),* se agitó (120rpm) a 28°C durante 24 h, se contó por Cámara de Neubauer (Cepero *et al.* 2012).

- Medio Completo (MC) 1 l: Peptona de caseína 2.5 g, Extracto de levadura 10 g, Nitrato de amonio 1.5 g, Solución de sales 62.5 ml, Glucosa 10 g

- Medio Mínimo 1 l: Nitrato de potasio 3 g, Solución de sales 62.5 ml, Glucosa 10g (esta será variable en base a la concentración que se requiera utilizar).

- Medio YEPS 1 l: 1% Extracto de levadura, 2% de Peptona de caseína y 2% de Sacarosa.

- YNB-N fresco con 1,7 g / l de base nitrogenada de levadura sin sulfato de amonio y glucosa al 5% como fuente de carbono (BD; Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE. UU.).

Optimización de nutrientes para producción de biopolímero y biosurfactante

La producción de los metabolitos de interés se evaluó con diferentes fuentes de C y N. Para las fuentes de carbono se utilizó Glucosa y Sacarosa, las fuentes de nitrógeno que se utilizaron fueron Urea, KNO_3, NH_4NO_3 en base de Medio Mínimo y en Medio YEPS utilizando el Extracto de levadura como fuente de nitrógeno y fuente de C con Sacarosa y Glucosa. Se tomó en cuenta la relación estequiométrica respecto al medio mínimo para reemplazar las fuentes o (C y N) que participan en cada medio, siendo el mol la unidad de medida.

Estandarización de procesos con variabilidad de pH.

El pH mostró una influencia en la expresión de los genes involucrado en la producción demetabolitos de ambas cepas, por ende, es necesario determinar los parámetros de pH óptimos

para la máxima producción de metabolitos, por esto se compararán perfiles de producción en pH ácido [3], pH próximo a la neutralidad [6] y pH alcalino [9].

Polisacárido

Producción de polisacárido (Aréchiga-Carvajal y Ruiz- Herrera 2005)

La cepa BMA2 se activó en medio MC por 24 h a 120 rpm a 28°C, se inocularon $1x10^5$ c/ml en medio MM pH7, se incubo por 24, 48 y 72 h.

Optimización de la producción del Betaglucano

Se optimizaron cuatro parámetros diferentes que afectan la producción (los nutricionalmente más importantes): fuente de C (Glucosa y Sacarosa), fuente de N (Nitrógeno como Urea, y Nitrato de Amonio), tiempo de incubación y pH (El rango de valores de pH se tomó de 3, 6 y 9) y el tiempo fue valorado en producción a las 72 h. La concentración en peso seco del polisacárido fue utilizada como indicador.

Aislamiento del polisacárido (Fonseca *et al.* 2011)

El medio de cultivo se obtuvo después del tiempo de incubación, se colocó en tubos Falcon (50 ml) 4:1 v/v agua bidestilada estéril para eliminar células al centrifugar a 14000 rpm por 30 min, una vez recuperado el sobrenadante con baja cantidad de células, se añadió etanol helado (concentración final al 50%) al medio libre de células. Después de 24 h a 4ºC, la mezcla se centrifuga a 5.000 rpm durante 5 min, y el material precipitado se seca en estufa a 40°C.

Estudio reológico

La viscosidad es una propiedad de los fluidos de gran importancia en múltiples procesos industriales, además de ser una variable de gran influencia en la fluidez del producto final, el valor de viscosidad se usa como punto de referencia en la formulación de nuevos productos, facilitando la reproducción de la consistencia de un lote a otro. Dicha medida de la resistencia interna de un fluido a desplazarse o moverse. Tanto en el aire como el agua a pesar de fluir con facilidad, presentan cierto grado de resistencia al flujo.

La viscosidad se determinó (Shearer y Hudson, 2008)

- El diámetro de un perdigón esférico.
- La densidad del material con el que están hechos los perdigones (vidrio).
- La densidad del fluido.
- Con un cronómetro se mide el tiempo que tarda la pequeña esfera en recorrer una distancia dada en el interior del tubo vertical que contiene el fluido.
- Se compararon los tiempos con respecto a un fluido control (Agua)
- Se aplica la fórmula:

$$\eta = \frac{2r^2(\rho-\sigma)g}{9v} =$$

v es la velocidad terminal

r es el radio del cuerpo esférico

g es la aceleración de la gravedad

ρ es la densidad del cuerpo esférico

σ es la densidad del líquido

η es el coeficiente de viscosidad

<u>Cuantificación en peso seco</u>

El polisacárido aislado se colocó en placas previamente pesadas, se dejó secar. Se tomó peso final por triplicado.

<u>Digestión de polisacáridos con (1 → 3) β-glucanasa (</u>Fonseca et al. 2011<u>)</u>

El polisacárido se trató con 1 ml (0,4 mg por mg de polisacárido) de Lyticase (Sigma) en tampón fosfato 50 mM pH 7, y se incuban a 25 ◦C. Después de 10 y 24 h de digestión, se congelo para desactivar las enzimas.

Cromatografía (Fonseca *et al*. 2011)

La muestra del polisacárido hidrolizado enzimáticamente se analizó por cromatografía de capa fina (TLC). Utilizando como fase móvil con una mezcla de isopropanol – cloroformo – agua (14: 8: 2, v / v) durante 2-3 h. La columna de gel de sílice se secó a temperatura ambiente y se visualizó después de la exposición a $KMnO_4$ 0,1 N en H_2SO_4 0.05 N (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE. UU.).

Producción del Biosurfactante

Se inoculó Medio YEPS (50ml) bajo diferentes condiciones de pH (3, 6 y 9) con las cepas correspondientes (FMA2, BMA2 y la cepa *U. maydis* wild type a $1x10^5$ c/ml en y se incubó a 24, 48, 72 y 96 h a 28 °C en agitación

Optimización de biosurfactantes

Se optimizaron cuatro parámetros diferentes que afectan la producción de biosurfactante (fuente de C, fuente de N, tiempo de incubación y pH). El rango de valores de pH se tomó de 3, 6 y 9 , el tiempo fue valorado en producción a 24, 48, 72 y 96h , la fuente de carbono fue: Dextrosa Glucosa y Sacarosa, así mismo las fuentes de Nitrógeno como Urea, Extracto de Levadura, peptona, y Nitrato de Amonio. El índice Emulsificación se utilizó como indicador de eficiencia de producción.

Caracterización analítica de los Biosurfactantes

La caracterización de los biosurfactantes se realizó mediante cromatografía de capa fina con un eluyente de cloroformo-acetona-agua (30:60:2). La columna de gel de sílice se secó a temperatura ambiente y se visualizó después de la exposición a $KMnO_4$ 0,1 N en H_2SO_4 0,05 N (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE. UU.). (Hewald 2005).

Extracción del biosurfactante en solvente

El cultivo se lleva una solución 1:1 con acetato de etilo Jalmec E6845 (99.5% de pureza) el acetato de etilo se evaporó a 60°C y se re suspendió en metanol (Hewald *et al.* 2005).

Métodos de detección basados en el ensayo de inhibición

Los biosurfactantes pueden tener actividad antimicrobiana (Kitamoto *et al.* 2002), por esto se caracterizó la capacidad de inhibición de crecimiento microbiano, en agar Luria (LB), se inoculó por hisopado *Escherichia coli*, con discos impregnados con 10 µl de los extractos por 24h a 37°C y se tomó registro del radio del halo de inhibición, los extractos con mayor inhibición se llevaron a Cromatografía de Capa Fina (Por sus siglas en ingles Thin Layer Chromatography).

Medida de emulsificación (Samanta *et al*. 2012)

Se comprobó el potencial emulsionante de biosurfactante de las muestras frente a hidrocarburos (xileno para todas las muestras y petróleo). Los sobrenadantes de cada condición de producción se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. El índice de emulsificación se midió combinando volúmenes iguales de solución de biosurfactante y los sustratos de hidrocarburo en tubos 25 x 140 mm, mezclado vigorosamente durante 10 min a temperatura ambiente 28 °C. Se determinó la actividad emulsionante con el porcentaje de la altura total que fue ocupada por la emulsión después de un tiempo de 24 h. Se calculó el% de EI utilizando la fórmula:

$$EI\% = (AE \div AT) \times 100$$

EI% es el índice de emulsificación en porcentaje.
AE es la altura de la emulsión en cm.
AT es la altura total de la suspensión en cm.

RESULTADOS

Biopolímero (B glucana): Aislamiento, Caracterización y Cuantificación

La producción del biopolímero reportada en la cepa se realizó primero comparando los sobrenadantes del cultivo libre de células (Fig. 4). Las condiciones variaron el tiempo de cultivo, se inocularon con $1x10^5$ c/ml en medio MM pH7. Las cepas de *Ustilago maydis WT* y BMA2 aumentaron su producción en peso seco a las 72 h de cultivo (Figura 5), ambos sobrenadantes elevaron su viscosidad aparente en comparación con el control (agua) (Figura 6). El biopolímero obtenido a las 72 h se trató con β-1-3-D-glucanasas por 10 y 24 h, como control se utilizó glucosa, se obtuvo una fracción que coincide con la fracción del control (glucosa).

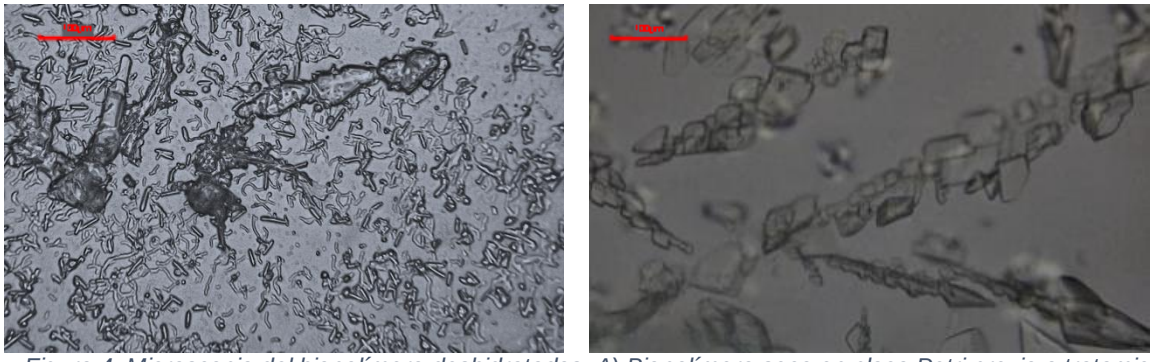


Figura 4. Microscopia del biopolímero deshidratados. A) Biopolímero seco en placa Petri previo a tratamiento de purificación microscopia 40x. B) Biopolímero después del tratamiento de purificación microscopia 40x.

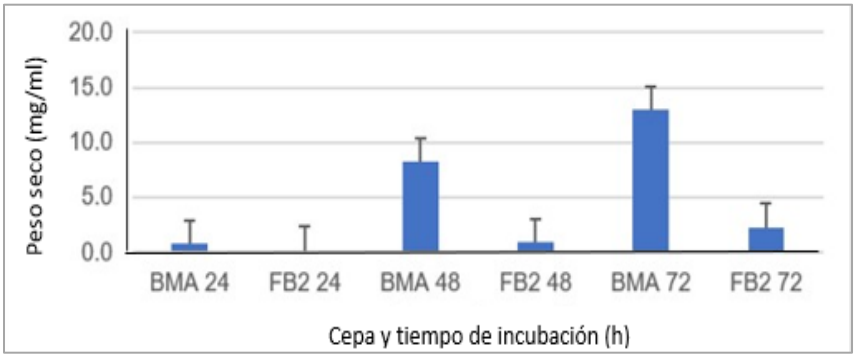


Figura 5. Comparación de la producción del biopolímero en peso seco a diferentes periodos de incubación de la cepa BMA2 (Aréchiga y colaboradores 2005).

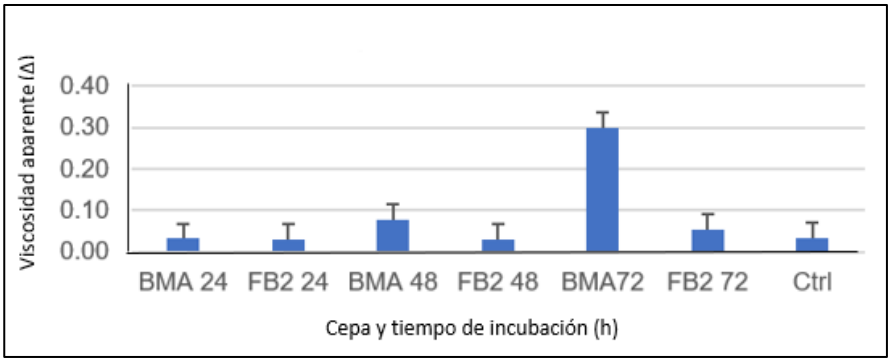


Figura 6. Comparación de la Viscosidad aparente a diferente tiempo de incubación de las cepas BMA2 y FB2 (Aréchiga y col. 2005).

La caracterización de la digestión de β-glucanos (Figura 7) mostrando diferente grado de digestión para el biopolímero a través de las horas transcurridas.

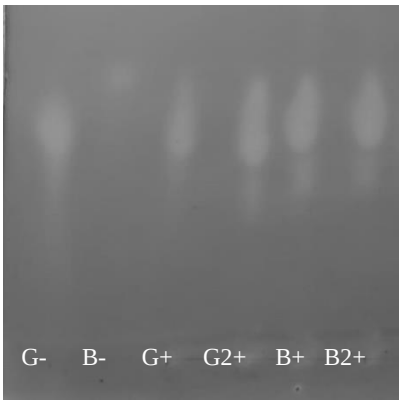


Figura 7. Caracterización de la digestión de β-glucanos. Cromatografía en capa fina realizada después de la digestión enzimática de 10 h y 24 h del biopolímero recuperado en MM pH9 con BMA2 a 72h de cultivo. Carril G-: glucosa sin tratamiento enzimático, Carril B-: biopolímero sin digestión enzimática, Carril G+: glucosa con tratamiento enzimático 10 h, Carril B+: biopolímero con tratamiento enzimático 10 h, Carril G2+ glucosa con tratamiento enzimático 24h y Carril B2+ biopolímero con tratamiento enzimático 24h.

Optimización de la producción del Betaglucano

Para la producción del biopolímero con diferentes fuentes de nitrógeno y carbono, en diferentes valores de pH (Figura 6), se obtuvo un aumento en peso seco en el pH acido (pH 3) con la cepa BMA2 cuando tiene como fuente de carbono a la sacarosa y fuente de nitrógeno el Nitrato de Amonio, mientras que en esta condición de pH el menor peso seco se obtuvo de la cepa *Ustilago maydis WT* cuando la fuente de carbono es sacarosa y la fuente de nitrógeno es urea. Con pH ligeramente ácido (pH 6), se aumentó la producción por BMA2

(18 mg/ml) a 72 h de cultivo con dextrosa como fuente de carbono y urea como fuente de nitrógeno además que fue la condición con mejor rendimiento, el menor rendimiento con pH 6 se obtuvo con la cepa FB2 cuando tiene como fuente de carbono a la sacarosa y fuente de nitrógeno el Nitrato de Amonio (Figura 8). La condición de pH alcalino (pH9) mantuvo una producción de 10-13 mg/ml para BMA, la fuente que obtuvo menor producción tanto para BMA2 como *Ustilago maydis WT*, fue la fuente de carbono dextrosa y la fuente de nitrógeno Urea excepto para pH 6 en BMA.

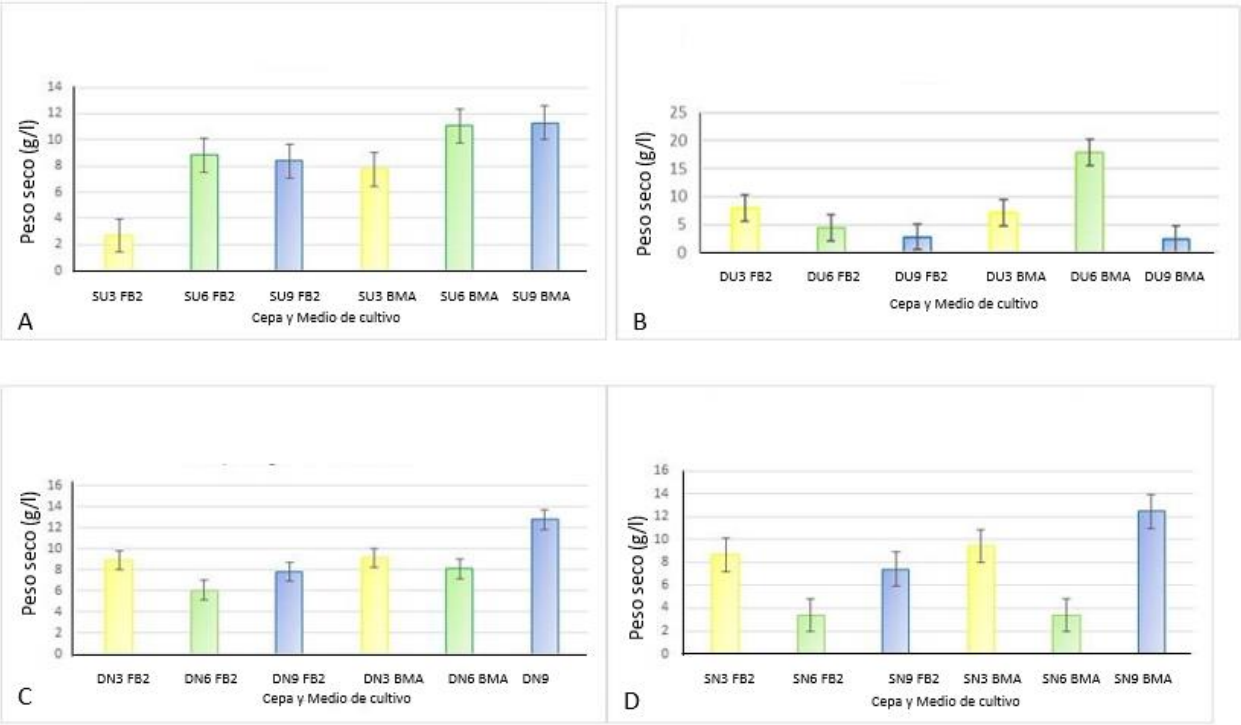


Figura 8. Efecto del pH, fuente de carbono y de nitrógeno sobre la producción del biopolímero β-1-3 Glucano con las cepas U. maydis WT y BMA2. A: Sacarosa y urea a pH 3, 6 y 9; B: Dextrosa y urea a pH 3, 6 y 9; C: Sacarosa y Nitrato e amonio a pH 3, 6 y 9; D: Dextrosa y Nitrato de amonio a pH 3, 6 y 9.

Estudio reológico

La viscosidad aparente del sobrenadante sin células se determinó con lo que se llama un valor adjudicado , como referencia se tomó el valor de viscosidad del agua como unidad principal, la cual obtuvo un valor de 0.03 Δ (control Δ) , en el que solamente la condición SN3 del organismo *Ustilago maydis WT* obtuvo el doble del valor Δ del control , mientras que con el organismo BMA obtuvimos el doble del valor Δ del control en las condiciones que utilizan sacarosa como fuente de carbono en condición de pH alcalino con Nitrato de potasio, con pH

ligeramente acido y alcalino cuando se utilizó Urea como fuente de nitrógeno (SN9, SU6,SU9), los mayores valores se obtuvieron del organismo BMA con dextrosa como fuente de glucosa, con nitrato de potasio como fuente de nitrógeno y un pH alcalino (DN9) se obtuvo 4 veces el valor del control Δ, y en la condición DU6 (Urea como fuente de nitrógeno en un pH ligeramente acido) BMA obtuvo 11 veces el valor del control Δ (Figura 9).

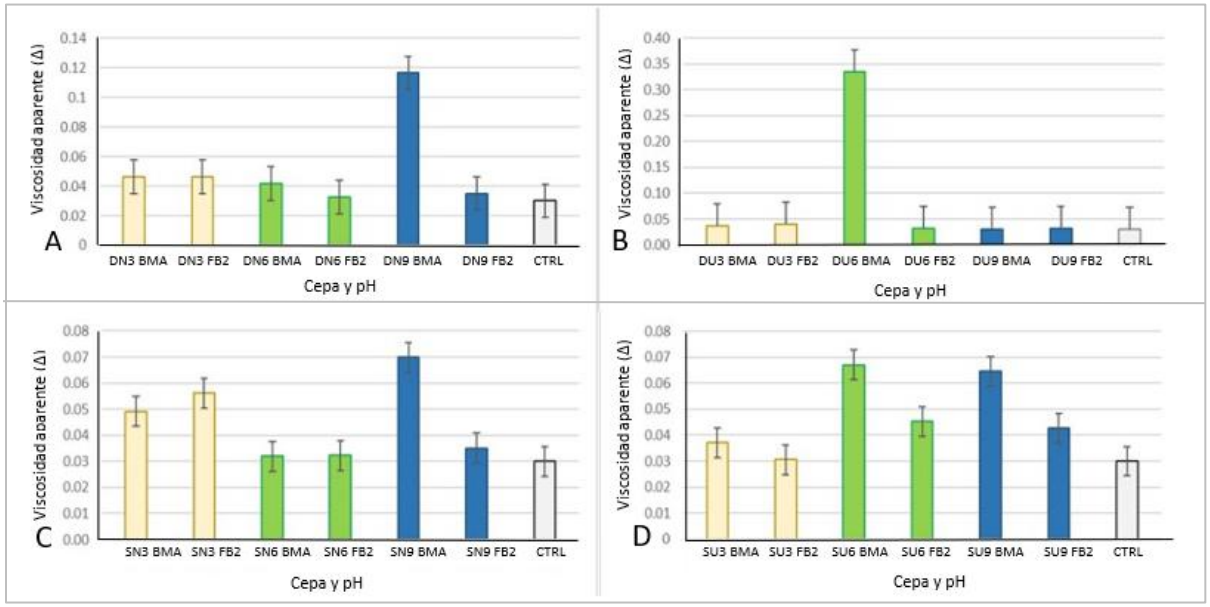


Figura 9. Efecto del pH, fuente de carbono y de nitrógeno sobre la Viscosidad aparente del medio libre de células a 72 h de incubación a 28°C con las cepas U. maydis WT y BMA2. A: Dextrosa y Nitrato de amonio a pH 3, 6 y 9; B: Dextrosa y Urea a pH 3, 6 y 9; C: Sacarosa y Nitrato de Amono o Nitrato de Potasio a pH 3, 6 y 9 y D: Sacarosa y Urea a pH 3, 6 y 9

Biosurfactante: Aislamiento, Detección y Cuantificación.

En la Microscopia de cultivo de FMA se observó la presencia de glicolípidos insolubles (Figura 10), los cuales se espera que su cantidad varíen en relación con el tiempo de vida del medio de cultivo.

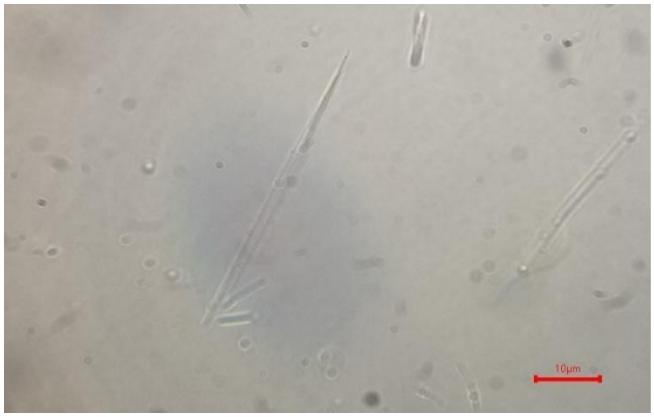


Figura 10. Microscopia de cultivo de FMA en medio YEPS a las 96 h, con presencia de los Glicolípidos insolubles (Escala 10 µm).

Métodos de detección de biosurfactante

Índice de emulsificación %

El índice de emulsificación aumentó conforme transcurría el tiempo del cultivo de FMA2 y de FB2 (Tabla 3).

Tabla 3. El índice de emulsificación (% de IE) se midió en el sobrenadante en diferentes horas de cultivo FMA2 y U. maydis WT (FB2) y TX-100 y Solución 1 x 101 de TX-100 en agua destilada como control. El porcentaje medido con Xileno.

Cepa	Tiempo (h)	EI%
FMA 24	24	**11**
FB2 24	24	**4**
FMA 48	48	**21**
FB2 48	48	**12**
FMA72	72	**50**
FB2 72	72	**12**
FMA 96	96	**54**
FB2 96	96	**23**
TX-100	-	**90**
SLN 10[1]	-	**23**

Ensayo de inhibición

Una vez corroborada la presencia de biosurfactante con el índice de emulsificación (% de IE) se mezclaron 2 ml de sobrenadante de cultivo a 2 ml de cada sustrato hidrófobo (xileno) mezclado vigorosamente y la mezcla se dejó en reposo durante 24 h. Se calculó el EI%, los extractos de FMA2 de la hora 72 h y 96 h fueron los que presentaron el mayor porcentaje de los sobrenadantes y fueron utilizados en las subsecuentes pruebas, el control usado fue TX-100, este biosurfactante obtuvo una emulsificación del 90% cuando se utilizó directamente. Se utilizó un ensayo de inhibición para detectar la presencia de extractos con actividad antimicrobiana. El crecimiento de *Escherichia coli*. Los extractos obtenidos de FMA2 (medio YEPS) presentaron capacidad inhibitoria de *E. coli* desde las 48 h, y con mayor claridad de los biosurfactantes tomados a partir de los cultivos de FMA2 a las 96 h donde sedetectaron glicolípidos insolubles en las microscopias (Figura 11). Se midió la actividad inhibitoria de los extractos obtenidos contra *E. coli*, se compararon con la actividad inhibitoria del solvente de las extracciones (Metanol). La mayor actividad inhibitoria se obtuvo del extracto de las 96 h.

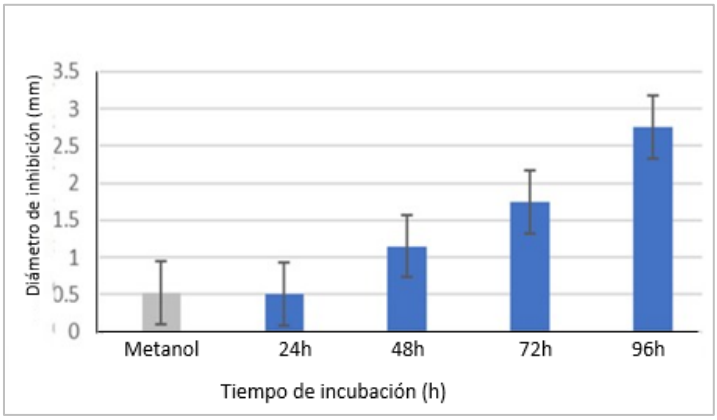


Figura 11. Actividad inhibitoria (mm) con los extractos obtenidos de Δnrg1 en medio YEPS a 24 h ,48 h, 72 h y 96 h.

La cromatografía de capa fina presenta fracciones de manosileritritol di acetilado, mono acetilado y no acetilado (MEL-A, MEL B/C y MEL-D) (Hewald S. 2006). La fracción de ácidos ustilaginicos también está presente. La presencia de estas fracciones se ve conforme el tiempo de cultivo de las extracciones, donde la presencia de MEL-A, MEL B/C, MEL-D y UA está presente desde las 48h de cultivo (Figura 12).

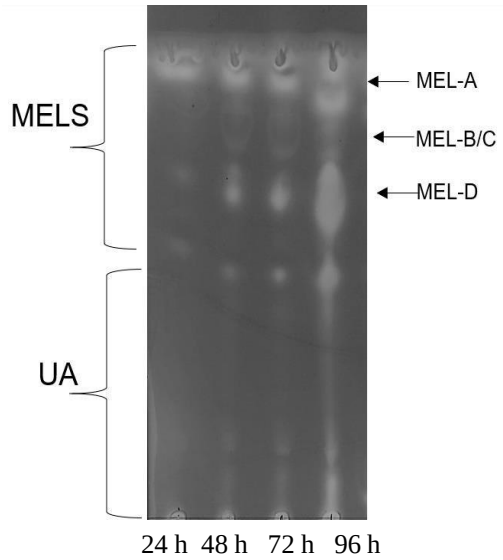


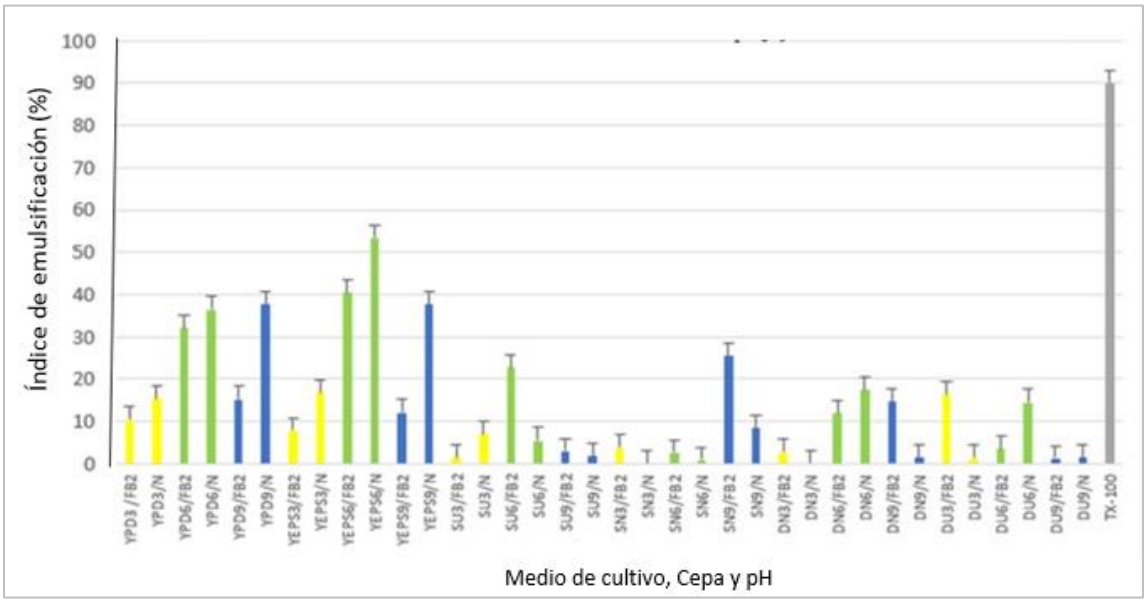
Figura 12.Cromatografía en capa fina de extractos obtenidos de la cepa FMA2 en el medio de cultivo YEPS a diferentes periodos de incubación. Las flechas indican diferentes fracciones de Manosileritritol (MEL) y ácidos ustilaginicos (UA) (Hewald et al. 2005).

Métodos de detección de biosurfactante en la optimización de la producción

Índice de emulsificación %

En un punto de vista termodinámico, la emulsión consiste en un sistema inestable, un sistema líquido-líquido inmiscible naturalmente tiende a separarse, reduciendo la tensión superficial. Una característica de biosurfactantes es que tienen la capacidad de disminuir la tensión superficial y aumentan la solubilidad entre soluciones que no son miscibles (Toribio Jiménez et al. 2014). El ensayo de índice de emulsificación se basa en que los biosurfactantes producidos por estas cepas presenta la capacidad de reducir la tensión superficial y aumentar la solubilidad de hidrocarburos. Los sobrenadantes que presentan mayor índice de emulsificación son los que se obtuvieron con extracto de levadura en ambas cepas como fuente de N (FMA2 y *U. maydis WT*), la comparación se hizo con el surfactante TritonX-100, el cual obtuvo un EI% al 90, mientras que los EI% obtenidos de las muestras con mayor

EI% van de 40- 58 % ± 2. El menor rendimiento se obtuvo cuando la fuente de nitrógeno es urea, nitrato de amonio y nitrato de potasio (Figura 13).



YPD: Extracto de levadura y Dextrosa, YEPS: Extracto de Levadura y Sacarosa, SU: Sacarosa y Urea, DU: Dextrosa y Urea SN: Sacarosa y Nitrato de Amono o Nitrato de Potasio. DN: Dextrosa y Nitrato de Amono o Nitrato de Potasio, TX-100: TritonX-100 surfactante, 3: pH3, 6: pH6 y 9: pH9. FB2: Ustilago maydis WT y N: FMA2.

Figura 13. Índice de Emulsificación (%) a diferentes pH, fuentes de carbono y de nitrógeno sobre sobre el en los cultivos de las cepas U. maydis WT y FMA.

Ensayo de inhibición

El ensayo de inhibición con frecuencia se encuentra influenciado por diferentes fuentes de C y N, a valores de pH 3, 6 y 9, muestra tener una mayor actividad inhibitoria del crecimiento de *E. coli* en todas las cepas, cuando la fuente de nitrógeno es extracto de levadura y de carbono la Sacarosa la cromatografía presenta fracciones que coinciden con el patrón para MELA y MEL B/C que se presenta cuando Hewald S. et al. 2006 describe la cromatografía del extracto de glicolípidos obtenidos de la cepas de *U. maydis FB1*, medio que contiene 1,7 g/l de base nitrogenada de levadura sin sulfato de amonio y 5% de glucosa como fuentede carbono. Las condiciones de pH6, con esta fuente de nitrógeno extracto de levadura y de carbono la sacarosa en la mutante, FMA2 muestra la mayor inhibición en el ensayo. Los extractos que mostraron actividad inhibitoria coinciden con la presencia de al menos MEL-A y UA. En condiciones donde la fuente de carbono fue sacarosa, el registro de inhibición fue mayor con diferentes cepas en pH alcalino, obteniendo mayor inhibición cundo la fuente de N fue urea para la cepa *Ustilago maydis* WT y cuando la fuente de Nitrógeno fue nitrato

de potasio fue para la cepa FMA2 para los extractos que se obtuvieron cuando la fuente de carbono es Dextrosa, se mantuvo una inhibición entre cepas, la mejor condición de inhibición se obtuvo en pH3 (Figura 14, 15).

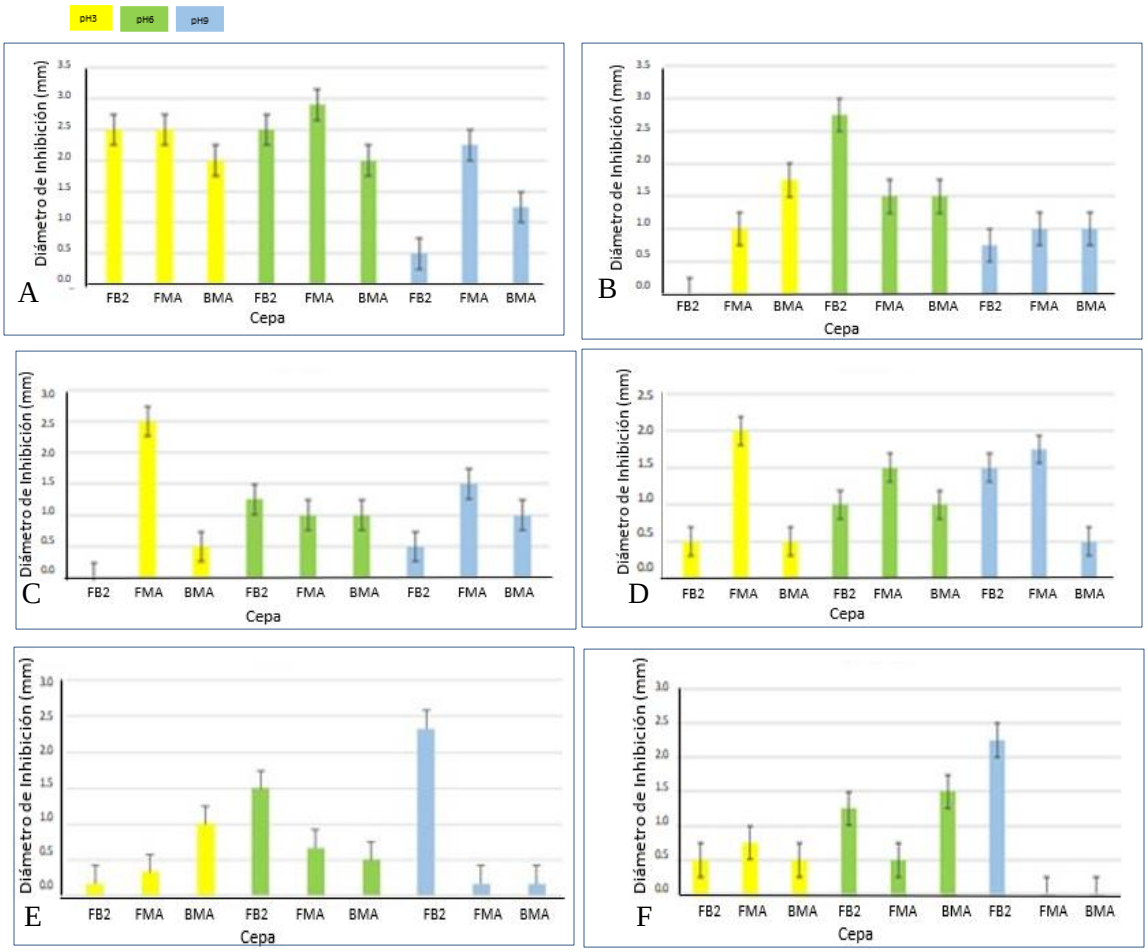


Figura 14. Influencia de la composición de los medios de cultivo y pH de los extractos obtenidos de U. maydis WT, FMA y BMA sobre la Actividad inhibitoria de E. coli. A: Extracto de Levadura y Sacarosa, B: Extracto de levadura y Dextrosa, C: Dextrosa y Nitrato de Amono o Nitrato de Potasio, D: Dextrosa y Urea, E: Sacarosa y Nitrato de Amono o Nitrato de Potasio y F: Sacarosa y Urea.

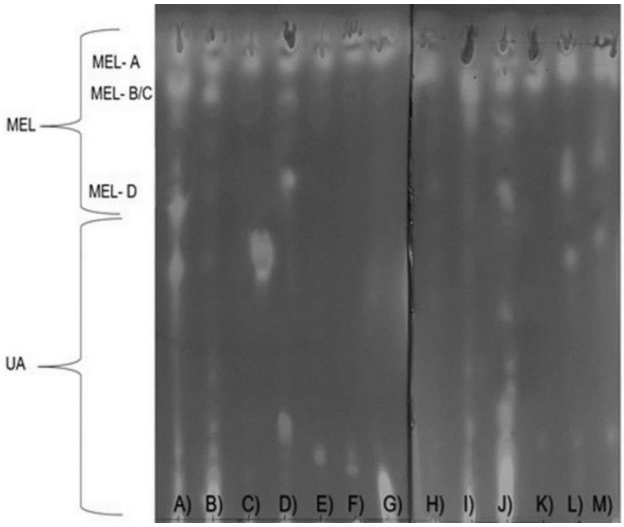


Figura 15. Cromatografía en capa fina para observar el efecto de las diferentes composiciones del cultivo (fuente de C, N y pH), en la producción de Glicolípidos. Carril A). Control: FMA2 en YEPS 96 h sin modificar, Carril B). FMA2 en YEPS pH6, Carril C). FMA2 en MM con NH4NO3 y Dextrosa pH6, Carril D). U. maydis WT YEPS en pH3, Carril E). FMA2 en MM con NH4NO3 y Sacarosa pH6, Carril F). FMA2 MM con NH4NO3 y Dextrosa pH6, Carril G). FMA2 WT YEPS pH9, Carril H). U. maydis WT YPD en pH6, Carril I). FMA2 en MM con NH4NO3 y Sacarosa pH9, Carril J). U. maydis WT YEPS en pH 6, Carril K). FMA2en MM con Urea y Sacarosa pH9, Carril L). U. maydis en MM con Urea y Sacarosa pH9, Carril M). BMA2 MM con Urea y Sacarosa pH9 (Hewald et al. 2005).

Cuantificación del biosurfactante

El peso seco se obtuvo después de realizar la extracción orgánica (Hewald et al. 2005) se dejó evaporar y se tomó el peso final por triplicado, con la fuente de nitrógeno; Extracto de levadura (YEPS y YPD), a pH6 y pH9 se presentaron los pesos secos más altos. La menor producción se presentó cuando la fuente de Nitrógeno fue Urea en pH ácido o alcalino. En el ensayo el mayor peso seco se obtuvo cuando la mutante FMA2 se cultivó en medio YEPS la cepa FMA2 por 4 días a 28°C y 120 rpm (Figura 16).

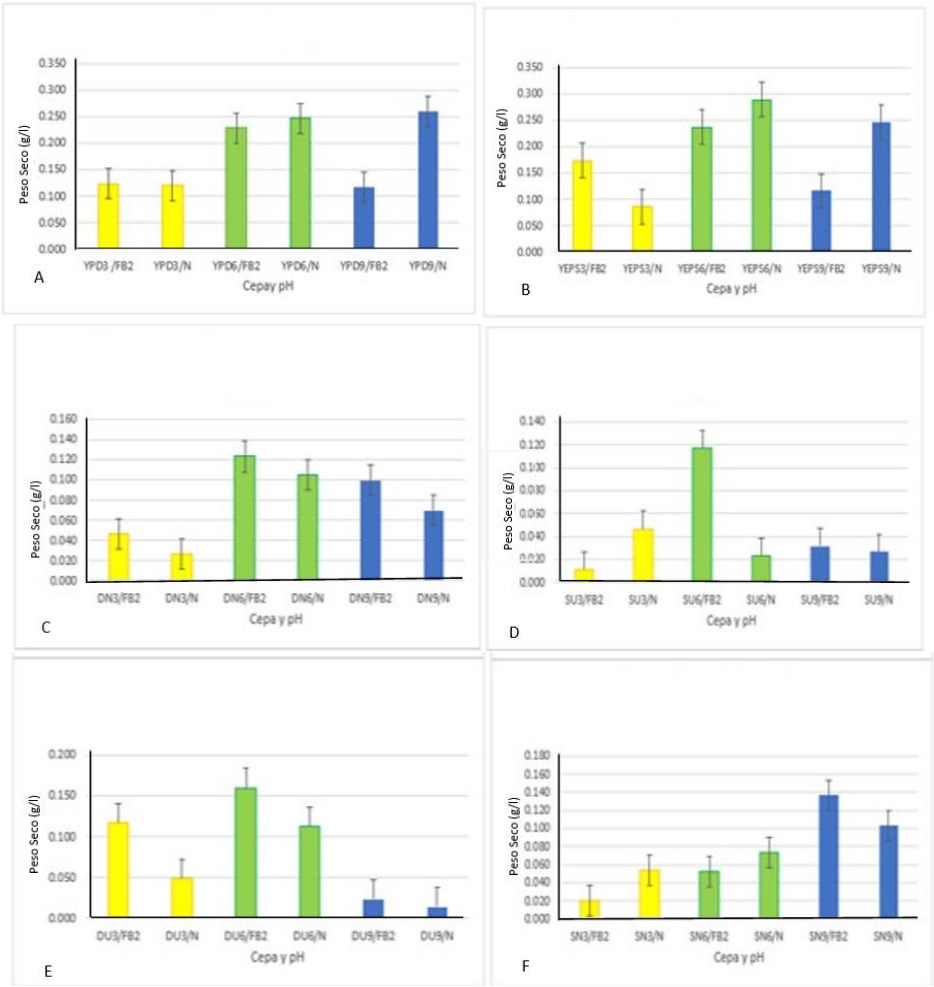


Figura 16. Influencia de la composición del medio de cultivo sobre el peso seco obtenido de los extractos de FMA2 y U. maydis WT. A: Extracto de Levadura y Dextrosa, B: Extracto de Levadura y Sacarosa, C: Dextrosa y Nitrato de Amono o Nitrato de Potasio, D: Sacarosa y Urea, E: Dextrosa y Urea y F: Sacarosa y Nitrato de Amono o Nitrato de Potasio.

DISCUSIÓN

Biopolímero

Aréchiga y colaboradores (2005) reportaron la capacidad de la mutante BMA (ΔRim101) de producir 11 mg/ml del polisacárido, que con el proceso de cultivo medio mínimo se estandariza a 12mg/ml del biopolímero obtenido por la mutante BMA2 en medio MM pH7, cultivado a 28°C a 120rpm por72h de crecimiento describe las características del cultivo. Fonseca y equipo (2011) analizaron el polisacárido producido por la mutante Δrim13, y determinaron que bajo sus condiciones de cultivo se producía β-glucano lineal, por lo que al tratarse Rim101 el efector final de la ruta Rim se espera que la mutante BMA2 (rim101), produzca lo mismo. En la TLC comparamos el patrón de Glucosa y el glucano obtenido del cultivo y bajo nuestras condiciones el polisacárido no pareció haber tenido ningún corte por parte de la beta glucanasas, por lo que se sugiere que es un betaglucano lineal. Los mutantes Δrim de *U. maydis* presentan hipersensibilidad a estrés por ácidos, oxidativo y choque térmico. *S. cerevisiae* se adapta a ácidos débiles por la vía Pal / Rim, principalmente a través de la activación transcripcional de genes implicados en el ensamblaje o remodelación de la pared celular (Mira et al., 2009). Las mutantes de *U. maydis* Δrim secretan un polisacárido, que se sugiere en condiciones silvestres está asociado a la pared celular" Cervantes-Chávez 2010.

Kayanna, N & colaboradores (2022) mencionan que el mayor rendimiento de β-glucano (37,73 g/L) que obtuvieron fue en el medio que contenía sacarosa, $NaNO_3$ y aceite de girasol en concentraciones de 60 g/l, 0,6 g/l y 81,7 ml/l, respectivamente, en 4 días de cultivo. Al intentar optimizar la producción de biopolímero, tuvimos un aumento de 6 mg/ml cuando la mutante utiliza como fuente de nitrógeno Urea y fuente de carbono Dextrosa a un pH6. Jing Wu (2006) y colaboradores encontraron un aumento de concentración de EPS cuando se utilizaron fuentes de nitrógeno orgánico,en comparación con los casos de uso de nitrógeno inorgánico, aumento la producción al cambiar de medio sin control de pH (5) a un control de pH (5.5). En el trabajo de Wu, C.-Y. (2008) las fuentes de nitrógeno inorgánico dieron lugar a una producción relativamente menor de biomasa micelial y EPS, por lo que sugieren que ciertos aminoácidos esenciales no pudieran ser sintetizados a partir de fuentes de nitrógeno inorgánico y que existía actividad proteolítica para la hidrólisis de proteínas en la fermentación de hongos superiores(U. Kües & Y. Liu, 2000), algunos ejemplos de estos hongos son *Paecilomyces sinclairii, Phellinus gilvus, Cordyceps militaris NG3, Ganoderma lucidum y Antrodia cinnamomea* (Perret, J. et. al. 1993, Kim S. et. al, 2002,2003; Fang, Q et. al. 2002; Hwang,

H. et. al. 2003; Shih, I. et al. 2006). Al utilizar la fuente de nitrógeno Urea con fuente de carbono por dextrosa en un pH9, el rendimiento en peso seco fue bajo, la viscosidad se mantuvo como el control. Park & colaboradores (1994) reportan que en cultivo de *Coriolus versicolor* el pH del cultivo afectó la produccion de exopolisacáridos, siendo pH 5-6 el pH óptimo para la produccion, mientras que aumentando pH mayor de 6 la produccion decreció rápidamente.

El ejercicio de viscosidad se midió basado en que el fluido que rodea a un objeto o cuerpo proporciona una resistencia friccional en la que las fuerzas se equilibran, con lo cual el objeto alcanza una velocidad terminal y constante. Los mayores valores se obtuvieron del organismo BMA con dextrosa como fuente de glucosa, con nitrato de potasio como fuente de nitrógeno y un pH alcalino (DN9) se obtuvo 4 veces el valor del control Δ, y en la condición DU6 (Urea como fuente de nitrógeno en un pH ligeramente acido) BMA obtuvo 11 veces el valor del control Δ (Figura 8). Nachtigall, C., & colaboradores (2019) menciona que la disminución de la viscosidad de las soluciones de polisacáridos se relaciona con la disminución observada en la masa molecular, esto afecta las propiedades tecnofuncionales, como la contribución a la rigidez del gel durante la formación de gel ácido. Debido a que el β-glucano tiene buenas características industriales como viscosidad, capacidad de retención de agua, poder de hinchamiento y valores de solubilidad, el extracto de β-glucano se ha considerado como el material más elegido para productos de tipo fijo como el yogur. Kaur R. & colaboradores (2020) evaluaron las características fisicoquímicas, reológicas y sensoriales del yogur con β-glucano incorporado durante los días 1, 7 y 14 de almacenamiento refrigerado, el efecto de la adición de β-glucano sobre la viscosidad del yogur mostraron más viscosidad que las muestras de control.

Biosurfactantes

El cluster de genes para la biosíntesis de MEL se ha reportado en Ustilago maydis (Hewald et al, 2005, 2006). Existen muchos reportes sobre la producción de 4-O-β-D-mannopyranosyl-D-erythritol en diferentes levaduras como Ustilago nuda, Candida Pseudozyma antarctica, Ustilago maydis. Arutchelvi et al., 2008. Sánchez-Arreguin & colaboradores (2021) reportan la produccion de MEL, debido a que durante el análisis transcripcional de la mutante FMA, existe un incremento en la transcripción de los genes

Mac1 (seis veces) y Mac2 (dos veces) (Sánchez-Arreguin J. et al. 2021; ambos genes codifican aciltransferasas). Además, el principal facilitador involucrado en el transporte de MEL Mmf1 se multiplicó cinco y siete veces en Emt1, que codifica la eritritol-manosil-transferasa responsable de la producción de MEL. Las aciltransferasas son las que permiten la producción de variantes de MEL como MEL- A y MEL-B/C, y la presencia de Mmf1 y Emt1 permite la producción de cualquier MEL y MEL-D. Es por ello, la producción de los manosileritritiol por parte de la mutante resultaba evidente.

Los lípidos manosileritritol (MEL) y los lípidos celobiosa (AU) producidos por C. antarctica han mostrado actividad antimicrobiana, con una Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de >400 mg/l de por MEL A y MELB. MEL-A y MEL-B, 4-0- (di-O-acetil-di-O-alcanoil-I3-D manopiranosil) -eritritol y 4-0 - (mono O-acetil-di-O-alcanoil ~ I3-D-manopiranosil) eritritol, respectivamente (Kitamoto D, 2002). Matsumura y col. (1993) reportó que los grupos manopiranosilo son los más eficaces entre los n-alquilglicósidos en ensayados contra microorganismos Gram positivos y negativos. Becker F et al. 2021 al interrumpir los genes en Ustilago Δmat1Δmac1Δmac2, obtienen la mutante MB4059 que en medio YEPS produce exclusivamente la variante MEL- D y UA. Sánchez – Arreguin (2021) demuestran la transcripción desregulada de estos genes en la mutante FMA2. En el presente trabajo se encontró que FMA produce los lípidos de manosilteritrol comprenden MEL- A, MEL-B, MEL-C, MEL- D, que conforme cambian las condiciones (fuentes de Carbono, Nitrógeno y pH) cambia el patrón de producción lo que permite por ingeniería de fermentación o metabólica dirigir la producción, estos aislados presentan características de interés como propiedades emulsificantes y actividad antimicrobiana a concentraciones bajas.

Zavala-Moreno, 2014 demuestra que en la presencia o ausencia de nitrógeno radican las preferencias hacia la producción de un tipo de glicolípido por parte de la cepa silvestre de U. maydis, las células en medios que contenían nitrato o urea produjeron diferentes proporciones de UA / MEL, pero bajo la falta de nitrógeno las células contenían solo UA a 7 días de cultivo. En la cromatografía (Figura. 15) todas las condiciones a 72h de cultivo mantienen la produccion de UA, pero cambia el tipo de fracción en las diferentes fuentes de nitrógeno y carbono, así como el diferente pH.

El ensayo de EI% se realizó debido a que la capacidad emulsificante es una característica de interés de los biosurfactantes de reducir la tensión superficial y aumentar la incorporación de líquidos inmiscibles. U. maydis WT y FMA2 presentaron mayor índice de emulsificación con extracto de levadura (en ambas cepas) como fuente de N, los valores obtenidos fueron de 40- 58% + 2 respectivamente. El menor rendimiento se obtuvo cuando la fuente de nitrógeno es urea, nitrato de amonio y nitrato de potasio (Figura 9). Becker F. & colaboradores (2021) informan que cuando el microorganismo que produce MEL con cadenas laterales muy largas las emulsificaciones son más eficientes.

Los lípidos de manosileritritol exhiben diferentes fases cristalinas líquidas liotrópicas, (fases de esponja, cúbica bicontinua inversa, o lamelar), por lo cual presentan niveles altos de actividad superficial en concentraciones bajas, estas propiedades le permiten ser un emulsificante de interés para la industria cosmética y farmacéutica, sumándole propiedades hidratantes comparable con las ceramidas naturales (Kitamoto D. et. al. 2022; Zavala-Moreno, A. et. al. 2014). Zavala Moreno et. al. 2014 obtiene una capacidad de emulsificación de los glicolípidos producidos por U. maydis WT en medios MM con o sin nitrógeno fue similar al 72% - 76%. Con un promedio de producción 0.381 mg. ml^{-1}. El índice de emulsificación (EI%) que se obtuvo con la cepa FMA2 en medio YEPS, cultivado 4 días, se mantiene en un rango de 54 a 59%, con un peso seco en rango de 0.34 g/l.

CONCLUSIÓN

A las 72h de cultivo obtuvimos 12+ 2 mg/ml del Beta glucano, la producción de β-glucano en pH6 por BMA aumenta en peso seco a 18 mg/ml cuando la fuente de nitrógeno es Urea y la fuente de C es Dextrosa y con un pH6. Se obtuvo la producción de MELS y UA en los cultivos de FMA (YEPS) desde las 24h, y con mayor presencia a las 96h. La síntesis UA por las cepas FMA y *U. maydis* WT, no se vio afectada por la diferente fuente de C, N, y tampoco pH del cultivo. La síntesis de MEL A, B/C se vio favorecida en FMA medio YEPS en pH6 alas 96h de cultivo. El sobrenadante con mayor EI% fue de la cepa FMA2 a condición de cultivo en medio YEPS con pH6.

PERSPECTIVAS

Al cambiar las condiciones de fermentación como aireación, temperatura y distintas fuentes de nutrientes se podría aumentar aún más los números en producción de metabolitos fúngicos, cómo han mencionado distintos autores, por lo que se proyecta en la siguiente etapa de produccion, lograr escalar ala parte de biorreactores implementando los factores que en este proyecto correlacionan una mejor y más accesible producción, así como los aspectos que no se tomaron en cuenta, principalmente la fase de aireación y capacidad de cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

Arena, A., Maugeri, T. L., Pavone, B., Iannello, D., Gugliandolo, C., & Bisignano, G. (2006). Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant Bacillus licheniformis. International immunopharmacology, 6(1), 8–13. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.07.004

Abdel-Aziz MS, Hamed HA, Mouafi FE, Gad AS. (2012).Acidic pH-shock induces the production of an exopolysaccharide by the fungus Mucor rouxii: Utilization of Beet-molasses. New York Sci J.;5(2):52–61.

Andrade, Jenny Patricia, Gómez A, Claudia Marcela, Barbosa B, Helber de J, Castellanos H, Leonardo, & Osorno R, Oscar E. 2010. Preformulation study for the development of a polymer-based gel with mucoadhesive propierties for its use in allelopathy assays in marine invertebrates. Acta Biológica Colombiana, 15(1), 87-104.

Álvarez. M. 2004, ‘’La industria de los surfactantes: Tendencias mundiales y perspectivas para Colombia’’. Palmas, Vol. 25, No. Especial, Tomo I, pp.340-353. 2004. URL. Disponible: http://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/1050

Arechiga-Carvajal E, Ruiz-Herrera J. The RIM101/pacC Homologue from the Basidiomycete Ustilago maydis Is Functional in Multiple pH-Sensitive Phenomena. Eukaryotic Cell. 2005;4:999–1008.

Bauer, R., Begerow, D., Oberwinkler, E., Piepenbring, M., & Berbee, M. L. 2001. Ustilaginomycetes. Systematics and Evolution, 57–83. doi:10.1007/978-3-662-10189-6_3

Bonaterra A, Badosa E, Cabrefiga J, Frances J, Montesinos E. 2012. Prospects and limitations of microbial pesticides for control of bacterial and fungal pomefruit tree diseases. Trees (Berl West) 2012;26:215–226

C. Jiang, M. Wang, J. Liu, D. Gan, X. Zeng, 2011, Extraction, preliminary characterization, antioxidant and anticancer activities in vitro of polysaccharides from Cyclina sinensis, Carbohydr. Polym. 84 (3) 851–857.

C. P., Choi, J. W. and Yun, J. W. 2003. Production and molecular characteristics of four groups of exopolysaccharides from submerged culture of Phellinus gilvus. J. Appl. Microbiol. 94: 707-719.

C. Li, X. Li, L. You, X. Fu, R.H. Liu,2017, Fractionation, preliminary structural characterization and bioactivities of polysaccharides from Sargassum pallidum, Carbohydr. Polym. 155 ,261–270.

Cheng, K.C., Demirci, A., Catchmark, J.M., 2011. Pullulan: biosynthesis, production, and applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 92, 29–44

Chrzanowski, L.; Ławniczak, L.; Czaczyk, K. 2012. Why do microorganisms produce rhamnolipids? World J. Microbiol. Biotechnol. 2012, 28, 401–419.

Chrzanowski, L.; Owsianiak, M.; Szulc, A.; Marecik, R.; Piotrowska-Cyplik, A.; Olejnik-Schmidt, A.K.; Staniewski, J.; Lisiecki, P.; Ciesielczyk, F.; Jesionowski, T.; et al. 2011. Interactions between rhamnolipid biosurfactants and toxic chlorinated phenols enhance biodegradation of a model hydrocarbon-rich effluent. Int. Biodeterior. Biodegrad., 65, 605–611. [CrossRef]

Da W, Shao J, Li Q, Shi G, Wang T, Wu D and Wang C (2019) Physical Interaction of Sodium Houttuyfonate With β-1,3-Glucan Evokes Candida albicans Cell Wall Remodeling. Front. Microbiol. 10:34. doi: 10.3389/fmicb.2019.00034

Decote-Ricardo, D., LaRocque-de-Freitas, I. F., Rocha, J. D. B., Nascimento, D. O., Nunes, M. P., Morrot, A., … Freire-de-Lima, C. G. (2019). Immunomodulatory Role of Capsular Polysaccharides Constituents of Cryptococcus neoformans. Frontiers in Medicine, 6. doi:10.3389/fmed.2019.00129

Fang, Q. H. and Zhong, J. J. 2002. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of Ganoderma lucidum. Process Biochem. 37: 769-774. 37.

Fonseca-García C, López MG, Aréchiga-Carvajal ET, Ruiz-Herrera J. 2011. A novel polysaccharide secreted by pal/rim mutants of the phytopathogen fungus Ustilago maydis. Carbohydr Polym 86:1646–1650

Goettel MS, Koike M, Kim JJ, Aiuchi D, Shinya R, Brodeur J. 2008. Potential of Lecanicillium spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. J Invertebr Pathol 98:256–261

Guillamon E, Garcia-Laufente A, Lozano M, D'Arrigo M, Rostagno MA, Villares A, Martinez JA .2010. Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. Fitoterapia 81:715–723

Hozova, L. Kuniak, B. Kelemenova, Application of beta-D-glucans isolated from mushrooms Pleurotus ostreatus (pleuran) and Lentinus edodes (lentinan) for increasing the bioactivity of yoghurts, Czech J. Food Sci. -UZPI (Czech Republic) 22 (2004) 204–214.

Hwang, H. J., Kim, S. W., Choi, J. W. and Yun, J. W. 2003. Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of Phellinus linteus KCTC 6190. Enzyme Microb. Technol. 33: 309-319.

Jala, R. C. R., Vudhgiri, S., & Kumar, C. G. (2022). A comprehensive review on natural occurrence, synthesis and biological activities of glycolipids. *Carbohydrate Research*, 108556.

Jiménez-Peñalver, P., Rodríguez, A., Daverey, A., Font, X.,& Gea, T. (2019). Use of wastes for sophorolipids production as a transition to circular economy: state of the art and perspectives. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. doi:10.1007/s11157-019-09502-3

K. N. Timmis (ed.), 2010. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, DOI 10.1007/978-3-540-77587-4_291

Kan, L., Chai, Y., Li, X., & Zhao, M. 2019. Structural analysis and potential anti-tumor activity of Sporisorium reilianum (Fries) polysaccharide. International Journal of Biological Macromolecules. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.228

Kayanna, N., Suppavorasatit, I., Bankeeree, W., Lotrakul, P., Punnapayak, H., & Prasongsuk, S. (2022). Production of prebiotic aubasidan-like β-glucan from Aureobasidium thailandense NRRL 58543 and its potential as a functional food additive in gummy jelly. LWT - Food Science and Technology, 163(Complete). https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113617

Khan, mohd & Singh, Brijdeep & Cameotra, Swaranjit. (2014). Biological Applications of Biosurfactants and Strategies to Potentiate Commercial Production. 10.1201/b17599-16.

Kim HO, Lim JM, Joo JH, et al. 2005. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by Agrocybe cylindracea. Bioresource Technol.;96(10):1175–82.

Kim HS, Kim JY, Kang JS, Kim HM, Kim YO, Hong IP, Lee MK, Hong JT, Kim Y, Han S-B. 2010.Cordlan polysaccharide isolated from mushroom Cordyceps militaris induces dendritic cell maturation through toll-like receptor for signalling. Food Chem Toxicol 48(7):1926–1933. doi:10.1016/j.fct.2010.04.036

Kim, S. W., Hwang, H. J., Xu, C. P., Na, Y. S., Song, S. K. and Yun, J. W. 2002. Influence of nutritional conditions on the mycelail growth and exopolysaccharide production in Paecilmyces sinclairii. Lett. Appl. Microbiol. 34: 389-393.

Kim, S. W., Xu, C. P., Hwang, H. J., Choi, J. W., Kim, C. W. and Yun, J. W. 2003. Production and characterization of exopolysaccharides from an enthomopathogenic fungus Cordyceps militaris NG3. Biotechnol. Prog. 19: 428-435. 36.

Kitamoto D, Isoda H, Nakahara T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants--from energy-saving materials to gene delivery carriers. J Biosci Bioeng. 2002;94(3):187-201. doi: 10.1263/jbb.94.187. PMID: 16233292.

Kozarski M, Klaus A, Niksic M, Jakovljevic D, Helsper JPFG, Van Griensven LJLD .2011. Antioxidative and immunomodulating activities of polisaccharide extracts of the medicinal mushrooms Agaricus bisporus, Agaricus brasieliensis, Ganoderma lucidium and Phellinus linteus. Food Chem 129:1667–1675. doi:10.1016/ j.foodchem.2011.06.029

Kozarski MS, Klaus AS, Niksic M, Van Griensven LJLD, Vrvic ´ MM, Jakovljevic ´ DM . 2014, Polysaccharides of higher fungi: biological role, structure and antioxidative activity. Hem Ind 68(3):305–320. doi:10.2298/HEMIND121114056K.

Kaur R, Riar CS. Sensory, rheological and chemical characteristics during storage of set type full fat yoghurt fortified with barley β-glucan. J Food Sci Technol. 2020 Jan;57(1):41-51. doi: 10.1007/s13197-019-04027-7. Epub 2019 Aug 28. PMID: 31975706; PMCID: PMC6952514.

L. Shen, J. Zhu, J. Lu, Q. Gong, M. Jin, X. Long. 2019. Isolation and purification of biosurfactant mannosylerythritol lipids from fermentation broth with methanol/water/n-hexane .Sep. Purif. Technol., pp. 1-8

Lee JS, Kwon JS, Yun JS, Pahk JW, Shin WC, Lee SY, Hong EK. 2010. Structural characterization of immunostimulating polysaccharide from cultured mycelia of Cordyceps militaris. Carbohydr Polym 80:1011–1017

Lee DH, Kim HW.2014, Innate immunity induced by fungal b-glucans via dectin-1 signaling pathway. Int J Med Mushrooms ;16:1-16.

Liang, M.-H., Zhu, J., & Jiang, J.-G. (2018). High-value bioproducts from microalgae: strategies and progress. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 01–53. doi:10.1080/10408398.2018.1455030

Lim JM, Kim SW, Hwang HJ, et al. 2004 .Optimization of medium by orthogonal matrix method for submerged mecelial culture and exopolysaccharide production in Collybia maculate. Appl Biochem Bio

Lindequist U, Niedermeyer THJ, Julich WD. 2005. The pharmacological potential of mushrooms. 3:285–299

M.Kambourova,R.Mandeva,D.Dimova,A.Poli,B.Nicolaus,G.Tommonaro,2009, Production and characterization of a microbial glucan, synthesized by Geobacillus tepidamans V264 isolated from Bulgarian hot spring, Carbohydr. Polym. 77 (2) 338–343.

Mahapatra, S., and Banerjee, D. 2013. Fungal exopolysaccharide: production, composition and applications. *Microbiol. Insights* 6, 1–16. doi: 10.4137/mbi.s10957

Maribel CM, Humberto HS, Gustavo FGL, et al 2012. Production and partial characterization of an exopolysaccharide from Ustilago maydis in submerged culture. African J Biotechnol. ;11:7079–87

Market data Forecast. 2019.Global Beta-Glucan Market by Source (Cereal, Mushroom, Yeast, Seaweed), Application (Food & Beverages, Personal Care, Pharmaceuticals, Animal Feed), Category (Soluble, Insoluble), Regional analysis- Global Industry Analysis, Forecast, Trends and Market Size and Forecast to 2025, ID: 2300 https://www.marketdataforecast.com/market-reports/beta-glucan-market

Matsumura, S., Kawamura, Y., Yoshikawa, S., Kawada, K., & Uchibori, T. (1993). Surface activities, biodegradability and antimicrobial properties of glucosamine derivatives containing alkyl chains. Journal of the American Oil Chemists' Society, 70(1), 17–22. doi:10.1007/bf02545361

Morita, T., Konishi, M., Fukuoka, T. et al. Discovery of Pseudozyma rugulosa NBRC 10877 as a novel producer of the glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, based on rDNA sequence. Appl Microbiol Biotechnol 73, 305–313 (2006). https://doi.org/10.1007/s00253-006-0466-7

Mulligan C, Cooper D, Neufeld R. 1984,Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. J Fermentation Technol.;62(4):311–314.

Mulligan, C.N.; Wang, S. 2004, Remediation of a heavy metal contaminated soil by a rhamnolipid foam. In Geoenvironmental Engineering: Integrated Management of Ground water and Contaminated Land; Thomas Telford: London, UK, pp. 544–551.

Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Ravi, T. K., & Sivachidambaram, P. 2008. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. Current Science, 00113891 , 94(6).

Narendra Kumar, P. et al., Statistical optimization of antifungal iturin A production from

Bacillus amyloliquefaciens RHNK22 using agro-industrial wastes. Saudi Journal of Biological Sciences (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.09.014

Nachtigall, C., Berger, C., Kovanović, T., Wefers, D., Jaros, D., & Rohm, H. (2019). Shear induced molecular changes of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Food Hydrocolloids, 97, 105181. doi:10.1016/j.foodhyd.2019.10518

Ochoa-Loza, F.J.; Artiola, J.F.; Maier, R.M. 2001. Stability constants for the complexation of various metals with a rhamnolipid biosurfactant. J. Environ. Qual, 30, 479–485.

Osinska-Jaroszuk M, Jaszek M, Mizerska-Dudka M, Blachowicz A, Rejczak T, Janusz G, Wydrych J, Polak J, Jarosz-Wilkołazka A, Kandefer-Szerszen M, 2014,Exopolysaccharide from Ganoderma applanatum as a promising bioactive compound with cytostatic and antibacterial properties. BioMed Res Int 2014:1–10. doi:10.1155/2014/743812

Osinska-Jaroszuk, A. Jarosz-Wikolazka, J. Jaroszuk-Scisel, K. Szalapata, A. Nowak, M. Jaszek, et al et al., 2015. Extracellular polysaccharides from Ascomycota and Basidiomycota: production conditions, biochemical characteristics, and biological properties, World Journal of Microbiology & Biotechnology, pp. 1823-1844

Osinska-Jaroszuk, M., Jarosz-Wilkołazka, A., Jaroszuk-Sciseł, 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 J. Microbiol. Biotechnol. 31, 1823–1844.

Ostos-Ortíz, Olga Lucía, Rosas-Arango, Sonia Marcela, & González-Devia, Johanna Lizeth. 2019. Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos. Nova, 17(31), 129-163.

P. Ruas-Madiedo, J. Hugenholtz, P. Zoon, 2002, An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, Int. Dairy J. 12 (2) 163–171.

Papaspyridi L-M, Zerva A, Topakas E (2018) Biocatalytic synthesis of fungal β-glucans. Catalysts 8(274):1–23. https://doi.org/10.3390/catal8070274.

Park, KS., Park, S., Jung, I.C., Ha, H.C., Kim S.H. and Lee, J.S. 1994. Production of protein-bound polysaccharides by solid- state fermentation of *Coriolus versicolor*. Kor. J. Mycol. 22: 184-189.

Palacios Lozano M, Moro C, D'Arrigo M, Rostagno MA, Martinez JA, Garcia-Lafuente A, Guillamon E, Villares A , 2011,Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushroom. Food Chem 128:674–678. doi:10.1016/j. foodchem.2011.03.085

Peña D. Antonio et. al, 2007, Bioquimica, 2a ed., Editorial Limusa SA de CV. pp: 143-149.

Pochana vanich, W.2002, Suntornsuk, Fungal chitosan production and its characterization, Lett. Appl. Microbiol. 35 17–21.

Prajapati, V.D., Jani, G.K., Khanda, S.M., 2013. Pullulan: An exopolysaccharide and its various applications. Carbohydr. Pol. 95, 540–549

Rosenberg, E. 2010. Microbial biosurfactants. Crit Rev Biotechnol 3:109-132.

Rosenberg, E., & Ron, E. Z. 1999. High-and low-molecular-mass microbial surfactants. Applied Microbiology and Biotechnology, 52 (2), 154–162.

Roukas T, Liakopoulou-Kyriakides M. 1999. Production of pullulan from beet molasses by Aureobasidium pullulans in a stirred tank fermenter. J Food Eng ;40(1–2):89–94.

Ruiz-Herrera J, León CG, Guevara-Olvera L, Carabez-Trejo A .1995. Yeast-mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of Ustilago maydis. Microbiology 141:695–703

Sandford PA. Exocellular, microbial polysaccharides. 1979. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Volume 36. Academic press, Inc;. 1979:265–313. ISBN 0-12-007236-X.

Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., and Sarubbo, L. A., 2016. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 401. doi: 10.3390/ijms17030401

Sánchez-Arreguin, J. A., Ruiz-Herrera, J., Mares-Rodriguez, F. J., León-Ramírez, C. G., Sánchez-Segura, L., Zapata-Morín, P. A., Coronado-Gallegos, J., & Aréchiga-Carvajal, E. T. (2021). Acid pH Strategy Adaptation through NRG1 in Ustilago maydis. Journal of fungi (Basel, Switzerland), 7(2), 91. https://doi.org/10.3390/jof7020091

Shen L., J. Zhu, J. Lu, Q. Gong, M. Jin, X. Long, 2019.Isolation and purification of biosurfactant mannosylerythritol lipids from fermentation broth with methanol/water/n-hexane, Sep. Purif. Technol. 219.1–8.

Shan Gao, Weiping Song, and Mingxin Guo. 2020.Industrial Biotechnology .http://doi.org/10.1089/ind.2019.0033

Sharma D., 2016,Biosurfactants in Food, SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition, DOI 10.1007/978-3-319-39415-2_2

Sharma, D., & Singh Saharan, B.2014. Simultaneous production of biosurfactants and bacteriocins by probiotic Lactobacillus casei MRTL3. International Journal of Microbiology, 698713.

Shih, I. L., Pan, K. and Hsieh, C. 2006. Influence of nutritional components and oxygen supply on the mycelial growth and bioactive metabolites production in submerged culture of Antrodia cinnamomea. Process Biochem. 41: 1129-1135. 38.

Shu Ch, Lung M .2004.Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by Antrodia camphorata in batch cultures. Process Biochem 39:931–937. doi:10.1016/ S0032-9592(03)00220-6

Singh, A., Van Hamme, J. D., & Ward, O. P. 2007. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. Biotechnology Advances, 25 (1), 99–121

Singh, P., Patil, Y. and Rale, V.,2019, Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. J Appl Microbiol, 126: 2-13. doi:10.1111/jam.14057

Tang YJ, Zhong JJ. Exopolysaccharide biosynthesis and related enzyme activities of the medicinal fungus, Ganoderma lucidum, grown on lactose in a bioreactor. Biotechnol Lett. 2002;24(12):1023–

Tiwary, M., & Dubey, A. K. (2018). Characterization of Biosurfactant Produced by a Novel Strain of Pseudomonas aeruginosa , Isolate ADMT1. Journal of Surfactants and Detergents, 21(1), 113–125. doi:10.1002/jsde.12021

Tyagi, P., Chandra, S., Saraswat, B. S., & Sharma, D. 2015. Design, spectral characterization, DFT and biological studies of transition metal complexes of Schiff base derived from 2-aminobenzamide, pyrrole and furan aldehyde. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 143 , 1–11.

Valverde ME, Paredes-Löpes O, Pataky JK, Guevara-Lary F ,1995,Huitlacoche (Ustilago maydis) as a food source — biology, composition, and production. CRC Crit Rev Food Sci Nutr 35: 191–229.

Voet Donald & Voet Judith, 2006, Bioquimica, 3a ed., Editorial Medica Panamericana,Buenos Aires: Medica Panamericana. pp: 377- 378.

Walter V, Syldatk C, Hausmann R ,2010, Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. Adv Exp Med Biol 672:1–13

Xu CP, Yun JW. 2004,Influence of aeration on the production and the quality of the exopolysaccharides from Paecilomyces tenuipes C240 in a stirred-tank fermenter. Enzyme Microb Tech ;35(1):33–9.

YAÑEZ, O. and WONG, A. BSs microbianos, producción potencial con residuos agroindustriales de Chiapas. BioTecnología. 2013, 17 (3), 13-28.

Z. Shi, X. Gao, M.W. Ullah, S. Li, Q. Wang, G. Yang,2016, Electroconductive natural polymer-based hydrogels, Biomaterials 111 ,40–54.

Z. Xu, G. Chen, L. Xue, H. Zhang, J. Wang, H. Xiang, K. Zheng. 2019. Isolation, structural characterizations and bioactivities of exopolysaccharides produced by Bacillus licheniformis. Int. J. Biol. Macromol., 141 , pp. 298-306, 10.1016/j.ijbiomac.2019.08.217