

Revista de la Sociedad Mexicana de

Biotecnología y Bioingeniería

Año 2025 Volumen 29, Número 2
ISSN 0188-4786



Sociedad Mexicana de
Biotecnología y Bioingeniería



MESA DIRECTIVA

2024 – 2026

Dr. Luis Bernardo Flores Coterá

Presidente

Dr. Francisco José Fernández Perrino

Vicepresidente

Dr. Manuel Alejandro Lizardi Jiménez

Secretario

Dra. Neith Aracely Pacheco López

Tesorero

Dra. Andrea Sabido Ramos

Subsecretario

Dra. Carolina Peña Montes

Subtesorero

M.C. Oscar Ulises García Flores

Vocal estudiante

M. en C. Ileana Emilia Gutiérrez Cancino

Vocal Profesional

EDITORIA

Dra. María Soledad Córdova Aguilar

UNAM

Co-editor

Dr. Jorge Gracida

UAQ

COMITÉ EDITORIAL

Dra. Isadora Martínez Arellano

Dra. Georgina Sandoval

Dra. Elda Patricia Segura Cenicerós

Dra. María Eugenia de la Torre

Dra. Virginia Villacruz

Dra. Beatriz Ruiz Villafán

M. en C. Vanessa Hernández Rodríguez

Formación y edición

Pas. QA Mariana Espinoza Tapia

ISSN 0188-4786, revista cuatrimestral publicada por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C, en LATINDEX (Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal), los artículos se encuentran en Google Académico. Certificado de Licitud de Título en trámite y Certificado de Licitud de Contenido en trámite. Reserva de derechos de Título 04-1999-082516265000-101. Los conceptos que en ella aparecen son responsabilidad exclusiva de los autores. Se prohíbe la reproducción total o parcial de su contenido sin previa autorización por escrito del Comité editorial. Toda correspondencia deberá enviarse a Km. 23.5 Carretera Federal México-Cuernavaca, Av. Cipreses s/n, Col. San Andrés Totoltepec, C.P. 14400, Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México. o a la siguiente dirección electrónica revista_biotecnologia@smbb.mx.

Índice

Instrucciones para los autores	4
--------------------------------	---

Artículos

Biorreactores Airlift de lazo externo, una alternativa para la producción de bikaverina: una revisión

Diana Belem Alanís-Gutiérrez, María de la Luz Xóchilt Negrete-Rodríguez, María del Carmen Chávez-Parga	8
---	---

Analysis of ATAT, ACAC and AGAG Microsatellite from the Worldwide *Cactaceae* Barcodes

Alejandra Guzmán-Cepeda, Argelia Francisca Tapia-Canseco, Ernesto Rios-Willars	29
---	----

Identifying potential diagnostic biomarkers in human glioblastoma using integrative transcriptomic analysis

Andres Turizo-Smith, Daniel Garcia-Niño, Liliana Lopez-Kleine	35
---	----

Polylactic acid pla production from alternative substrates submerged fermentation with *Rhizopus oryzae*

Carlos Luis Alvarado Almarza, Romari Hernández, Mauricio Veitia, Domenico Pavone	52
---	----

Alternativa de valorización de residuos agroindustriales y agroforestales de *Hylocereus undatus* y *Vitex gaumeri* para la obtención de pectinasas utilizando fermentación en estado sólido. Revisión

Silvia De Jesús Chalé Quintal, Isabel Mendoza Saldívar, Juan Carlos Cuevas, Luis Ignacio Hernández Chávez, María Isabel Reyes Arreozola	69
--	----

Desarrollo de un proceso biotecnológico para la producción de ácido S-láctico a partir de *Rhizopus oryzae* empleando estimulantes de biosíntesis mediante dos fuentes de carbono de origen vegetal a nivel de laboratorio

Jervis Blasco, Roselin Silva, Carlos Alvarado Almarza	80
---	----

Elaboración de Jarabes fructosados para la industria alimentaria y sus usos como aditivo

Daphne Reyes-Granados, Régulo Ruíz-Salazar, Cristian Lizarazo-Ortega, Adriana L. Perales-Torres, Rodríguez, Guadalupe C. Rodríguez-Castillejos, Juan R. De la torre-Escareño, Rubén Santiago-Adame	89
--	----

Instrucciones para los autores

Guía de Autores

La revista puede recibir trabajos de investigación original, así como de revisión en los campos de la Biotecnología y Bioingeniería. Todos los manuscritos serán sujetos a revisión por al menos dos miembros del Comité Editorial y deberán contar con una recomendación de aceptación para ser publicados.

Los idiomas en los que se puede publicar en la revista son el español y el inglés.

Los trabajos se escribirán en hoja tamaño carta (21.6 cm x 27.6 cm). Los márgenes aplicados a todo el manuscrito serán de 2.5 cm para los extremos superior e inferior, así como 3 cm de cada lado. Las páginas deberán estar numeradas en la parte inferior y central de cada hoja.

Para evitar errores innecesarios se recomienda usar el corrector de gramática y ortografía del procesador de palabras. Se recomienda que los trabajos completos tengan un máximo de 25 páginas, escritas con un interlineado de 1.5 renglones, incluyendo las tablas y figuras. Las publicaciones en la revista Biotecnología están exentas de costo para los autores.

Cuando corresponda, se recomienda el uso de abreviaturas para referirse a unidades de tiempo (h, min, s), de volumen (l, ml, μ l), de peso (kg, g, mg, μ g), ADN, ARN y otras comúnmente aceptadas en la literatura científica.

Los trabajos de investigación original pueden tocar cualquiera de los diversos campos que cultivan la biotecnología y la bioingeniería, desde aspectos fundamentales hasta sus aplicaciones, incluyendo: Enzimas y Biocatálisis, Microbiología, Biotecnología Agrícola y Vegetal, Biotecnología Marina, Alimentos y bebidas, Biotecnología farmacéutica, Biotecnología Ambiental, Bioingeniería y fermentaciones, Bioenergía y biocombustibles, Biología de sistemas y bioinformática, Biología sintética, Nanobiotecnología y biomateriales, Ingeniería metabólica, Omicas, Bioseguridad y Bioética.

Tanto los trabajos de investigación original como las revisiones deberán apegarse al siguiente formato:

1. El título del manuscrito se escribirá en negritas con letra Arial o equivalente tamaño 14. El título deberá estar centrado y ser conciso e informativo. Evite el uso de abreviaciones y fórmulas.

Instrucciones para los autores

2. El nombre de los autores ocupará los siguientes renglones escribiendo el nombre y primer apellido de cada participante. Se usará letra Arial o equivalente tamaño 12. Los nombres de los participantes deberán estar centrados, señalando con un asterisco el autor responsable de la publicación. En el siguiente renglón con letra *italica* Arial del mismo tamaño, se incluirá la dirección postal de la institución de adscripción de los autores, así como la dirección de correo del autor corresponsal. Si el responsable fuera un estudiante, deberá incluir una carta del tutor o director del trabajo autorizándolo.
3. Se deberá añadir un Resumen de no más de 250 palabras en español y el correspondiente Abstract en inglés.
4. Se incluirán entre 3 a 6 Palabras clave: que permitan clasificar el artículo en una base de datos. Estas palabras deberán de incluirse en español y en inglés (Key words).
5. Si el texto inicia con el nombre de algún subtema, éste se pondrá como primera línea en cursivas con letra Arial o equivalente tamaño 10. Después en el siguiente renglón se iniciará el texto descriptivo usando letra Arial o equivalente tamaño 10. El texto deberá ser escrito con un interlineado de 1.5 renglones. Se deberá dejar un espacio de un renglón al inicio de una sección o subtema nuevo. Los géneros y especies deberán escribirse en letras *italicas*.
6. Las figuras deberán numerarse con arábigos, correlativamente en orden de aparición en el texto. No se integrarán al texto, sino al final del manuscrito. No obstante, para facilitar el trabajo de edición, se recomienda indicar la ubicación de las mismas en el momento en que son mencionadas por primera vez en el texto. Las figuras deben incluir un breve título explicativo en la parte inferior de la misma. Si es necesario incluir fotos, éstas se deberán designar como figuras.
7. Las tablas también se numerarán con arábigos ubicados en la parte superior de las mismas e incluirán un breve título explicativo. Las notas en las tablas deberán ser indicadas con letras minúsculas en superíndice. La ubicación de las tablas será señalada en el texto, pero se anexarán en hojas separadas y al igual que las figuras, al final del manuscrito.
8. La información dada como referencias bibliográficas deberá permitir a los lectores llegar con facilidad a la fuente de información original. En el texto del trabajo, las referencias se citan por autor y año entre paréntesis redondos. Por ejemplo: "Martínez & García (1999) han demostrado que...", o bien, "Datos recientes (Martínez & García, 1999) han demostrado que...". Si la cita posee varios autores se escribirá como sigue: "Gutiérrez et al. (2003), han demostrado..." O bien: "Datos recientes (Gutiérrez et al., 2003) han mostrado..."

Instrucciones para los autores

Si la cita es una página de Internet, la dirección URL deberá escribirse completa y entre paréntesis directamente en el texto.

9. La lista de Referencias se deberá escribir con el mismo tipo de letra del texto principal (Arial tamaño 10) y con sangría francesa de acuerdo con el siguiente formato:

Artículos:

Bayegan AH, Clote P (2020) RNAmountAlign: Efficient software for local, global, semiglobal pairwise and multiple RNA sequence/structure alignment. PLoS ONE 15(1): e0227177. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227177>.

Libros:

Ullrich M (2009) Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends. Horizon Scientific Press, Norwich.

Capítulos de libros:

Sánchez S & Demain AL (2009) Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology. Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (EIB). Flickinger MC (ed). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ. pp. 396-458.

Patentes:

Fenical WH, Jensen PR & Kwon HC (2009) Polyol macrolide antitumor-antibiotics from the marine actinomycete strain CNQ140. US patent 7,521,414.

Congresos y reuniones:

Reyes N, Domínguez RM, Islas I & Solis S (2007) Inducción diferencial por pH y temperatura del complejo pectinolítico producido por células inmovilizadas de *Aspergillus* HL. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia Mich. México. OIII-12.

Instrucciones para los autores

Sitios en internet:

CAZY, Carbohydrate-Active Enzymes Database. (<http://www.cazy.org/>)

Tesis de pre y posgrado:

Cárdenas C (2009) Evaluación del uso biotecnológico de la semilla de *Ditaxis heterantha* para la producción de safranal. Tesis Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp. 1-78.

Cada autor es responsable de la precisión de las citas que emplea.

Una vez que ha sido revisado y aceptado su trabajo, los autores deberán enviar una carta de cesión de los Derechos de Autor, de manera que la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería pueda hacer uso del artículo aceptado, o parte de él, con fines de divulgación y difusión de la actividad científica y tecnológica. En ningún caso, dichos derechos afectan la propiedad intelectual que es propia de los autores, para usar la totalidad o parte de ese artículo con fines no lucrativos.

Los trabajos se someten en línea en la página electrónica de la Sociedad Mexicana de Biotecnología, en la dirección <https://smbb.mx/publicaciones/publicacion-de-articulo/>. Al momento de recibirlo, se enviará un acuse de recibo al autor correspondiente. La dirección para mantener comunicación con el editor es: revista_biotecnologia@smbb.mx y marisol.cordova@icat.unam.mx.

Una vez aceptados, los trabajos son editados y enviados a los autores para su corrección. En esta condición no se permitirán cambios sustanciales en el contenido de los mismos sin la aprobación del editor en jefe. Una vez aprobada la prueba, el trabajo se publicará en línea y podrá ser consultado en la página de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería AC <http://www.smbb.com.mx/>.

Biorreactores Airlift de lazo externo, una alternativa para la producción de bikaverina: una revisión

Diana Belem Alanís-Gutiérrez¹, María de la Luz Xochilt Negrete-Rodríguez², Ma. del Carmen Chávez-Parga^{1*}

¹*División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Gral. Francisco J. Múgica S/N, C.U., 58030, Morelia, Michoacán, México*

²*Tecnológico Nacional de México / Instituto Tecnológico de Celaya, Departamento de Ingeniería Bioquímica y Ambiental, García Cubas 600, Fovissste, Celaya, Gto., 38010, México.*

**Autor de correspondencia
Correo electrónico: cparga@umich.mx*

Resumen

La bikaverina es un metabolito secundario producido principalmente por hongos filamentosos del género *Fusarium*. Este metabolito presenta una estructura de policétido tetracíclico, cuyas aplicaciones abarcan desde la industria farmacéutica, alimentaria, textil y cosmética. La producción de metabolitos secundarios provenientes de hongos filamentosos en sistemas cerrados, como sistemas de fermentación sumergida depende de múltiples variables fisicoquímicas y biológicas, la concentración y biodisponibilidad de nutrientes, pH, temperatura, agitación, solubilidad de oxígeno en el medio, la presión hidrostática de la fase líquida, la aireación y agitación. En particular, la agitación es una variable fundamental, debido a que los fenómenos de transferencia de masa se encuentran estrechamente relacionados. En esta revisión se analizan los efectos más relevantes sobre el rendimiento y la producción de la bikaverina al utilizar un biorreactor *Airlift* de lazo externo, al establecer una comparación con sistemas de fermentación sumergida convencionales. Además, se exploran las ventajas económicas, técnicas, ambientales y operativas de este tipo de biorreactor.

Palabras Claves: *Bikaverina, metabolitos secundarios, biorreactores, transferencia de masa, Airlift.*

Abstract

Bikaverin is a secondary metabolite produced mainly by filamentous fungi of the genus *Fusarium*. This metabolite has a tetracyclic polyketide structure, whose applications range from the pharmaceutical, food, textile, and cosmetic industries. The production of secondary metabolites from filamentous fungi in closed systems, such as submerged fermentation systems, depends on multiple physicochemical and biological variables, the concentration and bioavailability of nutrients, pH, temperature, agitation, oxygen solubility in the medium, hydrostatic pressure of the liquid phase, aeration, and agitation. In particular, the agitation is a fundamental variable because mass transfer phenomena are closely related. In this review, the most relevant effects on bikaverin yield and productivity using an external loop *Airlift* bioreactor are analyzed in comparison with conventional submerged fermentation systems. In addition, the economic, technical, environmental, and operational advantages of this type of bioreactor are explored.

Key Words: *Bikaverin, secondary metabolites, bioreactors, mass transfer, Airlift.*

Introducción

La bikaverina es un policétido compuesto por 20 átomos de carbono, 14 de hidrógeno y 8 de oxígeno (Figura 1). Este compuesto presenta un pigmento rojizo, lo que facilita su identificación inmediata durante una fermentación en cultivo sumergido. Debido a esta característica, ha tenido un notable impacto en los sectores alimenticio y textil. Además, se han llevado a cabo estudios sobre

sus posibles efectos terapéuticos; actividad antibiótica (Lu et al., 2025), actividad antitumoral (Hinojosa Ventura et al., 2019), actividad neuroprotectora (Nirmaladevi et al., 2014) y recientemente, se ha propuesto como un modelo potencial de acoplamiento molecular para el diseño de fármacos inhibidores del COVID-19, al utilizar simulaciones de bioinformática (Singh & Florez, 2020).

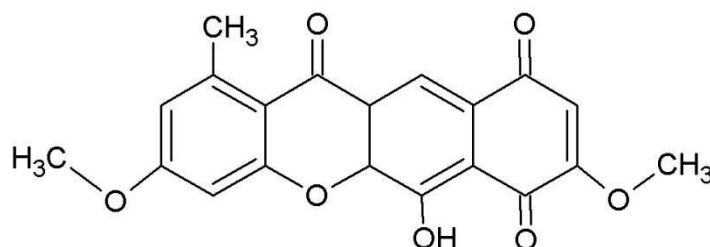


Figura 1. Estructura química de la bikaverina.

Algunos reportes muestran que la bikaverina está presente en microorganismos fúngicos del género *Fusarium*, entre ellos, *Gibberella fujikuroi* es una especie reconocida por su notable capacidad de biosintetizar una amplia diversidad de metabolitos secundarios. Dentro de las micotoxinas más investigadas se encuentran la moniliformina, las fusarinas, las fumonisinas, el ácido fusárico y la beauvericina, todas ellas con efectos tóxicos ampliamente documentados tanto en humanos como en animales. Paralelamente, este hongo también produce metabolitos no tóxicos de interés biotecnológico, entre los que destacan la neurosporaxantina, un carotenoide con propiedades antioxidantes, y la bikaverina, un pigmento policétido con potenciales aplicaciones en las áreas farmacológica y biomédica. La biosíntesis de bikaverina, al representar un efecto biológico significativo al inhibir la fosforilación oxidativa en las células, constituye una oportunidad clave para generar nuevos conocimientos y alternativas en posibles tratamientos, además de contribuir al avance tecnológico y científico, especialmente a través de su síntesis por vía fermentativa. Lo que conlleva al análisis de las variables físicas y fenomenológicas en biorreactores que inciden en la actividad metabólica, lo que enfatiza a la necesidad urgente de profundizar en esta línea de investigación, con el propósito de avanzar en la comprensión y mejora

continua de estos sistemas. En este contexto, proponer el análisis de las variables fisicoquímicas presentes en un biorreactor *Airlift* y su impacto en el metabolismo de *G. fujikuroi* para maximizar la producción de bikaverina representa una valiosa oportunidad de desarrollo e innovación tecnológica.

Los pigmentos fúngicos como la bikaverina están asociados con efectos antioxidantes o bien, con transmisión de señales o como fuente energética en las células (Socaciu, 2007). La presencia de pigmentos fúngicos representa una ventaja para la identificación analítica rápida y oportuna, debido a que las moléculas son capaces de absorber luz en la región visible (380-700 nm) (Muthumanickam et al., 2010). Los pigmentos fúngicos se han aplicado en múltiples áreas, desde la antigüedad en el teñido de textiles, predominando los colores café, rojo, amarillo, azules y naranjas. Hasta la época moderna con ciencia y tecnología avanzada en el tratamiento oportuno y preventivo de enfermedades degenerativas. Los metabolitos secundarios fúngicos como la bikaverina, presentan limitaciones en el escalamiento a nivel industrial, principalmente debido a que los procesos de producción y purificación implican costos energéticos y de insumos elevados, hoy en día la disponibilidad

comercial es únicamente como estándar químico extranjero, provisto por Sigma-Aldrich – Merck y su costo es de 296.33 dólares estadounidenses por mg de bikaverina, en 2025, por lo tanto, es fundamental implementar técnicas que maximicen su producción y recuperación para satisfacer las necesidades en aplicaciones e investigaciones *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. Es importante analizar la viabilidad metabólica y explorar alternativas biológicas que afectan directamente el desarrollo celular para la producción de metabolitos secundarios fúngicos, especialmente en el diseño y selección de biorreactores, los cuales ofrecen un entorno controlado y optimizado para este propósito, una de las principales ventajas de una correcta selección de biorreactores, es que puede ser eficiente no solo en la producción de bikaverina, si no también puede ser aplicable a otros procesos de producción, cuyas condiciones permitan el control y monitoreo de variables de la misma forma. Los biorreactores permiten un mejor control de factores clave en procesos de fermentación sumergida, como biodisponibilidad de nutrientes, temperatura, presión hidrostática, pH, que son fundamentales para la generación y acumulación de metabolitos de interés. Además, es crucial validar una correlación de este conocimiento generado a lo largo de los años con variables físicas como la agitación neumática y mecánica, y su posible efecto en el rendimiento metabólico. Esta correlación se logra a través del estudio de los fenómenos de transporte que ocurren dentro de los biorreactores, los cuales influyen directamente en la transferencia de oxígeno, la distribución de nutrientes y la disminución de otros subproductos metabólicos. En este contexto, es fundamental considerar la composición del medio de cultivo, debido a que afectan significativamente este proceso, específicamente a la inducción para producir bikaverina mediante la limitación de nitrógeno (Linnemannstöns et al., 2002; Giordano et al., 1999), la adición de calcio favorece la biosíntesis de bikaverina, mientras que las fosfatos y sulfatos reprime su formación (Rodríguez-Ortiz et al., 2010), además de un pH ácido y un ambiente con aireación, de este último sin especificar un intervalo óptimo (Limón et al., 2010). Las investigaciones centradas en la producción de bikaverina mediante el uso de un

biorreactor como dispositivo de fermentación son limitadas, en su mayoría las investigaciones son realizadas en matraz agitado, debido a que la idea central de las investigaciones es sobre el hongo y su correlación con el medio de cultivo, efectos biológicos al ser modificados genéticamente. La Tabla 1 presenta la información recopilada sobre la producción máxima de bikaverina a escala de laboratorio en matraz agitado. Es importante destacar que las productividades máximas reportadas en este sistema fermentativo se encuentra principalmente en aquellas cepas modificadas genéticamente, es una opción viable para aportes y estudios en biología molecular, no obstante, para un proceso de escalamiento a nivel piloto o industrial, resulta en una desventaja financiera, debido a la inversión de una cepa modificada en comparación con una cepa silvestre, no obstante, en un sistema a nivel matraz, es evidente que existe una limitación importante en la transferencia de oxígeno. Por lo tanto, resulta interesante explorar las posibilidades de mejorar el rendimiento en la producción de bikaverina mediante el estudio físico de las variables de transformación durante el proceso de fermentación, en una escala aumentada con un biorreactor que permita controlar y monitorear distintas variables en tiempo real, lo cual podría contribuir a un avance significativo en biotecnología e ingeniería química.

Gibberella fujikuroi como productor de bikaverina

Gibberella fujikuroi actualmente denominado como *Fusarium moniliforme* (Klittich & Leslie, 1988; Giordano et al., 1999) es un hongo patógeno que incide principalmente en plántulas de arroz (Kvas et al., 2009). El hongo es responsable de causar la enfermedad *bakanae*, lo cual provoca graves pérdidas de cosechas en países productores de arroz. Los síntomas más comunes se asocian con plántulas de arroz con alargamiento inusual de tallos y con aparente clorosis (Janevska & Tudzynski, 2018). Otra característica importante en la detección de las plantas infectadas es que la infertilidad, y como consecuencia la producción de granos

Tabla 1. Máxima producción de bikaverina reportada en matraz agitado con diferentes medios de cultivo.

Microorganismo	Producción de bikaverina (mg/L)	Medio de cultivo	Enfoques de la investigación	Condiciones de operación	Referencia
<i>Fusarium oxysporum</i> CCT7620	320.5	Enriquecido con harina de arroz	Optimización de las condiciones de fermentación para la producción de bikaverina	28 °C, 250 rpm, sin control de pH	(Dos Santos <i>et al.</i> , 2020)
<i>Fusarium fujikuroi</i> (NCIM 1019)	6,300	Medio de cultivo basal enriquecido con sacarosa y harina de soja	Evaluar la producción de bikaverina en una cepa mutada	28 °C, 200 rpm, pH inicial = 6.5	(Lale & Gadre, 2016)
<i>Fusarium fujikuroi</i> IMI58289	120	Medio enriquecido con sacarosa y en ausencia de sales de fosfato y sulfato	Evaluar la producción de bikaverina en distintas fuentes de carbono	30 °C, 150 rpm, pH = 4-5	(Rodríguez-Ortiz <i>et al.</i> , 2010)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	202.75	Medio líquido SC-Ura con glucosa y galactosa	Recodificación enzimática para maximizar la producción de bikaverina en levaduras	30 °C durante 96 h	(Zhao <i>et al.</i> , 2020)

*npi = no presenta información.

comestibles es escasa (Sharma *et al.*, 2024). A veces, el hongo provoca el retraso del crecimiento de los brotes de arroz, probablemente debido a la producción de fumonisinas y ácido fusárico. Los efectos negativos del crecimiento, o bien, la hiperelongación y la gravedad de la enfermedad pueden estar asociados directamente por los niveles de resistencia del huésped (Fiyaz *et al.*, 2016) aunado al efecto de la presencia de fumonisinas. El uso más común que existe para este hongo es la producción de ácido giberélico, si se describe una producción a escala industrial, específicamente en el control de calidad de frutas, incluso se han reportado incidencias en el malteado de cebada para la producción de cerveza. Además de la síntesis de ácido Giberélico, *G. fujikuroi* es conocida por producir diversos metabolitos secundarios, entre ellos micotoxinas y pigmentos con potencial biotecnológico. En las últimas dos décadas, se han caracterizado varios pigmentos de interés, siendo los más destacados la neurosporaxantina, la bikaverina y las fusarubinas (Prado-Cabrero *et al.*, 2009; Linnemannstöns *et al.*, 2002; Studt *et al.*, 2012). Sin embargo, la capacidad biosintética para la producción de estos metabolitos secundarios y la ingeniería metabólica para producir estas sustancias, aún son

desconocidos para la mayoría de ellos y es una gran oportunidad para obtener una perspectiva clara en cuestión de escalamiento industrial.

Por las diversas aplicaciones en las que ha tenido auge la bikaverina, es importante, continuar con el estudio metabólico de la ruta biosintética, con esto se puede tener una respuesta acertada de la correlación física y biológica que contribuye a la mejora continua del proceso. De igual forma que el ácido giberélico, la bikaverina se sintetiza a partir de acetil-CoA (Avalos *et al.*, 1999) sigue la ruta de los policétidos, donde también participa malonil-CoA, catalizado por una enzima pre-bikaverina policétido sintasa que a su vez es activada por el gen *Bik1* para formar pre-bikaverina, luego actúa una enzima monooxigenasa activada por el gen *Bik2* que oxida la pre-bikaverina para formar oxo-pre-bikaverina, posteriormente se metila mediante una o-metiltransferasa activada por el gen *Bik3*, donde se forma un intermediario me-oxo-pre-bikaverina, que luego es hidroxilado a norbikaverina, finalmente se metila nuevamente por actividad regulada mediante el gen *Bik3* y se forma bikaverina, como se muestra en la Figura 2.

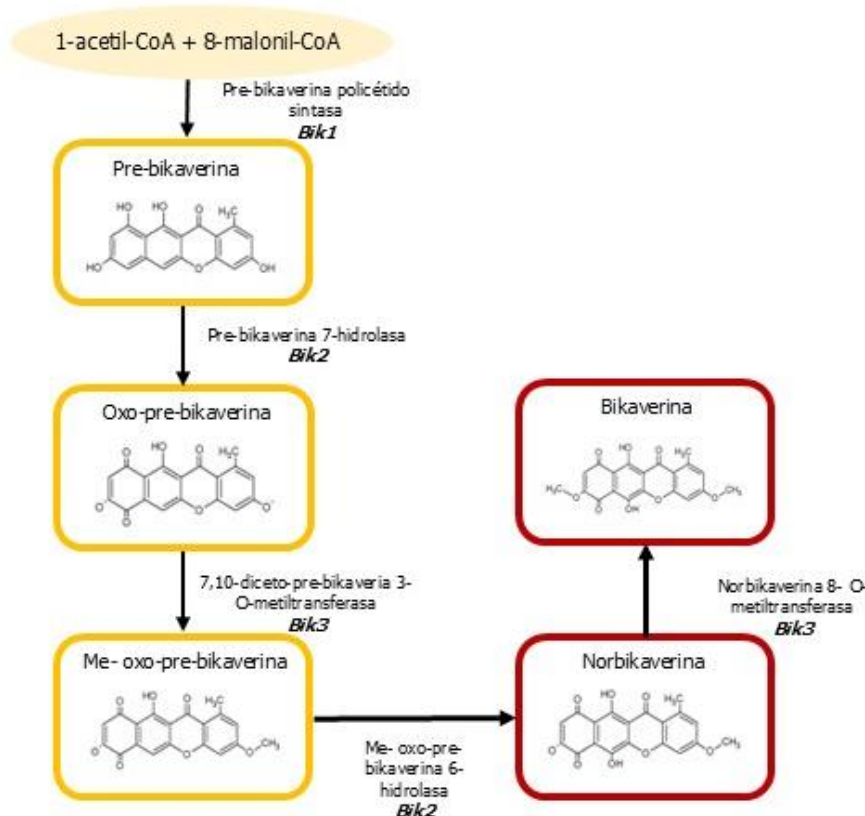


Figura 2. Ruta metabólica de la biosíntesis de bikaverina descrita para el género *Fusarium*. (Adaptado de Lebeau et al., 2019)

La bikaverina ha sido considerada en algunos estudios tempranos como una micotoxina (Kitagawa et al., 1997), aunque su grado de toxicidad muestra una marcada variación según el organismo y el contexto de exposición. En años recientes se han llevado a cabo evaluaciones toxicológicas adecuadas; de acuerdo con Beyzi et al. (2024) la bikaverina no presenta efectos mutagénicos según la prueba de Ames ni citotoxicidad relevante en células L929, con viabilidades superiores al 73% y un valor de IC₅₀ estimado en 1.79 µg/mL.

Aunque *G. fujikuroi* y otras especies productoras de bikaverina suelen ser fitopatógenas y capaces de generar micotoxinas como fumonisinas o beauvericina, no se ha documentado hasta ahora que la bikaverina produzca alteraciones sanitarias en consumidores humanos. Por el contrario, se considera un compuesto con potencial farmacológico, lo que lo diferencia de otras micotoxinas más nocivas presentes en el género *Fusarium*. ((Hasuda & Bracarense, 2023; Dos Santos et al., 2020)

Uno de los principales intereses en la purificación de la bikaverina radica en su potencial aplicación terapéutica, particularmente como agente antitumoral. Estudios han demostrado su efecto citotóxico frente a diversas líneas celulares, incluyendo linfoma, carcinoma y sarcoma (Zhan et al., 2007; Nirmaladevi et al., 2014). Investigaciones recientes han confirmado estos hallazgos; Haidar et al. (2019) reportaron una inhibición significativa del crecimiento en líneas celulares de adenocarcinoma mamario (MCF-7), carcinoma pulmonar (A427) y epidermoidales (A431), con reducciones de viabilidad superiores al 60 % a concentraciones de 10 µM. Estos resultados fortalecen la evidencia sobre el potencial farmacológico de la bikaverina como compuesto antineoplásico. Dado que la estadística poblacional muestra un aumento en la incidencia y prevalencia del cáncer con el tiempo, es fundamental continuar con mejoras y desarrollo de los mecanismos de producción para obtener

bikaverina, debido a que es una alternativa potencial para tratamientos contra algunos tipos de cáncer. No obstante, en la década de los años 70s se demostró que la bikaverina presentó efectos antibióticos frente al protozoo *Leishmania brasiliensis*, el cual provoca *Leishmaniasis* enfermedad clasificada por la OMS como cutánea, mucocutánea y visceral, las personas mayormente afectadas son aquellas que viven en zonas remotas. Hasta el año 2020 se había reportado un aproximado de un millón de nuevos casos, dentro de los cuales el 85% se presentan en países de Latinoamérica, Brasil, Perú y Colombia presentan mayor prevalencia, actualmente este padecimiento se clasifica como enfermedad tropical desatendida (World Health Organization: WHO, 2023). Por lo tanto, al establecer un método eficiente de producción y purificación en países de América Latina, se abre la posibilidad de tratar esta enfermedad, especialmente considerando que desde hace décadas se ha demostrado el efecto antibiótico de la bikaverina frente al protozoo. Otro uso biomédico importante de la bikaverina fue el reportado por Springler et al. (2016), quienes realizaron estudios sobre su efecto en la alteración de la barrera intestinal en un modelo celular diferenciado de células porcinas. Los resultados mostraron una viabilidad celular favorable, lo que podría considerarse un parámetro de seguridad. Respecto a un planteamiento en el área de microbiología clínica, recientemente (Al-Sa'ady et al., 2023) reportó que bikaverina presenta actividad antimicrobiana y antifúngica frente a cultivos patógenos, presenta efecto antagonístico frente a cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus typhi*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, y *Pseudomonas aeruginosa*, para cepas fúngicas presentó efectos en *Candida albicans*. Además, desde el enfoque farmacológico y biomédico, la bikaverina ha adquirido aplicaciones en materiales textiles. Al ser un pigmento producido naturalmente por un organismo fúngico, se considera un material atractivo en el proceso de teñido (Velmurugan et al., 2010; Dos Santos et al., 2020). Otra aplicación en la que los policétidos fúngicos han tenido auge tanto en enfoque industrial, como en el campo de la investigación aplicada, ha sido en procesos de biocontrol agrícola. Puesto que se ha afirmado que *Fusarium* es un hongo fitopatógeno, algunos metabolitos secundarios aislados han presentado efectos

positivos sobre el tizón tardío del tomate, entre ellos bikaverina que redujo el efecto de la enfermedad un 71% aproximadamente (Kim et al., 2007). Puesto que el enfoque de biosíntesis se encuentra encaminado a mejorar el rendimiento de los cultivos fúngicos desde un punto de vista genético y molecular, es importante también explorar más a fondo los efectos de las variables físicas y dilucidar esta problemática desde una perspectiva de ingeniería química.

Dado que el género *Fusarium* es el más estudiado sobre la biosíntesis de bikaverina, es importante mencionar que se han reportado otras especies fúngicas capaces de producirla, aunque en menor proporción. El estudio y aislamiento de *F. moniliforme* incluyó determinaciones estructurales para validar su estructura química, por lo tanto, la especie *moniliforme* es un antecedente confiable para profundizar acerca de los cambios metabólicos que influyen en la biosíntesis de bikaverina. En la Tabla 2, se muestra una recopilación del género *Fusarium* donde se ha trabajado en la caracterización de bikaverina, con diversos aportes científicos.

Las aportaciones en tema de patentes acerca de la bikaverina, de acuerdo con la revisión actual, en la base de datos "Lens.org®" se han reportado 87 registros de patentes relacionadas a la producción de bikaverina, en cierta medida algunas de ellas difieren en aplicaciones y el acceso a la información precisa es limitada. En la Figura 3 se muestra una distribución de patentes en distintas áreas del conocimiento y que tienen relación directa con la producción de bikaverina, cabe mencionar que la jurisdicción a la que pertenecen es a algunos países del continente europeo, China y en su mayoría Estados Unidos, con 53 de las patentes registradas, además, existe un mayor porcentaje de invenciones enfocadas a hacia la industria farmacológica y microbiología, con 27 y 31 patentes respectivamente.

No obstante, la menor cantidad de patentes enfocadas a la industria textil, con una patente registrada (Lens.org, 2025). En el

Artículos

Tabla 2. Especies fúngicas que han sido registradas como productoras de bikaverina, encaminadas hacia diferentes perspectivas en aportes científicos.

Cepa	Área de interés científico	Referencia
<i>Fusarium fujikuroi</i>	Producción de Metabolitos secundarios	(Janevska & Tudzynski, 2018)
<i>Fusarium moniliforme</i> Sheldon	Producción de metabolitos secundarios	(Latus-Ziętkiewicz <i>et al.</i> , 2006)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Producción de metabolitos secundarios y procesos de separación	(Mendonça <i>et al.</i> , 2021)
<i>Fusarium verticillioides</i>	Biología molecular	(Lazzaro <i>et al.</i> , 2012)
<i>Fusarium spp</i>	Biología molecular	(Deshmukh & Purohit, 2014)
<i>Fusarium proliferatum</i>	Biología molecular	(Kohut <i>et al.</i> , 2010)
<i>Fusarium lycopersici</i>	Cultivo celular	(Nirmaladevi <i>et al.</i> , 2014)
<i>Fusarium agapanthi</i>	Biología molecular	(Edwards <i>et al.</i> , 2016)
<i>Fusarium bulbigenum</i>	Producción de metabolitos secundarios	(Medentsev <i>et al.</i> , 2005)
<i>Fusarium graminearum</i>	Producción de metabolitos secundarios	
<i>Fusarium circinatum</i>	Biología molecular	(Phasha <i>et al.</i> , 2021)
<i>Cladobotryum varium</i>	Caracterización microbiológica	(Milic <i>et al.</i> , 2022)
<i>Botrytis cinerea</i>	Biología molecular	(Schumacher <i>et al.</i> , 2013)

área de microbiología comprenden los métodos de utilización y producción de “Biomats” provenientes de hongos filamentosos, entre ellos *Fusarium* (Kozubal *et al.*, 2019).

No obstante, la menor cantidad de patentes enfocadas a la industria textil, con una patente registrada (Lens.org, 2025). En el área de microbiología comprenden los métodos de utilización y producción de “Biomats” provenientes de hongos filamentosos, entre ellos *Fusarium* (Kozubal *et al.*, 2019).

Factores físicos que afectan la producción de bikaverina

La transformación del oxígeno y otros gases, y su transporte en una fase líquido es uno de los principales desafíos para la ingeniería de biorreactores (De Jesús *et al.*, 2017). Existen diversos procesos biológicos que ocurren en presencia de microorganismos aeróbicos, en los cuales el medio puede volverse altamente viscoso en función del tiempo, lo que genera

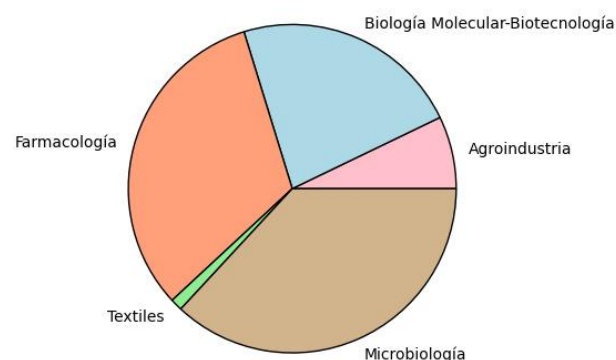


Figura 3. Relación de patentes recopiladas en relación con la producción de bikaverina con un enfoque en distintas áreas del conocimiento científico. (Elaboración propia)

limitaciones en los sistemas de aireación, agitación y mezclado, en cierto modo es importante mantener constante, o bien, lo más constante posible el suministro de oxígeno gaseoso en el seno del líquido

para el crecimiento y mantenimiento celular y así lograr un producto determinado. Generalmente en el caso de hongos filamentosos, la obtención de metabolitos secundarios y/o algunos intermediarios.

En la Figura 4, se muestra un esquema de la transferencia de oxígeno a través de las células.

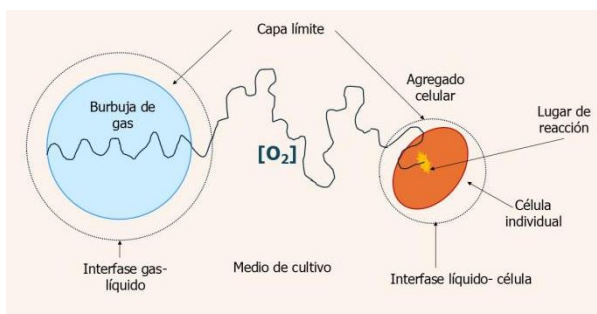


Figura 4. Mecanismo de transferencia de oxígeno desde su origen en la burbuja de gas, su trayectoria en el seno del líquido hasta llegar a la célula. (Adaptado de Bailey & Ollis, 1977)

La selección del biorreactor adecuado para obtener un producto final específico requiere que se tome en cuenta una serie de criterios y factores. Entre ellos se incluyen la geometría, el sistema de agitación y aireación, el tamaño y la forma del difusor, el material del biorreactor, la facilidad de operación y control, su capacidad para separar el producto del medio o los subproductos, el consumo de energía y, finalmente, la facilidad de limpieza y desinfección posterior al proceso, especialmente cuando es un proceso por lotes (Moucha *et al.*, 2003; Ju *et al.*, 2009). Estudiar los aspectos operacionales y optimizar las variables que influyen en el entorno de un biorreactor no es una actividad sencilla. Una alternativa viable para comenzar es comprender el comportamiento hidrodinámico del biorreactor, debido a que este conocimiento es esencial para entender los fenómenos de transporte involucrados en su operación. Entre las variables hidrodinámicas importantes se encuentran la velocidad de circulación del líquido, el tiempo de mezclado, la retención de gas, el diámetro de la burbuja, la transferencia de masa ($k_L a$) y la velocidad de corte (Guieysse *et al.*, 2011). Para que en una fermentación fúngica la transferencia de oxígeno de la fase gaseosa a la fase líquida sea eficiente, se debe evitar la generación de regiones de alto cizallamiento, dado que estas

afectan a las células y producen cambios morfológicos irreversibles en el microorganismo, por lo tanto, el efecto incide directamente en la regulación metabólica de los productos. Por esta razón, se debe evaluar cuidadosamente el efecto de la agitación sobre la morfología de los cultivos sumergidos. Por otro lado, la velocidad del agitador y la intensidad de la mezcla tienen un papel importante en la ruptura de las burbujas. Para crear una mayor turbulencia en el medio y romper las burbujas, muchos biorreactores utilizan un conjunto de deflectores, lo que también puede provocar una mayor velocidad de cizallamiento (García-Ochoa & Gómez, 2009). Por lo tanto, es imperativo entender que para algunos procesos fermentativos donde esté involucrado un microorganismo sensible a fuerzas mecánicas, como el caso de *G. fujikuroi* lo más conveniente en el caso es optar por la elección de un biorreactor de agitación neumática como es el caso de los biorreactores *Airlift*. La funcionalidad principal de este tipo de biorreactores es la recirculación de líquidos, característica que asegura un correcto mezclado, este efecto es dado por las cuatro secciones distintas; el tubo ascendente (*Raiser*), el tubo descendente (*Downcomer*), el separador de gas y el fondo. Además, estos biorreactores presentan un bajo consumo de energía, y que la manufactura y la construcción es relativamente simple y sin partes móviles (Chisti & Moo-Young, 1989). Además de los fenómenos de transporte es importante analizar otras variables físicas que pueden influir en el proceso, entre ellas; la temperatura, pH, agitación y presión.

Efecto de la temperatura

Son escasos los estudios enfocados a las relaciones de temperatura en cultivos agitados, de *G. fujikuroi*, específicamente en la producción de bikaverina. En su mayoría el enfoque principal es encaminado hacia otros metabolitos de interés, sin embargo, existen reportes sobre efecto de la temperatura en la tasa de crecimiento de hongos en estado sólido. Estudios recientes han establecido los rangos de temperatura óptimos para el crecimiento de *G. fujikuroi* (también identificado como *Fusarium moniliforme*).

Chen et al. (2020) evaluaron cepas infectantes en arroz y observaron un crecimiento radial efectivo dentro de un rango aproximado de 15 a 30 °C, con temperaturas óptimas en torno a 22 – 26 °C. Asimismo, Rodríguez et al. (2024) reportaron condiciones óptimas en sistemas de fermentación a 28 – 30 °C y pH cercano a 5, con rendimiento alto de ácido Giberélico y crecimiento vigoroso del hongo. Aun con los estudios realizados es difícil establecer las relaciones de temperatura de los parámetros obtenidos durante la fase de almacenamiento, operación y/o funcionamiento, en cada proceso puede variar no sólo con la temperatura durante la fase de almacenamiento, sino también con el tratamiento previo de las células. En otras palabras, la actividad potencial de las células no es necesariamente la misma en todas las fermentaciones, por lo tanto, al tener control total sobre su estado fisiológico, podrían mostrar un patrón diferente de relaciones de temperatura en las fermentaciones, así como en condiciones de incubación y almacenamiento.

Efecto del pH

Además de la temperatura, hay otras variables químicas que están directamente relacionadas con la regulación metabólica de los productos de interés, y que a su vez esta puede ser medida y/o controlada desde un sensor equipado en un biorreactor. El efecto del pH sobre la producción de bikaverina en un proceso fermentativo de *G. fujikuroi* ha sido analizado previamente. En algunas especies de hongos, la bikaverina se encuentra en menor concentración en comparación de la norbikaverina, y a su vez la formación de estos metabolitos por diferentes especies de hongos depende directamente de las condiciones del medio de cultivo, pero es afectada principalmente por la disponibilidad baja de nitrógeno y el pH ácido (Limón et al., 2010).

La regulación de las rutas metabólicas en *G. fujikuroi* ha sido ampliamente estudiada, especialmente en relación con la biosíntesis de ácido giberélico. No obstante, también se han reportado investigaciones centradas en otros metabolitos secundarios, como la bikaverina, en las cuales se ha identificado y caracterizado un conjunto específico de genes y enzimas clave involucrados en su producción. En *G. fujikuroi*, la formación de bikaverina es inducida por la ausencia de nitrógeno y el pH ácido principalmente, por lo tanto, es favorecida por

otras variables físicas, como la aireación, la escasez de algunas sales fosfatadas, o la disponibilidad de sacarosa, o bien, la relación entre ellos (Linnemannstöns et al., 2002). De acuerdo con la investigación presentada por Wiemann et al., (2009) en una fermentación inicial con un pH alcalino reprime fuertemente la expresión de genes que codifican para la producción de bikaverina, por lo tanto, lo ideal para este proceso fermentativo es acidificar el medio. A pH ácido los iones H^+ predominan en el medio y en consecuencia afecta el transporte los mismos al interior de las células, lo cual implica una respuesta cualitativa con la presencia del cambio de coloración en el medio en función del tiempo.

Efecto de la agitación

Si bien la producción de algunos metabolitos secundarios producidos alcanzó niveles más altos en columnas de burbujeo, se logró una mayor productividad en un biorreactor de tanque agitado (Camara et al., 2020; Cerri & Badino, 2012). El aumento en el rendimiento probablemente esté relacionado con una aireación forzada y una agitación parcialmente homogénea, que proporciona la oxigenación y tiempo de mezclado en medio, sin embargo, esta característica puede diferir al operar en un biorreactor *Airlift* que por su composición geométrica, es posible que, al proveer un mecanismo de aireación forzada favorezca la transferencia de oxígeno, y minimice los esfuerzos de corte debió a que no existe una fuerza mecánica producida por propelas, por lo tanto, es proceso puede ser más eficiente (Mendoza-Martínez & Escamilla-Silva, 2013). La mayoría de los ensayos experimentales relacionados con la agitación y la producción de bikaverina se centran en la biosíntesis. Sin embargo, se puede afirmar que en una agitación en matraz resulta más complejo controlar el suministro de aire o cualquier otro gas. Por ello, para estudiar en profundidad el efecto directo sobre la producción de bikaverina, es crucial realizar una evaluación que contemple los aspectos geométricos de los biorreactores comerciales, como el *Airlift*, el tanque agitado y el lecho empacado. En este caso, la variable de respuesta debe

ser la producción de bikaverina, al utilizar un suministro de gas constante mediante un mecanismo de aireación forzada, y al analizar la geometría de los biorreactores mencionados, es posible que en el *Airlift* los rendimientos tanto de crecimiento celular,

como productividad de bikaverina sean más altos en comparación con los otros tipos de biorreactores. En la Tabla 3, se muestran algunos de los tipos de impulsores mecánicos y neumáticos que se han utilizado en la producción de bikaverina asociado a la geometría de este.

Tabla 3. Comparación de diferentes mecanismos de agitación, configuraciones geométricas de biorreactores, producción de bikaverina y el coeficiente volumétrico de transferencia de masa.

Biorreactor	Microorganismo	Capacidad (L)	Producción reportada (mg/L)	Coeficiente Volumétrico de transferencia de masa global ($K_L a$) (h^{-1})	Configuración	Agitador/ Difusor	Referencia
Tanque agitado	<i>Fusarium oxysporum</i> CTT7620	1	300	20	Mecánica	Tipo oreja de elefante	(Dos Santos <i>et al.</i> , 2022)
<i>Airlift</i> de lazo interno	<i>Fusarium oxysporum</i> CCT7620	5	Absorción de pigmento (485 nm = 1.2)	*npi	Neumática	Cruceta perforada	(Dos Santos <i>et al.</i> , 2020)
Tanque agitado	<i>Gibberella fujikuroi</i> CDBB-H-984	3	106.29	41.42	Mecánica	Rushton	(Chávez-Parga <i>et al.</i> , 2014)
Biorreactor <i>Airlift</i> de lazo interno	<i>Gibberella fujikuroi</i> CDBB-H-984	3.5	14	*npi	Neumática	Cilíndrico	(Chávez-Parga <i>et al.</i> , 2008)
Biorreactor de lecho fluidizado	<i>Gibberella fujikuroi</i> CDBB-H-984	3.5	1200	*npi	Neumática	Cilíndrico	(Chávez-Parga <i>et al.</i> , 2005)
Biorreactor de lecho fluidizado	<i>Gibberella fujikuroi</i> CDBB-H-984	3.5	6830	*npi	Neumática	Cilíndrico	(Escamilla-Silva <i>et al.</i> , 2001)

*npi = no presenta información.

Como se presenta en la Tabla 3, la escala industrial no ha sido reportada hasta ahora, existen muchas posibilidades ante esta particular situación y potencialmente se debe a la limitada información acerca de modelos de escalamiento, por lo tanto, es ineludible continuar con una vía de desarrollo en ingeniería actual para obtener esta información y continuar el estudio de este policétido, y no solo la bikaverina, si no de muchos otros metabolitos secundarios fúngicos, cuyas características y propiedades permitan el desarrollo de productos innovadores en distintos sectores industriales.

Efecto de la presión hidrostática

La presión hidrostática dentro del biorreactor, desde el punto de vista físico no ha sido considerada un factor directamente involucrado en la regulación metabólica de *G. fujikuroi* para la producción de bikaverina. No

obstante, esta variable es importante desde el punto de vista del diseño y operación del sistema, especialmente en biorreactores *Airlift*. En estos sistemas, el gradiente de presión hidrostática generado entre la zona de ascenso y descenso promueve la circulación del líquido, mejora el mezclado y contribuye a minimizar zonas muertas, es decir, regiones transferencia de masa mínimas y movimiento deficiente, aunado también a los cambios reológicos del sistema en función del tiempo. Adicionalmente, un aumento en la presión hidrostática incrementa la solubilidad del oxígeno en el medio líquido, de acuerdo con la Ley de Henry, de esta manera se favorece la eficiencia de transferencia de oxígeno, el cual es un aspecto crítico en procesos aeróbicos fúngicos. En las últimas dos décadas, diversos estudios han reportado correlaciones entre la presión y

parámetros hidrodinámicos clave, como el tiempo de mezclado y el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (Chisti, 1998; Joshi et al., 1990; Petersen & Margaritis, 2001). Esto sugiere que, para un diseño exitoso, es fundamental comprender los parámetros de mezcla para facilitar un posible escalamiento industrial, no obstante, la presión es una variable que afecta directamente en los procesos de transferencia de masa, las reacciones en las cuales se encuentra involucrada una fase gas-líquido la presión juega un papel fundamental puesto que las velocidades de reacción están limitadas por la resistencia a la transferencia de masa en la fase líquida, y los biorreactores *Airlift* al constar principalmente por un suministro constante de gas, la tensión superficial está involucrada y por consecuencia la presión a un nivel micro molecular. Algunos estudios muestran el efecto de los cambios de presión sobre el coeficiente volumétrico de transferencia de masa en la interfaz líquido-gas en un intervalo de presión amplio al evaluar diferentes gases, al afirmar que los coeficientes de transferencia de masa en fase líquida no son afectados significativamente con algunos gases nobles, no obstante, el sistema de Helio p-xileno, exhibió una disminución en el coeficiente a una presión superior a 70 atm. Aunque es un método que ha aplicado durante años, es efectivo y preciso, este método tiene varias ventajas, como la rapidez en la respuesta del extensómetro, se pueden medir cambios de presión muy rápidos sin un retraso de tiempo significativo, como el que se produce cuando se utiliza un electrodo de membrana, sin embargo, la limitación se encuentra en el tamaño del extensómetro cuando se trata de un biorreactor de gran capacidad. Otra de las principales ventajas es que, aunque los electrodos de membrana sólo pueden usarse para determinar la concentración de unos pocos gases especiales como oxígeno y dióxido de carbono, el presente método puede aplicarse a cualquier sistema gas-líquido. Pero, este método no se puede utilizar para sistemas gas-líquido donde los gases son altamente solubles debido a que el volumen en ambas fases puede variar significativamente durante un experimento, lo que trae como consecuencia algunos falsos positivos.

En el análisis de la transferencia de oxígeno en sistemas gas-líquido, la presión hidrostática desempeña un papel relevante al influir

directamente en la solubilidad del oxígeno disuelto, de acuerdo con la Ley de Henry. En biorreactores *Airlift*, el aumento en presión parcial del oxígeno incrementa su concentración en la interfase gas-líquido, lo cual puede favorecer el rendimiento del coeficiente volumétrico de transferencia de masa $k_L a$.

La ecuación clásica basada en balances de masa, como la propuesta por Teramoto et al. (1974), permite estimar la concentración de oxígeno en fase líquida bajo condiciones donde la difusividad y viscosidad del sistema se consideran constantes (Ecuación 1), donde: C_L se refiere a la concentración de oxígeno en la fase líquida ($g\ mol/cm^3$); n_L número de moles en la fase líquida ($g\ mol$); V_L volumen de la fase líquida (cm^3); n_t número de moles totales ($g\ mol$); n_G número de moles en la fase gaseosa ($g\ mol$); P Presión del sistema (atm); V_G Volumen en la fase gaseosa (cm^3); z factor de compresibilidad, R constante de los gases ($cm^3 atm/g\ mol\ K$); T Temperatura (K).

$$C_L = n_L/V_L = (n_t - n_G)/V_L = (n_t - PV_G/zRT)/V_L$$

(Ecuación 1)

En esta expresión, la presión P se incorpora explícitamente, reflejando su influencia sobre la cantidad de oxígeno gaseoso transferido al líquido. No obstante, estudios recientes han señalado que, en condiciones reales, parámetros como la viscosidad del medio o la acumulación de biomasa pueden modificar significativamente la eficiencia de transferencia, incluso bajo presión elevada. Mast et al., (2023) observaron una disminución del rendimiento de $k_L a$ en medios viscosos, a pesar de mantener la presión y el régimen de agitación constantes.

En consecuencia, aunque la presión hidrostática puede mejorar la solubilidad del oxígeno, su efecto sobre la transferencia de masa real depende también de las condiciones reológicas del medio, la geometría del biorreactor y la interacción entre las fases, aspectos que deben ser considerados al estimar $k_L a$ de forma más

precisa en bioprocesos de cultivo sumergido. Expertos en fenómenos de transporte han optado por prevenir estas situaciones durante una etapa experimental a través de herramientas computacionales modernas, las cuales prevén pérdidas de tiempo, como lo que ofrecen los softwares enfocados en estudios de la fluidodinámica computacional. Recientemente, estudios reportados por (Al-Mashhadani et al., 2015), estudiaron un modelo simulado para dar una respuesta decisiva en el diseño de un biorreactor *Airlift*. Finalmente se dio una respuesta favorable para evitar zonas muertas asociada a las deficiencias de mezclado y determinar una mejora en la transferencia de masa en bioprocesos, por lo tanto, la presión se involucra el modelado de flujo de microburbujas al utilizar la ecuación de transporte de *momentum*, ecuación 2.

$$\phi_l \rho_l \frac{\partial u_l}{\partial t} + \phi_l \rho_l u_l * \nabla u_l = -\nabla P + \nabla * [\phi_l \eta_l (\nabla u_l + \nabla u_l^T)] + \phi_l \rho_l g \quad (\text{Ecuación 2})$$

En este análisis, se consideran varias propiedades físicas relevantes para la descripción del comportamiento hidrodinámico del sistema. La fracción de volumen de la fase líquida, representada por ϕ_l , se expresa en metros cúbicos de líquido por metro cúbico total del sistema (m^3/m^3), la densidad del líquido, ρ_l , se cuantifica en kilogramos por metro cúbico (Kg/m^3), mientras que su velocidad media, u_l , se expresa en metros por segundo (m/s), el tiempo de residencia o de operación se representa con la variable t en segundos (s) y la presión del sistema se denota como P , en pascales Pa . Por otro lado, la viscosidad dinámica del líquido, η_l , se mide en pascal-segundo ($Pa * s$) y la aceleración debida a la gravedad, g , se expresa en metros por segundo al cuadrado m/s^2 .

De manera similar, Marroquín-Fandiño et al., (2020) exploraron las herramientas de COMSOL Multiphysics® para evaluar la dinámica de fluidos computacional para la construcción de un biorreactor *Airlift* de lazo externo a escala milimétrica. Previo al establecer el diseño de un biorreactor con *Airlift*, es necesario realizar una simulación computacional para minimizar posibles errores operativos que puedan afectar directamente el proceso, y así, evitar pérdidas monetarias asociadas a un cambio estructural o de

materiales, además de validar el efecto de las variables fisicoquímicas que se discutieron en la presente revisión. Esto es importante, en virtud de que la calidad de las células podría ser significativamente alterada. A partir de este enfoque, es posible analizar diferentes perspectivas que incluyen áreas con impacto académico y científico. Un ejemplo de ello es el diseño asistido por computadora y herramientas de Dinámica de Fluidos Computacional, que permite simular la funcionalidad del biorreactor desde un enfoque microscópico, al estimar teóricamente los fenómenos de transferencia de masa.

Uso de biorreactores en la producción de bikaverina

Los biorreactores son dispositivos aislados, fundamentales en los bioprocesos, utilizados para cultivar organismos vivos, desde bacterias, levadura, hongos filamentosos, células vegetales, tejidos, entre otros. Estos sistemas permiten la producción de una amplia variedad de productos biotecnológicos, como fármacos, enzimas, alimentos funcionales, metabolitos secundarios, etc. Su importancia radica en que proporcionan un ambiente controlado para la proliferación de microorganismos o células. Uno de los desafíos más grandes en bioprocesos, es la selección y diseño de un biorreactor, debido a que es importante tomar en cuenta diferentes criterios operacionales en función de lo que se desea obtener como producto final. Para la producción de bikaverina a partir del hongo *G. fujikuroi* es importante tomar en cuenta diversos factores, esencialmente, lo que se ha reportado es la limitación de nitrógeno, el pH (Limón et al., 2010), aireación (Giordano & Domenech, 1999); en el caso de *G. fujikuroi*, es fundamental considerar la sensibilidad de sus estructuras miceliales frente a los cambios en el régimen de flujo dentro del sistema de cultivo, los cuales están dominados principalmente por el mecanismo de agitación. Los biorreactores de tanque agitado representan una alternativa viable para la producción de bikaverina, especialmente en términos de escalabilidad, dado que su diseño ha sido ampliamente estudiado y estandarizado a lo largo del tiempo. Sin embargo, esta

tecnología presenta limitaciones importantes. Entre ellas, destacan el elevado consumo energético asociado al motor de agitación y, sobre todo, el régimen de flujo turbulento generado por las hélices, que provoca esfuerzos de corte significativos, los cuales pueden dañar seriamente las estructuras fúngicas, en consecuencia, afecta negativamente el crecimiento y la productividad del hongo. Merchuk, (1990) menciona que algunos cultivos vegetales, incluidos los hongos filamentosos tienden a formar aglomerados en estructuras metálicas, al formar una capa superficial en la que incrementa el factor de ensuciamiento, tomando en cuenta esta información, el uso de un biorreactor de tanque agitado, es una alternativa limitada en este tipo de procesos, por lo que en esta revisión se propone analizar con mayor profundidad la alternativa del uso de un biorreactor con agitación neumática, este tipo de biorreactores garantizan una agitación homogénea y un mezclado eficiente sin exponer a las células a fuerzas de cizallamiento que puedan afectar a su proliferación y desarrollo, sin embargo, dentro de los biorreactores de agitación neumática existen diferentes configuraciones geométricas, desde una columna de burbujeo hasta biorreactores *Airlift*.

Los biorreactores de agitación neumática utilizan principalmente la inyección de una corriente gaseosa, generalmente aire, para garantizar el mezclado y facilitar la transferencia de sustancias gaseosas (como O_2 y CO_2) hacia la fase líquida. A diferencia de los reactores clásicos de agitación neumática con flujo aleatorio, como las columnas de burbujas, el diseño específico de los biorreactores *Airlift* permite que el líquido circule entre dos zonas interconectadas denominadas "*Raiser*" y "*Downcomer*" (Siegel & Robinson, 1992). Actualmente, la investigación y el desarrollo de los biorreactores *Airlift* se han centrado en demostrar el potencial de este sistema en nuevas aplicaciones, así como en modelar las complejas relaciones entre los parámetros de diseño, operación, dinámica de fluidos y transferencia de masa. Existen numerosos modelos experimentales capaces de describir el funcionamiento y el rendimiento de estos biorreactores (Guieysse et al., 2011). Sin embargo, la validez de dichos modelos suele estar limitada a aplicaciones y configuraciones

específicas del reactor. Por ello, en este trabajo se analizan los modelos más relevantes y ampliamente aceptados, con el objetivo de ilustrar cómo los parámetros de diseño, operación y funcionamiento afectan la dinámica de fluidos y las propiedades de transferencia de masa.

En los últimos 25 años se publicaron investigaciones relacionadas con la producción de bikaverina, con énfasis en distintas áreas de conocimiento. No obstante, la publicación acerca del uso de biorreactores *Airlift*, dado que la mayoría de ellas presentan un enfoque electrónico, y con directrices en instrumentación y control. Por lo tanto, se deduce que ambas áreas correlacionadas representan una oportunidad para realizar aportes significativos en los campos de la biotecnología y la bioingeniería. Ver Figura 5.

Los biorreactores *Airlift* se presentan en diversas configuraciones, las cuales se clasifican según su estructura física. Entre las más comunes se encuentran los de lazo interno y lazo externo. En ambos casos, los biorreactores están compuestos por compartimientos separados para la zona de ascenso y la zona de descenso, los cuales se interconectan mediante tubos horizontales. Sin embargo, en la configuración de lazo interno, ambas zonas se encuentran en el mismo recipiente y se separan únicamente por un deflector. Ambas configuraciones ofrecen ventajas frente a los biorreactores de agitación mecánica. Una de las principales diferencias entre los biorreactores *Airlift* de lazo interno y los de lazo externo radica en la disposición del conducto de la zona de descenso. En los sistemas de lazo interno, este se encuentra dentro del mismo cuerpo del biorreactor, lo que puede generar zonas de flujo menos definidas y dificultar la separación de fases. En contraste, los biorreactores de lazo externo presentan un *riser* y un *downcomer* físicamente separados mediante un circuito externo, lo que favorece el control de la circulación del medio y favorece la eficiencia de la transferencia de masa y el mezclado, en consecuencia, reduce la posibilidad de zonas muertas o cortocircuitos hidráulicos.

Artículos

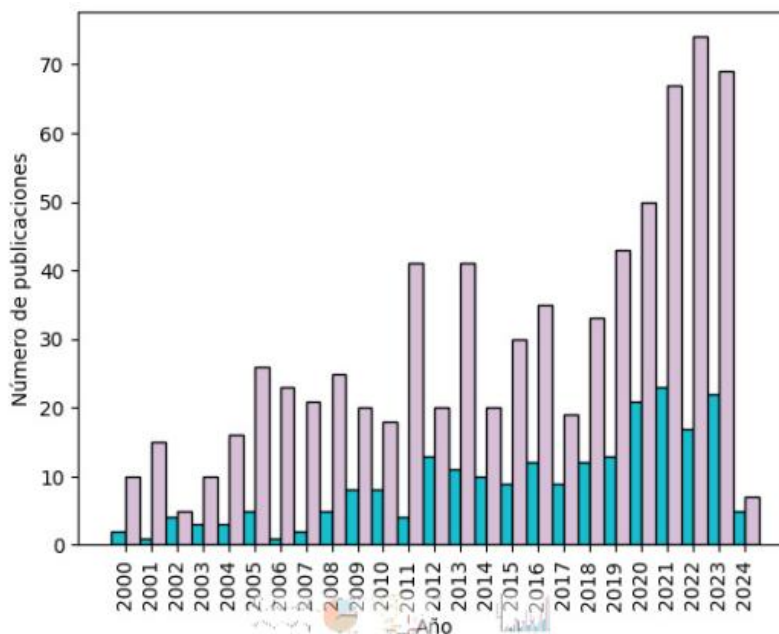


Figura 5. Publicaciones realizadas en los últimos 25 años. (barras azules) = acerca de la producción de bikaverina, (barras púrpuras) = acerca de biorreactores Airlift. (Elaboración propia)

Esta configuración resulta especialmente ventajosa para la producción de bikaverina mediante fermentación aeróbica con *G. fujikuroi*, dado que la máxima productividad se asocia con una distribución homogénea de nutrientes, bajos esfuerzos de corte y una adecuada disponibilidad de oxígeno disuelto.

Por lo tanto, el uso de un biorreactor *Airlift* de lazo externo representa una alternativa tecnológica prometedora para escalar este proceso de forma eficiente y sostenible, además el suministro limitado de oxígeno afecta la demanda basal de los microorganismos, por lo que, la baja solubilidad de la fase gaseosa provoca que la aireación sea un factor crítico en el escalamiento de procesos fermentativos (Amaral et al., 2008; Olsvik & Kristiansen, 1992). Además, Giordano & Domenech, (1999) reportaron que las tasas de aireación en cultivos sumergidos de *G. fujikuroi* promueve el crecimiento y la productividad de bikaverina y giberelinas, mientras que las tasas bajas estimulan la productividad de ácidos grasos y fusarina C. En este sentido, el uso de un biorreactor tipo *Airlift*, que permite un suministro continuo de aire sin componentes mecánicos de agitación, puede favorecer una transferencia de oxígeno más eficiente en comparación con otros sistemas,

especialmente en cultivos de hongos sensibles al esfuerzo de corte. Estas características lo posicionan como una alternativa prometedora para procesos de producción de bikaverina y para el desarrollo de estrategias de escalamiento industrial.

En cuanto a los estudios físicos y fenomenológicos que abordan los efectos de la difusión y transferencia de oxígeno en procesos biológicos, como la fermentación de *G. fujikuroi* para la producción de bikaverina, se observa que la información precisa sobre la correlación entre las variables fisicoquímicas y metabólicas del entorno de reacción permanece limitada. Sin embargo, es posible escalar este proceso a nivel industrial al establecer las bases teórico-prácticas de la ingeniería química y la biología. Además, es fundamental mejorar los aspectos físicos y operacionales relacionados con el rendimiento del proceso. Profundizar en este tema es crucial debido al impacto potencial en sectores como el alimentario, textil y farmacéutico, al desarrollar estrategias metodológicas para producir bikaverina a escala industrial.

Perspectivas hacia la producción industrial

Actualmente, no existen reportes sobre la producción de bikaverina a escala industrial. La mayoría de los desarrollos industriales en especies del género *Fusarium* han estado dirigidos principalmente a la obtención de giberelinas y otras micotoxinas de interés comercial. Un ejemplo destacado es el proceso patentado en Estados Unidos en 2010 (Rangaswamy & Balu, 2010), que describe la producción de ácido giberélico (GA₃) mediante fermentación en estado sólido con *Fusarium moniliforme*, alcanzando un rendimiento de hasta 225 g/kg, así como más de 15 g/L en sistemas de fermentación sumergida.

Estos antecedentes demuestran el potencial biotecnológico del género y abren la posibilidad de explorar estrategias similares para la bikaverina, un metabolito secundario con aplicaciones potenciales en las industrias farmacéutica, biomédica y cosmética. Sin embargo, las bases para su escalamiento aún requieren desarrollo y consolidación, tanto en términos de comprensión metabólica como de ingeniería del proceso.

A medida que se profundiza en la caracterización de *G. fujikuroi* y sus rutas biosintéticas, y considerando los beneficios potenciales de la bikaverina en aplicaciones biomédicas, su producción industrial se perfila como un objetivo alcanzable a mediano plazo.

Conclusiones y perspectivas finales

Existen numerosas variables que deben ser estudiadas y exploradas para mejorar continuamente los procesos de producción de metabolitos secundarios fúngicos, como la bikaverina. Estas variables abarcan aspectos multidisciplinarios, como biología molecular, microbiología, bioquímica y bioingeniería. La comprensión y optimización de variables fenomenológicas, como la eficiencia de mezclado y la transferencia de masa, son esenciales en procesos fermentativos por su influencia directa en el desempeño de diversos bioprocesos. En este contexto, la elección o el diseño del biorreactor debe alinearse con las características específicas del sistema. Para la producción de bikaverina al utilizar *G. fujikuroi*, factores como el pH, la limitación de nitrógeno, la ausencia de sales de fosfato y sulfato, una adecuada transferencia de oxígeno y bajos esfuerzos de corte resultan determinantes para maximizar su síntesis. Por lo tanto, el uso de n

biorreactor *Airlift* de lazo externo representa una alternativa prometedora para consolidar la producción de bikaverina a mayor escala.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca de Doctorado en Ciencias en Ingeniería Química, con número de CVU:1081080. Al laboratorio de Biotecnología y Bioingeniería de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por el apoyo en infraestructura para la realización del proyecto.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Referencias

- Al-Mashhadani, M. K. H., Wilkinson, S. J., & Zimmerman, W. B. (2015). Airlift bioreactor for biological applications with microbubble mediated transport processes. *Chemical Engineering Science*, 137, 243–253. <https://doi.org/10.1016/J.CES.2015.06.032>
- Al-Sa'ady, A. J., J Al-Obaidi, M., & Hanoon, A. Y. (2023). Study The Improvement Myco-manufacturing of Crud Bikaverin by *Fusarium oxysporum* with Evaluation the Antimicrobial Effectiveness. *University of Thi-Qar Journal of Science*, 10(1), 55–60. <https://doi.org/10.32792/utq/utjsci/v10i1.926>
- Amaral, P. F. F., Freire, M. G., Rocha-Leão, M. H. M., Marrucho, I. M., Coutinho, J. A. P., & Coelho, A. Z. (2008). Optimization of oxygen mass transfer in a multiphase bioreactor with perfluorodecalin as a second liquid phase. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(3), 588–598. <https://doi.org/10.1002/bit.21640>
- Avalos, J., Fernández-Martín, R., Prado, M. N., Giordano, W., Domenech, C. E., & Cerda-Olmedo, (1999). Biosíntesis de giberelinas, bikaverina y carotenoides en *Gibberella fujikuroi*. IV Simposio Científico En Biología Celular y Molecular, 169–188.

- Bailey, J. E., & Ollis, D. F. (1977). *Biochemical Engineering Fundamentals* (McGraw-Hill, Ed.; 2nd ed.).
- Beyzi, E., Külahcı, M. B., & Çerçi, N. A. (2024). Investigation of the mutagenic, cytotoxic and antimicrobial effect of bikaverin mycotoxin. *Bioscience Journal*, 40, e40020. <https://doi.org/10.14393/bj-v40n0a2024-70910>
- Camara, M. C., Vandenberghe, L. P. S., Sextos, G. C., Tanobe, V. O. A., Magalhães Junior, A. I., & Socol, C. R. (2020). Alternative methods for gibberellic acid production, recovery and formulation: A case study for product cost reduction. *Bioresource Technology*, 309, 123295. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.123295>
- Cerri, M. O., & Badino, A. C. (2012). Shear conditions in clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in stirred tank and airlift bioreactors. *Bioprocess And Biosystems Engineering*, 35(6), 977-984. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0682-8>
- Chávez-Parga, M. del C., Gonzalez-Ortega, O., Negrete-Rodríguez, M. de la L. X., Vallarino, I. G., Alatorre, G. G., & Escamilla-Silva, E. M. (2008). Kinetic of the gibberellic acid and bikaverin production in an airlift bioreactor. *Process Biochemistry*, 43(8), 855-860. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2008.04.007>
- Chávez-Parga, M. del C., González-Ortega, O., Sánchez-Cornejo, G., Negrete-Rodríguez, M. D. L. X., González-Alatorre, G., & Escamilla-Silva, E. M. (2005). Mathematical description of bikaverin production in a fluidized bed bioreactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5), 683-688. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-3854-0>
- Chávez-Parga, M. del C., Maya-Yescas, R., & Hinojosa Ventura, G. (2014). Effect of rates of aeration and agitation on the volumetric coefficient of oxygen transfer in the production of bikaverin. *In Article in International Review of Chemical Engineering*. <https://www.researchgate.net/publication/363413563>
- Chen, C., Chen, S., Liu, C., Wu, D., Kuo, C., Lin, C., Chou, H., Wang, Y., Tsai, Y., Lai, M., & Chung, C. (2020). Invasion and Colonization Pattern of *Fusarium fujikuroi* in Rice. *Phytopathology*, 110(12), 1934-1945. <https://doi.org/10.1094/phyto-03-20-0068-r>
- Chisti, Y. (1998). Pneumatically Agitated Bioreactors in Industrial and Environmental Bioprocessing: Hydrodynamics, Hydraulics, and Transport Phenomena. *Applied Mechanics Reviews*, 51(1), 33-112. <https://doi.org/10.1115/1.3098989>
- Chisti, Y., & Moo-Young, M. (1989). On the calculation of shear rate and apparent viscosity in Airlift and bubble column bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 34(11), 1391-1392. <https://doi.org/10.1002/bit.260341107>
- De Jesús, S. S., Moreira Neto, J., & Maciel Filho, R. (2017). Hydrodynamics and mass transfer in bubble column, conventional Airlift, stirred airlift and stirred tank bioreactors, using viscous fluid: A comparative study. *Biochemical Engineering Journal*, 118, 70-81. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2016.11.019>
- Deshmukh, R., & Purohit, H. J. (2014). siRNA mediated gene silencing in *Fusarium* sp. HKF15 for overproduction of bikaverin. *Bioresource Technology*, 157, 368-371. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.02.057>
- Dos Santos, M. C., Cerri, M. O., & Bicas, J. L. (2022). Relation of shear stress and KLa on bikaverin production by *Fusarium oxysporum* CCT7620 in a bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 45(4), 733-740. <https://doi.org/10.1007/s00449-022-02693-0>
- Dos Santos, M. C., da Silva, W. S., da Silva, B. F., Cerri, M. O., Ribeiro, M. P. de A., & Bicas, J. L. (2020). Comparison of Two Methods for Counting Molds in

Fermentations Using the Production of Bikaverin by *Fusarium oxysporum* CCT7620 as a Model. *Current Microbiology*, 77(11), 3671–3679.

<https://doi.org/10.1007/s00284-020-02166-1>

Dos Santos, M. C., Mendonça, M. de L., & Bicas, J. L. (2020). Modeling bikaverin production by *Fusarium oxysporum* CCT7620 in shake flask cultures.

Bioresources and Bioprocessing, 7(1).

<https://doi.org/10.1186/s40643-020-0301-5>

Dos Santos, M. C., & Bicas, J. L. (2020). Natural blue pigments and bikaverin.

Microbiological Research, 244, 126653.

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126653>

3

Edwards, J., Auer, D., de Alwis, S.-K., Summerell, B., Aoki, T., Proctor, R. H., Busman, M., & O'Donnell, K. (2016). *Fusarium agapanthi* sp. nov., a novel bikaverin and fusarubin-producing leaf and stem spot pathogen of *Agapanthus praecox* (African lily) from Australia and Italy.

Mycologia,

108(5), 981–992.

<https://doi.org/10.3852/15-333>

Escamilla-Silva, E., Poggi-Varaldo, H., De la Torre-Martínez, M. M., Sánchez Cornejo, M. A. H., & Dendooven, L. (2001). Selective production of bikaverin in a fluidized bioreactor with immobilized *Gibberella fujikuroi*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(5), 469–474.

<https://doi.org/10.1023/A:1011926316079>

Fiyaz, R. A., Yadav, A. K., Krishnan, S. G., Ellur, R. K., Bashyal, B. M., Grover, N., Bhowmick, P. K., Nagarajan, M., Vinod, K. K., Singh, N. K., Prabhu, K. V., & Singh, A. K. (2016). Mapping quantitative trait loci responsible for resistance to *Bakanae* disease in rice. *Rice*, 9(1), 45.

<https://doi.org/10.1186/s12284-016-0117-2>

Garcia-Ochoa, F., & Gomez, E. (2009).

Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview.

Biotechnology Advances, 27(2), 153–176.

<https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2008.10.006>

Giordano, W., & Domenech, C. E. (1999).

Aeration affects acetate destination in

Gibberella fujikuroi. *FEMS Microbiology Letters*,

180(1), 111–

116. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08784.x>

Giordano, W., Avalos, J., Cerdá-Olmedo, E., &

Domenech, C. (1999). Nitrogen availability and

production of bikaverin and gibberellins in

Gibberella fujikuroi. *FEMS Microbiology Letters*,

173(2),

389–393.

[https://doi.org/10.1016/s0378-1097\(99\)00106-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1097(99)00106-8)

Guieysse, B., Quijano, G., & Muñoz, R. (2011).

Airlift Bioreactors. In *Comprehensive Biotechnology* (pp. 199–212). Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00095-7>

Haidar, S., Aichele, D., Birus, R., Hielscher, J.,

Laitinen, T., Poso, A., & Jose, J. (2019). In Vitro and In Silico Evaluation of Bikaverin as a

Potent Inhibitor of Human Protein Kinase CK2.

Molecules, 24(7), 1380.

<https://doi.org/10.3390/molecules24071380>

Hasuda, A. L., & Bracarense, A. P. F. L. (2023).

Toxicity of the emerging mycotoxins

beauvericin and enniatins: A mini-review.

Toxicon, 239, 107534.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2023.107534>

Hinojosa Ventura, G., Puebla Pérez, A. M., Gallegos Arreola, M. P., Chávez Parga, M. del C., Romero Estrada, A., & Delgado

Saucedo, J. I. (2019). Cytotoxic and

Antitumoral Effects of Bikaverin from

Gibberella fujikuroi on L5178Y

Lymphoma Murine Model. *Journal of the*

Mexican Chemical Society, 63(4).

<https://doi.org/10.29356/jmcs.v63i4.729>

- Janevska, S., & Tudzynski, B. (2018). Secondary metabolism in *Fusarium fujikuroi*: strategies to unravel the function of biosynthetic pathways. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(2), 615–630.
<https://doi.org/10.1007/s00253-017-8679-5>
- Joshi, J. B., Ranade, V. V., Gharat, S. D., & Lele, S. S. (1990). Sparged loop reactors. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 68(5), 705–741.
<https://doi.org/10.1002/cjce.5450680501>
- Ju, F., Cheng, Z.-M., Chen, J.-H., Chu, X.H., Zhou, Z.-M., & Yuan, P.-Q. (2009). A novel design for a gas-inducing impeller at the lowest critical speed. *Chemical Engineering Research and Design*, 87(8), 1069–1074.
<https://doi.org/10.1016/j.cherd.2009.01.009>
- Kim, H.-Y., Choi, G. J., Lee, H. B., Lee, S.-W., Lim, H. K., Jang, K. S., Son, S. W., Lee, S. O., Cho, Y., Sung, N. D., & Kim, J.-C. (2007). Some fungal endophytes from vegetable crops and their anti-oomycete activities against tomato late blight. *Letters in Applied Microbiology*, 44(3), 332–337.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02093.x>
- Kitagawa, A., Sugihara, Y., Okumura, M., Kawai, K., & Hamasaki, T. (1997). Reexamination of Respiration-Impairing Effect of Bikaverin on Isolated Mitochondria. *Cereal Research Communications*, 25(3), 451–452.
<https://doi.org/10.1007/BF03543751>
- Klittich, C., & Leslie, J. F. (1988). Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). *Genetics*, 118(3), 417–423.
<https://doi.org/10.1093/genetics/118.3.417>
- Kohut, G., Oláh, B., Ádám, A. L., García-Martínez, J., & Hornok, L. (2010). Adenylyl cyclase regulates heavy metal sensitivity, bikaverin production and plant tissue colonization in *Fusarium proliferatum*. *Journal of Basic Microbiology*, 50(1), 59–71.
<https://doi.org/10.1002/jobm.200900113>
- Kozubal, M. A., Macur, R. E., & Avniel, Y. C. (2019). Filamentous Fungal Biomats, Methods of Their Production and Methods of Their Use (Patent US 2019/0316078 A1).
- Kvas, M., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J., Steenkamp, W. F. O., & Steenkamp, M. J. (2009). Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex.
- Lale, G. J., & Gadre, R. V. (2016). Production of bikaverin by a *Fusarium fujikuroi* mutant in submerged cultures. *AMB Express*, 6(1).
<https://doi.org/10.1186/s13568-016-0205-0>
- Latus-Ziętkiewicz, D., Chełkowski, J., Foremska, E., Goliński, P., Grabarkiewicz-Szczesna, J., Kostecki, M., Lew, M., Perkowski, I., Piasecki, M., Wiewiórowska, M., & J. Szebiotko, K. (2006). Biosynthesis of gibberellic acid (GA3) and mycotoxins by *F. moniliforme* Sheldon and other species of Liseola section. *Natural Toxins*, 4(5), 228–233.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)\(1996\)4:5<228::AID-NT5>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)(1996)4:5<228::AID-NT5>3.0.CO;2-G)
- Lazzaro, I., Busman, M., Battilani, P., & Butchko, R. A. E. (2012). FUM and BIK gene expression contribute to describe fumonisin and bikaverin synthesis in *Fusarium verticillioides*. *International Journal of Food Microbiology*, 160(2), 94–98.
<https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2012.10.004>
- Lebeau, J., Petit, T., Dufossé, L., & Caro, Y. (2019). Putative metabolic pathway for the bioproduction of bikaverin and intermediates thereof in the wild *Fusarium oxysporum* LCP531 strain. *AMB Express*, 9(1), 186.
<https://doi.org/10.1186/s13568-019-0912-4>

- Lens.org. (2025). Patent Search Results «Bikaverin». Recuperado 28 de febrero de 2025, (<https://www.lens.org/lens/search/patent/list?q=Bikaverin>)
- Limón, M. C., Rodríguez-Ortiz, R., & Avalos, K. (2010). Bikaverin production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(1), 21–29. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2551-1>
- Linnemannstöns, P., Schulte, J., Del Mar Prado, M., Proctor, R. H., Avalos, J., & Tudzynski, B. . The polyketide synthase gene *pkS4* from *Gibberella fujikuroi* encodes a key enzyme in the biosynthesis of the red pigment bikaverin. *Fungal Genetics and Biology*, 37(2), 134–148. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00501-7](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00501-7)
- Lu, H., Guo, S., Yang, Y., Zhao, Z., Xie, Q., Wu, Q., Sun, C., Luo, H., An, B., & Wang, Q. (2025) . Bikaverin as a molecular weapon: enhancing *Fusarium oxysporum* pathogenicity in bananas via rhizosphere microbiome manipulation. *Microbiome*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-025-02109-7>
- Marroquín-Fandiño, J. E., Ramírez-Acosta, C., Luna-Wandurraga, H. J., Valderrama-Rincón, J. A., Cruz, J. C., Reyes, L. H., & Valderrama-Rincon, J. D. (2020). Novel external-loop-airlift milliliter scale bioreactors for cell growth studies: Low-cost design, CFD analysis and experimental characterization. *Journal of Biotechnology*, 324, 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.09.022>
- Mast, Y., Wild, M., & Takors, R. (2023). Optimizing Mass Transfer in Multiphase Fermentation: The Role of Drag Models and Physical Conditions. *Processes*, 12(1), 45. <https://doi.org/10.3390/pr12010045>
- Medentsev, A. G., Arinbasarova, A. Yu., & Akimenko, V. K. (2005). Biosynthesis of Naphthoquinone Pigments by Fungi of the Genus *Fusarium*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41(5), 503–507. <https://doi.org/10.1007/s10438-005-0091-8>
- Mendoza-Martínez, A. M., & Escamilla-Silva, E. M. (2013). Airlift Bioreactors: Hydrodynamics and Rheology Application to Secondary Metabolites Production. En *InTech eBooks*. <https://doi.org/10.5772/53711>
- Mendonça, M., Santos, M. C. D., Pereira, A. K., Fill, T. P., Forte, M. B. S., & Bicas, J. L. (2021). Recovery and purification of bikaverin produced by *Fusarium oxysporum* CCT7620. *Food Chemistry X*, 12, 100136. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100136>
- Merchuk, J. C. (1990). Why use air-lift bioreactors? *Trends in Biotechnology*, 8(C), 66–71. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(90\)90138-N](https://doi.org/10.1016/0167-7799(90)90138-N)
- Milic, N., Christinaki, A. C., Benaki, D., Stavrou, A. A., Tsafantakis, N., Fokialakis, N., Kouvelis, V. K., & Gonou-Zagou, Z. (2022). Polyphasic Systematics of the Fungicolous Genus *Cladobotryum* Based on Morphological, Molecular and Metabolomics Data. *Journal of Fungi*, 8(8), 877. <https://doi.org/10.3390/jof8080877>
- Moucha, T., Linek, V., & Prokopová, E. (2003). Gas hold-up, mixing time and gas–liquid volumetric mass transfer coefficient of various multiple-impeller configurations: Rushton turbine, pitched blade and techmix impeller and their combinations. *Chemical Engineering Science*, 58(9), 1839–1846. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(02\)00682-6](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(02)00682-6)
- Muthumanickam, A., Rao, K., Kumar, K., & Chetty, C. (2010). Medicinal importance of natural dyes-a review. In *Article in International Journal of PharmTech Research*. <https://www.researchgate.net/publication/265043367>

- Nirmaladevi, D., Venkataramana, M., Chandranayaka, S., Ramesha, A., Jameel, N. M., & Srinivas, C. (2014). Neuroprotective Effects of Bikaverin on H₂O₂-Induced Oxidative Stress Mediated Neuronal Damage in SH-SY5Y Cell Line. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 34(7), 973–985. <https://doi.org/10.1007/s10571-014-0073-6>
- Olsvik, E. S., & Kristiansen, B. (1992). Influence of oxygen tension, biomass concentration, and specific growth rate on the rheological properties of a filamentous fermentation broth. *Biotechnology And Bioengineering*, 40(11), 1293–1299. <https://doi.org/10.1002/bit.260401102>
- Petersen, E. E., & Margaritis, A. (2001). Hydrodynamic and Mass Transfer Characteristics of Three-Phase Gaslift Bioreactor Systems. *Critical Reviews in Biotechnology*, 21(4), 233–294. <https://doi.org/10.1080/07388550108984172>
- Phasha, M. M., Wingfield, B. D., Wingfield, N. J. A., Coetzee, M. P. A., Hammerbacher, A., & Steenkamp, E. T. (2021). Deciphering the effect of FUB1 disruption on fusaric acid production and pathogenicity in *Fusarium circinatum*. *Fungal Biology*, 125(12), 1036–1047. <https://doi.org/10.1016/J.FUNBIO.2021.07.002>
- Prado-Cabrero, A., Schaub, P., Díaz-Sánchez, F., Estrada, A. F., Al-Babili, S., & Avalos, J. (2009). Deviation of the neurosporaxanthin pathway towards β -carotene biosynthesis in *Fusarium fujikuroi* by a point mutation in the phytoene desaturase gene. *The FEBS Journal*, 276(16), 4582–4597. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07164.x>
- Rangaswamy, V., & Balu, G. (2010). Process from Gibberelic acid production with “*Fusarium moniliforme*” strains (Patent US7846699B2).
- Rodríguez, A. H., Pacheco, A. D., Tolibia, S. F. M., Xicohtencatl, Y. M., Balbuena, S. y. G., & López, C. E. L. Y. (2024). Bioprocess of Gibberellic Acid by *F*: The Challenge of Regulation, Raw Materials, and Product Yields. *Journal Of Fungi*, 10(6), 418. <https://doi.org/10.3390/jof10060418>
- Rodríguez-Ortiz, R., Mehta, B. J., Avalos, J., & Limón, M. C. (2010). Stimulation of bikaverin production by sucrose and by salt starvation in *Fusarium fujikuroi*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1991–2000. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2282-3>
- Schumacher, J., Gautier, A., Morgant, G., Studt, L., Ducrot, P.-H., Le Pêcheur, P., Azeddine, S., Fillinger, S., Leroux, P., Tudzynski, B., & Viaud, M. (2013). A Functional Bikaverin Biosynthesis Gene Cluster in Rare Strains of Botrytis cinerea Is Positively Controlled by VELVET. *PLoS ONE*, 8(1), e53729. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053729>
- Sharma, S., Yadav, G. K., Shakouka, M. A., Yadav, M. K., S, G. K., Saharan, M. S., Gupta, A. K., & Bashyal, B. M. (2024). Assessing the long-term survival of bakanae pathogen *Fusarium fujikuroi* in rice-wheat cropping system in Northern - India using advanced metagenomic and qPCR techniques. *Plant Stress*, 100690. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100690>
- Siegel, M. H., & Robinson, C. W. (1992). Application of airlift gas-liquid-solid reactors in biotechnology. *Chemical Engineering Science*, 47(13–14), 3215–3229. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(92\)85030-F](https://doi.org/10.1016/0009-2509(92)85030-F)
- Singh, S., & Florez, H. (2020). Coronavirus disease 2019 drug discovery through molecular docking. *F1000Research*, 9, 502. <https://doi.org/10.12688/f1000research.24218>

Socaciu, C. (2007). Food Colorants (CRC Press, Ed.; 1 st). CRC Press.
<https://doi.org/10.1201/9781420009286>

Springler, A., Vrabel, G.-J., Mayer, E., Schatzmayr, G., & Novak, B. (2016). Effect of *Fusarium*-Derived Metabolites on the Barrier Integrity of Differentiated Intestinal Porcine Epithelial Cells (IPEC-J2). *Toxins*, 8(11), 345.
<https://doi.org/10.3390/toxins8110345>

Studt, L., Wiemann, P., Kleigrew, K., Humpf, H.-U., & Tudzynski, B. (2012). Biosynthesis of Fusarubins Accounts for Pigmentation of *Fusarium fujikuroi* Perithecia. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4468–4480. <https://doi.org/10.1128/AEM.00823-12>

Teramoto, M., Tai, S., Nishii, K., & Teranishi, H. (1974). Effects of pressure on liquid-phase mass transfer coefficients. The Chemical Engineering Journal, 8(3), 223–226.
[https://doi.org/10.1016/0300-9467\(74\)85027-6](https://doi.org/10.1016/0300-9467(74)85027-6)

Velmurugan, P., Kamala-Kannan, S., Balachandar, V., Lakshmanaperumalsamy, P., Chae, J. C., & Oh, B. T. (2010). Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather. *Carbohydrate Polymers*, 79(2), 262–268.

<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2009.07.058>

Wiemann, P., Willmann, A., Straeten, M., Kleigrew, K., Beyer, M., Humpf, H., & Tudzynski, B. (2009). Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi* genes, their function and regulation. *Molecular Microbiology*, 72(4), 931–946.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06695.x>

World Health Organization: WHO. (2023). Leishmaniasis.
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

Zhan, J., Burns, A. M., Liu, M. X., Faeth, S. H., & Gunatilaka, A. A. L. (2007). Search for Cell Motility and Angiogenesis Inhibitors with Potential Anticancer Activity: Beauvericin and Other Constituents of Two Endophytic Strains of *Fusarium oxysporum*. *Journal of Natural Products*, 70(2), 227–232.
<https://doi.org/10.1021/np060394t>

Zhao, M., Zhao, Y., Yao, M., Iqbal, H., Hu, Q., Liu, H., Qiao, B., Li, C., Skovbjerg, C. A. S., Nielsen, J. C., Nielsen, J., Frandsen, R. J. N., Yuan, Y., & Boeke, J. D. (2020). Pathway engineering in yeast for synthesizing the complex polyketide bikaverin. *Nature Communications*, 11(1).
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-19984-3>

Analysis of ATAT, ACAC and AGAG Microsatellite from the Worldwide *Cactaceae* Barcodes

Alejandra Guzmán-Cepeda¹, Argelia Francisca Tapia-Canseco², Ernesto Rios-Willars³

¹Universidad Carolina. Calzada Antonio Narro 707, Zona Centro C.P. 25000, Saltillo, Coahuila, México.

²CBTis 235. Calle 20 Sin Número. Saltillo Coahuila México

³Facultad de Sistemas de la Universidad Autónoma de Coahuila. Ciudad Universitaria, Fundadores km 13, Zona Centro C.P. 25350. Arteaga, Coahuila.

Resumen

Los códigos de barras genéticos son herramientas esenciales en biotecnología y biología evolutiva, utilizadas para la identificación de especies y el estudio de la biodiversidad. Sin embargo, la presencia de microsatélites en estos códigos puede influir en la precisión de la información genética que representan. En este estudio, se realizó un análisis bioinformático de microsatélites en códigos de barras de la familia *Cactaceae*, utilizando la herramienta MFind. Se analizaron 3,203 secuencias obtenidas de la base de datos BOLD, abarcando registros de 26 países. Se identificaron tres tipos principales de microsatélites: ACAC, AGAG y ATAT, observando que ATAT presentó la mayor frecuencia de repeticiones. Además, los análisis de correlación revelaron relaciones significativas entre las repeticiones de estos microsatélites ($p = 0.00$), sugiriendo patrones de distribución que podrían afectar la identificación de especies mediante códigos de barras genéticos. Los resultados resaltan la importancia de considerar la presencia de microsatélites en estudios filogenéticos y de conservación.

Palabras Claves: Códigos de barras genéticos, microsatélites, *Cactaceae*, bioinformática, MFind, biodiversidad.

Abstract

Genetic barcodes are essential tools in biotechnology and evolutionary biology, used for species identification and biodiversity studies. In this study, we conducted a bioinformatics analysis of microsatellites in *Cactaceae* barcodes using the powerful MFind tool. This tool allowed us to analyze a total of 3,203 sequences from the BOLD database, covering records from 26 countries. Three main microsatellite types were identified: ACAC, AGAG, and ATAT, with ATAT showing the highest frequency of repetitions. Correlation analyses revealed significant relationships between microsatellite occurrences ($p = 0.00$), suggesting distribution patterns that may influence species identification using genetic barcodes. The results underscore the importance of considering microsatellite presence in phylogenetic and conservation studies.

Key Words: Genetic barcodes, microsatellites, *Cactaceae*, bioinformatics, MFind, biodiversit

Introduction

Genetic barcodes, particularly DNA barcodes, are powerful tools in evolutionary biology, providing insights into species identification, lineage tracing, and evolutionary processes. They are short gene sequences that identify species and understand ecological and evolutionary dynamics. This is particularly useful in species identification and evolutionary studies: DNA barcodes are crucial for identifying species and understanding species boundaries, community ecology, and functional trait evolution. They help in studying trophic interactions and conserving biodiversity by providing a standardized method for species identification across various taxonomic groups (Gostel & Kress, 2022). The analysis of microsatellites in the genetic barcodes of the family Cactaceae is essential due to the uniqueness and diversity of this plant group, which includes numerous endemic species adapted to extreme environments. Microsatellites, due to their high variability and distribution in the genome, can influence the accuracy of molecular identification based on barcodes. Studying these repetitive elements in the barcodes of Cactaceae allows us to detect possible sources of error or ambiguity in the delimitation of species, which is especially relevant in a group with a high incidence of hybridization and morphological convergence. The Cactaceae family has significant ecological, economic, and cultural importance, being key in the conservation of arid and semi-arid ecosystems, as well as in the provision of resources for human communities.

A genetic barcode is a short DNA sequence that identifies and differentiates between species or genetic material. It serves as a unique identifier, much like a product barcode, allowing for the rapid and accurate classification of organisms or genetic elements. However, barcodes are susceptible to repetitions in the form of microsatellites that influence the genetic information they represent. The most common types of genetic barcodes are the Genome Barcodes: These are unique k-mer frequency distributions across a genome, used to identify and differentiate genomes. They are particularly useful in metagenome binning and identifying horizontally transferred genes. The DNA Barcodes are standardized short sequences of DNA, typically 400-800 base pairs long, used for species identification. They are widely used

in ecology, evolution, and conservation to understand species boundaries and interactions (Kress, 2017). More specifically, genetic barcodes are useful in species identification, where the DNA barcodes are extensively used to identify species, aiding in biodiversity conservation and ecological studies. Also, genome barcodes help in studying genome structure and function, particularly in determining phylogenetic relationships and gene transfer events (Zhou et al., 2008).

Some vegetable genes are commonly used as barcodes.

Genes used as plant barcodes mainly include *rbcl*, *matK*, *trnH-psbA*, *ITS2*, and *ycf1*. These genes have been developed and tested to identify plant species and address questions in systematics, ecology, evolutionary biology, and conservation (Dong et al., 2015). The *rbcl* and *matK* are two genes widely recommended as the central barcode for plants due to their species-discrimination ability and universal applicability (Hollingsworth et al., 2009). The combination of *rbcl* and *matK* provides a universal framework for plant identification. The nuclear marker *ITS2* is commonly used in plant phylogenetic investigations and shows high levels of interspecific divergence. On the other hand, *ycf1* is one of the most variable loci in the plastid genome that is more effective than other plastid candidates for species identification (Li et al., 2021). However, species-level resolution can be challenging, especially in regions with low floristic diversity (Braukmann et al., 2017).

Dinucleotide microsatellites, such as AT repeats, are common in plants and animals. In plants, AT repeats are the most frequent, while in animals, AC/TG repeats are more common. Trinucleotide repeats, such as TAT, are also prevalent and have been observed in various plant species (Morgante & Olivieri, 1993). Also, tetranucleotide and lengthier microsatellites exist and are used in genetic studies, especially in rice, where between 5,700 and 10,000 microsatellites have been identified (McCouch et al., 1997). In this context, other studies have been carried out on the genetic diversity of cacti in Mexico: 10 microsatellite loci were

developed for *Pachycereus pringlei* from the Sonoran Desert, showing polymorphism with an average of 6.3 alleles per locus. These loci help investigate population structure and genetic diversity (Gutiérrez Flores et al., 2014). Likewise, in another study, eight microsatellite markers were developed for *Mammillaria crucifera*, endemic of Mexico. These markers help to describe population structure and support conservation (Solórzano et al., 2009).

Materials and Method

The MFind tool (Rios-Willars & Chirinos-Arias, 2024) was used for microsatellite analysis, and a query was made to the BOLD database (Ratnasingham, 2007) with the classifier "Cactaceae[tax]" in February 2025. With this, 3,203 barcodes were found in records from 26 countries deposited in 27 institutions worldwide. For processing, computer equipment with the following characteristics was used: Processor 11th Gen Intel(R) Core™ i9-11900K @ 3.50GHz Installed RAM 64.0

GB (63.7 GB usable). The system type is a 64-bit operating system with an x64-based processor. The barcode database and the MFind output are available in the galaxy (Afgan et al., 2018) platform link: <https://usegalaxy.org/u/rioswillars/h/cactaceacedb> Regarding the use of the MFind tool, a download of the Java code corresponding to the software was made. Subsequently, the database of cactus barcodes was incorporated for processing. It is essential to ensure that the database is in multifasta format and that the first sequence is incorporated as a "problem sequence". The first position is the microsatellite to be searched for throughout the rest of the sequences, for example, the "ATAT" microsatellite. Figure 1 is a screenshot of the beginning of the multifasta file where the first sequence to be searched is found. The graphs and correlation calculations were performed using the statistical tool MiniTab16.

```
>ACAC
ACAC
>GBITS67830-21|Pachycereus tepamo|ITS|AY181560
TCATTGTCGAAACCTGCCAGCAGAAAGACCGCGAACATGTTTACCCCA
```

Figure 1. Rendering the sequences in the multifasta file. The first sequence is the problem sequence "ACAC".

Results

For the ACAC microsatellite, 924 records corresponding to two hits and 468 records for one hit were found in the database. Figure 2A illustrates these findings. A higher prevalence was found for the AGAG microsatellite than the previous one, with the highest recorded being one hit per genetic marker in the database, 998. The records with two hits for that microsatellite follow this count. Figure 2B illustrates the counting values for this variable. Finally, the ATAT microsatellite had the highest number of hits compared to the previous two. In this case, the count of six repetitions stands out, and 576 represents the highest bar in Figure 2C. It should be noted that the counts for the cases of zero repetitions were included in the graphs to contrast the results. This count represents the absence of the microsatellite in question for genetic markers. The representation of the count of the three different microsatellites in surface graph format clearly illustrates a genetic picture of each

microsatellite's distribution and prevalence compared to the others. It also provides current information on the genetic characteristics of these plants. Figure 3 is a surface illustration of the ATAT vs ACAC and AGAG microsatellites. There are peaks in prevalence in the central part and towards the back of the upper left corner. This represents relevant information for genetic markers, such as identifiers of cacti of particular interest. Finally, we found that the correlation between the variables is positive. When ATAT increases, AGAG also increases ($P=.62$; $p=0.00$), as does ACAC ($P=0.65$; $p=0.00$). In this sense, when ACAC increases, ATAT increases ($P=0.70$; $p=0.00$). Table 1 illustrates the Pearson correlation P-values for the three variables. The set of results in .csv format is also available at the following link on the Galaxy platform.

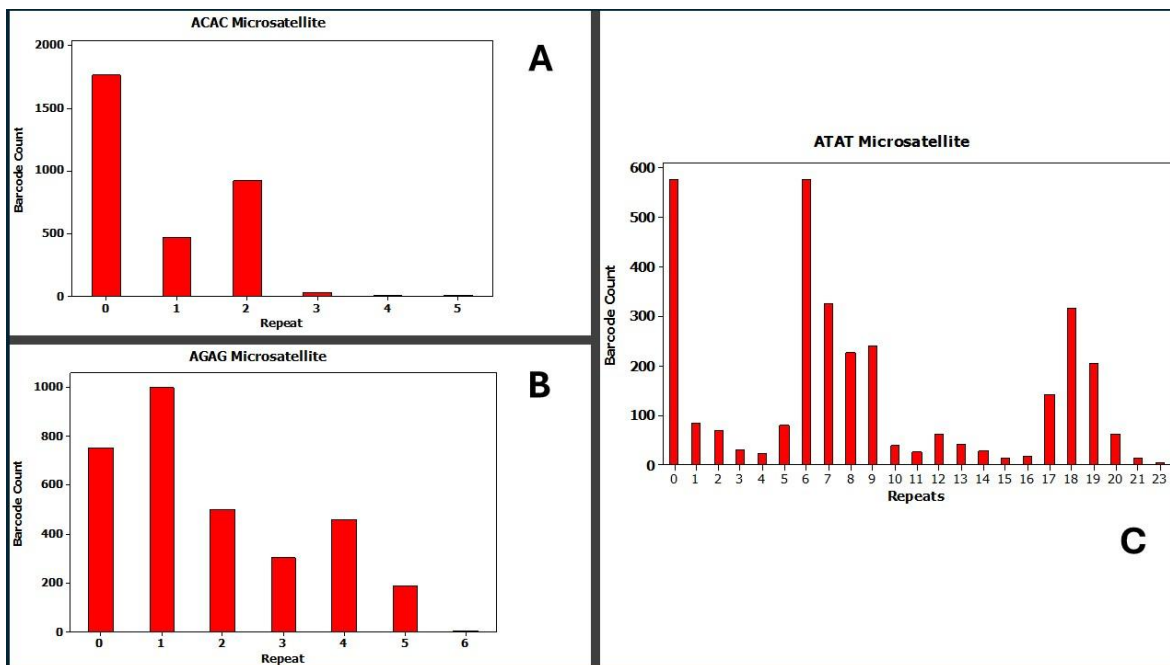


Figure 2. Description of microsatellite findings on the analyzed database. The figures describe the count of barcodes vs microsatellite repeat. Section A depicts the ACAC microsatellite. Section B depicts the AGAG microsatellite, and Section C depicts the ATAT microsatellite.

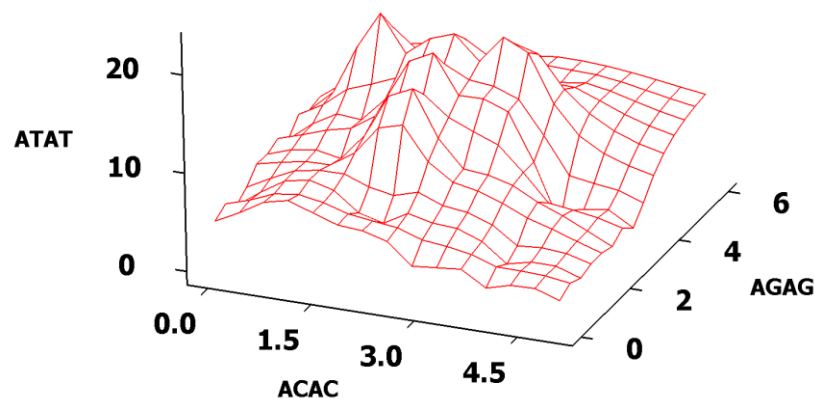


Figure 3. It shows the surface of the ATAT vs ACAC and AGAG microsatellites. The noticeable peaks describe the prevalence of ATAT microsatellites vs AGAG and ACAC.

Table 1. Correlation between the variables ATAT, ACAC, and AGAG with $p = 0.00$

	AGAG	ATAT
ATAT	0.625	
ACAC	0.653	0.705

Discussion

The analysis of microsatellites in the genetic barcodes of the Cactaceae family reveals the predominant presence of the ATAT, ACAC,

and AGAG motifs, with the first showing a notably higher frequency. This finding suggests that certain microsatellites may be associated with conserved or functionally

relevant regions within the barcodes, which could influence the accuracy of molecular species identification. The significant correlation between the repetitions of these microsatellites indicates the existence of non-random distribution patterns, possibly related to the adaptive evolution of the family in extreme environments and its high genetic diversity. These results highlight the importance of considering the presence and distribution of microsatellites when using genetic barcodes for species delimitation, especially in complex taxonomic groups such as Cactaceae. The variability generated by microsatellites can be a source of error in identification, but it also represents an opportunity to explore additional markers of genetic diversity and phylogeny. Furthermore, detailed knowledge of these patterns can help improve conservation strategies by enabling more precise identification of threatened species and facilitating decision-making in biodiversity management and protection programs.

Finally, this study provides a novel perspective by integrating bioinformatics tools for the analysis of microsatellites in barcodes, which can be replicated in other plant families of biotechnological and ecological interest. The methodology and results obtained lay the groundwork for future research aimed at understanding the functional role of microsatellites in plant evolution and adaptation, as well as their impact on the effectiveness of molecular identification systems used in conservation biology.

Conclusions

According to the literature, the results obtained in this work are congruent with other related works. The presence of microsatellites in genetic markers can influence the information of the barcodes themselves. Likewise, the MFind tool showed results efficiently, and it is recommended to use it for future research in biotechnology and its disciplinary areas. The count of ATAT-type microsatellites stood out for their prevalence throughout the database analyzed, representing an opportunity for their use as a resource for constructing surface graphs such as the one presented here. In this sense, it was observed that the count of microsatellites such as AGAG and ACAC had a lower presence and, at the same time, a direct correlation with ATAT. This suggests that the

barcodes used for cactus analysis may be saturated with microsatellites, affecting their efficiency as genetic identifiers.

References

- Afgan, E., Baker, D., Batut, B., van den Beek, M., Bouvier, D., Čech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Grüning, B. A., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Hiltemann, S., Jalili, V., Rasche, H., Soranzo, N., Goecks, J., Taylor, J., Nekrutenko, A., & Blankenberg, D. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible, and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W537–W544. <https://doi.org/10.1093/nar/gky379>
- Braukmann, T. W. A., Kuzmina, M. L., Sills, K., Zakharov, E. V., & Hebert, P. D. N. (2017). Testing the Efficacy of DNA Barcodes for Identifying the Vascular Plants of Canada. *PLOS ONE*, 12(1), e0169515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169515>
- Dong, W., Xu, C., Li, C., Sun, J., Zuo, Y., Shi, S., Cheng, T., Guo, J., & Zhou, S. (2015). ycf1, the most promising plastid DNA barcode of land plants. *Scientific Reports*, 5(1), 8348. <https://doi.org/10.1038/srep08348>
- Gostel, M. R., & Kress, W. J. (2022). The Expanding Role of DNA Barcodes: Indispensable Tools for Ecology, Evolution, and Conservation. In *Diversity* (Vol. 14, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/d14030213>
- Gutiérrez Flores, C., Lozano Garza, O. A., León de la Luz, J. L., & García de León, F. J. (2014). Development and characterization of 10 microsatellite loci in the giant cardon cactus, *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *Applications in Plant Sciences*, 2(2). <https://doi.org/10.3732/apps.1300066>
- Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, K. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., van der Bank, M., Chase, M. W., Cowan, R. S., Erickson, D. L., Fazekas, A. J., Graham, S. W., James, K. E., Kim, K.-J., Kress, W. J., Schneider, H., van AlphenStahl, J.,

- Barrett, C.H., van den Berg, C., Bogarin, D., ... S. Little, D. P. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12794–12797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905845106>
- Kress, W. J. (2017). Plant DNA barcodes: Applications today and in the future. *Journal of Systematics and Evolution*, 55(4), 291–307. <https://doi.org/10.1111/jse.12254>
- Li, H., Xiao, W., Tong, T., Li, Y., Zhang, M., Lin, X., Zou, X., Wu, Q., & Guo, X. (2021). The specific DNA barcodes based on chloroplast genes for species identification of Orchidaceae plants. *Scientific Reports*, 11(1), 1424. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81087-w>
- McCouch, S. R., Chen, X., Panaud, O., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, Y. G., Huang, N., Ishii, T., & Blair, M. (1997). Plant Molecular Biology. *Plant Molecular Biology*, 35(1/2), 89–99. <https://doi.org/10.1023/A:1005711431474>
- Morgante, M., & Olivieri, A. M. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, 3(1), 175–182. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.1993.t01-9-00999.x>
- Ratnasingham, S. , & E. P. (2007). *The Barcode of Life Data System*. *Molecular Ecology Notes* 7, 355 - 364.
- Rios-Willars, E., & Chirinos-Arias, M. C. (2024). Mfind: a tool for DNA barcode analysis in angiosperms and its relationship with microsatellites using a sliding window algorithm. *Planta*, 259(6), 134. <https://doi.org/10.1007/s00425-024-04420-3>
- Solórzano, S., Cortés-Palomec, A., Ibarra, A., Dávila, P., & Oyama, K. (2009). Isolation, characterization, and cross-amplification of polymorphic microsatellite loci in the threatened endemic *Mammillaria crucigera* (Cactaceae). *Molecular Ecology Resources*, 9(1), 156–158. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02422.x>
- Zhou, F., Olman, V., & Xu, Y. (2008). Barcodes for genomes and applications. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 546. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-546>

Identifying potential diagnostic biomarkers in human glioblastoma using integrative transcriptomic analysis

Andres Turizo-Smith^{a,*} • Daniel Garcia-Niño^b • Liliana Lopez-Kleine^c

^{a,*} *Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. andturizosm@unal.edu.co*

^b *Departamento de Matemáticas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.*

^c *Departamento de Estadística, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.*

Resumen

El glioblastoma (GB) es el tumor cerebral maligno más común y agresivo en humanos y presenta un pronóstico desfavorable. Los tratamientos existentes han tenido un éxito limitado en la prolongación de la supervivencia. La heterogeneidad tumoral y la caracterización precisa del GB siguen siendo un desafío, y actualmente no se dispone de biomarcadores efectivos y específicos de la enfermedad. Por lo tanto, la identificación y comprensión de moléculas clave responsables del fenotipo maligno del GB permitirán generar nuevos blancos terapéuticos potenciales.

El objetivo de este estudio es identificar genes diferencialmente expresados entre pacientes y controles, con el fin de reconocer firmas genéticas que permitan diferenciar los tipos de GB. Reanalizamos cinco conjuntos de datos transcriptómicos de GB disponibles públicamente, comparando controles y pacientes para la detección de genes diferencialmente expresados (DEG). Además, realizamos análisis de enriquecimiento y supervivencia, y confrontamos los resultados con la literatura científica para proponer biomarcadores diagnósticos y pronósticos potenciales.

Identificamos tres grupos de DEG que afectan diversas características que favorecen el desarrollo tumoral, así como cuatro DEG que no habían sido previamente reportados en GB. Los genes identificados representan nuevos biomarcadores potenciales para el diagnóstico o la mejora de tratamientos, y también permiten obtener nuevos conocimientos sobre los mecanismos moleculares implicados y una mejor comprensión de los subtipos de GB.

Los DEG clave son posibles blancos para el diagnóstico, la subtipificación, el pronóstico y el tratamiento, con el objetivo de mejorar la terapia y la supervivencia en GB. Los hallazgos principales indican que PDPN está asociado con la linfangiogénesis y la metástasis, lo que lo convierte en un marcador atractivo para la clasificación del GB, mientras que la glicosilación alterada sugiere un papel en la progresión del cáncer, haciendo de NEBL un buen biomarcador potencial de progresión.

Palabras Claves: *Astrocitoma, Clasificación, Biología Computacional, Diagnóstico, Transcriptoma.*

Abstract

Glioblastoma (GB) is the most common and aggressive malignant brain tumor in humans and has a bad prognosis. Existing treatments have had limited success in prolonging survival. Tumor heterogeneity and accurate characterization of GB remain challenging, and effective disease-specific biomarkers are currently unavailable. Therefore, identifying and understanding of key molecules responsible for the malignant phenotype of GB will allow the generation of new potential therapeutic targets.

The aim of this study is to identify differentially expressed genes between patients and controls to recognize genetic signatures that will allow differentiation of GB types. We re-analyzed five publicly available GB transcriptomic datasets, comparing controls and patients for the detection of differentially expressed genes (DEG). Additionally, we performed enrichment and survival analysis, and confronted the results with scientific literature to propose potential diagnostic and prognostic biomarkers.

We identified three groups of DEGs that affect several characteristics that favor tumor development and four DEGs that had not been reported earlier for GB. The identified genes are potential new biomarkers for diagnosis or to improve treatments, and they also allow gaining new insights into understanding molecular mechanisms and a better understanding of GB subtypes.

Key DEGs are potential targets for diagnosis, subtyping, prognosis, and therapy to improve GB treatment and survival. Main findings are that PDPN is associated with lymphangiogenesis and metastasis, making it an attractive marker for GB classification as well as the altered glycosylation indicating a role in cancer progression making of NEBL a good potential progression biomarker.

Key Words: *Astrocytoma, Classification, Computational Biology, Diagnosis, Transcriptome.*

Introduction

Glioblastoma (GB) is the most common and lethal variant of glioma. Mean survival is only 14-15 months with 10 % survival probability of 5 years (Gallego, 2015). Improving the survival time of GB patients remains a challenging management problem. Patients with GB have a dramatically poor prognosis due to its cellular and molecular heterogeneity. For that reason, it is essential to find molecular targets that can serve as biomarkers and possible druggable targets, that should lead to a new classification system for patient stratification, prognosis prediction and selection of appropriate therapies that could provide therapeutic opportunities for this deadly neoplasm. This tumor is also flexible and adaptative to different adverse conditions, such as nutrient deprivation and other multiple interactions between the tumor microenvironment and immune cells that may drive and maintain its development. The identification of potential biomarkers in such a complex disease requires the integration of several data sources and a data analysis pipeline ensuring correct pre-processing, filtering and selection of core genes that could serve the above purpose.

Considering the glioblastoma characteristics, we searched for gene expression data of glioblastoma patients and healthy controls, with the aim to identify a gene signature or some biomarkers that are potentially good candidates for diagnosis, subtyping, improving treatment

and, also to gain new insights to understand the underlying molecular mechanisms in GB. To achieve this goal, we identified differentially expressed genes in five publicly available GB datasets comparing controls and patients. This identification helped us to propose a gene signature for the differentiation of GB types. Further, we conducted an enrichment analysis of the differentially expressed genes (DEGs) lists. This allowed the confirmation of previously known processes in GB and, also, the identification of new crucial genes that had not previously been reported in GB. We selected the principal potential biomarkers through a thorough literature review and survival analysis to propose them for diagnosis or as future drug targets.

Our main finding is that the key DEGs can be classified into three groups: Genes that code for proteins of the collagen family (COL1A1, COL4A2, COL6A1), genes that code for transcription factors (HOXA10, HOXD10, HOXA5) and genes that code for proteins related to angiogenesis and/or cellular remodeling and a higher invasive potential (PDPN, VEGFA, CHI3L1). Moreover, we found four DEGs that have not been reported earlier as related to GB and could have a high potential of being valuable biomarkers and be possible druggable objectives. They have been reported to be implicated in carcinogenesis

or progression in other cancers but not directly related to GB (HS3ST4, GCNT4, NEBL, ST6GALNAC1).

Materials and methods

We selected five data sets from the NCBI GEO database that compare GB vs. regular brain tissue expression. Each data set was pre-processed and analyzed separately. Pre-processing and quality control were conducted: selecting random samples from each condition (GB/normal) to balance samples, gene filtering, and normalization to prevent mean-variance dependence. The results of these steps were confirmed using descriptive statistics.

Transcriptomic analysis.

Further, we identified DEGs using Bioconductor specialized packages (Carlson,

2017) version 3.16 in R version 4.2.1 and conducted an enrichment analysis for common DEGs in DAVID tool . The direction of differential expression was reported by fold-change outputs. Main DEGs were used for survival analysis.

The Genome Expression Omnibus database of NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) was searched for gene expression data of glioblastoma patients and healthy controls (without previous therapy). The datasets listed in Table 1 met the criteria. Most of these datasets had chip-seq, non-coding RNA or even methylation data that were not used. All datasets were accessed in the second semester of 2021.

Table 1. Data sets from NCBI with accession numbers, description of content and samples used in our investigation after random selection.

GEO accession number	Description	Samples used (before - after random selection) ^a
GSE119834 (D. W. Huang et al., 2009; Mack et al., 2019; Sherman et al., 2022)	RNAseq from GB samples, glioblastoma stem cells (GSC) and neural stem cells (NSC). Fragments Per Kilobase Million (FPKM) transformation.	<i>Before:</i> 45 GB; 44 GSC; 9 NSC. 19471 genes. <i>After:</i> 9 GB; 9 NSC. 19048 genes.
GSE145645 (Xu et al., 2021)	RNAseq from GB biopsies, normal brain tissues (NB), and cell line counterparts. FPKM-Ig2 transformation.	<i>Before:</i> 32 GB; 3 NB. 19774 genes. <i>After:</i> 4 GB; 3 NB. 17963 genes.
GSE147352 (T. Huang et al., 2021)	RNAseq from GB biopsies, lower grade gliomas (LGG) and NB.	<i>Before:</i> 85 GB; 18 LGG; 15 NB. 35149 genes. <i>After:</i> 17 GB; 15 NB. 32661 genes.
GSE151352	RNAseq of normal/tumor tissue pairs of GB patients (same patient). rlog-normalized count data.	<i>Before:</i> 12 GB; 12 NB. 33245 genes. <i>After:</i> 12 GB; 12 NB. 20565 genes.
GSE159851 (Schaffenrath et al., 2021)	RNAseq from endothelial cells isolated from primary and secondary brain tumors. GB, Adenocarcinoma brain metastasis (BM) and NB.	<i>Before:</i> 5 GB; 6 NB; 6 BM. 20336 genes. <i>After:</i> 5 GB; 6 NB. 19174 genes.

^aFiltered by quality analysis based on descriptive statistics analysis.

Ethical Considerations

This study is based solely on the re-analysis of publicly available transcriptomic data, which were generated under the ethical guidelines and approvals of the original studies. Since the data used are anonymized and publicly available, this research falls under the category of secondary research, which, according to international and national standards, does not require new ethical approvals. In Colombia, Resolution 8430 of 1993 requires ethical approval for studies involving direct human

participation or biological samples, but exempts studies using anonymized, publicly available data. Law 1751 of 2015 emphasizes the protection of dignity and privacy, while Decree 1374 of 2013 regulates the use of data in scientific research, ensuring that anonymized public data usage does not infringe on patient's rights. International guidelines, such as the Declaration of Helsinki, also confirm that secondary research using anonymized data

usually does not require further ethical review.

Summarization

When needed, summarization was performed to a specific reference human genome for each data set to ensure analysis of genes using gene symbols as an identifier. For GSE147352, GSE151352, and GSE159851, we used *Genome comprehensive annotation for the Human* package available in Bioconductor.

Data preprocessing

Data quality used descriptive statistics (boxplots, correlations, density plots, and Euclidean distance dendrogram) to identify atypical or non-comparable samples. Filters for non-informative row data were conducted: zero expression, non-variability between samples (zero variation coefficient). Some datasets needed a resampling because of an excessive difference between the number of cases (GB) and controls (NB) or because of a high sample number to balance conditions and controls. Finally, to correct mean-variance dependence Variance Stabilizing Normalization (VSN) (Huber et al., 2002) was applied for data without previous normalization.

Significance Analysis of Microarrays (SAM) (Schwender, 2017) was the method used for identifying DEGs in datasets for continuous data (microarrays, FPKM transformations, etc.). Differential gene expression analysis based on the negative binomial distribution (DESeq2) (Love et al., 2014) was used for identifying DEGs for raw count data. Both methods were used with a false discovery rate (FDR) < 0.05 (Benjamini & Hochberg, 1995) as control of multiplicity effects and error rate for many hypothesis tests.

Enrichment analysis

For common DEGs in the five data sets, enrichment search was conducted using DAVID tools (<https://david.ncifcrf.gov/>, 2021 version). Based on the enrichment terms we grouped them into the main higher category

and searched for their relationship with processes related to glioblastoma onset, development, and metastasis that could be potentially useful for monitoring the disease. Moreover, a reduced number of genes with coherent differential expression was chosen for further analysis to identify potential biomarkers.

Survival analysis

We used the GEPIA tool (Tang et al., 2017) for the survival analysis of the main common DEGs and saved the p-value of the hazard ratio test (Spruance et al., 2004) to select the best potential biomarkers. GEPIA was selected because it allows for the analysis of disease-free survival and overall survival.

Gene expression validation using TCGA

To validate our findings and confirm the results on a larger dataset, we used UALCAN (Chandrashekar et al., 2017), a comprehensive web resource for analyzing cancer omics data. UALCAN provides easy access to publicly available cancer transcriptome data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) project. We used this tool to examine the expression levels of our candidate biomarker genes in glioblastoma samples from the TCGA database. The web resource was consulted in the 2022 version (Chandrashekar et al., 2022).

Results

Differentially expressed genes and functional enrichment

Statistical analysis of the five GB datasets allowed us the identification of thirteen commonly deregulated genes identified as critical genes related to the presence of tumor processes (Table 2). Their importance was further investigated through annotation and enrichment, the interaction of the protein products, and survival (Table 3).

Survival analysis and Gene expression validation using TCGA

The main finding of this study, taking together all steps, is that the DEGs can be classified into three groups. These groups are related to molecular subtypes, therapy response, closed protein interactions between them, and overall patient survival. The genes belonging to these three groups have been reported earlier (Table 3). Kaplan-Meier analysis shows Disease-Free Survival (DFS) and Overall Survival (OS) for the five significant genes identified using the GEPIA tool. The analysis included genes where either or both survival metrics were statistically significant.

Notably, for COL6A1, both DFS and OS were significant, suggesting their potential as a biomarker. In other cases, DFS was significant

but not OS for PDPN and NEBL, while OS was significant but not DFS for VEGFA and HOXD10 in glioblastoma.

Table 2: Log fold change values and functional classification of the thirteen key genes identified by differential expression analysis of five GB datasets.

DEGs	log2 Fold Change by data set ^a					Functional group
	GSE11983 4	GSE145645	GSE147352	GSE151352	GSE159851	
COL1A1	-1,18	3,79	7,18	0,44	3,09	Cellular differentiation factors, extracellular matrix related, epithelial-mesenchymal transition.
COL4A2	-0,52	2,00	3,82	0,30	3,43	Cellular differentiation factors, angiogenesis, extracellular matrix related, epithelial-mesenchymal transition.
COL6A1	-0,51	0,87	1,86	0,19	2,26	Cellular differentiation factors, epithelial-mesenchymal transition.
HOXA10	-1,84	7,20	10,21	0,79	2,99	Epithelial-mesenchymal transition.
HOXD10	-1,44	6,99	11,92	0,83	7,69	Epithelial-mesenchymal transition.
HOXA5	-11,00	5,65	9,85	0,82	4,89	Epithelial-mesenchymal transition.
PDPN	-11,00	1,57	3,91	0,34	1,51	Epithelial-mesenchymal transition.
VEGFA	0,29	1,70	3,76	0,37	3,03	Cellular differentiation factors, angiogenesis, extracellular matrix related, epithelial-mesenchymal transition.
CHI3L1	-11,00	1,44	4,97	0,28	3,40	Cellular differentiation factors, epithelial-mesenchymal transition.
HS3ST4	-6,48	-2,22	-3,48	-1,16	-2,11	Epithelial-mesenchymal transition.
GCNT4	-2,60	-1,45	-3,50	-3,06	-2,82	Epithelial-mesenchymal transition.
NEBL	-11,00	-0,33	-1,49	-0,53	-2,42	Extracellular matrix related.
ST6GALNAC1	-6,86	-1,73	-1,29	-1,36	-3,33	Epithelial-mesenchymal transition.

^aShowing a qualitative expression by color. Red for down-regulated and green for up-regulated genes. For additional information see Supplementary Table.

Moreover, we found four DEGs that have not been reported earlier and could have a high potential for being useful biomarkers and possible druggable objectives. These DEGs were HS3ST4, GCNT4, NEBL, and ST6GALNAC1 which have been reported to be implicated in carcinogenesis or progression in other cancers. Global references related to cancer are listed in Table 3.

New potential biomarkers of therapeutic targets in GB

NEBL

NEBL is a protein-encoding gene belonging to the nebulin family. The proteins of this family play an essential role in cell adhesion and the architecture of the actin filament in the cell (Pappas et al., 2011). Upregulation of the NEBL gene has been reported in several high-grade and metastatic stage

Artículos

Table 3: Thirteen key genes identified by differential expression analysis of five transcriptomic GB datasets, results of their survival analysis for each of them and summary of the reported implication of these genes in cancer.

Gene symbol	Disease free survival	Overall survival	Description
COL1A1	p(HR)=0.24	p(HR)=0.14	COL1A1, COL4A2, and COL6A1 genes are protein-coding genes that can encode the different types of collagen and belong to the collagen family (Chandrashekar et al., 2017). The COL1A1 expression level in GB is much higher than in LGG (Chandrashekar et al., 2022). The COL4A2 gene had a significantly high-expression level in anaplastic astrocytoma and glioblastoma, and its expression level was closely related to glioma malignancy (Chandrashekar et al., 2017, 2022; Jiang et al., 2020). COL6A1 is a highly expressed tumor biomarker, including GB, with low levels in most normal tissues (S. Sun et al., 2018).
COL4A2	p(HR)=0.11	p(HR)=0.35	
COL6A1	p(HR)=0.03*	p(HR)=0.0058*	
HOXA10	p(HR)=0.32	p(HR)=0.17	<i>Transcription Factor (TF)</i> A high expression of HOXA10 has been observed in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) which correlates with poor prognosis (Choi et al., 2018). HOXD10 may play different or even opposite roles at different stages of GB onset and development. For patients with GB, HOXD10 may be a valid predictor of prognosis (Feng et al., 2021; Y. Li et al., 2021; Turtoi et al., 2014), but it is an unfavorable prognostic marker in renal cancer (see proteintatlas.org). HOXA5 is seen to be dysregulated in several tumor types, including cervical cancer and breast cancer, suggesting that HOXA5 may be an important tumor suppressor (Hussain et al., 2020).
HOXD10	p(HR)=0.03*	p(HR)=0.03*	
HOXA5	p(HR)=0.49	p(HR)=0.49	
PDPN	(HR)=0.0086*	p(HR)=0.35	<i>Angiogenesis/remodeling</i> It was observed that PDPN could be considered as a possible biomarker of stem cells derived from glioma, which confers resistance to ionizing radiation and would serve as a prognostic marker on patient outcomes (Sulman et al., 2008). CHI3L1 and PDPN are increased in GB tumors staining for markers associated with the mesenchymal gene expression pattern (Wood et al., 2016). VEGF and PDPN have been identified as angiogenesis and/or lymphangiogenesis regulators and might be essential to restrict tumor growth, progression, and metastasis (Belfort-Mattos et al., 2016). CHI3L1 up-regulated VEGF expression in GB; they synergistically promote endothelial cell angiogenesis (Francescone et al., 2011; Shao, 2013). Combination therapies, including anti-CHI3L1 and other traditional antiangiogenic agents together with chemotherapy/radiotherapy could be an interesting approach to treat GB (Francescone et al., 2011).
VEGFA	p(HR)=0.17	p(HR)=0.17	
CHI3L1	p(HR)=0.16	p(HR)=0.16	
HS3ST4	p(HR)=0.52	p(HR)=0.52	<i>New Possible Genes implicated in GB</i> HS3ST4 is involved in post-synthetic modification of heparan sulfate proteoglycan (HSPG); tumors of different histotypes, including breast, lung, brain, pancreas, skin, and colorectal cancer, are characterized by profound alterations in the fine structure of proteoglycans leading to uncontrolled proliferation, immune escape, metastasis and differentiation (Knelson et al., 2014; Zizza et al., 2019). GCNT4 is a prognostic marker in renal cancer (see proteintatlas.org); GCNT4 mediates O-Glycan biosynthesis in mucin-type biosynthesis (GCNT4, 2024; GCNT4 Gene - Glucosaminyl (N-Acetyl) Transferase 4, 2025). Alterations of O-glycans, such as increased expression of Tn antigens, are commonly detected in cancer cells (Gao, 2013). Additionally, expression of Tn antigen has been described in human glioblastoma cell lines (Dusoswa et al., 2020) and the developing
GCNT4	p(HR)=0.51	p(HR)=0.99	
NEBL	p(HR)=0.049*	p(HR)=0.99	
ST6GALNAC1	p(HR)=0.42	p(HR)=0.072	

mouse brain but not in healthy human brain tissues (Dusoswa et al., 2020).

Nebulette (NEBL) overexpression increases cell migration (Mamizadeh et al., 2021). It could be a favorable prognostic marker in renal cancer and an unfavorable one in urothelial cancer (see proteinatlas.org).

High expression of NEBL may be beneficial for the prognosis of glioma (Liu et al., 2021).

ST6N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 1 (ST6GALNAC1) appears to be a favorable prognostic marker in head and neck cancer (see proteinatlas.org), overexpression of ST6GALNAC1 in gastric, breast, prostate and ovarian cancer cell lines and tissues has been directly associated with poor prognosis (Hugonnet et al., 2021), it has been observed that other members of sialyltransferases family could be related with glioma progression (Cuello et al., 2020; Iwasawa et al., 2018; Suzuki et al., 2005).

*Statistical significance with p-value < 0.05

cancers (Mamizadeh et al., 2021), where NEBL overexpression increases cell migration (Hosseini et al., 2018). Currently there is no information on a clear correlation and significance of the expression of NEBL and gliomas beyond a study that proposes that NEBL is associated with tubuline (Hosseini et al., 2018) to a greater degree than with actin in the cytoskeleton of glioma cells (Dunina-Barkovskaya, 2013).

ST6GALNAC1

The ST6GALNAC1 gene encodes a homonymous protein that is a sialyltransferase expressed in the Golgi apparatus and transfers sialic acid to the O-linked sugar chain of the spleen backbone, receptor protein and produces the sialyl-Tn antigen (STn antigen). The STn antigen is overexpressed in some adenocarcinomas, including colon, gastric, pancreatic, breast, prostate, and ovarian adenocarcinomas, but has limited or no expression in normal organs (Marcos et al., 2004). The functions of the STn antigen are thought to be related to cell-to-cell attachment and cell migration, but recent studies have suggested associations with cancer aggressiveness and poor prognosis (Ferreira et al., 2013; Ozaki et al., 2012).

Since ST6GALNAC1-positive cancers are associated with poor prognosis, targeting ST6GALNAC1 and STn antigen could be an attractive novel treatment to prevent metastasis and recurrence of adenocarcinomas, including colorectal cancer (Ogawa et al., 2017). In the case of gliomas and GB, it is unknown what their correlation and significance could be, since there are currently no studies in this regard. The confirmation of the significance of

this gene was not established based on the TCGA data and therefore, more than the other genes, which significance was validated using TCGA data, it needs to be validated experimentally.

HS3ST4

Heparan sulfate (HS) is a highly sulfated glycosaminoglycan found on the cell surface and in the extracellular matrix. It is involved in cell-cell and cell-matrix communications and regulates the binding of a large number of ligands, resulting in a variety of physiological and pathological effects, such as in embryonic development, cell growth and differentiation, homeostasis, inflammatory response, tumor growth and microbial infection (Hellec et al., 2018). Altered expression of HS- modifying enzymes has been frequently observed in cancer. Consequently, dysregulation of the HS biosynthetic machinery results in dramatic changes in HS structure, affecting a variety of fundamental cellular processes involved in tumorigenesis and cancer progression, including proliferation, migration, apoptosis and immune evasion (Denys & Allain, 2019).

It has been observed that the increase in the expression of HS isoenzymes such as HS3ST4 may involve a mechanism that allows tumor cells to modulate the activation of natural killer (NK) cells and thus prevent their elimination, thus promoting evasion of the immune system by tumor cells (Denys & Allain, 2019; Hellec et al., 2018). Although HS3ST4 is abundantly expressed in the cerebral cortex and cerebellum (Denys & Allain, 2019) to

date there are no studies that correlate its expression in gliomas.

GCNT4

Members of the glucosaminyl (N-acetyl) transferase (GCNT) family are critical mediators in the synthesis, branching, and oligomerization of the mucin backbone (H. Sun et al., 2020). Altered glycosylation is a hallmark of cancer (H. Sun et al., 2020). Members of the GCNT family, including GCNT2, GCNT3, and GCNT4, have been previously identified as being associated with multiple human malignancies, influencing cancer genesis by regulating cell growth and apoptosis in pancreatic, prostate, and colon cancer (Hu et al., 2021; Zeng et al., 2022). However, the relationship between the expression levels of GCNT and GC family members has not been thoroughly investigated, including their expression and significance in gliomas.

Discussion

Cancer is a group of diseases characterized by abnormal cell growth and the potential to spread. Both environmental and genetic factors are crucial in cancer development. At the cellular level, oncogenes promote uncontrolled growth, whereas tumor suppressor genes protect against malignancy. Interestingly, some genes, such as the NOTCH receptors—key components of the evolutionarily conserved

Notch signaling pathway—can function paradoxically as both oncogenes and tumor suppressors, depending on the context (Aster et al., 2017; Shen et al., 2018; Soussi & Wiman, 2015; Yip et al., 2010).

Transcriptomic studies help classify tumors into subtypes, aiding therapeutic response and clinical outcomes. The study's analysis aligns with previous classifications, including Verhaak et al.'s proneural, neural, classic, and mesenchymal GB types (Verhaak et al., 2010). It also considers potential contamination and integrates signaling process-based classifications (Kim et al., 2021; Wang et al., 2017). Combining transcriptional analysis results with these elements harmonized classifications, revealing proneural and mesenchymal characteristics, which may result from PMT, a mechanism similar to EMT in other cancers. EMT involves carcinoma cells improving their invasive capacity, losing cell polarity, and acquiring a mesenchymal phenotype, promoting metastasis (Behnan et al., 2019; Garofano et al., 2021; Kim et al., 2021; Wang et al., 2017) (Figure 1a-1b).

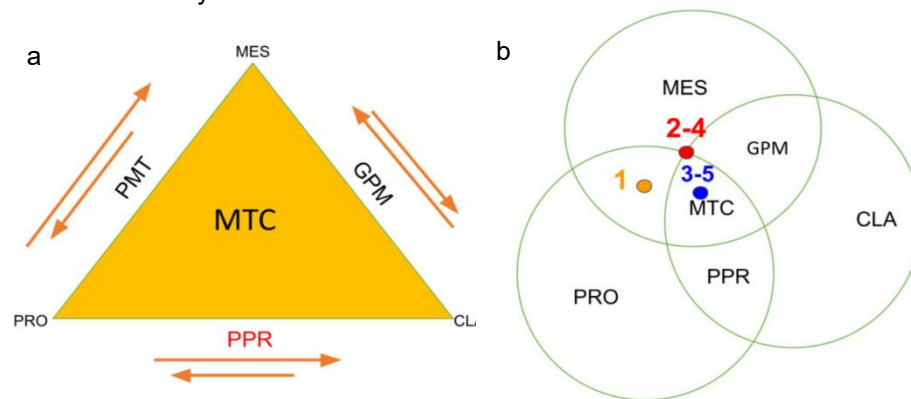


Fig 1 a-b: Proposed transcriptomic profiling and signaling pathway-based integration classification in GB. **(a)** Describes at each vertex the main transcriptomic types described to date, each edge represents subtypes based on analyzes of signaling pathways and transitions that have been observed experimentally between the PMT analogous to what happens in other types of cancer with EMT so that the tumors can manage to prosper. **(b)** Venn diagram between the transcriptomic types, subtypes based on signaling routes and clusters analyzed in this document. PRO: Proneural, MES: Mesenchymal CLA: Classical, GPM: Glycolytic/Plurimetabolic, MTC: Mitochondrial, NEU: Neuronal, PPR: PRoliferative/PRogenitor, PMT: Proneural-mesenchymal transition, 1-5 Cluster of GB patient samples analyzed.

A key unresolved question is whether PMT arises intrinsically or is induced by the tumor microenvironment (TME). Some evidence points to PMT being triggered by external factors like chemotherapy and radiotherapy (Lau et al., 2015; Lu et al., 2012; Segerman et al., 2016; Yang et al., 2021), while other studies highlight internal master regulators such as STAT3, C/EBP β , TAZ, and NF- κ B as key drivers (Yang et al., 2021; Zhang et al., 2020). Additionally, members of the HOX family of transcription factors have been implicated in modulating carcinogenesis, with context-dependent effects that can either promote or suppress tumor progression (Feng et al., 2021; Q. Li et al., 2014; Shah et al., 2012).

Within this context, several molecular markers have emerged as potential tools for classification and therapy. PDPN, a mucin-like transmembrane protein associated with lymphangiogenesis and metastasis, is widely expressed across tumors. Its interaction with receptor type C lectin-like 2 (CLEC-2) promotes platelet aggregation and metastasis, while also modulating cytoskeletal dynamics to enhance migration, invasion, and angiogenesis independently of VEGF pathways (Grau et al., 2015; Modrek et al., 2020). Given its expression patterns and the results of GEPIA analyses, PDPN represents a promising marker for GB classification.

Similarly, NEBL, which encodes a cytoskeletal matrix protein, is overexpressed in various high-grade and metastatic cancers (Cóser et al., 2010; Hosseini et al., 2018). Although it has not been previously linked to GB, GEPIA data suggest a potential association with progression-free survival, making it a candidate for further study and potential therapeutic targeting.

Another hallmark of cancer is altered glycosylation, involving the dysregulation of sialyltransferases and heparan sulfate (HS)-modifying enzymes (Vajaria & Patel, 2017). High-grade gliomas often exhibit elevated levels of terminal sialoglycans and sialyltransferases (Hugonnet et al., 2021). In this study, we observed aberrant expression of glycosylation-related genes, including ST6GALNAC1, GCNT4, and HS3ST4. While their specific roles in GB remain unclear, their

dysregulation suggests involvement in key processes such as proliferation and migration (Denys & Allain, 2019). Notably, ST6GALNAC2 was enriched in E2F and MYC target pathways, and E2F7 has been shown to activate EZH2 transcription, which in turn induces mTOR signaling, a crucial pathway in glioblastoma progression (Ahmad et al., 2024).

In addition to glycosylation-related pathways, remodeling of the extracellular matrix (ECM) plays a crucial role in glioma progression. This dynamic process facilitates the activation and migration of endothelial cells, thereby promoting tumor angiogenesis. Within this context, members of the collagen gene superfamily such as COL1A1, COL4A2, and COL6A1, have been implicated in the angiogenic cascade and may serve as potential biomarkers or therapeutic targets for GB classification and treatment (Pan et al., 2020).

However, interpreting gene expression data related to ECM components and other molecular features requires consideration of the inherent biological complexity of glioblastoma. Differences in gene expression trends across datasets can be attributed to several factors, including biological variability, inclusion of different cell types, technical differences, and sample composition. GB's heterogeneity, maintained by GSCs, contributes to its resistance to treatment and presents challenges and insights for targeted therapies. Finally, but not least importantly, the observed differences in gene expression trends, particularly the significant variance between the GSE119834 dataset and the other four datasets, could be attributed to several factors. Biological variability is a primary factor, as the GSE119834 dataset includes glioblastoma stem cells (GSC) and neural stem cells (NSC) in addition to glioblastoma (GB) samples, while the other datasets focus primarily on GB and normal brain tissues. This inclusion of different cell types might influence gene expression profiles and lead to distinct trends. Furthermore, the multiform and progressive nature of GB may lead to the evolution of molecular profiles in other datasets towards those

observed in the GSE119834 dataset. Glioblastoma tumors exhibit significant heterogeneity at both the single-cell and spatial levels, driven by distinct populations of cells with specific transcriptional signatures and the unique microenvironments created by hypoxia gradients. This heterogeneity, as noted by (Ou et al., 2020), is maintained by GSCs with concordant genomic mutations, contributing to the tumor's chemo- and radioresistance. Given the dynamic nature of GB, the molecular profiles observed in the other datasets may transition or evolve towards those seen in the GSE119834 dataset, which captures the complexity of GB more comprehensively. This potential for molecular evolution highlights the importance of considering PMT and other transition mechanisms in the study of GB.

The integration of data from UALCAN, TCGA, and GEPIA in our study has provided a comprehensive view of gene expression in glioblastoma. Each dataset has its strengths: UALCAN offers an accessible interface for survival analysis and gene expression validation, TCGA provides a rich, detailed dataset that allows for in-depth genomic and transcriptomic analysis, and GEPIA bridges the gap between TCGA cancer data and GTEx normal tissue data, offering a broader context for gene expression analysis. Despite these strengths, the discrepancies observed in the gene expression trends across these datasets can be attributed to several factors:

- **Sample Composition and Heterogeneity:** The composition of samples in each dataset can differ significantly. For instance, TCGA and UALCAN primarily focus on tumor samples, while GEPIA includes normal tissue data from GTEx, which may affect comparative analyses.
- **Technical Variations:** Differences in sequencing technologies, data processing pipelines, and normalization methods across these platforms can lead to variability in gene expression measurements.
- **Biological Variability:** Intrinsic biological differences, such as tumor heterogeneity, different subtypes, and the tumor microenvironment, can contribute to inconsistent gene expression patterns observed in different datasets.

Our study demonstrates that integrating multiple datasets can enhance the reliability of biomarker identification and provide a more nuanced view of the molecular underpinnings of glioblastoma.

Conclusions

Glioblastoma is one of the most aggressive and lethal human brain tumors. The high invasiveness, the propensity to disperse throughout the brain parenchyma, and the elevated vascularity and necrosis make these tumors extremely recidivist, resulting in a short patient median survival even after surgical resection and chemoradiotherapy (D'Alessio et al., 2019). There is a growing body of evidence demonstrating the existence of PMT, which suggests that first-line therapy for a primary disease may not work effectively for recurrent tumors due to this situation (Kim et al., 2021). In order to contribute to the understanding, diagnosis and treatment of glioblastoma, transcriptomic studies for tumor classification are crucial for classifying tumors into subtypes, aiding in therapeutic response and clinical outcomes. The classifications align with prior studies and integrate signaling processes. Proneural-Mesenchymal Transition is analogous to EMT in other cancers and is significant in GB. PMT may be intrinsic or induced by external factors like chemotherapy, radiotherapy, or master regulators such as STAT3 and NF-KB.

Regarding the potential biomarkers we identified through the integrative transcriptomic analysis and further confirmation, the main findings are that PDPN is associated with lymphangiogenesis and metastasis, making it an attractive marker for GB classification. Collagen Superfamily genes like COL6A1 are significant in tumor angiogenesis and prognosis. NEBL, a cytoskeletal matrix protein, is also proposed as a potential target for GB therapy. The altered Glycosylation represented by sialyltransferases and HS modifying enzymes show altered expressions, indicating a role in cancer progression that could be used for therapeutic decisions.

Moreover, it is important to mention that differences in gene expression trends across datasets are due to biological variability, inclusion of different cell types, technical differences, and sample composition. GB's heterogeneity contributes to its treatment resistance and presents challenges and insights for targeted therapies and findings need to be validated in different populations and ancestries. These findings underscore the importance of considering various genetic, molecular, and environmental factors in developing effective cancer treatments, particularly for GB. It seems clear that to combat GB there must be a change from classic cytotoxic chemoradiotherapy to more targeted therapies, considering the high degree of heterogeneity and molecular complexity of the tumor. GB subtyping is a key process to impact a patient's survival by providing targeted therapies.

Authorship contribution statement

Andres David Turizo-Smith: Conceptualization, Validation, Investigation, Writing - original draft. **Daniel Garcia-Niño:** Software, Formal analysis, Resources, Data curation, Visualization. **Liliana Lopez-Kleine:** Methodology, Writing - review & editing, Supervision, Project administration. All authors approved this study.

Disclosure of interest

The authors report there are no competing interests to declare.

Ethical approval

It does not apply as the data were obtained from publicly available databases.

Funding

No funding was received for conducting this study.

Data availability

All data sets are available in The Genome Expression Omnibus database from NCBI by GEO accession number. Statistical code and analysis are available from D.E.G. upon reasonable request via email.

References

Ahmad, M. S., Braoudaki, M., & Siddiqui, S. S. (2024). Differential expression of ST6GALNAC1 and ST6GALNAC2 and their clinical relevance to colorectal cancer progression. *PLOS ONE*, 19(9), e0311212. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0311212>

Aster, J. C., Pear, W. S., & Blacklow, S. C. (2017). The Varied Roles of Notch in Cancer.

Annual Review of Pathology: Mechanisms of

Disease, 12(Volume 12, 2017), 245–275.

[https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-052016-](https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-052016-100127)

100127

Behnan, J., Finocchiaro, G., & Hanna, G. (2019). The landscape of the mesenchymal signature in brain tumours. *Brain*, 142(4), 847–866.

<https://doi.org/10.1093/brain/awz044>

Belfort-Mattos, P. N., Focchi, G. R. D. A., Ribalta, J. C. L., Megale De Lima, T., Nogueira Carvalho, C. R., Kesselring Tso, F., & De Góis Speck, N. M. (2016). Immunohistochemical Expression of VEGF and Podoplanin in Uterine Cervical Squamous Intraepithelial Lesions. *Disease Markers*, 2016, 1–8.

<https://doi.org/10.1155/2016/8293196>

Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 57(1), 289–300.

Carlson, M. (2017). *Org.Hs.eg.db* [Computer software]. Bioconductor. <https://doi.org/10.18129/B9.BIOC.ORG.HS.EG.DB>

Chandrashekar, D. S., Bashel, B., Balasubramanya, S. A. H., Creighton, C. J., Ponce-Rodriguez, I., Chakravarthi, B. V. S. K., & Varambally, S. (2017). UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia*, 19(8), 649–658.

<https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.05.002>

Chandrashekar, D. S., Karthikeyan, S. K., Korla, P. K., Patel, H., Shovon, A. R., Athar, M., Netto, G. J., Qin, Z. S., Kumar, S., Manne, U., Creighton, C. J., & Varambally, S. (2022). UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform. *Neoplasia*, 25, 18–27.

<https://doi.org/10.1016/j.neo.2022.01.001>

- Choi, S. W., Shin, H., Sa, J. K., Cho, H. J., Koo, H., Kong, D., Seol, H. J., & Nam, D. (2018). Identification of transcriptome signature for predicting clinical response to bevacizumab in recurrent glioblastoma. *Cancer Medicine*, 7(5), 1774–1783. <https://doi.org/10.1002/cam4.1439>
- Cóser, V. M., Meyer, C., Basegio, R., Menezes, J., Marschalek, R., & Pombo-de-Oliveira, M. S. (2010). Nebulette is the second member of the nebulin family fused to the MLL gene in infant leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 198(2), 151–154. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2009.12.013>
- Cuello, H. A., Ferreira, G. M., Gulino, C. A., Toledo, A. G., Segatori, V. I., & Gabri, M. R. (2020). Terminally sialylated and fucosylated complex N-glycans are involved in the malignant behavior of high-grade glioma. *Oncotarget*, 11(52), 4822–4835. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27850>
- D'Alessio, A., Proietti, G., Sica, G., & Scicchitano, B. M. (2019). Pathological and Molecular Features of Glioblastoma and Its Peritumoral Tissue. *Cancers*, 11(4), 469. <https://doi.org/10.3390/cancers11040469>
- Denys, A., & Allain, F. (2019). The Emerging Roles of Heparan Sulfate 3-O-Sulfotransferases in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 9, 507. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00507>
- Dunina-Barkovskaya, L. V. (2013). *Effect of desmin peptides and the characterization of nebulin family proteins in glial cells*. <https://hdl.handle.net/1969.1/157610>
- Dusoswa, S. A., Verhoeff, J., Abels, E., Méndez-Huergo, S. P., Croci, D. O., Kuijper, L. H., De Miguel, E., Wouters, V. M. C. J., Best, M., Rodriguez, E., Cornelissen, L. A. M., Van Vliet, S. J., Wesseling, P., Breakefield, X. O., Noske, D. P., Würdinger, T., Broekman, M. L. D., Rabinovich, G. A., Van Kooyk, Y., & Garcia-Vallejo, J. J. (2020). Glioblastomas exploit truncated O linked glycans for local and distant immune modulation via the macrophage galactose-type lectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(7), 3693–3703. <https://doi.org/10.1073/pnas.1907921117>
- Feng, Y., Zhang, T., Wang, Y., Xie, M., Ji, X., Luo, X., Huang, W., & Xia, L. (2021). Homeobox Genes in Cancers: From Carcinogenesis to Recent Therapeutic Intervention. *Frontiers in Oncology*, 11, 770428. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.770428>
- Ferreira, J. A., Videira, P. A., Lima, L., Pereira, S., Silva, M., Carrascal, M., Severino, P. F., Fernandes, E., Almeida, A., Costa, C., Vitorino, R., Amaro, T., Oliveira, M. J., Reis, C. A., Dall'Olio, F., Amado, F., & Santos, L. L. (2013). Overexpression of tumour-associated carbohydrate antigen sialyl-Tn in advanced bladder tumours. *Molecular Oncology*, 7(3), 719–731. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.03.001>
- Francescone, R. A., Scully, S., Faibish, M., Taylor, S. L., Oh, D., Moral, L., Yan, W., Bentley, B., & Shao, R. (2011). Role of YKL-40 in the Angiogenesis, Radioresistance, and Progression of Glioblastoma. *Journal of Biological Chemistry*, 286(17), 15332–15343. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.212514>
- Gallego, O. (2015). Nonsurgical Treatment of Recurrent Glioblastoma. *Current Oncology*, 22(4), 273–281. <https://doi.org/10.3747/co.22.2436>
- Gao, Y. (2013). *Glycosylation of Prostate Cancer Cell Lines and Glycosyltransferase Characterization and Inhibition*. <https://qspace.library.queensu.ca/items/0caefc81-f156-4a58-a8a4-7acfb9e9a4c03>
- Garofano, L., Migliozi, S., Oh, Y. T., D'Angelo, F., Najac, R. D., Ko, A., Frangaj, B., Caruso, F. P., Yu, K., Yuan, J., Zhao, W., Di Stefano, A. L., Bielle, F., Jiang, T., Sims, P., Suvà, M. L., Tang, F., Su, X.-D., Ceccarelli, M., ... Iavarone, A. (2021). Pathway-based classification of glioblastoma uncovers a mitochondrial

subtype with therapeutic vulnerabilities.

Nature Cancer, 2(2), 141–156.

<https://doi.org/10.1038/s43018-020-00159-4>

GCNT4. (2024). The Human Protein Atlas.

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000017692-8-GCNT4>

GCNT4 Gene—Glucosaminyl (N-Acetyl) Transferase 4. (2025). The Human Gene Database. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GCNT4>

Grau, S. J., Trillsch, F., Tonn, J.-C., Goldbrunner, R. H., Noessner, E., Nelson, P. J., & von Lüttichau, I. (2015).

Podoplanin increases migration and angiogenesis in malignant glioma.

International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 8(7), 8663–8670.

Hellec, C., Delos, M., Carpentier, M., Denys, A.,

& Allain, F. (2018). The heparan sulfate 3-O-sulfotransferases (HS3ST) 2, 3B and 4 enhance proliferation and survival in breast cancer MDA-MB-231 cells. *PLOS ONE*, 13(3), e0194676.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194676>

Hosseini, S. M., Mahjoubi, F., Majidzadeh, T., Khaje-Hosseini, F., & Haghipanah, M. (2018). Nebulette Expression Is Associated with Lymph Node Metastasis in Patients with Colorectal Cancer. *Middle East Journal of Digestive Diseases*, 10(3), 174–179.

<https://doi.org/10.15171/mejdd.2018.107>

Hu, W., Zheng, X., Liu, J., Zhang, M., Liang, Y., & Song, M. (2021). MicroRNA MiR-130a-3p promotes gastric cancer by targeting Glucosaminyl N-acetyl transferase 4 (GCNT4) to regulate the TGF- β 1/SMAD3 pathway.

Bioengineered, 12(2), 11634–11647.

<https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1995099>

Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 4(1), 44–57.

<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>

Huang, T., Yang, Y., Song, X., Wan, X., Wu, B.,

Sastry, N., Horbinski, C. M., Zeng, C., Tiek, D.,

Goenka, A., Liu, F., Brennan, C. W., Kessler, J.

A., Stupp, R., Nakano, I., Sulman, E. P., Nishikawa, R., James, C. D., Zhang, W., ... Cheng, S.-Y. (2021). PRMT6 methylation of RCC1 regulates mitosis, tumorigenicity, and radiation response of glioblastoma stem cells.

Molecular Cell, 81(6), 1276–1291.e9.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.01.015>

Huber, W., Von Heydebreck, A., Sülthmann, H.,

Poustka, A., & Vingron, M. (2002). Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics*, 18(suppl_1), S96–S104.

https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.suppl_1.S96

1.S96

Hugonnet, M., Singh, P., Haas, Q., & Von Gunten, S. (2021). The Distinct Roles of Sialyltransferases in Cancer Biology and Onco-Immunology. *Frontiers in Immunology*,

12, 799861.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.799861>

Hussain, I., Deb, P., Chini, A., Obaid, M., Bhan, A., Ansari, K. I., Mishra, B. P., Bobzean, S. A., Udden, S. M. N., Alluri, P. G., Das, H. K., Brothers, R. M., Perrotti, L. I.,

& Mandal, S. S. (2020). HOXA5 Expression Is Elevated in Breast Cancer and Is Transcriptionally Regulated by Estradiol. *Frontiers in Genetics*, 11, 592436.

<https://doi.org/10.3389/fgene.2020.592436>

Iwasawa, T., Zhang, P., Ohkawa, Y., Momota, H., Wakabayashi, T., Ohmi, Y., Bhuiyan, R., Furukawa, K., & Furukawa, K. (2018). Enhancement of malignant properties of human glioma cells by ganglioside GD3/GD2.

International Journal of Oncology.

<https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4266>

Jiang, Y., He, J., Guo, Y., Tao, H., Pu, F., &

- Li, Y. (2020). Identification of genes related to low-grade glioma progression and prognosis based on integrated transcriptome analysis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 121(5–6), 3099–3111. <https://doi.org/10.1002/jcb.29577>
- Kim, Y., Varn, F. S., Park, S.-H., Yoon, B. W., Park, H. R., Lee, C., Verhaak, R. G. W., & Paek, S. H. (2021). Perspective of mesenchymal transformation in glioblastoma. *Acta Neuropathologica Communications*, 9(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01151-4>
- Knelson, E. H., Nee, J. C., & Blobe, G. C. (2014). Heparan sulfate signaling in cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(6), 277–288. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.03.001>
- Lau, J., Ilkhanizadeh, S., Wang, S., Miroshnikova, Y. A., Salvatierra, N. A., Wong, R. A., Schmidt, C., Weaver, V. M., Weiss, W. A., & Persson, A. I. (2015). STAT3 Blockade Inhibits Radiation-Induced Malignant Progression in Glioma. *Cancer Research*, 75(20), 4302–4311. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3331>
- Li, Q., Ding, C., Chen, C., Zhang, Z., Xiao, H., Xie, F., Lei, L., Chen, Y., Mao, B., Jiang, M., Li, J., Wang, D., & Wang, G. (2014). miR-224 promotion of cell migration and invasion by targeting Homeobox D 10 gene in human hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 29(4), 835–842. <https://doi.org/10.1111/jgh.12429>
- Li, Y., Ma, K., Xie, Q., Zhang, X., Zhang, X., Chen, K., Kong, L., & Qian, R. (2021). Identification of HOXD10 as a Marker of Poor Prognosis in Glioblastoma Multiforme. *OncoTargets and Therapy*, Volume 14, 5183–5195. <https://doi.org/10.2147/OTT.S336225>
- Liu, Z., Lian, X., Zhang, X., Zhu, Y., Zhang, W., Wang, J., Wang, H., Liu, B., Ren, Z., Zhang, M., Liu, M., & Gao, Y. (2021). ESPL1 Is a Novel Prognostic Biomarker Associated With the Malignant Features of Glioma. *Frontiers in Genetics*, 12, 666106. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.666106>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lu, K. V., Chang, J. P., Parachoniak, C. A., Pandika, M. M., Aghi, M. K., Meyronet, D., Isachenko, N., Fouse, S. D., Phillips, J. J., Cheresch, D. A., Park, M., & Bergers, G. (2012). VEGF Inhibits Tumor Cell Invasion and Mesenchymal Transition through a MET/VEGFR2 Complex. *Cancer Cell*, 22(1), 21–35. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.05.037>
- Mack, S. C., Singh, I., Wang, X., Hirsch, R., Wu, Q., Villagomez, R., Bernatchez, J. A., Zhu, Z., Gimple, R. C., Kim, L. J. Y., Morton, A., Lai, S., Qiu, Z., Prager, B. C., Bertrand, K. C., Mah, C., Zhou, W., Lee, C., Barnett, G. H., ... Rich, J. N. (2019). Chromatin landscapes reveal developmentally encoded transcriptional states that define human glioblastoma. *Journal of Experimental Medicine*, 216(5), 1071–1090. <https://doi.org/10.1084/jem.20190196>
- Mamizadeh, Z., Kalani, M. R., Parsania, M., Soltan Dallal, M. M., & Moradi, A. (2021). NEBL and AKT1 maybe new targets to eliminate the colorectal cancer cells resistance to oncolytic effect of vesicular stomatitis virus M-protein. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 23, 593–601. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2021.11.013>
- Marcos, N. T., Pinho, S., Grandela, C., Cruz, A., Samyn-Petit, B., Harduin-Lepers, A., Almeida, R., Silva, F., Morais, V., Costa, J., Kihlberg, J., Clausen, H., & Reis, C. A. (2004). Role of the Human ST6GalNAc-I and ST6GalNAc-II in the Synthesis of the Cancer-Associated Sialyl-Tn Antigen. *Cancer Research*, 64(19), 7050–7057.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1921>

Modrek, A. S., Eskilsson, E., Ezhilarasan, R., Wang, Q., Goodman, L. D., Bhat, K., Le, T., Barthel, F. P., Tang, M., Yang, J., Long, L., Gumin, J., Lang, F., Verhaak, R., Aldape, K., & Sulman, E. P. (2020). PDPN+ Tumor Initiating, Treatment Resistant Glioblastoma Cells Promote Radiation Resistance Via PRC2. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 108(3), e510. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2020.07.1606>

Ogawa, T., Hirohashi, Y., Murai, A., Ishidate, T., Okita, K., Wang, L., Ikehara, Y., Atoyoshi, T., Usui, A., Kubo, T., Nakastugawa, M., Kanaseki, T., Tsukahara, T., Kutomi, G., Furuhashi, T., Hirata, K., Sato, N., Mizuguchi, T., Takemasa, I., & Torigoe, T. (2017). ST6GALNAC1 plays important roles in enhancing cancer stem phenotypes of colorectal cancer via the Akt pathway. *Oncotarget*, 8(68), 112550–112564. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22545>

Ou, A., Yung, W. K. A., & Majd, N. (2020). Molecular Mechanisms of Treatment Resistance in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 351. <https://doi.org/10.3390/ijms22010351>

Ozaki, H., Matsuzaki, H., Ando, H., Kaji, H., Nakanishi, H., Ikehara, Y., & Narimatsu, H. (2012). Enhancement of metastatic ability by ectopic expression of ST6GalNAc1 on a gastric cancer cell line in a mouse model. *Clinical & Experimental Metastasis*, 29(3), 229–238. <https://doi.org/10.1007/s10585-011-9445-1>

Pan, Y., Wang, S., Yang, B., Jiang, Z., Lenahan, C., Wang, J., Zhang, J., & Shao, A. (2020). Transcriptome analyses reveal molecular mechanisms underlying phenotypic differences among transcriptional subtypes of glioblastoma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(7), 3901–3916. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14976>

Pappas, C. T., Bliss, K. T., Zieseniss, A., & Gregorio, C. C. (2011). The Nebulin family: An actin support group. *Trends in Cell Biology*, 21(1), 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.09.005>

Schaffnerath, J., Wyss, T., He, L., Rushing, E.

J., Delorenzi, M., Vasella, F., Regli, L., Neidert, M. C., & Keller, A. (2021). Blood-brain barrier alterations in human brain tumors revealed by genome-wide transcriptomic profiling. *Neuro-Oncology*, 23(12), 2095–2106. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab022>

Schwender, H. (2017). *Siggenes* [Computer software]. Bioconductor. <https://doi.org/10.18129/B9.BIOC.SIGGENE>

Segerman, A., Niklasson, M., Haglund, C., Bergström, T., Jarvius, M., Xie, Y., Westermark, A., Sönmez, D., Hermansson, A., Kastemar, M., Naimaie-Ali, Z., Nyberg, F., Berglund, M., Sundström, M., Hesselager, G., Uhrbom, L., Gustafsson, M., Larsson, R., Fryknäs, M., ...

Westermark, B. (2016). Clonal Variation in Drug and Radiation Response among Glioma-Initiating Cells Is Linked to Proneural-Mesenchymal Transition. *Cell Reports*, 17(11), 2994–3009. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.056>

Shah, C. A., Bei, L., Wang, H., Platanias, L. C., & Eklund, E. A. (2012). HoxA10 Protein Regulates Transcription of Gene Encoding Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) in Myeloid Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 287(22), 18230–18248. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.328401>

Shao, R. (2013). YKL-40 acts as an angiogenic factor to promote tumor angiogenesis. *Frontiers in Physiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00122>

Shen, L., Shi, Q., & Wang, W. (2018). Double

- agents: Genes with both oncogenic and tumor-suppressor functions. *Oncogenesis*, 7(3), 25. <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0034-x>
- Sherman, B. T., Hao, M., Qiu, J., Jiao, X., Baseler, M. W., Lane, H. C., Imamichi, T., & Chang, W. (2022). DAVID: A web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W216–W221. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac194>
- Soussi, T., & Wiman, K. G. (2015). TP53: An oncogene in disguise. *Cell Death & Differentiation*, 22(8), 1239–1249. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.53>
- Spruance, S. L., Reid, J. E., Grace, M., & Samore, M. (2004). Hazard Ratio in Clinical Trials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(8), 2787–2792. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.8.2787-2792.2004>
- Sulman, E., Goodman, L., Le, T., Pelloso, C., Bhat, K., Gumin, J., Lang, F., Colman, H., & Aldape, K. (2008). A novel marker of glioma stem cells that is prognostic for treatment response and patient outcome. *Cancer Research*, 68(9_Supplement), 3777.
- Sun, H., Chang, J., Ye, M., Weng, W., Zhang, M., Ni, S., Tan, C., Huang, D., Wang, L., Du, X., Xu, M., & Sheng, W. (2020). GCNT4 is Associated with Prognosis and Suppress Cell Proliferation in Gastric Cancer. *OncoTargets and Therapy*, Volume 13, 8601–8613. <https://doi.org/10.2147/OTT.S248997>
- Sun, S., Wang, Y., Wu, Y., Gao, Y., Li, Q., Abdulrahman, A., Liu, X., Ji, G., Gao, J., Li, L., Wan, F., Li, Y., & Gao, D. (2018). Identification of COL1A1 as an invasion-related gene in malignant astrocytoma. *International Journal of Oncology*. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4568>
- Suzuki, M., Suzuki, M., Nakayama, J., Suzuki, A., Angata, K., Chen, S., Sakai, K., Hagihara, K., Yamaguchi, Y., & Fukuda, M. (2005). Polysialic acid facilitates tumor invasion by glioma cells. *Glycobiology*, 15(9), 887–894. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwi071>
- Tang, Z., Li, C., Kang, B., Gao, G., Li, C., & Zhang, Z. (2017). GEPIA: A web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W98–W102. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx247>
- Turtoi, A., Blomme, A., Bianchi, E., Maris, P., Vannozzi, R., Naccarato, A. G., Delvenne, P., De Pauw, E., Bevilacqua, G., & Castronovo, V. (2014). Accessibilome of Human Glioblastoma: Collagen-VI-alpha-1 Is a New Target and a Marker of Poor Outcome. *Journal of Proteome Research*, 13(12), 5660–5669. <https://doi.org/10.1021/pr500657w>
- Vajaria, B. N., & Patel, P. S. (2017). Glycosylation: A hallmark of cancer? *Glycoconjugate Journal*, 34(2), 147–156. <https://doi.org/10.1007/s10719-016-9755-2>
- Verhaak, R. G. W., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., Miller, C. R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J. P., Alexe, G., Lawrence, M., O’Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B. A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., ... Hayes, D. N. (2010). Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17(1), 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>
- Wang, Q., Hu, B., Hu, X., Kim, H., Squatrito, M., Scarpace, L., deCarvalho, A. C., Lyu, S., Li, P., Li, Y., Barthel, F., Cho, H. J., Lin, Y.-H., Satani, N., Martinez-Ledesma, E., Zheng, S., Chang,

Artículos

E., Sauv , C.-E. G., Olar, A., ... Verhaak, R. G. W. (2017). Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell*, 32(1), 42-56.e6.

<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.06.003>

Wood, M. D., Reis, G. F., Reuss, D. E., & Phillips, J. J. (2016). Protein Analysis of Glioblastoma Primary and Posttreatment Pairs Suggests a Mesenchymal Shift at Recurrence. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 75(10), 925–935.

<https://doi.org/10.1093/jnen/nlw068>

Xu, L., Chen, Y., Huang, Y., Sandanaraj, E., Yu,

J. S., Lin, R. Y.-T., Dakle, P., Ke, X.-Y., Chong, Y. K., Koh, L., Mayakonda, A., Nacro, K., Hill, J., Huang, M.-L., Gery, S., Lim, S. W., Huang, Z., Xu, Y., Chen, J., ... Koeffler, H. P. (2021). Topography of transcriptionally active chromatin in glioblastoma. *Science Advances*, 7(18), eabd4676.

<https://doi.org/10.1126/sciadv.abd4676>

Yang, M., Chen, X., Zhang, J., Xiong, E., Wang, Q., Fang, W., Li, L., Fei, F., & Gong, A. (2021). ME2 Promotes Proneural–Mesenchymal Transition and Lipogenesis in Glioblastoma. *Frontiers in Oncology*, 11, 715593.

<https://doi.org/10.3389/fonc.2021.715593>

Yip, S.-C., Saha, S., & Chernoff, J. (2010). PTP1B: A double agent in metabolism and

oncogenesis. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(8), 442–449.

<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.03.004>

Zeng, L., Liao, Q., Zeng, X., Ye, J., Yang, X.,

Zhu, S., Tang, H., Liu, G., Cui, W., Ma, S., & Cui, S. (2022). Noncoding RNAs and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in advanced gastric cancer. *Bioengineered*, 13(2), 2623–2638.

<https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2021348>

Zhang, G., Tanaka, S., Jiapaer, S., Sabit, H.,

Tamai, S., Kinoshita, M., & Nakada, M. (2020). RBPJ contributes to the malignancy of glioblastoma and induction of proneural-mesenchymal transition via IL-6-STAT3 pathway. *Cancer Science*, 111(11), 4166–4176.

<https://doi.org/10.1111/cas.14642>

Zizza, P., Dinami, R., Porru, M., Cingolani, C., Salvati, E., Rizzo, A., D'Angelo, C., Petti,

E., Amoreo, C. A., Mottolese, M., Sperduti, I., Chambery, A., Russo, R., Ostano, P., Chiorino, G., Blandino, G., Sacconi, A., Cherfils-Vicini, J., eonetti, C., ... Biroccio, A. (2019). TRF2 positively regulates SULF2 expression increasing VEGF-A release and activity in tumor microenvironment. *Nucleic Acids Research*, 47(7), 3365–3382.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkz041>

Polylactic acid PLA production from alternative substrates submerged fermentation with *Rhizopus oryzae*

Carlos Luis Alvarado Almarza^{1*}, Romari Hernández, Mauricio Veitia, Domenico Pavone

⁽¹⁾Center for Chemical Research (CIQ). Laboratory of Industrial Biotechnology (LABIOT). Faculty of Engineering. University of Carabobo

(*) e-mail: claalmarza@gmail.com

Resumen

Esta investigación tuvo como objetivo obtener un bioplástico a escala de laboratorio a partir de sustratos generados mediante fermentación sumergida, mediante un proceso dividido en dos fases: fermentación y polimerización. Primero, se seleccionó el microorganismo y se formularon medios de cultivo convencionales y alternativos para la fermentación. En estos medios se produjo ácido láctico, materia prima para la polimerización. La fermentación se ejecutó a nivel laboratorio con la cepa seleccionada, y el ácido láctico generado se purificó y caracterizó mediante análisis fisicoquímicos. El experimento se realizó por triplicado en dos medios: PDA y residuos vegetales como sustrato alternativo. Se obtuvo ácido láctico en ambos casos, con concentración máxima de 9.34 g/L y pH promedio de 2.46 en el medio de residuos vegetales. La producción se confirmó mediante espectroscopía UV-Vis e infrarroja. En la segunda fase, se ajustó y llevó a cabo la polimerización, consistiendo en las etapas de preconcentración, oligomerización y polimerización, adaptadas a las condiciones y equipamiento del laboratorio. El bioplástico se caracterizó fisicoquímicamente. Las pruebas infrarrojas identificaron grupos funcionales específicos, mientras que el análisis reológico evidenció un comportamiento pseudoplástico. El peso molecular promedio del polímero fue 16,327.43 g/mol. Además, se realizaron ensayos de biodegradabilidad que resultaron positivos. Finalmente, un análisis económico evidenció la alta viabilidad del proceso para su aplicación en laboratorio.

Palabras Claves: Fermentación, Residuos Vegetales, Bioplástico, Polimerización, Biodegradabilidad.

Abstract

The objective of this research was to obtain a laboratory scale bioplastic from substrates obtained by submerged fermentation; a process, which consisted of two parts: a fermentation process and polymerization. First, the microorganism used was selected and the means of conventional and alternative crops for fermentation were formulated, where the material (lactic acid) was obtained that it will be used to get the polymerization; The fermentation process was performed at the laboratory level, in order to produce lactic acid from the microorganism strain, which was purified and characterized by physicochemical form. This was carried out in triplicate for two different culture media PDA and vegetable wastes as alternative substrate, obtaining lactic acid in both media, with a maximum concentration of 9.34 g / L and a pH of 2.46 for the average vegetable waste. To verify the production of lactic acid tests Ultraviolet visible and infrared spectrums were used. In the second step the process suitable polymerization to laboratory conditions as equipment, reagents and time was set; the process contained three steps pre-concentration, oligomerization and polymerization completed bioplastic production stages was characterized by physicochemical form. Infrared tests were performed to identify the functional groups, and observing rheological tests that it has a pseudoplastic behavior, and the calculation of the average molecular weight was 16327.43 g / mol. Besides, biodegradability tests that tested positive were performed. Finally, the economic analysis was obtained feasibility high of application to laboratory level.

Key Words: Fermentation, Waste Vegetable, bioplastic, Polymerization, Biodegradability

Introduction

The accumulation of substantial quantities of plastic waste represents a critical environmental challenge, primarily due to the recalcitrant nature of conventional plastics stemming from their non-biodegradable chemical architecture (Elnashar, 2011). Transitioning from petrochemical-derived plastics to biodegradable alternatives offers a viable strategy to mitigate the environmental burden imposed by persistent plastic residues. Biodegradable plastics can be managed as organic waste streams, enabling their disposal in sanitary landfills or controlled composting facilities where microbial-mediated degradation occurs over significantly reduced timeframes. Such bioplastics are typically synthesized from renewable biomass resources of both animal and plant origin (IBAW, 2005).

Poly(lactic acid) (PLA) constitutes one of the most extensively investigated biodegradable polymers, synthesized via the polymerization of lactic acid monomers (García *et al.*, 2004). Lactic acid (2-hydroxypropanoic acid), a chiral α -hydroxy acid, serves diverse industrial sectors including chemical synthesis, pharmaceuticals, food technology, and bioplastic manufacture, with production routes encompassing both chemical and biotechnological processes. Chemical synthesis methods often yield a racemic mixture containing equimolar amounts of the D- and L- stereoisomers, resulting in optical inactivity—a significant drawback for certain applications (Serna, 2005). Conversely, biotechnological production employs microbial fermentation, enabling the generation of optically pure enantiomers, either D(-) or L(+) forms, depending on the microorganism and fermentation conditions utilized (Hofvendahl & Hägerdal, 2000).

Among lactic acid-producing microorganisms, *Rhizopus oryzae*, a filamentous fungus classified within the *Zygomycetes*, is prominent for its capacity to biosynthesize optically pure L(+)-lactic acid with high yield efficiency. This strain displays metabolic versatility by fermenting diverse lignocellulosic agro-industrial residues, thereby valorizing waste streams while concomitantly producing lactic acid along with ancillary metabolites such as ethanol (Feng-

Wei, 2023). Solid waste accumulation represents an additional anthropogenic environmental concern, where plant-derived biomass residues constitute a significant proportion. These plant wastes infiltrate subsurface lithospheric strata, potentially compromising water quality through leachate generation and pollutant dispersion (Eswaran *et al.*, 2001).

Plant biomass is inherently rich in complex carbohydrates, rendering it an attractive carbon source for microbial bioprocesses, including the fermentative production of lactic acid by *R. oryzae*. This valorization pathway provides a dual environmental benefit by reducing net CO₂ emissions associated with plant biomass decomposition and generating value-added bioproducts. Therefore, the substitution of persistent synthetic polymers with biodegradable bioplastics derived from renewable carbonaceous feedstocks, such as lignocellulosic plant residues, emerges as a sustainable solution to ameliorate multiple environmental impacts.

The objective of this study is to develop an integrated bioconversion process utilizing submerged fermentation with *R. oryzae* to transform plant waste substrates into bioplastics precursors, thereby contributing to the reduction of environmental contamination linked to both conventional plastic persistence and agricultural residue accumulation.

Materials and Methods

Microorganism

The *R. oryzae* strain utilized in this study was procured from the Venezuelan Center for Microorganism Collection (CVCM), accession number 3031, at the Central University of Venezuela (UCV). Subsequently, the biomass was subjected to lyophilization for preservation.

Reactivation of *R. oryzae* strain

Lyophilized *R. oryzae* strain was reconstituted using sterile deionized water and subsequently inoculated onto Potato Dextrose Agar (PDA) medium. The inoculated plates were incubated under ambient laboratory conditions (approximately 22–25°C) for a period of five days.

Morphological characterization was performed to confirm fungal identification, in accordance with established protocols (Guevara *et al.*, 2010; FAO, 1985; Schaad & Jones, 2001).

Inoculum Preparation

Spores were harvested from mature *R. oryzae* cultures cultivated on Potato Dextrose Agar (PDA) plates. The spore suspension was prepared by rinsing the agar surface with 10 mL of 0.1% (w/v) Tween-80® aqueous solution to facilitate spore detachment. The resultant suspension was then subjected to filtration to remove mycelial fragments and agar debris. Spore concentration was quantified using a hemocytometer (Neubauer chamber) under microscopic examination, following established protocols (Sánchez-Rosario & Sánchez, 2011; Khunnonkwoa *et al.*, 2012; Gil-Horán *et al.*, 2008; Guevara *et al.*, 2010; Cañedo & Ames, 2004).

Culture media

The alternative culture media utilized for submerged fermentation processes consisted of the following raw material concentrations (g/L): potato (200), sweet potato (330), carrot (100), beetroot (300), and cassava (100). This base was further supplemented with (g/L): sodium phosphate (0.40), ammonium sulfate (2.0), magnesium sulfate (0.25), and zinc sulfate (0.40). Vegetables were subjected to washing, mechanical crushing, and drying in accordance with standard COVENIN 1156-79, maintained at 70 °C for a duration of 4 days. The conventional culture medium employed was Potato Dextrose (PD) broth, prepared by boiling 200 g of potato in 1 L of distilled water, followed by filtration through cheesecloth, dilution at a 1:1 ratio with distilled water, and supplementation with glucose at 30 g/L. The pH of all culture media was adjusted to 6.0 prior to inoculation.

Fermentation Process

Bioreactors consisted of 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of either the alternative or conventional fermentation medium. The culture media were sterilized by autoclaving at 121 °C for 15 minutes, followed by aseptic inoculation with a *R. oryzae* spore suspension at a concentration of 1×10^6 spores/mL. The bioreactors were incubated at 30 °C with agitation at 150 rpm

on an orbital shaker for periods of 24, 48, and 72 hours. Fermentation at each time point was terminated by thermal inactivation at 80 °C for 15 minutes. Subsequently, the fermentation broth was filtered through pre-weighed Whatman No. 5 filter paper to separate the biomass (Bulut *et al.*, 2004). Experiments were conducted in triplicate.

Lactic Acid Recovery and Biomass Quantification

Lactic acid produced during fermentation was recovered from the supernatant via a liquid-liquid extraction process. In 250 mL flasks, the fermentation broth was acidified to pH 3 using 1 N hydrochloric acid, followed by the addition of ethyl acetate as the organic solvent. The mixtures were agitated at 150 rpm on an orbital shaker for 30 minutes. The resultant biphasic mixture was transferred to a separating funnel to isolate the organic phase. The collected organic phase underwent simple distillation to evaporate and recover the ethyl acetate, leaving behind purified lactic acid. The final lactic acid solution was stored in sterilized glass containers for subsequent analyses (Nuñez *et al.*, 2009).

For biomass quantification, filter papers containing the harvested mycelium were dried at 80 °C until a constant weight was achieved, and biomass concentration was determined gravimetrically (Cañedo & Ames, 2004). Results are expressed as grams of dry biomass (mycelium) per liter of culture.

Quantification of Lactic Acid

Lactic acid concentration in the filtrates was determined using the ferric chloride colorimetric assay, following the methodologies of Nurbalqis *et al.* (2015) and Orozco & Solarte (2003). An aliquot of 5 mL from each filtrate was combined with 3 mL of 1% (w/v) FeCl₃ solution. The solution was then acidified by adding 1 mL of 1N HCl per 100 mL of FeCl₃. Absorbance measurements were recorded at 440 nm using a spectrophotometer. Quantification was based on a lactic acid standard calibration curve ranging from 0.000 to 4.056 g/L, adapted from Marquez (2020). All measurements were performed in triplicate. Final lactic acid concentrations were expressed as grams per liter (g/L).

Quantification of Consumed Substrate

Substrate consumption, expressed as reducing sugars, was quantified using the phenol-sulfuric acid method as described by the Nuffield Foundation (1984). To 1 mL of the sample, 1 mL of 5% (w/v) phenol solution and 5 mL of 98.5% sulfuric acid were added. The mixture was incubated for 20 minutes, during which it was gently agitated at 5-minute intervals to facilitate chromophore development. Absorbance was measured at 490 nm. A standard curve was prepared with D-glucose over the concentration range of 0.000 to 0.600 g/L. Results were expressed in grams of substrate consumed per liter (g/L).

Characterization of lactic acid

Quantitative analysis

The characterization of lactic acid was conducted by measuring its refractive index, acidity, relative density, and viscosity. These physicochemical properties were determined according to the procedures established in the COVENIN standards 702:2001, 1116:77, and 658:1997, with the exception of viscosity, which was assessed following the methodology described by Chávez *et al.* (2023).

Qualitative analysis

Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy was employed to identify the functional groups present in lactic acid (Skoog, 2001). A total of six samples, three from the conventional medium and three from the alternative medium, were analyzed directly in the liquid phase without any mixing. Two drops of each sample were placed between two potassium bromide (KBr) plates (Skoog, 2001). Spectral acquisition for each sample was conducted under varying instrumental conditions to achieve optimal resolution, characterized by sharp and intense absorption bands whenever possible. Once the optimal spectrum was obtained for each sample, the spectral scale was calibrated in terms of wavenumber.

Production of polylactic acid

A pre-concentration step was conducted via simple distillation of 100 mL of lactic acid obtained from fermentation. The sample was heated for three hours within a temperature range of 40 to 60 °C. The concentration of

lactic acid was quantified by a colorimetric titration using 1 M sodium hydroxide (NaOH) as the titrant and phenolphthalein as the indicator (Jiménez, 2012).

The polymerization process comprised two distinct stages: oligomerization (dehydration) followed by polymerization. During the oligomerization phase, 30 mL of lactic acid was subjected to continuous heating at 150 °C and dehydrated using a vacuum distillation apparatus. The system pressure was progressively lowered to 22 inches Hg vacuum, maintaining these conditions for a duration of 4 hours (Pinzón *et al.*, 2006).

Subsequent polymerization was initiated upon attainment of the target vacuum level. Tin chloride (SnCl₂) was introduced as a catalyst, and the reaction mixture was maintained at a constant temperature of 170 °C under a steady vacuum of 22 inches Hg. This stage proceeded for an additional 4 hours, during which polymer formation was monitored (Pinzón *et al.*, 2006).

Characterization of polylactic acid

Molecular Weight Estimation

Molecular weight was determined by measuring the intrinsic viscosity of polymer solutions prepared in chloroform at concentrations ranging from 0.9 to 2.0% w/v. The measurements were conducted using an Ostwald viscometer maintained at 25°C, following the methodology outlined by Jimenez (2012). The molecular weight was subsequently calculated utilizing the Mark-Houwink-Sakurada equation:

$$n = 5.45 \times 10^{-4} \times \bar{M}^{0.73}$$

Where:

η : intrinsic viscosity, d.u.

$\bar{M}$: molecular weight, g/mol

Structural analysis

A structural assessment of the polymer in solid state was conducted using infrared spectroscopy to characterize its functional groups. For sample preparation, the polymer was finely ground and homogenized with anhydrous, spectroscopic-grade KBr at a 1:100 sample-to-KBr weight ratio using a mortar. The resulting mixture was compressed into a pellet, which was subsequently positioned in the

spectrophotometer sample holder for spectral acquisition.

Degradation of the polymer

A hydrolytic degradation study of the polymer was conducted in two distinct media: acidic and neutral. Buffer compositions were adjusted to maintain a constant ionic strength of 0.15. The protocol involved immersing each sample in 6 mL of buffer solution within test tubes as follows:

Acidic medium: samples were immersed in 6 mL of phosphate buffer at pH 4.5 and incubated in a water bath at 36 °C.

Neutral medium (physiological conditions): samples were immersed in 6 mL of phosphate buffer at pH 7.0 and incubated in a water bath at 36 °C.

Enzymatic degradation was evaluated using Lipase 20 in a phosphate buffer solution at pH 7.0 and 36 °C. Polymer samples were placed in test tubes containing 10 mL of the

buffer solution with an enzyme concentration of 1 mg/mL (Bueno, 2012).

Polymer exposure to microorganisms

Biological degradation assays were conducted using the environmental fungus *Aspergillus niger* and the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, both obtained from the National Institute of Agricultural Research (INIA-CENIAP). Sample preparation and dimensions matched those used in hydrolytic and enzymatic degradation tests. Polymer specimens were incubated with these microorganisms for a duration of nine days, following protocols established by Swapnil *et al.* (2015) and Usha *et al.* (2011).

Results

Production of lactic acid

Figures 1 and 2 present the kinetic profiles of fermentations conducted using both conventional and synthetic media. Figure 3 illustrates the lactic acid production yields obtained from fermentations employing conventional versus alternative media formulations.

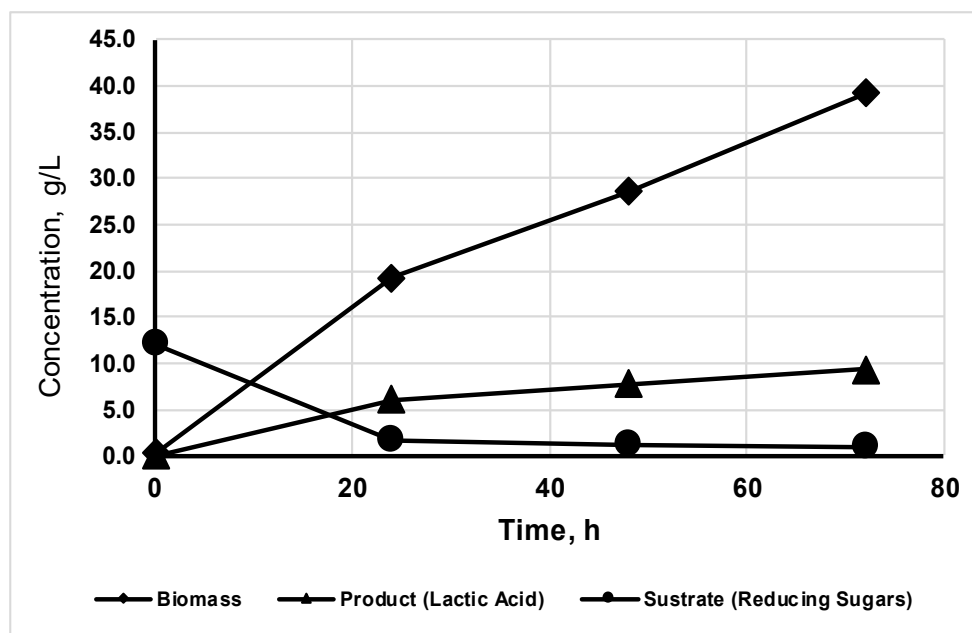


Figure 1. Kinetic analysis of lactic acid biosynthesis employing non-conventional substrate media

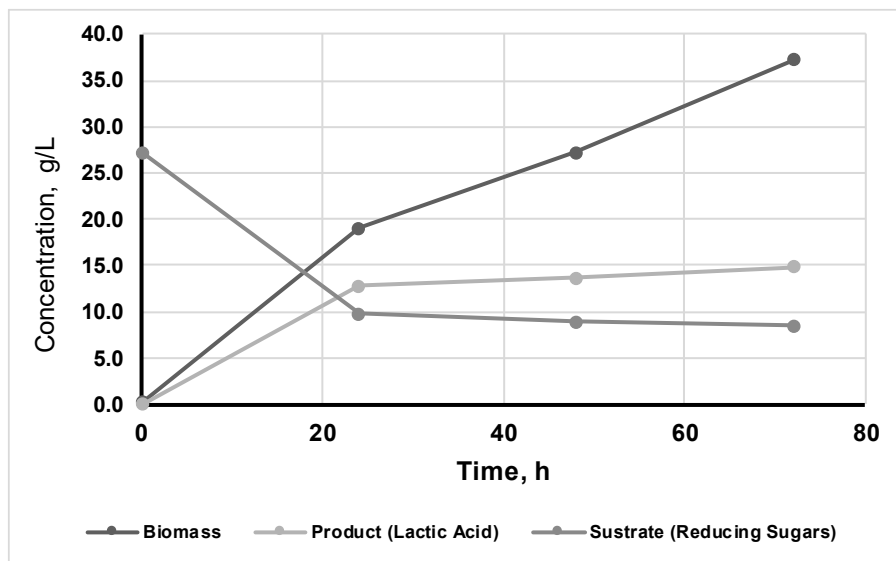


Figure 2. Kinetic analysis of lactic acid biosynthesis employing conventional media

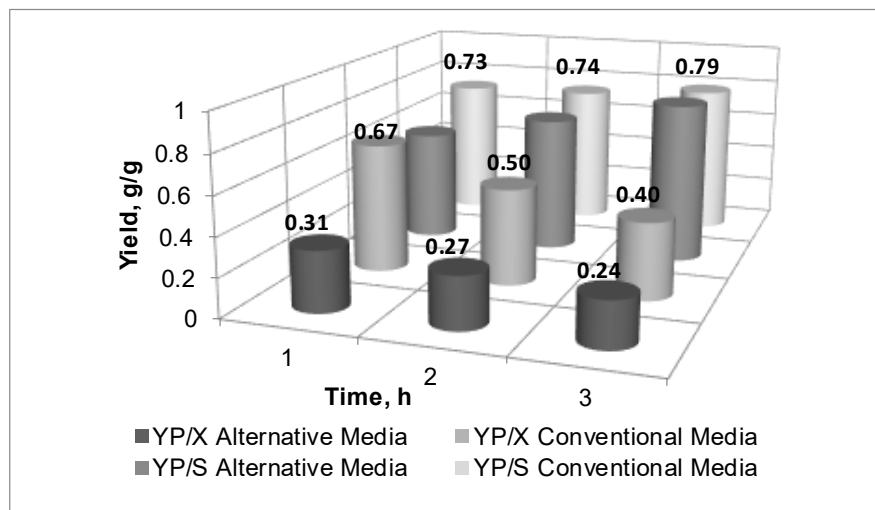


Figure 3. Yields for the production of lactic acid using the conventional and alternative media

Statistical analysis

Figures 3 until 7 show the statistical analysis.

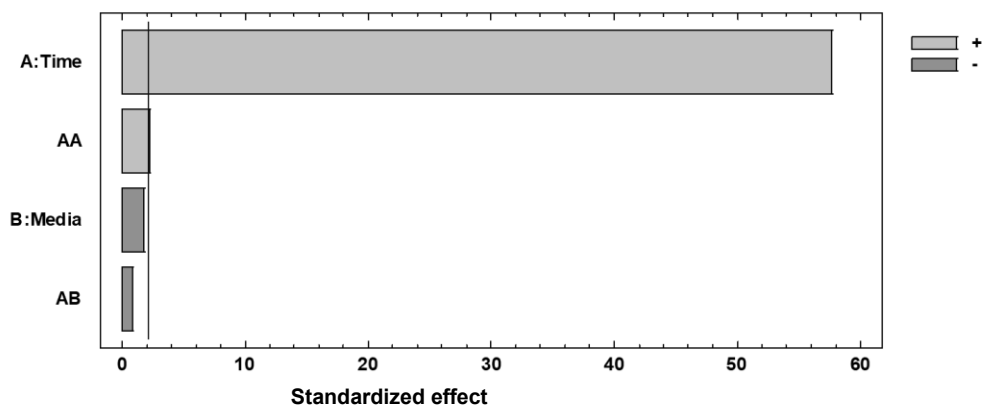


Figure 3. Standardized Pareto diagram for biomass.

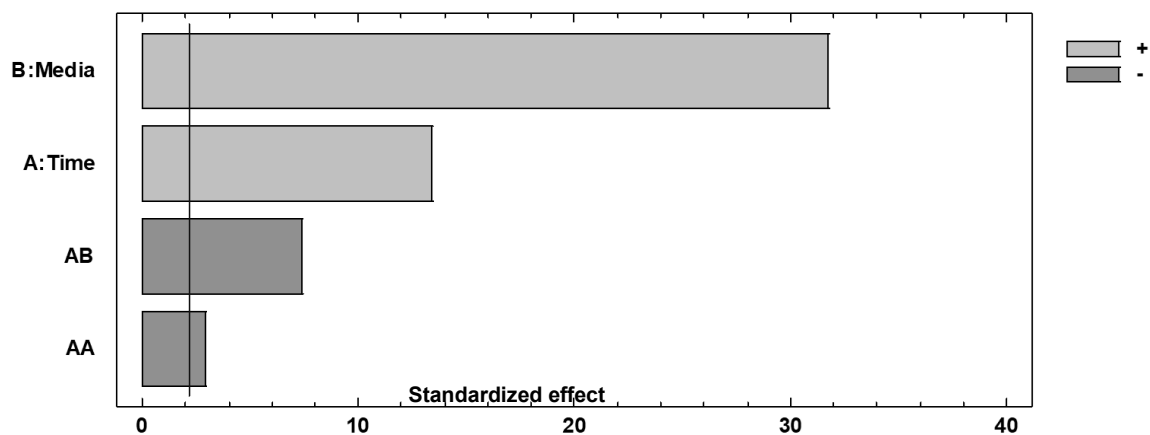


Figure 4. Standardized Pareto diagram for Lactic acid.

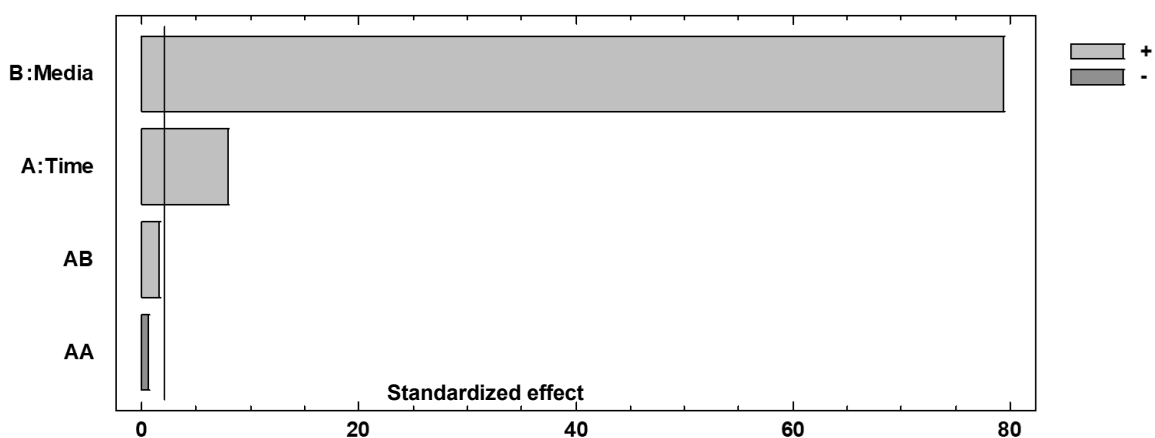


Figure 5. Standardized Pareto diagram for Reducing Sugars.

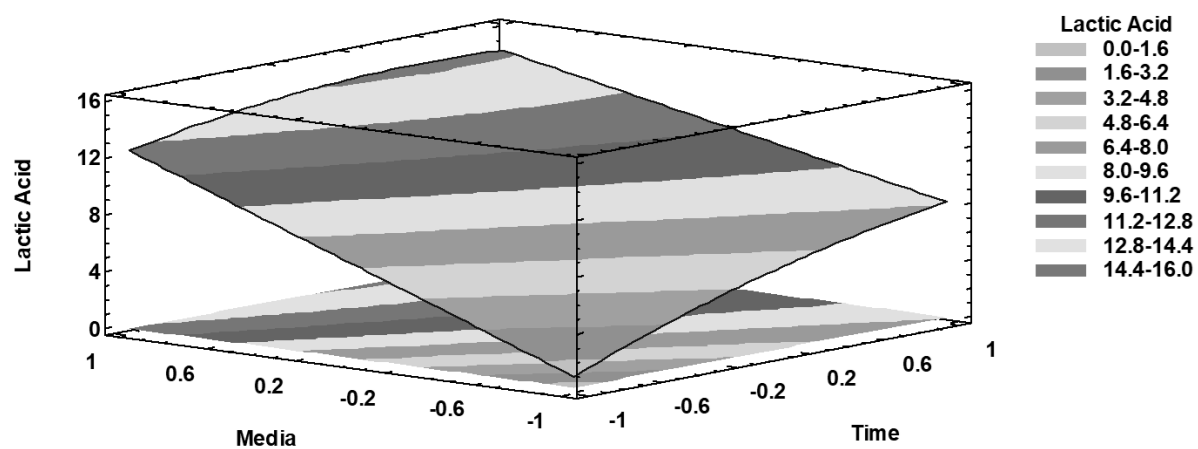


Figure 6. Estimated Response Surface for Lactic Acid.

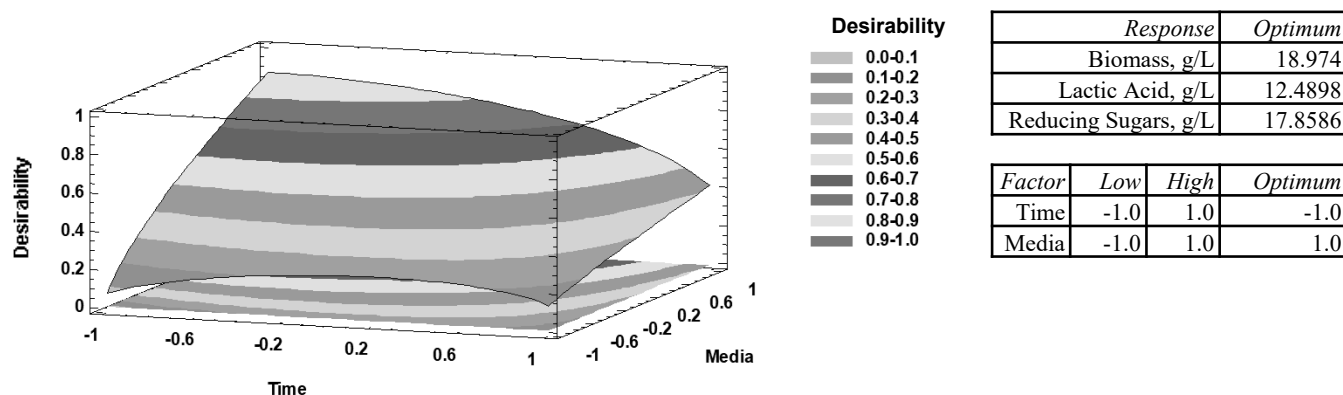


Figure 7. Response surface determined for desirability function optimizing maximal lactic acid, reducing sugar consumption, and minimal biomass.

Characterization of lactic acid

The results of physic-chemical tests show in Table 1.

Table 1. Properties obtained from lactic acid

Properties	Conventional media	Alternative media	Reference date
Density	984 Kg/m ³	976 Kg/m ³	1174.8 Kg/m ³
Viscosity	9.95x10 ⁻⁴ Kg/m.s	9.3x10 ⁻⁴ Kg/m.s	28.5x10 ⁻³ Kg/m.s
pH	2.6	2.4	-
Refraction Index	1.33	1.33	1.44
Titrateable acidity	1.323%	1.458%	-

The IR spectrum of the lactic acid obtained by the conventional media is shown in Figure 8 and for the alternative media in Figure 9.

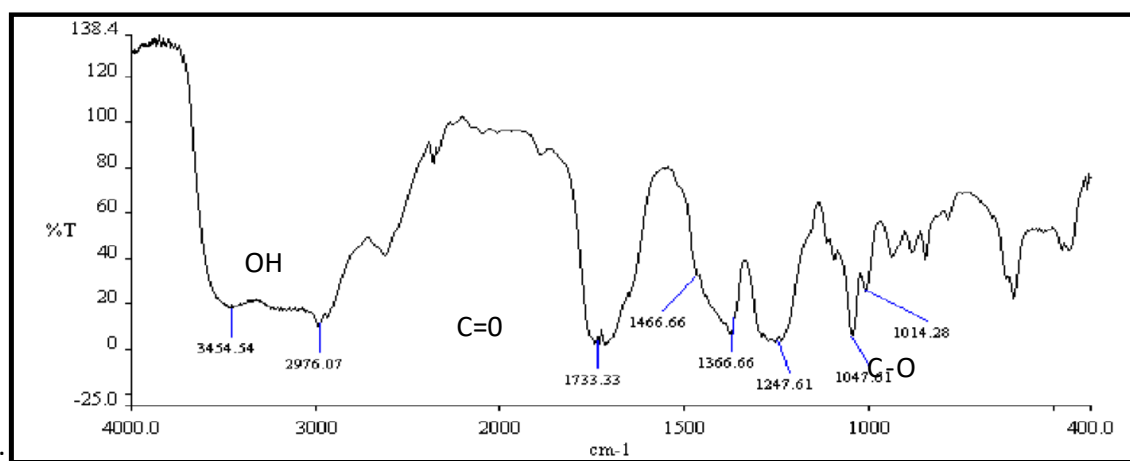


Figure 8. IR spectrum of the lactic acid obtained with the conventional media at 24 hours of fermentation.

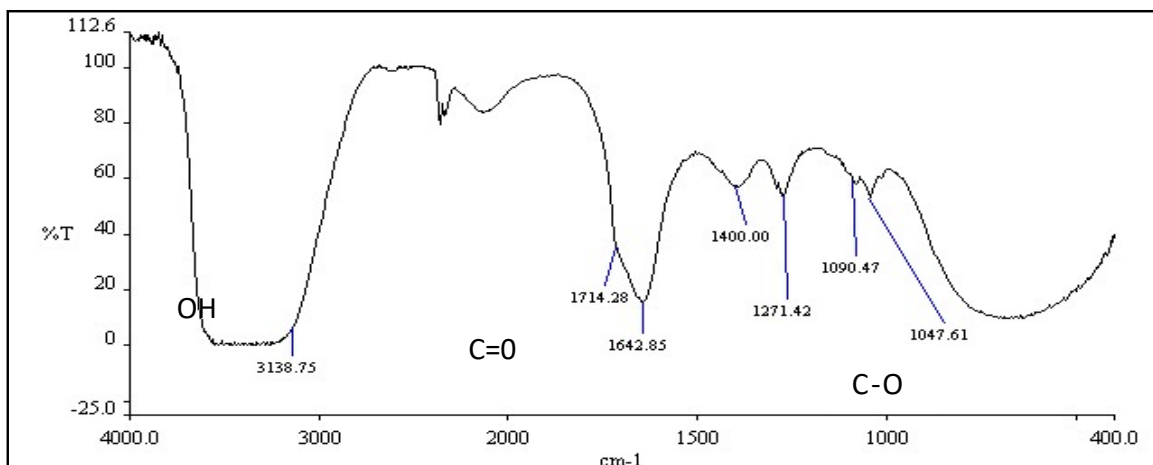


Figure 9. IR spectrum of the lactic acid obtained with the alternative media at 24 hours of fermentation.

Polylactic acid production

The outcomes of lactic acid pre-concentration are presented in Table 2.

Table 2. Pre-concentration of lactic acid

Alternative media		Conventional media	
Initial concentration (g/L)	Final concentration (g/L)	Initial concentration (g/L)	Final concentration (g/L)
9.33	65.70	14.84	76.50

The data pertaining to polylactic acid production are presented in Table 3.

Table 3. Polylactic acid production

Polylactic acid production	
Alternative media (g/L)	Conventional media (g/L)
20.15	20.00

Characterization of polylactic acid

The results of the titratable acidity analysis for polylactic acid are summarized in Table 4.

Table 4. Polylactic acid titratable acidity

Polylactic acid titratable acidity	
Alternative media (% acidity)	Conventional media (% acidity)
0.0054	0.0045

The infrared (IR) spectra of polylactic acid (PLA) synthesized using conventional media and alternative media are presented in Figures 10 and 11, respectively.

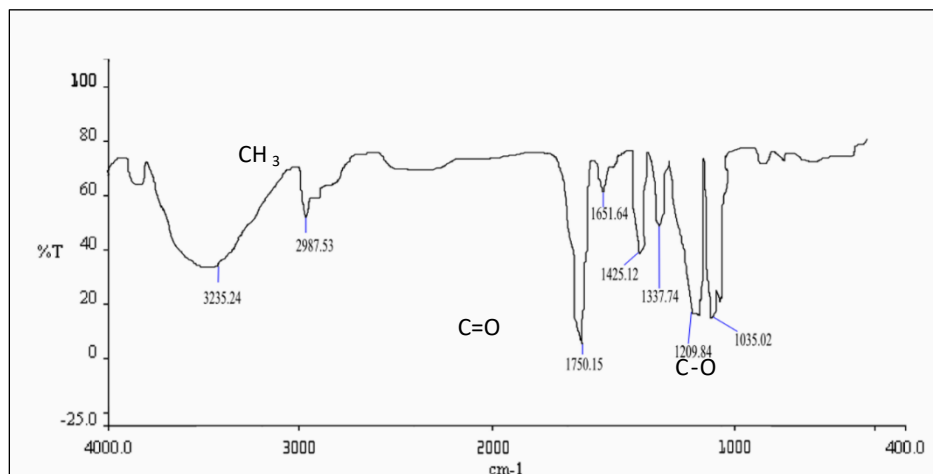


Figure 10. IR spectrum of the polylactic acid obtained with the conventional media.

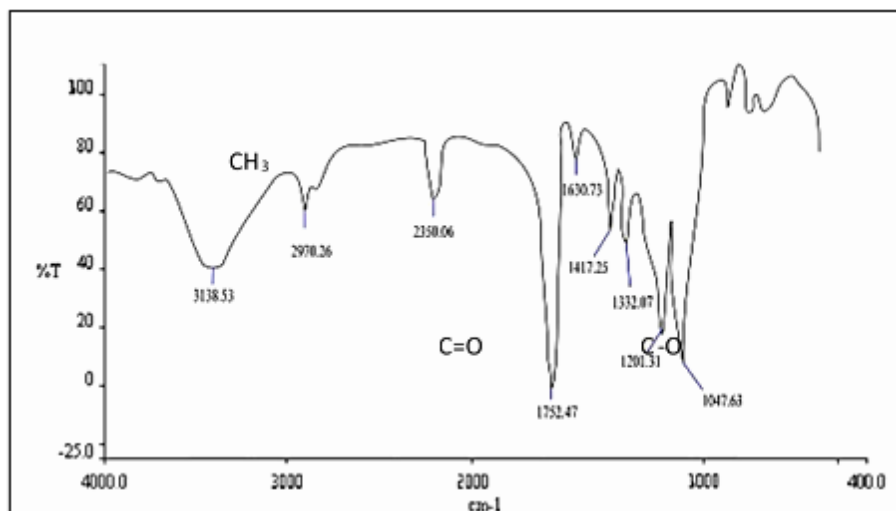


Figure 11. IR spectrum of the polylactic acid obtained with the alternative media.

Figure 12 illustrates the response of the solutions to variations in the fluid cutting speed.

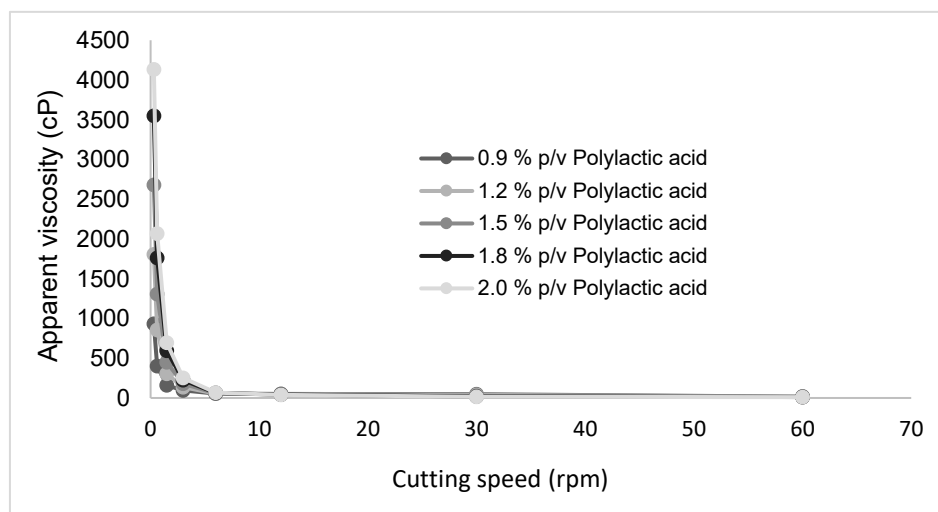


Figure 12. Representation of the viscosity of solutions of different concentration of the polylactic acid versus the cutting speed.

Artículos

The results of polylactic acid molecular weight show in Table 5.

Table 5. Polylactic acid titratable acidity

Average Molecular Weight of the Biopolymer		Reference Average Molecular Weight	
Alternative media (g/mol)	Conventional media (g/mol)	Polycondensation (g/mol)	ROP (g/mol)
16327.43	15695.90	< 1.6x 10 ⁴	2.0x10 ⁴ a 6.8x10 ⁵

Table 6 shows the different pH in polylactic solutions for hydrolytic degradation.

Table 6. Measurement of pH in different media arranged for hydrolytic degradation.

Day	Polylactic acid obtained from conventional media		Polylactic acid obtained from alternative media	
	Acidic medium (pH)	Neutral medium (pH)	Acidic medium (pH)	Neutral medium (pH)
0	4.5	7.0	4.5	7.0
1	3.5	5.0	3.5	5.0
2	3.0	4.0	3.0	4.0
3	2.6	3.0	2.6	3.0
4	2.3	3.0	2.3	3.0
5	2.0	3.0	2.0	3.0
6	2.0	3.0	2.0	3.0

The results of polylactic acid hydrolytic, enzymatic and biological degradation show in Figures13 until 15.

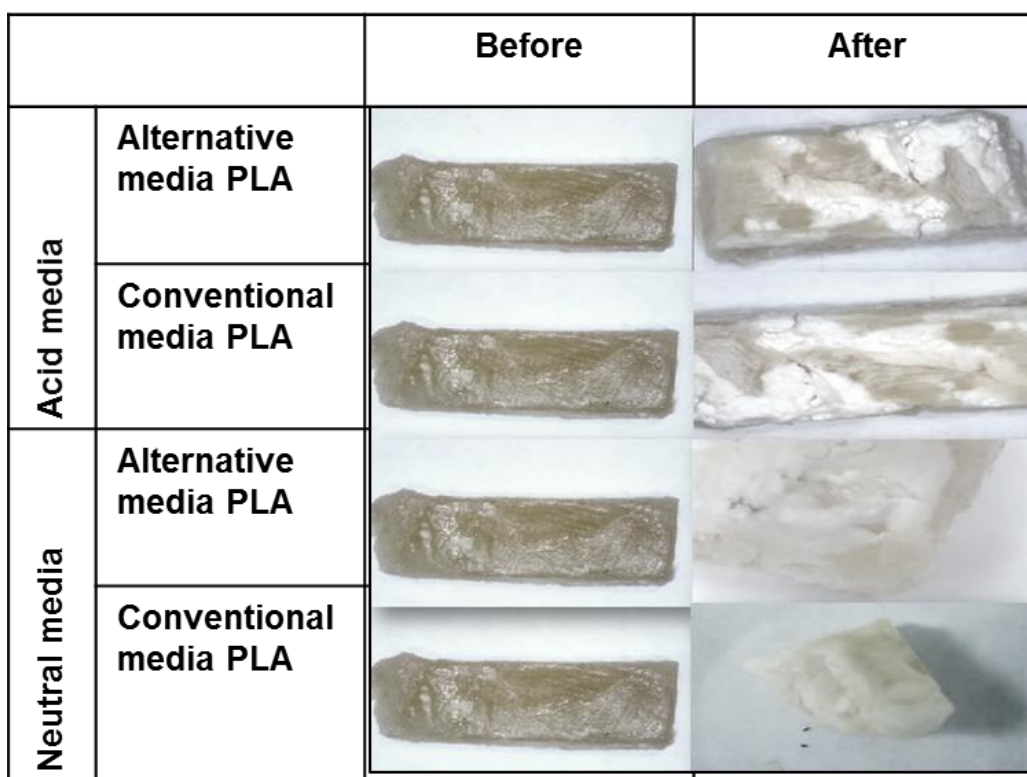


Figure 13. Samples of polylactic acid tested for hydrolytic degradation.

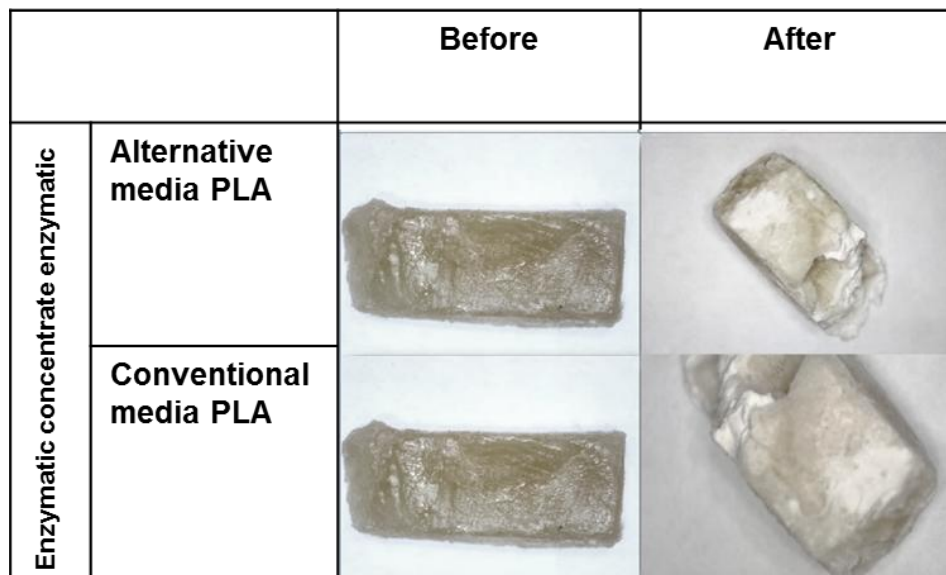


Figure 14. Samples of polylactic acid tested for enzymatic degradation.

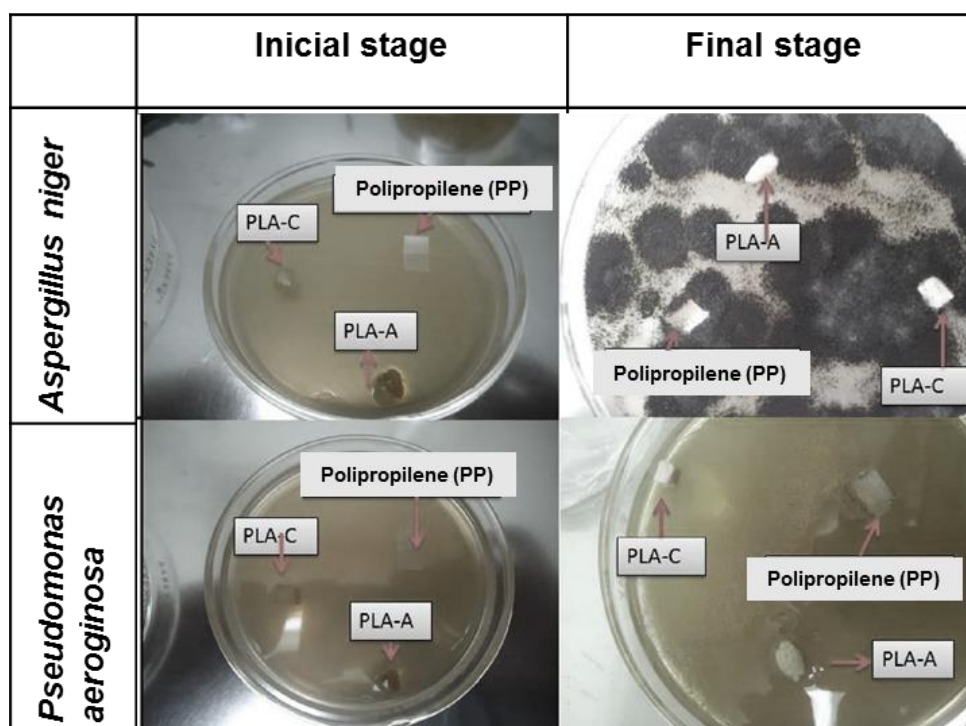


Figure 15. Samples of polylactic acid tested for biological degradation. PLA-C: Polylactic acid from conventional media. PLA-A: Polylactic acid from alternative media.

Discussion

Production of lactic acid

Figures 1 and 2 illustrate the characteristic growth phase of *R. oryzae* as previously documented (Xuefeng *et al.*, 2011; Gil-Horan *et al.*, 2008). During fermentation, both media exhibited similar lactic acid production kinetics, albeit with distinct final

concentrations at 72 hours: 9.34 g/L in the conventional medium versus 14.84 g/L in the alternative medium. The conventional medium demonstrated a higher initial concentration of reducing sugars (27.21 g/L) compared to the alternative medium (12.08 g/L). However, substrate utilization efficiency at 72 hours was superior in the alternative

medium, achieving 91.97% consumption relative to 68.93% in the conventional medium, indicative of enhanced fermentative performance in the alternative substrate formulation.

Comparing the results obtained (Table 2) with the research carried out by Xuefeng *et al.* (2010) and Gil-Horan *et al.*, (2003) it can be noted that a higher yield was obtained than these (Table 7). In addition, the yield obtained in this case is congruent with other reports; however, for some cases the yield obtained is similar and in others it is greater. Table 7 summarizes the different reports of production of lactic acid by different microorganisms and substrates considering the results of the present study.

Characterization of polylactic acid

The percentage of acidity (Table 4) of the titrated samples is very close between them, that is, it cannot be noticed a notable difference between them, therefore the degree of polymerization in the samples is similar. These values may be because for both monomers used for the polymerization, both the conventional and the alternative media were used at the same concentration, the same polymerization times, as well as the amount of catalyst, were used. Thus, it can be said that the biopolymer obtained from the alternative medium is as acceptable as the one produced from the conventional medium, in addition that the low acidity percentage indicates that the acid used as the monomer reacted mostly in the polymerization process, therefore had a good performance.

The IR spectrum of the polylactic acid obtained from the conventional medium (Figure 10) shows the functional groups characteristic of the structure of this polymer, such as the carbonyl group (C=O) in 1750 cm^{-1} , the strong signal of methyl (CH_3) at 1425 cm^{-1} and 2987 cm^{-1} , and finally another signal of the CO bond of the carboxyl group at 1035 cm^{-1} and 1209 cm^{-1} respectively (Pavia *et al.*, 2020). Observing the spectrum obtained qualitatively confirms that there is presence of polylactic acid since the functional groups corresponding to it are clearly reflected; The same occurs with the IR spectrum of the polylactic acid obtained from the alternative medium (Figure 11).

In Figure 12, it is observed that the viscosity decreases with increasing the cutting speed of the fluid. Welty *et al.* (2007) says that when viscosity varies according to shear stress, shear rate and / or temperature we are in the presence of a non-Newtonian fluid. In addition, when this fluid decreases its viscosity by increasing the rate of deformation we are in the presence specifically of pseudoplastic fluids. When comparing the results with those expressed by Chatillon (2012), it was found that the rheological study of polylactic acid is of pseudoplastic tendency, equal to that obtained in the present investigation. The values obtained for the molecular weight of the polylactic acid (16327.43 g/mole for the alternative media and 15695.90 g/mole for the conventional media) (Table 5) are congruent with those reported by Zuluaga (2013)

Table 7. Lactic acid production reports.

Author	Microorganism	Substrate	Yield
Tatum & Peterson (1935)	<i>Streptococcus lactis</i>	Glucose	94.00%
	<i>Lactobacillus casei</i>		93.00%
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>		95.00%
Pan <i>et al.</i> (1940)	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Molasses	87.30%
Cordon <i>et al.</i> (1950)	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Potato starch	61.90%
	<i>Lactobacillus pentosus</i>		91.20%
	124-2 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> NRLB-445		79.40%
Rehm (2009)	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Glucose	90.0%
Xuefeng <i>et al.</i> (2011)	<i>Rhizopus oryzae</i>	Glucose	78.75%
Gil-Horan <i>et al.</i> (2008)	<i>Rhizopus oryzae</i>	Solid orange waste	82.00%
Orozco & Solarte (2003)	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> (NRRL B-763)	Glucose	90.21%

where it is indicated that molecular weight for the synthesis of PLA by polycondensation is 1.6×10^4 Da, while the molecular weights synthesized according to the ring-opening polymerization (ROP) method are between 2×10^4 to 6.8×10^5 g/mole (Zuluaga, 2013).

Results for hydrolytic degradation show in Figure 13 where it is observed that where it was observed during the first three days that the samples that were exposed to the media began to turn white and had small cracks in its surface, in addition, it was possible to notice the presence of bubbles in the middle which is indicative of the evolution of dioxide of carbon (CO_2) characteristic of a decomposing material (Meneses *et al.*, 2007). The remaining days of the test the samples were completely white, with larger cracks and even small particles detachment. In the same way, the presence of bubbles in the media was maintained; all these changes give evidence of the degenerative process that the samples suffered. These results are congruent with Bueno (2012). In these latter two methods the pH decrease was a characteristic presented as indicative of the degradation (Table 6).

With enzymatic degradation (Figure 14) it was possible to visualize particles detachments on the first day of the sample, some bubbles indicative of CO_2 evolution. On the final day the samples were extracted from the medium observing that it turned white, like those mentioned in the test of hydrolytic degradation, cracking and detachment of particles evidencing the degenerative process that the sample underwent in this test. These results were congruent with those presented by Bueno (2012).

The last method was biological degradation (Figure 15), in which the samples were exposed to two microorganisms, one fungus (*A. niger*) and one bacterium (*P. aeruginosa*), in Petri plates for 9 days. The results are shown in Figure 15 where three samples can be seen on each plate, which are PLA-C (biopolymer obtained from the conventional medium), PLA-A (biopolymer obtained from the alternative medium) and polypropylene (Petroleum). The deterioration of the biopolymer samples

obtained was evident, showing surface cracking, color change and texture change in both samples. Unlike the PLA-C and PLA-A samples, Polypropylene did not undergo any changes when exposed to microorganisms, which indicates that the degeneration of the other samples shows the effectiveness of the degradation.

Conclusions

The maximum achieved concentration of lactic acid using conventional and alternative media was 14.84 g / L and 9.34 g / L respectively. The yields of lactic acid achieved from both media were 80% and 84% respectively, expressed as grams of lactic acid produced between grams of consumed substrate. The degrees of acidity of conventional and alternative media were 1.323% and 1.458%, respectively. The total polymerization time was 8 hours. The amounts of bioplastic obtained from the lactic acid polymerization of the conventional medium and the alternative media were 20.00 g and 20.15 g respectively. The average molecular weight of the bioplastic obtained from the lactic acid polymerization of the conventional media was 15695.90 g/mole. The average molecular weight of the bioplastic obtained from the lactic acid polymerization of the alternative media was 16327.43 g/mole. The bioplastic obtained from the polymerization of lactic acid from the conventional and alternative media according to various tests is biodegradable.

Acknowledgments

The authors thank the staff of the Center for Chemical Research (C.I.Q) of the Faculty of Engineering of the University of Carabobo, for collaborating with the development of this research. To the Institute of Biomedical Research of the University of Carabobo (BIOMED).

References

Bueno, D. (2012). Síntesis de copolímeros basados en ácido láctico, ácidos dicarboxílicos insaturados y monómeros acrílicos. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia.

Bulut, S.; Elibol, M. & Ozer, D. (2004). Effect of different carbon sources on $\text{I}(+)$ –

lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochem Eng J* (21): 33–37.

Cañedo, V.; Ames, T. (2004). Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. ISBN 92-9060-238-4.

Castaño, E. (2011). Comunicar la responsabilidad social, una opción de éxito empresarial poco explorada. *Rev. Lasallista Investig.* 8 (2): 173-186.

Chatillon M. (2012). Modificación estructural de poli(ácido láctico) mediante extrusión reactiva: estudio del comportamiento reológico. Universidad Politécnica de Catalunya. Departamento de Ciencia de Materiales e Ingeniería Metalúrgica. España.

Chávez, H.; Reinoso, A.; Manzano, D.; Campos, G. (2023). Química general. Introducción a la química: conceptos básicos y principios fundamentales. Editorial Queyám Cia. Ltda. ISBN 978-9942-7124-0-0

Cordon, T.; Treadway, R.; Walsh, M. & Osborne, M. (1950). Lactic acid from potatoes. *Ind. Eng. Chem.* 42 (9): 1833–1836.

COVENIN (Comisión Venezolana de Normas Industriales). (1977). COVENIN 1116. Frutas, Vegetales y Productos Derivados. Determinación de la Densidad Relativa. Ministerio de Industrias Ligeras y Comercio. Caracas, Venezuela.

COVENIN (Comisión Venezolana de Normas Industriales). (1997). COVENIN 658. Leche y sus derivados. Determinación de la Acidez Titulable. (3ra. Revisión). Ministerio de Industrias Ligeras y Comercio. Caracas, Venezuela.

COVENIN (Comisión Venezolana de Normas Industriales). (2001). COVENIN 702. Aceites y Grasas Vegetales.

Determinación del Índice de Refracción. (2da. Revisión). Ministerio de Industrias Ligeras y Comercio. Caracas, Venezuela.

Elnashar, M. (2011). Biotechnology of Biopolymers. InTech. Croatia. ISBN 978-953-307-179-4.

Eswaran H.; Lal, R. & Reich, PF. (2001). Land degradation: An overview. In : Bridges EM, Hannam ID, Oldeman LR, Penning de Vries FWT, Scher SJ, Sombatpanit S (eds). Response to land degradation. Science Publ, Inc, Enfield, New Hampshire, USA, pp. 20-35.

FAO (1985). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Oficina Regional para América Latina y el Caribe Roma. Manual para patólogos vegetales. Santiago, Chile. ISBN 0-89054-066-7.

García, M.; Quintero, R. & López-Munguía, A. (2004). Biotecnología Alimentaria. Limusa Noriega Editores. México. ISBN 9681845226.

Gil-Horan, R.; Domínguez, R. & Pachó, J. (2008). Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cáscara de naranja: Procesos de separación y purificación. *Tecnol. Ciencia Ed. (IMIQ)* 23 (2): 79-90.

Guevara, M.; Urcia, F. & Casquero, J. (2010). Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Ministerio de Salud del Perú, Instituto Nacional de Salud. *Medicina & Laboratorio* 2(16): 9-10.

Guevara, M.; Urcia, F.; & Casquero, J. (2010). Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Instituto Nacional de Salud. *Medicina & Laboratorio.* 2(16): 9-10. Lima. Perú.

- Hofvendahl, K. & Hägerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb Technol* 26 (2-4): 87-107.
- IBAW (2005). Highlights in Bioplastics. International Biodegradable Polymers Association & Working Groups. Berlin.
- Jiménez, P.; Sibaja, M. & Vega-Baudrit, J. (2012). Síntesis y caracterización de poli(ácido L-láctico) por policondensación directa, obtenido del fermento de desechos agroindustriales de banano (musa acuminata aaa variedad cavendish cultivar gran naine) en Costa Rica. *Rev. Iberoam. Polim* 13(2): 52-59.
- Khunnonkwaoa, P.; Boontawanb, P.; Haltrichc, D.; Maischbergerd, T. & Boontawana, A. (2012). Purification of L-(+)-lactic acid from pre-treated fermentation broth using vapor permeation-assisted esterification. *Process Biochemistry* 47(12): 1948-1956.
- Márquez Araque, A. T. (2020). Algunas aplicaciones de la biotecnología en nutrición de rumiantes. *Agroindustria, Sociedad Y Ambiente*, 1(14), 125-157. Recuperado a partir de <https://revistas.uclave.org/index.php/asa/article/view/2836>
- Meneses J.; Corrales C.; Valencia, M. (2007). Síntesis y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de yuca. *EIA*, ISSN 1794-1237; (8): 57-67.
- Nuffield Foundation. (1984). Química avanzada Nuffield: Ciencia de la alimentación. Primera edición. Barcelona: Editorial Reverté. (1992). ISBN 8429175415, 9788429175417.
- Núñez, A.; Michelena, G.; Carrera, E. & Álvarez, X. (2009). Estudios sobre la recuperación y purificación de ácido láctico para la producción de plásticos biodegradables. *Revista ICIDCA Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar* 2(43): 20-29.
- Nurbalqis, S.; Hazimah, H., & Azimah, M. (2015). Determination of lactic acid production by *Rhizopus oryzae* in solid state fermentation of pineapple waste. *Jurnal Teknologi* 77(31): 95-102.
- Orozco, M. & Solarte, J. (2003). Búsqueda del mejor medio de cultivo y modelamiento cinético para la obtención del ácido láctico a partir de glucosa por vía fermentativa. Tesis de grado. Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia.
- Pan, S.C; Peterson, W.H. & Johnson, M.J. (1940). Acceleration of lactic acid fermentation by heat - labile substances. *Ind. Eng. Chem* 32 (5): 709-714.
- Pavia, D.; Lampman, G.; Kriz, G.; Vyvyan, J. (2020). Organic Structures from Spectra. 6th edition. Wiley. ISBN: 978-1-119-52480-9
- Pinzón, J.; Martínez, J.; Espinosa, A.; Pérez, A. & Narváez, P. (2006). Polimerización de ácido (D, L) láctico mediante policondensación por fusión directa. Estudio cinético de la etapa de oligomerización. Universidad Nacional de Colombia. *Rev. Colomb. Quim.* 2(35):125-134.
- Rehm, B. (2009) Fermentative Production of Organic Acids for Polymer Synthesis. Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors. Caister Academic Press. ISBN 9781904455363.
- Sánchez-Rosario, Y. & Sánchez J. (2011). Producción y caracterización de la fenol oxidasa de *Scytalidium thermophilum*. *Rev. Mex. Mic.* 34: 31-42.
- Schaad, J. B. & Jones, W. (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Third Edition. APS Press. The American Psychopathological Society. St. Paul, Minnesota. ISBN 9780890542637.

Serna C. L. & Rodríguez de S. (2005). Producción biotecnológica de ácido láctico: Estado del arte. *Ciencia Tecnol. Aliment.* 5(1):54-65.

Skoog D.A.; Holler, F.J. & Nieman, T.A. (2001). Principios de Análisis Instrumental, 5ta edición, McGraw Hill, España. ISBN 0030020786, 8448127757.

Swapnil, K.; Amit, D.; Mahendra, D. & Vikram, P. (2015). Microbial degradation of plastic: a review. *J Biochem Tech* 6(1): 952-961.

Tatum, E. L. & Peterson, W.H. (1935). Fermentation method for production of dextrolactic acid. *Ind. Eng. Chem* 27 (12):1493-1494.

Usha, R.; Sangeetha, T. & Palaniswamy, M. (2011). Screening of Polyethylene

Degrading Microorganisms from Garbage Soil. *Libyan Agriculture Research Center*

Journal International (LARCJI) 2 (4): 200-204.

Welty, J.; Wicks, C.; Rorrer, G. & Wilson, R. (2007). Fundamentals of Momentum, Heat and Mass Transfer. John Wiley & Sons Ltd. ISBN: 9780470475164.

Xuefeng, W.; Shaotong, J.; Mo, L.; Lijun, P.; Zhi, Z. & Shuizhong, L. (2011). Production of L-lactic acid by *Rhizopus oryzae* using semicontinuous fermentation in bioreactor. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38 (X): 565-571.

Zuluaga, F. (2013). Algunas aplicaciones del ácido poli-L-láctico. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 37 (142): 125-142.

Alternativa de valorización de residuos agroindustriales y agroforestales de *Hylocereus undatus* y *Vitex gaumeri* para la obtención de pectinasas utilizando fermentación en estado sólido. Revisión.

^{1,3} Silvia De Jesús Chalé Quintal, ¹ Isabel Mendoza Saldívar, ² Juan Carlos Cuevas, ³ Luis Ignacio Hernández Chávez, ¹ María Isabel Reyes Arreozola*

¹ Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico Superior del Oriente del Estado de Hidalgo. Carretera Apan-Tepeapulco, Las Peñitas, 43900 Apan, Hgo.

² Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Subsede Sureste. Tablaje Catastral 31264 Km 5.5 Carretera Sierra Papacal-Chuburna Puerto Parque Científico Tecnológico de Yucatán CP: 97302 Mérida, Yucatán, México.

³ Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico Superior de Felipe Carrillo Puerto. Carretera a Vigía Chico Kilómetro 1.5, Centro, 77200 Felipe Carrillo Puerto, Q.R.
Correspondencia

*María Isabel Reyes Arreozola
mireyes@itesa.edu.mx

Resumen

Los residuos sólidos que se generan en el mundo se pueden contar en miles de millones de toneladas al año. Muchos de estos residuos se pueden clasificar de acuerdo a su origen, donde pueden ser empleados como materia prima para la generación de productos biotecnológicos con alto valor. En el presente documento se describen las características de los residuos agroindustriales, componentes, las alternativas de aplicación y valorización de residuos orgánicos como son *Hylocereus undatus* y *Vitex gaumeri* por sus características proponiendo emplearlos en sistemas de fermentación en estado sólido para la obtención de enzimas con miras a ser utilizadas en la industria alimentaria.

Palabras Claves: Residuos agroindustriales, pectinasas, fermentación

Abstract

The solid waste generated in the world can be counted in billions of tons per year. Many of these wastes can be classified according to their origin, where they can be used as raw materials for the generation of high-value biotechnological products. This document describes the characteristics of agroindustrial waste, components, alternatives for application and valorization of organic waste such as *Hylocereus undatus* and *Vitex gaumeri* due to their characteristics, proposing to use them in solid state fermentation systems to obtain enzymes with a view to be used in the food industry.

Key Words: Agroindustrial waste, pectinases, fermentation

Introducción

La generación de residuos agroindustriales ha incrementado debido que son pocas las propuestas para su uso alternativo, así como la viabilidad económica de algunas de estas. En determinadas zonas del país, como la zona maya del estado de Quintana Roo, en donde se mantienen prácticas tradicionales, las cuales no contemplan el aprovechamiento de residuos vegetales, al considerarlos que no son fuente de nutrientes, lo que ha ocasionado la acumulación de residuos orgánicos en tiraderos clandestinos sin tratamiento para su debida incorporación en el suelo en forma de sustrato.

Algunas causas de importancia que impactan en la generación de residuos orgánicos sin un segundo uso han sido la mala calidad postcosecha de diferentes frutas de la región maya, lo que se refleja en su baja comercialización. Así mismo, su comercialización y consumo casi exclusivos como fruta fresca de *Hylocereus undatus* (pitahaya), del cual no existen procesos semiindustriales que cuenten con la estandarización de sus parámetros de calidad, únicamente se han reportado procesamiento artesanales que permiten la elaboración de muy pocos productos de consumo local, mientras que para *Vitex gaumeri* (yax-nik) no existe una explotación y por ende un aprovechamiento, al ser considerado un residuo agroforestal. De acuerdo con la bibliografía existente se ha reportado parte del aporte nutrimental por lo que es necesario realizar más estudios para la definición de aplicaciones.

Por lo tanto, las consecuencias de que la problemática de residuos orgánicos incrementa, representan un riesgo ambiental de consideración por la posible contaminación de suelos, focos de infección, propagación de plagas, además de, impactar económicamente el poder adquisitivo de la región, debido a la pérdida de variedades o especies autóctonas y, a su vez inciden en la desaparición de platillos tradicionales. Siendo importante el establecimiento de estrategias de reducción de los residuos agroindustriales que actualmente forman parte de los contaminantes medio ambientales.

Marco teórico

Residuos

Se estima que a nivel mundial las actividades humanas generan 12 000 millones de toneladas de residuos sólidos, estos provienen de la producción de alimentos, agricultura, industria, plásticos, hogar, entre otros (ONU, 2023).

Según la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (Última Reforma DOF 08-05-2023), en su artículo 5 fracción XXIX indica como "Residuo: Material o producto cuyo propietario o poseedor desecha y que se encuentra en estado sólido o semisólido, o es un líquido o gas contenido en recipientes o depósitos, y que puede ser susceptible de ser valorizado o requiere sujetarse a tratamiento o disposición final conforme a lo dispuesto en esta Ley y demás ordenamientos que de ella deriven."

Dentro de esta ley se puede encontrar la clasificación especial de los residuos, destacando los residuos generados por las actividades pesqueras, agrícolas, silvícolas, forestales, avícolas, ganaderas, incluyendo los residuos de los insumos utilizados en esas actividades. Según Kumla et al (2020) define como residuos agroindustriales a aquellos que son generados por los sectores agrícolas, ganadero, y de los alimentos.

Clasificación de los residuos agroindustriales

Los residuos agroindustriales son generados de la producción de alimentos, de los cultivos agrícolas y el sector ganadero; en particular de los alimentos, se generan más residuos a partir de tubérculos, frutas, hortalizas, semillas oleaginosas, pescado, cereales, carnes y productos lácteos.

Estudios han demostrado que la producción de alimentos representa la mayor producción de residuos con respecto a otras industrias, se estima que, hasta un tercio de los alimentos producidos en el mundo, terminan como residuos (Díaz, 2022).

Artículos

De acuerdo con Díaz (2022) los residuos agroindustriales se pueden clasificar en agrícolas e industriales.

Los residuos agrícolas provienen del proceso del campo como hojas, tallos, vainas, y aquellos que se generan después del proceso como cáscaras y pulpas. Los residuos industriales son aquellos generados durante el procesamiento de los alimentos como frutas y verduras, generando bagazos, cáscaras y pulpas.

Los residuos agroindustriales normalmente son depositados en vertederos o se queman generando daños ambientales y de salud a los seres humanos y la vida silvestre. Por su composición pueden ser usados para la obtención de productos de interés, como biocombustibles, metabolitos secundarios, enzimas, productos de fermentación, entre otros productos. En la figura 1 podemos ver una clasificación general de los residuos agroindustriales.

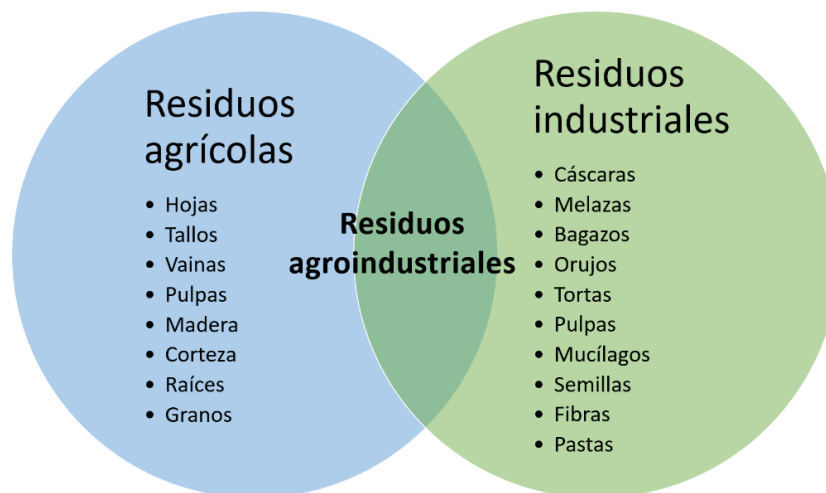


Figura 1. Clasificación de los tipos de residuos agroindustriales en residuos agrícolas y residuos industriales (Díaz, 2022).

Composición de los residuos agroindustriales

La composición de los residuos agroindustriales, como cáscaras de cítricos, pulpa de manzana, salvado de trigo, salvado de arroz, restos del prensado de aceites, etc.

La cáscara de manzana contiene un 43% de celulosa mientras que la cáscara de piña un 75% de hemicelulosa y el salvado de maíz hasta un 49% de lignina (ver tabla 1) (Kumla et al. 2020).

Tabla 1. Composición química y relación C/N de residuos agroindustriales empleados en fermentaciones en estado sólido (Kumala et al, 2020).

Residuos agroindustriales	Composición (% peso base seca)			Relación C/N
	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	
Pulpa de manzana	43	24	20	48/1
Paja de cebada	23-33	21-22	14-19	82-120/1
Cáscara de café	43	7	9	49/1
Salvado de maíz	34	39	49	ND
Tallos de maíz	34-61	19-24	7-9	57-80/1
Salvado de arroz	35	25	17	12-48/1
Cáscara de piña	22	75	3	77/1
Cáscara de papa	35	5	4	25/1
Cáscara de naranja	9-14	6-11	1-2	102/1
Cáscara de limón	12	5	2	ND
Cáscara de naranja	12	10	3	18-29/1

Por la composición que estos residuos presentan se han estudiado para extraer componentes bioactivos como polisacáridos, proteínas, enzimas, fibras, aceites esenciales, antioxidantes, vitaminas, minerales y aromas (Díaz, 2022).

Pitahaya (Hylocereus undatus)

La pitahaya (*no pitaya*) cuyo nombre científico más ampliamente usado para esta especie es *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose, sin embargo, fue recientemente reclasificada como *Selenicereus undatus* (Haw.) D.R. Hunt (Korotkova et al., 2017), sin embargo, esta última reclasificación es poco usada. Se considera originaria del Sureste de México o del norte de Centroamérica (Carnevali et al., 2023) (ver figura 2).



Figura 2. Imagen a) planta de pitahaya y b) fruto (Acosta, 2021) que son producidos en Quintana Roo, México.

Descripción botánica

La pitahaya es uno de los frutos tropicales más conocidos y ampliamente cultivado por su delicado sabor y exótica apariencia, con su superficie externa de color rosado intenso o rojo brillante y la pulpa del interior blanco salpicado de una miríada de semillas negras (Carnevali et al., 2023).

Hylocereus undatus es una cactácea perenne, epífita, trepadora con forma triangular, carnosa y de tallos verdes articulados, normalmente crece en árboles o piedras, debido a que puede sostenerse de sus raíces. Produce un fruto de forma esférica o de forma ovoide de 10 a 12 cm de diámetro (ver figura 2), con pulpa blanca y semillas negras dispersas en la pulpa, la cáscara tiene colores que va del rojo al púrpura y está cubierta por brácteas, salientes con forma triangular (Centurión et al. 2008).

Composición

El fruto de la pitahaya se compone por su pulpa, semillas y cáscara, la pulpa y semillas comprenden aproximadamente del 60-80 % del peso total del fruto. El fruto tiene un peso de 200-570 g. Esta fruta tiene un colorante natural debido a su contenido de betacianinas que brindan un color rojo a la cáscara de la fruta. En su

composición destaca su alto contenido de agua entre el 82.3-89%, carbohidratos de 11.6-13.55%, proteína de 0.5-1.4%, fibra dietética del 0.3 %, así como diversos compuestos como vitaminas, minerales (hierro, calcio, fósforo) y aminoácidos, de igual manera contiene ácidos orgánicos, fibras solubles, fitoalbúminas y betalainas (Mercoado Silva 2018, ICBF 2018, Morales de León et al., 2015).

Producción

En el estado de Quintana Roo según SADER en 2022 se reportó que existían 1,813 hectáreas de cultivo de las cuales se cosecharon 1535 hectáreas. También se ha registrado que en promedio se generan 4.5 toneladas del fruto por cada hectárea sembrada. Por lo tanto, con respecto a la generación del desecho de la cáscara de pitahaya se puede estimar que se producen entre 1631-3263 toneladas de cáscaras al año.

YA'AXNIK (*Vitex gaumeri*)

La especie *Vitex gaumeri* pertenece a uno de los 16 géneros taxonómicos que pertenecen a la familia Lamiaceae, es conocida en lengua maya como Ya'axnik, es un árbol que se distribuye en México en los estados de Yucatán,

Artículos

Quintana Roo, Campeche, Chiapas, Guerrero, Michoacán, Morelos y Tabasco, así como en toda Centroamérica hasta Nicaragua (ver figura 3).

Es un árbol que llega a medir hasta 30 metros de altura, con un diámetro de hasta 80 cm, posee un tronco recto con ramas ascendentes y copa irregular. Su corteza se encuentra fisurada con irregularidades, es

escamosa, de color crema amarillenta a rojizo a verdoso que cambia a pardo

oscuro, fibrosa y amarga. El grosor de la corteza es de entre 6 a 9 cm. Sus hojas están divididas como una mano abierta, sus flores son de color violeta morado en racimos (ver figura 3). Los frutos son de color verde oscuro, globosos y de sabor dulce.



Figura 3. a) Imagen de árbol adulto de *Vitex gaumeri*. b) fruto, c) flores cultivado en Quintana Roo, México (Rivera, 2016).

Los frutos maduros tienden a caer del árbol y después de varios días se secan por el efecto del sol. En la figura 4 se observan frutos secos que presentan colores café

intensos con cortezas duras, pero a su vez esponjosas, de igual forma, se pueden observar las semillas secas de *Vitex gaumeri*.



Figura 4. Residuos agroforestales de *Vitex gaumeri* a) fruto seco b) semilla que fueron secados al sol de manera natural después de caer por madurez de los árboles.

Usos

El estado de Quintana Roo cuenta con una gran diversidad de flora, por lo cual la madera es un elemento importante en la industria forestal local. *Vitex gaumeri* es una especie con buen aprovechamiento de maderables (Hernández, 2020). Este árbol se usa como combustible, leña y carbón y, de acuerdo a sus usos tradicionales se emplea de manera medicinal para tratar el asma y los resfriados.

Fermentación

Varios autores sugieren que la palabra fermentación viene del latín “*fermentare*” que significa “al cielo”, otros dicen que viene del verbo latín *fervere* lo cual significa hervir (Martínez, 2020). La fermentación es un proceso bioquímico metabólico, en el cual los sustratos generan energía produciendo sustancias orgánicas.

En un proceso de fermentación se pueden generar de productos como bebidas (cerveza, sidras, tequilas, whiskis, vinos), cereales (panes, pasteles), vegetales (semillas de cacao, frutos de cacao, aceitunas), carnes o embutidos (jamones curados) y lácteos (yogurt, quesos); al igual que otros productos como enzimas, metabolitos secundarios, aditivos, colorantes, entre otros.

Los procesos de fermentación han ayudado a la transformación de gran variedad de productos alimenticios mejorando propiedades organolépticas o enriquecimiento las propiedades a estos alimentos.

Clasificación

Las fermentaciones según Puerta (2010) se pueden clasificar de acuerdo al producto final de la siguiente manera:

- a. Fermentación acética, es una fermentación producida por *Acetobacter*, bacterias aerobias que transforman el alcohol en ácido acético como resultado de la oxidación.
- b. Fermentación alcohólica, en este proceso los azúcares se transforman a etanol y CO₂, es producida normalmente por levaduras, siendo *Saccharomyces cereviceae* la más utilizada.
- c. Fermentación láctica, este proceso se usa la lactosa como fuente de carbono para producir ácido láctico, por lo general, los microorganismos más empleados para este tipo de fermentación pertenecen a las familias Lactobacilacea y Enterobacteriaceae.
- d. Fermentación butírica, es la transformación de azúcares en ácido butírico, por medio de la bacteria *Clostridium butirycus*.

De igual manera, el proceso de fermentación se puede dividir según las condiciones que está presente, como la fermentación sumergida, en la cual se necesita mayor cantidad de agua con respecto a una fermentación en estado sólido, esta última se desarrolla en condiciones más similares a las que los microorganismos crecen en la naturaleza.

Fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido (FES) es uno de los procesos biotecnológicos más antiguos conocidos por la humanidad.

Muchas culturas tienen como tradición preparar alimentos fermentados. Alimentos como el tofu, yogurt, kéfir, quesos, cervezas, vinos, sidras, pan, chocolate, café, kombucha, encurtidos, etc. Los cuales son fermentados de manera tradicional empleando microorganismos como hongos y bacterias durante el proceso de fermentación.

En este tipo de fermentación se deben considerar aspectos como las condiciones del medio, pH, temperatura, microorganismo, sustratos, tamaño de partícula y capacidad de absorción de agua; mediante las cuales se busca imitar a las condiciones reales de crecimiento de los microorganismos.

En la actualidad la FES puede ser usada para la obtención de diversos productos de alto valor, dentro estos productos de alto valor podemos tener la obtención de antibióticos, enzimas, hongos, biosurfactantes, gomas, alimentos para animales, azúcares fermentables, colorantes, bioetanol y biodiesel (Pastrana, 2009).

Soportes de fermentación en estado sólido

En los sistemas de fermentación en estado sólido se debe considerar el tipo de sustrato o soporte a usarse. Es decir, el sustrato se refiere a aquello que proporcione los nutrientes necesarios para el crecimiento del microorganismo, así como su posterior generación del producto de interés.

Dentro de las características a considerar para un soporte se encuentran las siguientes: deben ser insolubles en agua y a los buffers que se adicionan, contener la cantidad necesario de carbono y nitrógeno, poseer una estructura granulométrica que permita la adherencia y penetración del microorganismo, que solo sea fermentable por un tipo de microorganismo y poca capacidad de aglomeración o apelmazamiento.

En otro punto tenemos aquellos que solo funcionan como soporte donde no proporcionan nutrientes a los microorganismos, pero se les puede adicionar soluciones con sustrato y a su vez proporcionando la humedad necesaria. Kumar (2018) menciona que los residuos agroindustriales como:

pulpas de frutas, bagazos, cáscaras de frutas, tallos, hojas y salvados de cereales pueden ser empleados como sustratos y soportes para procesos de fermentación estado sólido. Por su parte, Callejas (2015) describe que soportes inertes como: espuma de poliuretano, amberita, zeolita, vermiculita, pozolano, perlita y tezontle no aportan nutrientes para que los microorganismos puedan crecer en procesos de fermentación sólida generando una desventaja contra los residuos agroindustriales.

Microorganismos usados en fermentación en estado sólido

Los microorganismos usados en la fermentación en estado sólido, son importantes, ya que son los responsables de producir los metabolitos de interés. Para su selección se deben considerar aspectos como capacidad de aprovechamiento de polisacáridos, capacidad de adherencia y penetración en la partícula usada como soporte o sustrato y, uso de agua necesaria para su desarrollo.

Dentro de los microorganismos más usados para procesos biotecnológicos de fermentación sólida se encuentran las bacterias, las levaduras de los géneros *Brettanomyces*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* y hongos destacando *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma* y gran número de bacterias como *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Acinetobacter* entre otras.

Enzimas

Las enzimas se pueden definir como catalizadores biológicos, que permiten llevar a cabo reacciones bioquímicas a altas velocidades, no se consumen durante la reacción y, en general, presentan un elevado grado de especificidad.

En el área de los alimentos las enzimas son de suma importancia debido a los cambios que experimentan los alimentos, pudiendo ser beneficiosos o perjudiciales. Muchos productos alimenticios se obtienen a partir de las enzimas propias de los alimentos y, en algunos casos es necesario añadirlas para la elaboración de alimentos fermentados.

En uso de enzimas se remonta tiempo antiguos, donde se usaban ciertas hojas para envolver la carne provocando el ablandamiento, y el uso de estómagos de

animales causando la coagulación de lácteos.

Actualmente el uso de estas enzimas se enfoca en la conservación de alimentos, el uso de materias primas de manera más eficiente y mejora de la calidad sensorial de los alimentos.

Las enzimas se pueden clasificar de manera general en oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas.

Pectinasas

Las pectinas forman parte de la estructura en las células vegetales, generan cadenas ramificadas de compuestos metílicos, ésteres y ácidos galacturónicos, por lo tanto, las pectinasas son enzimas que hidrolizan la pectina hasta ácido galacturónico.

Las pectinasas se pueden clasificar en poli-galacturonasas, pectina liasas y metil-esterasa, según el modo de acción y el sustrato.

Clasificación

Kumar et al. (2018), clasifica las pectinasas de interés industrial de la siguiente manera:

Protopectinasas.- También llamadas pectinosinasas, las cuales degradan la protopectina insoluble que está presente en frutos inmaduros y da lugar a pectina soluble altamente polimerizada.

Pectina metilesterasas.- A menudo denominada pectina pectilhidrolasa, pectinesterasa, pectasa, pectina demetoxilasa y pectolipasa, es una esterasa de ácido carboxílico y pertenece al grupo de enzimas hidrolasas, son responsables de la eliminación de ésteres metoxilo, lo que resulta en pectinas ácidas y metanol.

Poligalacturonasas.- Son las enzimas pectinolíticas que catalizan la escisión hidrolítica del poligalacturónico en presencia de agua. Las poligalacturonasas son clasificadas en dos clases; endopoligalacturonasas y exopoligalacturonasas. Las enzimas endopoligalacturonasas hidrolizan los ácidos poligalacturónicos y liberan ácidos oligogalacturónicos; mientras que, las enzimas exopoligalacturonasas hidrolizan los ácidos pécticos y liberan monogalacturonato.

Pectina liasas.- Las liasas (o transelimininas) realizan una degradación no hidrolítica de pectatos o pectinatos, caracterizados por un efecto transeliminativo, división del polímero péctico. Las liasas rompen los enlaces glicosídicos en el cuarto carbono y simultáneamente elimina el hidrógeno del quinto carbono, produciendo un producto insaturado.

Aplicaciones generales

Las pectinasas se pueden usar en el procesamiento de vegetales, vinos, jugos, textiles, extracción de aceites, tratamiento de aguas, aditivos, geles, papel e industria farmacéutica. (Chilakamarry et al., 2020).

Diversos residuos agroindustriales mayormente empleados para la producción de pectinasas son: bagazo de manzana (Ibarra-Cantún et al. 2020), bagazo de azúcar de caña (Alzahrani et al. 2023; Aita et al. 2019), salvado de arroz (Abdullah et al. 2018; Janarny & Gunathilake 2020), cáscara de piña (Aruna 2019), residuos de aceite (Balakrishnan, 2021), biomasa vegetal y frutal (Chetana et al. 2021) cáscara de limón (Dange, V. U., Harke S.; 2018) , pulpa de café (Gasani et al. 2021; Hidayah et al. 2020), salvado de trigo (Kaur, Varghese. & Mahajan 2019), residuos de harinas (Melnikuch et al. 2020)

y cáscaras de platano y granada (Rasit et al. 2021; Roukas et al. 2020).

Estudios de Dange et al. (2018) describen que el salvado de trigo promueve un mejor crecimiento de hongos en sistemas de fermentación sólida debido al contenido de nitrógeno (6.5%) y aumenta el contenido de pectinasas alcalinas (Kaur Varghese & Mahajan 2019). La pulpa de café empleada como soporte presenta cerca del 50% de capacidad de retención de agua lo que promueve que la matriz del residuo retenga la humedad (Gasani et al. 2021). Es importante destacar que el tamaño de partícula es un factor clave para el soporte a utilizar para lo cual es indispensable realizar un tamizado en mallas de 0.85–2.0 mm y <0.85 mm (Melnikuch et al. 2020) en residuos de soya y cáscaras de plátano de 75 µm (Rasit et al. 2021).

En la tabla 2 se presenta las condiciones de temperatura, pH y oxígeno que se deben considerar para un óptimo crecimiento de microorganismos en sistemas de fermentación sólida con la finalidad de incrementar la producción de pectinasas. La humedad entre el 60 al 70 % es la más recomendada de acuerdo a estudios para el crecimiento de *Aspergillus* mostrando actividades de hasta 47,000 U/g sustrato seco.

Tabla 2. Condiciones de fermentación para la producción de pectinasas empleando residuos agroindustriales y agroforestales.

Microorganismo	Condiciones de fermentación	Actividad enzimática	Referencia
<i>Aspergillus niger</i>	0.1M NaCl 30°C por 3 días 2 ml; pH 4.0	4 U/mL	Ametefe et al. 2022.
<i>Bacillus thuringiensis</i> B45, <i>Bacillus velezensis</i> BF3 and <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B987	45 °C por 48 h	35.82 109.69 202.68 (IU mg ⁻¹ de proteína)	Alzahrani 2023
<i>Aspergillus niger</i> IBT-7	30 °C por 72 h pH 5.0 Medio Czapek	39.1 U/ml/min	Abdullah et al. 2018.
<i>Aspergillus niger</i>	32 °C 62 h	83 U/ml	Chetana et al. 2021.
<i>Aspergillus oryzae</i>	30°C por 15 días	1.12 U/ml	Dange, V. U., Harke S 2018.
Hongo aislado VTM4	Buffer de acetato de 20 mM a pH 5 72 h	0.747 U/ml	Gasani et al. 2021.
<i>Aspergillus</i> sp. VTM5	30 °C por 72 h pH 4.5	85.85 µg/ml	Hidayah et al. 2020.
<i>Bacillus pumilus</i> AJK	5 g 37°C por 9 días	Alcalin pectinasas 938 IU/g	Kaur, A., Varghese, L. M. & Mahajan, R., 2019.
<i>Aspergillus oryzae</i>	30 °C por 6 días	47,000 U/g sustrato seco	Melnikuch et al. 2020.
<i>Aspergillus niger</i>	35 °C por 120 horas 60% de humedad	27 U/ml	Rasit et al. 2021.

La generación de residuos agroindustriales ha incrementado debido principalmente a la baja tasa de empleo de dichos residuos para la generación de valor agregado, así como la viabilidad económica de alguna de estas. En determinadas zonas del país, como la zona maya del estado de Quintana Roo, se continúa con el desperdicio de fuentes vegetales, al no ser consideradas una alternativa para la obtención de nutrientes o productos de valor agregado, lo que ha ocasionado la acumulación de residuos orgánicos sin tratamiento para su debida incorporación en el suelo en forma de sustrato.

Algunas causas de importancia que impactan en la generación de residuos orgánicos sin un segundo uso han sido la mala calidad postcosecha de diferentes frutas de la región maya, lo que se refleja en su baja comercialización. Así mismo, su comercialización y consumo casi exclusivos como fruta fresca de *Hylocereus undatus* (pitahaya), del cual no existen procesos semiindustriales que cuenten con la estandarización de sus parámetros de calidad, únicamente se han reportado procesamiento artesanales que permiten la elaboración de muy pocos productos de consumo local, mientras que para *Vitex gaumeri* (yax-nik) no existe una explotación y por ende un aprovechamiento, al ser considerado un residuo agroforestal. De acuerdo con la bibliografía existente se ha reportado parte del aporte nutrimental por lo que es necesario realizar más estudios para la definición de aplicaciones.

Por lo tanto, las consecuencias de que la problemática de residuos orgánicos incrementa, representan un riesgo ambiental de consideración por la posible contaminación de suelos, focos de infección, propagación de plagas, además de, impactar económicamente el poder adquisitivo de la región, debido a la pérdida de variedades o especies autóctonas y, a su vez inciden en la desaparición de platillos tradicionales. Siendo importante el establecimiento de estrategias de reducción de los residuos agroindustriales que actualmente forman parte de los contaminantes medio ambientales.

Los residuos agroindustriales son generados por las industrias del manejo de animales, procesamiento de frutas y vegetales y cultivos de granos y semillas. Solo en

México, la industria de las frutas y vegetales produce 76 millones de toneladas de residuos, los cuales repercuten en la proliferación de plagas, contaminación de suelos y mantos acuíferos.

Los cultivos de pitahaya (*Hylocereus undatus*) y Yaxnik (*Vitex gaumeri*) son cultivados en la zona maya de Quintana Roo, estos generan residuos agroindustriales debido a la poca tecnificación, la mala calidad postcosecha y la poca diversificación de productos a partir de ellos; sin embargo, debido a su contenido de nutrientes, ambos residuos pudieran ser usados como sustratos para la generación de productos de alto valor. El aprovechamiento de estos residuos disminuiría el impacto ambiental que generan, así como la incorporación de un residuo de fácil asimilación al medio ambiente.

De tal manera que, estos residuos pueden ser usados para la obtención de enzimas como las pectinasas mediante sistemas de fermentación en estado sólido, teniendo ventaja por sobre una fermentación una fermentación sumergida, ya que, la FES necesita requerimientos mínimos para su fermentación, así como ventajas al obtener productos más concentrados, debido a la baja cantidad de agua que requerida para su desarrollo.

Estas enzimas por su alto valor comercial, pueden ser usadas en industrias como la alimentaria, cosmética y farmacéutica. En particular, para el caso de los alimentos, estas enzimas pueden ser usadas en la clarificación de jugos, preparación de geles, manufactura de alimentos en general, retención de fibras, extracción de aceite, entre otras aplicaciones. Por tal motivo, resulta importante buscar alternativas de sustratos a bajo costo para producirlas, que sean de fácil acceso y más competitivas tecnológicamente con respecto a los soportes comerciales.

El presente trabajo busca ser una revisión bibliográfica de las ventajas de la fermentación en estado sólido, así como mostrar los posibles usos alternativos para los residuos agroindustriales de *Vitex gaumeri* y de *Hylocereus undatus*

para la obtención de pectinasas, mediante el empleo de sistemas de FES con el hongo *Aspegillus orysae*.

Referencias

- Abdullah R, Farooq I, Kaleem A, Iqteqar M, Iftikhar T (2018) Pectinase production from *Aspeggillus niger* IBT-7 using solid State fermentation. Bangladesh J. Bot. 47(3): 473-478.
<https://doi.org/10.3329/bjb.v47i3.38714>
- Alzahrani OM, Sohail M, Mahmoud SF, Alswat AS, El-Halmouch Y (2023) Preparation of a Pectinase-Enriched Multienzyme under Solid State Fermentation of Sugarcane Bagasse. Fermentation 9(141): 1-13.
<https://doi.org/10.3390/fermentation9020141>
- Ametefe GD, Lemo AO, Orji FA, Lawal AK, Iweala EE J, Chinedu SN (2022) Pectinase Activities of Selected Fungi Grown on Agrowastes via Solid-state Fermentation. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 1-9.
<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/1054/1/012003/pdf>
- Bryant CM, Hamaker BR (1997) Effect of lime on gelatinization of corn flour and starch. Cereal chemistry 74(2): 171-175.
<http://dx.doi.org/10.1094/CCHEM.1997.74.2.171>
- Carnevali, G., Duno, R., Tapia Muñoz, J. L., Ramírez-Morillo, I. M. (2023). Invisible a plena vista: una piyahaya (*Hylocereus*) desconocida. Desde el Herbario CICY, 15:112-117.
https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Desde_Herbario/2023/2023-06-08-GCarnevali-Invisible-a-plena-vista-una-pitahaya.pdf
- Chetana A, Kumar VV, Jyothi C, Kumar VA, Reddy DM (2021) Production of Pectinase from Fruit and Vegetable Waste by *Aspergillus niger*. Bulletin Monumental 8(22):8-12.
https://www.researchgate.net/publication/361926316_Production_of_Pectinase_from_Fruit_and_Vegetable_Waste_by_Asperegillus_niger
- Crosbie GB (1991) The Relationship between Swelling Properties, Paste Viscosity and Boiled Noodle Quality in Wheat

Flours. Journal of cereal science 13(2):145-150.
https://www.scirp.org/reference/reference_spa_pers?referenceid=421533

Dange VU, Harke S (2018) Production and purification of Pectinase by fungal strain in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. International Journal of Life Sciences Research 6(4): 85-93.
<https://www.researchpublish.com/papers/production-and-purification-of-pectinase-by-fungal-strain-in-solid-state-fermentation-using-agro-industrial-bioproduet>

Díaz ME (2022) Residuos agroalimentarios ¿qué son? ¿quién los genera? y ¿por qué son valiosos?. Frontera biotecnológica 9-16.
<https://www.revistafronterabiotecnologica.ciba.tlaxcala.ipn.mx/volumen/vol23/pdf/vol-23-2.pdf>

Gasani OK, Azizah A, Siswanto S, Winarsa R, Muzakhar K (2020) Pectinase Production by Using Coffee Pulp Substrate as Carbon and Nitrogen Source. Key Engineering Materials 884: 165-170.
<https://repository.unej.ac.id/handle/123456789/106319>

Hidayah AA, Azizah Winarsa R, Muzakhar K (2020) Utilization of coffee pulp as a substrate for pectinase production by *Aspergillus* sp. VTMS through solid state fermentation. AIP Conf. Proc. <https://doi.org/10.1063/5.0030474>

Holloway WD, Greig RI (1984) Water holding capacity of hemicelluloses from fruits, vegetables and wheat bran. Journal of Food Science 49(6):1632-1633.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb12867.x>

Kaur A, Varghese LM, Mahajan R (2019) Simultaneous production of industrially important alkaline xylanase-pectinase enzymes by a bacterium at low cost under solid-state fermentation conditions. Biotechnology and Applied Biochemistry 66(4):574-585.
<https://doi.org/10.1002/bab.1757>

- Korotkova N., Borsch T. & Arias Montes S. (2017) . A phylogenetic framework for the Hylocereeae (Cactaceae) and implications for the circumscription of the genera. *Phytotaxa* 327(1): 1–46. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.327.1.1>
- Kumla J, Suwannarach N, Sujarit N, Penkhrue W, Kakumyan P, Jatuwong K, Vadthanarat S, Lumyong S (2020) Cultivation of Mushrooms and Their Lignocellulolytic Enzyme Production Through the Utilization of Agro-Industrial Waste. *Molecules*, 25(12):1-41. <https://doi.org/10.3390/molecules25122811>
- Melnichuk N, Braia MJ, Anselmi PA, Meini MR, Romanini D (2020) Valorization of two agroindustrial wastes to produce alpha-amylase enzyme from *Aspergillus oryzae* by solid-state fermentation, *Waste Management* 106:155-161. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.03.025>
- Miranda AG, Soto JL M, Ruiz IG (2008) Parcial caracterización de nuevos almidones obtenidos del tubérculo de camote del cerro (*Dioscorea spp*). *Revista iberoamericana de tecnología postcosecha* 9(1): 81-88. <https://www.redalyc.org/pdf/813/81311226011>
- OMA (2023). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL 22th Ed. <https://www.aoac.org/official-methods-of-analysis/>
- ONU. Programa para el medio ambiente (2023, 30 de marzo) Día Internacional de Cero Desechos 2023. <https://www.unep.org/es/events/un-day/dia-internacional-de-cero-desechos-2023>
- Rasit N, Sze YS, Hassan MA, Kuan OC, Hamzah S, Rahman W, Siddique N (2021) Pectinase Production from Banana Peel Biomass via the Optimization of the Solid-state Fermentation Conditions of *Aspergillus niger* Strain. *Pertanika J. Sci. & Technol.* 30(1):257-275 <https://doi.org/10.47836/pjst.30.1.14>.
- Rodriguez GO, Serrat DM (2008) Poligalacturonasas de levaduras: un producto biotecnológico de grandes potencialidades. *Tecnología Química* 28(1):80-90. <https://www.redalyc.org/pdf/4455/445543755010>
- Sadh PK, Duhan S, Duhan JS (2018) Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing* 5(1):1-15. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z>
- Salazar I, Ramírez H, Yllanes M, Zúñiga A, Castellanos R, Naquiche A, Castillo D (2020) Selección e identificación de una nueva bacteria productora de pectinasa a partir de fuentes geotermales. *Ciencia & Desarrollo* 27:143-149. <https://doi.org/10.33326/26176033.2020.27.1004>
- Sengkhampan N, Chanshotikul N, Assawajitpukdee C, Khamjae T (2013) Effects of blanching and drying on fiber rich powder from pitaya (*Hylocereus undatus*) peel. *International Food Research Journal* 20(4):1595-1600. <http://www.ifrj.upm.edu.my/volume-20-2013.html>
- SIAP (2022) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Verona-Ruiz A, Urcia-Cerna J, Paucar-Menacho LM (2020) Pitahaya (*Hylocereus spp.*): Cultivo, características fisicoquímicas, composición nutricional y compuestos bioactivos. *Scientia Agropecuaria* 11(3):439-453. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.03.16>
- Yegres S, Sánchez J, Belmar M, Riveros W, Belmar D (2001) Producción de enzimas pécicas ensayos preliminares. *Saber* 13(1):55-59. <http://ri2.bib.udo.edu.ve:8080/jspui/handle/123456789/3761>

Desarrollo de un proceso biotecnológico para la producción de ácido S-láctico a partir de *Rhizopus oryzae* empleando estimulantes de biosíntesis mediante dos fuentes de carbono de origen vegetal a nivel de laboratorio

Blasco, Jervis; Silva, Roselin; Alvarado Almarza, Carlos ^{1*}

¹Center for Chemical Research (CIQ). Laboratory of Industrial Biotechnology (LABIOT).
Faculty of Engineering. University of Carabobo

(*) e-mail: claalmarza@gmail.com

Resumen

El ácido láctico es uno de los ácidos orgánicos de mayor aplicación en la industria cosmética, farmacéutica, alimenticia, entre otras. El objetivo de esta investigación fue evaluar la producción de ácido S-láctico empleando estimulantes de biosíntesis con dos fuentes de carbono de origen vegetal. Se realizaron los procesos unitarios y acondicionamiento de la materia prima; se identificó el microorganismo (*R. oryzae*) según sus características morfológicas a nivel microscópico y macroscópico. Se evaluó la producción de ácido láctico empleando medios de cultivo con diferentes concentraciones de harinas de yuca y batata de 2, 5 y 7%; a diferentes tiempos de fermentación; obteniéndose las mayores producciones de ácido láctico (27.60 y 26.70 g/L) a concentraciones de sustratos de (2% batata – 5% yuca) y 5% de harina de yuca a las 22 h, evidenciando la capacidad amilolítica del microorganismo. Se realizó la identificación del isómero L del ácido láctico a través de una prueba enzimática. De forma análoga empleando los estimulantes [deoxicolato de sodio (1 g/L), glicerol (0.05 g/L), manosa (0.5 g/L)], se obtuvo la mayor producción de ácido S-láctico (16.17 g/L) con el sustrato (2% batata – 5% yuca) y el estimulante (manosa 0.5 g/L) en 24 h.

Palabras Claves: ácido S-láctico, bioprocesos, estimulantes, fuentes de carbono, *Rhizopus oryzae*

Abstract

Lactic acid is one of the most widely used organic acids in the cosmetic, pharmaceutical, chemical and food industries, among others. The objective of this research was to evaluate the production of S-lactic acid using biosynthesis stimulants with two carbon sources of vegetable origin. The unitary processes and conditioning of the raw material were carried out, followed by the identification of the microorganism (*R. oryzae*) by microscopy and macroscopic characteristics. The production of lactic acid was evaluated using culture media with different concentrations of cassava and sweet potato flours of 2, 5 and 7%; at different fermentation times; obtaining the highest productions of lactic acid (27.60 and 26.70 g/L) at substrate concentrations of (2 % sweet potato - 5% cassava) and 5% cassava flour at 22 h, evidencing the amylolytic capacity of the microorganism. The identification of the S isomer of lactic acid was carried out through an enzymatic test. Similarly, using the stimulants [sodium deoxycholate (1 g/L), glycerol (0.05 g/L), mannose (0.5 g/L)], the highest production of S-lactic acid (16.17 g/L) was obtained with the substrate (2 % sweet potato – 5 % cassava) and the stimulant (mannose 0.5 g/L) in 24 h.

Key Words: S-lactic acid, bioprocess, stimulants, carbon sources, *Rhizopus oryzae*

Introducción

La química verde surge como una respuesta a la necesidad de minimizar la contaminación y los riesgos ambientales asociados con la producción industrial y el uso de productos químicos. Se basa en el principio de prevenir la contaminación desde el origen, buscando diseñar procesos químicos más eficientes y menos dañinos para el medio ambiente y la salud humana (Miranda et al., 2024). Es por ello, que esta investigación está dirigida en diseñar un proceso biotecnológico que sea beneficioso para el medio ambiente usando un microorganismo para generar producto de valor agregado, en este caso, ácido S-láctico partiendo de una fuente de carbono de origen vegetal.

El ácido láctico también conocido como ácido alfa-hidroxipropánico (ácido 2-hidroxipropánico), es un compuesto químico orgánico con la fórmula química ($C_3H_6O_3$) que existe en dos isómeros ópticos: S y R ácido láctico. Se forma de manera natural como subproducto de la fermentación bacteriana del azúcar, el almidón de maíz o el suero lácteo, así como en los músculos durante el ejercicio intenso. El isómero S es producido naturalmente en el cuerpo humano y es metabolizado por él, mientras que el isómero R es menos común y puede ser perjudicial (García et al. 2010).

El ácido láctico tiene muchas aplicaciones. En la industria alimentaria y farmacéutica, se utiliza en anticongelantes, biocidas y plastilina, y está presente en la leche, los encurtidos, la soja fermentada, la cerveza y la carne. En la industria cosmética es usado por sus propiedades hidratantes permiten emplearlo como ingrediente en cosméticos para conseguir una piel suave, uniforme y firme para prevenir las arrugas (Aladdim et al. 2015).

Se realizó una investigación experimental de nivel explicativo, donde se consideró: la evaluación de los sustratos seleccionados para la producción de ácido láctico, la caracterización de la materia prima, la obtención de las mejores condiciones experimentales de la fermentación para la producción de ácido láctico, la identificación del estereoisómero S del ácido láctico, la producción de ácido S-láctico usando estimulantes de biosíntesis con las mejores condiciones experimentales de fermentación, y la estimación de los costos de operación a nivel de laboratorio. Esto con el fin de poder

evaluar los rendimientos obtenidos en la producción de ácido S-láctico a partir del hongo *Rhizopus oryzae* empleando estimulantes de biosíntesis mediante dos fuentes de carbono de origen vegetal a nivel de laboratorio.

Materiales y métodos

Material biológico

La cepa del hongo *R. oryzae* se activó a partir de muestras congeladas. Para la activación se sembró asépticamente el hongo previamente hidratado en 6 fiolas individuales (Rivera & Wright, 2020); finalmente, se incubaron a temperatura ambiente hasta el completo desarrollo de las colonias a los 5 días, (Schaad et al., 2001).

Preparación del inoculo del hongo *R. oryzae*

A partir de la cepa reactivada de *R. oryzae* se tomaron colonias del hongo con una edad de crecimiento de 5 días, se realizó un raspado de superficie con la ayuda de un asa de platino, inoculando el hongo en una solución de Tween 80 al 0,1 % en agua desmineralizada estéril. Posteriormente se tomaron 3 muestras de una suspensión de esporas del hongo, y se determinó la concentración microbiana en cámara de Neubauer, y finalmente se ajustó a una concentración de 10^6 esporas/mL (Sánchez & Rosario 2011; Khunnonkwaoa et al., 2012; Gil-Horán et al., 2008; Guevara et al., 2010).

Proceso de fermentación

Se llevó a cabo una fermentación inicial con dos tipos de sustratos: harina de yuca y harina de batata. Esto con el fin de estudiar el comportamiento del hongo *R. oryzae* ante la presencia de la mezcla dos fuentes de carbono y frente a cada una individualmente. El caldo de cultivo estuvo constituido por sales minerales: sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$) 2.5 g/L, fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4) 0.3 g/L, sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.02 g/L, sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.15 g/L; y 500 mL de agua desmineralizada; las concentraciones de los sustratos fueron: 3, 5 y 7 % g/L harina de yuca; 3, 5 y 7 % g/L (Alvarado & Pavone, 2015). Se realizó una

segunda fermentación con el fin de escoger las mejores concentraciones para producir la mayor cantidad de ácido láctico, en este caso

se manejaron las mismas cantidades de las concentraciones de las sales, y modificando las concentraciones de los sustratos y las mezcla, que fueron ; 2 y 5 % g/L harina de yuca; 2 y 5 % g/L harina de batata; y la primera mezcla conformada por 2 % de harina de batata y 5% de harina de yuca; la segunda mezcla de 5% de harina de batata y 2 % de harina de yuca.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en biorreactores de 250 mL con 50 mL de caldo fermentativo por triplicado, más el inóculo de *R. oryzae*, con agitación orbital a 200 rpm y temperatura ambiente. Se tomaron muestras a las 18 y 36 h (Tabla 1). Culminado el tiempo total de fermentación, se procedió a acidificar con ácido clorhídrico (HCl) 4N y separar la

Seguidamente para detener la fermentación del caldo obtenido, éste se esterilizó en autoclave a 10 psi durante de 15 min (Blas & Dulce, 2024).

La concentración del ácido láctico presente en las muestras fue determinada a través del método colorimétrico del cloruro férrico, el cual consistió inicialmente en la preparación de una solución madre de cloruro férrico (FeCl_3) al 0.3 %, posteriormente se tomaron 0.05 mL de la muestra a analizar y se diluyeron en 2 mL de la solución de cloruro férrico y finalmente se midió su absorbancia a una longitud de onda a 390 nm. Las concentraciones de ácido láctico se determinaron mediante una curva patrón de ácido láctico a distintas concentraciones (Alvarado & Pavone, 2015).

biomasa producida por el microorganismo a través de una filtración por gravedad.

Tabla 1. Diseño experimental para la producción de ácido S-láctico.

Factores	Niveles	Variable de respuesta
Concentración (g/L)	3 (-1)	Producción de ácido S-láctico (g/L)
	5 (0)	
	7 (+1)	
Sustrato	Batata (-1)	
	Yuca (+1)	
Tiempo	18 h (-1)	
	36 h (+1)	

Identificación del isómero S del ácido láctico.

Se identificó el producto final de fermentación empleando el método enzimático QuantiQuik™ S-Lactic Acid, QQLAC10, Lot: BJ11B20 de BioAssay Systems, empleando una muestra de 0,05 mL. Se transfirió una alícuota de muestra a un tubo de reacción que contenía soluciones de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH), la cual reaccionó únicamente con el ácido S-láctico formando una coloración en la banda de identificación. Finalmente, se comparó el color de la banda con una tabla de referencia de ácido S-láctico proporcionada en el paquete, tal como indica Saha, et al. (2021), donde al someter una muestra a la mezcla de NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleótido) y LDH (lactato deshidrogenasa), ocurre una serie de reacciones enzimáticas entre el lactato (almohadilla de reacción de la tira) y el NAD^+ que cambian el color del agente cromogénico (formazán) de blanco a purpura en la almohadilla (Figura 1).

La interacción del MTT en presencia de LDH y NAD^+ conducen a la formación de un agente coloreado de tono purpura que varía en intensidad según la concentración de ácido S-láctico presente en la muestra (Figura 2).

Comparación del rendimiento del ácido láctico con los estimulantes

Después de aplicar el test enzimático, el cual detectó la presencia del ácido S-láctico, se seleccionaron las muestras con las mejores concentraciones, el cual fueron 5 % de harina de yuca y la mezcla compuesta de 5 % de harina de yuca y 2 % de harina de batata, para evaluar el efecto de los estimulantes de biosíntesis en el metabolismo del hongo para la producción de ácido S-láctico. En base de revisión de literaturas se seleccionaron deoxicolato de sodio 1 g/L, glicerol 0.05 g/L y manosa 0.5 g/L (García, et al. 2010), dado que presentaron un mejor efecto en la producción del ácido S. láctico con el *R. oryzae*. El caldo de cultivo estuvo constituido por sales minerales: sulfato de amonio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$

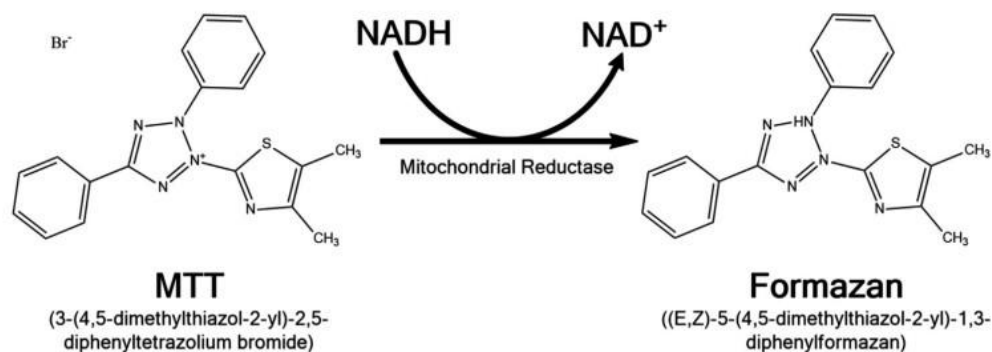


Figura 1. Reacción enzimática del agente cromogénico (MTT) en las tiras de detección QuantiQuick™ S-Lactic Acid

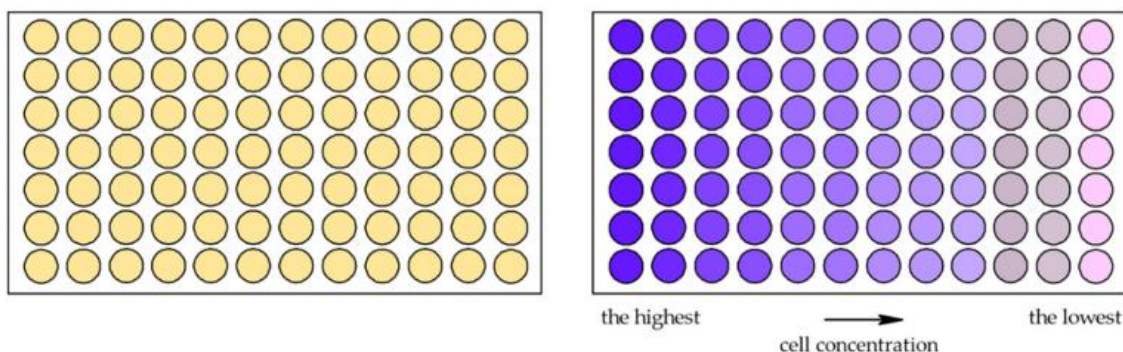


Figura 2. Coloración según la concentración del agente cromogénico en la muestra.

2.5 g/L, fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4) 0.3 g/L, sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.02 g/L, sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.15 g/L; y 500 mL de agua desmineralizada; las concentraciones de los sustratos fueron: mezcla (2 % p/v harina de batata y 5 % p/v harina de yuca), 5 % p/v harina de yuca; y las concentraciones de los estimulantes fueron: deoxicolato de sodio (SDC) 1 g/L, glicerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) 0.05 g/L y manosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) 0.5 g/L. Las fermentaciones se llevaron a cabo en biorreactores aireados de 250 mL con 50 mL de caldo fermentativo, más el inóculo de

R. oryzae con agitación orbital de 200 rpm a temperatura ambiente. Se tomaron muestras a las 20 y 24 h (Tabla 2). Culminado el tiempo total de fermentación se procedió a acidificar con ácido clorhídrico (HCL) 4N, y separar la biomasa producida por el microorganismo a través de una filtración por gravedad. Seguidamente para detener la fermentación del caldo obtenido, éste se esterilizó en autoclave a 10 psi durante de 15 min (Blas & Dulce, 2024).

Se utilizó el método colorimétrico anteriormente descrito para determinar la concentración de ácido S-láctico de las fermentaciones.

Tabla 2. Diseño experimental para la producción de ácido S-láctico con estimulantes.

Factores	Niveles	Variable de respuesta
Sustrato	Mezcla (-1)	Producción de ácido láctico (g/L)
	Yuca (+1)	
Estimulante	Deoxicolato (-1)	
	Glicerol (-0,33)	
	Manosa (0,33)	
	Sin estimulante (+1)	
Tiempo	20 h (-1)	
	24 h (+1)	

Resultados y Discusión

Determinación de ácido láctico

El objetivo de esta investigación fue encontrar las mejores condiciones de operación del proceso que produzca la mayor concentración de ácido S-láctico y evaluar su producción con estimulantes de biosíntesis. Para las fermentaciones realizadas con sustratos de harina de yuca y batata a concentraciones de 3, 5 y 7%, se obtuvieron dos rendimientos de 14.35 y 12.22 g/L con 5% de harina de yuca a las 36 y 18 h respectivamente. Con el resto de las concentraciones evaluadas de yuca (3 y 7 %) y batata (3, 5 y 7 %) no se reportaron concentraciones de ácido láctico.

Se puede observar un comportamiento similar a la investigación (Alvarado & Pavone, 2015) donde obtuvieron un máximo de concentración de ácido láctico (12.91 g/L) en un tiempo de 48 h, con la diferencia de que la presente investigación llegó a obtener una máxima concentración de ácido láctico (14.35 g/L) en un tiempo de 36 h, es decir, la cantidad de nutrientes que posee el sustrato harina de yuca son mayores que los que posee el yare,

lo que promueve una mejora en la producción de ácido láctico en menor tiempo.

En cambio, bajo las concentraciones estudiadas del sustrato harina de batata se observa que el hongo *R. oryzae* no parece producir ácido láctico a las condiciones estudiadas. En la investigación (Huang *et al.* 2005), encontraron que las condiciones óptimas para la sacarificación del almidón de batata y la posterior formación de ácido láctico mediante el hongo *R. oryzae* son una temperatura de 30 °C y un pH de 6.

Un análisis de tiempo realizado a las condiciones anteriormente descritas demostró que durante las primeras 7 h de fermentación, la actividad del hongo *R. oryzae* se encontraba en fase de adaptación, después de 22 h la producción de ácido láctico aumento hasta alcanzar una concentración máxima de 27.60 g/L con la mezcla 1 (2 % harina de batata - 5 % harina de yuca), hasta terminar la fermentación en 24 h (Figura 3). Cabe resaltar que esta concentración ha sido la más alta durante la investigación.

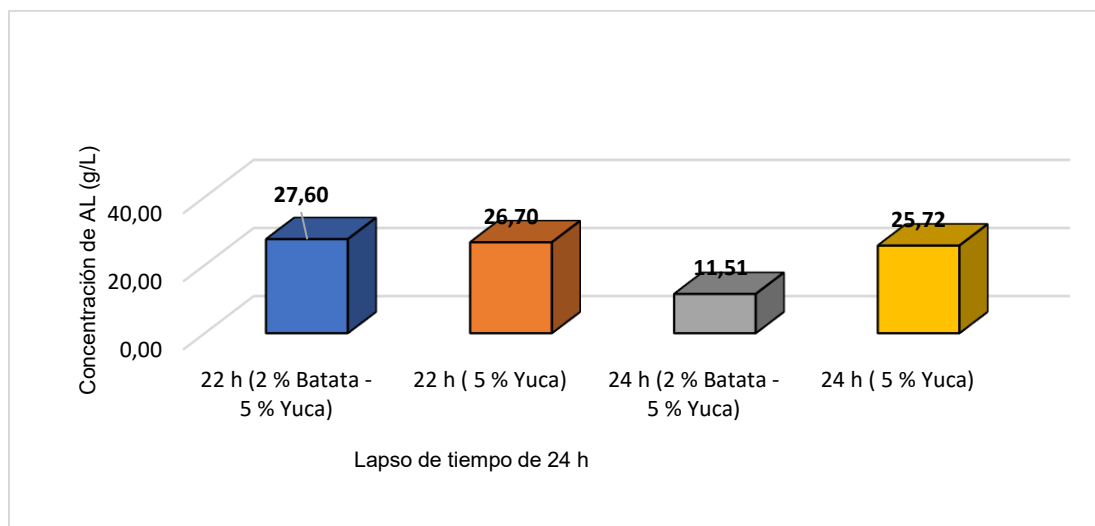


Figura 3. Producción de ácido láctico (AL) contra el tiempo con *R. oryzae* en un lapso de 24 h.

En el diagrama de Pareto (Figura 4) se observa que el efecto de sustrato y tiempo poseen efectos positivos a la variable de respuesta (producción de ácido láctico), es decir, que ambos contribuyen en el rendimiento de ácido láctico, cabe destacar que el tiempo es el que produce el mayor

efecto en el rendimiento de la variable de respuesta, esto quiere expresar, que excede el límite del estadístico F que es 3,80 aproximadamente, esto indica que la producción de ácido láctico se ve afectada de manera positiva (incrementa) con respecto al aumento del tiempo de fermentación hasta un

lapso de 24 h donde se evidencia un máximo. Para el sustrato evaluado el microorganismo alcanza su máxima producción a las 22 h, lo que es diferente a lo reportado en (Alvarado & Pavone, 2015) empleando yare como sustrato. Se podría explicar que la yuca contiene más almidones aprovechables por el

hongo y su capacidad amilolítica así lo demuestra en su crecimiento. Y con el yare hay otros componentes. Sin embargo, se requieren más estudios con diferentes concentraciones para evaluar mejor estos sustratos.

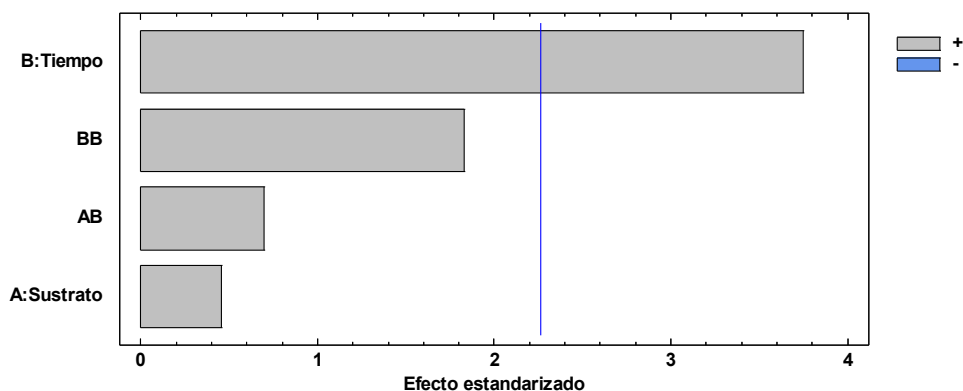


Figura 4. Efecto estandarizado del análisis de tiempo en la producción de ácido láctico durante 24 h.

Para seleccionar el estimulante apropiado, previamente se realizó una búsqueda bibliográfica de investigación acreditadas en las revistas científicas del área, donde se seleccionaron el glicerol y el deoxicolato de sodio como estimulantes, fundamentado en las investigaciones que evidencian las mayores concentraciones de ácido S-láctico obtenidas en las experimentaciones. Adicionalmente, se incorporará manosa tomando en cuenta que es un carbohidrato simple que puede ser fermentado por este hongo como lo establece la investigación (García *et al.* 2010).

Después de realizar un primer experimento se obtuvo los mejores estimulantes (glicerol y manosa) para realizar un nuevo experimento evaluando el efecto de las concentraciones de los estimulantes en la producción de ácido S-láctico en un tiempo de 24 h. Los resultados del proceso fermentativo con los estimulantes de glicerol y manosa en un tiempo de 24 h se presentan en la Figura 6.

Al comparar estos resultados con los reportados Serna & Rodríguez (2009), donde

obtuvieron un rango de concentración de 24 - 58 g/L de ácido S-láctico producido usando el glicerol como estimulante, muestra incidencias, dejando la posibilidad de realizar nuevos experimentos con otras concentraciones para futuras investigaciones, y llegar a obtener las condiciones óptimas que promuevan la actividad amilolítica de la cepa *R. oryzae* en la producción de ácido S-láctico.

En el gráfico de interacción (Figura 7) se observa que la interacción sustrato-estimulantes no son independientes, es decir, que el estimulante glicerol genera una alta concentración con la mezcla (2% harina de batata-5% harina de yuca) y la harina de yuca (5 %) y la manosa genera otra alta concentración de ácido S-láctico; esto genera una intersección entre los sustratos y estimulantes, indicando que la modificación de las concentraciones se deben hacer en conjunto para asegurar la máxima producción de ácido S-láctico.

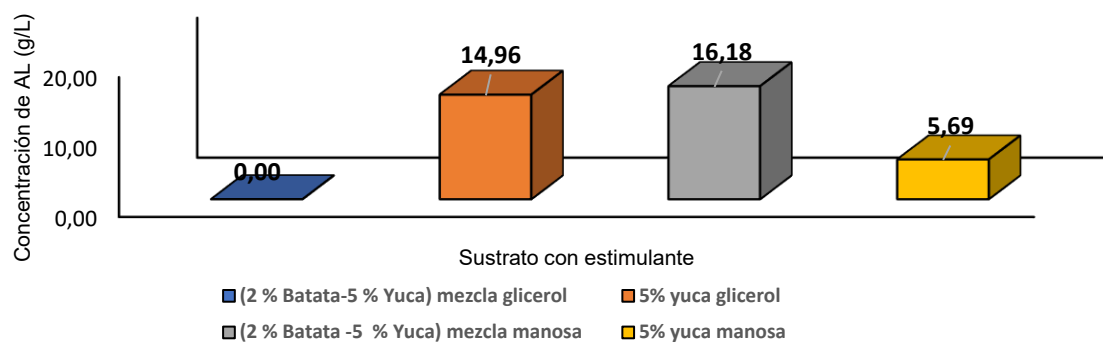


Figura 6. Rendimiento de ácido láctico de la fermentación con los estimulantes glicerol y manosa en 24 h.

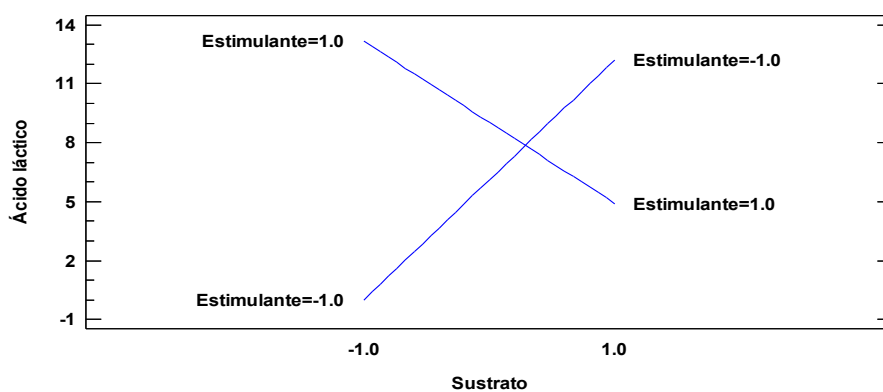


Figura 7. Gráfico de interacción de la fermentación con estimulantes durante 24 h.

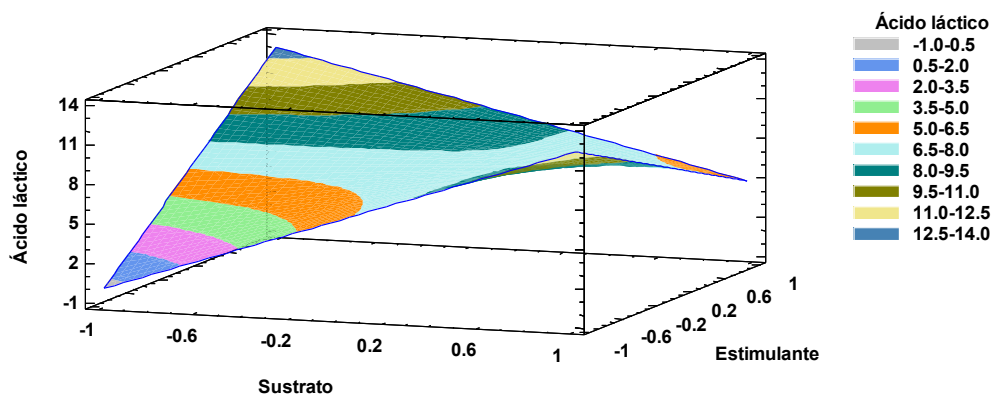


Figura 8. Superficie de respuesta estimada de la fermentación con estimulantes durante 24 h.

Conclusión

En esta investigación se evidencio que un medio de cultivo para el hongo *Rhizopus oryzae* en la producción de ácido láctico (AL) constituido por sustratos agroindustriales, aporta nutrientes beneficiosos que favorecen su crecimiento y producción de ácido láctico. Donde la mayor concentración obtenida de ácido láctico (26.70 g/L) con la harina de yuca (5 %) y la mezcla de harina (27.60 g/L) como sustrato fue a un tiempo de 22 h. Usando una prueba enzimática se identificó el isómero S del ácido láctico obtenido. Y los mejores estimulantes (glicerol y manosa) en la producción de ácido S-láctico alcanzaron concentraciones de 14.96 g/L con el sustrato [harina de yuca (5 %)]; 16.17 g/L con el sustrato (2 % batata – 5 % yuca) y 5.69 g/L con el sustrato [harina de yuca (5%)] en 24 h. Hay que destacar que esta investigación es pionera en usar la manosa como estimulante, donde se llegó a comprobar su efecto positivo en la producción de ácido S-láctico, representando un gran aporte a la comunidad científica para futuras investigaciones.

Referencias

Aladdin Azzam, Alsaheb A. Ramzi A., Malek Roslinda A., Othman Nor Z. (2015). Lactic acid applications in pharmaceutical and cosmeceutical industries. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, año 2015, Volume 7, N° 10, pág. 729-735. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/292990722_Lactic_acid_applications_in_pharmaceutical_and_cosmeceutical_industries

Alvarado, C., Pavone, D. (2015). Fermentación Sumergida con base en Subproductos de la Agroindustria para el Crecimiento de *Rhizopus oryzae* y Producción de Ácido Láctico. Faraute 10(2): 32-42. <https://servicio.bc.uc.edu.ve/facyt/vol10n2/art04.pdf>

Blas, P. Evelyn, M., Dulce, C., Jackelyn, F. (2024). Efecto de la concentración de fosfato inorgánico y cascara de *Solanum tuberosum* en la producción de ácido láctico por *Rhizopus oryzae* en cultivo batch [Tesis de pregrado publicada]. Universidad Nacional del Santa (UNS). Disponible en: <https://repositorio.uns.edu.pe/handle/20.500.14278/4668>

Garcia, C., Arrázola Paternina, G. S., & Durango Villadiego, A. M. (2010). Producción de ácido láctico por vía biotecnológica. Temas Agrarios, 15(2), 2010. <https://doi.org/10.21897/rta.v15i2.676>.

Gil, R., Dominguez, R. & Pacho, J. (2008). Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cascara de naranja: procesos de separación y purificación. Tecnología, ciencia y educación (IMIQ). Volumen 23, N° 2, pág. 80-81. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/482/48223207.pdf>

Guevara, M., Urcia, F., Casquero, Jose. (2010). Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Ministerio de Salud del Perú, Instituto Nacional de Salud. Medicina & Laboratorio, volumen 2, N° 16, pág. 9-10. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2010/myl107-8d.pdf>

Huang LP, Jin B, Lant P. (2005). Fermentación directa de aguas residuales de almidón de patata a ácido láctico por *Rhizopus oryzae* y *Rhizopus arrizus*. Bioproceso Biosyst Eng 27:229-238. <http://doi.org/10.1007/s00449-005-0398-0>.

Khunnonkwaoa, P., Boontawanb, P., Haltrichc, D., Maischbergerd, T., & Boontawana, A. (2012). Purification of L-(+)-lactic acid from pre-treated fermentation broth using vapor permeation-assisted esterification. Process Biochemistry, 47 (12), 1948-1956. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.07.011>

Miranda, R.; Cil del Padro, K.; Noguez, M.; Escobedo, R.; Martínez, J.; Cortés, J.; Morales, D.; Reyes, L. (2024). Química verde: Principio por principio. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. ESCUELA NACIONAL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES. ISBN: 978-607-30-8720-9.

Rivera, M; Wright, E. (2020). Apuntes de patología vegetal: fundamentos y prácticas para la salud de las plantas. Editorial Facultad de Agronomía Universidad de Buenos Aires. ISBN 978-987-3738-30-2 FAO (1985). Manual para patólogos vegetales. Perú: Pacific Press S.A. https://books.google.co.ve/books/about/Manual_para_pat%C3%B3logos_vegetales.html?id=LyOKnAEACAAJ&redir_esc=y

Artículos

Saha, T., Fang, J., Mukherjee, S., Dickey, M., Velez, O. (2021). ACS Applied Materials & Interfaces 2021 13 (7), 8071-8081. DOI: 10.1021/acsami.0c22730.

Sanches-Rosario, Y. & Sanchez J. (2011). Producción y caracterización de la fenol oxidasa de *Scytalidium thermophilum*. Revista Mexicana de Micología, 34: 31-42.

Schaad, J. B. Jones, W. Chun (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. (3rd ed.). APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, EE.UU. 164p.

Serna C. Lili, Rodriguez de S. A. (2005). Producción biotecnológica de ácido láctico:

estado del arte. Ciencia y tecnología alimentaria, volumen 5, año 2015, N° 001, pág. 54-65. Disponible en: http://www.eis.uva.es/~biopolimeros/alberto/_private/acido%20lactico.pdf

Srisakul, T., Nantana S., Kuakoon, P., Shang-Tian, Y., Vichien, K. (2017). L-lactic acid production from liquefied cassava starch by thermotolerant *Rhizopus microsporus*: characterization and optimization (Producción de ácido L-láctico a partir de almidón de yuca licuado por el termotolerante *Rhizopus microsporus*: caracterización y optimización.). Process Biochemistry Sciencedirect, Tailandia. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359511317308498>.

Elaboración de Jarabes fructosados para la industria alimentaria y sus usos como aditivo

Daphne Reyes-Granados, Régulo Ruíz-Salazar, Cristian Lizarazo-Ortega, Adriana L. Perales-Torres, Rodríguez, Guadalupe C. Rodríguez-Castillejos, Juan R. De la torre-Escareño, Rubén Santiago-Adame
regulo.ruiz@docentes.uat.edu.mx

Resumen

Los jarabes fructosados, también conocidos como jarabes de alta fructosa, son edulcorantes líquidos derivados del almidón de maíz, trigo u otros vegetales ricos en almidón. El proceso implica la conversión del almidón en glucosa y luego en fructosa mediante enzimas específicas. Estos jarabes contienen una combinación de fructosa y glucosa en proporciones variables, siendo el jarabe de maíz de alta fructosa (JMAF) uno de los más comunes.

En la industria alimentaria, los jarabes fructosados tienen un uso importante debido a su dulzura intensa, capacidad para mejorar la textura, y estabilidad en productos horneados. Son ingredientes clave en la producción de refrescos, jugos frutales, panadería, helados, yogurt y conservas. Su capacidad para alargar la vida útil de los alimentos los hace ideales para productos procesados. Su bajo costo y facilidad de uso en formulaciones líquidas los han convertido en una elección popular para los fabricantes.

Más allá de la industria alimentaria, los jarabes fructosados tienen aplicaciones en la farmacéutica como componente en jarabes infantiles y vitaminas líquidas. También se usan en la fabricación de tabaco y productos para el cuidado personal, como fijadores y champú, por su capacidad de retener humedad. Las aplicaciones que se le da a estos jarabes tienen su importancia en las cualidades que aporta.

Sin embargo, su uso ha generado debates sobre sus efectos en la salud, asociándose con problemas metabólicos cuando se consumen en exceso. Por tanto, los jarabes fructosados representan una solución versátil para la industria, aunque su uso requiere consideraciones sobre salud pública.

Palabras Claves: *jarabe de alta fructosa, azúcar, poder edulcorante, azúcares, diabetes*

Abstract

Fructose-containing syrups, also known as high-fructose corn syrups, are liquid sweeteners derived from corn, wheat, or other starchy vegetables. The process involves converting starch into glucose and then into fructose using specific enzymes. These syrups contain a combination of fructose and glucose in varying proportions, with high-fructose corn syrup (HFCS) being one of the most common. In the food industry, fructose-containing syrups are widely used due to their intense sweetness, ability to improve texture, and stability in baked goods. They are key ingredients in the production of soft drinks, fruit juices, baked goods, ice cream, yogurt, and preserves. Their ability to extend food shelf life makes them ideal for processed products. Furthermore, their low cost and ease of use in liquid formulations have made them a popular choice for manufacturers. Beyond the food industry, fructose syrups have applications in the pharmaceutical industry as a component in cough syrups and liquid vitamins. They are also used in the manufacture of tobacco and personal care products, such as hair gel and shampoo, due to their moisture-retaining properties. The applications of these syrups are based on the qualities they provide.

However, their use has generated debate about their health effects, with associations with metabolic problems when consumed in excess. Therefore, fructose syrups represent a versatile solution for the industry, although their use requires public health considerations.

Key Words: *high fructose corn syrup, sugar, sweetening power, sugars, diabetes*

Introducción

Este capítulo proporciona una visión general completa sobre la elaboración de jarabes fructosados y sus múltiples aplicaciones en la industria alimentaria y otros sectores. La importancia de estos jarabes radica no solo en su amplio uso como edulcorantes en la producción de alimentos, sino también en su impacto en la salud pública y las regulaciones que rigen su utilización. A lo largo de este trabajo, se abordarán temas esenciales que van desde la definición y características de los jarabes fructosados hasta los procesos de producción que los hacen viables comercialmente.

El jarabe de maíz es un producto derivado que se encuentra disponible para todo el público, integrado por azúcares como la fructuosa que favorece la integración de energía a la sangre con menor velocidad de la glucosa (Alcántara-Ortiz, et al., 2021).

Comenzaremos explorando qué son los jarabes fructosados y cuáles son sus características principales, un aspecto fundamental para entender sus roles en la industria. La producción de estos jarabes implica un proceso complejo que inicia con la obtención del jugo, seguido de las etapas de concentración y purificación del producto. Este proceso no solo inscribe importancia en la obtención de un producto de calidad, sino que también sienta las bases para su evaluación fisicoquímica, que será abordada en el siguiente capítulo. Las propiedades de los jarabes fructosados, incluyendo su composición y comportamiento ante diferentes condiciones, son esenciales para su aplicación efectiva en diversas formulaciones alimentarias.

La elaboración de jarabes fructosados implica la purificación del jugo de fuentes vegetales, hidrólisis enzimática y concentración de los azúcares para obtener un producto dulce y viscoso. Existen en el mercado una gran variedad de jarabes entre los que se destacan los jarabes concentrados de sacarosa (66-68 %) y los de sacarosa parcial totalmente hidrolizados, para producir una mezcla de glucosa y fructosa. Incluso jarabes de glucosa obtenidos por hidrólisis ya sea enzimática o hidrólisis química de almidones, y jarabes altos contenido de fructosa

Definición de jarabes fructosados

Los jarabes fructosados son edulcorantes líquidos que se elaboran principalmente a partir

del almidón de vegetales, a través de un proceso de hidrólisis enzimática. Este proceso da lugar a una mezcla de azúcares, principalmente fructosa y glucosa, aunque otros monosacáridos y oligosacáridos pueden estar presentes en menor cantidad. Los jarabes fructosados juegan un papel fundamental en la industria alimentaria, donde se utilizan por su capacidad para añadir dulzura, mejorar la textura y prolongar la vida útil de los productos.

La fructosa es uno de los componentes más destacados de estos jarabes. Se la considera un azúcar simple, que es más dulce que la glucosa, lo que permite que se necesiten menores cantidades para lograr un nivel de dulzura comparable. La combinación de fructosa y glucosa en diferentes proporciones permite una variabilidad significativa en las características de los jarabes fructosados, lo que a su vez influye en su funcionalidad y su aplicación en múltiples formulaciones alimentarias. Esta variabilidad es una característica clave que distingue a los jarabes fructosados de otros edulcorantes, como el azúcar de caña o la sacarosa, que poseen una composición más uniforme y fija.

Los métodos más comunes para la obtención de jarabes se basan en la inversión de la sacarosa, utilizando ácidos, resinas de intercambio iónico o enzimas. La hidrólisis ácida tiene el inconveniente de la formación de productos no deseables y corrosión en materiales y equipos. La hidrólisis enzimática genera residuos y requiere de un consumo de productos químicos para la regeneración de las resinas. La hidrólisis enzimática es el método más empleado a nivel mundial, pero requiere de un alto costo debido a la poca recuperación de la enzima que se utiliza (Gómez-Brizuela, et al., 2022)

La producción de jarabes fructosados se lleva a cabo mediante procesos controlados que emplean enzimas específicas para hidrolizar los enlaces glucosídicos en el almidón. Este proceso de conversión enzimática permite una mayor precisión en la obtención de las proporciones deseadas de fructosa y glucosa, lo cual es esencial para cumplir con las demandas particulares de los formuladores de productos alimenticios. Adicionalmente, la selección de

enzimas y las condiciones de reacción influyen en la mejora de las propiedades fisicoquímicas del jarabe resultante, como su estabilidad y solubilidad.

Un otro aspecto relevante en la discusión de los jarabes fructosados es la normativa que rige su uso en la industria alimentaria en países como México. Estas regulaciones son importantes porque establecen parámetros de calidad y seguridad alimentaria que deben cumplir los fabricantes. Estas normativas pueden variar ampliamente dependiendo del tipo de jarabe y su concentración de azúcares. Por ejemplo, el jarabe de maíz de alta fructosa, debido a su prevalencia y su papel en la dieta moderna, es objeto de atención regulatoria específica que busca asegurar su uso apropiado y etiquetado claro para los consumidores.

Proceso de elaboración de jarabes fructosados

La elaboración de jarabes fructosados es un proceso meticuloso que involucra una serie de etapas técnicas comenzando por la obtención del jugo vegetal hasta la caracterización y conservación del producto resultante. Este capítulo detalla los métodos de obtención del jugo, la hidrólisis enzimática y la concentración del jarabe, así como los criterios de calidad y condiciones de almacenamiento que son esenciales para garantizar la viabilidad comercial del producto

Preparación del Jugo

El proceso comienza con la obtención del jugo del fruto o materia vegetal de primera extracción, en ocasiones es necesario hacer un filtrado o una purificación, para la eliminación de impurezas, como la adsorción con carbón activado o ultrafiltración para mejorar la claridad del producto, con estos métodos se eliminan colorantes y compuestos no deseados del jugo. (Solís-Fuentes, J. A., et al, 2010)

Hidrólisis Enzimática

La hidrólisis enzimática se lleva a cabo utilizando una enzima invertasa, que convierte la sacarosa presente en el jugo en glucosa y fructosa. Esta etapa es de suma importancia ya que se incrementa el contenido de fructosa en el jarabe, mejorando su poder edulcorante. Esta reacción se suele llevar a cabo en condiciones controladas de pH y temperatura para maximizar la eficiencia de la enzima (Solís-Fuentes, J. A., et al, 2010)

Concentración del Jarabe

Después de la transformación de la sacarosa, el siguiente paso es la concentración del jarabe, este proceso se realiza por medio de liofilización o por evaporación, con ello se elimina el exceso de agua y alcanza un contenido de sólidos necesario para alcanzar la denominación de jarabe (Solís-Fuentes, J. A., et al, 2010)

Caracterización y Almacenamiento

El jarabe se caracteriza químicamente además de evaluarse el sabor y la resistencia a cristalizarse. Las propiedades fisicoquímicas para evaluar son pH, color y porcentaje de sólidos y con ello determinar la calidad del jarabe. Se deben establecer condiciones adecuadas para mantener la estabilidad y calidad del producto. (Solís-Fuentes, J. A., et al, 2010).

Obtención del jugo de fuentes vegetales

La obtención del jugo de fuentes vegetales es una etapa crítica en la producción de jarabes fructosados, ya que la calidad y el rendimiento del jugo influyen directamente en las características finales del producto. Existen diversos métodos que se utilizan para la extracción del jugo, cada uno con sus ventajas y desventajas en términos de eficiencia, costo y impacto en la calidad del producto.

En este capítulo, se explorarán en detalle estos métodos, así como la purificación y las variables que afectan la calidad del jugo obtenido.

Los métodos de extracción más comunes incluyen la extracción mecánica y la difusión. La extracción mecánica implica el uso de prensas o exprimidores que aplican fuerza para liberar el jugo del tejido vegetal.

El método es ampliamente utilizado debido a su simplicidad y eficacia, pero puede perder compuestos bioactivos y ciertos nutrientes durante el proceso. Por otro lado, la difusión se basa en la aplicación de un soluto en el tejido vegetal que permite la migración del jugo hacia el exterior a través de diferencias de concentración. Se tiende a ser más delicado y, por lo tanto, preserva mejor los compuestos sensibles, aunque a menudo requiere tiempos de extracción más prolongados.

La filtración y purificación del jugo son igualmente importantes. La filtración se utiliza para eliminar sólidos suspensos y otros contaminantes que

pueden afectar la claridad y la calidad sensorial del jarabe resultante.

A menudo se emplean diferentes tipos de filtros dependiendo de la viscosidad del jugo y de las impurezas que se desea eliminar. Posteriormente, la purificación puede involucrar procesos como la centrifugación o la coagulación, los cuales ayudan a eliminar residuos indeseables y mejorar la claridad del producto final.

Estos pasos no solo tienen en cuenta la estética del jarabe, sino que también son cruciales para garantizar la estabilidad física y química de este.

Propiedades fisicoquímicas de los jarabes

Este capítulo explora las propiedades fisicoquímicas de los jarabes fructosados, las cuales desempeñan un papel crucial en su funcionalidad y aplicación en la industria alimentaria. Inicialmente, el pH es un factor determinante que influye en la estabilidad y en las reacciones que se producen durante el almacenamiento de los jarabes. Un pH un tanto ácido, que generalmente varía entre 4.0 y 6.0, no solo afecta la conservación, sino que también puede alterar las propiedades sensoriales, ofreciendo un perfil de sabor que puede ser más o menos deseable dependiendo del producto final.

Aplicaciones del jarabe rico en fructosa

Los jarabes fructosados son ampliamente utilizados en la industria alimentaria como edulcorantes naturales, gracias a su alto poder endulzante y menor impacto calórico en comparación con la sacarosa.

Se usan para la producción de bebidas, confitería, y alimentos procesados, además de ser una alternativa para personas que padecen diabetes, debido a su diferente metabolismo.

En México, la regulación del uso de jarabes fructosados es un tema candente. La normativa vigente promueve ciertas restricciones que buscan mitigar los riesgos asociados con su consumo. Es importante señalar que estas regulaciones no solo afectan la cantidad de jarabes fructosados que se pueden utilizar, sino que también influyen en la forma en que se etiquetan y comercializan los productos alimentarios. La importancia del etiquetado claro y veraz se ha vuelto un punto focal para asegurar

que los consumidores estén informados sobre lo que realmente están consumiendo.

Los jarabes fructosados, como el jarabe de maíz de alta fructosa, ofrecen múltiples beneficios a la industria alimentaria, incluyendo su alto poder endulzante, versatilidad y propiedades funcionales.

Alto poder endulzante

Los jarabes fructosados, especialmente el jarabe de maíz de alta fructosa (JMAF), son significativamente más dulces que la sacarosa (azúcar común). Esto permite a los fabricantes utilizar menos cantidad de jarabe para alcanzar el nivel de dulzor deseado, lo cual reduce los costos de producción y mejora la eficiencia.

Jarabes de fructosa en México: Impactos en la salud y en la industria alimentaria.

El jarabe de maíz de alta fructosa es un edulcorante omnipresente en la industria alimentaria, utilizado ampliamente en productos procesados y bebidas debido a su bajo costo y capacidad para realzar el sabor.

Sin embargo, este edulcorante ha generado controversia por sus efectos sobre la salud pública y su impacto en las dietas, lo que ha provocado una creciente presión regulatoria en diversas regiones del mundo, incluyendo América Latina.

Las normativas que rigen el uso del jarabe de maíz tienen implicaciones significativas para las empresas alimentarias, afectando tanto a la formulación de nuevos productos como a la reformulación de los ya existentes.

El panorama actual del jarabe de maíz de alta fructosa en la industria alimentaria y las regulaciones globales y regionales influyen en su uso, y cómo estas afectan las decisiones de formulación de productos.

Razones por las que la industria los prefiere: bajo costo, alta solubilidad, mayor poder endulzante, etc.

Los edulcorantes son una clase funcional de aditivos alimentarios, que normalmente se utilizan para reemplazar los azúcares en la producción de alimentos de bajo contenido energético. Proporcionan el sabor dulce deseado sin la adición de energía apreciable y pueden

ayudar a mantener la palatabilidad de los productos. Estos productos pueden o no estar etiquetados como, por ejemplo, "dietéticos", "ligeros", "sin azúcar" o "bajos energéticos" y normalmente contienen uno o más edulcorantes no nutritivos como sustituto total o parcial del azúcar. Algunos de estos tipos de productos están formulados de manera que puedan agregarse directamente a bebidas como té y café, o usarse para cocinar y hornear (Wierzbicka, 2021).

Uso de jarabes fructosados en bebidas

El uso de jarabes fructosados en la producción de bebidas ha ganado atención en la industria alimentaria, especialmente debido a su capacidad para mejorar las características sensoriales y prolongar la vida útil del producto. Estos jarabes, que incluyen el jarabe de maíz de alta fructosa (JMAF), son frecuentes en bebidas azucaradas, ya que proporcionan un nivel de dulzura que puede ser ajustado de acuerdo con las necesidades del consumidor y las regulaciones vigentes. La proporción de jarabes fructosados en las bebidas azucaradas, en comparación con otros edulcorantes, es significativa. En muchos casos, la fructosa es más dulce que la glucosa, lo que permite a los fabricantes utilizar menores cantidades para alcanzar la dulzura deseada, optimizando así el desarrollo del producto.

Jarabes fructosados en productos de panadería

El uso de jarabes fructosados en la panadería ha adquirido relevancia significativa, principalmente dado su impacto en las propiedades sensoriales y técnicas de los productos horneados. Estos jarabes, particularmente el jarabe de maíz de alta fructosa, se incorporan en diversas formulaciones debido a sus capacidades para embellecer, conservar y modificar la textura de los productos. Un aspecto fundamental es entender qué propiedades funcionales poseen estos jarabes que los hacen ideales para ser utilizados en la panadería. La capacidad de los jarabes fructosados para retener la humedad y afectar la actividad de los lípidos en la masa son cruciales para mejorar la miga y la frescura de los productos, permitiendo que el pan y otros alimentos horneados mantengan su calidad durante un período más prolongado.

Impacto en la salud

El impacto de los jarabes fructosados en la salud pública es un tema de creciente preocupación en el ámbito nutricional y de salud. Los jarabes de maíz de alta fructosa (JMAF) y otros jarabes fructosados se han convertido en ingredientes comunes en diversos productos alimenticios, especialmente en las bebidas azucaradas y alimentos procesados. Sin embargo, el consumo excesivo de estos edulcorantes ha sido vinculado a una serie de problemas de salud, uno de los más alarmantes siendo la creciente tasa de obesidad en la población mexicana.

Efectos metabólicos: relación con obesidad, diabetes tipo 2, hígado graso y síndrome metabólico.

El consumo excesivo de jarabe de alta fructosa (JMAF) se ha relacionado con diversos efectos metabólicos adversos que contribuyen al desarrollo de enfermedades crónicas como la obesidad, la diabetes tipo 2, el hígado graso no alcohólico y el síndrome metabólico.

Obesidad: El JMAF favorece la acumulación de grasa debido a su capacidad para estimular la lipogénesis de novo, un proceso que convierte la fructosa en grasa en el hígado. Además, su consumo excesivo puede alterar los mecanismos de saciedad, promoviendo el aumento de peso.

Diabetes tipo 2: La fructosa puede inducir resistencia a la insulina al alterar las vías de señalización celular y aumentar los niveles de triglicéridos y colesterol de muy baja densidad. Esto contribuye al desarrollo de diabetes tipo 2.

Hígado graso no alcohólico: El metabolismo de la fructosa en el hígado genera subproductos que promueven la acumulación de grasa hepática, lo que puede evolucionar hacia inflamación y fibrosis².

Síndrome metabólico: El consumo excesivo de JMAF está asociado con un conjunto de alteraciones metabólicas, como hipertensión, dislipidemia y resistencia a la insulina, que conforman el síndrome metabólico.

Estudios científicos que vinculan el consumo excesivo de fructosa industrial con enfermedades crónicas.

Un artículo publicado en la revista TIP destaca cómo el consumo excesivo de JMAF está

asociado con obesidad, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, hiperuricemia e inflamación. Estos efectos se deben a alteraciones en las vías metabólicas y a la acumulación de lípidos.

Otro estudio en el International Journal of Morphology analiza cómo el consumo elevado de fructosa añadida puede contribuir al desarrollo de obesidad, resistencia a la insulina, lipogénesis de novo e inflamación. Estos factores están relacionados con el riesgo de enfermedades metabólicas y hepáticas.

En Acta Médica Costarricense, se describe cómo el consumo excesivo de JMAF puede estar vinculado a dislipidemias, síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares. Este estudio resalta los efectos negativos de consumir fructosa en cantidades que superen el 25% de la ingesta calórica diaria.

Estos estudios subrayan la importancia de moderar el consumo de fructosa industrial para prevenir riesgos metabólicos y promover una mejor salud.

Normas mexicanas y etiquetado de alimentos

La regulación del uso de jarabes fructosados en la industria alimentaria en México es un tema multidimensional que abarca diversas leyes, normativas y sistemas de vigilancia que buscan proteger tanto la salud pública como asegurar la calidad de los productos alimenticios. En este sentido, las normativas específicas que regulan la producción y uso de jarabes fructosados son esenciales para comprender el marco regulatorio que rige la industria alimentaria. La norma oficial mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010 se enfoca en el etiquetado de alimentos y bebidas no alcohólicas, estableciendo criterios claros que deben seguir los productores, incluyendo información sobre los ingredientes y el contenido calórico, así como alertas sobre la cantidad de azúcares añadidos. Esto permite que los consumidores tomen decisiones informadas sobre los productos que consumen. En el contexto de los jarabes fructosados, es vital que se especifique la naturaleza del edulcorante, destacando el porcentaje de fructosa y glucosa, ya que estas proporciones también pueden afectar la percepción del producto por parte del consumidor.

Aunque no existe una norma específica para jarabes fructosados, algunas normas relacionadas incluyen:

NOM-051-SCFI/SSA1-2010: Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados. Esta norma regula la información comercial y sanitaria que debe aparecer en las etiquetas de los productos.

NOM-251-SSA1-2009: Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. Establece lineamientos para garantizar la inocuidad durante la producción.

NOM-173-SE-2021: Relacionada con jugos, néctares y bebidas no alcohólicas, incluye especificaciones y métodos de prueba que podrían ser aplicables a productos similares.

Estas normas aseguran que los jarabes fructosados cumplan con estándares de calidad, etiquetado y seguridad alimentaria.

Presión de la industria alimentaria vs. políticas públicas en salud.

La relación entre la presión de la industria alimentaria y las políticas públicas en salud respecto al uso de jarabes fructosados es un tema complejo y multifacético. Por un lado, la industria alimentaria ejerce una influencia significativa en la formulación de políticas debido a su poder económico. Esto puede llevar a la promoción de productos ultra procesados, incluidos aquellos que contienen jarabes fructosados, como una solución rentable y atractiva para los consumidores (Massieu, Y.C. 2006)

La influencia de las industrias sobre las políticas globales y locales, la investigación y la práctica de la salud pública es conocida. Las comparaciones entre las industrias del tabaco, farmacéuticas y alimentarias sugieren que las corporaciones utilizan una serie de tácticas comunes cuyo objetivo final es defender sus productos, garantizar los beneficios empresariales y establecer una determinada agenda de salud pública global. (Mengibar, Josep León, et al.)

Las políticas públicas en salud buscan reducción de la producción de alimentos con altos contenidos de jarabes fructosados debido a los efectos negativos del consumo excesivo de estos productos, vinculados a enfermedades crónicas como la obesidad, diabetes tipo 2 y síndrome metabólico. En México, por ejemplo, se han

implementado medidas como el etiquetado frontal de advertencia y los impuestos a bebidas azucaradas para reducir el consumo de productos con alto contenido de azúcares añadidos.

Sin embargo, estas políticas de etiquetado, a pesar de dar más información al consumidor, se enfrentan desafíos significativos debido a la resistencia de la industria alimentaria, que argumenta que estas regulaciones pueden afectar la economía. Este conflicto refleja la necesidad de equilibrar los intereses económicos y tecnológicos con la protección de la salud pública.

Opciones más saludables para endulzar

Existen varias alternativas saludables para endulzar tus alimentos, como la miel, la stevia, el azúcar de coco y los dátiles, que no solo son deliciosos, sino que también ofrecen beneficios nutricionales.

La stevia es un edulcorante natural que puede ser hasta 300 veces más dulce que el azúcar. No aporta calorías y no eleva los niveles de azúcar en sangre, lo que la hace ideal para personas con diabetes. Su sabor puede variar, y algunas personas pueden notar un ligero regusto amargo, por lo que es recomendable probar diferentes marcas.

El azúcar de coco se extrae de la savia de las flores del cocotero y tiene un bajo índice glucémico. Aunque es natural, debe consumirse con moderación debido a su contenido de fructosa. Este edulcorante es rico en minerales y antioxidantes, lo que lo hace una opción saludable.

Los dátiles son frutas naturalmente dulces y muy nutritivas. Pueden ser consumidos enteros, picados o en forma de pasta para endulzar sin necesidad de azúcar añadido. Son ricos en fibra y ayudan a mejorar la digestión.

El jarabe de arce es un edulcorante natural que contiene antioxidantes y nutrientes como calcio y potasio. Aunque es delicioso, debe consumirse en cantidades controladas debido a su alto contenido calórico.

Eritritol y Xilitol son polialcoholes que tienen un bajo índice glucémico y no afectan los niveles de azúcar en sangre. Eritritol tiene

aproximadamente 0,2 calorías por gramo, mientras que xilitol contiene un 40% menos calorías que el azúcar. Ambos son excelentes para cocinar y hornear.

Fruta del Monje (Monk Fruit). Este edulcorante natural es hasta 250 veces más dulce que el azúcar y no genera respuesta glucémica. Su sabor es suave y se utiliza en postres frescos y batidos.

Incorporar estos edulcorantes naturales en tu dieta no solo te ayudará a reducir el consumo de azúcares refinados, sino que también te permitirá disfrutar de un sabor dulce sin comprometer tu salud. Recuerda que, aunque son saludables, es importante consumirlos con moderación para evitar problemas de salud. (Zhang, G., et al., 2022)

Este capítulo sintetiza los hallazgos sobre los jarabes fructosados, destacando su importancia en la industria alimentaria y sus implicaciones en la salud pública. A lo largo de esta obra, se ha analizado cómo estos edulcorantes, especialmente el jarabe de maíz de alta fructosa (JMAF), han sido integrados en varios productos alimenticios y cómo su consumo ha llegado a ser tema de preocupación tanto para los reguladores como para los consumidores.

Una de las cuestiones más relevantes es el impacto del uso de jarabes fructosados en la salud pública a largo plazo. Estudios han correlacionado el aumento en el consumo de estos edulcorantes con un incremento en las tasas de obesidad y diabetes tipo 2 en la población, lo que ha suscitado el interés de expertos y organizaciones de salud para encontrar formas de regular su uso y educar al público sobre sus efectos adversos. La necesidad de regulaciones adecuadas es evidente, dado que un marco regulador que limite la presencia de jarabes fructosados en los alimentos procesados puede servir como un mecanismo crucial para mitigar los riesgos asociados con su consumo y proteger la salud de la población.

Además, las políticas públicas en México tienen un papel fundamental en la mejora de la regulación del uso de jarabes fructosados. Las iniciativas para reducir el contenido de azúcares añadidos y establecer criterios claros para su etiquetado son pasos necesarios para garantizar que los consumidores tomen decisiones

informadas. Estas políticas podrían impulsar un cambio hacia alternativas más saludables, que han demostrado ser más efectivas en términos de salud y aceptación del consumidor. Así, es crucial que el gobierno, junto con organizaciones no gubernamentales y la industria, trabaje en conjunto para fomentar un ambiente que priorice la salud.

Las alternativas a los jarabes fructosados, como la stevia y el azúcar de coco, han demostrado ser más efectivas en términos de salud. Estas opciones no solo ofrecen beneficios nutricionales, sino que también responden a la creciente demanda de productos más naturales. De esta manera, la industria alimentaria enfrenta el reto de adoptar soluciones más saludables en relación con el uso de jarabes fructosados, logrando así equilibrar las expectativas del consumidor y los requerimientos nutricionales.

La educación nutricional también juega un papel clave en la reducción del consumo de jarabes fructosados. A medida que la población se vuelve más consciente de los efectos negativos de los azúcares añadidos, es probable que muchos busquen activamente productos más saludables. Esto podría señalar un cambio en cómo los fabricantes desarrollan y comercializan sus productos, motivándolos a adoptar prácticas más responsables.

Finalmente, los avances en tecnología para edulcorantes prometen impactar la producción y formulación de productos alimentarios más saludables. Inversiones en investigación y desarrollo que integren alternativas a los jarabes fructosados podrían no solo mejorar la salud pública, sino también ofrecer a los consumidores opciones que se alineen con su preferencia por alimentos más saludables y sustentables.

En este contexto, la visión futura de la industria alimentaria debería centrarse no solo en la producción eficiente, sino también en el bienestar del consumidor y la sostenibilidad de los sistemas alimentarios.

Referencias

Alcántara-Ortiz, M. G., Campos-Serrano, J., & Ibarra-Sánchez, A. (2021). *Desregulación metabólica y consecuencias clínicas por el consumo de fructosa. TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 24.

Estuardo Cevallos, G., Cargua Chávez, J. E., Villarreal Cobeña, Ángel, & Alcívar Mera, A. (2025). Nuevas Tecnologías y pensamiento creativo en la era de la Inteligencia Artificial: New Technologies and creative thinking in the era of Artificial Intelligence. *Revista De Investigación Científica TSE DE*, 8(L11), Pág. 1 –. <https://doi.org/10.60100/tsede.v8iL11.237>

Fenical WH, Jensen PR & Kwon HC (2009) Polyol macrolide antitumor-antibiotics from the marine actinomycete strain CNQ140. US patent 7,521,414.

Gómez-Brizuela, L., Vázquez-Sotolongo, W., Ramírez-Pérez, H. L., Luis-Orozco, J., & Serrano-Febles, J. (2022). Influencia de la concentración de ácido cítrico en las propiedades de siropes de azúcar invertidos. *Tecnología Química*, 42(2), 214-229

Massieu Trigo, Y. C. (2006). México y su necesaria ley de bioseguridad: intereses económico-políticos y movimiento social. *Estudios sociales (Hermosillo, Son.)*, 14(27), 57-91.

Mengíbar, Josep León, Pastor-Valero, María, & Hernández Aguado, Ildefonso. (2017). Una evaluación crítica de la relación entre la industria alimentaria y la investigación en salud. *Gaceta Sanitaria*, 31(4), 320-323. <https://dx.doi.org/10.1016/j.gaceta.2016.10.012>

Olvera, C., Castillo, E., & López-Munguía, A. (2007). Fructosiltransferasas, fructanas y fructosa. *Biotechnología*, 14(3), 327-345.

Wierzbicka, E. (2021). Sweeteners as sugar substitutes in food industry—conditions of use and consumer safety®. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, (1), 186-196.

Zhang, G., Zhang, L., Ahmad, I., Zhang, J., Zhang, A., Tang, W., ... Lyu, F. (2022). Recent advance in technological innovations of sugar-reduced products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(15), 5128–5142. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2151560>



www.smbb.com.mx