

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**IDENTIFICACIÓN Y PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS
BIOACTIVOS EN LA FERMENTACIÓN SUMERGIDA DE
PENICILLIUM CRUSTOSUM Y SU ESCALAMIENTO PARA SU
POTENCIAL APLICACIÓN COMO PLATAFORMA EN UNA
BIORREFINERÍA**

POR:

M.C. ARELY SUGEY NÚÑEZ SERRANO

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA APLICADA**

Octubre 2025

Identificación y producción de compuestos bioactivos en la fermentación sumergida de *Penicillium crustosum* y su escalamiento para su potencial aplicación como plataforma en una biorrefinería

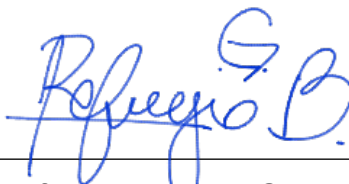
Los miembros del comité de tesis aprueban la tesis realizada por la alumna:

Arely Sugely Núñez Serrano, con matrícula 1558240, como opción al grado de Doctorado en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

Firmas:



Dra. Alcione García González



Dr. Refugio Bernardo García Reyes

Dra. María Elena Cantú Cárdenas

Dr. Gustavo Raúl Reyna Martínez

Dra. Sara Elena Solís Pereira

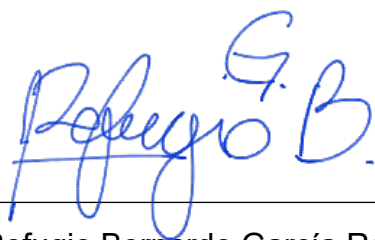
Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Subdirectora de Estudios de Posgrado

Identificación y producción de compuestos bioactivos en la fermentación sumergida de *Penicillium crustosum* y su escalamiento para su potencial aplicación como plataforma en una biorrefinería

Firmas:



Dra. Alcione García González



Dr. Refugio Bernardo García Reyes

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por las facilidades e instalaciones brindadas.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada durante el programa de doctorado.

Al Laboratorio de Electroquímica y Biocatálisis Ambiental y al Laboratorio de Tratamiento de Aguas por las instalaciones brindadas para la realización de este proyecto. Dra. Alcione García González y Dr. Bernardo García Reyes, por la dirección, asesoramiento y apoyo en la realización de este proyecto de investigación.

Al Laboratorio de Análisis Instrumental del Departamento de Investigación en Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, por las instalaciones permitidas durante la estancia de investigación, en especial al Dr. Juan Alberto Ascacio Valdés y al Dr. Cristóbal Noe Aguilar.

Al comité tutorial por las observaciones y asesoramiento en el desarrollo de este trabajo de investigación.

DEDICATORIA

*A QUIENES HAN ESTADO PRESENTES EN CADA ETAPA DE ESTE CAMINO, CUYA
PRESENCIA E INCONDICIONAL APOYO HICIERON POSIBLE ESTE LOGRO Y MAS LIGERO
EL RECORRIDO.*

RESUMEN

Arely Sugey Núñez Serrano

Fecha de graduación:

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de estudio: **Identificación y producción de compuestos bioactivos en la fermentación sumergida de *Penicillium crustosum* y su escalamiento para su potencial aplicación como plataforma**

Número de
páginas:

Candidata para el grado de Doctorado en Ciencias con
Orientación en Microbiología Aplicada

Área de Estudio: Microbiología Aplicada

Propósito y Método de Estudio: El aprovechamiento de residuos agroindustriales ha promovido procesos industriales sostenibles, como las biorrefinerías, donde microorganismos transforman sustratos en productos comercializables. En este estudio, se evaluó la producción de hidrolasas y de antimicrobianos a partir de *Penicillium crustosum*, utilizando agro residuos como cosustrato, y se llevó a cabo el escalamiento de la fermentación sumergida mediante un modelo de similitud geométrica. Se cuantificó la actividad de pectinasas, xilanasas y celulasas para identificar el mejor residuo inductor, optimizando la producción individual como del cóctel hidrolítico. Posteriormente, el cóctel fue semi purificado por ultrafiltración con membrana, determinándose el peso molecular y la actividad de cada enzima mediante SDS-PAGE y zimograma. Además, se evaluó el tiempo de fermentación y el uso del cosustrato en la producción de compuestos con actividad frente a *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*. Finalmente, los compuestos bioactivos con actividad antibiótica fueron identificados mediante RP-HPLC-ESI-MS, obteniendo principalmente compuestos fenólicos, flavonoides y ácidos metoxicinámicos, reportados por su actividad antimicrobiana.

La cáscara de limón resultó ser el mejor cosustrato para la producción de pectinasas y celulasas, mientras que el salvado de trigo fue el más eficiente para la producción de xilanasas. Las condiciones óptimas para la producción del coctel hidrolítico se establecieron a 45°C, pH 5.0 y 2.5 g/L de MnSO₄ y 2% de cáscara de limón (p/v). Se identificaron pesos moleculares de 20 kDa para xilanasas, 25 kDa para pectinasas, y 40 y 85 kDa correspondientes a isoformas de celulasas.

No se detectó actividad antifúngica frente a *C. albicans*, sin embargo, se observó actividad antimicrobiana ante *E. coli* y *S. aureus*. La concentración mínima inhibitoria (CMI) contra *S. aureus* se encontró en la muestra sin cosustrato a las 120 horas de fermentación, con un valor de 2.5 mg/mL, mientras que frente a *E. coli*, se detectó en el extracto con cosustrato a las 144 horas, con un valor de 2.01 mg/mL.

Contribuciones y Conclusiones: *Penicillium crustosum* fue identificado como un potente productor de enzimas hidrolíticas y compuestos con actividad antimicrobiana en un sistema de fermentación sumergida con cosustrato, logrando altos rendimientos en tiempos cortos de proceso y estableciendo una base para el desarrollo de una biorrefinería. Se identificó la producción de un cóctel hidrolítico parcialmente purificado que contiene pectinasas, xilanasas y celulasas, así como compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana frente a *E. coli* y *S. aureus*. Además, el sistema de producción fue escalado en tanques de agitación a volúmenes operacionales de 200 mL y 2 L, lo que sugiere su posible aplicación a nivel industrial.

FIRMA DEL ASESOR: _____



Dra. Alcione García González

ÍNDICE

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	18
2. MARCO TEÓRICO	21
2.1 Biorrefinería: Alternativa sostenible.....	21
2.2 Residuos agroindustriales como materia prima en la biorrefinería	22
2.3 Revalorización de la cáscara de limón como materia prima	24
2.4 Revalorización del salvado de trigo como materia prima	26
2.5 Producción de enzimas bajo concepto de biorrefinería	27
2.6 Enzimas pectinolíticas.....	29
2.7 Enzimas xilanasas.....	31
2.8 Enzimas celulasas.....	33
2.9 Microorganismo productor: <i>Penicillium crustosum</i>.....	35
2.10 Microorganismos patógenos.....	37
2.11 <i>Escherichia coli</i>.....	39
2.12 <i>Staphylococcus aureus</i>.....	40
2.13 <i>Candida albicans</i>.....	42
2.14 Resistencia bacteriana	43
3. ANTECEDENTES	45
4. ANÁLISIS CRÍTICO DE LA LITERATURA.....	48
5. APORTACIÓN CIENTÍFICA.....	48
6. HIPÓTESIS	48
7. OBJETIVO GENERAL.....	48
8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
9. MATERIALES Y MÉTODOS	49
9.1 Material y reactivos.....	49
9.2 Tratamiento y caracterización de la materia prima	50
9.3 Microorganismo y condiciones de crecimiento	50
9.4 Condiciones de cultivo para la producción enzimática	51
	10

9.5	Determinación de la actividad enzimática y análisis de la proteína extracelular	51
9.6	Análisis estadístico	52
9.7	Optimización de la producción enzimática	52
9.8	Optimización de la producción del cóctel hidrolítico.....	55
9.9	Purificación enzimática parcial	55
9.10	Determinación del peso molecular por SDS-PAGE y zimograma.....	55
9.11	Liofilización del cóctel hidrolítico parcialmente purificado	56
9.12	Evaluación de micotoxinas en condiciones de fermentación.....	57
9.13	Determinación de los parámetros cinéticos.....	57
9.14	Condiciones de cultivo para la producción de compuestos antimicrobianos ..	58
9.15	Extracción de los compuestos antimicrobianos	58
9.16	Fraccionamiento de los extractos con actividad antimicrobiana	58
9.17	Semi purificación de las muestras crudas con actividad antimicrobiana	59
9.18	Determinación de la actividad antimicrobiana	59
9.19	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	60
9.20	Análisis por cromatografía líquida de alta resolución acoplado a masas (RP-HPLC-ESI-MS).....	60
9.21	Escalamiento de la fermentación sumergida con cosustrato para la producción del cóctel hidrolítico y de los compuestos con actividad ante <i>E. coli</i>	61
10	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
10.1	Evaluación del efecto del uso de cosustratos en la producción enzimática pectinolítica	62
10.2	Análisis estadístico en la producción de enzimas pectinasas	68
10.3	Evaluación del efecto del uso de cosustrato en la producción de enzimas xilanasas	69
10.4	Análisis estadístico en la producción de enzimas xilanasas	72
10.5	Evaluación del efecto del uso de cosustrato en la producción de celulasas	75
10.6	Análisis estadístico en la producción de enzimas celulasas	77
10.7	Optimización de la producción de enzimas pectinasas mediante un diseño central compuesto 2 ³	78
10.8	Optimización de la producción de enzimas xilanasas mediante un diseño central compuesto centrado a las caras 2 ⁴ utilizando salvado de trigo como cosustrato	82
10.9	Optimización de la producción de enzimas celulasas mediante un diseño central compuesto 2 ³ utilizando cáscara de limón como cosustrato	87

10.10	Optimización de la producción del cóctel hidrolítico	90
10.11	Semi purificación enzimática por ultrafiltración con membrana	95
10.12	Determinación del peso molecular por SDS-PAGE y Zimograma.....	96
10.13	Reactivación de las hidrolasas liofilizados	99
10.14	Evaluación de la micotoxina Penitrem A en condiciones de producción del cóctel hidrolítico	100
10.15	Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos extracelulares en las muestras crudas	101
10.16	Efecto del tiempo de fermentación y el uso del cosustrato en la producción de compuestos antimicrobianos.....	103
10.17	Actividad antimicrobiana de las muestras crudas, extraídas, fraccionadas y semipurificadas contra <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>, <i>MRSA</i> y <i>P. aeruginosa</i>	106
10.18	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las muestras semi purificadas.....	108
10.19	Identificación de compuestos por RP-HPLC-ESI-MS.....	109
10.20	Escalamiento de la producción del coctel hidrolítico y de los compuestos con actividad contra <i>E. coli</i>	111
10.21	Determinación de los parámetros cinéticos	113
11	CONCLUSIONES.....	115
12	DISPOSICIÓN DE LOS RESIDUOS GENERADOS.....	116
13	REFERENCIAS.....	117

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación y principales productos en la biorrefinería.....	18
Tabla 2. Clasificación de las enzimas según el mecanismo de reacción	27
Tabla 3 Clasificación de enzimas pectinolíticas de acuerdo con el mecanismo de reacción (Mahmoodi et al., 2017).	30
Tabla 4. Clasificación de las enzimas xilanasas de acuerdo con el mecanismo de reacción, (Bhardwaj & Verma, 2021).	32
Tabla 5. Clasificación de las enzimas celulasas de acuerdo con el mecanismo de reacción, (Valle-Pérez et al., 2021).	34
Tabla 6 Variables experimentales para DCCCC utilizado en la optimización de la producción de pectinasas.....	53
Tabla 7 Variables independientes y valores seleccionados para el DCCCC para la optimización de la producción de celulasas	53
Tabla 8 Variables independientes para el DCCCC 2 ⁴ utilizado para la optimización de la producción de xilanasas	53
Tabla 9 Variables independientes para el DCCCC 2 ³ utilizado para la optimización del cóctel hidrolítico	55
Tabla 10. Análisis estadístico de varianza (ANOVA) de una vía de la actividad pectinolítica variando los cosustratos mediante fermentación sumergida, R ² 0.9469	
Tabla 11. Análisis estadístico de varianza (ANOVA) de una vía de la actividad xilanolítica variando los cosustratos mediante fermentación sumergida	73
Tabla 12. Análisis estadístico de varianza (ANOVA) de una vía de la actividad xilanolítica variando los cosustratos mediante fermentación sumergida	78
Tabla 13. DCCCC para las tres variables independientes, la actividad enzimática se observa como respuesta para la producción óptima de pectinasas	79
Tabla 14. DCCCC con cuatro variables independientes para la producción óptima de enzimas xilanasas	82
Tabla 15. DCCCC 2 ³ , evaluando los valores independientes para la producción óptima de enzimas celulasas	87
Tabla 16. DCCCC 2 ³ y resultados experimentales de la producción de cóctel hidrolítico presentados como actividad enzimática (U/mL)	91
Tabla 17. Actividad antimicrobiana de las muestras crudas producidas por P. crustosum evaluado por la zona de inhibición ante microorganismos patógenos	103
Tabla 18. Análisis de Varianza (ANOVA) del tiempo de fermentación con cosustrato en la producción de compuestos bioactivos frente a E. coli; R ² 0.916, $\alpha=0.05$	105
Tabla 19. Análisis de Varianza (ANOVA) del tiempo de fermentación sin cosustrato en la producción de compuestos bioactivos frente a S. aureus; R ² 0.886 $\alpha=0.05$	105
Tabla 20. Inhibición de crecimiento de E. coli, S. aureus, MRSA y P. aeruginosa por la muestra cruda, extraída, fraccionada y semipurificada	108
Tabla 21. Valores de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) contra Staphylococcus aureus, Escherichia coli, MRSA y Pseudomonas aeruginosa	109

Tabla 22. Compuestos identificados por RP-HPLC-ESI-MS de los extractos fermentativos de <i>P. crustosum</i>	111
Tabla 23. Escalamiento de la producción del cóctel hidrolítico en biorreactores de diferentes volúmenes, producción de pectinasas, celulasas y xilanasas evaluadas en tres sistemas: 100 mL, biorreactor de 200 mL y 2 L.....	113

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Clasificación de la biorrefinería basado según la materia prima utilizada y el producto generado, (Liu et al., 2021).	21
Fig. 2 Estructura principal de la cáscara de limón, (Aina et al., 2012).	25
Fig. 3 Estructura y composición química general del salvado de trigo, (Martínez-Aispuro et al., 2016).	26
Fig. 4 Principales campos de aplicación de las enzimas hidrolíticas en la industria estimados en el año 2021, (Chapman et al., 2018).	29
Fig. 5 Evaluación del efecto del cosustrato en la producción de pectinasas con respecto al tiempo de fermentación.	64
Fig. 6 Cuantificación de la proteína extracelular producida por <i>P. crustosum</i> mediante fermentación sumergida variando los cosustratos.	67
Fig. 7 Determinación de la actividad pectinolítica específica por mg de proteína extracelular (U/mg) producida por fermentación sumergida variando los cosustratos.	68
Fig. 8 Análisis Tukey, comparación entre las medias de la actividad enzimática producida comparando los cosustratos, indica que existe diferencia significativa a α de 0.05.	69
Fig. 9 Evaluación del efecto del uso de agro residuos como cosustrato en la producción de xilanasas con respecto al tiempo de fermentación.	70
Fig. 10 Determinación de la actividad específica, actividad xilanolítica por mg de proteína producida por <i>P. crustosum</i> en fermentación sumergida variando los cosustratos.	72
Fig. 11 Análisis Tukey, comparación entre las medias de la actividad enzimática xilanolítica producida comparando los cosustratos, indica que existe diferencia significativa a α de 0.05.	74
Fig. 12 Evaluación del efecto del uso de agro residuos como cosustrato en la producción de enzimas celulasas con respecto al tiempo de fermentación.	75
Fig. 13 Determinación de la actividad específica, actividad xilanolítica por mg de proteína producida por <i>P. crustosum</i> en fermentación sumergida variando los cosustratos.	77
Fig. 14 Análisis Tukey, comparación entre las medias de la actividad enzimática de celulasas producida comparando los cosustratos, indica que existe diferencia significativa a α de 0.05.	78
Fig. 15 Gráfica de la superficie de respuesta y de contorno que muestra el efecto interactivo del A) pH y temperatura, B) temperatura y cofactor, C) pH y cofactor en la producción de pectinasas por <i>P. crustosum</i>	82
Fig. 16 Superficies de respuesta y de contorno del efecto interactivo entre A) pH y temperatura, B) temperatura y cofactor, C) pH y cofactor, D) temperatura y concentración de PDB, E) pH y concentración de PDB y F) cofactor y PDB en la producción de xilanasas por <i>P. crustosum</i>	86

Fig. 17 Gráficas de la superficie de respuesta del efecto interactivo entre A) pH y temperatura, B) temperatura y cofactor, C) pH y cofactor en la producción de celulasas por <i>P. crustosum</i>	90
Fig. 18 Gráficas de la superficie de respuesta y graficas de contorno que ilustra la interacción entre la temperatura y concentración del cofactor en la actividad de (A) pectinasas, (B) celulasas y (C) y xilanasas durante la optimización del cóctel hidrolítico.	94
Fig. 19 Determinación de la actividad hidrolítica de pectinasas, xilanasas y celulasas (U/mL) en las fracciones obtenidas mediante ultrafiltración bajo las condiciones óptimas de producción del cóctel hidrolítico (45°C, pH 5.5, 2.5 g/L MnSO ₄ , cáscara de limón al 2% p/s).	96
Fig. 20 (A) Electroforesis SDS-PAGE, Carril 1: marcador molecular, Carril 2: Cóctel hidrolítico parcialmente purificado (100-10 kDa), Carril 3: Pectinasa comercial de <i>A. niger</i> , Carril 4: Xilanasa comercial de <i>A. niger</i> , y Carril 5: Celulasa comercial de <i>A. niger</i> . (B) Zimograma que muestra la determinación de las actividades de las pectinasas, xilanasas y celulasas.	98
Fig. 21 Actividad enzimática posterior a la reactivación del cóctel hidrolítico parcialmente purificado liofilizado.	99
Fig. 22 Cromatogramas HPLC-UV a 296 nm de Penitrem A, cóctel hidrolítico parcialmente purificado, sobrenadante crudo y control negativo en condiciones óptimas de producción de hidrolasas.	100
Fig. 23 Efecto del extracto fermentativo con cosustrato y sin cosustrato en el crecimiento de (A) <i>E. coli</i> y (B) <i>S. aureus</i> . Sobrenadante sin cosustrato (Filtrado por membrana de 0.45 µm, 20 µL, 100% v/v), Sobrenadante con cosustrato (Filtrado por membrana de 0.45 µm, 20 µL, 100% v/v), Control positivo: estreptomicina (20 µL, 2 mg/mL, Control negativo: agua estéril (20 µL).	105
Fig. 27 Tasa de crecimiento de <i>P. crustosum</i> a condiciones óptimas de la producción del cóctel hidrolítico en cada sistema de producción con respecto al tiempo, donde $\mu = \ln X_2X_1/(t_2 - t_1)$, x = concentración celular (g/mL).	114

ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA

kDa: Kilodaltons

FTIR-ATR: Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada

mL: Mililitros

μ M: Micro mol

μ g: Microgramo

U: Unidades de actividad enzimática

mg: Miligramos

PDA: Agar papa dextrosa

PDB: Caldo papa dextrosa

CMI: Concentración mínima inhibitoria

μ m: Micrómetros

μ L: Microlitros

mM: Mili mol

nm: Nanómetros

UFC: Unidades formadoras de colonias

Rpm: Revoluciones por minuto

1. INTRODUCCIÓN

La industrialización, el crecimiento urbano y la constante explotación de recursos han acentuado la contaminación, convirtiéndola en un problema socioeconómico. El impacto negativo en el medio ambiente causado por la explotación de recursos no renovables, como las fuentes fósiles, ha impulsado el desarrollo de alternativas naturales y tecnologías verdes para la generación de energía y la producción de productos con valor agregado.

El aprovechamiento de recursos renovables, como la biomasa, y la valorización de residuos agroindustriales han favorecido la industrialización de procesos amigables con el medio ambiente para la obtención de productos comercializables mediante la bioconversión de sustratos a través de microorganismos, conceptualizado como “Biorrefinería” (Liu et al., 2021).

Según el tipo de materia prima utilizada y el producto obtenido, la biorrefinería se ha clasificado en tres generaciones (Tabla 1). En este contexto, se destaca que la segunda generación ofrece ventajas significativas, ya que aprovecha los recursos y residuos agroindustriales como materias primas, lo que lo convierte en un proceso económico, sostenible y amigable con el medio ambiente (Bhardwaj et al., 2021).

Tabla 1. Clasificación y principales productos en la biorrefinería

Generación	Materia prima	Producto
Primera	Maíz, semillas de girasol, cebada	Bioetanol, aceite vegetal, biodiesel
Segunda	Biomasa de plantas lignocelulósicas, cáscaras, bagazo, residuos municipales	Biocombustible, productos de valor agregado
Tercera	Biomasa acuática (microalga, cianobacteria y algas)	Biocombustible

La materia prima, compuesta mayoritariamente por compuestos lignocelulósicos, requiere un pretratamiento esencial (físico, químico o biológico) para romper la matriz lignocelulósica y acceder a compuestos monoméricos. Estos compuestos son luego aprovechados por microorganismos para la producción de producto de interés. Sin embargo, este proceso aumenta significativamente los costos de

producción y, por lo tanto, dificulta el escalamiento, lo que constituye una de las principales limitaciones y desventajas de la biorrefinería (Ferreira et al., 2019).

Una estrategia actual y propuesta en este proyecto es la combinación del pretratamiento con la producción de enzimas hidrolíticas fúngicas. Este enfoque tiene como objetivo aprovechar los azúcares fermentables y facilitar la generación de nuevos metabolitos secundarios de interés comercial (Bhardwaj et al., 2021).

La selección del microorganismo bioconvertidor es crucial, ya que evaluar su capacidad para generar compuestos relevantes es fundamental para una biorrefinería rentable. Si bien varios microorganismos, como bacterias y levaduras, han sido estudiados como potenciales productores de bioetanol y biodiesel, los hongos han sido reconocidos como los principales productores de enzimas y ácidos orgánicos (Chatterjee et al., 2022).

A través de fermentaciones sólidas y sumergidas, se ha evaluado la conversión de desechos agrícolas mediante reacciones biocatalíticas generadas por diversos hongos. Se ha reportado la síntesis de enzimas celulasas, hemicelulasas y xilanasas por *Aspergillus sp.* y *Rhizopus sp.*, debido a su capacidad de degradar compuestos lignocelulósicos presentes en el medio fermentativo (Valladares-Diestra et al., 2021). Se ha demostrado que el género *Penicillium*, perteneciente a los ascomicetos, es capaz de producir enzimas hidrolíticas, principalmente celulasas, β -glucosidasas, xilanasas y pectinasas, además de enzimas lipolíticas (Sinitsyn et al., 2020). Este complejo enzimático posee un alto valor comercial y es demandado por diversas industrias como la alimentaria, textil y farmacéutica.

El hongo filamentoso *Penicillium crustosum*, ha sido poco estudiado en la producción de biocompuestos y enzimas. Sin embargo, recientemente se ha reportado la producción de enzimas celulasas y xilanasas (Lunkes et al., 2019; Xiong et al., 2017). Además, tiene la capacidad de utilizar la xilosa y producir xilitol, que se emplea principalmente en la industria de alimentos como sustituto de azúcar (Chatterjee et al., 2022). Por otro lado, la especie *crustosum* también es productora de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas, citotóxicas y antibiofilm (Yu et al., 2019).

Por lo tanto, en este proyecto se propone identificar la producción de compuestos bioactivos y enzimáticos de interés industrial mediante la fermentación sumergida de *Penicillium crustosum* utilizando como agro residuos, con su posterior escalamiento y una potencial aplicación como plataforma en una biorrefinería.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Biorrefinería: Alternativa sostenible

Con el propósito de abordar el cambio climático y reducir la dependencia de recursos no renovables, como el petróleo, se ha impulsado el desarrollo de tecnologías alternativas que promuevan una economía sostenible basada en fuentes renovables. La biorrefinería emerge como una solución con el potencial de sustituir el uso de recursos fósiles por materia prima de origen vegetal, como “biomasa”, para la producción industrial.

A partir del concepto de refinería del petróleo, que separa el crudo en sus fracciones individuales, la biorrefinería ha evolucionado para integrar procesos de conversión de biomasa en sus componentes básicos. Esto permite la producción de productos químicos, biocombustibles y otros productos de valor agregado mediante la conversión microbiana (Liu et al., 2021).

La definición más reciente de biorrefinería, postulada por la Task 42 de la International Energy Agency (IEA), la describe como “el proceso sostenible de biomasa en un espectro de productos comercializables y energía”. Se estima que, a partir de una tasa de crecimiento anual del 8.9%, se alcanzaron aproximadamente 714,600 millones de dólares en el 2021 (Ferreira et al., 2019).

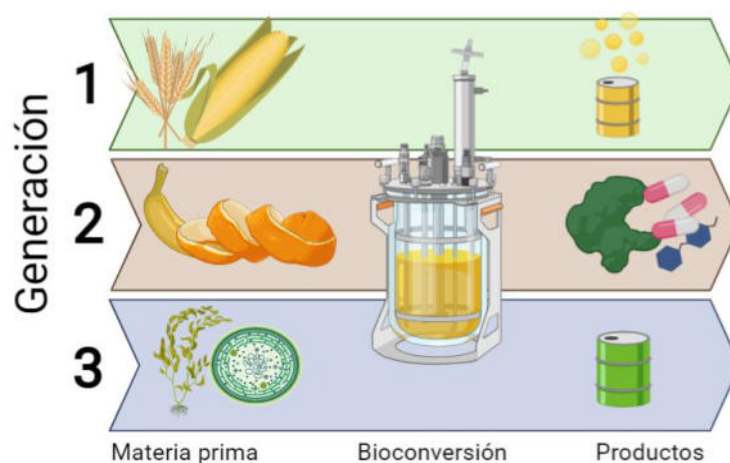


Fig. 1 Clasificación de la biorrefinería basado según la materia prima utilizada y el producto generado, (Liu et al., 2021).

De acuerdo con la materia prima y el producto la biorrefinería se clasifica en tres generaciones (Fig. 1). La primera generación se basa en el uso de materia cruda como semillas de girasol, maíz y cebada para la generación de biocombustibles, tales como bioetanol, biodiesel y aceites vegetales. Se ha demostrado que, a partir de esta tecnología, la emisión de gases y el consumo de energías fósiles se ha reducido. La segunda generación hace uso de biomasa lignocelulósica como materia prima, destacada por la revalorización de agro residuos como cáscaras, bagazos, desechos sólidos municipales y grasa animal para la generación de productos de valor agregado, como enzimas de interés industrial, fármacos y biocombustibles; se considera como la generación más eficiente considerando el aspecto económico y ecológico (Aguilar et al., 2021). La tercera generación, se caracteriza por el aprovechamiento de biomasa acuática, cianobacteria, macro y microalgas para la producción de aceites, biocombustibles (Liu et al., 2021).

2.2 Residuos agroindustriales como materia prima en la biorrefinería

La valorización de los residuos agroindustriales representa un paso significativo hacia un modelo circular de la economía, optimizando el uso de recursos y reduciendo el desperdicio, lo que a su vez disminuye el impacto ambiental, como la emisión de gases de efecto invernadero, y aumentando la rentabilidad industrial.

La materia prima destinada a la biorrefinería proviene de diferentes sectores, como los residuos sólidos municipales, los residuos de acuicultura y los residuos agrícolas. Los residuos agroindustriales son materia generados a partir del consumo directo de productos primarios o de industrialización, que ya no son útiles para el proceso de obtención original, pero que son aprovechables para generar otros productos de interés comercial. En el 2006, México generó aproximadamente 60.13 millones de toneladas de residuos orgánicos, de los cuales el 25% correspondía a bagazos de frutas y cereales (Pérez et al., 2021; Susana Saval, 2012).

La biomasa derivada de los residuos agroindustriales está compuesta principalmente por materia lignocelulósica, estructurado por celulosa, hemicelulosa y lignina, polímeros complejos que dificultan el acceso y la bioconversión por microorganismos, limitando así su aprovechamiento. Tradicionalmente, se utilizan

pretratamientos físicos, químicos, biológicos o combinaciones de estos para facilitar la biocatálisis, aunque el aumento de los pasos operativos eleva considerablemente los costos de producción (Chatterjee & Venkata Mohan, 2022). Los pretratamientos físicos, como la molienda y pirolisis, reducen el tamaño de las partículas, lo que permite un mayor rendimiento en la reacción hidrolítica. El uso de productos químicos, como ácidos y solventes, para solubilizar la celulosa y la hemicelulosa presenta desventajas debido a la formación de compuestos inhibitorios, altas temperaturas requeridas y la generación de contaminantes emergentes para el medio ambiente. El pretratamiento biológico se basa en el uso de enzimas ligninolíticas e hidrolíticas de origen microbiano para el proceso de deslignificación, presentando ventajas como alta eficiencia, bajo costo y es amigable con el medio ambiente. Sin embargo, para mejorar el rendimiento de hidrólisis, es necesario utilizar un conjunto de enzimas en este tipo de pretratamiento (Chatterjee & Venkata Mohan, 2022).

La composición estructural y química de la biomasa está estrechamente relacionada con el producto deseado y con la viabilidad económica del proceso. Por lo tanto, es de suma importancia realizar análisis para determinar la composición química cuali y cuantitativamente, con el fin de aprovechar al máximo los residuos orgánicos como materia prima.

La revalorización de los residuos agroindustriales para la bioconversión mediante microorganismos con el objetivo de obtener productos comerciales, como enzimas, es un tema de interés y estudio actual. El uso de residuos agroindustriales como sustratos o cosustratos permite un proceso más rentable y ecológico para la producción de enzimas microbianas (Falade, 2021).

Se han evaluado diferentes residuos agroindustriales, como los bagazos, como fuente de carbono para la producción o biosíntesis de enzimas hidrolíticas mediante fermentación con microorganismos fúngicos. Se ha observado un aumento significativo en el rendimiento de producción, ya que estos residuos están compuestos por carbohidratos, proteínas, lípidos y lignina, y dependiendo de sus características fisicoquímicas, pueden contener altos porcentajes de pectina,

celulosa y xilano, por lo cual cumplen una función nutritiva e inductora para la biosíntesis de metabolitos secundarios como las enzimas hidrolíticas (Paini et al., 2022).

En estudios previos, se ha evaluado el uso de bagazo de agave para la producción de celulasas y xilanasas, observando que *P. citrinum* alcanzó la mayor actividad de celulasa (10,112 U/kg de bagazo de agave) en comparación con *A. fumigatus* (7,347 U/kg de bagazo de agave). En contraste, en la producción de xilanasas, *A. fumigatus* fue el mejor productor enzimático (125,250 U/kg de salvado de trigo) en comparación con *P. citrinum*, donde la mayor actividad xilanolítica se encontró con bagazo de agave (28.974 U/kg) (Valle-Pérez et al., 2021). Se ha evaluado el uso de salvado de trigo con mazorca de maíz para la producción de celulasas mediante fermentación en estado sólido por *Penicillium sp.* FSDE15, observando la mayor actividad enzimática (endo celulasa 21.11 U/g y celulasa 1.29 U/g) a las 126 horas de fermentación, utilizando una proporción de 50% de los dos residuos agroindustriales como sustrato (Santos et al., 2021). La producción de pectinasas utilizando residuos agroindustriales como sustrato también ha sido objeto de estudio. Por ejemplo, *Aspergillus niger* registró la máxima actividad de exo-PG de 45 U/g en fermentación sólida utilizando cáscara de naranja como sustrato (Mahmoodi et al., 2017a). La producción de un conjunto de isoenzimas pectinolíticas mediante fermentación en estado sólido por *P. viridicatum* RFC3 utilizando una mezcla de bagazo de naranja y salvado de trigo (en proporción 1:1), registró la máxima actividad de 0.70 U/mL endo-PG y 8.90 U/mL exo-PG (Tokuishi et al., 2005).

2.3 Revalorización de la cáscara de limón como materia prima

El cultivo y la producción de frutos cítricos representa uno de los principales mercados en México, con una exportación de aproximadamente \$508 millones de dólares, destacándose el limón uno de los productos más demandados para la producción de jugos, saborizantes y jaleas (Manuel Vargas-Canales et al., 2017). Además, el limón es rico en fitocompuestos como carbohidratos, flavonoides, pigmentos, vitaminas y minerales.

A nivel mundial, se estima la producción de residuos cítricos alcanza alrededor de 40 millones de toneladas, mientras que en México la producción de cáscara de limón se estima en 396,000 toneladas por año. El principal valor agregado es el aprovechamiento y extracción de aceites esenciales y pigmentos. Sin embargo, las cáscaras cítricas contienen altas cantidades de polisacáridos complejos como la celulosa, hemicelulosa y pectina, esta composición química es útil y aprovechable como fuente de carbono en procesos de fermentación, permitiendo la revalorización de estos residuos y por lo tanto la generación de industrias verdes (Ruiz et al., 2012) (Sharma et al., 2019).

La cáscara cítrica constituye entre el 40% y el 55% del peso total del fruto (Fig. 2), y se compone de estructuras como el exocarpo, el albedo y el flavedo. La composición química de la cáscara varía según el tipo de fruto, la especie y las condiciones de cultivo. Se han caracterizado especies de cáscara de limón (*Citrus limon*), que registran un porcentaje de pectina del 16.71%, con un contenido de grupos metoxilo del 4.46 % y un pH de 4.1. En comparación, la cáscara de naranja (*Citrus sinensis*) presenta una concentración de pectina del 15.92%, un contenido de grupos metoxilo del 5.79% y un pH de 3.6. Siendo los residuos cítricos una excelente fuente de pectina (Aina et al., 2012).

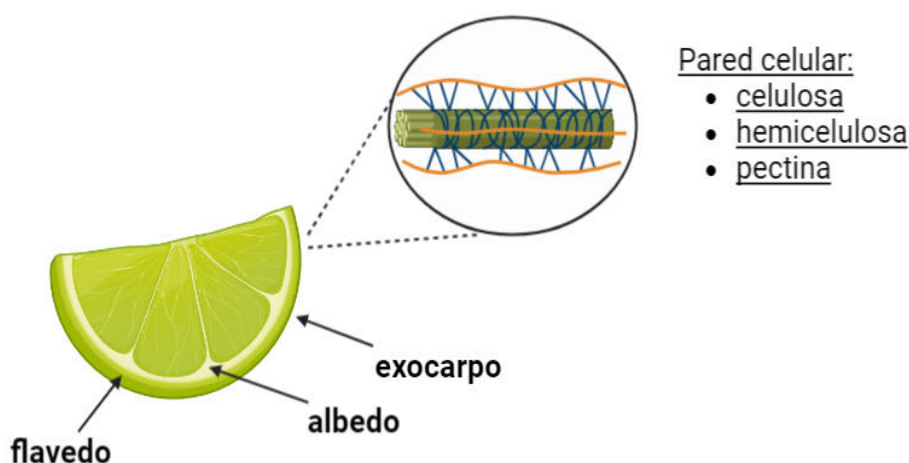


Fig. 2 Estructura principal de la cáscara de limón, (Aina et al., 2012).

2.4 Revalorización del salvado de trigo como materia prima

El trigo es uno de los cereales de mayor consumo en México, con un promedio de 57.4 kg per cápita al año, y se considera un producto básico a nivel nacional, contribuyendo con un 2.05 % al Producto Interno Bruto (PIB) agrícola nacional (SAGARPA, 2017). La harina es el producto principal obtenido después del proceso de molienda y descascarillado, durante el cual se separa el salvado de trigo, que no forma parte del producto final, generando aproximadamente 150 millones de toneladas de residuo. El salvado de trigo se utiliza comúnmente como alimento para ganado, ya que está compuesto por carbohidratos, fibra y proteína (Martínez-Aispuro et al., 2016). Solo un pequeño porcentaje (5.6%) se utiliza como ingredientes en alimentos, con predominio en la panadería (Prückler et al., 2014).

Químicamente, el salvado de trigo está compuesto por estructuras complejas como la celulosa, hemicelulosa, lignina y xilanos (Fig. 3). Esta composición lo convierte en una poderosa fuente de carbono en procesos de fermentación para la generación de metabolitos secundarios a partir de microorganismos. Sin embargo, actualmente se realizan tratamientos enzimáticos que modifican la estructura celular compleja para aumentar la biodisponibilidad de nutrientes o para su aplicación en la producción de compuestos prebióticos. Por otro lado, el salvado de trigo puede servir como fuente de carbono en procesos de fermentación para la producción de enzimas hidrolíticas a partir de microorganismos, lo que lo hace eficiente en los procesos de biorrefinería (Prückler et al., 2014).

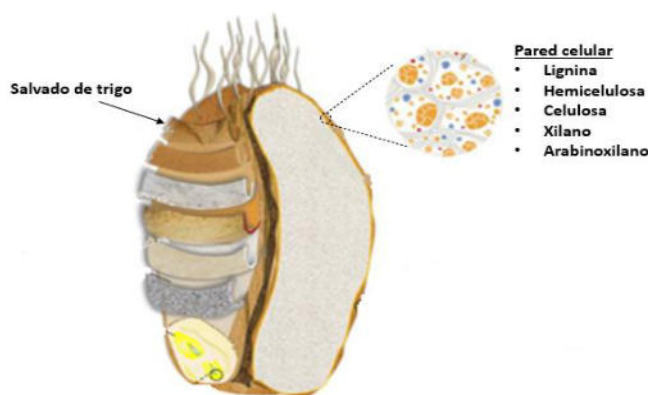


Fig. 3 Estructura y composición química general del salvado de trigo, (Martínez-Aispuro et al., 2016).

2.5 Producción de enzimas bajo concepto de biorrefinería

Las enzimas son moléculas que catalizan reacciones químicas y, debido a su capacidad para actuar de manera específica, son ampliamente utilizadas en procesos industriales. Según el tipo de reacción que catalizan, las enzimas se pueden clasificar en seis grupos principales (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de las enzimas según el mecanismo de reacción

Tipo de enzima	Acción
Oxidoreductasas	Catalizan reacciones de óxido-reducción. Se encuentran enzimas oxidasas, deshidrogenasas y reductasas.
Transferasas	Transferencia de un grupo funcional de una molécula a otra, por ejemplo, grupos carbonilos, metilo, fosfato y amino.
Hidrolasas	Escisión hidrolítica de un enlace (C-O, C-N, C-C, etc.), por la adición de agua.
Liasas	Se eliminan grupos para formar dobles enlaces.
Isomerasas	Transferencia de grupos dentro de una molécula para la formación isomérica y reordenamientos intermoleculares.
Ligasas	Formación de un enlace entre dos moléculas.

De manera natural, las enzimas son producidas para llevar a cabo reacciones químicas necesarias en procesos esenciales para los organismos, como la replicación del ADN, la síntesis de proteínas y el metabolismo (S. Li et al., 2012). Los principales productores de enzimas industriales son los microorganismos; algunos hongos y bacterias tienen la capacidad de biosintetizar enzimas extracelulares necesarias para hidrolizar polisacáridos en azúcares fermentables, un proceso requerido para la nutrición.

La producción enzimática a nivel industrial es un proceso comercial que continuamente busca estrategias para optimizar operaciones, reducir pasos y costos. A escala industrial, la fermentación es el método más utilizado para la producción de enzimas, debido a sus ventajas como bajo costo, sistema simultaneo, alto rendimiento y proceso *downstream* sencillo (Chatterjee & Venkata Mohan, 2022).

Actualmente, existen dos tipos de sistemas de fermentación según el estado del sustrato: fermentación sólida y fermentación sumergida. La fermentación sólida ha suscitado interés reciente en la producción de enzimas debido a que se considera un proceso más sencillo en comparación con la fermentación en estado sumergido. Este sistema (fermentación sólida) consta de un sustrato sólido inerte y libre de líquido, lo que imita las condiciones naturales de crecimiento de los microorganismos y permite obtener mayores rendimientos de producción de los metabolitos de interés. Sin embargo, el escalamiento de la fermentación en estado sólido se ha visto limitado debido a la dificultad de controlar condiciones como el pH, la temperatura, la transferencia de masa y el oxígeno (Intasit et al., 2021) .

Por otro lado, la fermentación sumergida permite un mejor control de las condiciones del medio, además de una fácil recuperación de la biomasa y un proceso *downstream* más simple. Se destaca la capacidad de los hongos para biosintetizar enzimas extracelulares, lo que facilita la recuperación enzimática y convierte este sistema en uno fácil de escalar (Uçkun Kiran et al., 2014). Sin embargo, para tener un proceso eficiente, es necesario optimizar las condiciones del cultivo como la viscosidad, el crecimiento del micelio, la concentración de biomasa, factores que pueden afectar la potencia de agitación y, por lo tanto, la transferencia de oxígeno y masa (Wolf-Márquez et al., 2017).

Las enzimas hidrolasas, producidas mayoritariamente por hongos y levaduras de manera extracelular, son altamente demandadas por diversos sectores industriales debido a su eficaz aplicación en procesos de biotransformación (Fig. 4). Destacan su uso en la industria de alimentos y bebidas, la producción de etanol y biodiesel, el blanqueamiento de textiles y papel, así como en síntesis orgánicas (Aehle, 2004). Globalmente, se estima que el mercado de enzimas industriales experimenta un crecimiento anual de aproximadamente el 6.6%, alcanzando los \$1.5 billones de dólares. El sector de alimentos es el más demandante debido al constante crecimiento demográfico. Sin embargo, el uso de enzimas en la industria no solo satisface esta creciente demanda, sino que también impulsa el desarrollo de

procesos amigables con el medio ambiente y de bajos costos de producción (Chapman et al., 2018).

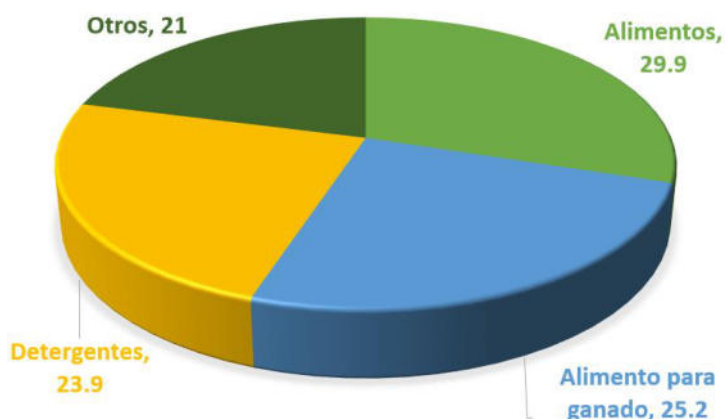


Fig. 4 Principales campos de aplicación de las enzimas hidrolíticas en la industria estimados en el año 2021, (Chapman et al., 2018).

2.6 Enzimas pectinolíticas

Dentro del amplio espectro de enzimas hidrolíticas se encuentran las pectinasas, un conjunto de enzimas que catalizan la despolimerización de la cadena pectica presente en la pared celular vegetal. Estas enzimas se clasifican según el mecanismo de reacción (Tabla 3) (Mahmoodi et al., 2017).

Las pectinasas son producidas de forma natural por microorganismos y se consideran enzimas fitopatógenas, contribuyendo a la descomposición de la materia orgánica vegetal. Son mayormente generadas por hongos saprofitos, destacando los géneros *Aspergillus* (El Enshasy et al., 2018a) y *Penicillium* (Sudeep et al., 2020), conocidos por su producción de poligalacturonasas y pectinasas ácidas.

Tabla 3 Clasificación de enzimas pectinolíticas de acuerdo con el mecanismo de reacción (Mahmoodi et al., 2017).

Enzimas pectinasas	Mecanismo de reacción
<i>Pectin metil esterasas</i>	
<i>Pectin acetil esterasas</i>	Cataliza la reacción hidrolítica en grupos acetil esterificados unidos a la pectina ácida
<i>Poligalacturonasas (PG)</i>	Hidrolizan los enlaces glucosídicos α -1,4-glicosídicos de manera aleatoria en los enlaces internos (endo-PG) o de forma específica (exo-PG) en los enlaces externos de la cadena pectica produciendo D-galacturonatos
<i>Polimetilgalacturonasas</i>	Hidrolizan los enlaces α -1,4-glicosídicos en estructuras pectinas altamente esterificadas
<i>Pectin liasas</i>	Catalizan la reacción de transeeliminación de enlaces glucosídicos en pectina altamente esterificada, produce metiloligogalacturonatos insaturados

Se han reportado diversas condiciones óptimas la máxima producción enzimática, dependiendo del microorganismo productor. Por ejemplo, *P. frequentans* mostró actividad pectinolítica máxima a 35°C y pH 2.5 (Said et al., 1991).

Para la producción máxima de exo-PG, *P. viridicatum* RFC3 requirió condiciones de 28°C y pH 5.0 (Tokuishi et al., 2005). En el caso de *P. oxalicum* PJO2, las condiciones óptimas de producción pectinolítica fueron 36.5°C y pH 5.0 (P. J. Li et al., 2014).

El peso molecular de las enzimas también varía según el microorganismo, la especie, las condiciones del medio y el tipo de isoenzima pectinolítica. Por ejemplo, la enzima exo-PG producida por *P. frequentans* mostró una masa molecular de 74 kDa (Chellegatti et al., 2002), mientras que otro reporte con el mismo microorganismo productor reportó una pectinasa extracelular con un peso molecular de 20 kDa (de Fá Tima Borin et al., 1996). Por otro lado, *P. crustosum* presentó un peso molecular de alrededor de 35 kDa para las exo-PG y aproximadamente 18 kDa

para las endo-PG (Núñez-Serrano et al., 2024). Además, la pectinasa producida por *A. niger* mostró un peso molecular de 30 kDa, según análisis mediante la técnica de SDS-PAGE (Ahmed et al., 2016).

En la industria de alimentos, especialmente en la producción de bebidas y jugos, las pectinasas ácidas son ampliamente utilizadas debido a su eficacia en la extracción. Estas enzimas aumentan el rendimiento en más del 90% en comparación con los métodos mecánicos tradicionales. Además, los jugos de frutas ricas en pectina tienden a tener una alta viscosidad, lo cual puede causar turbidez y afectar las características sensoriales. Las pectinasas son aplicadas para hidrolizar la pectina, reduciendo así la viscosidad y mejorando la claridad de los jugos. Se ha observado una reducción de aproximadamente el 60% en la turbidez de los jugos clarificados mediante tratamientos enzimáticos. Actualmente, alrededor del 10% de la producción total de enzimas industriales corresponde a las pectinasas, con un enfoque principal en la industria de alimentos (Shrestha et al., 2021).

2.7 Enzimas xilanasas

Con el desarrollo de la biorrefinería y la bioconversión de residuos orgánicos, ha aumentado la demanda de enzimas hemicelulasas, particularmente de las xilanasas. Estas enzimas son necesarias para catalizar la hidrólisis y liberación de azúcares simples de la pared celular vegetal, rica en hemicelulosa, celulosa y xilano, componentes abundantes en los residuos agroindustriales (Bhardwaj & Verma, 2021). Las xilanasas hidrolizan los enlaces β -1,4 xilosídicos que componen la estructura del xilano, y se clasifican según su mecanismo de acción. Estas enzimas también son denominadas endo- β -1,4-xilanasas y β -xilosidasas y, además, existen enzimas xilanolíticas encargadas de catalizar reacciones de deesterificación como acetil xilan-esterasas, las cuales en conjuntos rompen la cadena compleja del xilano en estructuras monoméricas como la D-xilosa, de manera similar las enzimas xilanolíticas se clasifican de acuerdo con el mecanismo de reacción (Tabla 4) (Alokika & Singh, 2019) (Bhardwaj & Verma, 2021).

Los principales productores de xilanasas son hongos filamentosos como *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Penicillium*, que utilizan fermentación en estado sólido o

sumergida para su producción, aprovechando su capacidad para producir enzimas extracelulares (Kumar & Shukla, 2018).

La temperatura y el pH óptimos para la producción enzimática varían según el microorganismo y las condiciones del medio. Por ejemplo *P. crustosum* mostró actividad óptima a 35°C y pH 4.5 (Mushimiyimana & Tallapragada, 2015), mientras que la cepa termoestable *T. lanuginosus* VAPS24 alcanzó la máxima actividad a 65°C y pH 5.0 (Kumar & Shukla, 2018). La optimización de los factores fisicoquímicos del medio permitió la máxima actividad xilanasa a 50°C a un pH de 5.5 para *Aspergillus fumigatus* y a 60°C y pH 5.0 por *P. citrinum* (Valle-Pérez et al., 2021).

Las características bioquímicas de la enzima xilanasa están relacionadas con el tipo de microorganismo biosintetizador y la naturaleza del medio de cultivo, *Penicillium crustosum* reportó un peso molecular de 23.4 kDa correspondiente a la xilanasa, posterior a la purificación enzimática (Lunkes et al., 2019). La enzima endo- β -1,4 xilanasa producida por *P. oxalicum* presentó un peso molecular de 21.3 kDa (Liao et al., 2014). Sin embargo, las isoenzimas xilanolíticas como la α -glucuronidasas presentan pesos moleculares de 90 kDa proveniente de microorganismos fúngicos (Alokika & Singh, 2019).

Tabla 4. Clasificación de las enzimas xilanasas de acuerdo con el mecanismo de reacción, (Bhardwaj & Verma, 2021).

Enzimas xilanolíticas	Mecanismo de reacción
<i>Endo- β-1,4-xilanasas</i>	Hidrolizan los enlaces β -1,4 glicosídicos de la estructura del xilano, se producen monómeros como xilosa, xilobiosa y xilooligosacáridos
<i>β- xilosidasas</i>	Rompen los extremos no reductores de los xilooligosacáridos
<i>α- glucuronidasas</i>	Hidrolizan los enlaces α -1,2 glicosídicos de los extremos no reductores de las unidades xilopiranosilo produciendo xilooligosacáridos
<i>α- arabinofuranosidasas</i>	Hidrolizan los enlaces α -1,2; α -1,3 y α -1,5 arabinofuranosilano de la estructura del arabinoxilanos

Las xilanasas se utilizan en diversas aplicaciones industriales, como en la fabricación de papel, donde se utilizan como alternativa amigable con el medio ambiente como sustituto de agentes químicos en el tratamiento de blanqueamiento de fibras y pulpa, logrando hasta un 50% de blanqueo sin el uso de cloro (S. Silva et al., 2016). En la industria alimentaria, especialmente en panadería, las xilanasas se utilizan para ablandar el trigo, mejorando la calidad y el contenido nutricional del pan. Además, se emplean junto con las pectinasas en la clarificación de jugos y vinos (Lunkes et al., 2019)(Alokika & Singh, 2019). Debido a su eficacia en la hidrólisis de compuestos lignocelulósicos junto con enzimas celulasas y lignocelulasas, las xilanasas se aplican en el pretratamiento de agro residuos y en la producción de biocombustibles y bioetanol (Bhardwaj & Verma, 2021).

2.8 Enzimas celulasas

Las enzimas celulasas desempeñan un papel fundamental en la degradación de la celulosa, un polímero complejo ampliamente presente en la naturaleza, siendo un componente mayoritario en la pared celular vegetal. El creciente interés en la utilización de residuos orgánicos como biomasa lignocelulósica para la producción de compuestos y energía ha generado una demanda significativa de enzimas capaces de degradar estas estructuras celulósicas en subunidades monoméricas, como la glucosa, permitiendo así su revalorización en la generación de una variedad de productos de valor agregado (Valle-Pérez et al., 2021).

Las enzimas celulasas comprenden un grupo de isoenzimas que se clasifican según el mecanismo de degradación de los compuestos lignocelulósicos (Tabla 5). Sin

embargo, es importante destacar que estas tres enzimas actúan sinérgicamente durante el proceso de hidrólisis en el sector industrial (Prajapati et al., 2018).

Tabla 5. Clasificación de las enzimas celulasas de acuerdo con el mecanismo de reacción, (Valle-Pérez et al., 2021).

Enzimas celulasas	Mecanismo de reacción
Exocelulasas	Hidroliza la estructura celulósica en disacáridos
Endocelulasas	Cataliza la reacción hidrolítica de los enlaces glicosídicos β -1,4 de la estructura celulósica
β -glucosidasas	Hidroliza estructuras celo-oligosacáridos en monómeros de glucosa

Comercialmente, las celulasas son producidas por bacterias y hongos capaces de sintetizar estas enzimas de manera extracelular, siendo los géneros fúngicos como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Chrysosporium*, y especialmente *Penicillium sp.*, las principales fuentes de estas enzimas (Vaishnav et al., 2018).

La producción enzimática está influenciada por los parámetros fisicoquímicos del medio de fermentación y del microorganismo productor. Por ejemplo, la máxima producción de enzimas celulasas por *P. oxalicum* se obtuvo bajo fermentación sumergida a 50°C y pH 5.0 (Saini et al., 2015). En otro estudio *Aspergillus fumigatus* alcanzó la mayor producción enzimática a 50° C y pH 4.5, en comparación con *P. oxalicum* a 50°C y pH 5 en fermentación en estado sólido (Valle-Pérez et al., 2021).

Las características propias de las celulasas también varían según el microorganismo utilizado para su producción y el tipo de isoenzima sintetizada. Por ejemplo, la masa molecular de la enzima exo-celulasa producida por *Penicillium sp.* FSDE15 se detectó en bandas de aproximadamente 150 y 30 kDa, con una señal adicional en 70 kDa atribuida a la presencia de la isoforma β -glucosidasas, según análisis por SDS-PAGE (de Castro Coêlho et al., 2021). La celulasa purificada obtenida a partir de la bacteria *Paenibacillus sp.*, presentó una masa molecular de 67 kDa (Islam & Roy, 2018). Asimismo, la celulasa sintetizada por *A. niger* mediante fermentación sumergida registró una masa molecular aproximadamente de 13.5 kDa (Sulyman et al., 2020).

Las celulasas ocupan el tercer lugar de las enzimas industriales más demandadas, siendo de suma importancia descubrir nuevos microorganismos como fuentes potenciales de estas enzimas, así como optimizar los procesos para lograr un rendimiento enzimático eficiente. Actualmente, la producción de biocombustibles se destaca como el principal sector industrial que emplea enzimas celulasas, utilizadas desde el pretratamiento para la sacarificación de biomasa lignocelulósica hasta la obtención de azúcares simples y bioetanol (Bajaj & Mahajan, 2019). Aprovechando la capacidad biocatalíticas en la degradación de las fibras celulósicas, las celulasas también se aplican en el tratamiento de des tintado de fibras, sustituyendo el uso de químicos y convirtiéndolo en un proceso amigable con el medio ambiente (Bajaj & Mahajan, 2019). Además, la industria alimentaria, el sector ganadero, la extracción de jugos y el procesamiento del almidón son otros sectores donde las celulasas encuentran aplicaciones debido a su bajo costo y efectividad enzimática (Sulyman et al., 2020).

2.9 Microorganismo productor: *Penicillium crustosum*

Los microorganismos fúngicos, especialmente del género *Penicillium*, han sido objeto de estudio debido a su capacidad para producir una variedad de metabolitos secundarios con potenciales aplicaciones industriales y farmacéuticas. Estos hongos filamentosos son conocidos por generar metabolitos como antibióticos y enzimas extracelulares, como celulasas, glucosidasas y xilanasas, que son altamente demandadas en la industria (Naraian & Gautam, 2017).

El género *Penicillium* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y es uno de los más abundantes en suelos por lo que se considera una especie ubicua. Sus condiciones de crecimiento suelen ser a temperatura ambiente, con un rango de temperatura de incubación de 30 a 37°C durante un periodo de 7 días. Macroscópicamente, las colonias de *Penicillium* suelen presentar estructuras fúngicas características, como esporas que facilitan la diseminación del hongo y conidios elipsoidales, conidióforos terverticilados, hifas, ramificaciones irregulares terminando en tres a seis fiálides. Las colonias suelen presentar coloración verde-

azul, planas y el reverso suele ser incoloras dependiendo de la especie (Palou, 2014).

La producción de enzimas hidrolíticas capaces de degradar materia lignocelulósica es una característica común en especies pertenecientes al género *Penicillium*. Se han identificado alrededor de 90 especies con esta capacidad, como *P. oxalicum* (Santi et al., 2020), *P. citrinum* (Valle-Pérez et al., 2021), *P. chrysogenum* (L. de M. B. Silva et al., 2020), *P. ochrochloron* (Rančić et al., 2006), *P. frequentans* (Chellegatti et al., 2002). La producción de estas enzimas está regulada a nivel transcripcional por la biosíntesis de genes específicos, como el gen AmyR que expresa la síntesis de enzimas amilolíticas (Hu et al., 2021). Además, la síntesis de las hidrolasas puede estar controlada por la represión catabólica relacionada por la asimilación de la fuente de carbono. La presencia de glucosa en el medio actúa como represor en la producción de enzimas pectinasas como la polimetilgacturonasas y poligalacturonasas, en donde el regulador catabólico juega un papel importante en la represión de la expresión genética de enzimas pectinolíticas (Solis-Pereira et al., 1993; Vries et al., 2002). Por otro lado, algunas especies pertenecientes al género *Penicillium* pueden ser inducibles a la síntesis de enzimas hidrolasas específicas, por ejemplo, la presencia de ácido D-galacturónico en el medio de cultivo prolifera la síntesis de genes pectinolíticos, con la expresión y regulación de genes específicos; asimismo, la expresión de genes xilanolíticos también puede ser inducida por la presencia de arabinoxilano a partir de la activación transcripcional por el gen XInR (Vries et al., 2002a). La producción de celulasas se vio incrementada en la sobre expresión del gen PoSaA, encargado de la regulación de la síntesis de enzimas extracelulares evaluado en *P. oxalicum* (Hu et al., 2021).

Aparte de su capacidad enzimática, los hongos del género *Penicillium* también son reconocidos por producir metabolitos secundarios con potenciales aplicaciones farmacéuticas e industriales. Se ha demostrado que extractos del micelio de *Penicillium sp.* presentan actividad antioxidante necesarios para evitar el estrés oxidativo celular (Ghareeb et al., 2019). Además, *Penicillium sp.*, se caracteriza por

ser microorganismo fúngico productor de agentes antimicrobianos, como los ya reconocidos derivados β -lactámicos (Pohl et al., 2020), además, se ha evaluado e identificado recientemente estructuras y compuestos químicos como los alquilo aromáticos, alcaloides, quinazolines, policétidos, ácidos grasos y cadenas hidrocarbonadas que actúan como agentes antimicrobianos y citotóxicos, por ejemplo, los extractos producidos por *Penicillium* sp. SAM16-EGY presentaron actividad antimicrobiana ante *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, además se reportó actividad antifúngica evaluando ante la cepa *A. niger* (Ghareeb et al., 2019).

Sin embargo, la producción e identificación de metabolitos secundarios de importancia industrial y farmacéutica aún continúa en investigación, debido a que no todos los hongos pertenecientes al género *Penicillium* tienen la capacidad o el rendimiento ideal para la generación de estos compuestos a gran escala. *Penicillium crustosum*, una cepa fúngica de origen marino ha sido objeto de estudio reciente, debido a que se ha observado que posee conjuntos de genes que biosintetizan estructuras químicas con un amplio espectro de bioaplicaciones (Yu et al., 2019b). Esta cepa ha demostrado ser fácilmente inducible para la producción de enzimas hidrolíticas, lo que la convierte en un microorganismo de interés para la biorrefinería y la producción de compuestos de alto valor añadido (Lunkes et al., 2019; Núñez-Serrano et al., 2024; Xiong et al., 2017).

2.10 Microorganismos patógenos

Los microorganismos son los organismos más primitivos que habitan en todos los ecosistemas, participan en procesos metabólicos y ecológicos vitales en el funcionamiento y mantenimiento de la vida. Se agrupan en procariotas y eucariotas, en la primera se encuentran las bacterias, las cuales fueron las primeras formas de vida en la tierra y han sobrevivido a lo largo de tiempo debido a procesos de adaptación y la eficiencia metabólica que las caracteriza, encontrándolas tanto en ambientes extremos como los polos y desiertos, hasta ambientes húmedos, además de formar parte del microbiota natural en los seres humanos (Arias et al., 2010). De acuerdo con la estructura y la composición en la pared celular las bacterias se

clasifican en Gram positivo (+) y Gram negativo (-). Las bacterias Gram positivo se caracterizan por tener una pared gruesa de peptidoglicano, el cual es una macromolécula compuesta de cadenas entrecruzadas de glucano con extremos peptídicos, mientras que, en la estructura superior, se encuentran moléculas de ácido teicoico y ácido lipoteicoico, responsables de la hidrofobicidad y la adherencia bacteriana, además, dependiendo de la cepa bacteriana, puede presentar un tamaño de espesor entre 10-60 nm (Pajerski et al., 2019). Esta estructura juega un papel importante en la turgencia celular, la resistencia mecánica y la interacción hacia el medio ambiente, (Pasquina-Lemonche et al., 2020). Entre las cepas más representativas pertenecientes a la clasificación Gram (+), se encuentra *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus spp*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Streptomyces albus* (Gregersen, 1978).

Por otro lado, las bacterias pertenecientes a la clasificación Gram (-) presentan una membrana citoplasmática, en la parte intermedia denominada espacio periplásmico el cual cuenta con una capa de peptidoglucano y posteriormente la membrana exterior, además de moléculas de lipopolisacáridos en la parte exterior de la bicapa lipídica (Pajerski et al., 2019). *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp*, *Serratia marcescens* y *Vibrio cholerae* son algunas de las cepas que se encuentran dentro de esta clasificación (Gregersen, 1978).

Los microorganismos patógenos representan una amenaza para la salud humana, ya que pueden causar enfermedades graves, especialmente en personas con sistemas inmunes comprometidos. Estos microorganismos pueden ser transmitidos a través de diferentes vías, siendo los alimentos una de las fuentes principales de contaminación (García & Rica, 2008).

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAS), de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, son causadas por agentes patógenos, ya sea microorganismos patógenos vivos o toxinas producidas por bacterias presentes en los alimentos. Entre los principales microorganismos identificados como causantes de ETAS se encuentran *Staphylococcus sp.*, *Bacillus cereus*, *E. coli* y *Salmonella*, causando un cuadro clínico caracterizado por presentar dolor abdominal, diarrea,

cefalea, deshidratación y complicaciones graves de acuerdo con las condiciones del paciente (Riley, 2020).

En México el grupo de personas más afectados son los encontrados entre 15 a 44 años, seguido del grupo de niños entre 5 a 14 años. El aumento en el consumo de alimentos en el exterior ha contribuido a la incidencia de estas enfermedades. Identificar las principales cepas de microorganismos patógenos y mantener un control adecuado de su incidencia es fundamental para proteger la salud pública y garantizar la seguridad alimentaria (Arellano-Narváez, 2020).

2.11 *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria anaerobia facultativa que pertenece al género *Escherichia*. Esta bacteria es Gram negativo y no forma esporas, presentando una longitud de aproximadamente 3.0 µm por 0.5 µm. Las características macroscópicas coloniales varían de acuerdo con el medio de cultivo utilizado, en agar MacConkey medio selectivo para identificar la cepa bacteriana, las colonias presentan una coloración roja con un halo blanquecino, así mismo, en agar EMB (eosina y azul de metileno, el centro de la colonia es de color negro y presentan una coloración verde visualizado con luz reflectante (Kaper et al., 2004). La temperatura óptima para el crecimiento de la cepa es alrededor de 37°C, se considera como una bacteria abundante en el tracto gastrointestinal de humanos y animales sanos. Es utilizada frecuentemente en estudios de investigación por la velocidad de crecimiento (Abernethy et al., 2015).

Esta especie, dependiendo de los serotipos, puede causar enfermedades gastrointestinales, especialmente cuando los alimentos están contaminados con cepas patógenos. Las infecciones por *E. coli* puede adquirirse por diversas vías, siendo la más frecuente por vías urinarias, desarrollando infecciones intestinales, generalmente siendo los alimentos contaminados o poco cocidos la principal fuente de contagio. La cepa puede permanecer en el epitelio intestinal causando cuadros de diarrea de casos leves a extremos, provocando colitis hemorrágica. Algunos serotipos de *E. coli* pueden llegar a generar casos de meningitis, septicemias, neumonía y peritonitis (Elbehiry et al., 2023).

E. coli se clasifica en varios grupos según sus mecanismos de infección y enfermedades asociadas, como *E. coli* enteropatógeno, enteroinvasivo, enterohemorrágica y enterotoxigénica, en donde en este último grupo, se encuentra *Shigella* spp., relacionado con la generación de toxinas altamente riesgosas para la salud humana, debido a la infección presentada en el epitelio del colon e intestinos (Riley, 2020).

Esta bacteria es una de las principales causas de bacteriemia a nivel mundial, en países europeos se reporta una tasa de incidencia de 50.5 casos por 100,000 de habitantes por año, mientras que en Norte América se estima entre 79,000 a 94,000 muertes por año. El tratamiento tradicional ha incluido el uso de antibióticos como compuestos fluoroquinolones, principalmente ciprofloxacino, sin embargo, en años recientes se ha registrado resistencia a antibióticos, además de una baja eficacia en el uso de β -lactámicos, como la penicilina y cefalosporina. En Europa en el 2014, un alto porcentaje de cepas *E. coli* BSI evaluadas, presentaron resistencia a los agentes antes mencionados (49 y 24%, respectivamente)(Poolman & Anderson, 2018).

2.12 *Staphylococcus aureus*

La bacteria *Staphylococcus aureus* recibe su nombre debido a la coloración característica dorada que presenta, se encuentra dentro de las bacterias Gram positiva que se caracteriza por formar colonias estructuradas en racimos, positivo a reacciones bioquímicas como la catalasa y coagulasa. Se encuentra naturalmente en la flora microbiana del ser humano, especialmente en la piel y zona nasofaríngea. Sin embargo, *S. aureus* es una de las principales causas de bacteriemia a nivel mundial. Diversos factores son causantes de la infección por medio de esta cepa, tal como la transmisión por alimentos y focos de infección en hospitales, como medicamentos inyectables, y exposición en cirugías (Garzón et al., 2018).

Debido a la alta capacidad de sobrevivir a diferentes condiciones ambientales y a la alta tasa de infección *S. aureus* se considera una bacteria patógena, destacando la gastroenteritis estafilocócica, causada por las enterotoxinas transmitidas principalmente por alimentos, en donde, los pacientes presentan síntomas como

nauseas, vomito, dolor abdominal, y en casos severos infección sanguínea, destacando que esta cepa se encuentra entre los cinco patógenos responsables de la contaminación de alimentos a nivel mundial (M. Li et al., 2011; Xu et al., 2019).

S. aureus es encontrada comúnmente en la piel, sin embargo, una infección severa provoca dermatitis aguda; además, el efecto citotóxico causado por esta cepa representa un alto riesgo para la salud, debido a que afecta células del sistema inmunológico causando un síndrome de shock tóxico (Poolman & Anderson, 2018).

Al igual que las ya conocidas bacterias patógenas, el tratamiento para combatir la infección causada por *S. aureus* es por medio de antibióticos, comúnmente β -lactámicos, como la penicilina y cefalosporinas, conocidas por inhibir la síntesis de la membrana celular relacionada con la estructura de peptidoglicano, característica representativa de las bacterias Gram positivo (Plata et al., 2009).

No obstante, *S. aureus* también ha presentado resistencia ante agentes bacterianos con eficacia previamente reportada, tal como la meticilina, cepas resistentes a este antibiótico β -lactámico y a otros derivados de este, reciben el nombre de *S. aureus* resistentes a meticilina; los primeros reportes del aislamiento de estas cepas resistentes se realizaron en los años 70's, identificando infecciones en hospitales, posteriormente la propagación de esta cepa condujo a catalogarla como una cepa con severo riesgo a la salud. En Norte América se ha reportado entre 33 a 55% de cepas resistentes a meticilina del total aislado en hospitales (M. Li et al., 2011). Se han observado tres mecanismos de resistencia, la biosíntesis de enzimas penicilinasas o β -lactamasas, la mutación genética, en donde presenta una proteína (PBP2a) de unión a penicilina, disminuyendo la afinidad del fármaco, esta codificación proviene del gen *mecA* ausente en bacterias sin resistencia. Además, las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina también presenta genes que codifican en el bombeo de salida de fármacos (Boss et al., 2016; M. Li et al., 2011).

Anteriormente, la vancomicina era el fármaco con mayor efectividad en el tratamiento de las infecciones por *S. aureus* resistentes a meticilina, debido a que inhibe la síntesis de la pared celular mediante la unión a los aminoácidos terminales de la cadena de peptidoglucano. Sin embargo, en años recientes, se ha detectado

la propagación mundial de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina y además a vancomicina, lo cual alerta la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos (M. Li et al., 2011).

2.13 *Candida albicans*

Candida albicans es una levadura que se considera un patógeno oportunista y pertenece a la familia de sacaromicetos. Además, es un hongo dimórfico que pueda adoptar formas de levadura a 37°C y de un hongo filamentoso a 25°C. Cuando se presenta en forma de levadura, presenta características redondeadas de aproximadamente de 3 a 5 µm de diámetro y forma colonias múltiples con una apariencia blanquecina y cremosa (Garza Zaragoza, 2012). Esta especie de hongo forma parte del microbiota natural del cuerpo humano, habitando en el tracto respiratorio, gastrointestinal y genital. Sin embargo, en ciertas condiciones, como la supresión del sistema inmunológico del hospedador, puede volverse patógena y causar candidiasis (Lu et al., 2021).

A nivel mundial, *Candida albicans* es uno de los principales microorganismos fúngicos responsables de infecciones. En el 2017, aproximadamente el 45% de las especies causantes de candidemia fueron identificados como *C. albicans* (Raja, 2021). La exposición prolongada a antibiótico es uno de los factores de riesgo más comunes para la colonización excesiva de *C. albicans* en el cuerpo humano, especialmente en pacientes sometidos a intervenciones quirúrgicas (Raja, 2021).

El tratamiento de las infecciones causadas por *C. albicans* generalmente implica el uso de agentes azoles, como el fluconazol, que inhiben la enzima 14 α-demetilasa, responsable en la conversión de lanosterol en la síntesis del ergosterol en la membrana celular del hongo. Además, este microorganismo patógeno tiene la capacidad de formar *biofilms*, lo cual dificulta el control de esta cepa, sin embargo, en algunas etapas claves de la formación del *biofilm*, se incrementa la sensibilidad al fluconazol, por ejemplo, en la fase de adherencia, en donde el ergosterol es un factor importante, la disrupción de la síntesis del ergosterol, provoca la proliferación de hifas defectuosas, inhibiendo el crecimiento de este patógeno (Lu et al., 2021).

Sin embargo, al solo actuar como inhibidor de crecimiento, permite el desarrollo de cepas con resistencia a fluconazol.

En años recientes, se ha observado un aumento en la resistencia al fluconazol, y la necesidad de utilizar de manera sinérgica un doble agente como la anfotericina B y caspofungina en pacientes con endocarditis de riesgo severo. La mutación genética ha sido el principal factor del desarrollo de resistencia a fluconazol, se ha observado que *C. albicans* ha modificado el factor de transcripción Upc2, que regula el gen Erg11 que codifica a la síntesis de la enzima 14 α -demetilasa (Levinson et al., 2021).

Debido al incremento de cepas resistentes a agentes fúngicos azoles se ha buscado nuevas estrategias como la combinación de fármacos, y la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos en fuentes naturales, como los metabolitos secundarios derivados de hongos marinos, *P. meleagrinum* demostró tener actividad ante *C. albicans* en combinación con fluconazol. Por lo cual, es importante considerar especies pertenecientes a este género, como *P. crustosum* como potenciales fuentes de agentes antimicrobianos (Okabe et al., 2016).

2.14 Resistencia bacteriana

La resistencia antimicrobiana es un problema global en aumento que afecta a diversas áreas geográficas y se caracteriza por la resistencia de los microorganismos a agentes antimicrobianos efectivos (Vila et al., 2020).

La resistencia a fármacos emergió en el año de 1930, cuando se cepas de *Streptococcus pyogenes* resistentes a sulfonamida en hospitales militares, siendo esa locación la principal fuente de microorganismos resistentes a antibióticos, tales como la resistencia a penicilina por *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium tuberculosis* con resistencia a estreptomina, además de cepas como *Escherichia coli*, *Shigella* y *Salmonella* (Levy & Bonnie, 2004). En la actualidad una señal de alerta es el incremento en la concentración mínima inhibitoria en cepas ya conocidas, clasificándolas con emergente nivel de resistencia cuando la susceptibilidad comienza a decrecer.

Los hospitales urbanos son una fuente principal de microorganismos resistentes, donde el uso inadecuado y excesivo de antibióticos contribuye significativamente a la propagación de cepas resistentes. Algunas cepas patógenas a humanos son propagadas principalmente a través de la cadena de alimentos destacando a los cárnicos como el principal foco de infección. Además, la degradación de los antibióticos resulta en otro punto crítico, debido a que esta no llega a ser completa o puede ser de largo plazo, por lo cual, son abundantemente encontrados a concentraciones por encima a lo permitido por las normas oficiales en aguas residuales, siendo otro factor en la problemática actual (Polanco-Rodriguez & Ruiz, 2021).

Los microorganismos adquieren resistencia a través de la transferencia de genes de resistencia, que puede ocurrir mediante elementos genéticos móviles como bacteriófagos, plásmidos o transposones. Los mecanismos de resistencia varían según el microorganismo y el agente antimicrobiano. El modelo de resistencia a través de transposones ha sido identificado en bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Mediante el proceso de transformación, los genes cromosomales de bacterias resistentes pueden ser transferidos partir de ADN hacia otros microorganismos, permitiendo la adquisición de genes resistentes. Posteriormente de la mutación genética de los microorganismos, los mecanismos de resistencia se desarrollan o modifican. Algunas enzimas como las β -lactamasas actúan directamente hacia los antibióticos como la penicilina mediante reacciones de degradación y de inactivación hacia agentes como el cloranfenicol y aminoglucósidos. Así mismo, puede ocurrir algún tipo de alteración en moléculas como proteínas y ribosomas, impidiendo que el fármaco actúe sobre alguna función vital del microorganismo como en la replicación del ADN. Otro tipo de mecanismo desarrollado es el bombeo de eflujo activo, expulsando agentes como la tetraciclina y fluoroquinolonas, impidiendo así, la entrada del fármaco al sitio objetivo específico (Levy & Bonnie, 2004). Sin embargo, recientemente se ha detectado el desarrollo de nuevos mecanismos de resistencia, tal como la resistencia medida por plásmidos. Por otro

lado, el mecanismo no es específico a solo un fármaco, si no que más de un mismo mecanismo actúa ante el agente antibiótico; por lo cual, el desarrollo de nuevas estrategias y fuentes de producción es un tema de interés mundial.

Algunas familias de antibióticos ya conocidas y probadas clínicamente actúan sobre funciones metabólicas específicas en las células microbianas, las penicilinas, glucopéptidos, cefalosporinas actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular, la tetraciclina, aminoglucósidos, cetólidos, macrólidos como los biosintetizados por *P. crustosum* (Yu et al., 2019), reportan un mecanismo de acción como inhibidores de la síntesis de proteínas. A pesar del eficiente mecanismo de acción, el uso continuo de estos agentes favorece el incremento de la generación de cepas resistentes.

La modificación estructural de antibióticos activos ha sido una alternativa efectiva previniendo el desarrollo de la resistencia, bloqueando o alterando el objetivo específico de ataque. Se ha reportado el uso eficiente de β -lactámicos como inhibidores bacterianos, sin embargo, la combinación de ciertos compuestos como metales, los cuales actúan inhibiendo el bombeo de flujo en las células bacterianas (Vila et al., 2020).

No obstante, la búsqueda de nuevas fuentes de compuestos con actividad antimicrobiana continua, con principal interés en procesos naturales con alta eficacia, como el caso de metabolitos bioactivos producidos por microorganismos fúngicos, como *Penicillium*, el cual es capaz de producir compuestos como los poliquetos con actividad antibacteriana, insecticida y nematocida (Korejo et al., 2014). Considerando al género *Penicillium*, una nueva fuente de metabolitos de interés en la industria farmacéutica.

3. ANTECEDENTES

En investigaciones recientes se optimizó la producción xilanolítica mediante fermentación en estado sólido utilizando una cepa de *Pencillium roqueforti* ATCC 10110, utilizando un diseño Box-Behnken. Se observó que la máxima actividad (14.03 IU g^{-1}) se alcanzó a las 144.80 horas de fermentación, a una temperatura óptima de 25.55°C . Además, se ha demostrado que el uso de iones metálicos, como

el Mn^{2+} como cofactor puede aumentar significativamente en un 40% la actividad relativa (de Almeida Antunes Ferraz et al., 2020).

En otro estudio (2019), se investigó el potencial de *P. crustosum* para producir xilanasas con aplicación en la clarificación de jugos. Se purificaron las enzimas por cromatografía de intercambio iónico, DEAE- Sephadex (2 x 20 cm) y verificado por SDS-PAGE. Se evaluó la citotoxicidad de *P. crustosum* por MTT, así como la capacidad clarificante de las xilanasas purificadas en jugos de frutas. La actividad total del extracto crudo fue 7,650 U y la xilanasas purificadas 1,104 U. El peso molecular determinado fue 23.4 kDa. No se encontró efecto citotóxico en el extracto enzimático crudo y purificado por MTT. Se reportó un porcentaje de 36.68% de clarificación en jugo de mango (5 U/mL⁻¹ xilanasas por 10 min) (Lunkes et al., 2019).

Un diseño factorial 2⁴ fue utilizado para optimizar la producción celulasas y xilanasas por *Penicillium crustosum* en fermentación sumergida, utilizando cáscaras de remolacha azucarera como sustrato. Se observó que los parámetros como pH, fuente de carbono y nitrógeno tienen un efecto significativo en la actividad enzimática. La actividad máxima para celulasas fue de 5.56 U/mL a pH 7.0 y para xilanasas fue de 36.14 U/mL a pH 7.7 (Mushimiyimana & Tallapragada, 2015).

Se ha investigado el efecto de iones metálicos en la producción de enzimas pectinolíticas, como la exo-PG, a partir de la fermentación de *Penicillium notatum*. Se encontró que el Mn^{2+} como cofactor puede incrementar la actividad enzimática aproximadamente en un 20%. Sugiriendo que existe un efecto favorable en la producción de exo-PG y en la actividad catalítica con la presencia de estos iones metálicos, destacando al ion Mn^{2+} el cual podría encontrarse en el sitio activo de la enzima interaccionando con los aminoácidos residuales de la exo-pectinasa (Amin, Bhatti, et al., 2017).

Se realizó la optimización de la producción de exo y endo pectinasas utilizando un diseño central compuesto 2², en donde se tomó como variables independientes la temperatura y el pH. Además, se evaluó el uso de agro residuos como cosustrato en la fermentación sumergida de *P. crustosum* para la producción enzimática. Las condiciones óptimas de fermentación fueron a temperatura de 35° C y pH de 6.0,

obteniendo la máxima actividad de 340.9 U/mL (exo-PG) y 2.92 U/mL (endo-PG), así mismo, se demostró que la cáscara de limón tuvo un efecto significativo en la producción de pectinasas, incrementando la actividad 3 veces más que en la fermentación en ausencia del agro residuo (Núñez-Serrano et al., 2024).

La producción y detección de compuestos bioactivos producidos por *P. crustosum* en conjunto con *Xilaria* sp., fue un trabajo realizado en donde, a partir de fermentación estática en medio PDA, se obtuvieron extractos etanólicos, posteriormente purificados y analizados cualitativamente por UPLC-MS. Los autores mencionan que los compuestos alquilo-aromáticos detectados: penixilarina A-D, 1, 1,3-dihidroxi-5-(12-hidroxiheptadecil) benceno y 1,3-dihidroxi-5-(12-sulfoxiheptadecil) benceno, presentan actividad antimicrobiana ante *Bacillus subtilis* y *Vibrio parahemolyticus* (Yu et al., 2019).

Se ha reportado la generación de compuestos micotóxicos a partir de *P. crustosum*, en un estudio previo, se evaluó el efecto del pH y la temperatura en la formación de micotoxinas en arroz, detectadas cuantitativamente mediante HPLC-MS. Se encontró que a niveles muy bajos de pH (2.0) se forman thomitremas A y E, provenientes de la conversión de penitremas A y E, sin embargo, no se detectó a pH de 5.0 después de 72 h en cultivo. No hubo crecimiento colonial a 10°C, pero a 15 y 25°C se detectó una baja concentración de roquefortina C (Rundberget et al., 2004a).

La producción de pectinasas por *A. flavipes* fue escalada de 1 L a un biorreactor de agitación de 5 L de volumen de operación, utilizando cáscara de limón (10 g/L) a 37°C por 144 h de fermentación, se determinó la viabilidad de escalamiento, determinando los parámetros de operación. Se observó un incremento de 40 veces en la producción de exo pectinasas (Wolf-Márquez et al., 2017).

A partir de la optimización de la producción de xilanasas por *A. brasiliensis* en cultivo sumergido en matraz de 1 L utilizando salvado de trigo como cosustrato (1.1162 ± 0.003 U/mL), se escaló la producción utilizando un biorreactor de tanque de agitación (1 L, pH 6.5, 200 rpm y 1 vvm), inoculando al microorganismo en la fase

logarítmica, encontrando una actividad de 3.112 ± 0.246 U/mL a las 72 h de fermentación (Jee Hsiung, 2015).

4. ANÁLISIS CRÍTICO DE LA LITERATURA

Penicillium crustosum es un potente productor de hidrolasas en fermentación sumergida, sin embargo, no se ha probado que esta cepa pueda producir de manera conjunta, pectinasas, celulasas y xilanasas.

Penicillium crustosum genera compuestos bioactivos con posible aplicación antimicrobiana pero no se ha evaluado la producción de manera conjunta con hidrolasas.

No se ha evaluado la producción de compuestos bioactivos con *P. crustosum* utilizando agro residuos como inductores.

La producción de xilanasas, celulasas y pectinasas por *P. crustosum* no ha sido escalada por similitud geométrica.

Además, no existen estudios previos en donde se utilice a *P. crustosum* como microorganismo bioproductor en una biorrefinería.

5. APORTACIÓN CIENTÍFICA

Desarrollo de una plataforma para una biorrefinería para la producción enzimática y de compuestos bioactivos por fermentación sumergida de *P. crustosum* utilizando agro residuos y su escalamiento por similitud geométrica.

6. HIPÓTESIS

La fermentación sumergida con *Penicillium crustosum* utilizando salvado de trigo y/o cáscara de limón como cosustratos produce en conjunto pectinasas, xilanasas, celulasas y compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana.

7. OBJETIVO GENERAL

Identificar compuestos bioactivos y enzimáticos, así como escalar la fermentación sumergida de *Penicillium crustosum* para su potencial aplicación como plataforma en una biorrefinería.

8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Optimizar la producción de las hidrolasas en fermentación sumergida utilizando salvado de trigo y/o cáscaras de limón como cosustrato
2. Identificar y optimizar la producción de compuestos bioactivos en fermentación sumergida con distintos cosustratos
3. Descartar la presencia micotoxinas a las condiciones óptimas de producción enzimática
4. Obtener los parámetros cinéticos de la producción enzimática y de los compuestos bioactivos
5. Semipurificar y liofilizar los extractos y evaluar la actividad enzimática y antimicrobiana
6. Escalar por similitud geométrica la producción enzimática y de compuestos a 200 mL y 2 L y 20 L

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Material y reactivos

Agar Papa Dextrosa (PDA), y caldo de Papa Dextrosa (PDB) (BD Difco), caldo Muller-Hilton, agar Luria Bertani (LB) como medios de cultivo. D-(+)-Ácido galacturónico, D-xilosa, D-glucosa (Sigma-Aldrich), albúmina sérica bovina (Quick Start, Bio-Rad), ácido tánico (Sigma-Aldrich), se emplearon como estándares de calibración. 3-5 ácido dinitrosalicílico (DNS) (Sigma-Aldrich), reactivo de Bradford, reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) utilizados como reactivos. Celulosa microcristalina (Avicel), pectina cítrica (Sigma-Aldrich), Xilano (Megazyme) empleados como sustratos para la reacción enzimática. Pectinasa, xilanasas y celulasa de *A. niger* (Sigma-Aldrich) utilizado como controles positivos.

Las bacterias patógenas, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) y *Pseudomona aeruginosa* ATCC 23853, fueron obtenidas del Departamento de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL. La cepa *P. crustosum* OR889307 y *Candida albicans* fueron obtenidas del Laboratorio de Electroquímica y Biocatálisis Ambiental de la Facultad de Ciencias Químicas, UANL.

Todos los productos químicos utilizados en este proyecto fueron de grado analítico.

9.2 Tratamiento y caracterización de la materia prima

Se seleccionaron la cáscara de limón y el salvado de trigo como agros residuos para su uso como cosustratos en la fermentación sumergida de *P. crustosum*. El salvado de trigo (ST) fue adquirido en la Central de Abastos, Guadalupe, N.L, México, mientras que las cáscaras de limón (CL) se obtuvieron de una juguería local en Monterrey, N.L, México.

Una muestra representativa de estos agros residuos se secó en horno convencional a 80°C durante 24 h. Posteriormente, la muestra fue molida utilizando un molino vibracional (Rock Lab modelo Benchmill) hasta su pulverización y se tamizó utilizando tamices de 300 y 150 micras. Se seleccionó la parte intermedia del tamizado con el objetivo de homogeneizar la muestra, manteniendo condiciones asépticas para su posterior uso como cosustrato.

Para evaluar el contenido de pectina en la cáscara de limón, se llevó a cabo la extracción mediante hidrólisis ácida. Se utilizó una mezcla de agua destilada (16.6 mL) y ácido clorhídrico al 37% v/v (0.09 mL), a la cual se añadieron 5 g de cáscara de limón pulverizada y tamizada. La mezcla se ajustó a un pH de 1.5. Posterior a la hidrólisis, la pectina fue precipitada añadiendo etanol al 95% v/v. El precipitado resultante se colectó por filtración y se secó a 40°C durante 12 horas.

Ambos agro residuos (cáscara de limón y salvado de trigo) fueron caracterizados mediante la determinación del contenido de azúcares reductores (Miller, 1959), compuestos fenólicos totales (Singleton et al., 1999) y proteína extracelular total (Bradford, 1976).

9.3 Microorganismo y condiciones de crecimiento

La cepa *Penicillium crustosum* fue previamente aislada en el Laboratorio de Fisicoquímica de Interfaces (Facultad de Ciencias Químicas, UANL) (Núñez-Serrano A.S et al., 2021) e identificada genéticamente, con el número de acceso OR889307 registrado en el Gen Bank. La inoculación de la cepa se realizó en placas de agar papa dextrosa (PDA) suplementadas con pectina cítrica (2% p/v), a una

temperatura de 35°C durante 5 días. Posteriormente, se colectaron las esporas y se suspendieron en solución salina al 0.09%. La concentración de esporas se determinó utilizando la cámara de Neubauer. Se midió la absorbancia de la solución de esporas a una longitud de onda de 660 nm. A partir del valor de absorbancia (0.055), se estimó una concentración de esporas de 1×10^6 esporas/mL. Para garantizar una concentración de inoculación uniforme, todos los experimentos se estandarizaron a este nivel de absorbancia.

9.4 Condiciones de cultivo para la producción enzimática

La producción enzimática se llevó a cabo mediante fermentación sumergida, el medio de cultivo tomado como control, consistió en 100 mL de caldo papa dextrosa (PDB) en un matraz Erlenmeyer 250 mL. Con el objetivo de evaluar el efecto del cosustrato, de manera separada, se agregó 2% p/s de cáscara de limón pretratada y 2% p/s de salvado de trigo sometido al pretratamiento físico previamente descrito. La inoculación de *P. crustosum* OR889307 fue de 1.6×10^6 esporas/mL. La fermentación se realizó bajo agitación constante (120 rpm) a 35°C y pH inicial 6.0 durante 168 h.

El extracto enzimático crudo se colectó cada 24 h. La biomasa fúngica fue separada mediante centrifugación (4,500 rpm, 4°C por 15 min) y el sobrenadante líquido fue recuperado y filtrado mediante papel filtro Whatman No.1 y posteriormente, a través de membrana celulósica de 0.45 μ m.

9.5 Determinación de la actividad enzimática y análisis de la proteína extracelular

Para determinar la actividad de las exo-poligalacturonasas (exo-PG), se incubó una mezcla de pectina cítrica (100 μ L) al 1% p/v y 500 μ L del extracto enzimático en 1 mL de buffer de citratos (pH 5.0) a 35° por 25 min. Posteriormente, se tomó 500 μ L de la mezcla previa y se agregaron 500 μ L del reactivo DNS, siguiendo de una reacción a 100°C durante 10 min. Se utilizó ácido-galacturónico como estándar y se construyó una curva de calibración correspondiente, determinando la concentración de este monómero mediante espectroscopía de UV-Vis a 545 nm. Una unidad de actividad de exo-poligalacturonasas se definió como el aumento de enzima que

cataliza 1 μmol de ácido galacturónico por mililitro por minuto (Mahmoodi et al., 2017).

Para la actividad de las xilanasas, se incubaron 500 μL del extracto enzimático en una solución de xilano al 1.0 % p/v en 1 mL de buffer de citratos (pH 5.5, 50 mM) a 50°C por 10 min. Se cuantificó el contenido de azúcares reductores mediante el reactivo DNS (Miller, 1959). Una unidad de actividad xilanolítica se definió como el aumento de D-xilosa producido (μmol) por mL por minuto. Previamente realizando una curva de calibración con D-xilosa como estándar. La absorbancia de la muestra se leyó a 540 nm en UV-Vis (Jee Hsiung, 2015).

Para cuantificar la actividad de celulasas, se determinó la liberación de azúcares reductores mediante el método de DNS, utilizando glucosa como estándar. Se incubó una mezcla del extracto enzimático con 100 μL de celulosa microcristalina (*Avicel*) al 1.0% p/v a 50°C por 30 min. Una unidad de actividad de celulasas se definió como el aumento de la enzima que produce un micro mol de glucosa por mililitro por minuto (Santos et al., 2021).

Se estimó el contenido de proteína extracelular en el extracto enzimático crudo, utilizando serina albumina (129-1500 $\mu\text{g/mL}$) como estándar. La absorbancia se leyó a una longitud de onda a 595 nm en UV-Vis (Bradford, 1976). La actividad específica (U/mg) se expresó como la unidad de actividad enzimática por miligramo de proteína extracelular.

9.6 Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba Tukey para evaluar la diferencia estadísticamente significativa al analizar el efecto del cosustrato sobre la actividad enzimática obtenida, con el propósito de seleccionar el mejor cosustrato para la producción enzimática. Se consideran como significativos los valores con $p < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Origin 2021.

9.7 Optimización de la producción enzimática

Se optimizó la producción enzimática de manera individual mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR) para pectinasas, celulasas y xilanasas. Se

empleó un diseño central compuesto centrado a las caras (DCCCC) para evaluar los parámetros significativos durante la fermentación. En la evaluación de la producción de pectinasas y celulasas, se consideraron tres variables independientes: (X_1) temperatura, (X_2) pH y (X_3) cofactor (MnSO_4 , g/L) con dos niveles (-1 y +1) (Tablas 6 y 7).

Para la optimización para la producción de xilanasas, se incluyeron cuatro variables independientes: (X_1) temperatura, (X_2) pH, (X_3) cofactor (MnSO_4 , g/L) y (X_4) concentración de PDB (%), también con dos niveles (-1 y +1) (Tabla 8).

Los valores de las variables independientes se seleccionaron con base a la literatura consultada y en la naturaleza específica de cada enzima.

Los modelos matemáticos fueron evaluados mediante el análisis de varianza utilizando el software Design Expert 11 (Statease, Inc., Minneapolis, MS, USA). Además, este software se utilizó para generar las gráficas de superficie de respuesta y las gráficas de contorno.

Tabla 6 Variables experimentales para DCCCC utilizado en la optimización de la producción de pectinasas

Variables independientes			$-\alpha$	-1	0	1	$+\alpha$
(X_1)	Temperatura	(°C)	30	30	35	40	40
(X_2)	pH	-	4	4	5	6	6
(X_3)	MnSO_4	(g/L)	1.5	1.5	2.0	3.5	3.5

Tabla 7 Variables independientes y valores seleccionados para el DCCCC para la optimización de la producción de celulasas

Variables independientes			$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
(X_1)	Temperatura	(°C)	30	30	37.5	45	45
(X_2)	pH	-	4.5	4.5	5.5	6.5	6.5
(X_3)	MnSO_4	(g/L)	1.5	1.5	2.5	3.5	3.5

Tabla 8 Variables independientes para el DCCCC 2^4 utilizado para la optimización de la producción de xilanasas

Variables independientes			$-\alpha$	-1	0	1	$+\alpha$
(X_1)	Temperatura	(°C)	30	30	37.5	45	45

(X ₂)	pH	-	4.5	4.5	5.5	6.5	6.5
(X ₃)	MnSO ₄	(g/L)	1.5	1.5	2.5	3.5	3.5
(X ₄)	PDB	(%)	0.25	0.25	0.625	1	1

Se utilizó un DCCCC con dos factores y tres niveles para evaluar el efecto de las variables independientes en la producción de exo-poligalacturonasas utilizando cáscara de limón como cosustrato. Este diseño estadístico constó de un total de 20 experimentos, que incluyeron 6 puntos centrales, y la actividad exo-PG se tomó como respuesta. Se empleó un modelo de segundo orden, donde Y representa la actividad enzimática, β_0 es el coeficiente de intercepción, y β se utilizó para calcular la respuesta predicha, X₁ es la temperatura codificada, X₂ es el pH codificado, y X₃ es la concentración del cofactor codificada (MnSO₄) (Ec. 1).

Ec. 1

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2$$

De manera similar, se utilizó un DCCCC 2³ para optimizar la producción utilizando cáscara de limón como cosustrato. Se llevaron a cabo un total de 20 experimentos con 6 puntos centrales. Se empleó un modelo de segundo orden (Ec. 1).

En el caso de la producción de xilanasas, se utilizó un DCCCC 2⁴, con un total de 30 experimentos que incluyeron 6 puntos centrales. Se empleó una ecuación polinómica de segundo orden (Ec. 2), donde β_0 es el coeficiente de intercepción, y β se utilizó para calcular la respuesta predicha. X₁ representa la temperatura codificada, X₂ el pH codificado, X₃ la concentración codificada del cofactor (MnSO₄), y X₄ la concentración codificada de PDB, mientras que Y es la actividad enzimática tomada como respuesta.

Ec. 2

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2$$

9.8 Optimización de la producción del cóctel hidrolítico

Se empleó un diseño DCCCC 2³ como método de evaluación de los parámetros significativos de la fermentación. En este diseño se incluyeron tres variables individuales: temperatura (°C), pH y MnSO₄ (g/L) como cofactor, estableciendo dos niveles (+1 y -1) (Tabla 9). La producción conjunta de las tres enzimas se llevó a cabo mediante fermentación sumergida utilizando cáscara de limón como cosustrato. El diseño estadístico presentó un total de 20 experimentos, incluyendo 6 puntos centrales y se obtuvieron tres valores de respuesta experimental: exo-PG (respuesta 1), celulasas (respuesta 2), xilanasas (respuesta 3), medidos en términos de actividad enzimática (U/mL). Se utilizó un modelo de segundo orden, donde Y representa las respuestas (actividad enzimática de exo-PG, celulasas y xilanasas), β_0 es el coeficiente de intercepción y β se utilizó para calcular la respuesta predicha. Además, X₁ representa la temperatura codificada, X₂ el pH codificado y X₃ es la concentración codificada del cofactor (MnSO₄) (Ec. 1).

Tabla 9 Variables independientes para el DCCCC 2³ utilizado para la optimización del cóctel hidrolítico

Variables independientes			(-α)	(-1)	(0)	(1)	(+α)
(X ₁)	Temperatura	(°C)	30	30	37.5	45	45
(X ₂)	pH	-	4.5	4.5	5.5	6.5	6.5
(X ₃)	MnSO ₄	(g/L)	1.5	1.5	2.5	3.5	3.5

9.9 Purificación enzimática parcial

El extracto enzimático se centrifugó y el sobrenadante se filtró a través de papel Whatman No. 1. El extracto resultante se sometió a ultrafiltración por tamaño molecular utilizando membranas Amicon de 10, 30, 50 y 100 kDa, analizando la actividad enzimática en cada fracción resultante. Se recolectó la fracción intermedia a 100 y 10 kDa y se denominó el cóctel hidrolítico parcialmente purificado.

9.10 Determinación del peso molecular por SDS-PAGE y zimograma

El extracto enzimático (coctel hidrolítico) parcialmente purificado se evaluó mediante SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 12%. Se empleó un marcador molecular marca *Novex*, *Invitrogen* como estándar. Además, se utilizaron enzimas

comerciales de pectinasas, celulasas y xilanasas de *A. niger* (Sigma-Aldrich) como control positivo. La electroforesis se llevó a cabo a 110 V durante 15 minutos, seguida de una aplicación de 140 V constante durante 2 horas. Después de la migración de las proteínas, el gel se tiñó utilizando una solución de nitrato de plata (U. K. Laemmli, 1970).

Se realizó el zimograma correspondiente para cada hidrolasa en condiciones desnaturalizantes. Para la evaluación de la actividad pectinolítica, se agregó pectina cítrica al 1.5% al gel de acrilamida. Después de la migración de las proteínas, el gel se sumergió en agua destilada para eliminar el buffer-SDS restante, y luego se dejó sumergido en buffer de acetatos pH 4.9, 1 M, a 35°C durante 12 horas para re naturalizar la proteína. Posteriormente, el gel se tiñó con una solución de rojo Congo al 1% durante 30 minutos, y finalmente, se destiñó con NaCl al 1% hasta que se observó una banda correspondiente a la enzima.

Para la determinación de las celulasas, el gel de acrilamida se suplementó con celulosa microcristalina al 2%. Después de la electroforesis, el gel se lavó para eliminar SDS restante y se sumergió en buffer de acetatos, durante 12 horas a 45°C. Luego se tiñó solución de rojo Congo al 2% y se destiñó con NaCl hasta que se observó una banda clara.

En el caso de la evaluación de las xilanasas, se siguió un método similar al de las celulasas, pero se varió la suplementación del gel con xilano al 2%. Las condiciones de renaturalización de la proteína fueron 45°C durante 12 horas e inmerso en buffer de acetatos pH 4.9.

9.11 Liofilización del cóctel hidrolítico parcialmente purificado

El extracto correspondiente al cóctel hidrolítico parcialmente purificado fue liofilizado a -50°C bajo presión a vacío (50 mT) hasta que la muestra fue pulverizada. Con el objetivo de evaluar la estabilidad enzimática posterior a este método de almacenamiento, la muestra fue reactivada utilizando buffer de citratos pH 5.0, a 45°C durante 30 min. La actividad enzimática se determinó por miligramo liofilizado.

9.12 Evaluación de micotoxinas en condiciones de fermentación

Se evaluó la presencia de Penitrem A, una micotoxina reportada como producida por cepas de *Penicillium crustosum*, bajo las condiciones de la producción del cóctel hidrolítico. Para esto, se analizaron tanto el extracto crudo como una muestra del cóctel hidrolítico parcialmente purificado mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Se utilizó como estándar una muestra de Penitrem A (Sigma Aldrich) a una concentración de 0.5 mg/mL, disuelta en 1 mL de acetonitrilo y filtrada por membrada de 0.22 μ m. El análisis se llevó a cabo en un equipo: cromatógrafo de líquidos de alta resolución (YL9100 Young Lin, Korea), equipado con un detector con arreglo de diodos (DAD) y una columna C18 Gemini, Phenomenex (250 x 4.5 mm, 5 μ m). La detección se realizó a una longitud de onda de 296 nm, y se realizó una separación isocrática utilizando una fase móvil de acetonitrilo/agua (80:20 v/v), a un flujo de 1 mL/min, y con un volumen de inyección de 20 μ L.

9.13 Determinación de los parámetros cinéticos

Para determinar los parámetros cinéticos se siguió el modelo de Monod. Primeramente, se construyó una curva de crecimiento de *P. crustosum*, tomando una alícuota de la cepa en su fase logarítmica, que se alcanzó tras 5 días de crecimiento en medio PDA + pectina al 2%. Esta alícuota fue resuspendida en solución salina, y posteriormente se realizaron diluciones seriadas. La curva de crecimiento celular resultante relacionó la densidad óptica medida a 600 nm con la concentración celular, expresada en g/mL, lo que permitió establecer una correlación entre la absorbancia y la biomasa celular para los análisis cinéticos.

Los parámetros cinéticos fueron determinados en las condiciones óptimas de fermentación del coctel hidrolítico de 0 a 168 h. cada 24 horas se tomaron muestras periódicas para determinar la densidad óptica, además de cuantificar los azúcares reductores. Con los datos obtenidos se calculó la tasa específica de crecimiento (μ) y la concentración del sustrato (S). Posteriormente, los datos se ajustaron a la ecuación de Monod (Ec. 3).

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_m + S}$$

Donde:

μ : tasa de crecimiento específico

μ_{max} : tasa de crecimiento máxima

S: concentración del sustrato

K_m : constante de afinidad

9.14 Condiciones de cultivo para la producción de compuestos antimicrobianos

Se evaluó el efecto del tiempo y el uso del cosustrato en la producción de compuestos con actividad antimicrobiana en fermentación sumergida. Bajo las condiciones óptimas de la producción del coctel hidrolítico (45°C, pH 5.05 y 2.5 mg/mL $MnSO_4$ con 2% p/s de cáscara de limón) y sin cosustrato a (35°C, pH 5.5 y 2.5 mg/mL $MnSO_4$) se evaluó la producción durante 190 h de fermentación, bajo agitación constante a 120 rpm. Cada 24 horas, se tomó una muestra representativa del sobrenadante, la cual se filtró a través de papel filtro Whatman No.1 y una membrana de celulosa de 0.45 μm , denominándose muestra cruda.

9.15 Extracción de los compuestos antimicrobianos

Las muestras crudas con mayor actividad antimicrobiana se extrajeron con acetato de etilo (tres veces) utilizando un embudo separador. Los extractos de acetato de etilo se evaporaron al vacío a 50°C para concentrar las muestras. Tanto la fase orgánica como la fase acuosa se evaluaron posteriormente para determinar la actividad antimicrobiana.

9.16 Fraccionamiento de los extractos con actividad antimicrobiana

Las muestras que mostraron la mayor actividad antimicrobiana se fraccionaron y concentraron utilizando una membrana de corte de 10 kDa. Las muestras se centrifugaron a 4,500 rpm durante 20 minutos a 4°C. Las dos fracciones resultantes: mayor a 10 kDa y menor a 10 kDa. Ambas fracciones se evaluaron para determinar su actividad antimicrobiana.

9.17 Semi purificación de las muestras crudas con actividad antimicrobiana

La semipurificación de los compuestos bioactivos se llevó a cabo mediante cromatografía en columna con el objetivo de separar y recuperar los compuestos con actividad antimicrobiana. Se utilizó Amberlite XAD16 como resina. Primero, se realizó una elución con agua destilada para eliminar las impurezas, seguida de una elución con etanol absoluto para obtener la fracción orgánica de interés. Posteriormente, el solvente se evaporó hasta obtener un polvo fino, la muestra fue disuelta en agua destilada y filtrada a través de membranas de 0.45 µm (Carlos et al., 2020a).

9.18 Determinación de la actividad antimicrobiana

Para evaluar cualitativamente la actividad antimicrobiana, se utilizó el método de disco de difusión en placa. Los microorganismos seleccionados fueron *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

Los patógenos se cultivaron en medio Luria Bertani (LB). Cada cultivo se fijó en una concentración de 1×10^8 UFC/mL y se inóculo por esparcimiento homogéneo en las placas de agar LB. Discos de papel filtro (Whatman No.1 de 1.6 mm) se impregnaron con 20 µL de la muestra cruda. Como controles, se utilizó 20 µL de agua estéril como control negativo, 20 µL de estreptomicina (2 mg/mL) como control positivo para *E. coli* y *S. aureus*, y 20 µL fluconazol (2 mg/mL) para *Candida albicans*. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C. La actividad antimicrobiana se evaluó visualizando las zonas claras alrededor de los discos y se midió el diámetro de estas zonas (Korejo et al., 2014), (Rančić et al., 2006).

Para la evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana, se realizó la prueba de micro dilución. El cultivo de los patógenos se realizó como se describió previamente, en una microplaca de 96 pozos (12x8) se transfirió 100 µL que contenía 100 µL de caldo Müller-Hilton. Se utilizaron los controles descritos previamente, 100 µL de agua estéril como control negativo, 100 µL de estreptomicina (2 mg/mL) como control positivo para *E. coli* y *S. aureus*, y 100 µL fluconazol (2 mg/mL) para *Candida albicans*. Evaluando 100 µL de la muestra del extracto fermentativo. Con el objetivo de determinar la concentración mínima

inhibitoria, se realizaron diluciones seriadas del extracto fermentativo de *Penicillium crustosum*. Las microplacas se incubaron durante 24 horas a 37°C. La actividad antimicrobiana se determinó como el porcentaje de inhibición midiendo la turbidez a 660 nm (Attia et al., 2022).

9.19 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó en la muestra seleccionada que mostró el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento de patógenos, en este proyecto la muestras semi purificadas presentaron mayor actividad antimicrobiana. Estas muestras fueron rehidratadas con agua destilada estéril en un rango de concentración de 500 a 0.6 µg/mL. El análisis fue realizado ante *E. coli*, *S. aureus*, *S. aureus* resistente a meticilina y *P. aeruginosa*. Las microplacas fueron incubadas por 24 horas a 37°C, y la CMI fue definida como la concentración mas baja en la que se inhibe completamente el crecimiento del patógeno, la turbidez fue medida a 660 nm utilizando un espectrofotómetro con lector de microplacas.

9.20 Análisis por cromatografía líquida de alta resolución acoplado a masas (RP-HPLC-ESI-MS)

Se realizó un análisis por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) en un equipo HPLC Varían ProStar 410, Palo Alto, CA, USA con un detector de arreglos de fotodiodos (PDA) de las muestras semi purificadas con resina. Utilizando una columna C18 Denali (150 x 2.1 mm, 3 µm). La fase de lavado fue metanol, y acetonitrilo (Solvente A) y acido fórmico (0.2% v/v, Solvente B), se utilizó un gradiente de 3% A, y 97% B 0-5 min 9% A y 91% B, 5-15 min 16% A y 84% B, 15-30 min 33% A y 67% B, 30-33 min 90% A y 10% B, 33-35 min 90% A y 10% C, 35-42 min 3% A y 97% B. El flujo fue de 1.2 mL/min con un volumen de inyección de 10 µL. Posteriormente la muestra fue ionizada en una trampa de iones (Varían 500-MS) equipado con una fuente de ionización por electrospray. El análisis de masas se realizó en modo negativo $[M-H]^{-1}$, aplicando un voltaje en spray de 5.0 kV, un voltaje capilar de 90.0 V y una temperatura de 350°C. Las muestras fueron analizadas en un rango de 100-2000 m/z (Cerdeja-Cejudo et al., 2024).

9.21 Escalamiento de la fermentación sumergida con cosustrato para la producción del cóctel hidrolítico y de los compuestos con actividad ante *E. coli*

El escalamiento de la fermentación sumergida bajo condiciones óptimas para la producción del cóctel hidrolítico y de los compuestos con actividad contra *Escherichia coli* se realizó en un tanque de agitación, empleando un modelo de escalamiento basado en la similitud geométrica. Primeramente, se determinaron los parámetros dimensionales del biorreactor con un volumen operacional de 200 mL, tomando como referencias de las dimensiones de un matraz Erlenmeyer de 250 mL con un volumen operacional de 100 mL. El proceso se llevó a cabo siguiendo las ecuaciones correspondientes con igual transferencia de masa (Ec. 4)

Ec. 4

$$V = A_t \cdot H = \frac{\pi D_T^2}{4} \cdot H = \frac{\pi D_T^3}{4}$$

$$D_T = \sqrt[3]{\frac{4 \cdot V}{\pi}}$$

$$H = D_T \quad J = \frac{D_T}{10}$$

$$D_a = \frac{D_T}{3} \quad L = \frac{D_a}{4}$$

$$E = D_a \quad W = \frac{D_a}{5}$$

Donde:

V: Volumen operacional

D_a: Diámetro del agitador

A_t: Área transversal

E: Altura del impulsor a base del tanque

H: Altura

L: Ancho del impulsor

D_t: Diámetro

H: Altura del impulsor

El biorreactor con un volumen operacional de 200 mL consistió en un reactor de vidrio con una altura total de 12 cm, un diámetro total (D_t) de 6.33 cm y una altura del líquido (H) de 6.33 cm. La agitación se aplicó utilizando un motor con control de velocidad fijado a 80 rpm, utilizando un agitador de silicona con un diámetro (D_a) de

2.11 cm, y colocado a una altura (E) de 2.11 cm. Se mantuvieron condiciones de esterilidad durante todo el proceso y se controló la temperatura con una plancha de calentamiento a 45°C. El pH fue ajustado previamente a la esterilización a 5.5. Se tomó muestras periódicas cada 24 horas, y se determinó la actividad hidrolítica a las 144 horas de fermentación, además de realizar pruebas de actividad antimicrobiana.

De manera similar, se construyó un biorreactor de 2 L, con un reactor de vidrio con una altura total del tanque de 20 cm, mientras que el diámetro total (Dt) fue de 13.65 cm y una altura del líquido (H) de 13.65 cm. La agitación se mantuvo de manera controlada a 180 rpm, utilizando un agitador de acero inoxidable tipo hélice marina de tres aspas con un diámetro (Da) de 4.55 cm, colocado a una altura (E) de 4.55 cm. El tanque fue aireado a un flujo controlado, pasando a través de una membrana de 0.2 µm para asegurar la esterilidad. La temperatura fue monitoreada y controlada durante todo el proceso de fermentación.

10 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1 Evaluación del efecto del uso de cosustratos en la producción enzimática pectinolítica

La actividad enzimática puede ser influenciada por diversos factores, como la temperatura, el pH, el tamaño del inóculo y la fuente de carbono, así como los nutrientes complementarios para el crecimiento del microorganismo productor (Valle-Pérez et al., 2021).

Se ha observado que el medio de cultivo rico en compuestos pécticos, como la pectina y el ácido galacturónico, puede estimular la producción de pectinasas (Vries et al., 2002b). Por lo tanto, el uso de un cosustrato rico en pectina puede aumentar la producción de enzimas pectinolíticas, como se observó en los resultados obtenidos (Fig. 5). Se registró una diferencia de 4 veces más en la actividad enzimática producida en medios con cosustratos ricos en pectina, como la cáscara de limón (980.12 U/mL) y la pectina extraída de la cáscara de limón (82% p/p de pectina extraída) (992.26 U/mL), en comparación con el medio control (230.01

U/mL). Además, el efecto prevaleció en la evaluación del uso de salvado de trigo como cosustrato, donde la máxima actividad pectinolítica fue de 244.03 U/mL, solo un 6% más comparando con el control. No se observó diferencia significativa entre la actividad obtenida en el medio suplementado con la pectina extraída del salvado de trigo (31% p/p pectina extraída).

Esta diferencia entre la producción obtenida comparando los dos cosustratos utilizados puede estar relacionada con un efecto de represión catabólica debido a la concentración de glucosa presente en los medios fermentativos. El salvado de trigo presenta una mayor concentración de azúcares, como la glucosa y la lignocelulosa, en comparación con la cáscara de limón, lo que podría provocar una disminución en la expresión de genes que codifican la síntesis de enzimas pectinasas. Este efecto se ha observado en la producción de enzimas pectinasas a partir de la fermentación sumergida de *A. niger* CH4, donde la actividad se vio disminuida cuando el medio de cultivo con pectina como cosustrato fue suplementado con 3% de glucosa, demostrando un efecto de represión/inhibición catabólica debido a la fuente de carbono (Solis-Pereira et al., 1993), y demostrando un efecto inductor por la composición química como fuente de nutrientes en el medio de cultivo en la producción hidrolítica. En este proyecto se observó que, a mayor

concentración de pectina como cosustrato y fuente de carbono, la producción de pectinasas aumenta (Ahmed et al., 2016; Pedrolli et al., 2009).

Este mismo efecto puede estar relacionado con el resultado obtenido en la producción de pectinasas en el medio fermentativo suplementado con salvado de

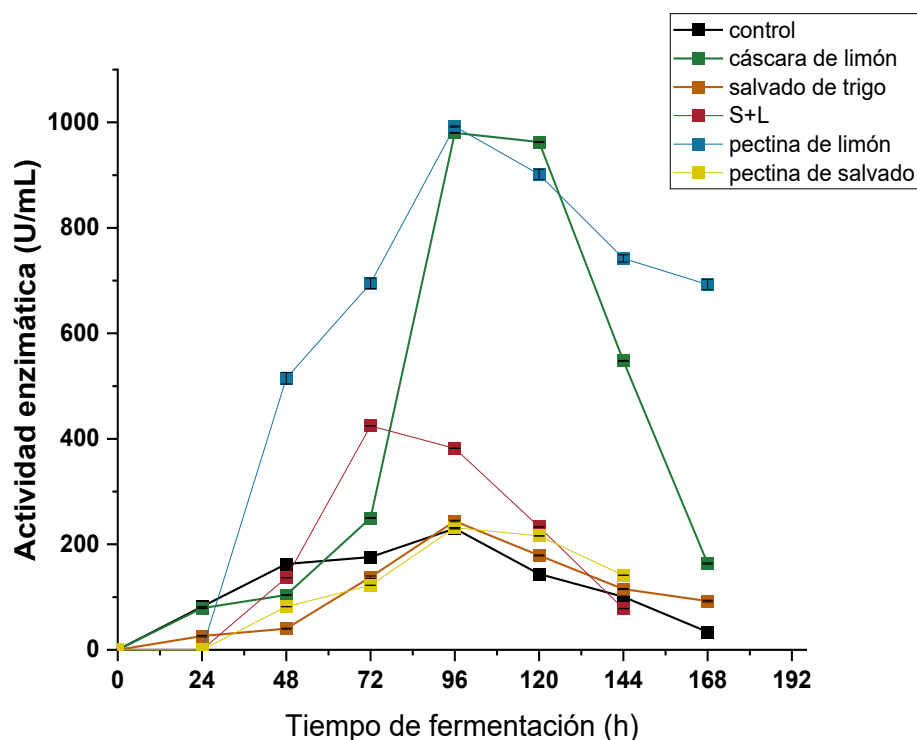


Fig. 5 Evaluación del efecto del cosustrato en la producción de pectinasas con respecto al tiempo de fermentación.

trigo (1% p/s) y cáscara de limón (1% p/s), donde se observó que la mayor actividad enzimática se registró a las 72 horas de fermentación en comparación con los demás medios de cultivos, la cual se obtuvo a las 96 horas de fermentación. Sin embargo, aunque el tiempo de reducción se vio disminuido, la actividad pectinolítica fue 2.3 veces menor en comparación con la máxima actividad producida con cáscara de limón. Esto pudo ser debido al aumento en la concentración de glucosa aportada por el salvado de trigo y a la menor concentración de pectina proveniente

de la cáscara de limón. Estas condiciones de cultivo podrían permitir la generación de otros tipos de metabolitos secundarios o modificar el crecimiento microbiológico reduciendo la fase logarítmica del hongo productor (Ahmed et al., 2016; Papadaki et al., 2020a).

En investigaciones anteriores, se ha evaluado al hongo filamentoso *P. crustosum* como productor de enzimas pectinasas, logrando una actividad máxima de 548 U/mL bajo condiciones óptimas de producción (35°C y pH 6.0), utilizando un medio mineral y cáscara de limón (2% p/s) como cosustrato (Núñez-Serrano A.S et al., 2021). Este resultado es similar a lo obtenido en el presente proyecto, donde el aumento en la actividad podría atribuirse al período de adaptación del hongo a las condiciones de fermentación e incubación. Hasta el momento, no existen otros reportes sobre el uso de *P. crustosum* como o productor de enzimas pectinasas.

Sin embargo, trabajos de investigación previos utilizan comúnmente a *A. niger* como productor de pectinasas, logrando una actividad máxima de 117.1 ± 3.4 $\mu\text{M/mL/min}$ utilizando cáscara de naranja como fuente de carbono, a una temperatura de fermentación de 30°C y pH de 5.5 al quinto día de fermentación (Ahmed et al., 2016). Por otro lado, la cáscara de limón como fuente de carbono también ha sido evaluada anteriormente para la producción de pectinasas a partir de la fermentación sólida de *A. niger* Aa-20, obteniendo una actividad enzimática máxima de 2.182 U/mL a 30°C después de 96 h de fermentación, utilizando un biorreactor de columna (Ruiz et al., 2012).

Además, el género *Penicillium* sp., también ha sido ampliamente estudiado como productor de enzimas pectinasas. Se ha reportado que *P. oxalicum* PJ02 alcanzó una actividad máxima de exo-pectinasa de 36.88 U/mL bajo condiciones óptimas de producción (36.5 °C y 1.12 g/L de NH₄Cl), utilizando cáscara de naranja mediante fermentación sumergida (P. J. Li et al., 2014). Del mismo modo, *P. chrysogenum* exhibió una actividad máxima de enzimas poligalacturonasas de 27.21 U/mL a 35°C y pH de 4.5 mediante fermentación sumergida en medio suplementado con pectina (Banu et al., 2010).

La biosíntesis de enzimas pectinasas varía según las condiciones fisicoquímicas del medio, el microorganismo utilizado y la isoenzima analizada en los diferentes estudios de investigación. Esto se relaciona con la actividad exo-PG alcanzada con diferentes cosustratos en este proyecto a través de la fermentación sumergida de *P. crustosum*, lo que demuestra el efecto de la fuente de carbono, el uso de agro residuos como cosustrato y su composición química, así como del microorganismo productor y las condiciones de pre-adaptación y fermentación durante la producción enzimática.

A partir de la cuantificación de la proteína extracelular obtenida mediante la fermentación sumergida de *P. crustosum* con los diferentes cosustratos utilizados (Fig. 6), se observó un incremento en la producción de compuestos proteicos liberados al medio de cultivo con respecto al tiempo de fermentación. Este aumento se atribuye a la síntesis de metabolitos primarios y secundarios por parte del microorganismo fúngico, destacando la producción de enzimas hidrolíticas necesarias para la degradación de compuestos moleculares complejos en estructuras más simples que puedan ser utilizadas por el hongo filamentoso (Grijseels et al., 2017).

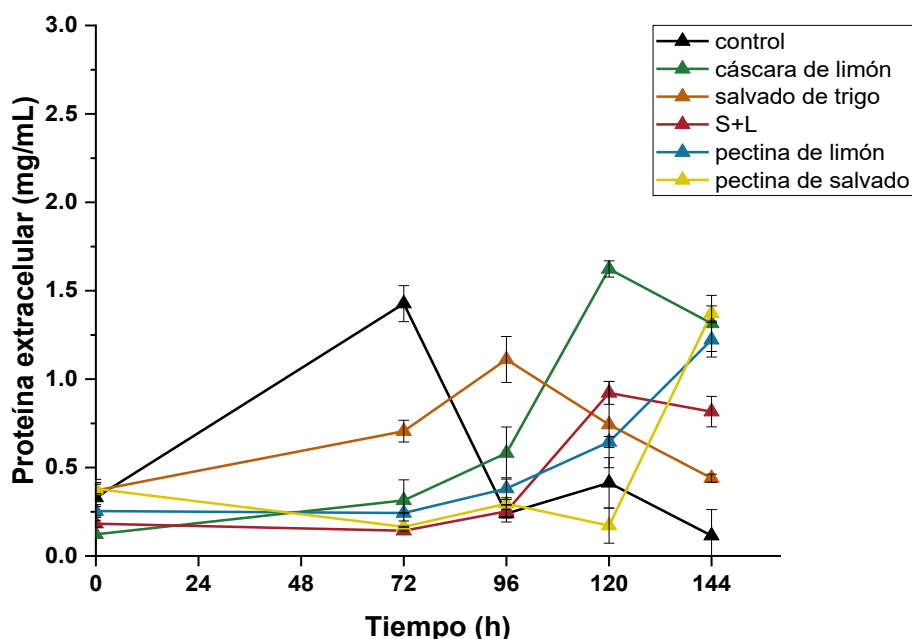


Fig. 6 Cuantificación de la proteína extracelular producida por *P. crustosum* mediante fermentación sumergida variando los cosustratos.

Al considerar los valores de concentración proteica, se calculó la actividad pectinolítica específica (U/mg de proteína extracelular) en función del tiempo de fermentación para cada uno de los cosustratos utilizados (Fig. 7). Se observó que los valores más altos se registraron a las 72 horas de fermentación en el medio suplementado con pectina de limón (4,085.81 U/mg), seguido de la mezcla de 1% de salvado de trigo y 1% de cáscara de limón (2,972.93 U/mg). Se observó que la síntesis de enzimas pectinolíticas en estos medios de cultivo ocurre en menor tiempo de fermentación que en el caso de la cáscara de limón, donde la actividad específica fue de 1,685.26 U/mg a las 96 horas. Esta reducción en el tiempo de producción de enzimas pectinasas en los medios mencionados puede atribuirse a la composición química de los cosustratos utilizados, lo que induce al hongo a sintetizar enzimas capaces de degradar los nutrientes presentes en el medio fermentativo (Malmström et al., 2000.). Estos resultados indican una alta generación de enzimas pectinasas a partir de *P. crustosum* en comparación con otros

compuestos proteicos que se pudieran estar generando en el tiempo de fermentación.

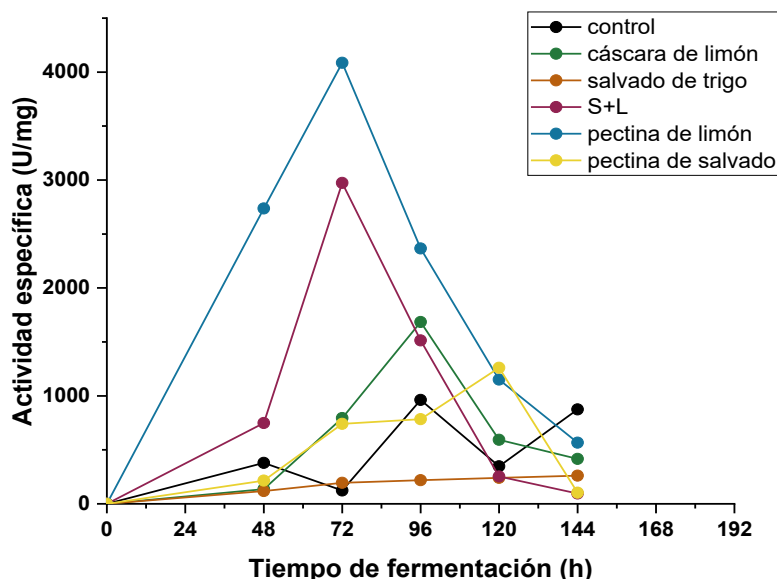


Fig. 7 Determinación de la actividad pectinolítica específica por mg de proteína extracelular (U/mg) producida por fermentación sumergida variando los cosustratos.

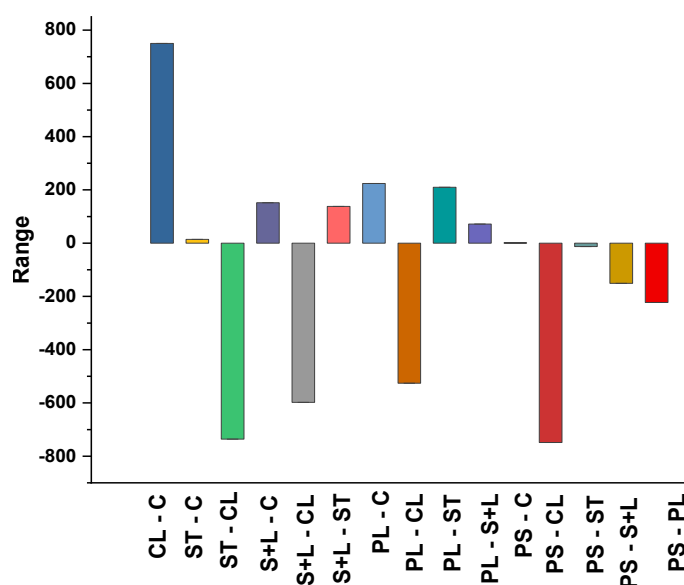
10.2 Análisis estadístico en la producción de enzimas pectinasas

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para evaluar las actividades enzimáticas máximas obtenidas con cada uno de los cosustratos a las 96 horas de fermentación (Tabla 10). Se observó que existe diferencia significativa en la actividad enzimática pectinolítica, lo que sugiere que existe un efecto del cosustrato en la producción de pectinasas a un nivel de significancia α de 0.05. Además, se obtuvo un coeficiente de determinación (R^2) de 0.94, lo cual indica un buen ajuste del modelo estadístico.

Además, según los resultados de la prueba estadística de Tukey (Fig. 8), se identificó una diferencia significativa a un nivel de α de 0.05 entre la actividad enzimática producida por los agros residuos seleccionados. Se destacó principalmente la diferencia entre la cáscara de limón y el salvado de trigo. Por lo tanto, se decidió seleccionar la cáscara de limón al 2% p/s como el mejor cosustrato en el medio de fermentación para la producción de pectinasas.

Tabla 10. Análisis estadístico de varianza (ANOVA) de una vía de la actividad pectinolítica variando los cosustratos mediante fermentación sumergida, R^2 0.94

	DF	Suma de cuadrados	Diferencia de cuadrados	F	Prob > F
Modelo	5	837879.629	167575.925	4311335.35	1.41507E-19
Error	6	0.233	0.038		
Total	11	837879.862			



CL, cáscara de limón; C, control; ST, salvado de trigo; S+L, 1% p/s salvado de trigo y 1% p/s cáscara de limón; PL, pectina de limón; PS, pectina de salvado de trigo

Fig. 8 Análisis Tukey, comparación entre las medias de la actividad enzimática producida comparando los cosustratos, indica que existe diferencia significativa a α de 0.05.

10.3 Evaluación del efecto del uso de cosustrato en la producción de enzimas xilanasas

En el presente proyecto se evaluó el efecto del uso de cosustratos en la producción de enzimas xilanasas mediante la fermentación sumergida de *P. crustosum*. Se ha demostrado que la fuente de carbono es un factor importante en la producción de xilanasas por microorganismos durante el proceso de fermentación. En este

estudio, se evaluaron diferentes agro residuos, como la cáscara de limón, el salvado de trigo, una mezcla de ambos en concentraciones iguales y la pectina extraída de estos residuos, como cosustratos para la producción de xilanasas (Fig. 9).

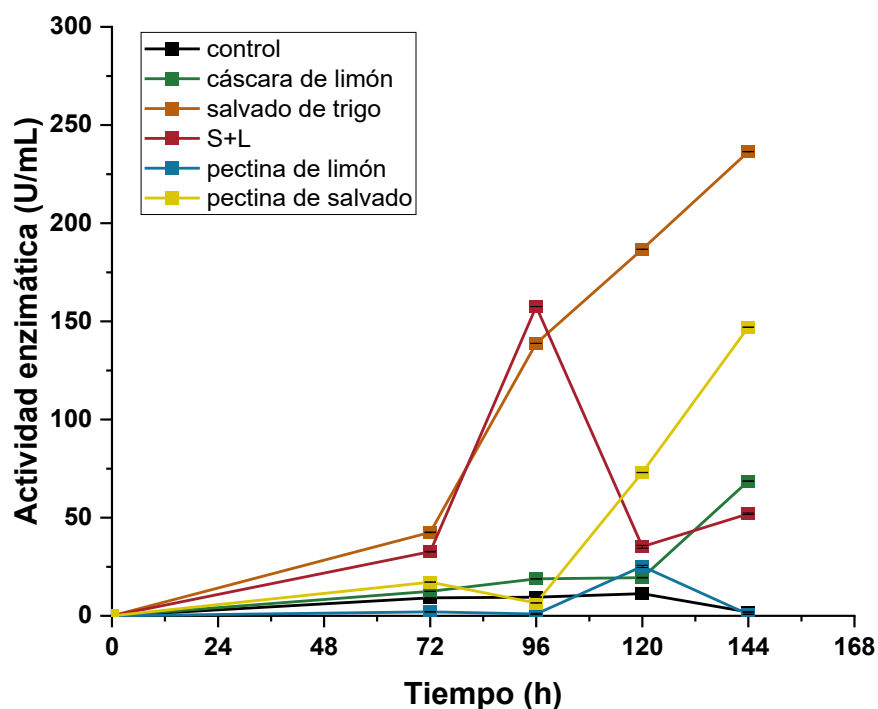


Fig. 9 Evaluación del efecto del uso de agro residuos como cosustrato en la producción de xilanasas con respecto al tiempo de fermentación.

En investigaciones previas realizadas en 2019, se reportó la producción de xilanasas utilizando residuos agroindustriales, tales como, la caña de azúcar, bagazo de trigo, cascarilla de arroz y cáscara de manzana, caracterizados por ser ricos en compuestos lignocelulósicos (Alokika & Singh, 2019). En este mismo año, se reportó la producción de xilanasas a partir de una cepa de *P. crustosum* inoculada en medio PDA (fermentación sólida), donde se obtuvo un extracto crudo con una actividad de 7.65 U/mL, resultado similar al obtenido en este proyecto en un medio de cultivo sin cosustrato (11.30 U/mL) a las 120 horas de fermentación. Sin embargo, la máxima actividad xilanolítica (236.30 U/mL) se alcanzó en un tiempo de fermentación de 144 horas, utilizando salvado de trigo como fuente

adicional de carbono. Se observó una diferencia de 20 veces más en comparación con el medio sin cosustrato, lo que sugiere que la cepa fúngica utilizada en este trabajo de investigación es eficientemente inducible según la fuente de carbono presente en el medio de cultivo, similar a lo observado durante la producción de pectinasas.

Este efecto puede explicarse por lo reportado en trabajos anteriores, donde se menciona que en presencia de L-arabinosa y arabinoxilano, los genes que codifican a las enzimas xilanasas son activados, esto el sistema regulatorio en *A. niger* (Vries et al., 2002a). Los agros residuos utilizados son ricos en ambos compuestos, lo que podría estar relacionado con la actividad xilanolítica alcanzada. La actividad de xilanasas a partir de la cáscara de limón fue 3 veces menor que la producida con salvado de trigo, pero similar a la reportada en la literatura por *P. oxalicum* (85.0 U/mL) en extracto crudo (Liao et al., 2014). Además, la actividad obtenida en el medio con la pectina extraída de la cáscara de limón fue menor (25.17 U/mL) a la alcanzada utilizando los cosustratos mencionados, lo que indica que la composición

La actividad específica fue determinada tomando los valores de la cuantificación proteica y la actividad xilanolítica con respecto al tiempo de fermentación (Fig.10). El valor obtenido en el tiempo máximo de actividad enzimática en el medio sin cosustrato (27.33 U/mg) fue similar a lo reportado en la producción xilanolítica en extracto crudo por *P. oxalicum* (23.4 U/mg) (Liao et al., 2014). Sin embargo, los valores máximos de actividad específica se obtuvieron en presencia de los cosustratos ricos en salvado de trigo, coincidiendo con los resultados registrados en la actividad enzimática, lo que indica una alta producción de enzimas xilanasas a partir del uso de este agro residuo.

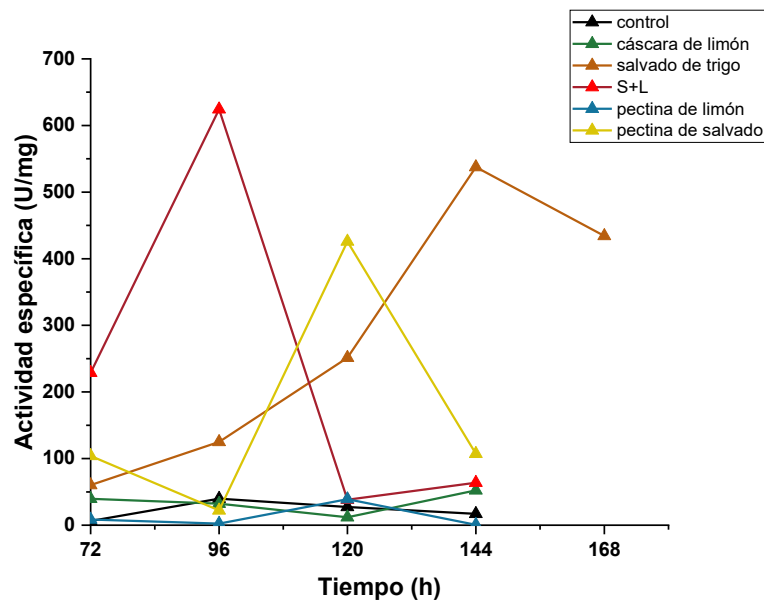


Fig. 10 Determinación de la actividad específica, actividad xilanolítica por mg de proteína producida por *P. crustosum* en fermentación sumergida variando los cosustratos.

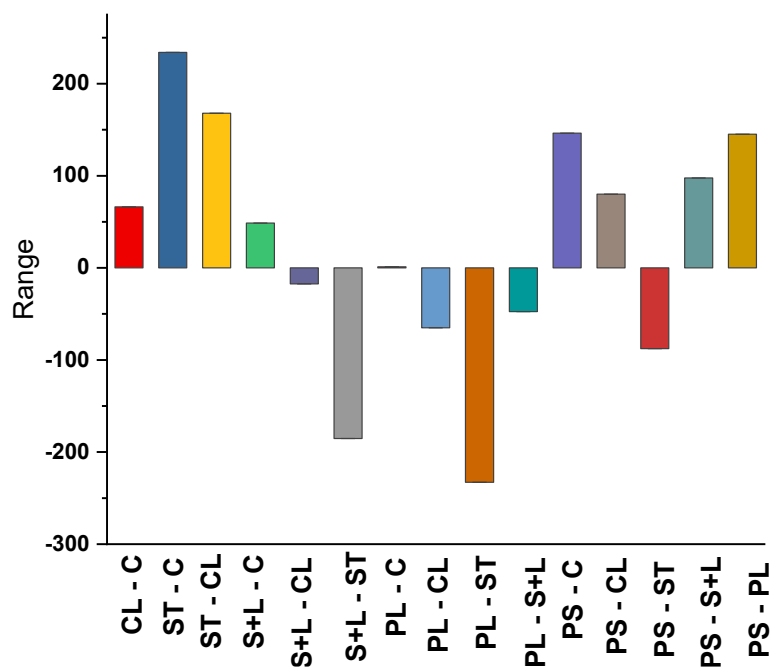
10.4 Análisis estadístico en la producción de enzimas xilanasas

Se llevó a cabo un análisis estadístico de varianza de una vía (ANOVA) sobre la actividad enzimática a las 144 horas de fermentación obtenida de cada uno de los medios utilizados (Tabla 11). El análisis estadístico reveló una R^2 de 0.97, lo que sugiere un buen ajuste del modelo utilizado. Además, se observó una diferencia significativa a un nivel de α de 0.05, lo que indica un efecto significativo en el uso de agro residuos como cosustrato en la producción de xilanasas por parte de *P. crustosum*.

Tabla 11. Análisis estadístico de varianza (ANOVA) de una vía de la actividad xilanolítica variando los cosustratos mediante fermentación sumergida

	DF	Suma de cuadrados	Diferencia de cuadrados	F	Prob > F
Modelo	5	83548.96	27849.65	52.101	1.35595E-5
Error	6	4276.24	534.53		
Total	11	87825.20			

De manera similar a la producción pectinolítica, se llevó a cabo una prueba estadística Tukey (Fig.11) para comparar las medias obtenidas en cada uno de los cosustratos utilizados. Con excepción a la pectina extraída de la cáscara de limón, se observó una diferencia significativa a un nivel de α de 0.05 en la producción de xilanasas con el uso de cosustrato en comparación del medio sin cosustrato, confirmando nuevamente el efecto inductor del uso de agro residuos ricos en compuestos lignocelulósicos en la producción enzimática. Además, se encontró una diferencia significativa al comparar la producción xilanolítica a partir del salvado de trigo y la cáscara de limón, lo que sugiere que para la producción de enzimas xilanasas en este proyecto, el salvado de trigo resultó ser el mejor agro residuo con potencial uso de cofactor.



cL, cáscara de limón; C, control; ST, salvado de trigo; S+L, 1% p/s salvado de trigo y 1% p/s cáscara de limón; PL, pectina de limón; PS, pectina de salvado de trigo

Fig. 11 Análisis Tukey, comparación entre las medias de la actividad enzimática xilanolítica producida comparando los cosustratos, indica que existe diferencia significativa a α de 0.05.

10.5 Evaluación del efecto del uso de cosustrato en la producción de celulasas

Se evaluó el efecto del agroresiduos seleccionados (cáscara de limón y salvado de trigo) en la producción de enzimas celulasas mediante la fermentación sumergida de *Penicillium crustosum* (Fig.12). El medio de cultivo sin cosustrato alcanzó una máxima actividad enzimática de 15.89 U/mL, un valor más alto que lo reportado en la literatura para una cepa de *P. crustosum*, donde la máxima actividad enzimática fue de 5.56 U/mL. Sin embargo, la producción de celulasas aumentó en medios de cultivo con cosustrato, siendo el cultivo con cáscara de limón como cosustrato el que presentó la mayor actividad hidrolítica, con 56.34 U/mL, 2.4 veces más que en presencia de salvado de trigo (23.83 U/mL). Esta diferencia atribuirse a la estructura y composición química de la cáscara de limón, que cuenta con una alta concentración de celulosa, y no contiene cascarilla rica en lignano como el salvado de trigo, lo que facilita el proceso de hidrólisis (Valle-Pérez et al., 2021). Además, se ha observado que el tamaño de partícula del salvado de trigo es un factor importante en la producción de celulasas, ya que partículas de menor tamaño proporcionan una mayor área superficial para el proceso hidrolítico y el crecimiento del microorganismo (Santos et al., 2021), lo que podría explicar los resultados obtenidos durante la producción enzimática.

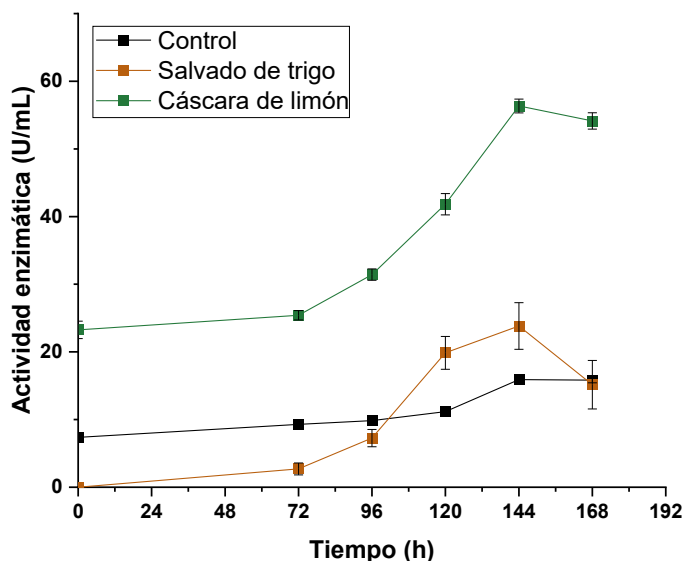


Fig. 12 Evaluación del efecto del uso de agro residuos como cosustrato en la producción de enzimas celulasas con respecto al tiempo de fermentación.

El mejor tiempo de producción de celulasas (144 horas) coincide en los tres medios de cultivo evaluados (con y sin cosustrato), lo que sugiere que la cepa utilizada está predispuesta a degradar compuestos pécticos en corto tiempo de fermentación, biosintetizando enzimas pectinolíticas a las 96 horas del proceso (Núñez-Serrano et al., 2024). Posteriormente, hacia macromoléculas lignocelulósicas como el xilano, coincidiendo con el tiempo de fermentación en el que se obtuvo la mayor producción de xilanasas (144 horas). Esto indica una sinergia entre los dos tipos de enzimas durante la degradación de la materia lignocelulósica, lo que sugiere una potencial aplicación industrial, por ejemplo, en la producción de biocombustibles, con una alta actividad hidrolítica para ambas enzimas y el uso de “cócteles enzimáticos” que aumentan la eficiencia en procesos industriales (Prajapati et al., 2018).

La actividad específica determinada durante el proceso de fermentación para los diferentes medios de cultivos (Fig. 13), muestra que la mayor producción de enzimas celulasas se presenta a las 144 horas, coincidiendo con la máxima actividad alcanzada en los tres medios de cultivo evaluados. Esto indica que la producción de compuestos proteicos, además de ser enzimas xilanasas, también corresponden a las celulasas sintetizadas a este tiempo de fermentación. Además, se observa que el valor de actividad específica es bajo a las 96 horas de fermentación, tiempo en el cual, la mayor generación de compuestos proteicos es pectinasas.

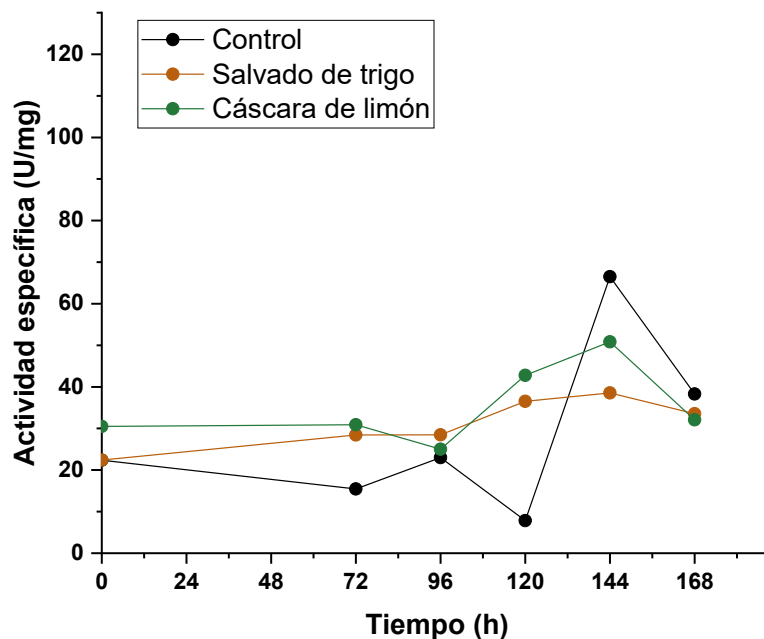


Fig. 13 Determinación de la actividad específica, actividad xilanolítica por mg de proteína producida por *P. crustosum* en fermentación sumergida variando los cosustratos.

10.6 Análisis estadístico en la producción de enzimas celulasas

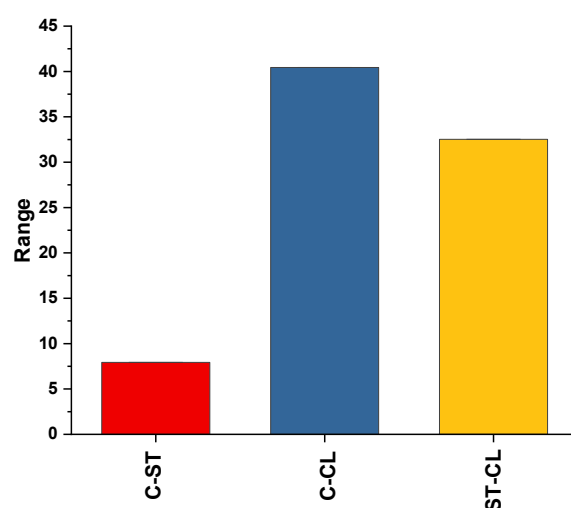
El análisis estadístico de varianza (ANOVA) reveló una diferencia significativa entre los cosustratos utilizados y el medio control (sin cosustrato) en términos de la actividad enzimática máxima alcanzada a las 144 horas de fermentación (Tabla 12). Esta diferencia fue observada con un nivel de significancia de α de 0.05, indicando un efecto considerable en el aumento de la producción de celulasas mediante el uso de cosustratos agroindustriales. Además, el modelo demostró un buen ajuste con una R^2 de 0.988.

La prueba estadística Tukey también mostró diferencias significativas, con un nivel de significancia de α de 0.05, al comparar las medias de la actividad enzimática máxima entre cada uno de los cosustratos y el medio control (sin cosustrato). Esto resalta la importancia de utilizar cosustrato con el fin de incrementar la producción de enzimas celulasas. Además, a partir del resultado observado, se seleccionó a la

cáscara de limón como cosustrato para la producción de celulasas en este proyecto (Fig. 14).

Tabla 12. Análisis estadístico de varianza (ANOVA) de una vía de la actividad xilanolítica variando los cosustratos mediante fermentación sumergida

	DF	Suma de cuadrados	Diferencia de cuadrados	F	Prob > F
Modelo	2	2756.027	1378.01	265.8	1.39E-06
Error	6	31.105	5.184		
Total	8	2787.133			



CL, cáscara de limón; C, control; ST, salvado de trigo

Fig. 14 Análisis Tukey, comparación entre las medias de la actividad enzimática de celulasas producida comparando los cosustratos, indica que existe diferencia significativa a α de 0.05.

10.7 Optimización de la producción de enzimas pectinasas mediante un diseño central compuesto 2^3

Con el objetivo de optimizar las condiciones del medio de cultivo para la producción de enzimas pectinolíticas mediante la fermentación de *P. crustosum* utilizando cáscara de limón como cosustrato, se evaluó el efecto de la temperatura ($^{\circ}$ C) (X_1), el pH (X_2) y la concentración del cofactor (MnSO_4 , g/L) (X_3). La respuesta evaluada fue la actividad enzimática medida en U/mL, utilizando un diseño central compuesto centrado a las caras 2^3 , que constó de una corrida de 20 experimentos con 6 puntos centrales (Tabla 13). La máxima actividad se registró en la corrida 20, la cual

correspondió a una temperatura de 35°C, un pH 5.0 y 2.5 g/L MnSO₄. Esto sugiere que estas condiciones pueden ser óptimas para maximizar la producción de enzimas pectinolíticas en este sistema de fermentación.

Tabla 13. DCCCC para las tres variables independientes, la actividad enzimática se observa como respuesta para la producción óptima de pectinasas

Run	Variables independientes			Respuesta
	(X ₁) °C	(X ₂) pH	(X ₃) MnSO ₄ (g/L)	
1	40	4	1.5	301.938
2	30	4	1.5	787.629
3	35	5	2.5	1469.24
4	35	5	2.5	1370.35
5	40	6	3.5	821.207
6	30	6	3.5	863.51
7	35	4	2.5	543.065
8	35	6	2.5	987.51
9	30	5	2.5	767.535
10	40	5	2.5	1208.28
11	40	6	1.5	740.567
12	30	4	3.5	419.064
13	30	6	1.5	1181.58
14	35	5	2.5	1374.05
15	35	5	2.5	873.557
16	35	5	1.5	1046.73
17	40	4	3.5	792.917
18	35	5	2.5	1530.57
19	35	5	3.5	1012.36
20	35	5	2.5	1472.41

De acuerdo con el coeficiente de regresión lineal (R^2 0.928) obtenido posterior al análisis estadístico de varianza (ANOVA), se observó que existe un buen ajuste al modelo cuadrático empleado en el diseño de experimentos, además se indica que el modelo es significativo ($p < 0.05$) (ANEXO 1). Sin embargo, no existe interacción significativa entre los valores independientes evaluados en la producción enzimática. Así mismo, se presenta la ecuación final para el modelo cuadrático (Ec. 5), la actividad enzimática está representada por Y.

Ec. 5

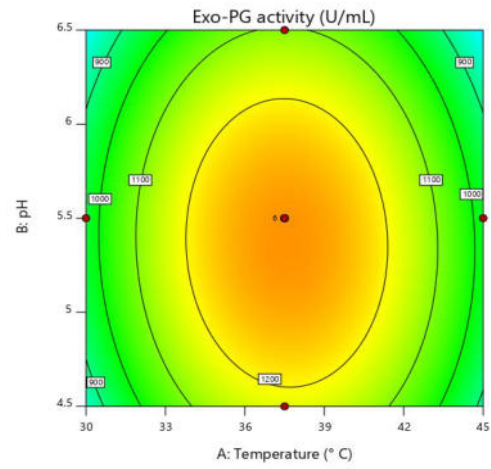
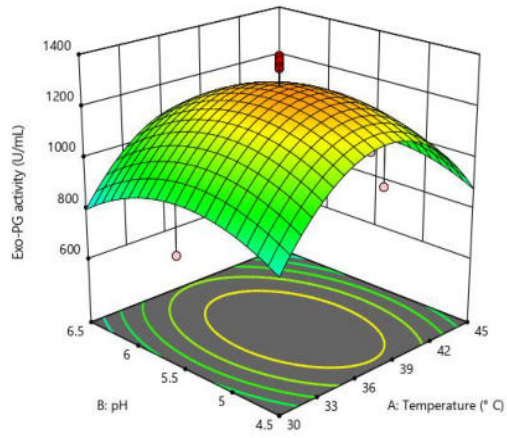
$$Y = 1253.45 - 15.44 X_1 + 174.98 X_2 - 14.94 X_3 - 44.98 X_1 X_2 + 157.28 X_1 X_3 - 44.98 X_2 X_3 - 123.17 X_1^2 - 345.79 X_2^2 - 81.53 X_3^2$$

Se analizaron las interacciones entre los factores de temperatura, pH y concentración de MnSO_4 con respecto a la actividad pectinolítica mediante gráficas de superficie de respuesta (Fig.15 A-C).

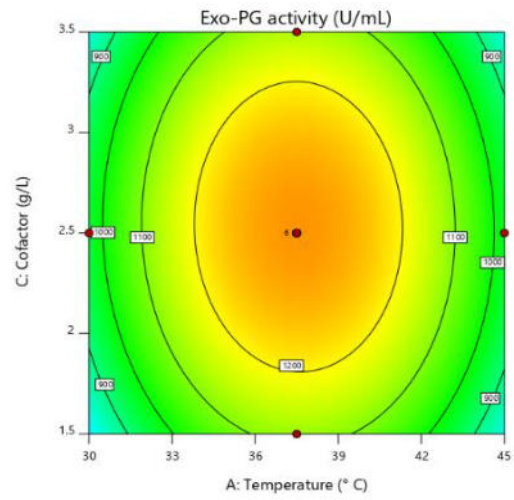
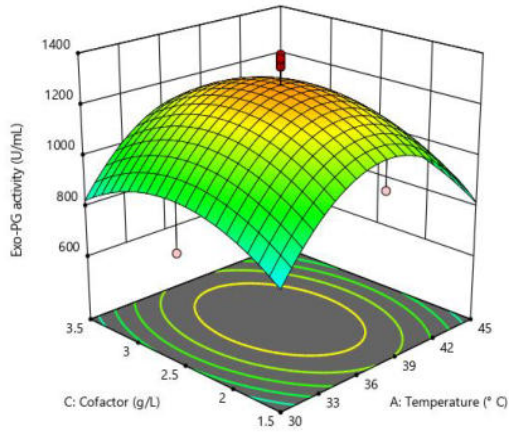
La interacción entre la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y el pH (Fig.15 A) revela que al aumento de la temperatura conduce a un incremento en la actividad enzimática aumenta, pero niveles extremadamente altos (superiores a 38°C) puede ocasionar una disminución debido a la desnaturalización proteica. Asimismo, disminuir el pH por debajo de 4.5 también afecta negativamente la actividad enzimática. El punto máximo de producción se observó a 35°C , coincidiendo con la optimización de producción previamente realizada a partir de un DCCCC 2², variando como factores la temperatura y el pH, utilizando cáscara de limón como cofactor en la fermentación de *P. crustosum* (Núñez-Serrano A.S et al., 2021). El punto óptimo de pH fue de 5.05 esto debido a que este tipo de enzimas pertenecen a las exopoligalacturonasas ácidas (El Enshasy et al., 2018b). No se observaron interacciones significativas entre la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y la concentración del cofactor (Fig. 15 B), ni entre la concentración del cofactor y el pH (Fig. 15 C). Sin embargo, se destacó el efecto de la concentración de MnSO_4 (g/L) en la producción pectinolítica, la cual aumentó con su incremento hasta cierto punto, pero disminuyó concentraciones mayores a 3.0 g/L. Investigaciones previas han demostrado que sal metálica puede incrementar significativamente la actividad enzimática relativa (4.8%) en la producción por *P. notatum*, mencionando que este tipo de enzima pertenece a las metaloenzimas permitiendo una activación catalítica en presencia de este compuesto (Amin, 2016).

Las condiciones óptimas predichas por el modelo fueron 33.5°C , pH 5.05 y 2.5 g/L de MnSO_4 , con una actividad predicha de 1,269.70 U/mL y una deseabilidad de 1.0. Comparando con el resultado experimental (1427.99 ± 27.41 U/mL), se registró un porcentaje de similitud de 112%, destacando que experimentalmente a las condiciones óptimas se obtuvo una actividad enzimática mayor, reflejando una eficiente producción de enzimas pectinasas a partir de *P. crustosum*.

(A)



(B)



(C)

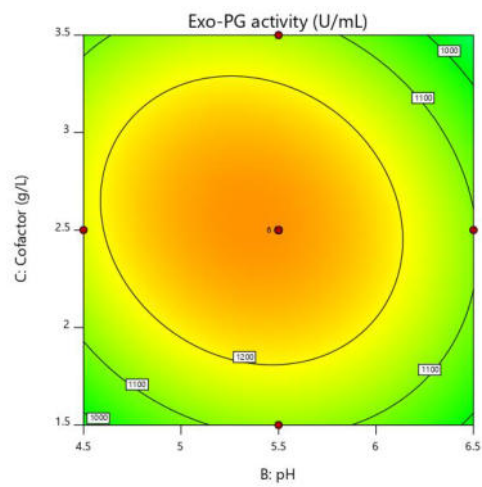
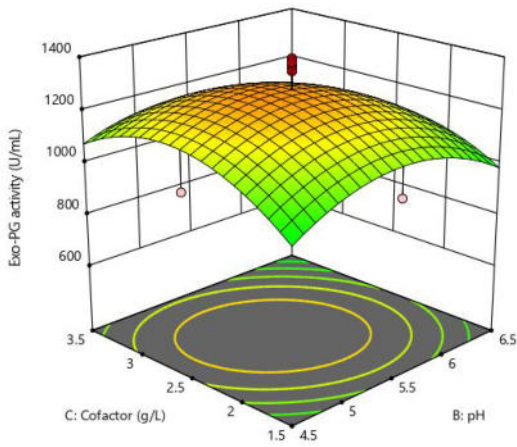


Fig. 15 Gráfica de la superficie de respuesta y de contorno que muestra el efecto interactivo del A) pH y temperatura, B) temperatura y cofactor, C) pH y cofactor en la producción de pectinasas por *P. crustosum*.

10.8 Optimización de la producción de enzimas xilanasas mediante un diseño central compuesto centrado a las caras 2⁴ utilizando salvado de trigo como cosustrato

La optimización de la producción de enzimas xilanasas se llevó a cabo a las 144 horas de fermentación, momento en el que se alcanzó la máxima actividad enzimática, utilizando salvado de trigo (2% p/s) como cosustrato. Se utilizó un diseño central compuesto centrado a las caras 2⁴, con las siguientes variables independientes: temperatura (° C) (X_1), pH (X_2), la concentración del cofactor (MnSO₄, g/L) (X_3) y la concentración del medio PDB (% p/v) (X_4), mientras que la respuesta (Y) fue la actividad xilanolítica (U/mL) (Tabla 14).

Tabla 14. DCCCC con cuatro variables independientes para la producción óptima de enzimas xilanasas

Run	Variables independientes				Respuesta
	(X_1)	(X_2)	(X_3)	(X_4)	
	°C	pH	MnSO ₄ , (g/L)	PDB (% p/v)	
4	30	4.5	3.5	1	64.8445
19	30	4.5	3.5	0.25	51.9961
26	30	4.5	1.5	1	84.8868
28	30	4.5	1.5	0.25	58.8218
29	30	5.5	2.5	0.625	60.1602
2	30	6.5	3.5	1	51.9961
8	30	6.5	3.5	0.25	81.9423
10	30	6.5	1.5	0.25	64.2423
24	30	6.5	1.5	1	64.2423
5	37.5	4.5	2.5	0.625	55.6097
3	37.5	5.5	2.5	0.625	55.6097
6	37.5	5.5	1.5	0.625	36.4039
7	37.5	5.5	2.5	1	55.6097
9	37.5	5.5	2.5	0.625	55.6097
11	37.5	5.5	2.5	0.625	51.9961
12	37.5	5.5	3.5	0.625	38.7461
13	37.5	5.5	2.5	0.625	151.996
21	37.5	5.5	2.5	0.25	98.7055
22	37.5	5.5	2.5	0.625	260.181
23	37.5	5.5	2.5	0.625	224.687
14	37.5	6.5	2.5	0.625	389.203
15	45	4.5	1.5	1	279.567
25	45	4.5	3.5	0.25	327.613

27	45	4.5	1.5	0.25	262.703
30	45	4.5	3.5	1	285.79
1	45	5.5	2.5	0.625	262.59
16	45	6.5	1.5	1	293.486
17	45	6.5	3.5	1	282.846
18	45	6.5	3.5	0.25	282.746
20	45	6.5	1.5	0.25	314.466

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) indicaron que el modelo fue significativo ($p < 0.0001$) con un buen ajuste, como lo demuestra el valor de R^2 0.978. Además, se observó que no hubo interacción significativa entre los factores evaluados, a excepción del término cuadrático de la temperatura (X_1^2) (ANEXO 2). A continuación, se presenta la ecuación final codificada del modelo cuadrático (Ec. 6).

Ec. 6

$$Y = 298.99 - 8.84 X_1 - 1.83 X_2 - 0.4018 X_3 - 6.17 X_4 - 2.91 X_1 X_2 + 1.73 X_1 X_3 + 1.48 X_1 X_4 + 0.9076 X_2 X_3 - 6.83 X_2 X_4 - 0.4810 X_3 X_4 - 147.83 X_1^2 - 35.75 X_2^2 - 46.06 X_3^2 - 7.53 X_4^2$$

Las gráficas de superficie de respuesta ilustran la interacción de los factores seleccionados sobre la actividad xilanolítica generada (Fig. 16A-F). De acuerdo con el análisis ANOVA, no se observó interacción significativa entre la temperatura y el pH en la producción enzimática (Fig. 16A). Sin embargo, los puntos óptimos (37.5 °C y pH 5.5) son similares a los reportados en la optimización de la producción de xilanasas por *A. brasilensis* ATCC 1604 utilizando salvado de trigo como fuente de carbono a las 144 h de fermentación (Jee Hsiung, 2015). Esto sugiere que *P. crustosum* es un potencial productor de hidrolasas ácidas, altamente demandadas en la industria debido a su amplio espectro de aplicaciones en bioprocesos (Troiano et al., 2020). Además, el rango de temperatura óptima coincide con el ideal para la producción de pectinasas, destacando una eficiente producción de ambas enzimas recordando el concepto de biorrefinería, siendo uno de los objetivos en este proyecto.

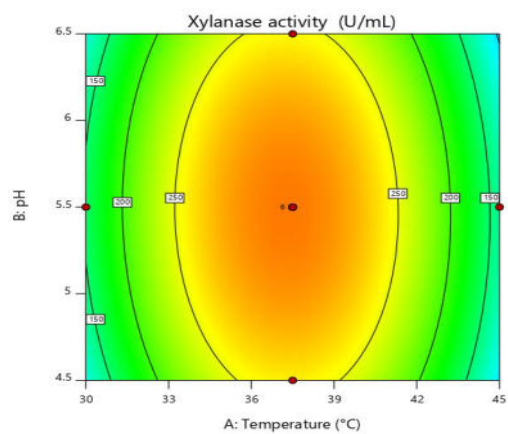
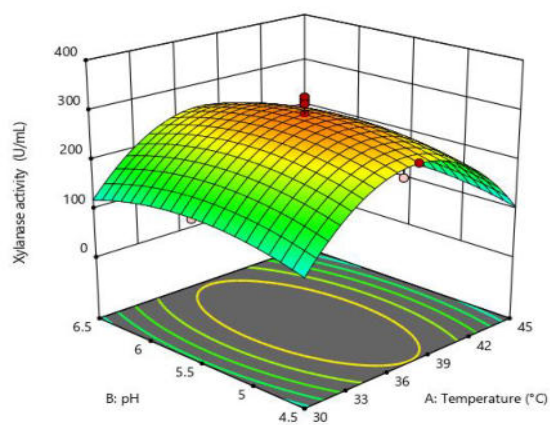
Se observó el efecto de interacción entre el cofactor y la temperatura (Fig. 16B), así como entre el pH y el cofactor (Fig. 16C). Aunque no se detectó ningún efecto entre

el cofactor y los parámetros previamente analizados (temperatura y pH), se encontró una relación entre la concentración de MnSO_4 (g/L) y la actividad xilanolítica. Se observó un aumento en la actividad hidrolítica al incrementar la concentración del cofactor, siendo 2.5 g/L la concentración óptima. Se ha evidenciado que una alta concentración de sales metálicas puede inhibir la actividad enzimática, posiblemente debido a una reacción entre los grupos amino presentes en el sitio activo de la enzima o a una reacción oxidante con los iones metálicos, lo que inhibiría la actividad hidrolítica. Por ejemplo, el uso de MnSO_4 (2 mol/L) aumentó la actividad relativa en un 41% en comparación con control (100%) en la actividad de enzimas xilanasas producidas por *P. roqueforti* ATCC 10110 (de Almeida Antunes Ferraz et al., 2020).

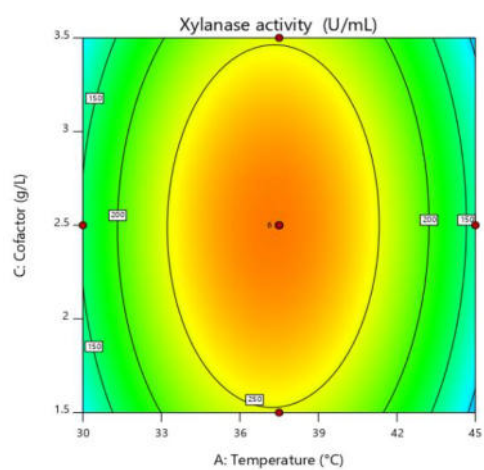
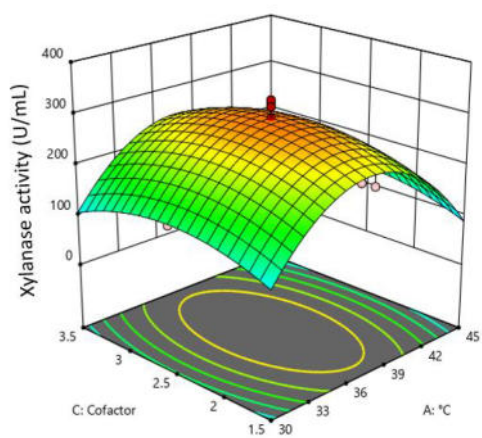
No se observó interacción entre la concentración de PDB y la temperatura (Fig. 16D), PDB (% p/v) y pH (Fig. 16E), ni PDB (% p/v) y el cofactor (Fig. 16F) con respecto a la actividad enzimática. Sin embargo, se registró un aumento en la actividad xilanolítica al disminuir la concentración de PDB, lo que sugiere una represión catabólica debido a la concentración de glucosa presente en el medio y su efecto sobre la producción de enzimas xilanasas (Terrasan et al., 2010). Este resultado refleja una disminución en los costos de producción de enzimas xilanasas a nivel industrial, ya que un bioproceso óptimo requiere menos insumos, como en este caso la concentración de glucosa a partir de la fermentación de *P. crustosum*.

Los valores óptimos estimados por el modelo aplicado (37.5 °C, pH 5.5, 2.5 g/L, 0.625 % p/v PDB, a una deseabilidad de 1.0) fueron replicados experimentalmente, obteniendo una actividad enzimática de 271.77 ± 8.50 U/mL, con un porcentaje de similitud de 92.75% en comparando con la actividad predicha.

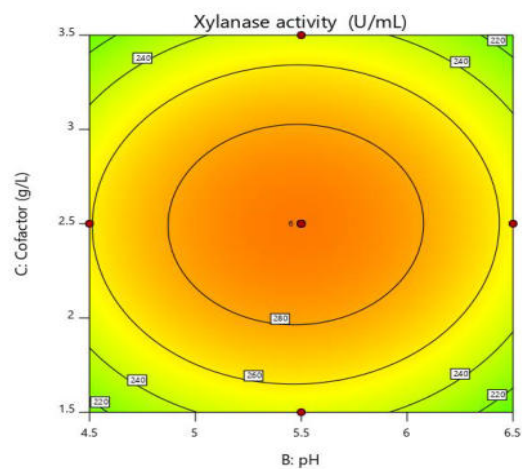
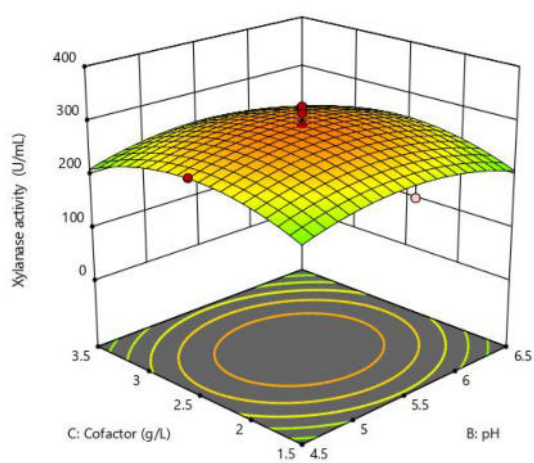
(A)



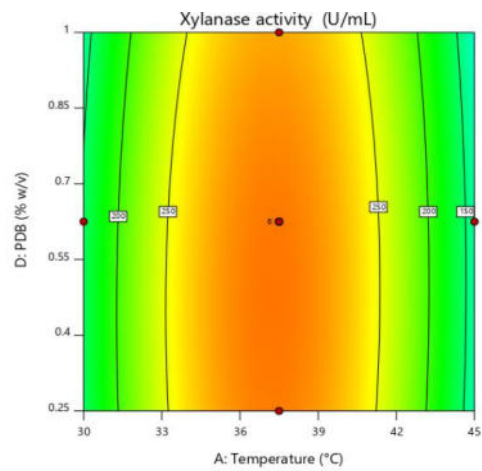
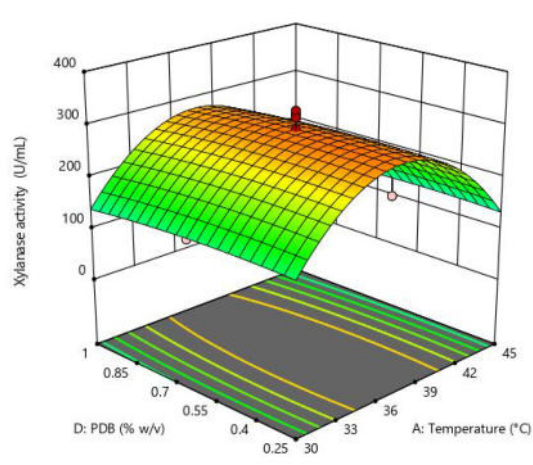
(B)



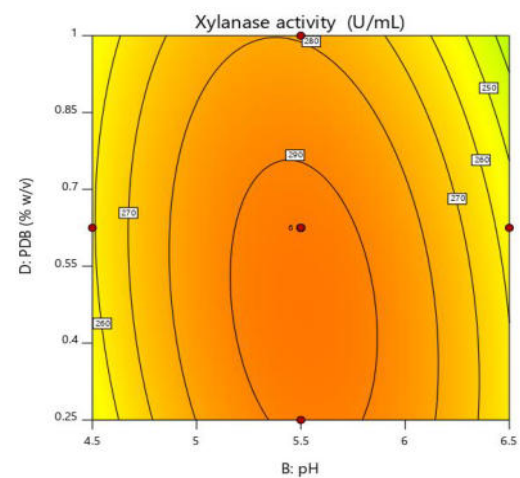
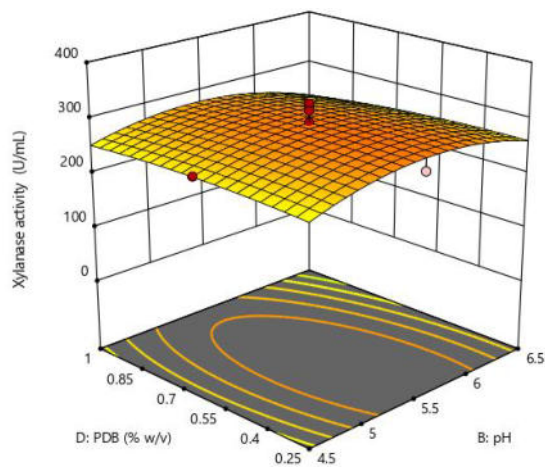
(C)



(D)



(E)



(F)

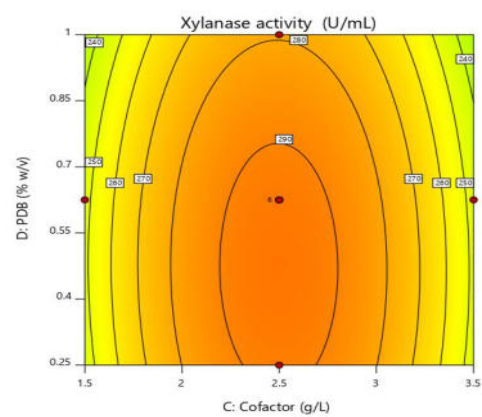
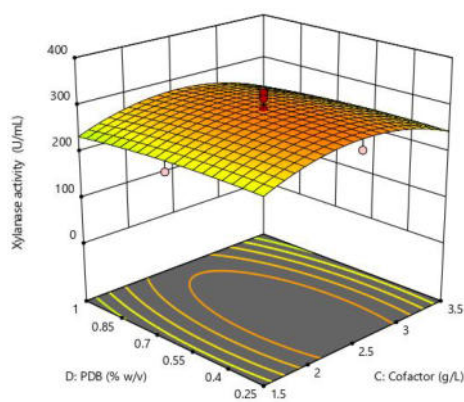


Fig. 16 Superficies de respuesta y de contorno del efecto interactivo entre A) pH y temperatura, B) temperatura y cofactor, C) pH y cofactor, D) temperatura y concentración

de PDB, E) pH y concentración de PDB y F) cofactor y PDB en la producción de xilanasas por *P. crustosum*.

10.9 Optimización de la producción de enzimas celulasas mediante un diseño central compuesto 2³ utilizando cáscara de limón como cosustrato

Después de la evaluación del efecto del cofactor y la selección de la cáscara de limón (2% p/s) como el agro residuo utilizado como fuente suplementaria de carbono en la producción de enzimas celulasas, se procedió a la optimización de producción de celulasas. Para ellos, se llevó a cabo un diseño central compuesto centrado a las caras 2³, con las variables temperatura (°C) (X_1), pH (X_2) y la concentración del cofactor (MnSO₄, g/L) (X_3), mientras que respuesta fue la actividad enzimática (U/mL). Se realizaron un total de 20 corridas, incluyendo 6 puntos centrales. Se observó que la máxima actividad enzimática (65.73 U/mL) se logró en la corrida 10, con condiciones de 45°C, pH 5.5, y 2.5 g/L de MnSO₄, mientras que la menor actividad enzimática (21.05 U/mL), se registró en la corrida 20, a 30°C, pH 6.5 y 1.5 g/L de MnSO₄ (Tabla 15).

Se empleó un modelo cuadrático para la evaluar los factores, lo que resultó en un coeficiente de regresión (R^2) de 0.9612, indicando un buen ajuste al modelo matemático. Además, el modelo fue significativo ($p < 0.0001$) según los resultados del ANOVA. En este diseño experimental, la temperatura fue un factor significativo ($p < 0.0001$), así como el cuadrado de este mismo factor (X_1^2) (ANEXO 3). A continuación, se presenta la ecuación final codificada obtenida a partir del diseño experimental evaluado, donde Y representa la actividad enzimática (U/mL) (Ec. 7).

Ec. 7

$$Y = 31.09 + 16.75 X_1 - 1.94 X_2 + 0.8751 X_3 - 1.55 X_1 X_2 - 0.2584 X_1 X_3 + 0.6215 X_2 X_3 + 16.24 X_1^2 - 0.4695 X_2^2 - 7.52$$

Tabla 15. DCCCC 2³, evaluando los valores independientes para la producción óptima de enzimas celulasas

Run	Variables independientes			Respuesta
	(X_1)	(X_2)	(X_3)	
	°C	pH	MnSO ₄ , (g/L)	U/mL
1	37.5	5.5	2.5	32.8358

2	37.5	5.5	2.5	37.2339
3	37.5	5.5	2.5	35.1567
4	37.5	5.5	1.5	22.8191
5	37.5	5.5	3.5	21.3605
6	45	6.5	1.5	50.2345
7	45	4.5	1.5	59.09
8	37.5	5.5	2.5	25.9797
9	37.5	5.5	2.5	27.5643
10	45	5.5	2.5	65.73
11	45	4.5	3.5	59.7116
12	45	6.5	3.5	53.684
13	37.5	4.5	2.5	30.1399
14	37.5	5.5	2.5	33.6813
15	30	5.5	2.5	25.9797
16	30	4.5	3.5	25.367
17	37.5	6.5	2.5	28.141
18	30	4.5	1.5	23.37
19	30	6.5	3.5	25.199
20	30	6.5	1.5	21.058

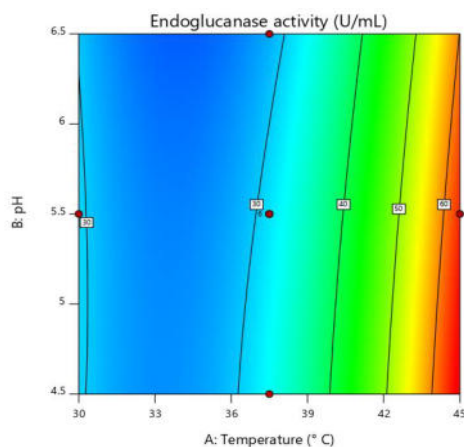
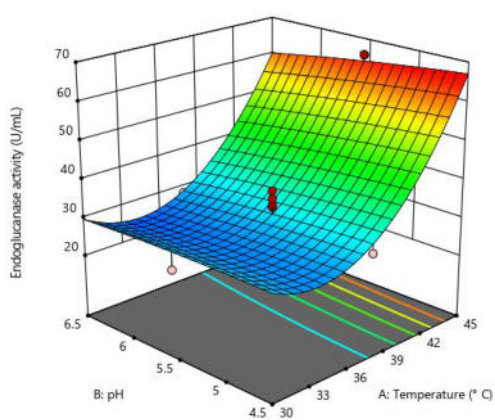
Se generaron las gráficas de superficie de respuesta para representar las interacciones entre los factores seleccionados con respecto a la producción de enzimas celulasas (Fig. 17A-C). Se observó que la temperatura fue un factor significativo que influyó en la actividad enzimática, la cual aumentó conforme se incrementó la temperatura (Fig. 17A). La producción máxima de enzimas celulasas se registró a altas temperaturas, coincidiendo con lo reportado en la evaluación de *Penicillium sp.* FSDE15, donde se encontró que el rango de temperatura óptima para la producción del conjunto de celulasas fue de 33 a 41°C (de Castro Coêlho et al., 2021b).

Por otro lado, el valor de pH no mostró una interacción significativa en la producción enzimática; sin embargo, se observó que en la actividad enzimática fue más alta en el rango de acidificación del medio de cultivo (4.5 a 5.5). No se observaron interacciones entre la temperatura y el cofactor (Fig. 17B), lo que sugiere la tendencia de aumento en la actividad enzimática prevaleció incluso en presencia del cofactor. De manera similar, no se detectó interacción entre el pH y el cofactor (Fig. 17C), además, se dedujo que existe actividad catalítica en un rango de

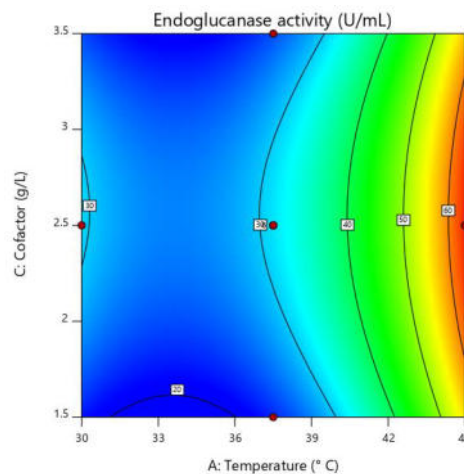
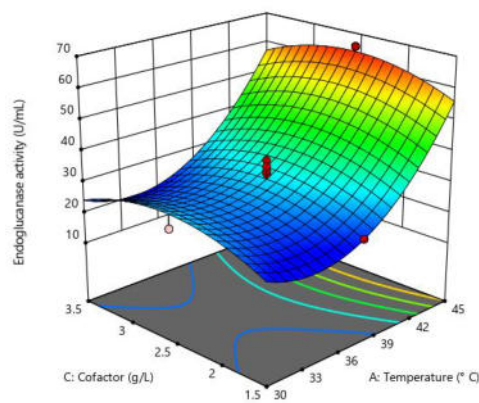
concentración de MnSO_4 1.5 a 3.5 g/L. El uso de esta sal metálica como factor fue evaluado en la optimización de la producción de celulasas por *A. penicillioides* 12ASZ, observándose un incremento en la producción enzimática (Sorour et al., 2020).

Los valores óptimos predichos por el modelo matemático (45°C, pH 5.5 y 2.5 g/L MnSO_4) estimaron una actividad enzimática de 64.08 U/mL (deseabilidad 1.0). Al replicar estas condiciones, se alcanzó una actividad de 62.68 ± 9.65 U/mL, con una similitud de 97.81%. Además, se observó un aumento en la actividad enzimática bajo las condiciones óptimas de fermentación, en comparación con la cinética enzimática evaluada anteriormente.

(A)



(B)



(C)

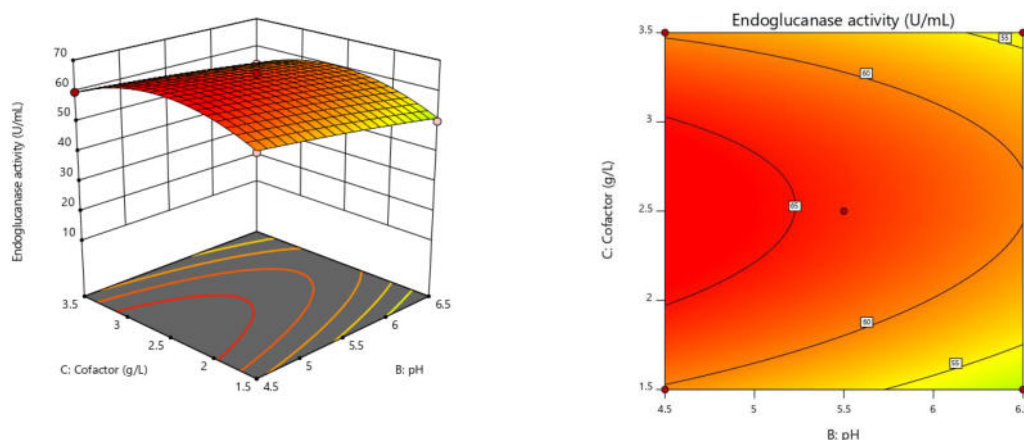


Fig. 17 Gráficas de la superficie de respuesta del efecto interactivo entre A) pH y temperatura, B) temperatura y cofactor, C) pH y cofactor en la producción de celulasas por *P. crustosum*.

10.10 Optimización de la producción del cóctel hidrolítico

Para optimizar la descomposición de sustratos complejos, es crucial producir un cóctel de enzimas hidrolíticas. Esto permitiría obtener adaptabilidad y eficiencia en comparación con la producción individual de enzimas. El cóctel hidrolítico tiene aplicaciones significativas en diversas industrias, como en la producción de biocombustibles a partir del aprovechamiento de residuos agroindustriales (Papadaki et al., 2020b).

Se analizó la demanda en el mercado de enzimas para determinar las condiciones de producción. Entre las enzimas hidrolíticas más demandadas, las celulasas sobresalen, representando aproximadamente el 25% del total del mercado (Srivastava et al., 2021). Por lo tanto, en este proyecto se identificaron las condiciones ideales para la producción, las cuales incluyen una temperatura de 45°C, un pH 5.5 y una concentración de 2.5 g/L MnSO_4 , utilizando cáscara de limón como cosustrato, con una duración de fermentación de 144 horas. Con base en estos parámetros, se utilizó un diseño central compuesto centrado a las caras 2^3 , con dos niveles (+ y -). El diseño experimental (Tabla 16), muestra la actividad de pectinasas (U/mL) (Respuesta 1), celulasas (U/mL) (Respuesta 2) y xilanasas (U/mL) (Respuesta 3).

Tabla 16. DCCCC 2³ y resultados experimentales de la producción de cóctel hidrolítico presentados como actividad enzimática (U/mL)

Run	Variables independientes			Respuesta 1	Respuesta 2	Respuesta 3
	Temperatura (° C)	pH	Cofactor (g/L)			
	(X ₁)	(X ₂)	(X ₃)	Pectinasas (U/mL)	Celulasas (U/mL)	Xilanasas (U/mL)
18	30	4.5	1.5	698.58	23.37	37.08
7	45	4.5	1.5	697.99	59.09	65.24
20	30	6.5	1.5	698.45	21.05	38.18
6	45	6.5	1.5	689.59	50.23	51.12
16	30	4.5	3.5	798.25	25.36	35.04
11	45	4.5	3.5	808.16	59.71	52.12
19	30	6.5	3.5	683.68	25.19	38.48
12	45	6.5	3.5	602.15	53.68	60.45
15	30	5.5	2.5	765.24	25.97	39.87
10	45	5.5	2.5	901.14	65.73	70.09
13	37.5	4.5	2.5	1024.16	30.13	42.19
17	37.5	6.5	2.5	994.15	28.14	40.05
4	37.5	5.5	1.5	1002.14	22.81	45.05
5	37.5	5.5	3.5	989.68	21.36	39.98
8	37.5	5.5	2.5	1349.99	25.97	49.78
9	37.5	5.5	2.5	1394.25	27.56	49.98
2	37.5	5.5	2.5	1368.41	37.23	49.87
1	37.5	5.5	2.5	1358.21	32.83	49.48
14	37.5	5.5	2.5	1347.87	33.68	45.15
3	37.5	5.5	2.5	1379.13	35.15	49.58

Se observó que *P. crustosum* demostró una eficiente producción hidrolítica al emplear cáscara de limón como cosustrato a las 144 horas de fermentación bajo las condiciones experimentales del diseño.

La actividad de las pectinasas se mantuvo elevada bajo las mismas condiciones ideales para la producción de celulasas (45°C, pH 5.5, 2.5 g/L de MnSO₄). Sin embargo, la actividad de xilanasas disminuyó debido a la inclusión de la cáscara de limón como cosustrato. La actividad máxima xilanólítica se registró en la corrida 10,

coincidiendo con la temperatura sugerida (45°C) para la producción simultanea del cóctel hidrolítico.

Los datos experimentales fueron analizados utilizando un modelo matemático cuadrático (Ec. 1), y los efectos de interacción de las variables fueron elevados mediante la metodología de superficie de respuesta. Los valores de respuesta experimentales (Respuesta 1) fueron evaluados utilizando un ANOVA (ANEXO 4). Los datos experimentales se sometieron a un modelo polinómico cuadrático. Es importante destacar que el modelo para la producción de pectinasas demostró significancia ($p < 0.05$), evidenciada por un bajo valor de p de 0.0010. Además, el valor del coeficiente de regresión (R^2 0.889) sugiere que el modelo se ajusta a los resultados experimentales. El valor de falta de ajuste fue insignificante (0.000017), lo que indica que el modelo ajusto es adecuado.

En el análisis estadístico de la actividad de las celulasas, el valor de p fue < 0.0001 , lo que indica la significancia del modelo y demuestra un modelo matemático con buen ajuste (R^2 0.9612). La temperatura es un factor significativo en la producción enzimática según el valor de p (< 0.0001). La falta de ajuste fue insignificante lo que significa que el modelo se ajusta bien a los datos.

El análisis de ANOVA para los resultados de producción de xilanasas indica que el modelo es significativo (valor de p de 0.0002) con un ajuste robusto, como lo demuestra el valor de R^2 0.920.

La ecuación final para la producción de pectinasas, celulasas y xilanasas, considerando la actividad enzimática como respuesta, se presenta en la Ec. 8.

Ec. 8

$$\text{Actividad de pectinasas } \left(\frac{U}{mL} \right) = 1278.46 + 5.48 X_1 - 35.91 X_2 + 9.52 X_3 - 12.46 X_1 X_2 - 7.77 X_1 X_3 - 39.01 X_2 X_3 - 313.49 X_1^2 - 137.53 X_2^2 - 150.77 X_3^2$$

$$\text{Actividad de celulasas } \left(\frac{U}{mL} \right) = 31.09 + 16.75 X_1 - 1.94 X_2 + 0.8751 X_3 - 1.55 X_1 X_2 - 0.2584 X_1 X_3 + 0.6215 X_2 X_3 + 16.24 X_1^2 - 0.4695 X_2^2 - 7.52 X_3^2$$

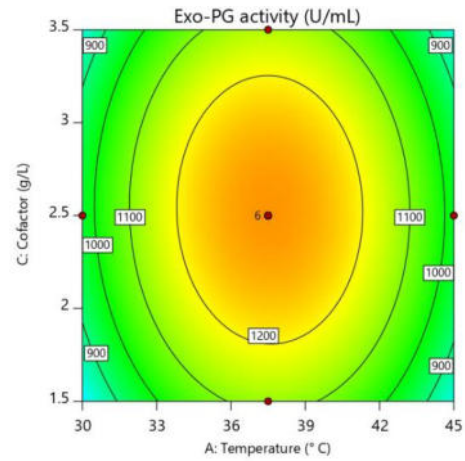
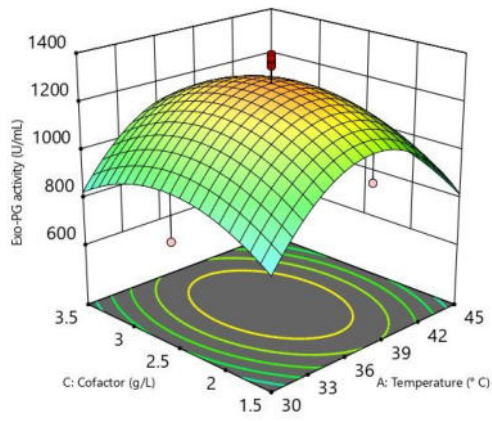
$$\text{Actividad de xilanasas } \left(\frac{U}{mL} \right) = 48.03 + 11.48 X_1 - 0.339 X_2 - 1.06 X_3 - 1.29 X_1 X_2 - 0.256 X_1 X_3 + 3.10 X_2 X_3 + 8.39 X_1^2 - 5.47 X_2^2 - 4.08 X_3^2$$

La temperatura se destaca como el factor de mayor relevancia en los tres tipos de enzima, ejerciendo una influencia considerable en la actividad enzimática y en el proceso de producción. A pesar de que la concentración del cofactor también impacta la actividad enzimática en los tres procesos hidrolíticos, su efecto es relativamente menor en comparación con la temperatura, tal como indican los resultados estadísticos. La interacción entre estos factores se visualiza en los gráficos de superficie de respuesta y de contorno (Fig. 18A-C). Además, también se muestran los efectos interactivos de la temperatura, el pH y la concentración del cofactor en la producción de pectinasas (Fig.18A). El rango de las variables operativas se alinea con el análisis de la producción individual de las de las pectinasas previo.

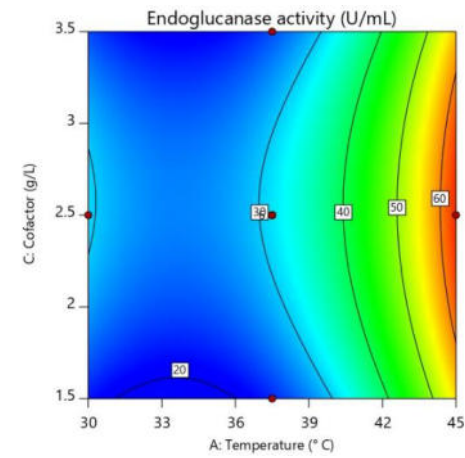
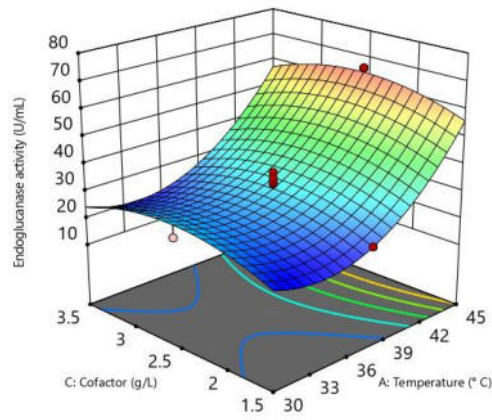
Una observación similar surge en la comparación con la producción individual de las celulasas, como se evidencia en los gráficos de contorno y de superficie de respuesta (Fig. 18B)

Los gráficos de contorno ilustran la interacción de los factores seleccionados en la producción xilanolítica (Fig. 18C). Sin embargo, es destacable que la actividad enzimática alcanzada fue menor de lo que se predijo mediante el método de superficie de respuesta en el análisis de la producción individual de las xilanasas. Este efecto se atribuye al residuo agroindustrial seleccionado en la producción simultánea del cóctel hidrolítico.

(A)



(B)



(C)

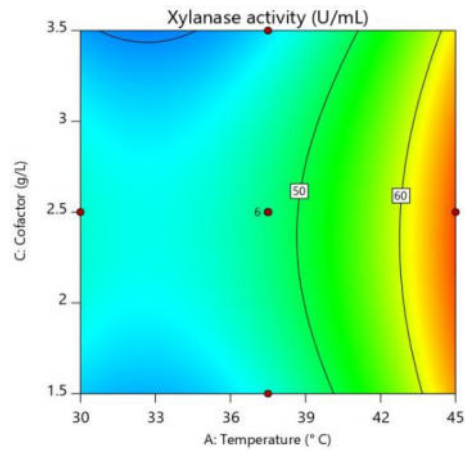
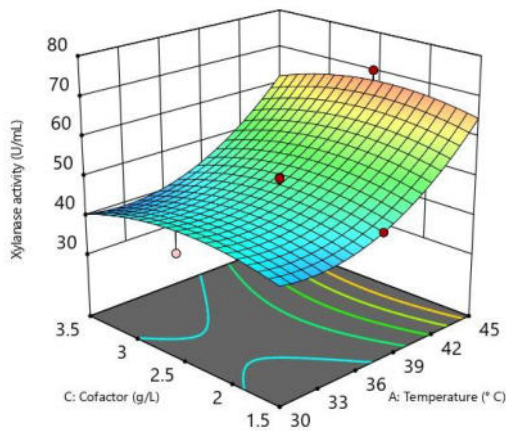


Fig. 18 Gráficas de la superficie de respuesta y graficas de contorno que ilustra la interacción entre la temperatura y concentración del cofactor en la actividad de (A) pectinasas, (B) celulasas y (C) y xilanasas durante la optimización del cóctel hidrolítico.

10.11 Semi purificación enzimática por ultrafiltración con membrana

Se llevó a cabo con una purificación parcial de las hidrolasas mediante ultrafiltración con membrana (10, 30, 50 y 100 kDa), utilizando las condiciones óptimas de la producción del cóctel hidrolítico (Fig.19). Se observó que, bajo estas condiciones, la actividad hidrolítica de las tres enzimas se encontraba en un rango de 100 a 10 kDa, registrando la mayor actividad pectinolítica (825.31 U/mL) se registró a una fracción entre 50-10 kDa, coincidiendo con el peso molecular reportado para las enzimas pectinasas (30 a 50 kDa) según el microorganismo productor (Ahmed et al., 2016).

La actividad xilanolítica (154.63 U/mL) se presentó en la fracción de 30 -10 kDa, lo cual concuerda con el peso molecular reportado para las enzimas xilanasas (23 kDa) (Lunkes et al., 2019), lo que explica el resultado observado. Además, se encontró que las celulasas prestaron mayor actividad enzimática (38.68 U/mL) en una fracción correspondiente a un rango de 100 a 50 kDa, coincidiendo con el peso molecular reportado para el conjunto de enzimas celulasas, el cual oscila entre 30 y 150 kDa, dependiendo de la isoenzima o al microorganismo productor (de Castro Coêlho et al., 2021a).

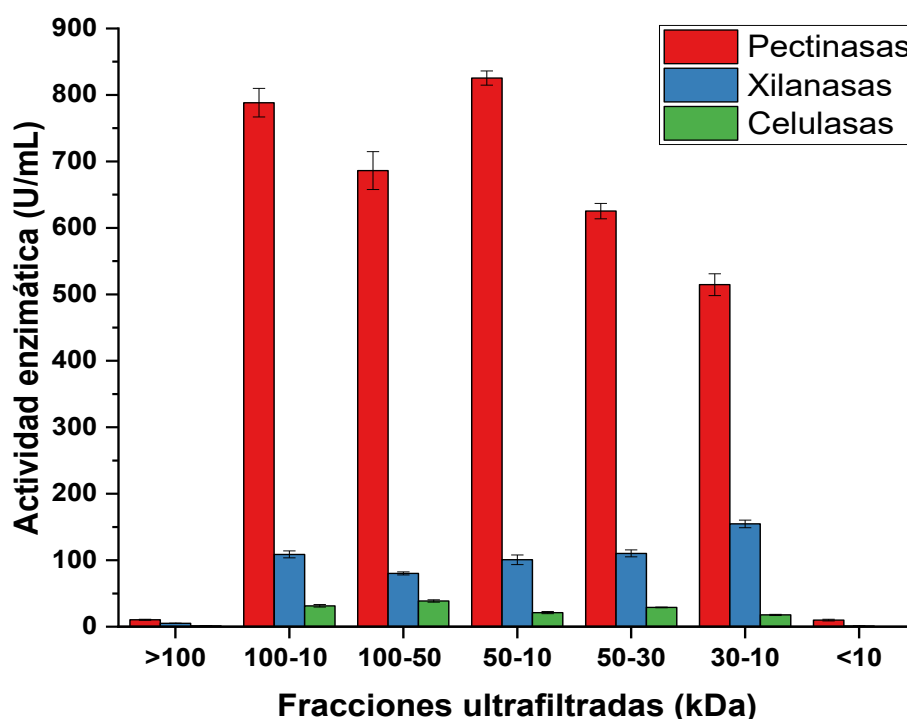


Fig. 19 Determinación de la actividad hidrolítica de pectinasas, xilanasas y celulasas (U/mL) en las fracciones obtenidas mediante ultrafiltración bajo las condiciones óptimas de producción del cóctel hidrolítico (45°C, pH 5.5, 2.5 g/L MnSO₄, cáscara de limón al 2% p/s).

A nivel industrial el proceso de purificación enzimática es uno de los más complejos y de alto costo debido a los múltiples pasos que es necesario realizar. La ultrafiltración por membrana es un proceso que fracciona y concentra por el peso molecular, permitiendo eliminar compuestos que puedan interferir, en este caso en la actividad catalítica, facilitando la separación y recuperación del extracto en donde deduciblemente se encuentre la enzima de interés, y en caso de ser necesario realizar algún método suplementario de purificación enzimática (Valle-Pérez et al., 2021).

10.12 Determinación del peso molecular por SDS-PAGE y Zimograma

El peso molecular de cada hidrolasa presente en la fracción del cóctel hidrolítico se determinó mediante técnicas de SDS-PAGE y zimograma (Fig.20AB)

La fracción parcialmente purificada del coctel hidrolítico (100-10 kDa) mostró una variedad de pesos moleculares, los cuales probablemente corresponden a isoformas de cada hidrolasa, como se presenta en la Línea 2 (Fig. 20A). En el caso de las pectinasas, existe una variación en los pesos moleculares dependiendo de la naturaleza de las enzimas o isoformas, como se observó en la evaluación de una pectinasa comercial producida por *A. niger* en la Línea 3. La mayor concentración de proteínas se encontró en 55 kDa, coincidiendo con una banda presente en la muestra del coctel hidrolítico en 60 kDa. También se observó una similitud en un peso molecular de 25 kDa. En reportes previos se ha registrado isoformas de exo-PG, como exo-PG I, con un peso molecular de 85 kDa y exo-PG II, con un peso molecular de 25 kDa (Amin, Nawaz, et al., 2017).

En reportes previos, las xilanasas extracelulares producidas por *P. crustosum* presentó un peso molecular de 23 kDa (Lunkes et al., 2019). El análisis de la xilanasas comercial de *A. niger* presenta una banda en 19 kDa (Línea 4), que coincide con la banda encontrada a 20 kDa durante el análisis de la muestra del coctel hidrolítico. De manera similar, se ha reportado que las celulasas presentan

isoformas en un rango de 150 a 20 kDa (de Castro Coêlho et al., 2021a). En la celulasa comercial de *A. niger* (Línea 5) se observó una banda a 37 kDa y 80 kDa. Por lo tanto, se deduce que las bandas encontradas en 40 y 85 kDa corresponden a isoformas de celulasas.

Se detectó actividad hidrolítica de las tres enzimas analizadas mediante el método de zimograma (Fig. 20B). Las pectinasas mostraron actividad en un rango de 20 kDa, lo que sugiere la posible expresión de isoenzimas de pectinasas, como las endo-poligalacturonasas, bajo las condiciones experimentales utilizadas (Pedrolli et al., 2009). La actividad de xilanasas se expresó en un peso molecular de 25 kDa, coincidiendo con lo reportado por una cepa de *P. crustosum* en 23 kDa (Lunkes et al., 2019). Asimismo, la actividad de celulasas se registró en un peso molecular de 45 kDa, lo cual es consistente con el amplio rango de peso molecular registrado para celulasas producidas por microorganismos fúngicos, que varía entre 42 a 75 kDa (de Castro Coêlho et al., 2021a).

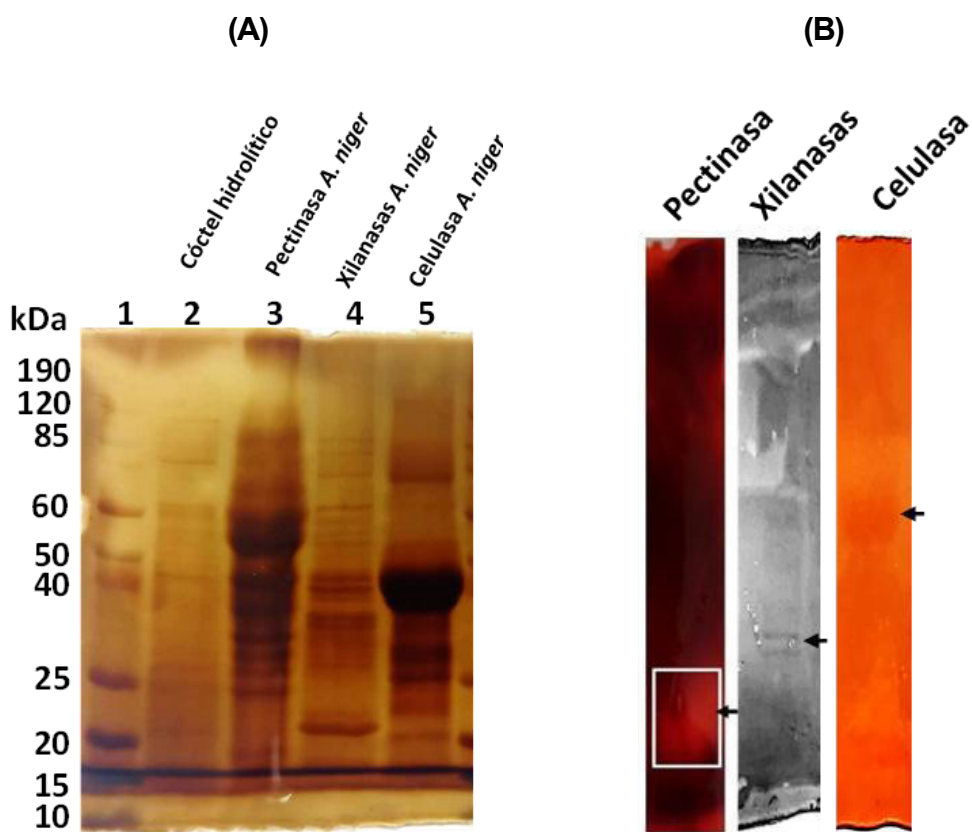


Fig. 20 (A) Electroforesis SDS-PAGE, Carril 1: marcador molecular, Carril 2: Cóctel hidrolítico parcialmente purificado (100-10 kDa), Carril 3: Pectinasa comercial de *A. niger*, Carril 4: Xilanasa comercial de *A. niger*, y Carril 5: Celulasa comercial de *A. niger*. (B) Zimograma que muestra la determinación de las actividades de las pectinasas, xilanasas y celulasas.

10.13 Reactivación de las hidrolasas liofilizados

La liofilización es una técnica utilizada para la conservación de diversos compuestos y moléculas, como las proteínas. Es ampliamente aplicada en la industria farmacéutica debido a que permite preservar la estructura molecular de los productos, lo que asegura la estabilidad y el funcionamiento a tiempos prolongados (Wang, 2000).

La muestra del cóctel hidrolítico parcialmente purificado fue liofilizada según las condiciones establecidas en la metodología. Posteriormente, se reactivó bajo las condiciones de reacción del cóctel hidrolítico (45°C, pH 5.0, durante 30 min). Se evaluó la actividad hidrolítica de las tres enzimas antes y después de la liofilización (Fig. 21), observando que, posterior a esta técnica, la actividad pectinolítica se conservó en un 90%, mientras que las actividades de xilanasas y celulasas se mantuvieron en un 72% y 71%, respectivamente. Estos resultados indican que la liofilización mantiene la actividad hidrolítica considerablemente, sin embargo, es necesario optimizar las condiciones de reactivación para mejorar aún más la actividad enzimática recuperada.

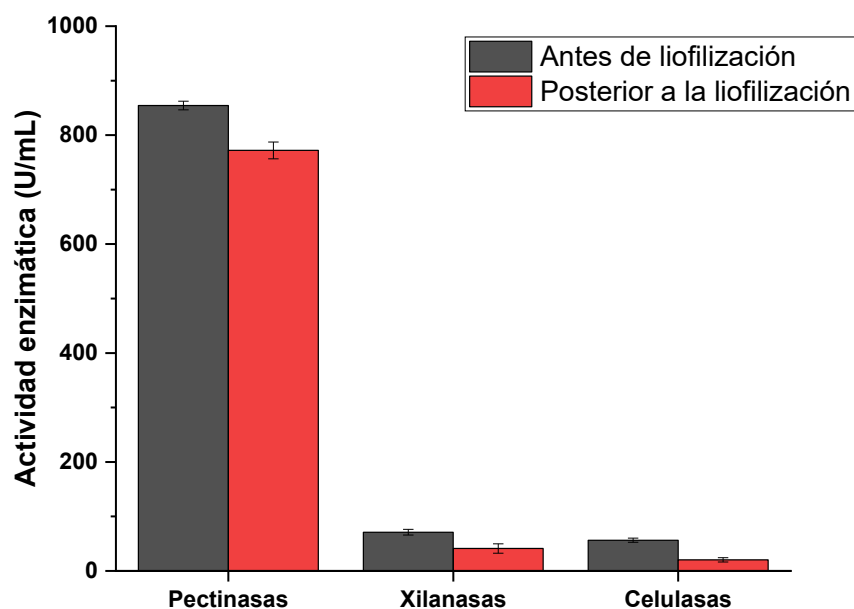


Fig. 21 Actividad enzimática posterior a la reactivación del cóctel hidrolítico parcialmente purificado liofilizado.

10.14 Evaluación de la micotoxina Penitrem A en condiciones de producción del cóctel hidrolítico

Las especies del género *Penicillium* son comúnmente reportadas como productoras de micotoxinas durante su metabolismo secundario bajo condiciones específicas, lo que podría indicar un riesgo para la salud en caso de utilizarse en las industrias alimentarias o farmacéutica (Rundberget et al., 2004). Por esta razón, es importante descartar la presencia de estas micotoxinas durante la producción del cóctel hidrolítico.

En el análisis mediante HPLC, se detectó el tiempo de retención del estándar Penitrem A a 400 segundos a 296 nm (Fig. 22). Sin embargo, no se observó una señal similar en las muestras del extracto crudo ni el cóctel hidrolítico parcialmente purificado. En ambas muestras se detectó una señal de 150 a 250 segundos, coincidiendo con la muestra de pectinasa comercial, lo que sugiere que el pico detectado corresponde a isoformas de la enzima analizada.

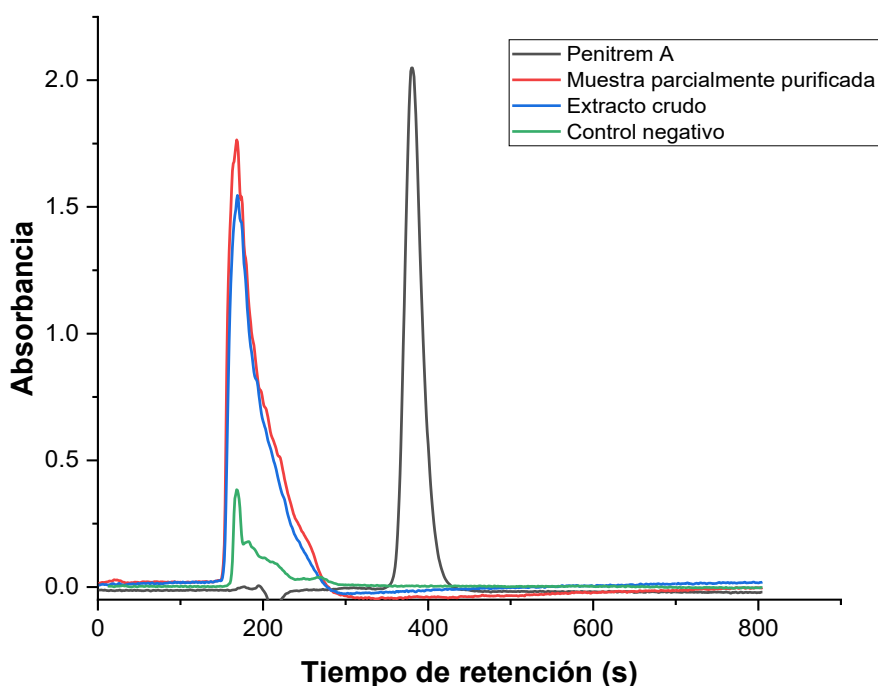


Fig. 22 Cromatogramas HPLC-UV a 296 nm de Penitrem A, cóctel hidrolítico parcialmente purificado, sobrenadante crudo y control negativo en condiciones óptimas de producción de hidrolasas.

Se ha reportado que este tipo de micotoxinas se producen en condiciones de estrés, por ejemplo, se ha encontrado que a condiciones de fermentación prolongadas (21 días), ausencia de luz y en fermentación en estado sólido con bajos niveles de oxígeno (Kalinina et al., 2017).

Por lo tanto, bajo las condiciones del coctel hidrolítico, no se detectó la presencia de la micotoxina Penitrem A. Sin embargo, es necesario que se analicen otro tipo de micotoxinas, como las aflatoxinas, que también se ha reportado que son producidas por cepas de *Penicillium* (Shabeer et al., 2022), con el objetivo de garantizar la seguridad del extracto fermentativo.

10.15 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos extracelulares en las muestras crudas

La actividad antimicrobiana de los compuestos extracelulares de las muestras crudas bajo fermentación sumergida se evaluó utilizando el método de difusión en disco contra bacterias Gram-negativas, Gram-positivas y levaduras, observándose la zona de inhibición (Tabla 17).

Para determinar si los compuestos antimicrobianos provenían a partir de la fermentación de *P. crustosum*, se evaluaron muestras de sin cosustrato (SC) y con cosustrato (CC) sin inoculación fúngica contra *E. coli* y *S. aureus*. En el caso de las bacterias Gram-positivas, se notó una actividad mínima con ambas muestras (SC y CC). Sin embargo, en la evaluación de *E. coli*, se observó una zona de inhibición de 0.45 ± 0.3 mm. Aunque el área fue mínima (<1 mm), este valor se atribuyó a la composición química de la cáscara de limón. Se ha demostrado que los extractos de este residuo agroindustrial son más efectivos contra bacterias Gram-negativas en comparación con las Gram-positivas (Saleem & Saeed, 2020).

Se observó actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *Staphylococcus aureus* en ambas muestras de fermentación, con y sin cosustrato. Para *E. coli*, la mayor zona de inhibición se observó en la evaluación de las muestras CC, midiendo 5.17 ± 0.25 mm. Este resultado sugiere que la cáscara de limón como cosustrato mejora

significativamente la producción de compuestos con actividad antimicrobiana contra esta bacteria Gram-negativa. Además, la zona de inhibición fue mayor que la producida por el control positivo (estreptomicina 2 mg/mL), lo que indica la alta eficacia del extracto fermentativo como una posible alternativa para el control microbiológico.

Por el contrario, en el análisis de *S. aureus*, la mayor zona de inhibición (4.35 ± 0.15 mm) se observó en la muestra sin cosustrato (SC). Esto indica que la presencia de cáscara de limón no produce un efecto significativo en la producción de compuestos con actividad ante bacterias Gram-positivas, en específico *S. aureus*. Estos resultados sugieren una respuesta en la producción de compuestos antimicrobianos dependiendo del tipo de microorganismo productor y la presencia del cosustrato (Pasquina-Lemonche et al., 2020), destacando la potencial eficacia a partir de los extractos fermentativos de *P. crustosum*.

No se detectó actividad antifúngica contra *C. albicans* en el sobrenadante extracelular bajo ninguna de las condiciones de fermentación. Este resultado contrasta con los efectos bacterianos previamente observados, lo que sugiere que, bajo estas condiciones fermentativas, *P. crustosum* podría estar produciendo metabolitos con propiedades antibacterianas que compuestos antifúngicos.

Además, los agentes antifúngicos comúnmente utilizados, como el fluconazol, funcionan inhibiendo la síntesis de ergosterol, un componente crucial de la membrana celular de *C. albicans*. El ergosterol es esencial para mantener la integridad y fluidez de la membrana celular. La ausencia de compuestos dirigidos al ergosterol en los metabolitos producidos por *P. crustosum* bajo las condiciones de producción, lo que podría explicar la nula actividad antifúngica observada (Lu et al., 2021).

Sin embargo, se ha reportado actividad antifúngica contra *C. albicans* utilizando compuestos producidos por otras cepas de *Penicillium*, como *P. meleagrinum*. En este caso, los compuestos extraídos de la biomasa producida después de 13 días de fermentación mostraron sinergia con fluconazol contra *C. albicans* resistente a azoles (Okabe et al., 2016). La diferencia entre estos resultados y los obtenidos en

este estudio puede deberse al tiempo de fermentación. Bajo condiciones de estrés, podrían producirse diferentes tipos de moléculas que pueden exhibir actividad antifúngica. Además, la composición química del medio de cultivo también influye en la producción de compuestos, por ejemplo, los medios mínimos de cultivo que genera condiciones de estrés.

Tabla 17. Actividad antimicrobiana de las muestras crudas producidas por *P. crustosum* evaluado por la zona de inhibición ante microorganismos patógenos

Cepas bacterianas	Zona de inhibición (mm)				Estreptomicina	Fluconazol	Control neg
	SC (muestra control)	CC (muestra control)	SC	CC			
<i>E. coli</i>	0.04 ± 0.01	0.45 ± 0.3	1.73 ± 0.03	5.17 ± 0.25	4.44 ± 0.56	-	0.08 ± 0.01
<i>S. aureus</i>	0.08 ± 0.00	0.07 ± 0.00	4.35 ± 0.15	0.00 ± 0.00	4.43 ± 0.56	-	0.05 ± 0.02
<i>C. albicans</i>	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	-	3.97 ± 1.08	0.02 ± 0.00

10.16 Efecto del tiempo de fermentación y el uso del cosustrato en la producción de compuestos antimicrobianos

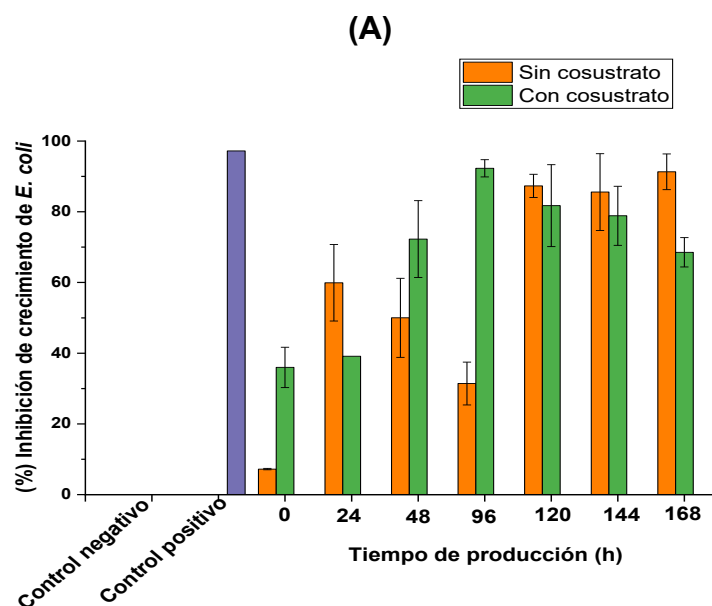
Se evaluó el efecto del tiempo de fermentación en la producción de compuestos con actividad antimicrobiana por *P. crustosum* desde 0 a 168 horas de fermentación (Fig. 23A-B). El efecto antimicrobiano se evaluó contra *E. coli* y *S. aureus*, posterior a que se encontró que no existía actividad antifúngica ante *C. albicans*.

En la evaluación de la actividad ante *E. coli* (Fig. 23A), se encontró que el tiempo de fermentación fue un factor significativo (Tabla 18) en la producción de compuestos extracelulares con actividad antimicrobiana en ambos medios de cultivo. El mayor porcentaje de inhibición de crecimiento (89.03%) se observó a las 96 horas de fermentación con cosustrato. No se observaron diferencias significativas entre las 120 y 168 horas de fermentación. Estos resultados sugieren que el aumento gradual de la actividad antimicrobiana a lo largo del tiempo puede estar relacionado con la biosíntesis de compuestos como parte del metabolismo secundario del hongo (Malmström et al., 2000). El uso de cáscara de limón como cosustrato también fue un factor significativo en la producción de compuestos ante *E. coli*. Este resultado podría estar relacionado con la presencia y disponibilidad adecuada de nutrientes esenciales para la producción sostenida de metabolitos bioactivos por parte del microorganismo fúngico, así como la inducción de

compuestos como fenoles y antioxidantes que podrían actuar contra este patógeno Gram-negativo. Por ejemplo, se conoce que las especies de *Penicillium* producen terpenoides como el limoneno y aceites esenciales con actividad antimicrobiana contra bacterias de este grupo (Tajick et al., 2014).

Durante la evaluación de la actividad antimicrobiana contra *S. aureus* (Fig. 23B), el tiempo de fermentación influyó significativamente en la producción de compuestos por *P. crustosum* (Tabla 19). Asimismo, el uso del cosustrato también afectó la producción de estos compuestos. El máximo porcentaje de inhibición ante *S. aureus* fue de $93.31 \pm 3.57\%$, observado en el medio SC a las 120 horas de fermentación, mayor que el porcentaje máximo alcanzado con el medio CC a las 168 horas de fermentación ($56.79 \pm 8.39\%$). Estos resultados también se atribuyen a los diferentes tipos de metabolitos secundarios que son producidos durante la fermentación sumergida, los cuales varían de acuerdo con la composición química del medio de cultivo.

De acuerdo con los resultados, las muestras seleccionadas para evaluaciones posteriores fueron con cosustrato a las 144 horas de fermentación (CC144) para la actividad contra *E. coli* y sin cosustrato a las 120 horas de fermentación (SC120) para la evaluación ante *S. aureus*.



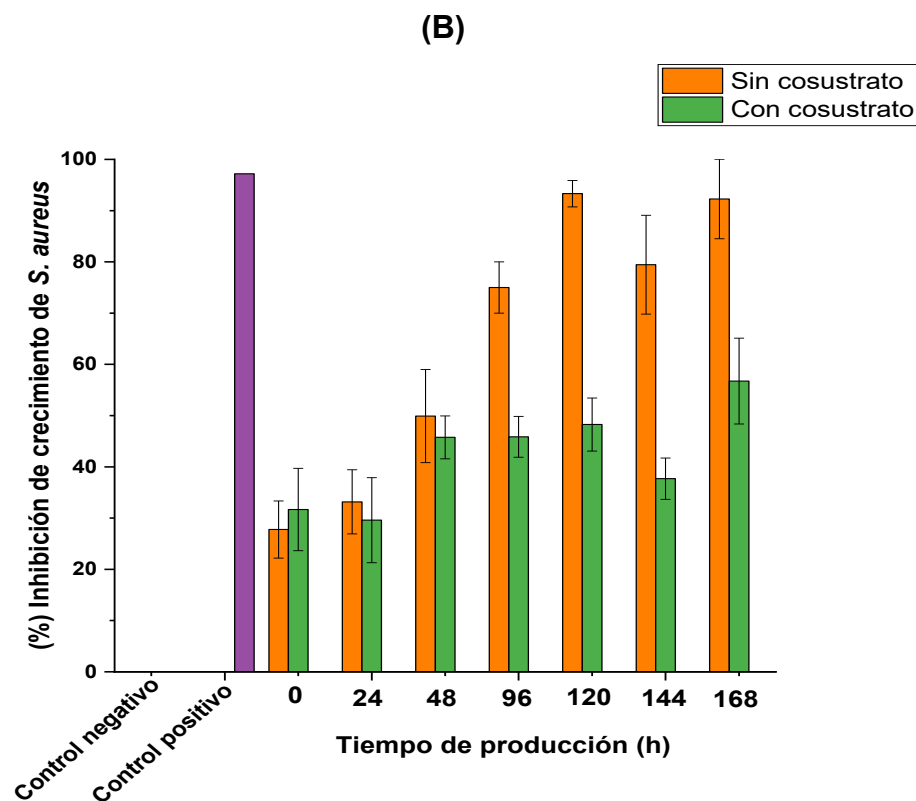


Fig. 23 Efecto del extracto fermentativo con cosustrato y sin cosustrato en el crecimiento de (A) *E. coli* y (B) *S. aureus*. Sobrenadante sin cosustrato (Filtrado por membrana de 0.45 μm , 20 μL , 100% v/v), Sobrenadante con cosustrato (Filtrado por membrana de 0.45 μm , 20 μL , 100% v/v), Control positivo: estreptomicina (20 μL , 2 mg/mL, Control negativo: agua estéril (20 μL).

Tabla 18. Análisis de Varianza (ANOVA) del tiempo de fermentación con cosustrato en la producción de compuestos bioactivos frente a *E. coli*; R^2 0.916, $\alpha=0.05$

	DF	SS	MS	F-value	Prob>F
Model	6	10675.26256	1779.21043	13.57467	3.99642E-5
Error	14	1834.95732	131.06838		
Total	20	12510.21989			

Tabla 19. Análisis de Varianza (ANOVA) del tiempo de fermentación sin cosustrato en la producción de compuestos bioactivos frente a *S. aureus*; R^2 0.886 $\alpha=0.05$

	DF	SS	MS	F-value	Prob>F
Model	6	13993.68528	2332.28088	18.24503	7.0403E-6

Error	14	1789.63449	127.83104
Total	20	15783.31977	

10.17 Actividad antimicrobiana de las muestras crudas, extraídas, fraccionadas y semipurificadas contra *E. coli* y *S. aureus*, MRSA y *P. aeruginosa*

Las muestras seleccionadas: SC120 y CC144, que demostraron actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *E. coli*, respectivamente fueron evaluadas posteriormente frente a MRSA y *P. aeruginosa*. Se analizaron las fases acuosas y las fases orgánicas resultantes de la extracción con acetato de etilo. Además, se evaluaron las fases obtenidas tras el fraccionamiento. Los resultados son presentados en la Tabla 20.

Los resultados de la actividad antimicrobiana de los compuestos bioactivos producidos contra *E. coli* exhiben que la muestra cruda CC144 ($78.86 \pm 8.34\%$) presentó una actividad mayor en comparación con la muestra cruda SC120 y ($67.33 \pm 13.2\%$). Lo que indica que la adición de un cosustrato mejora la producción de compuestos secundarios con actividad ante bacterias gram negativas (M. Li et al., 2011). Posterior a la extracción orgánica, la fase acuosa CC144 presentó la mayor actividad ($98.28 \pm 0.91\%$), lo que sugiere que los compuestos polares son efectivos ante *E. coli*. Esto se deduce debido a que la fase orgánica resultante presentó una actividad considerable ($77.73 \pm 5.94\%$), lo que sugiere la producción de compuestos fenólicos o lipofílicos con actividad ante este patógeno (J. S. Li et al., 2021).

Las muestras fraccionadas presentaron resultados importantes, la fracción > 10 kDa de la muestra SC120 mostró una actividad mayor contra *E. coli* ($65.58 \pm 17.31\%$) que la fracción por debajo de este peso molecular, estos resultados fueron similares a los obtenidos con las muestras con cosustrato CC144, lo que indica que los compuestos tienen un rango de peso mayor o igual a este peso molecular, o bien, estar compuestos por grupos glucosilados o lipofílicos como glucofenoles (George et al., 2019).

Las muestras semipurificadas de las muestras de CC144, demostraron una purificación y concentración de metabolitos activos después del paso cromatográfico esto evidenciado por un aumento en la actividad antimicrobiana alcanzada ($89.09 \pm 2.39\%$).

En contraste con los resultados para *E. coli*, la muestra cruda SC120 mostró una inhibición mayor contra *S. aureus* ($93.31 \pm 1.57\%$) en comparación con CC144 ($37.68 \pm 4.04\%$), lo que sugiere que el cosustrato podría no ser tan efectivo para la producción de compuestos contra bacterias grampositivas. Tras la extracción con acetato de etilo, la fase acuosa de SC120 presentó mayor actividad ($74.94 \pm 7.07\%$) en comparación con la fase orgánica ($31.67 \pm 5.55\%$), enfatizando el papel de los compuestos polares (M. Li et al., 2011).

En las muestras fraccionadas, la fracción >10 kDa de SC120 demostró una actividad de $42.40 \pm 5.94\%$, mientras que la fracción <10 kDa presentó una inhibición mayor ($82.97 \pm 0.19\%$). Los resultados indicaron que los compuestos bioactivos con mayor actividad antimicrobiana eran principalmente moléculas de pequeño tamaño molecular. Esto coincide con investigaciones previas, en donde se han identificado moléculas de bajo peso molecular con una actividad bioactiva importante, por ejemplo, la nisina, que es un polipéptido de peso molecular de aproximadamente 3.5 kDa, conocida por pertenecer a la clasificación de bacteriocinas con actividad antimicrobiana ante bacterias Gram-positivas (M. Li et al., 2011).

La semipurificación de las muestras SC120 incrementó la actividad antimicrobiana alcanzada ante este patógeno gram-positivo, nuevamente indicando ser un proceso eficiente en la purificación de compuestos orgánicos (J. S. Li et al., 2021).

Además, las muestras semipurificadas fueron las únicas con efectividad contra *S. aureus* resistente a meticilina y *P. aeruginosa*. La muestra semipurificada CC144 presentó una inhibición significativamente mayor comparado con la muestra semipurificada SC120 ($77.24 \pm 8.62\%$ y $33.54 \pm 4.58\%$, respectivamente). Esto sugiere que la producción de metabolitos con actividad específica ante este patógeno resistente se favorece bajo condiciones suplementadas con cáscara de limón. Asimismo, se ha reportado que compuestos orgánicos, como los

fitocompuestos, pueden actuar con mayor eficacia superando los mecanismos de resistencia presentes en patógenos multirresistentes, como es el caso de MRSA.

Tabla 20. Inhibición de crecimiento de *E. coli*, *S. aureus*, MRSA y *P. aeruginosa* por la muestra cruda, extraída, fraccionada y semipurificada

Muestra		Actividad antimicrobiana (Inhibición de crecimiento, %)			
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>P. aeruginosa</i>
SC120	Muestra cruda	67.33 ± 13.2	93.31 ± 1.57	-	-
	Fase acuosa	71.02 ± 2.63	74.94 ± 7.07	-	-
	Fase orgánica	68.44 ± 4.3	31.67 ± 5.55	-	-
	>10 kDa	65.58 ± 17.31	42.40 ± 5.94	-	-
	<10 kDa	46.02 ± 0.56	82.97 ± 0.19	-	-
	Semipurificada	78.58 ± 0.98	85.71 ± 2.45	33.54 ± 4.58	39.90 ± 5.74
CC144	Muestra cruda	78.86 ± 8.34	37.68 ± 4.04	-	-
	Fase acuosa	98.28 ± 0.91	25.67 ± 2.71	-	-
	Fase orgánica	77.73 ± 5.94	65.01 ± 7.11	41.32 ± 4.89	-
	>10 kDa	65.58 ± 7.31	-	-	-
	<10 kDa	46.02 ± 0.56	-		
	Semipurificada	89.09 ± 2.39	69.52 ± 3.02	77.24 ± 8.62	76.73 ± 7.12
Antibiotico	Estreptomicina	97.19 ± 0.25	95.24 ± 1.02	89.18 ± 5.98	82.2 ± 4.58

Porcentaje de actividad antibacteriana en comparación con el control negativo tomado como 100%. Los datos se presentan como media ± error estándar de la media (n=3), estreptomicina (2 mg/mL), (-) sin inhibición de crecimiento.

10.18 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las muestras semi purificadas

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las muestras semi purificadas con el objetivo de evaluar la eficacia antimicrobiana, se identificó la CMI de SC120 semi purificada frente a *S. aureus* y de CC144 semi purificada ante *E. coli*, MRSA y *Pseudomona aeruginosa* (Tabla 21).

Las muestras semi purificadas fueron rehidratadas con agua destilada estéril para obtener concentraciones entre 500 y 0.6 µg/mL. La CMI obtenida para *S. aureus* con la muestra SC120 semi purificada fue de 250 µg/mL. Este valor coincide con estudios previos en donde se reportó un valor de CMI de 50 µg/mL de un extracto de *A. flavus* MTCC 13062 contra *S. aureus* (Techaoei et al., 2020).

En el caso de la evaluación de *E. coli*, la muestra semi purificada de CC144 presentó una CMI de 125 µg/mL, este valor fue similar con investigaciones previas en donde se registra una CMI de 50 µg/mL para extractos de *A. flavus* ante este patógeno (Amin, Nawaz, et al., 2017).

Asimismo, las CMI determinadas para MRSA y *P. aeruginosa* con la muestra CC144 semi purificada fueron de 225 µg/mL y 185 µg/mL, respectivamente. Estos resultados son comparables con valores de CMI de 200 µg/mL reportados con extractos de micelio de *A. flavus* ante ambos patógenos (Techaoei et al., 2020).

En este estudio, el proceso de semi purificación no incluyó pasos adicionales como el uso de solventes ni extracciones de micelio como lo tradicionalmente reportado. Los compuestos activos evaluados fueron obtenidos del medio extracelular, lo que reduce el uso de métodos de extracción. Lo que destaca el potencial de los metabolitos extracelulares como fuente de agentes antimicrobianos.

Tabla 21. Valores de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) contra *Stapylococcus aureus*, *Escherichia coli*, MRSA y *Pseudomonas aeruginosa*

Bacteria	Muestra	Concentración CMI (µg /mL)
<i>S. aureus</i>	SC120	250
<i>E. coli</i>	CC144	125
MRSA	CC144	225
<i>P. aeruginosa</i>	CC144	185

10.19 Identificación de compuestos por RP-HPLC-ESI-MS

La síntesis de metabolitos secundarios esta influenciada tanto por las condiciones de cultivo como por la naturaleza del microorganismo (Malmström et al., 2000). Se ha reportado que diversas especies fúngicas producen un amplio espectro de compuestos, incluidas micotoxinas. Sin embargo, también se ha reportado la producción de compuestos bioactivos con actividad antioxidante y antimicrobiana. Por ejemplo, *A. niger* GH1 ha demostrado la síntesis de compuestos como flavonoles, antocianinas y catequinas (Carlos et al., 2020b). Además, especies del género *Penicillium*, como *P. setosum*, también han producido compuestos bioactivos, entre ellos el ácido láurico, ácido hexadecanoico y patulina (George et al., 2019). De manera similar, *P. commune* SD-118, presentó la producción de esteroides, compuestos aromáticos y alcaloides con actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *E. coli* (Shang et al., 2012).

Los compuestos producidos por *P. crustosum* en los distintos medios de fermentación (SC120 y CC144) fueron identificados mediante cromatografía líquida en fase reversa acoplada a espectrometría de masas (RP-HPLC-ESI-MS) (Tabla 22). Se observó que la producción de compuestos bioactivos variaba en función de la composición fisicoquímica de los medios. Por ejemplo, en la muestra CC144 se detectaron compuestos como la naringina, mientras que en la muestra SC120 se identificó secoisolariciresinol. Sin embargo, en ambas muestras se encontraron compuestos en común como la quercetina 3-O xilosil-glucorónido, perteneciente al grupo de los flavonoides, y el Ácido ferúlico 4-O-glucósido, perteneciente a los ácidos metoxicinámicos.

Los flavonoides son compuestos producidos comúnmente como parte del metabolismo secundario y juegan un papel importante en los mecanismos de defensa de los organismos, principalmente en plantas. Estos compuestos han sido ampliamente reportados por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorios, así como actividad antifúngica y antibacteriana. Se ha reportado la actividad antibacteriana frente a microorganismos patógenos como *P. aureuginosa*, *E. coli*, *E. faecalis* y *S. aureus*. Los mecanismos antimicrobianos de los flavonoides incluyen la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, principalmente en la inhibición de las topoisomerasas bacterianas. Además, estos compuestos pueden disrumpir la membrana celular bacteriana al reducir la fluidez las regiones hidrofílicas e hidrofóbicas, debido a la presencia de residuos polares y no polares en su estructura. Por ejemplo, se ha reportado que la quercetina incrementa la permeabilidad de la membrana en *S. aureus* (Biharee et al., 2020; Do Socorro Chagas et al., 2022).

El compuesto feruloil glucosa puede originarse como un derivado de la hidrólisis de polisacáridos y residuos lignocelulósicos, considerando que los extractos utilizados en este estudio son ricos en enzimas hidrolítica. Este tipo de compuesto pertenecientes a los ácidos hidroxicinámicos, ha sido reportado por sus propiedades antioxidantes y antimicrobiana. No obstante, la actividad antimicrobiana se atribuye

principalmente a los ácidos ferúlicos, que son derivados activos de esta familia de compuestos (J. S. Li et al., 2021).

Tabla 22. Compuestos identificados por RP-HPLC-ESI-MS de los extractos fermentativos de *P. crustosum*

Muestras	ID	Tiempo de retención (min)	Masa [M-H] ⁻	Compuesto	Familia
CC144	1	8.57	356.5	Ácido ferúlico 4-O-glucósido	Ácidos metoxicinámicos
	2	35.85	578.7	Naringina	Flavanonas
	3	37.85	608.7	Quercetina 3-O xilosil-glucorónido	Flavonoles
SC120	4	18.89	364.8	Secoisolariciresinol	Lignanos
	5	23.54	356.6	Ácido ferúlico 4-O-glucósido	Ácidos metoxicinámicos
	6	32.99	364.8	Secoisolariciresinol	Lignanos
	7	36.24	608.8	Quercetina 3-O xilosil-glucorónido	Flavonoles

10.20 Escalamiento de la producción del coctel hidrolítico y de los compuestos con actividad contra *E. coli*

El escalamiento es un proceso crucial en la industria, ya que busca mantener un rendimiento de producción rentable. Sin embargo, factores claves como la agitación y aireación juegan un papel fundamental en la transferencia de oxígeno al microorganismo productor. Además, una agitación excesiva puede dañar mecánicamente las células del microorganismo, lo que afecta significativamente la producción. Por lo tanto, el escalamiento desde la producción a nivel laboratorio hacia mayores volúmenes es un proceso complejo, pero esencial para asegurar la eficiencia del proceso a mayor escala (John et al., 2020).

La producción del cóctel hidrolítico fue escalada en biorreactores con volúmenes operacionales de 200 mL y 2 L (Tabla 23), utilizando las condiciones óptimas determinadas en un sistema a nivel laboratorio (matraz Erlenmeyer, 100 mL de volumen operacional). La máxima producción de pectinasas se alcanzó en el sistema de 100 mL, con una actividad de 959.74 ± 10.71 U/mL. Sin embargo, al escalar a 200 mL, se observó una disminución del 7.03%, alcanzando una actividad de 892.32 ± 15.79 U/mL, y una reducción del 10% al escalar 2 L, con una actividad

de 884.68 ± 2.60 U/L. Este efecto podría relacionarse a que las condiciones de transferencia de oxígeno no son equivalentes entre los biorreactores de mayor tamaño y el matraz, lo cual podría estar influyendo en la eficiencia metabólica del hongo. Sin embargo, se observa un escalamiento de la producción con una eficiencia bastante aceptable.

La producción de las celulasas presentó un incremento significativo al escalar del matraz de 100 mL al biorreactor de 200 mL, con actividades de 61.98 ± 8.95 U/mL y 77.89 ± 7.91 U/mL, respectivamente. Este aumento podría deberse a que la agitación controlada en el biorreactor mejora la oxigenación en el sistema en comparación con la agitación de manera orbital utilizada en el matraz, lo que favorece la producción enzimática. Sin embargo, al escalar a 2 L operacionales, la actividad disminuyó alrededor del 13% (67.43 ± 6.40 U/mL), lo que indica que las condiciones específicas a este volumen operacional aún no están optimizadas. Por ejemplo, sería necesario ajustar el flujo de aire, ya que este parámetro podría estar influyendo directamente en la producción enzimática. Aun así, el sistema de 2 L mostró una mejora del 8.79% en la actividad enzimática en relación con el sistema a nivel laboratorio de 100 mL.

En el caso de la producción de xilanasas, la actividad enzimática al escalar en el sistema de 200 mL presentó un aumento de 7.38% comparando con el resultado de en el matraz de 100 mL (65.60 ± 5.02 U/mL). Sin embargo, un aumento significativo se observó en el biorreactor de 2 L alcanzando la máxima actividad de 85.76 ± 5.25 U/mL. Este resultado indica que las condiciones del escalamiento fueron favorables para la producción de xilanasas, probablemente debido a una mejor transferencia de masa en el sistema de mayor volumen operacional.

La producción del cóctel hidrolítico fue escalada de manera eficiente, sin embargo, es necesario ajustar parámetros como el flujo de aire y determinar la concentración de oxígeno disuelto en el sistema para optimizar las condiciones de fermentación en cada biorreactor. Se ha evidenciado que la aireación y agitación son factores que afectan directamente la producción de hidrolasas, por ejemplo, en el escalamiento de la producción de enzimas xilanasas por *A. nidulans* en un tanque de agitación de

1.5 L, donde se observó que un mayor coeficiente de transferencia de oxígeno volumétrico incrementa la producción enzimática (Abdella et al., 2020).

Tabla 23. Escalamiento de la producción del cóctel hidrolítico en biorreactores de diferentes volúmenes, producción de pectinasas, celulasas y xilanasas evaluadas en tres sistemas: 100 mL, biorreactor de 200 mL y 2 L

Condiciones de operación						Actividad pectinasas (U/mL)	Actividad celulasas (U/mL)	Actividad xilanasas (U/mL)	
Sistema	Volumen operacional	Temperatura (° C)	pH	MnSO4 (g/L)	Tipo de agitación (RPM)				
Matraz	100 mL	45	5.5	2.5	Orbital	120	959.74 ± 10.71	61.98 ± 8.95	65.6 ± 5.02
Biorreactor	200 mL				Mecánica	70	700.18 ± 8.46	52.51 ± 5.17	72.14 ± 5.73
Biorreactor	200 mL				Mecánica	80	829.32 ± 15.79	77.89 ± 7.91	70.45 ± 3.92
Biorreactor	2 L				Mecánica	180	884.68 ± 2.6	67.43 ± 6.4	85.76 ± 5.25

10.21 Determinación de los parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos se determinaron bajo condiciones óptimas para la producción del cóctel hidrolítico. La tasa de crecimiento específica se evaluó a lo largo del tiempo durante la fermentación sumergida, tanto en matraz con un volumen operacional de 100 mL, como en biorreactores de 200 mL y 2 L (Fig. 27). Se observó que la fase estacionaria del microorganismo fúngico coincide con el tiempo óptimo de la producción enzimática y de compuestos bioactivos, alrededor de las 72 h y 120 h de fermentación, lo que indica que estos compuestos son producidos durante el metabolismo secundario (Pohl et al., 2020).

Sin embargo, la fase de latencia y la fase exponencial varían según el sistema de producción. En el biorreactor de 200 mL se observó una reducción en la fase de latencia en comparación con el matraz de 100 mL, lo cual podría deberse al mayor flujo de oxigenación que se obtiene a partir de la agitación por agitación mecánica en comparación con la agitación orbital. Asimismo, se observó un incremento de aproximadamente el doble de la tasa de crecimiento en el biorreactor de 2 L en comparación con los otros dos sistemas de producción. Este aumento podría estar influenciado tanto por el flujo y la concentración de oxígeno como por la agitación, que facilita una mejor distribución de sustrato (Hamill et al., 2020).

La evaluación de los parámetros cinéticos fue determinada a partir del modelo de Monod, específicamente los valores de velocidad máxima de crecimiento específico ($\mu_{\max}$) y la constante de saturación (K_s). Para este análisis, el modelo fue linealizado con un valor de R^2 de 0.9993. Se registró un valor de $\mu_{\max}$ de 0.000766 h^{-1} , lo que indica una tasa de crecimiento baja comparando con otros microorganismos fúngicos reportados en la literatura, por ejemplo, en la fermentación sumergida de un hongo macroscópico *Pleurotus ostreatus*, se registró un valor de $\mu_{\max}$ de 0.0325 h^{-1} (Hamza et al., 2024), esta diferencia podría deber ser a que el hongo utilizado en este proyecto es microscópico, lo que resulta en un crecimiento más baja y su producción de biomasa es menor. En el caso de la determinación de la constante de saturación, se registró un valor de 0.9998 g/L , lo que indica que existe una buena afinidad entre el sustrato y el microorganismo. En la literatura se presenta un valor de K_s de 1.9999 g/L para el hongo *P. ostreatus* (Hamza et al., 2024)

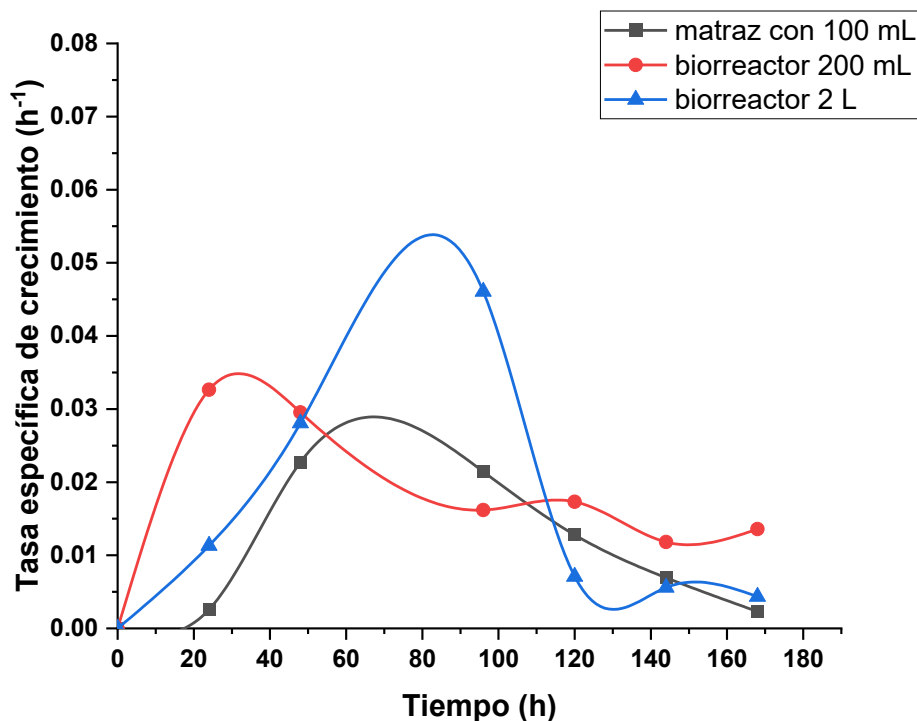


Fig. 24 Tasa de crecimiento de *P. crustosum* a condiciones óptimas de la producción del cóctel hidrolítico en cada sistema de producción con respecto al tiempo, donde $\mu = \ln \frac{x_2}{x_1} / (t_2 - t_1)$, x = concentración celular (g/mL).

11 CONCLUSIONES

El uso de agro residuos como fuente de carbono demostró un incremento en la producción de hidrolasas, con un aumento significativo en la producción de pectinasas, xilanasas y células, con un incremento de 4, 20 y 3.5 veces respectivamente, en comparación con el control. La cáscara de limón (2% p/s) fue el mejor cosustrato para la producción de pectinasas (980.12 U/mL a las 96 h), y celulasas (56.34 U/mL a las 144 h), mientras que el salvado de trigo (2% p/s) fue el más efectivo para la producción de xilanasas (236.39 U/mL a las 144 h).

P. crustosum resultó ser un potencial productor de pectinasas, xilanasas y celulasas, con actividades mayores a las reportadas en la literatura. La optimización de las condiciones de cultivo permitió incrementar la actividad de pectinasas en un 45%, con una actividad de 1427.99 ± 27.41 U/mL a 33.5 °C, pH 5.05, 2.5 g/L MnSO₄. Asimismo, se logró optimizar la producción de xilanasas y celulasas, con incrementos del 14% y 11%, respectivamente, tras ajustar las condiciones de fermentación: 37.5 °C, pH 5.5, 2.5 g/L MnSO₄ y 0.625% PDB para xilanasas y 45° C, pH 5.5 y 2.5 g/L MnSO₄ para celulasas.

Las condiciones óptimas del cóctel hidrolítico se establecieron a 45°C, pH 5.5 y 2.5 g/L MnSO₄ con 2% p/s de cáscara de limón, encontrado en una fracción entre 10 a 100 kDa. Utilizando el método de SDS-PAGE y zimograma, se identificaron las masas moleculares de las hidrolasas producidas, pectinasas en 20 kDa, 25 kDa para las xilanasas y 45 kDa para celulasas.

La reactivación del cóctel hidrolítico liofilizado mantuvo en una actividad enzimática significativa, lo que sugiere la viabilidad del producto liofilizado para su uso futuro.

Se descartó la producción de la micotoxina Penitrem A en las condiciones empleadas para la producción del cóctel hidrolítico.

Los extractos fermentativos presentaron actividad antimicrobiana ante *E. coli* y *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, no se observó actividad antifúngica ante *C. albicans*. El uso de cosustratos influyó en la actividad antimicrobiana, sin cosustrato los extractos fueron efectivos frente a *E. coli* y *S. aureus*, mientras que, con cosustrato, solo mostraron actividad ante *E. coli*.

La fracción extracelular SC120 semipurificada presentó actividad antimicrobiana con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 250 µg/mL contra *S. aureus* y la muestra CC144 semipurificada de 125 µg/mL para *E. coli*.

A partir de la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa acoplado con espectrometría de masas (RP-HPLC-ESI-MS) se identificaron compuestos fenólicos, flavonoides, ácidos hidroxicinámicos y lignanos con actividad antimicrobiana ante *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y SARM. Destacando al compuesto derivado de Quercetina que se produce tanto en medio sin cosustrato como con cosustrato.

La fermentación sumergida se escaló exitosamente a volúmenes de 200 mL y 2 L. En ambos sistemas, se mantuvo entre el 93% y 90% de similitud en la actividad pectinolítica, mientras que la actividad de xilanasas mostró un incremento del 7% en el biorreactor de 200 mL y un 30% en el biorreactor de 2 L. La actividad de celulasas también aumentó, con un 25% en el sistema de 200 mL y un 8% en el biorreactor de 2 L, lo que sugiere que el escalamiento mejoró la eficiencia de producción de estas enzimas.

Con base en los resultados obtenidos en este proyecto, se deduce que la hipótesis planteada se cumple, debido a que en un mismo sistema de fermentación con cosustrato se logró la producción tanto de cóctel hidrolítico como de compuestos con actividad antimicrobiana efectiva contra *E. coli*, *SARM* y *P. aeruginosa*. Por lo que se establece una potente plataforma para producción de compuestos bioactivos de interés en una biorrefinería.

12 DISPOSICIÓN DE LOS RESIDUOS GENERADOS

Los residuos generados en el presente trabajo fueron dispuestos de acuerdo con el reglamento establecido por el departamento de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.

13 REFERENCIAS

- Abdella, A., Segato, F., & Wilkins, M. R. (2020). Optimization of process parameters and fermentation strategy for xylanase production in a stirred tank reactor using a mutant *Aspergillus nidulans* strain. *Biotechnology Reports*, 26. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00457>
- Abernethy, J. K., Johnson, A. P., Guy, R., Hinton, N., Sheridan, E. A., & Hope, R. J. (2015). Thirty-day all-cause mortality in patients with *Escherichia coli* bacteraemia in England. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(3), 251.e1-251.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.01.001>
- Aehle, W. (2004). Industrial Enzymes: Overview of industrial enzyme applications. *Enzymes in Industry*, 257–262. <https://doi.org/10.1002/3527602135.ch5d>
- Aguiar, A., Milessi, T. S., Mulinari, D. R., Lopes, M. S., da Costa, S. M., & Candido, R. G. (2021). Sugarcane straw as a potential second-generation feedstock for biorefinery and white biotechnology applications. In *Biomass and Bioenergy* (Vol. 144). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105896>
- Ahmed, I., Zia, M. A., Hussain, M. A., Akram, Z., Naveed, M. T., & Nowrouzi, A. (2016). Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(2), 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.11.003>
- Aina, V. O., Barau, M. M., Mamman, O. A., Zakari, A., Haruna, H., Hauwa Umar, M. S., & Abba, Y. B. (2012). Extraction and characterization of pectin from peels of lemon (*Citrus limon*), grape fruit (*Citrus paradisi*) and sweet orange (*Citrus sinensis*). *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, 3(6), 259–262.
- Alokika, & Singh, B. (2019). Production, characteristics, and biotechnological applications of microbial xylanases. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 103, Issues 21–22, pp. 8763–8784). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10108-6>
- Amin, F. (2016). Multiple parameter optimizations for enhanced biosynthesis of exo-polygalacturonase enzyme and its application in fruit juice clarification. <https://doi.org/10.1515/ijfe-2016-0256>
- Amin, F., Bhatti, H. N., Bilal, M., & Asgher, M. (2017). Purification, kinetic, and thermodynamic characteristics of an exo-polygalacturonase from *Penicillium notatum* with industrial perspective. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 183(1), 426–443. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2455-y>
- Amin, F., Nawaz, H., Bilal, M., & Asgher, M. (2017). international journal of biological macromolecules improvement of activity, thermo-stability and fruit juice clarification characteristics of fungal exo - polygalacturonase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 974–984. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.086>
- Arellano-Narváez. (2020). Prácticas de higiene en el proceso de elaboración de alimentos en microempresas de un mercado de Ciudad de México. *Revista de Alimentación Contemporánea y Desarrollo Regional*, 30(56). <https://doi.org/10.24836/es.v39i56.1003>
- Arias, M., Sandoval Pérez, M.; Lidia, A., Ricalde, C., Lucía, S., Yáñez, S., & Manuel, J. (2010). Los microorganismos: Pequeños gigantes. In *Núm* (Vol. 17). <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=29411989003>
- Attia, E. Z., Khalifa, B. A., Shaban, G. M., Abdelraheem, W. M., Mustafa, M., Abdelmohsen, U. R., & El-Katatny, M. H. (2022). Discovering the chemical profile, antimicrobial and antibiofilm potentials of the endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* isolated from *Artemisia judaica* L. assisted with docking studies. *South African Journal of Botany*. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.01.005>
- Bajaj, P., & Mahajan, R. (2019). Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 103, Issues 21–22, pp. 8711–8724). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10146-0>
- Banu, A. R., Devi, M. K., Gnanaprabhal, G. R., Pradeep, B. V., Palaniswamy, M., & Nadu, T. (2010). Production and characterization of pectinase enzymes from *Penicillium chrysogenum*. *Indian Journal of Science and Technology*, 3(4), 377–381.

- Bhardwaj, N., & Verma, P. (2021). 7 Microbial xylanases: a helping module for the enzyme biorefinery platform.
- Biharee, A., Sharma, A., Kumar, A., & Jaitak, V. (2020). Antimicrobial flavonoids as a potential substitute for overcoming antimicrobial resistance. In *Fitoterapia* (Vol. 146). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104720>
- Boss, R., Overesch, G., & Baumgartner, A. (2016). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli*, *enterococci*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* from raw fish and seafood imported into Switzerland. *Journal of Food Protection*, 79(7), 1240–1246. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-463>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. 254, 248–254.
- Carlos, D. L. M. J., Leonardo, S., Jesús, M. C., Paola, M. R., Alejandro, Z. C., Juan, A. V., & Noé, A. C. (2020a). Solid-state fermentation with *Aspergillus niger* gh1 to enhance polyphenolic content and antioxidative activity of Castilla rose (*Purshia plicata*). *Plants*, 9(11), 1–15. <https://doi.org/10.3390/plants9111518>
- Carlos, D. L. M. J., Leonardo, S., Jesús, M. C., Paola, M. R., Alejandro, Z. C., Juan, A. V., & Noé, A. C. (2020b). Solid-state fermentation with *Aspergillus niger* gh1 to enhance polyphenolic content and antioxidative activity of Castilla rose (*Purshia plicata*). *Plants*, 9(11), 1–15. <https://doi.org/10.3390/plants9111518>
- Cerda-Cejudo, N. D., Buenrostro-Figueroa, J. J., Sepúlveda, L., Estrada-Gil, L. E., Torres-León, C., Chávez-González, M. L., Aguilar, C. N., & Ascacio-Valdés, J. A. (2024). Enhancing the release of ellagic acid from mexican rambutan peel using solid-state fermentation. *Biomass*, 4(3), 1005–1016. <https://doi.org/10.3390/biomass4030056>
- Chapman, J., Ismail, A. E., & Dinu, C. Z. (2018). Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. In *Catalysts* (Vol. 8, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/catal8060238>
- Chatterjee, S., & Venkata Mohan, S. (2022). Fungal biorefinery for sustainable resource recovery from waste. In *Bioresource Technology* (Vol. 345). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126443>
- Chellegatti, M. A. D. S. C., Fonseca, M. J. V., & Said, S. (2002). Purification and partial characterization of exopolysaccharonase I from *Penicillium frequentans*. *Microbiological Research*, 157(1), 19–24. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00127>
- de Almeida Antunes Ferraz, J. L., Oliveira Souza, L., Gustavo de Araújo Fernandes, A., Luiz Ferreira Oliveira, M., de Oliveira, J. R., & Franco, M. (2020). Optimization of the solid-state fermentation conditions and characterization of xylanase produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 using yellow mombin residue (*Spondias mombin* L.). *Chemical Engineering Communications*, 207(1), 31–42. <https://doi.org/10.1080/00986445.2019.1572000>
- de Castro Coêlho, M., da Câmara Rocha, J., Augusto Santos, F., Carlos Ramos Gonçalves, J., Maria de Vasconcelos, S., Cristina Soares de Lima Grisi, T., Florentino de Melo Santos, S., Antônio Machado de Araújo, D., & Campos Teixeira de Carvalho-Gonçalves, L. (2021a). Use of agroindustrial wastes for the production of cellulases by *Penicillium* sp. FSDE15. *Journal of King Saud University - Science*, 33(6). <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101553>
- de Castro Coêlho, M., da Câmara Rocha, J., Augusto Santos, F., Carlos Ramos Gonçalves, J., Maria de Vasconcelos, S., Cristina Soares de Lima Grisi, T., Florentino de Melo Santos, S., Antônio Machado de Araújo, D., & Campos Teixeira de Carvalho-Gonçalves, L. (2021b). Use of agroindustrial wastes for the production of cellulases by *Penicillium* sp. FSDE15. *Journal of King Saud University - Science*, 33(6). <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101553>
- de Fá Tima Borin, M., Said, S., José, M., & Fonseca, V. (1996). Purification and biochemical characterization of an extracellular endopolysaccharonase from *Penicillium frequentans*.
- Do Socorro Chagas, M. S., Behrens, M. D., Moragas-Tellis, C. J., Penedo, G. X. M., Silva, A. R., & Gonçalves-De-Albuquerque, C. F. (2022). Flavonols and Flavones as Potential anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antibacterial Compounds. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2022). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2022/9966750>

- Dudeja, S., Chhokar, V., Beniwal, V., Badgujjar, H., Chauhan, R., Soni, S., & Kumar, A. (2021). Optimization and production of antimicrobial compounds by *Aspergillus flavus* MTCC 13062 and its synergistic studies. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102065>
- El Enshasy, H. A., Elsayed, E. A., Suhaimi, N., Malek, R. A., & Esawy, M. (2018a). Bioprocess optimization for pectinase production using *Aspergillus niger* in a submerged cultivation system. *BMC Biotechnology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0481-7>
- El Enshasy, H. A., Elsayed, E. A., Suhaimi, N., Malek, R. A., & Esawy, M. (2018b). Bioprocess optimization for pectinase production using *Aspergillus niger* in a submerged cultivation system. *BMC Biotechnology*, 18(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0481-7>
- Elbehiry, A., Abalkhail, A., Marzouk, E., Elmanssury, A. E., Almuzaini, A. M., Alfheaid, H., Alshahrani, M. T., Huraysh, N., Ibrahim, M., Alzaben, F., Alanazi, F., Alzaben, M., Anagreyah, S. A., Bayameen, A. M., Draz, A., & Abu-Okail, A. (2023). An overview of the public health challenges in diagnosing and controlling human foodborne pathogens. In *Vaccines* (Vol. 11, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/vaccines11040725>
- Falade, A. O. (2021). Valorization of agricultural wastes for production of biocatalysts of environmental significance: towards a sustainable environment. *Environmental Sustainability*, 4(2), 317–328. <https://doi.org/10.1007/s42398-021-00183-9>
- Ferreira, J. A., Agnihotri, S., & Taherzadeh, M. J. (2019). Waste biorefinery. In *Sustainable Resource Recovery and Zero Waste Approaches* (pp. 35–52). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64200-4.00003-7>
- García, F., & Rica, C. (2008). Revisión Enfermedades infecciosas emergentes: interacción entre el mundo microbiano y las sociedades humanas (Emergent infectious diseases: interaction between the microbial world and human societies). In *AMC* (Vol. 50, Issue 3).
- Garza Zaragoza. (2012). Caracterización taxonómica y molecular de *Candida albicans* spp. en aislados clínicos de origen bucal en pacientes sanos y diabéticos de Nuevo León.
- Garzón, P., Martínez, R., & Molina L, M. (2018). *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *NOVA*, 17(32), 25–36.
- George, T. K., Devadasan, D., & Jisha, M. S. (2019). Chemotaxonomic profiling of *Penicillium setosum* using high-resolution mass spectrometry (LC-Q-ToF-MS). *Heliyon*, 5(9). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02484>
- Ghareeb, M., Hamed, M., Saad, A., Abdel-Aziz, M., Hamed, A., & Refahy, L. (2019). Bioactive secondary metabolites from the locally isolated terrestrial fungus, *Penicillium* sp. SAM16-EGY. *Pharmacognosy Research*, 11(2), 162. https://doi.org/10.4103/pr.pr_102_18
- Gregersen, T. (1978). Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacteria. In *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol* (Vol. 5).
- Grijseels, S., Nielsen, J. C., Nielsen, J., Larsen, T. O., Frisvad, J. C., Nielsen, K. F., Frandsen, R. J. N., & Workman, M. (2017). Physiological characterization of secondary metabolite producing penicillium cell factories. *Fungal Biology and Biotechnology*, 4(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40694-017-0036-z>
- Hamill, P. G., Stevenson, A., McMullan, P. E., Williams, J. P., Lewis, A. D. R., Sudharsan, S., Stevenson, K. E., Farnsworth, K. D., Khroustalyova, G., Takemoto, J. Y., Quinn, J. P., Rapoport, A., & Hallsworth, J. E. (2020). Microbial lag phase can be indicative of, or independent from, cellular stress. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62552-4>
- Hamza, A., Shankar, M. P., Chowdary, U. S., Ghanekar, S., Sahoo, S., Krishnaiah, C. V., & Kumar, D. S. (2024). Submerged production of mycelium biomass and bioactive compounds from *P. ostreatus* in a controlled fermentation medium. *Food and Humanity*, 2, 100302. <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2024.100302>
- Hu, Y., Zhao, K., Qu, Y., Song, X., Zhao, J., & Qin, Y. (2021). *Penicillium oxalicum* S-adenosylmethionine synthetase is essential for the viability of fungal cells and the expression of genes encoding cellulolytic enzymes. *Fungal Biology*, 125(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.09.004>

- Intasit, R., Cheirsilp, B., Suyotha, W., & Boonsawang, P. (2021). Synergistic production of highly active enzymatic cocktails from lignocellulosic palm wastes by sequential solid state-submerged fermentation and co-cultivation of different filamentous fungi. *Biochemical Engineering Journal*, 173. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108086>
- Islam, F., & Roy, N. (2018). Screening, purification and characterization of cellulase from cellulase producing bacteria in molasses. *BMC Research Notes*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3558-4>
- Javadi, N., Khodadadi Tirkolaei, H., Hamdan, N., & Kavazanjian, E. (2021). Longevity of raw and lyophilized crude urease extracts. *Sustainable Chemistry*, 2(2), 325–334. <https://doi.org/10.3390/suschem2020018>
- Jee Hsiung, H. L. H. (2015). Bioprocessing of agro-residual wastes for optimization of xylanase production by *Aspergillus brasiliensis* in shake flask culture and its scaling up elucidation in stirred tank bioreactor. *Journal of Biodiversity, Bioprospecting and Development*, 02(02). <https://doi.org/10.4172/2376-0214.1000148>
- John, J., Kaimal, K. K. S., Smith, M. L., Rahman, P. K. S. M., & Chellam, P. V. (2020). Advances in upstream and downstream strategies of pectinase bioprocessing: A review. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 162, pp. 1086–1099). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.224>
- Kalinina, S. A., Jagels, A., Cramer, B., Geisen, R., & Humpf, H. U. (2017). Influence of environmental factors on the production of penitrems A–F by *Penicillium crustosum*. *Toxins*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/toxins9070210>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 2, Issue 2, pp. 123–140). <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Korejo, F., Ali, S. A., Shafique, H. A., Sultana, V., Ara, J., & Ehteshamul-Haque, S. (2014). Antifungal and antibacterial activity of endophytic *Penicillium* species isolated from salvadora species. In *Pak. J. Bot* (Vol. 46, Issue 6).
- Kumar, V., & Shukla, P. (2018). Extracellular xylanase production from *T. lanuginosus* VAPS24 at pilot scale and thermostability enhancement by immobilization. *Process Biochemistry*, 71, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.05.019>
- Laemmli. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Levinson, T., Dahan, A., Novikov, A., Paran, Y., Berman, J., & Ben-Ami, R. (2021). Impact of tolerance to fluconazole on treatment response in *Candida albicans* bloodstream infection. *Mycoses*, 64(1), 78–85. <https://doi.org/10.1111/myc.13191>
- Levy, S. B., & Bonnie, M. (2004). Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. In *Nature Medicine* (Vol. 10, Issue 12S, pp. S122–S129). <https://doi.org/10.1038/nm1145>
- Li, J. S., Lau, Y. Q., Sun, T. Y., & Chen, C. S. (2021). Purification and biochemical characterization of an alkaline feruloyl esterase from *Penicillium sumatrense* NCH-S2 using rice bran as substrate. *CYTA - Journal of Food*, 19(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1844300>
- Li, M., Muthaiyan, A., O'bryan, C. A., Gustafson, J. E., Li, Y., Crandall, P. G., & Ricke, S. C. (2011). Use of natural antimicrobials from a food safety perspective for control of *Staphylococcus aureus*. In *Current Pharmaceutical Biotechnology* (Vol. 12).
- Li, P. J., Xia, J. L., Shan, Y., Nie, Z. Y., Su, D. L., Gao, Q. R., Zhang, C., & Ma, Y. L. (2014). Optimizing production of pectinase from orange peel by *Penicillium oxalicum* PJ02 using response surface methodology. *Waste and Biomass Valorization*, 6(1), 13–22. <https://doi.org/10.1007/s12649-014-9317-4>
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., & Wang, X. (2012). Technology prospecting on enzymes: Application, marketing and engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2(3), e201209017. <https://doi.org/10.5936/csbj.201209017>

- Liao, H., Sun, S., Wang, P., Bi, W., Tan, S., Wei, Z., Mei, X., Liu, D., Raza, W., Shen, Q., & Xu, Y. (2014). A new acidophilic endo- β -1,4-xylanase from *Penicillium oxalicum*: Cloning, purification, and insights into the influence of metal ions on xylanase activity. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(7), 1071–1083. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1453-0>
- Liu, Y., Lyu, Y., Tian, J., Zhao, J., Ye, N., Zhang, Y., & Chen, L. (2021). Review of waste biorefinery development towards a circular economy: From the perspective of a life cycle assessment. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 139). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.110716>
- Lu, H., Shrivastava, M., Whiteway, M., & Jiang, Y. (2021). *Candida albicans* targets that potentially synergize with fluconazole. In *Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 47, Issue 3, pp. 323–337). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1884641>
- Lunkes, J. C., Arfelli, V. C., Bittencourt, J. W. F., Menolli, R. A., Maller, A., Silva, J. L. da C., Simão, R. de C. G., & Kadowaki, M. K. (2019). Purification of a xylanase from *Penicillium crustosum* and its potential use in clarifying fruit juice. In *Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza* 3 (pp. 91–100). Atena Editora. <https://doi.org/10.22533/at.ed.59019270510>
- Mahmoodi, M., Najafpour, G. D., & Mohammadi, M. (2017a). Production of pectinases for quality apple juice through fermentation of orange pomace. *Journal of Food Science and Technology*, 54(12), 4123–4128. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2829-8>
- Mahmoodi, M., Najafpour, G. D., & Mohammadi, M. (2017b). Production of pectinases for quality apple juice through fermentation of orange pomace. *Journal of Food Science and Technology*, 54(12), 4123–4128. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2829-8>
- Malmström, J., Christophersen, C., & Frisvad, J. C. (2000). Secondary metabolites characteristic of *Penicillium citrinum*, *Penicillium steckii* and related species. www.elsevier.com/locate/phytochem
- Manuel Vargas-Canales, J., Laura Guido-López, D., Rodríguez-Haros, B., Isela Bustamante-Lara, T., Huitzilhuil Camacho-Vera, J., & Orozco-Cirilo, S. (2017). Evolution of the specialization and competitiveness of lemon production in Mexico. In *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas* (Vol. 11, Issue 5).
- Martínez-Aispuro, J. A., Figueroa-Velazco, J. L., Cordero-Mora, J. L., Sánchez Torres-Esqueda, M. T., & Martínez-Aispuro, M. (2016). Dietas para cerdos en iniciación incluyendo salvado de trigo y adicionadas con xilanasas. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 4(10), 73. <https://doi.org/10.19136/era.a4n10.996>
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mushimiyimana, I., & Tallapragada, P. (2015). Statistical optimization of cellulase and xylanase enzyme production by *Penicillium crustosum* using sugar beet peel substrate by response surface methodology. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6(1), 1144–1151.
- Naraian, R., & Gautam, R. L. (2017). *Penicillium* enzymes for the saccharification of lignocellulosic feedstocks. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Penicillium System Properties and Applications*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00006-5>
- Núñez-Serrano, A., García-Reyes, R. B., Solís-Pereira, S., & García-González, A. (2024). Production and immobilization of pectinases from *Penicillium crustosum* in magnetic core-shell nanostructures for juice clarification. *International Journal of Biological Macromolecules*, 263, 130268. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130268>
- Núñez-Serrano A.S, García-González Alcione, García-Reyes Refugio B, & Solís-Pereira Sara E. (2021). Producción de pectinasas con un hongo filamentoso e inmovilización en nanoestructuras core-shell de Fe3O4@SiO2 para la clarificación de jugos.
- Okabe, M., Sugita, T., Kinoshita, K., & Koyama, K. (2016). Macrolides from a marine-derived fungus, *Penicillium meleagridum* var. *viridiflavum*, showing synergistic effects with fluconazole against azole-resistant *Candida albicans*. *Journal of Natural Products*, 79(4), 1208–1212. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00019>

- Paini, J., Benedetti, V., Ail, S. S., Castaldi, M. J., Baratieri, M., & Patuzzi, F. (2022). Valorization of wastes from the food production industry: A review towards an integrated agri-food processing biorefinery. *Waste and Biomass Valorization*, 13(1), 31–50. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01467-1>
- Pajerski, W., Ochonska, D., Brzychczy-Wloch, M., Indyka, P., Jarosz, M., Golda-Cepa, M., Sojka, Z., & Kotarba, A. (2019). Attachment efficiency of gold nanoparticles by Gram-positive and Gram-negative bacterial strains governed by surface charges. *Journal of Nanoparticle Research*, 21(8). <https://doi.org/10.1007/s11051-019-4617-z>
- Palou, L. (2014). *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* (Green Mold, Blue Mold). In *Postharvest Decay: Control Strategies*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00002-8>
- Papadaki, E., Kontogiannopoulos, K. N., Assimopoulou, A. N., & Mantzouridou, F. T. (2020a). Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using *Aspergillus niger* in an integrated citric acid-enzymes production process. *Bioresource Technology*, 309. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123317>
- Papadaki, E., Kontogiannopoulos, K. N., Assimopoulou, A. N., & Mantzouridou, F. T. (2020b). Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using *Aspergillus niger* in an integrated citric acid-enzymes production process. *Bioresource Technology*, 309. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123317>
- Pasquina-Lemonche, L., Burns, J., Turner, R. D., Kumar, S., Tank, R., Mullin, N., Wilson, J. S., Chakrabarti, B., Bullough, P. A., Foster, S. J., & Hobbs, J. K. (2020). The architecture of the Gram-positive bacterial cell wall. *Nature*, 582(7811), 294–297. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2236-6>
- Pedrolli, D. B., Monteiro, A. C., Gomes, E., & Carmona, E. C. (2009). Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *The Open Biotechnology Journal*, 3(1), 9–18. <https://doi.org/10.2174/1874070700903010009>
- Pérez, R. H., Álvarez Castillo, A., Olarte Paredes, A., & Salgado Delgado, A. M. (2021). Obtención de nanocelulosa a partir de residuos postcosecha. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencias y Nanotecnología*, 16(30), 1e–47e. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2023.30.69662>
- Plata, K., Rosato, A. E., & Węgrzyn, G. (2009). *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. www.actabp.pl
- Pohl, C., Polli, F., Schütze, T., Viggiano, A., Mózsik, L., Jung, S., de Vries, M., Bovenberg, R. A. L., Meyer, V., & Driessen, A. J. M. (2020). A *Penicillium rubens* platform strain for secondary metabolite production. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64893-6>
- Polanco-Rodriguez, A. G., & Ruiz, D. (2021). Bacterial resistance to antibiotics in groundwater. <https://www.researchgate.net/publication/356123171>
- Poolman, J. T., & Anderson, A. S. (2018). *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: leading bacterial pathogens of healthcare associated infections and bacteremia in older-age populations. In *Expert Review of Vaccines* (Vol. 17, Issue 7, pp. 607–618). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1488590>
- Prajapati, A. S., Panchal, K. J., Pawar, V. A., Noronha, M. J., Patel, D. H., & Subramanian, R. B. (2018). Review on cellulase and xylanase engineering for biofuel production. In *Industrial Biotechnology* (Vol. 14, Issue 1, pp. 38–44). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/ind.2017.0027>
- Prückler, M., Siebenhandl-Ehn, S., Apprich, S., Höltinger, S., Haas, C., Schmid, E., & Kneifel, W. (2014). Wheat bran-based biorefinery 1: Composition of wheat bran and strategies of functionalization. In *LWT* (Vol. 56, Issue 2, pp. 211–221). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.004>
- Raja, N. S. (2021). Epidemiology, risk factors, treatment and outcome of *Candida bloodstream* infections because of *Candida albicans* and *Candida non-albicans* in two district general hospitals in the United Kingdom. *International Journal of Clinical Practice*, 75(1). <https://doi.org/10.1111/ijcp.13655>

- Rančić, A., Soković, M., Karioti, A., Vukojević, J., & Skaltsa, H. (2006). Isolation and structural elucidation of two secondary metabolites from the filamentous fungus *Penicillium ochrochloron* with antimicrobial activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22(1), 80–84. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2005.12.003>
- Riley, L. W. (2020). Extraintestinal foodborne pathogens. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 11, 9. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519>
- Ruiz, H. A., Rodríguez-Jasso, R. M., Rodríguez, R., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. (2012). Pectinase production from lemon peel pomace as support and carbon source in solid-state fermentation column-tray bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 65, 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.03.007>
- Rundberget, T., Skaar, I., O'Brien, O., & Flåøyen, A. (2004a). Penitrem and thomitrem formation by *Penicillium crustosum*. In *Mycopathologia* (Vol. 157).
- Rundberget, T., Skaar, I., O'Brien, O., & Flåøyen, A. (2004b). Penitrem and thomitrem formation by *Penicillium crustosum*. In *Mycopathologia* (Vol. 157).
- SAGARPA. (2017). Trigo grano cristalino y harinero mexicano planeación agrícola nacional.
- Said, S., Fonseca, M. J. V., & Siéssere, V. (1991). Pectinase production by *Penicillium frequentans*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 7(6), 607–608. <https://doi.org/10.1007/BF00452841>
- Saini, R., Saini, J. K., Adsul, M., Patel, A. K., Mathur, A., Tuli, D., & Singhania, R. R. (2015). Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* for bio-ethanol application. *Bioresource Technology*, 188, 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.048>
- Saleem, M., & Saeed, M. T. (2020). Potential application of waste fruit peels (orange, yellow lemon and banana) as wide range natural antimicrobial agent. *Journal of King Saud University - Science*, 32(1), 805–810. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.02.013>
- Santi, L., Beys-da-Silva, W. O., Berger, M., Yates, J. R., Brandelli, A., & Vainstein, M. H. (2020). *Penicillium oxalicum* secretomic analysis identify plant cell wall degrading enzymes important for fruit juice extraction. *Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04688-9>
- Santos, F. A., Carvalho-Gonçalves, L. C. T. de, Cardoso-Simões, A. L. de C., & Santos, S. F. de M. (2021). Evaluation of the production of cellulases by *Penicillium sp.* FSDE15 using corncob and wheat bran as substrates. *Bioresource Technology Reports*, 14. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100648>
- Shabeer, S., Asad, S., Jamal, A., & Ali, A. (2022). Aflatoxin contamination, its impact and management strategies: an updated review. In *Toxins* (Vol. 14, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/toxins14050307>
- Shang, Z., Li, X., Meng, L., Li, C., Gao, S., Huang, C., & Wang, B. (2012). Chemical profile of the secondary metabolites produced by a deep-sea sediment-derived fungus *Penicillium commune* SD-118. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 30(2), 305–314. <https://doi.org/10.1007/s00343-012-1075-1>
- Sharma, K., Mahato, N., & Lee, Y. R. (2019). Extraction, characterization and biological activity of citrus flavonoids. *Reviews in Chemical Engineering*, 35(2), 265–284. <https://doi.org/10.1515/revce-2017-0027>
- Shrestha, S., Rahman, M. S., & Qin, W. (2021). New insights in pectinase production development and industrial applications. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 105, Issue 24, pp. 9069–9087). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11705-0>
- Silva, L. de M. B., Gomes, T. C., Ullah, S. F., Ticona, A. R. P., Hamann, P. R. V., & Noronha, E. F. (2020). Biochemical properties of carbohydrate-active enzymes synthesized by *Penicillium chrysogenum* using corn straw as carbon source. *Waste and Biomass Valorization*, 11(6), 2455–2466. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00589-x>
- Silva, N. F. D. S., Simões, M. R., Knob, A., De Moraes, S. S., Henn, C., Da Conceição Silva, J. L., Simão, R. D. C. G., Maller, A., & Kadowaki, M. K. (2016). Improvement in the bleaching of kraft pulp with xylanase from *Penicillium crustosum* FP 11 isolated from the Atlantic Forest. *Biocatalysis and Biotransformation*, 34(3), 119–127. <https://doi.org/10.1080/10242422.2016.1212849>

- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent.
- Sinitsyn, A. P., Sinitsyna, O. A., Zorov, I. N., & Rozhkova, A. M. (2020). Exploring the capabilities of the *Penicillium verruculosum* expression system for the development of producers of enzymes for the effective degradation of renewable plant biomass: a Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 56(6), 638–646. <https://doi.org/10.1134/S0003683820060162>
- Solis-Pereira, S., Favela-Torres, E., Viniegra-Gonzalez, G., & Gutierrez-Rojas, M. (1993). Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. In *Appl Microbiol Biotechnol* (Vol. 39).
- Sorour, A. A., Ali, S. M., El-Naggar, M. Y., & Olama, Z. A. (2020). Isolation and optimization of cellulase production by *Aspergillus penicillioides* 12 ASZ using experimental design. In *Copyright@ EM International* (Vol. 26).
- Srivastava, N., Srivastava, M., Alhazmi, A., Kausar, T., Haque, S., Singh, R., Ramteke, P. W., Mishra, P. K., Tuohy, M., Leitgeb, M., & Gupta, V. K. (2021). Technological advances for improving fungal cellulase production from fruit wastes for bioenergy application: A review. *Environmental Pollution*, 287. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117370>
- Sudeep, K. C., Upadhyaya, J., Joshi, D. R., Lekhak, B., Chaudhary, D. K., Pant, B. R., Bajgai, T. R., Dhital, R., Khanal, S., Koirala, N., & Raghavan, V. (2020). Production, characterization, and industrial application of pectinase enzyme isolated from fungal strains. *Fermentation*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION6020059>
- Sulyman, A. O., Igundu, A., & Malomo, S. O. (2020). Isolation, purification and characterization of cellulase produced by *Aspergillus niger* cultured on *Arachis hypogaea* shells. *Heliyon*, 6(12). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05668>
- Susana Saval. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro.
- Tajick, M. A., Seid Mohammadkhani, G. H., & Babaeizad, * V. (2014). Identification of some secondary metabolites produced by four *Penicillium* species. In *Mycologia Iranica* (Vol. 1, Issue 2). <http://mi.iranjournals.ir>
- Terrasan, C. R. F., Temer, B., Duarte, M. C. T., & Carmona, E. C. (2010). Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. *Bioresource Technology*, 101(11), 4139–4143. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.011>
- Tokuishi, K., Martins, S., Silva, R. Da, & Gomes, E. (2005). Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. 40, 2885–2889. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.01.008>
- Troiano, D., Orsat, V., & Dumont, M. J. (2020). Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 117). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109472>
- Uçkun Kiran, E., Trzcinski, A. P., Ng, W. J., & Liu, Y. (2014). Enzyme production from food wastes using a biorefinery concept. In *Waste and Biomass Valorization* (Vol. 5, Issue 6, pp. 903–917). Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/s12649-014-9311-x>
- Vaishnav, N., Singh, A., Adsul, M., Dixit, P., Sandhu, S. K., Mathur, A., Puri, S. K., & Singhania, R. R. (2018). *Penicillium*: The next emerging champion for cellulase production. In *Bioresource Technology Reports* (Vol. 2, pp. 131–140). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.04.003>
- Valladares-Diestra, K. K., Porto de Souza Vandenberghe, L., & Soccol, C. R. (2021). A biorefinery approach for enzymatic complex production for the synthesis of xylooligosaccharides from sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 333. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125174>
- Valle-Pérez, A. U., Flores-Cosío, G., & Amaya-Delgado, L. (2021). Bioconversion of agave bagasse to produce cellulases and xylanases by *Penicillium citrinum* and *Aspergillus fumigatus* in solid-state fermentation. *Waste and Biomass Valorization*, 12(11), 5885–5897. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01397-y>

- Vila, J., Moreno-Morales, J., & Ballesté-Delpierre, C. (2020). Current landscape in the discovery of novel antibacterial agents. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 26, Issue 5, pp. 596–603). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.09.015>
- Vries, R. P. De, Jansen, J., Aguilar, G., Par, L., Joosten, V., Wu, F., Benen, J. A. E., & Visser, J. (2002a). Expression profiling of pectinolytic genes from *Aspergillus niger*. *FEBS Letters*, 530, 41–47.
- Vries, R. P. de, Jansen, J., Aguilar, G., Par, L., Joosten, V., Wu, F., Benen, J. A. E., & Visser, J. (2002b). *Expression profiling of pectinolytic genes from Aspergillus niger*. 530.
- Wang, W. (2000). Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 203). www.elsevier.com/locate/ijpharm
- Wolf-Márquez, V. E., Martínez-Trujillo, M. A., Aguilar Osorio, G., Patiño, F., Álvarez, M. S., Rodríguez, A., Sanromán, M. Á., & Deive, F. J. (2017). Scaling-up and ionic liquid-based extraction of pectinases from *Aspergillus flavipes* cultures. *Bioresource Technology*, 225, 326–335. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.067>
- Xiong, W., Yang, J. K., Chen, F. yuan, & Han, Z. gang. (2017). The catalytic domain of *Penicillium crustosum* endoglucanase EGL1 has cellulose-binding capacity and cellulolytic activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 97, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.11.007>
- Xu, Z., Xie, J., Soteyome, T., Peters, B. M., Shirliff, M. E., Liu, J., & Harro, J. M. (2019). Polymicrobial interaction and biofilms between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*: an underestimated concern in food safety. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 26, pp. 57–64). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.03.006>
- Yu, G., Sun, Z., Peng, J., Zhu, M., Che, Q., Zhang, G., Zhu, T., Gu, Q., & Li, D. (2019a). Secondary metabolites produced by combined culture of *Penicillium crustosum* and a *Xylaria* sp. *Journal of Natural Products*, 82(7), 2013–2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00345>
- Yu, G., Sun, Z., Peng, J., Zhu, M., Che, Q., Zhang, G., Zhu, T., Gu, Q., & Li, D. (2019b). Secondary metabolites produced by combined culture of *Penicillium crustosum* and a *Xylaria* sp. *Journal of Natural Products*, 82(7), 2013–2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00345>

ANEXOS

Tabla ANEXO 1. Análisis de varianza del modelo cuadrático ajustado para la producción de pectinasas

	SS	df	SM	Valor de F	Valor de p	
Modelo	2.545E+06	9	2.828E+05	5.15	0.0086	significativo
X_1	296.00	1	296.00	0.00	0.9429	
X_2	7.727E+05	1	7.727E+05	14.07	0.0038	
X_3	243.86	1	243.86	0.00	0.9482	
X_1X_2	27785.87	1	27785.87	0.50	0.4932	
X_1X_3	38955.40	1	38955.40	0.70	0.4194	
X_2X_3	26431.59	1	26431.59	0.48	0.5037	
X_1^2	1.325E+05	1	1.325E+05	2.41	0.1514	
X_2^2	2.112E+05	1	2.112E+05	3.85	0.0783	
X_3^2	87026.12	1	87026.12	1.58	0.2367	
Residual	5.493E+05	10	54930.65			No significativo
Falta de ajuste	2.468E+05	5	49358.55	0.81	0.5857	
Error	3.025E+05	5	60502.75			
Cor Total	3.094E+06	19				

Tabla ANEXO 2. Análisis de varianza del modelo cuadrático ajustado para la producción de xilanasas

	SS	df	MS	F-value	p-value	
Modelo	3.463E+05	14	24733.12	43.19	< 0.0001	Significativo
X_1	1407.26	1	1407.26	2.46	0.137	
X_2	60.18	1	60.18	0.10	0.750	
X_3	2.91	1	2.91	0.00	0.944	
X_4	684.17	1	684.17	1.19	0.291	
X_1X_2	135.58	1	135.58	0.23	0.633	
X_1X_3	47.74	1	47.74	0.08	0.776	
X_1X_4	35.07	1	35.07	0.06	0.807	
X_2X_3	13.18	1	13.18	0.02	0.881	
X_2X_4	745.45	1	745.45	1.30	0.271	
X_3X_4	3.70	1	3.70	0.00	0.937	
X_1^2	56624.77	1	56624.77	98.88	< 0.0001	
X_2^2	3311.66	1	3311.66	5.78	0.029	
X_3^2	5496.37	1	5496.37	9.60	0.007	
X_4^2	146.82	1	146.82	0.25	0.620	
Residual	8590.04	15	572.67			No significativo
Falta de ajuste	7332.06	10	733.21	2.91	0.1247	
Error	1257.98	5	251.60			
Cor Total	3.549E+05	29				

Tabla ANEXO 3. Análisis de varianza del modelo cuadrático ajustado para la producción de celulasas

	SS	df	MS	F-value	p-value	
Modelo	3718.63	9	413.18	27.55	< 0.0001	Significativo
X_1	2804.83	1	2804.83	187.03	< 0.0001	
X_2	37.49	1	37.49	2.50	0.144	
X_3	7.66	1	7.66	0.51	0.491	
X_1X_2	19.23	1	19.23	1.28	0.283	
X_1X_3	0.53	1	0.53	0.03	0.854	
X_2X_3	3.09	1	3.09	0.20	0.659	
X_1^2	725.72	1	725.72	48.39	< 0.0001	
X_2^2	0.60	1	0.60	0.04	0.844	
X_3^2	155.52	1	155.52	10.37	0.009	
Residual	149.97	10	15.00			No significativo
Falta de ajuste	53.20	5	10.64	0.54	0.736	
Error	96.77	5	19.35			
Cor Total	3868.59	19				