

APROXIMACIÓN DE DISEÑO DE UN BIOPROCESO A ESCALA DE LABORATORIO PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA MEDIANTE CULTIVO DEL HONGO ENDOFITICO *Diaporthe sajoë*

DESIGN APPROACH OF A LABORATORY SCALE BIOPROCESS FOR OBTAINING RAW EXTRACTS WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY THROUGH THE ENDOPHYTIC FUNGUS CULTIVATION *Diaporthe sajoë*

Karin Parra Rosero*, Lorena Zúñiga Jaramillo**, Nelson Caicedo Ortega***

RESUMEN

Los hongos endófitos filamentosos son de gran interés para la generación de nuevas moléculas con acción antimicrobiana, pero las condiciones para su desarrollo en cultivos sumergidos y configuraciones de biorreactor han sido muy poco estudiadas. Especialmente, el cultivo sumergido del hongo *Diaporthe sajoë* que se ha identificado como productor de extractos crudos con acción antimicrobiana en el Valle del Cauca, pero no se ha estudiado su producción en sistemas fermentativos. En función de lo anterior, se plantearon fermentaciones sumergidas en tanque agitado y columna de burbujeo con medio YMG que permitieron definir la mejor configuración de biorreactor para obtener extractos crudos extracelulares e intracelulares con actividad antimicrobiana. Utilizando la cepa fúngica *Diaporthe sajoë* ET-28 para las fermentaciones en sumergido y ejecutando operaciones de downstream a escala de laboratorio para la separación y purificación de los extractos crudos se determinaron los rendimientos de producción y se evaluó la acción de inhibir el 50% del crecimiento (CI_{50}) de los microorganismos evaluados por medio del método de microdilución en caldo y lectura de densidad óptica. De manera que, los mejores rendimientos de producción se alcanzaron con los extractos obtenidos intracelularmente. Asimismo, el extracto intracelular obtenido de la columna de burbujeo presentó la mejor acción inhibitoria sobre *Staphylococcus aureus* con 0.54 ± 0.62 mg/mL y el extracto intracelular obtenido del tanque agitado con 19.68 ± 1.45 mg/mL sobre la levadura *Candida albicans*. Además, se determinó que la columna de burbujeo fue la mejor configuración de biorreactor a partir del CI_{50} , pero se recomienda continuar con los ensayos evaluando el efecto de las configuraciones de biorreactor sobre estos extractos crudos de interés para propiciar una correcta validación del diseño de bioproceso presentado.

Palabras clave: Fermentación sumergida, Tanque agitado, Columna de burbujeo, *Diaporthe sajoë*, actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

Filamentous endophytic fungi are of great interest for the generation of new molecules with antimicrobial action, but the conditions for their development in submerged cultures and bioreactor configurations haven't been studied enough. Especially, the submerged culture of the fungus *Diaporthe sajoë*, which has been identified as a producer of crude extracts with antimicrobial action in Valle del Cauca, Colombia. But its production in fermentation systems hasn't been studied. Based on the above, submerged fermentations were proposed in a stirred tank and bubble column with YMG medium that allowed the definition of the best bioreactor configuration to obtain extracellular and intracellular crude extracts with antimicrobial activity. Using the fungal strain *Diaporthe sajoë* ET-28 for

submerged fermentations and executing downstream operations on a laboratory scale for the separation and purification of the crude extracts, the production yields were determined and the action of inhibiting 50% of the growth was evaluated on the microorganisms of interest by means of the broth microdilution method and optical density reading. Thus, the best production yields were achieved with the extracts obtained intracellularly. Likewise, the obtained column bubbles intracellular extract presented the best inhibitory action on *Staphylococcus aureus* with 0.54 ± 0.62 mg/mL and the obtained stirred tank intracellular extract with 19.68 ± 1.54 mg/mL on the yeast *Candida albicans*. In addition, it was determined that the bubble column was the best bioreactor configuration from the IC_{50} , but it is recommended to continue with the trials evaluating the effect of the bioreactor configurations on these crude extracts of interest to promote a correct validation of the bioprocess design presented.

* Estudiante de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Icesi. Santiago de Cali. Karin.parra@u.icesi.edu.co

** Estudiante de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Icesi. Santiago de Cali. Cindy.zuniga@u.icesi.edu.co

*** Jefe y profesor del departamento de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Icesi. Santiago de Cali. nhcaicedo@icesi.edu.co

Keywords: Submerged fermentation, Stirred tank, Bubble column, *Diaporthe sajoe*, antimicrobial activity.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la resistencia a los agentes antimicrobianos representa una de las 10 principales amenazas para la salud pública (World Health Organization: WHO, 2020). Durante las últimas décadas la resistencia frente a los agentes antimicrobianos ha generado que el número de nuevos antibióticos para comercializar disminuya progresivamente, lo que ha provocado una reducción del 75% en la disponibilidad de nuevos antibióticos en el mundo (Medina, 2014, pág. 35). Además, de un incremento en el número de personas afectadas a nivel mundial debido a cepas capaces de evadir la acción de las sustancias biocidas (Quiñones Pérez, 2017. Pág. 12).

En este orden de ideas, para afrontar la emergente situación de microorganismos resistentes y la disminución en el descubrimiento de nuevos antibióticos para contenerlos, continúa siendo una alternativa la producción de nuevos principios activos a partir de agentes biológicos, como los hongos endófitos, microorganismos saprofitos que han demostrado ser excelentes productores de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (Liu et al., 2017; Dhakshinamoorthy et al., 2021; de Souza et al., 2015; Souza et al., 2017). Usualmente, estos microorganismos toman nutrientes y protección de una planta hospedera y algunos de ellos en retribución pueden desempeñar un papel mutualista, es decir, pueden beneficiarlo al inducir su crecimiento, aumentar su tolerancia al estrés y producir metabolitos secundarios con amplia diversidad estructural que le brindan protección y resistencia contra herbívoros y/o microorganismos fitopatógenos (Sánchez-Fernández et al., 2013). La variedad de metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos es tan amplia que se distribuye entre ácidos orgánicos, polisacáridos, enzimas, reguladores del crecimiento de las plantas, alcaloides, pigmentos, micotoxinas y antibióticos (El-Enshasy, H. A., 2007). En particular, una capacidad fascinante para producir grandes cantidades de proteínas, metabolitos y ácidos orgánicos en su medio de crecimiento. Sin embargo, son escasos los estudios que establecen cuál es el modo de acción y cuáles son los compuestos antimicrobianos implicados, por lo que, el estudio químico y biológico de la interacción hongo-hospedero ha conducido al descubrimiento de metabolitos secundarios bioactivos estructuralmente diversos y novedosos a partir de diversas especies de hongos endófitos.

Especialmente el género *Diaporthe spp.* que se describe a menudo como productor de enzimas y metabolitos secundarios como principios activos para formulación de antibióticos. A partir de una fermentación sumergida de *Diaporthe schini* en matraces Erlenmeyers Dos Reis et al. (2019) identificaron la producción de extractos crudos extracelulares con acción antimicrobiana para bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y *Candida krusei*. También, Dhakshinamoorthy et al. (2021) demostraron que el hongo endofítico *Diaporthe coatingensis* produce extractos crudos extracelulares con potencial antibacteriano a una concentración más baja de 12.5 a 25 µg / ml sobre las bacterias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus lactis* y *Escherichia coli*. Además, la cepa ET-028 de *Diaporthe sajoe* ha sido reportado por Charria et al. (2021) como productor de extractos crudos extracelulares e intracelulares con acción antibacteriana frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

De acuerdo con lo anterior, hay diferentes reportes sobre la obtención de extractos crudos intracelulares y extracelulares a partir de fermentaciones sumergidas del género *Diaporthe spp.* Estos se han llevado a cabo a escala de laboratorio en matraces Erlenmeyer con sistemas de agitación y control de temperatura con un volumen máximo de 250 mL, sin embargo, se sabe poco sobre la producción de dichos extractos en fermentaciones sumergidas utilizando diferentes configuraciones de biorreactor como tanques agitados, columnas de burbujeo, reactor de lecho fluidizado, etc.

No obstante, las configuraciones de biorreactor para el cultivo de microorganismos son uno de los principales aspectos a considerar en estos procesos, especialmente para el cultivo de hongos filamentosos donde el interés radica en su desarrollo o, ya sea, la obtención de moléculas que conformen un producto de valor agregado. Estas configuraciones tienen un efecto único sobre el crecimiento de células fúngicas filamentosas por la amplia variabilidad que presentan en su respuesta fisiológica (morfología) en función de cambios en variables de procesos como la agitación y aireación entre otros (El-Enshasy, 2007).

Así que, con la búsqueda de nuevos agentes biológicos para la producción de compuestos con actividad antimicrobiana en este trabajo se plantearon diseños experimentales donde se evaluó la configuración de biorreactor que permitiera la producción de moléculas de interés con acción antimicrobiana. Por lo anterior, se estudió la configuración de biorreactor entre un tanque agitado y una columna de burbujeo que fuese adecuada para la fermentación del hongo *Diaporthe sajoë* para la obtención de extractos crudos extracelulares e intracelulares que inhiban los mecanismos de defensa desarrollados por cepas de *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, las cuales presentan elevadas tasas de resistencia a los antibióticos más comúnmente usados en el tratamiento de enfermedades e infecciones (Margarita, L. Et al. 2019).

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Para el desarrollo experimental se empleó el hongo *Diaporthe sajoe* ETB-28 obtenido de la colección de hongos del semillero EBB (Ecología, bioprospección y bioprocesos) de la Universidad Icesi. También, para la evaluación de la actividad antimicrobiana se empleó la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y la levadura *Candida albicans* ATCC 10231.

Desarrollo de inóculo

El microorganismo en placa de Petri (cultivo de trabajo), crecido (29°C durante 7 días) sobre medio agar YMG: Glucosa (4g/L), Extracto de levadura (4g/L), Extracto de malta (10g/L), se obtuvo de un tubo de ensayo con agar inclinado de Papa-Dextrosa-Agar (PDA) y aceite mineral conservado a temperatura ambiente del cual se tomó una alícuota con asa microbiológica. Como inóculo se transfirieron 2mL de una solución acuosa (Tween al 0,01% (v/v)) con pedazos de micelio del cultivo de trabajo. Las unidades experimentales finales se conformaron de Erlenmeyer de 250mL con 80mL de medio YMG a la misma composición y se mantuvo en un agitador orbital (Shacker Actum, Medellín, Colombia) a 90 rpm, 29°C, durante 3 días.

Fermentación

La fermentación para obtener los extractos crudos extracelulares e intracelulares se llevó a cabo en cultivos sumergidos bajo estrategia de lotes en (i) reactores de tanque agitado (Applikon, Delft, Holanda) de 500mL y (ii) Columna de burbujeo de 450mL conteniendo ambos 350mL de volumen de medio de cultivo (90% v/v) y 10% (v/v) de inóculo. El medio nutritivo fue el YMG con la misma composición citada anteriormente y bajo las condiciones de temperatura a 29°C para ambas configuraciones de biorreactor.

La fermentación en el tanque agitado (**Figura 1**) tuvo una duración de 11 días con 3 días de inanición de la fuente de carbono (starvation), además se configuró la agitación en 40 rpm, 1 vvm y control de nivel y de temperatura, en el cual para ambas fermentaciones el elemento final de control correspondió a una Celda Peltier.

La fermentación en la columna de burbujeo (**Figura 2**) tuvo una duración de 11 días con 3 días de inanición y se acondiciono una malla de acero inoxidable que tiene como función dar soporte, pues se relaciona que al ser un hongo filamentosos y endofítico que demanda de un organismo hospedador y en cultivos se adhiere a las paredes, elementos y sensores de los equipos, requería de un elemento en el cual se pudiera 'enredar' y evitar conglomeraciones de este, 0.2 vvm y control de espuma y temperatura. También se realizó seguimiento de posible contaminación en las configuraciones de biorreactor por medio de los métodos de tinción de gram y frescos del medio.

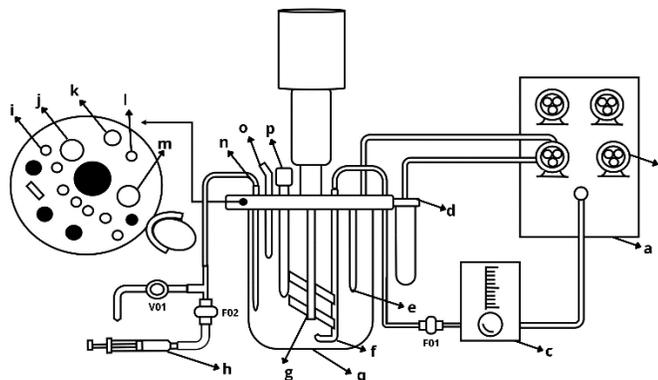


Figura 1. Esquema básico de configuración de tanque agitado. a.Consola de control PLC b.Bombas peristálticas de alimentación c.Rotámetro d. Frasco suministro de antiespumante e.Termocupla f.Suministro de aire g.Agitador h.Jeringa de succión (Sistema de muestreo) i.Orificios de suministro j.Orificio para sensor de pH k.Orificio para condensador l.Orificio para termocupla m.Orificio para sensor de oxígeno disuelto n. Línea de muestreo o.Sensor de nivel p. Sensor de pH q.Tanque agitado

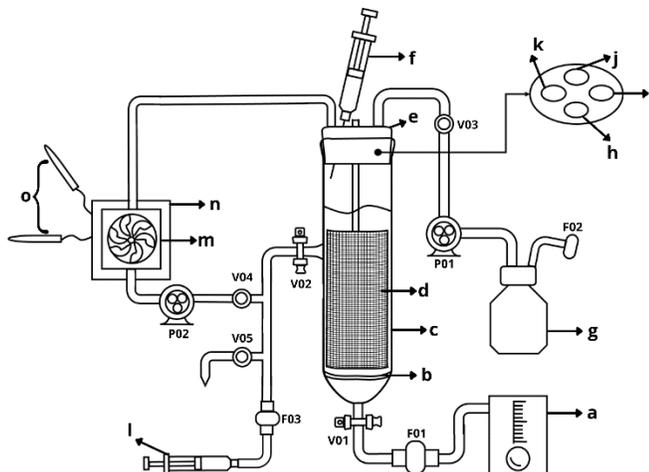


Figura 2. Esquema básico de configuración de columna de burbujeo. a.Rotámetro b.Frita de distribución de aire c.Columna de vidrio d.Malla de soporte e.Tapón columna f.Jeringa suministro de antiespumante g.Recipiente suministro de medio h.Orificio para malla y sensor de temperatura i.Orificio para condensador j.Orificio para alimentación de medio k.Orificio para recirculación l.Jeringa suministro de succión (Sistema de muestreo) m.Sistema de celda Peltier (Control de temperatura) n.Circuito eléctrico para sistema de celda Peltier o.Sensores de temperatura

Obtención de los extractos extracelulares

Una vez terminadas las fermentaciones se realizaron filtraciones empleando filtros cualitativos y cuantitativos con un tamaño de retención de partículas de 8 y 3 μ m para la respectiva separación de la biomasa del medio exhausto. El filtrado se concentró en un roto evaporador a 45 °C, 40mbar y 3 rpm. Posteriormente, la solución concentrada se mezcló con acetato de etilo (EtOH) por 24 horas a temperatura ambiente, con agitación manual cada 20 minutos durante al menos 10 horas, en una proporción 1:1 (w/w) en un embudo de decantación. Finalmente, la fase orgánica obtenida se roto evaporó hasta 5mL bajo las mismas condiciones y fue llevada a un proceso de secado (horno al vacío OV-12 Lab companion, a 40 °C y -0.08mbar), finalmente en una centrifuga al vacío (Eppendorf SE) hasta obtener el extracto crudo seco.

Obtención de extractos intracelulares

Obtenido el micelio después de la fermentación, se siguió la metodología propuesta por (Charria, Et al. 2021). Inicialmente el micelio se sometió a una etapa de ruptura celular por medio de una maceración y disrupción mecánica con esferas de vidrio, seguida de una digestión química en baño ultrasónico con acetona en proporción 1:1 (w/w) por 1 h. Posteriormente, se realizó una extracción sólido-líquido en el equipo Soxhlet con acetona en relación 1:10 (w/w) por 1 hora, la fase líquida obtenida se dejó evaporando por 2 días en una cabina de extracción, luego se mezcló con la acetona resultante del baño ultrasónico para ser sometida a una extracción orgánica con EtOH en proporción 1:1 (w/w) en un embudo de decantación por 4 h. La biomasa resultante se sometió a las mismas condiciones que la fase líquida con EtOH en proporción 1:5 (w/w). La fase orgánica de ambas extracciones se mezcló y dejaron decantar, obteniendo una fase orgánica que se roto evaporó y seco a las mismas condiciones y procesos para el extracto extracelular crudo seco.

Evaluación de la actividad antimicrobiana

La acción antimicrobiana de los extractos crudos se determinó por medio de la técnica de microdilución en caldo frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Candida albicans* ATCC 10231. Se prepararon placas de microplatos de 96 pozos con soluciones de extractos crudos en 6 diluciones. Para obtener estas soluciones, los extractos secos se mezclaron en DMSO 1% (v/v) + metanol 99% (v/v) para obtener una suspensión diluida de los mismos. Paralelo a esto, la cepa bacteriana de referencia se reactivó en caldo YM tomando 100 µL de un criovial incubado a 37 °C y 150 rpm durante 20 horas. Seguido a esto, se realizó una siembra por agotamiento en agar YMG durante 20 horas a 37 °C. Con esto se tomó una colonia que fue suspendida en 10mL de solución salina al 0.9%, esta suspensión se diluyó hasta obtener absorbancias en el rango de 0.08 - 0.1 a 620 nm. La cepa fúngica se reactivó en medio líquido YM a 28 °C y 150 rpm durante 24 horas, seguido de una dilución en solución salina al 0,9% para obtener absorbancias en el rango de 0.08 - 0.9 a 570nm. Las placas de ensayo fueron leídas en el lector de microplacas Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX.

Análisis estadístico

La diferencia significativa de los rendimientos de producción entre las configuraciones se analizó estadísticamente por medio del programa estadístico *MINITAB 19* donde se ejecutó un ANOVA para conocer la variación de los rendimientos de producción. También, el procesamiento de datos para la determinación del CI50 de los extractos crudos intracelulares y extracelulares se realizó usando el software R (Charria et al., 2021).

RESULTADOS

Fermentación de Diaporthe sajoe en tanque agitado y columna de burbujeo y recuperación de los extractos orgánicos crudos

La **Figura 3** ejemplifica los primeros ensayos realizados en las configuraciones de biorreactor. Estos cultivos fermentativos exhibieron cambios colorimétricos en el medio, en los que, a través de la tonalidad original del caldo, amarillo translucido, se fue oscureciendo de naranja a rojo pardo o marrón en los últimos días de fermentación. Hasta el momento se desconocen las reacciones o compuestos que generen este fenómeno y si presenta correlación alguna con la producción de los metabolitos de interés. Así mismo, se evidenció que la ocurrencia de estos cambios se da en momentos diferentes durante ambas fermentaciones, puesto que, para el tanque agitado, la tonalidad rojo pardo se presenta alrededor de tres días transcurridos y para la columna de burbujeo después de seis días. Además, en las fermentaciones realizadas en el tanque agitado se observó un cambio colorimétrico en la biomasa producida que pasa de un color blanco crema a color negro después de algunos días de fermentación. Los hongos filamentosos comúnmente muestran diferentes respuestas fisiológicas (cambios en morfología) como respuesta a diferentes condiciones operacionales incluidas la agitación (Espinosa-Ortiz et al., 2016).

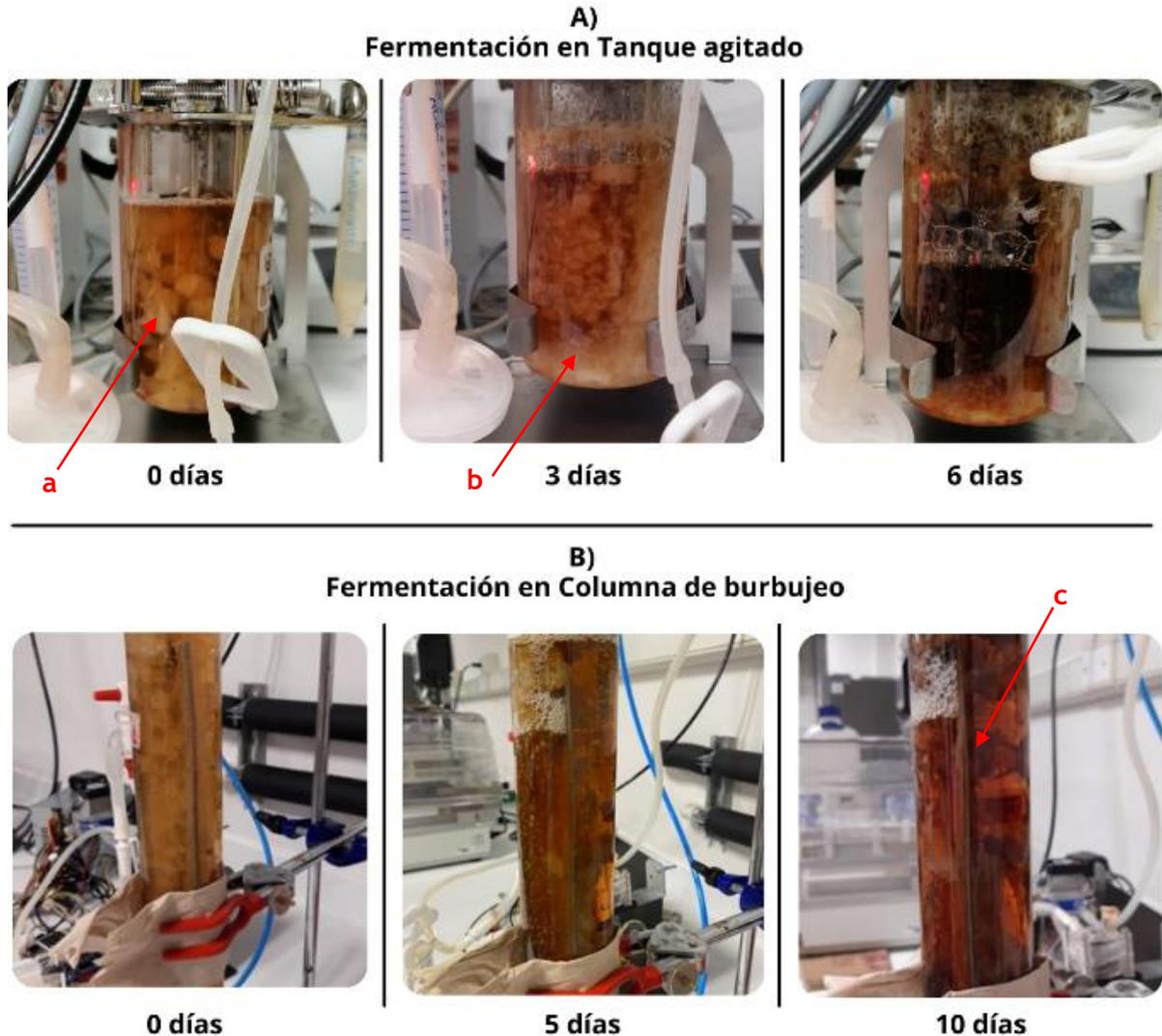


Figura 3. Cambios colorimétricos y morfológicos en las configuraciones de biorreactor del cultivo fermentativo de *Diaporthe sajoe* para la obtención de extractos orgánicos crudos.
a) Morfología en forma de pellets a los 0 días. b) Morfología en forma de micelio disperso a los 3 días. c) Crecimiento y adaptación del hongo sobre la malla metálica.

La **Figura 4** presenta el promedio de la masa de extracto orgánico crudo recuperado del medio de cultivo fermentado (ECE) y de la biomasa húmeda (ECI) de *Diaporthe sajoe*, donde para ambas configuraciones de biorreactor la obtención de los extractos localizados intracelularmente es mayor a aquellos localizados extracelularmente. Además, el promedio de las tres muestras analizadas para cada configuración de biorreactor indica que hubo mayor producción de extractos crudos orgánicos en la columna de burbujeo.

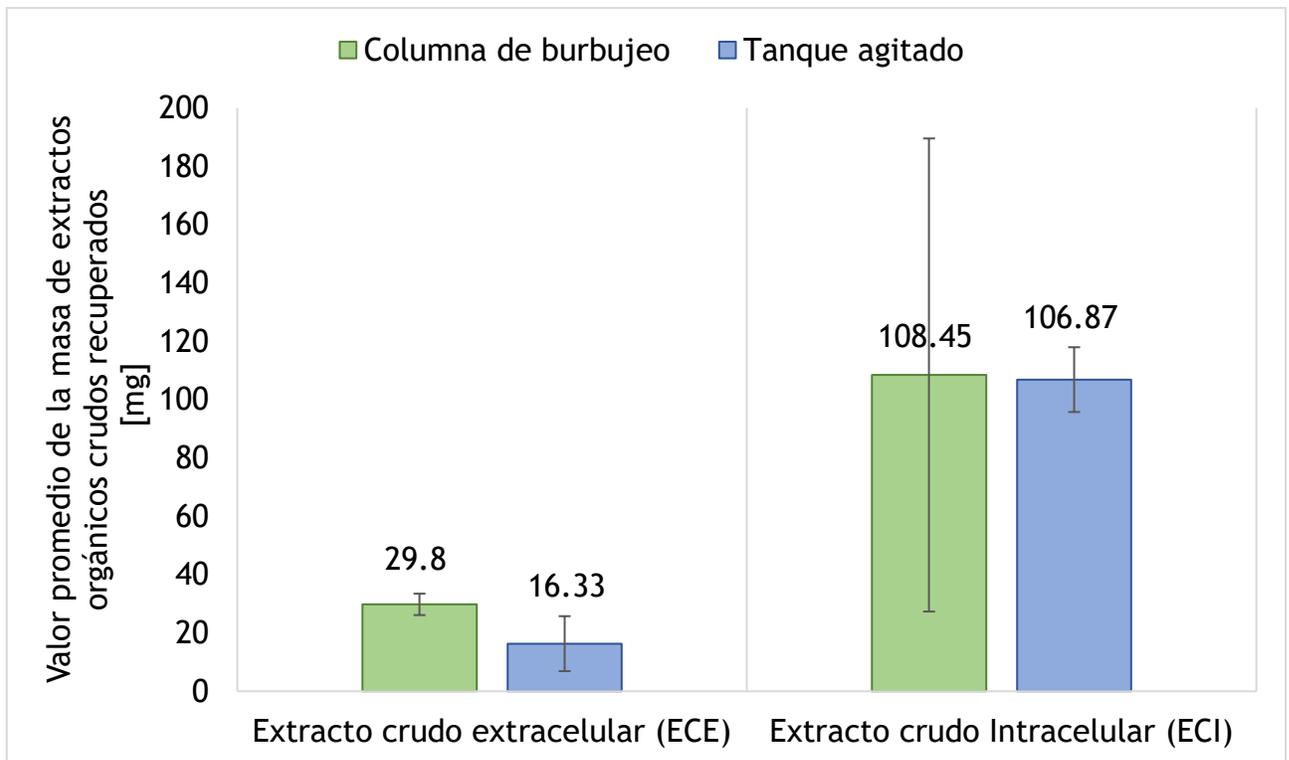


Figura 4. Masa de extractos orgánicos crudos intracelulares y extracelulares recuperados a partir de la biomasa húmeda (*Diaporthe sajoe*) formada y el medio de cultivo fermentado en diferentes configuraciones de biorreactores: Columna de burbujeo (28.55 - 29 °C, 0.28 vvm), Tanque agitado (27 - 30 °C, 1vvm). Valor promedio (n=3).

Consecuentemente la **Figura 5** demuestra que los rendimientos de recuperación de los extractos orgánicos crudos basados en la biomasa húmeda de *Diaporthe sajoe* son más altos para aquellos obtenidos intracelularmente y los mejores rendimientos se asocian a la fermentación llevada a cabo en la configuración de tanque agitado.

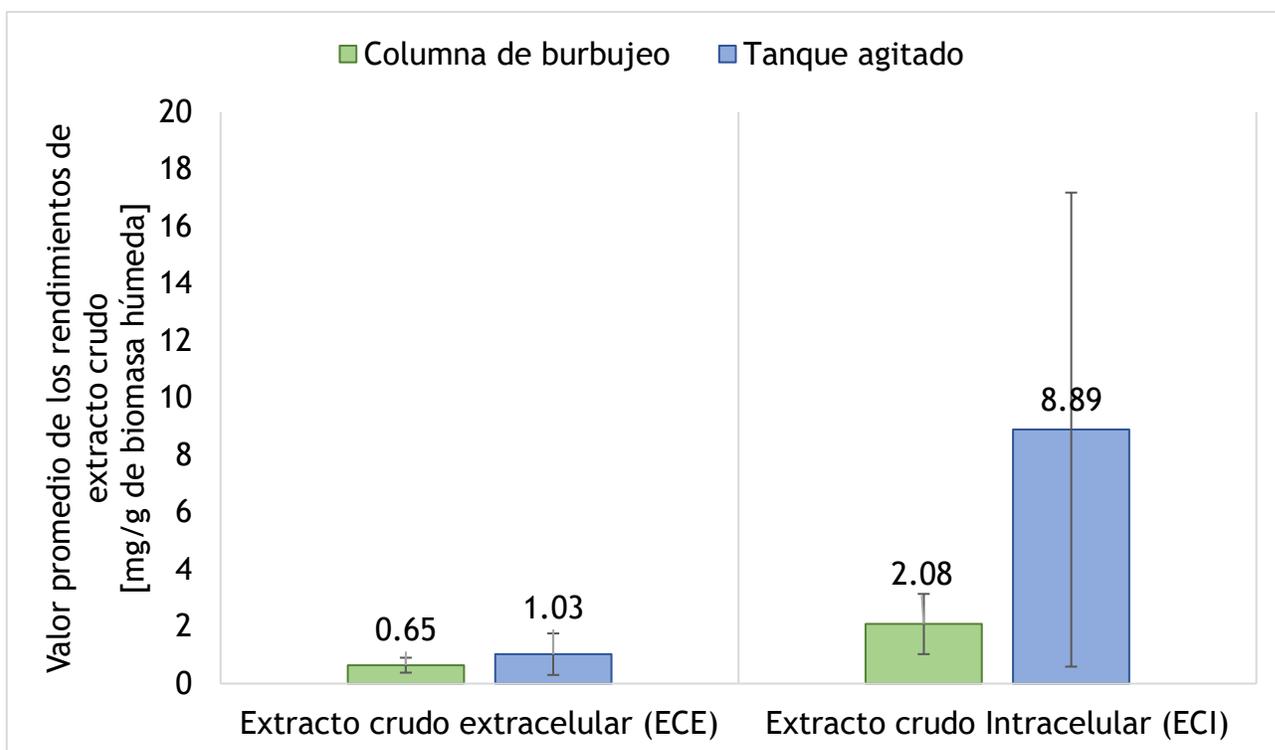


Figura 5. Rendimientos de recuperación de extractos orgánicos crudos extracelulares e intracelulares basados en la biomasa húmeda (*Diaporthe sajoe*) formada en diferentes configuraciones de biorreactores: Columna de burbujeo (28.55 - 29 °C, 0.28 vvm), Tanque agitado (27 - 30 °C, 1vvm), Valor promedio (n=3).

Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos orgánicos crudos

La **Tabla 1** muestra los resultados obtenidos en la evaluación de actividad antimicrobiana por medio de la técnica de micro dilución en caldo, donde se evaluaron los extractos crudos obtenidos de la fermentación con *Diaporthe sajoe* en las dos configuraciones de biorreactor: Columna de burbujeo y Tanque agitado, frente a dos microorganismos patógenos *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Los valores obtenidos muestran mejores resultados contra la bacteria gram positiva al inhibir el 50% de la población bacteriana.

Tabla 1. Máxima concentración de extractos orgánicos crudos obtenidos de la fermentación de *Diaporthe sajoe* en configuraciones de biorreactor (Columna de burbujeo y tanque agitado) para inhibir el crecimiento del 50% de la población microbiana. Valor promedio (n=3).

| Extractos | Concentración CI_{50} [mg/mL] | |
|-----------|---------------------------------|------------------------------|
| | <i>Candida albicans</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| C-I-O | >30 | 0.54 ± 0.62 |
| C-E-O | 20.46 ± 3.89 | 16.49 ± 10.41 |
| T-I-O | 19.68 ± 1.45 | 11.02 ± 5.81 |
| T-E-O | 23.95 ± 3.08 | >30 |

Los nombres designados a los extractos que se despliegan en la tabla 4 han sido denominados a partir de la siguiente nomenclatura: T/C - E/I - O . #

T/C (T:Tanque agitado, C:Columna de burbujeo): Tipo de configuración de biorreactor donde se cultivó el hongo). E/I (E: Extracelular, I:Intracelular): Localización de los extractos crudos en el cultivo. O: Fase de donde se purificaron los extractos. Fase Orgánica. #: Número de ensayo o fermentación de donde obtuvieron los extractos crudos.

Evaluación del efecto de la temperatura sobre los rendimientos de recuperación y actividad antimicrobiana de extractos orgánicos crudos de interés

Ahora bien, debido a la dificultad de validar el diseño de bioproceso por falta de tiempo para ejecutar como mínimo 2 fermentaciones, se decidió conocer el efecto que podría tener la temperatura sobre los rendimientos de producción de los extractos crudos con actividad antimicrobiana en la columna de burbujeo, estos resultados se muestran en la **Tabla 2**. Los resultados para el ensayo 1 corresponden a un control de temperatura de 26 °C y el ensayo 2 corresponde a 29 °C.

Tabla 2. Rendimientos de los extractos crudos extracelulares ($Y_{pE/x}$) e intracelulares ($Y_{pl/x}$) con base en la biomasa húmeda formada a lo largo del cultivo de *Diaporthe sajoe* en un biorreactor tipo columna de burbujeo a diferentes temperaturas durante la fase de inanición por fuente de carbono.

| Temperatura de cultivo | Δ Biomasa húmeda [g] | $Y_{pE/x}$ [mg/g] | $Y_{pl/x}$ [mg/g] |
|------------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|
| 26 C | 59.2 | 1.36 | 1.40 |
| 29 C | 52.1 | 1.19 | 1.42 |

La **Figura 6** demuestra la capacidad máxima inhibitoria de los extractos orgánicos crudos para inhibir el crecimiento del 50% de la población microbiana de *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, obtenidos extracelular e intracelularmente del cultivo de *Diaporthe sajoe* a 26 °C y 29 °C.

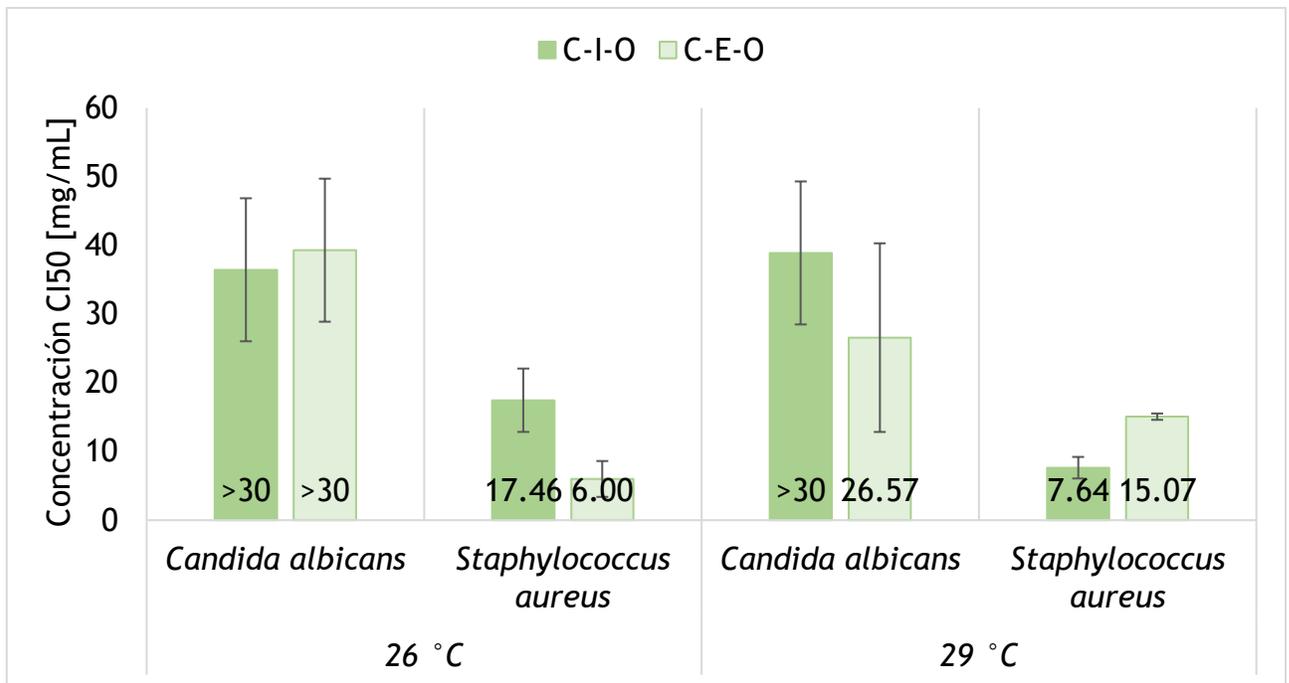


Figura 6. Máxima concentración inhibitoria sobre el 50% de la población microbiana patógena de los extractos crudos extracelulares (C-E-O) e intracelulares (C-I-O) del cultivo de *Diaporthe sajoe* en un biorreactor tipo columna de burbujeo a diferentes temperaturas.

Diseño básico de bioproceso

A continuación, se presenta a través de un diagrama de bloques el diseño de bioproceso que describe la metodología planteada para la obtención de extractos crudos extracelulares e intracelulares mediante la fermentación del hongo *Diaporthe sajoe* en una configuración de biorreactor.

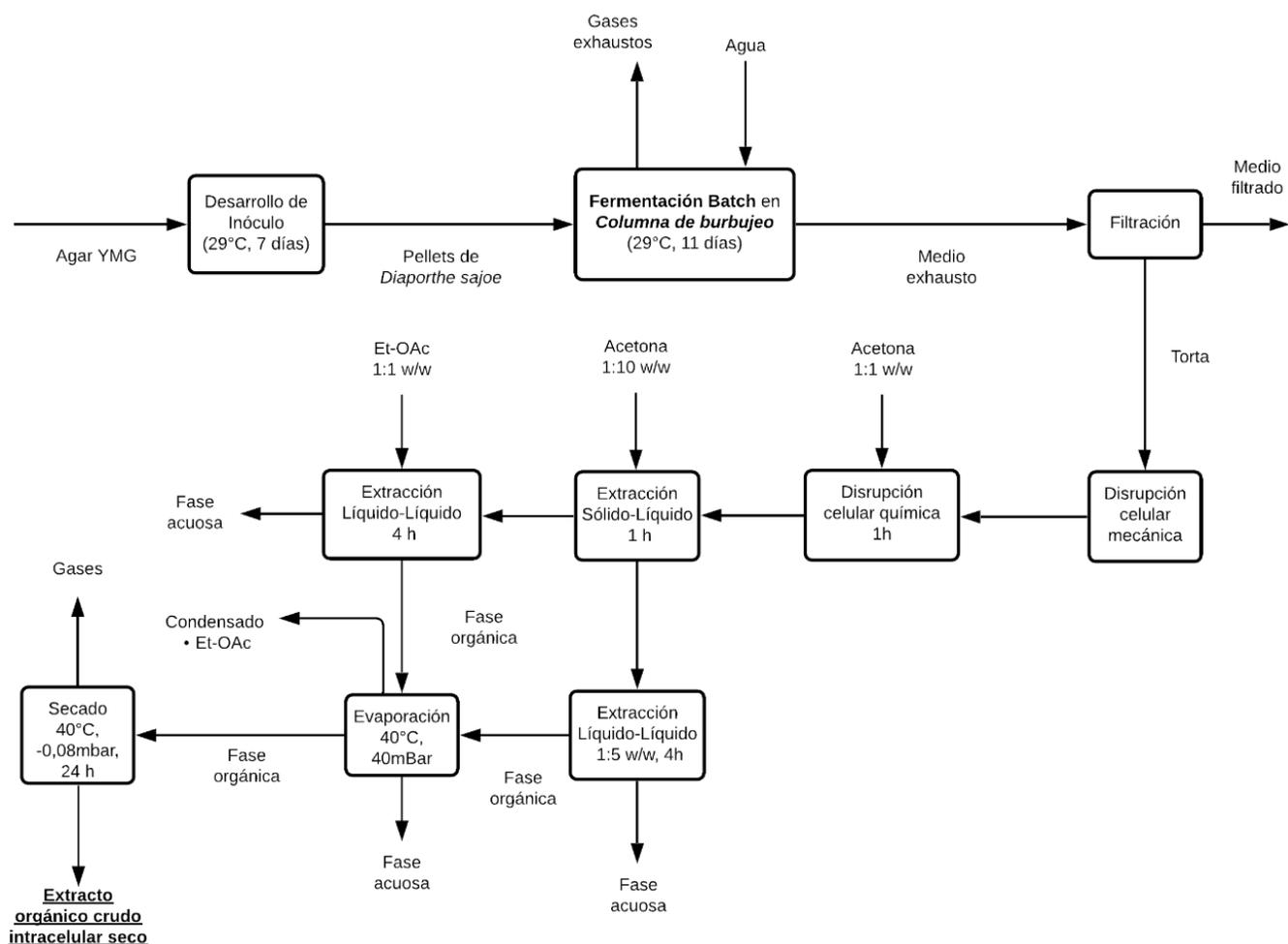


Figura 7. Aproximación de diseño básico del bioproceso para la obtención de extractos orgánicos crudos intracelulares de *Diaporthe sajoe* por fermentación sumergida en columna de burbujeo.

DISCUSIÓN

Actualmente las fermentaciones con *Diaporthe sajoe* son de gran interés investigativo debido a las actividades antimicrobianas evidenciadas por sus metabolitos secundarios. Algunos estudios muestran que este género tiene una amplia capacidad de biosíntesis de compuestos (Charria et al., 2021; dos Reis et al., 2019; Dhakshinamoorthy et al., 2021) de interés farmacéutico para el desarrollo de nuevos tratamientos o fármacos para el manejo de la resistencia antimicrobiana. En ese sentido se presenta la primera investigación donde se estudió el efecto de la configuración de biorreactor sobre los rendimientos de producción de los extractos orgánicos crudos obtenidos a partir de la fermentación en sumergido de *Diaporthe sajoe*. Además, se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos crudos obtenidos ante la bacteria *Staphylococcus aureus* y levadura *Candida albicans*.

Fermentación de Diaporthe sajoe en tanque agitado y columna de burbujeo y recuperación de los extractos orgánicos crudos

Acorde con lo anterior, se realizaron fermentaciones en tanque agitado y columna de burbujeo donde en primera instancia fue posible contemplar cambios colorimétricos importantes como se muestra en la **Figura 3**, pues el medio YMG inicialmente tenía una coloración amarilla traslucida, el cual después de alrededor de tres días se tornó a un amarillo pardo hasta los últimos días de fermentación donde el medio cambió completamente a rojo pardo; cambios colorimétricos que también fueron reportados por Charria et al. (2021). Estos cambios se asocian a un proceso de pardeamiento enzimático, el cual implica la presencia de moléculas de oxígeno que catalizadas por la enzima polifenol oxidasa permiten la oxidación de las moléculas fenólicas a quinonas (Li et al., 2021), dando como resultado la formación de los pigmentos de color pardo. Además, algunas moléculas fenólicas y quinonas han sido reportadas como metabolitos secundarios en cultivos sumergidos por Tang-Chang Xu et al. (2021) sintetizados por hongos del género de *Diaporthe spp* como compuestos con actividad antimicrobiana. Así mismo, Selim et al. (2014) concluyeron que para fermentaciones con *Chaetomium globosum* el medio YMG favoreció la producción de agentes antimicrobianos. No obstante, en el caso del presente estudio no fue posible establecer una correlación entre los cambios colorimétricos y actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos. En parte, a que los extractos recuperados y evaluados estaban parcialmente enfocados en moléculas con afinidad a la polaridad de los solventes empleados en la extracción (Acetato de etilo y acetona).

Además, Pusztahelyi Tünde et al. (1997) asocia la formación de moléculas con acción antimicrobiana al proceso metabólico secundario cuando se somete el microorganismo a un periodo de inanición de la fuente de carbono, el cual es consecuente con la condición bajo la cual estuvieron sometidos los cultivos durante los últimos tres días de las fermentaciones. Se debe agregar que, otros autores que han implementado estos periodos en cultivos con hongos endófitos filamentosos sugieren que este proceso es inductor de la producción de compuestos de interés farmacéutico que no se obtienen en altas cantidades en condiciones normales. En este sentido, Lu et al. (2019) señalaron que por fermentación sumergida del hongo endófito *Alternaria spp*, el tratamiento de inanición aumentó significativamente la acumulación de compuestos fenilpropanoides, reconocidas moléculas bioactivas en la industria agroindustrial, cosmética y farmacéutica, y reguló positivamente la expresión de genes clave en las vías de su síntesis. También, Maccheroni-Azevedo. (1998) sometieron al hongo endofítico *Colletotrichum musae* a un periodo de inanición de la fuente de carbono, demostrando que la falta de este nutriente esencial promovió el aumento de la actividad enzimática en general. Esta información sugiere que haber sometido a *Diaporthe sajoe* a una inanición de fuente de carbono condujo a la expresión y producción de moléculas bioactivas que fueron recuperadas en las etapas de separación y purificación del extracto crudo. Esto dado a que el valor de CI_{50} obtenido en el caso de los extractos provenientes del cultivo en columna de burbujeo fueron significativamente menores que lo reportados por Charria et al. (2021) para la misma cepa fúngica. El microorganismo pudo verse obligado a sintetizarlas para sobrevivir ante una situación de estrés hidrodinámico dado por la aireación.

Por otro lado, Nitsche et al. (2012) señalan que en cultivos sumergidos de hongos filamentosos del género *Aspergillus spp* se presentaron características celulares como la autólisis, muerte celular y/o el reciclaje endógeno de nutrientes durante seis días de inanición por la fuente de carbono. Características que, según White et al. (2002) conducen al aumento de las actividades de la enzima hidrolasa, la fragmentación del micelio y fragmentación de hifas, los cuales, adicionado a la tensión mecánica ejercida por el agitador en una configuración de tanque agitado, es razonable esperar que se reduzca drásticamente la cantidad de biomasa obtenida. Esto podría explicar un poco lo observado con la poca biomasa obtenida al final de los cultivos en el tanque agitado, los cuales adicionado a la aireación estuvieron bajo agitación mecánica permanente.

En este mismo contexto, el crecimiento de *Diaporthe sajoe* en tanque agitado se dio en forma de micelio disperso (**Figura 3A, b**), a pesar de inocularse en forma de pellets pequeños los cuales fueron desintegrados por la acción mecánica del impeller y el estrés hidrodinámico, por esta razón y las mencionadas anteriormente, la recuperación de biomasa al final de las fermentaciones en tanque agitado disminuyó

considerablemente respecto a lo obtenido en la columna de burbujeo. Pues, en esta se obtuvo un promedio de 48.55 ± 14.21 g de biomasa húmeda mientras que en el tanque agitado el promedio correspondió a 21.6 ± 46.84 g. Cabe resaltar que la fermentación en columna de burbujeo se adaptó con una malla de acero inoxidable que ofreció una mayor área superficial en la cual se adhirió y desarrolló el microorganismo, teniendo en cuenta la evidente formación y conservación de biofilms; así como la formación de pellets miceliales en el seno de la columna.

La formación de pellets (**Figura 3B,c**) en fermentaciones sumergidas parece ser la morfología característica de *Diaporthe sajoe*; no obstante, contrario a la metodología propuesta por Charria et al. (2021) para el desarrollo de inóculo, en nuestro caso mediante el proceso de raspado de caja de agar con solución Tween 0,01% (v/v) fue posible obtener esta morfología homogénea de pellets y controlar el tamaño según lo requerido para cada configuración de biorreactor. Este control del tamaño del pellet ayudó a mejorar la distribución de biomasa y seguramente a los mecanismos de transferencia de nutrientes en puntos de la columna de burbujeo, haciendo más homogéneo el cultivo.

De otro lado, con respecto a la masa recuperada de los extractos crudos, como muestra la **Figura 4**, en promedio la mayor cantidad se obtuvo de la zona intracelular, donde en el tanque agitado se alcanzaron 106.87 ± 11.10 mg y la máxima obtenida en la columna de burbujeo correspondió a 108.45 ± 81.11 mg. Esta última alta variabilidad podría relacionarse con el protocolo de extracción con el acetato de etilo, pues la recuperación de los extractos depende de la afinidad de las moléculas con polaridad similar a la del solvente o la interacción entre las moléculas presentes en cada etapa de extracción (Chang et al., 2003). Al comparar estos resultados con los obtenidos por Charria et al. (2021) en términos de la fuente de extracción, se evidencia que la mayor cantidad de extractos se alcanzó a partir del medio exhausto correspondiente a 1.45 g frente a 4.77 mg obtenidos de la biomasa húmeda de *Diaporthe sajoe*, y los mejores rendimientos de extracción se obtuvieron con metanol como solvente. Lo anterior sugiere que las condiciones de estrés a las cuales fue sometido el hongo en las diferentes configuraciones de biorreactor favorecen la expresión de las moléculas de interés intracelulares. En cuanto a la producción de los extractos extracelulares globales, se obtuvieron mejores resultados con las fermentaciones realizadas en la columna de burbujeo puesto que se obtuvo alrededor de 1.8 más masa promedio que la alcanzada en el tanque agitado.

Por otra parte, pese a lo argumentado con anterioridad y los resultados obtenidos, por medio del software *Minitab 19* se evaluó la significancia estadística de los rendimientos de producción de los extractos orgánicos crudos extracelulares e intracelulares para cada configuración de biorreactor, donde el valor *P* (0.540 y 0.353) estuvo por encima del nivel de significancia ($P > 0.005$). Lo anterior indica que las configuraciones de reactores empleados para las fermentaciones del hongo *Diaporthe sajoe*, no produjeron diferencias significativas sobre los rendimientos de recuperación de los extractos orgánicos crudos.

Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos orgánicos crudos

Los resultados obtenidos en el *software estadístico R* para los diferentes extractos evaluados contra los microorganismos patógenos de interés, mostraron que los extractos obtenidos en ambas configuraciones tienen mejor actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* que ante la levadura *Candida albicans*. La razón de evaluar únicamente esta bacteria Gram-positiva y no una Gram-negativa como *Escherichia coli*, fue debido a que estudios preliminares realizados por Charria et al. (2021) reportaron que la cepa de ET-28 de *Diaporthe sajoe* produce extractos crudos que requieren de menos concentraciones para inhibir el crecimiento de la bacteria patógena *Staphylococcus aureus* en contraste con las requeridas para *Escherichia coli*, por lo tanto, se decidió continuar los estudios con esta y conocer la acción que podrían tener los extractos orgánicos crudos sobre una levadura patógena como *Candida albicans*.

En consecuencia, la mejor actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* se presentó por parte de los extractos crudos recuperados de la columna de burbujeo al requerir menores concentraciones para inhibir su crecimiento, específicamente el extracto intracelular orgánico (C-I-O) del cual fueron suficientes 0.54 ± 0.62 mg/mL para inhibir la mitad de la población bacteriana incubada, lo cual sugiere que cultivar

el hongo en columna de burbujeo permite obtener mejores resultados de CI_{50} para los extractos intracelulares, puesto que Charria et al., (2021) reportaron para su extracto crudo intracelular 3.42 mg/mL de CI_{50} y para los extractos crudos extracelulares 3.91 mg/mL. Sin embargo, en el presente estudio se obtuvo una máxima concentración inhibitoria de extractos extracelulares correspondientes a 16.49 ± 10.41 mg/mL en la columna de burbujeo y en el tanque agitado ambas concentraciones fueron mayores a 10 mg/mL. Esto sugiere que las condiciones en configuración de biorreactor y el periodo de inanición favorecen la obtención de extractos con acción antimicrobiana provenientes de la zona intracelular, pero generan una bioactividad inversa sobre los extractos crudos de la zona extracelular; posiblemente por un cambio en las rutas de síntesis de los metabolitos secundarios de interés.

Contrariamente, para a los extractos evaluados ante *Candida albicans*, la mejor concentración de extracto correspondió al intracelular derivado del cultivo en el tanque agitado (T-I-O) con un valor de CI_{50} de 19.68 ± 1.45 mg/mL. Lo cual es inverso a lo reportado por dos Reis et al. (2019) sobre el género de *Diaporthe spp*, que ante esta especie fúngica indicaron concentraciones mínimas de 3.9 μ g/mL hasta 0.25 mg/mL, posiblemente dado a que la recuperación orgánica de estos extractos se realizó con diferentes solventes como metanol, hexano y diclorometano. Sugiere como anteriormente se mencionó, que la afinidad de las moléculas bioactivas de interés puede variar y ser mayor con otros solventes diferentes al acetato de etilo. Sin embargo, la mayoría de los extractos obtenidos en ambas configuraciones mostraron resultados favorables en función de la cantidad necesaria para inhibir el desarrollo de este tipo de microorganismos, lo cual demuestra resultados prometedores para estudios en futuras investigaciones.

Evaluación del efecto de la temperatura sobre los rendimientos de recuperación y actividad antimicrobiana de extractos orgánicos crudos de interés

En vista de que no se lograron llevar a cabo suficientes ensayos que permitieran validar el diseño de bioproceso a partir de la mejor configuración de biorreactor, se planteó estudiar el efecto de la variación de temperatura sobre los rendimientos de recuperación de los extractos orgánicos crudos extracelulares e intracelulares obtenidos de la fermentación con *Diaporthe sajo*e. En consecuencia, se decidió realizar la fermentación en la configuración de biorreactor de la cual se obtuvieron las mejores concentraciones máximas de inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos, además la más oportuna en términos de operabilidad, consistencia en la obtención de biomasa fúngica por falta de fuerzas de cizallamiento y recuperación de extractos orgánicos crudos, siendo la columna de burbujeo la que predominó sobre estos aspectos y permitió el seguimiento de la colorimetría y morfología del microorganismo; factores que se relacionaron con la obtención de extractos orgánicos crudos.

Finalmente, como muestra la **Tabla 2** los valores obtenidos para la biomasa húmeda son similares entre ambas temperaturas, ya que la diferencia es de alrededor de 7.1 g. Además, los rendimientos intracelulares son consistentes con el promedio de los obtenidos para la comparación entre configuraciones de biorreactor. No obstante, es importante destacar que la variación de temperatura si influyó sobre la concentración máxima de inhibición frente a los microorganismos patógenos evaluados porque, los extractos orgánicos crudos de 26 °C la concentración máxima inhibitoria dio 6.00 ± 2.61 mg/mL pero para los extractos de 29 °C aumento a 7.64 ± 1.57 mg/mL y en contraste con Charria et al. (2021) ambas concentraciones máximas de inhibición aumentaron. Ahora bien, como se puede ver en la **Figura 6** los extractos orgánicos crudos obtenidos tanto del micelio como del medio extracelular mostraron buena actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, donde principalmente los extractos intracelular y extracelular orgánico de la columna de burbujeo, (C-I-O) a 29 °C y (C-E-O) a 26 °C respectivamente, alcanzaron concentraciones inferiores a 10 mg/mL. Aunque, para los extractos orgánicos crudos de 26 °C la concentración disminuyo a 6.00 ± 2.61 mg/mL sobre 7.64 ± 1.57 mg/mL requerida para los extractos de 29 °C, en contraste con Charria et al. (2021) las concentraciones máximas de inhibición aumentaron.

Mientras que, ninguno de los extractos obtenidos en este ensayo presentó concentraciones máximas de inhibición por debajo de 26 mg/mL obtenidos con anterioridad frente a *Candida albicans*, particularmente

los obtenidos en la fermentación a 26°C. Esto sugiere la existencia de una relación inversa entre la concentración máxima inhibitoria (CI₅₀) y la temperatura, en este caso a aquellas inferiores a 29°C.

CONCLUSIONES

A partir de la comparación entre tanque agitado y columna de burbujeo, se determinó que esta última es la mejor configuración de biorreactor para plantear la primera aproximación de diseño de bioproceso para la fermentación batch del hongo endófito *Diaporthe sajoë* en columna de burbujeo con un periodo de inactivación de la fuente de carbono que favoreció la obtención de extractos orgánicos crudos con acción antimicrobiana ante *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Esto debido a que se dio la mejor concentración de inhibición frente a *S. aureus* a partir de los extractos obtenidos intracelularmente en esta configuración, correspondiente a 0.54 mg/mL. Como aspectos adicionales se consideró la obtención de biomasa fúngica y cantidad de extractos orgánicos crudos, además de permitir el seguimiento de la colorimetría y morfología del microorganismo.

Adicionalmente, al evaluar el efecto de la temperatura sobre la fermentación sumergida de *Diaporthe sajoë* en columna de burbujeo se demostró que existe una relación inversa entre la concentración máxima inhibitoria y aquellas temperaturas por debajo de 29°C, dado que el CI₅₀ aumentó al disminuir la temperatura unos grados por debajo de la normalmente evaluada. Se recomienda continuar estudiando el efecto de la temperatura sobre la producción de los extractos orgánicos crudos y su actividad antimicrobiana. Así que es posible aportar a la resistencia a los antimicrobianos con los extractos obtenidos intracelularmente puesto que para tanque agitado y columna de burbujeo se obtuvieron concentraciones para inhibir el crecimiento del 50% de la población microbiana de *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* de 0.54 ± 0.62 y 19.68 ± 1.45 respectivamente.

Finalmente, se recomienda continuar el estudio de los cultivos fermentativos de *Diaporthe sajoë* evaluando diferentes factores como la temperatura y medio de cultivo que puedan afectar la producción de los extractos orgánicos crudos con actividad antimicrobiana, haciendo uso de la malla metálica que funciona como soporte de crecimiento y se controle el tamaño de los pellets con la metodología del desarrollo de inóculo aquí planteada.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la ayuda técnica impartida por Stefania Osorio, Angie Benavides y Andrea Castro del laboratorio del departamento de Ingeniería Bioquímica.

Al profesor Carlos Andrés Díaz por la ayuda, asistencia técnica y creaciones brindadas para la implementación de un sistema de control de temperatura adecuado para las columnas de burbujeo.

A Isabella Giraldo y Anna Isabel Castellanos por el apoyo, asistencia y compromiso durante los procesos experimentales e intercambio de conocimientos.

Al departamento de Ingeniería Bioquímica de la universidad Icesi por las facilidades otorgadas para realizar el presente trabajo.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

Awais, M., Pervez, A., Yaqub, A., & Shah, M. (2010). Production of Antimicrobial Metabolites by *Bacillus subtilis* Immobilized in Polyacrylamide Gel. *Pakistan J. Zool*, 42(3), 267-275. [http://zsp.com.pk/pdf/267-276%20\(11\).pdf](http://zsp.com.pk/pdf/267-276%20(11).pdf)

APROXIMACIÓN DE DISEÑO DE UN BIOPROCESO A ESCALA DE LABORATORIO PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA MEDIANTE CULTIVO DEL HONGO ENDÓFITICO *Diaporthe sajoë*

Barrios-Gonzalez, J., Fernandez, F., & Tomasini, A. (2003). Microbial Secondary Metabolites Production and Strain Improvement. *Indian Journal of Biotechnology*, 2, 322-333. <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/11326/1/IJBT%20%283%29%20322-333.pdf>

Cabrera, Cristina Eugenia y Gómez, Rommel Fabián y Zúñiga, Andrés Edmundo (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*, 38 (2), 149-158. ISSN: 0120-8322. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=28338208>

Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 27(1), 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>

Charria-Girón E, Espinosa MC, Zapata-Montoya A, Méndez MJ, Caicedo JP, Dávalos AF, Ferro BE, Vasco-Palacios AM y Caicedo NH (2021) Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos crudos obtenidos del cultivo de nativos Hongos endofíticos pertenecientes a una selva tropical montana en Colombia. Parte delantera. *Microbiol . 12: 716523*. doi: 10.3389 / fmicb.2021.716523

Chang, R., Goldsby, K. A. ;., Álvarez Manzo, R., & Ponce López, S. (2013). *Química* (11a. ed. --.). México D.F.: McGraw Hill.

De Souza, A. R. C., Baldoni, D. B., Lima, J., Porto, V., Marcuz, C., Ferraz, R. C., ... Mazutti, M. A. (2015). Bioherbicide production by *Diaporthe* sp. isolated from the Brazilian Pampa biome. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 575-578. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.005>

Del Arco, J. (2014). Antibióticos: situación actual. Retrieved April 28, 2021, from Elsevier.es website: <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-pdf-X0213932414516605>

Dhakshinamoorthy, M., Kilavan Packiam, K., Kumar, P. S., & Saravanakumar, T. (2021). Endophytic fungus *Diaporthe caatingaensis* MT192326 from *Buchanania axillaris*: An indicator to produce biocontrol agents in plant protection. *Environmental Research*, 197, 111147. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111147>

Dos Reis, C. M., da Rosa, B. V., da Rosa, G. P., do Carmo, G., Morandini, L. M. B., Ugalde, G. A., ... Kuhn, R. C. (2019). Antifungal and antibacterial activity of extracts produced from *Diaporthe schini*. *Journal of Biotechnology*, 294, 30-37. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.01.022>

El-Enshasy, H. A. (2007). Filamentous Fungal Cultures - Process Characteristics, Products, and Applications. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*, 225-261. doi:10.1016/b978-044452114-9/50010-4

Elvira Sánchez-Fernández, R., Lorena Sánchez-Ortiz, B., Monserrat Sandoval-Espinosa, Y. K., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., Claudia García-Méndez, M., & Lydia Macías-Rubalcava, M. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP*, 16(2), 132-146. [https://doi.org/10.1016/s1405-888x\(13\)72084-9](https://doi.org/10.1016/s1405-888x(13)72084-9)

Espinosa-Ortiz, E. J., Rene, E. R., Pakshirajan, K., van Hullebusch, E. D., & Lens, P. N. L. (2016). Fungal pelleted reactors in wastewater treatment: Applications and perspectives. *Chemical Engineering Journal*, 283, 553-571. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.07.068>

Gomes, R. R., Glienke, C., Videira, S. I. R., Lombard, L., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 31(1), 1-41. doi:10.3767/003158513x666844

Li, X., Gao, J., Simal-Gandara, J., Wang, X., Caprioli, G., Mi, S., & Sang, Y. (2021). Effect of fermentation by *Lactobacillus acidophilus* CH-2 on the enzymatic browning of pear juice. *LWT*, 147, 111489. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111489>

Lu, Y., Che, J., Xu, X., Pang, B., Zhao, X., Liu, Y., & Shi, J. (2019). Metabolomics reveals the response of the phenylpropanoid biosynthesis pathway to starvation treatment in the grape endophyte *Alternaria* sp. MG1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. doi:10.1021/acs.jafc.9b05302

Maccheroni, Jr., W. and Azevedo, J., 1998. Synthesis and secretion of phosphatases by endophytic isolates of *Colletotrichum musae* grown under conditions of nutritional starvation. *J-Stage*, 44(6), pp.381-387. doi.org/10.2323/jgam.44.381

Nitsche, B. M., Jørgensen, T. R., Akeroyd, M., Meyer, V., & Ram, A. F. (2012). The carbon starvation response of *Aspergillus niger* during submerged cultivation: Insights from the transcriptome and secretome. *BMC Genomics*, 13(1), 380. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-380>

Organización Panamericana de la Salud. (2018). Retrieved November 16, 2021, from Paho.org website: <https://www.paho.org/es/noticias/3-3-2021-resistencia-antimicrobiana-pone-riesgo-salud-mundial>

Papaspyridi, L.-M., Aligiannis, N., Topakas, E., Christakopoulos, P., Skaltsounis, A.-L., & Fokialakis, N. (2012). Submerged Fermentation of the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus* in a Batch Stirred Tank Bioreactor as a Promising Alternative for the Effective Production of Bioactive Metabolites. *Molecules*, 17(3), 2714-2724. <https://doi.org/10.3390/molecules17032714>

Papaspyridi, L.-M., Aligiannis, N., Christakopoulos, P., Skaltsounis, A.-L., & Fokialakis, N. (2011). Production of bioactive metabolites with pharmaceutical and nutraceutical interest by submerged fermentation of *Pleurotus ostreatus* in a batch stirred tank bioreactor. *Procedia Food Science*, 1, 1746-1752. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.257>

Pusztahelyi, T. Pócsi, I. Kozma, Jozsef. (2011). Aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: I: Morphological changes and secondary metabolite production. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 25(1):81 - 86. Doi: 10.1111/j.1470-8744.1997.tb00417.x

Sebastianes, F. L. S., Cabedo, N., Aouad, N. E., Valente, A. M. M. P., Lacava, P. T., Azevedo, J. L., ... Cortes, D. (2012). 3-Hydroxypropionic Acid as an Antibacterial Agent from Endophytic Fungi *Diaporthe phaseolorum*. *Current Microbiology*, 65(5), 622-632. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0206-4>

Selim, KA, El-Beih, AA, Abdel-Rahman, TM y col. Evaluación biológica del hongo endofítico, *Chaetomium globosum* JN711454, como posible candidato para mejorar el descubrimiento de fármacos. *Cell Biochem Biophys* 68, 67-82 (2014). <https://doi.org/10.1007/s12013-013-9695-4>

Souza, A. R. C. de, Baldoni, D. B., Lima, J., Porto, V., Marcuz, C., Machado, C., ... Mazutti, M. A. (2017). Selection, isolation, and identification of fungi for bioherbicide production. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(1), 101-108. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.09.004>

Shahri, S. Z., Vahabzadeh, F., & Mogharei, A. (2020). Lactic acid production by loofah-immobilized *rhizopus oryzae* through one-step fermentation process using starch substrate. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(2), 333-345. doi:10.1007/s00449-019-02231-5

Tanapichatsakul, C., Monggoot, S., Gentekaki, E., & Pripdeevech, P. (2017). Antibacterial and Antioxidant Metabolites of *Diaporthe* spp. Isolated from Flowers of *Melodorum fruticosum*. *Current Microbiology*, 75(4), 476-483. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1405-9>

White, S., McIntyre, M., Berry, D. R., & McNeil, B. (2002). The Autolysis of Industrial Filamentous Fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(1), 1-14. doi:10.1080/07388550290789432

World Health Organization: WHO. (2020, October 13). Resistencia a los antimicrobianos. Retrieved April 21, 2021, from Who.int website: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

Xu, T.-C., Lu, Y.-H., Wang, J.-F., Song, Z.-Q., Hou, Y.-G., Liu, S.-S., Liu, C.-S., et al. (2021). Bioactive Secondary Metabolites of the Genus *Diaporthe* and Anamorph *Phomopsis* from Terrestrial and Marine Habitats and Endophytes: 2010-2019. *Microorganisms*, 9(2), 217. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9020217>

ZY Zhang , B. Jin , JM Kelly (2007). Producción de ácido láctico y subproductos de almidón de patata residual por *Rhizopus arrhizus* : papel de las fuentes de nitrógeno. *World J. Microbiol. Biotechnol.* , 23, págs. 229 - 236

ZY Zhang , B. Jin , JM Kelly, Y. Chisti (2007). Producción de ácido láctico y subproductos de almidón de patata residual por *Aspergillus terreus* : papel de las fuentes de nitrógeno. *World J. Microbiol. Biotechnol.* , 23, págs. 229 - 236