

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“PRODUCCIÓN DE COLORANTES NATURALES CON HONGOS
FILAMENTOSOS UTILIZANDO DOS SISTEMAS DE
FERMENTACIÓN”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
BIÓLOGA**

LILIANA ROCIO RENGIFO URBIETTA

LIMA – PERÚ

2021

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“PRODUCCIÓN DE COLORANTES NATURALES CON HONGOS
FILAMENTOSOS UTILIZANDO DOS SISTEMAS DE
FERMENTACIÓN”**

Presentada por:

LILIANA ROCIO RENGIFO URBIETTA

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGA

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Dra. Doris Elizabeth Zúñiga Dávila
PRESIDENTE

Ph.D. Jenny del Carmen Valdez Arana
MIEMBRO

Mg. Sc. Katty Ogatta Gutiérrez
MIEMBRO

Ph.D. Gretty Katherina Villena Chávez
ASESORA

DEDICATORIA

Dedico la presente investigación a mis amados padres, por su apoyo incondicional, esfuerzo y paciencia a lo largo de este tiempo.

A mi hermanita y mejor amiga Silvia, quién con su ejemplo y consejos me demostró que a pesar de las adversidades podría lograr esta meta.

A mi dulce Jorge, quién creyó en mí, nunca dejó de alentarme a salir adelante y por siempre querer lo mejor para mí.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi asesora la Dra. Gretty Villena Chávez, quién me permitió desarrollar esta investigación en el Laboratorio de Micología y Biotecnología "Marcel Gutiérrez - Correa". Gracias por la confianza, apoyo y consejos. Además de todo el aprendizaje y conocimientos compartidos a lo largo de todo este tiempo.

Un agradecimiento y abrazo hasta el cielo para el Dr. Marcel Gutiérrez - Correa, hombre de ciencia, admirable maestro y fundador del Laboratorio de Micología y Biotecnología. Gracias por su legado.

A la Dra. Ilanit Samolski Klein y a la Dra(c). Yvette Ludeña Hinojosa, por compartir sus conocimientos, consejos y experiencias. En especial, gracias por su amistad.

A FONDECYT por permitir el desarrollo de este trabajo como parte del proyecto "Adquisición de un biorreactor automatizado de escala piloto para la producción biotecnológica de insumos eco-amigables para la industria textil" con contrato N°010-2018-FONDECYT/BM-IADT-AV.

Un infinito agradecimiento a mi familia Silvia, Roger, Silvita y Jorge, por su apoyo incondicional, amor y comprensión. Asimismo, por creer en mí, respetar y valorar mi trabajo.

A cada uno de mis compañeros y amigos del LMB, por su amistad, apoyo y motivación para continuar con la tesis.

FINANCIAMIENTO

La presente tesis ha sido desarrollada y financiada en el marco del proyecto “Adquisición de un biorreactor automatizado de escala piloto para la producción biotecnológica de insumos eco-amigables para la industria textil” con contrato N°010-2018-FONDECYT/BM-IADT-AV.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. OBJETIVO GENERAL.....	3
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. COLORANTES.....	4
2.1.1. Definición y clasificación	4
2.1.2. Fuentes de colorantes naturales	5
2.1.3. Colorantes de origen fúngico.....	8
2.2. MICOTOXINAS	14
2.2.1. Ocratoxina.....	15
2.3. SISTEMAS DE FERMENTACIÓN	17
2.3.1. Fermentación en sumergido.....	17
2.3.2. Fermentación por adhesión a superficies.....	19
2.4. ESPECTROSCOPIA DE UV-VISIBLE.....	21
2.5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR SEMICUANTITATIVA (RT-PCR).....	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN.....	24
3.2. MATERIALES CONSUMIBLES	24
3.3. MICROORGANISMOS	27
3.4. MEDIOS DE CULTIVO	28
3.4.1. Medio PDA (Potato Dextrose Agar)	28
3.4.2. Medio caldo Czapek-Dox Modificado.....	28

3.4.3.	Medio caldo Czapek-Dox Modificado 7X.....	28
3.5.	SISTEMAS DE FERMENTACIÓN	29
3.5.1.	Fermentación en sumergido (FS)	29
3.5.2.	Fermentación en biopelícula (FB).....	30
3.5.3.	Fermentación en estado sólido (FES)	32
3.6.	EXTRACCIÓN DE COLORANTES	34
3.6.1.	Extracción de colorantes en FS y FB	34
3.6.2.	Extracción de colorantes en FES	34
3.7.	DETERMINACIÓN DE BIOMASA.....	35
3.7.1.	Determinación de biomasa en FS y FB.....	35
3.7.2.	Determinación de biomasa en FES	35
3.8.	ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO DE LOS COLORANTES PRODUCIDO.....	37
3.8.1.	Determinación de la concentración y rendimiento de producción de colorante.....	37
3.9.	ANÁLISIS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GENES DE OCRATOXINA.....	38
3.9.1.	Extracción y purificación de ADN	38
3.9.2.	Cebadores.....	39
3.9.3.	Amplificación de genes de <i>pks</i> para ocratoxina usando PCR convencional.....	40
3.10.	ANÁLISIS PARA LA EXPRESIÓN DE GENES DE OCRATOXINA MEDIANTE PCR SEMICUANTITATIVA (RT-PCR).....	41
3.10.1.	Recuperación de la biomasa en FS y FB	41
3.10.2.	Recuperación de la biomasa en FES	42
3.10.3.	Extracción y purificación de ARN de cultivos en FS, FB y FES	43
3.10.4.	Síntesis de ADN complementario (ADNc)	45
3.10.5.	PCR Semicuantitativa (RT-PCR).....	45

3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS	47
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	48
4.1. CURVAS DE PRODUCTIVIDAD DE COLORANTES	48
4.2. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE COLORANTES EN MEDIO CZAPEK DURANTE 10 DÍAS.....	53
4.3. COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE COLORANTES EN LAS 5 CEPAS A LOS 7 DÍAS.....	69
4.4. ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE COLORANTES A LOS 7 DÍAS	78
4.5. IDENTIFICACIÓN DE GENES DE OCRATOXINA.....	87
4.6. PCR SEMI CUANTITATIVA USANDO ADN _c (RT-PCR)	91
V. CONCLUSIONES.....	94
VI. RECOMENDACIONES	95
VII. BIBLIOGRAFÍA	96
VIII. ANEXOS	116

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Colorantes alimentarios autorizados de origen natural y sus fuentes principales	7
Tabla 2: Especies de <i>Talaromyces/Penicillium</i> productoras de colorantes, colorantes identificados y fórmulas propuestas.	11
Tabla 3: Colores absorbidos y colores observados dentro del espectro UV-Visible.....	22
Tabla 4: Especies del cepario del Laboratorio de Micología y Biotecnología utilizadas en este trabajo	27
Tabla 5: Cebadores utilizados para la amplificación y posterior secuenciamiento.....	40
Tabla 6: Reactivos para el master mix de una PCR a 20 µL de volumen final de reacción	40
Tabla 7: Condiciones de amplificación para una PCR	41
Tabla 8: Reactivos para el master mix de una PCR semicuantitativa a 20 µL de volumen final de reacción.....	46
Tabla 9: Condiciones de amplificación para una PCR semicuantitativa	46
Tabla 10: Resultados del alineamiento con BLAST X del secuenciamiento de las amplificaciones de genes de biosíntesis de ocratoxina A de la cepa <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP37 utilizando cebadores KA F/R y KAOTAF/R	89
Tabla 11: Resultados del alineamiento con BLAST X del secuenciamiento de las amplificaciones de genes de biosíntesis de ocratoxina A de la cepa <i>Talaromyces brunneus</i> LMB-HP43 utilizando cebadores KA F/R y KAOTAF/R	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ejemplos de familias químicas de colorantes de origen fúngico	9
Figura 2: Estructura de algunos colorantes de los géneros <i>Penicillium</i> y <i>Talaromyces</i>	14
Figura 3: Vía biosintética propuesta de ocratoxina (OTA), que incluye metabolitos intermedios y enzimas catalíticas.	16
Figura 4: Curva de productividad de colorantes (UC/L/hora) de <i>Talaromyces brunneus</i> LMB-HP43 en fermentación sumergida (FS), biopelícula (FB) y en fermentación en estado sólido (FES) con medio Czapek.	49
Figura 5: Curva de productividad de colorantes (UC/L/hora) de <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP37 en fermentación sumergido (FS), biopelícula (FB) y fermentación en estado sólido (FES) con medio Czapek.	50
Figura 6: Curva de productividad de colorantes (UC/L/hora) de <i>Penicillium maximae</i> LMB-HP33 en fermentación sumergida (FS), biopelícula (FB) y fermentación en estado sólido (FES) con medio Czapek	51
Figura 7: Curva de productividad de colorantes (UC/L/hora) de <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP19 en fermentación sumergida (FS), biopelícula (FB) y fermentación en estado sólido (FES) con medio Czapek.	52
Figura 8: Curva de productividad de colorantes (UC/L/horas) de <i>Talaromyces wortmannii</i> LMB-HP14 en fermentación sumergida (FS), biopelícula (FB) y fermentación en estado sólido (FES) con medio Czapek.	52
Figura 9: Producción de colorante por la cepa <i>Talaromyces brunneus</i> LMB-HP43 en fermentación sumergido durante 10 días.	54
Figura 10: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa <i>Talaromyces brunneus</i> LMB-HP43 en fermentación sumergido durante 10 días.	54
Figura 11: Producción de colorante por la cepa <i>Talaromyces brunneus</i> LMB-HP43 en fermentación por biopelícula durante 10 días.	55
Figura 12: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa <i>Talaromyces brunneus</i> LMB-HP43 en fermentación por biopelícula durante 10 días.	55

Figura 13: Producción de colorante por la cepa <i>Talaromyces brunneus</i> LMB-HP43 en fermentación por estado sólido durante 10 días.	56
Figura 14: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa <i>Talaromyces brunneus</i> LMB-HP43 en fermentación por estado sólido durante 10 días.	56
Figura 15: Producción de colorante por la cepa <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP37 en fermentación en sumergido durante 10 días.	57
Figura 16: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP37 en fermentación sumergido durante 10 días.	57
Figura 17: Producción de colorante por la cepa <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP37 en fermentación por biopelícula durante 10 días.	58
Figura 18: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP37 en fermentación por biopelícula durante 10 días.	58
Figura 19: Producción de colorante por la cepa <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP37 en fermentación por estado sólido durante 10 días.	59
Figura 20: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP37 en fermentación por estado sólido durante 10 días.	59
Figura 21: Producción de colorante por la cepa <i>Penicillium maximae</i> LMB-HP33 en fermentación sumergido durante 10 días.	60
Figura 22: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa <i>Penicillium maximae</i> LMB-HP33 en fermentación en sumergido durante 10 días.	60
Figura 23: Producción de colorante por la cepa <i>Penicillium maximae</i> LMB-HP33 en fermentación por biopelícula durante 10 días.	61
Figura 24: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa <i>Penicillium maximae</i> LMB-HP33 en fermentación por biopelícula durante 10 días.	61
Figura 25: Producción de colorante por la cepa <i>Penicillium maximae</i> LMB-HP33 en fermentación por estado sólido durante 10 días.	62

Figura 26: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa <i>Penicillium maximae</i> LMB-HP33 en fermentación en sumergido durante 10 días.	62
Figura 27: Producción de colorante por la cepa <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP19 en fermentación en sumergido durante 10 días.	63
Figura 28: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP19 en fermentación en sumergido durante 10 días.	63
Figura 29: Producción de colorante por la cepa <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP19 en fermentación por biopelícula durante 10 días.	64
Figura 30: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP19 en fermentación por biopelícula durante 10 días.	64
Figura 31: Producción de colorante por la cepa <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP19 en fermentación por estado sólido durante 10 días.	65
Figura 32: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP19 en fermentación por estado sólido durante 10 días.	65
Figura 33: Producción de colorante por la cepa <i>Talaromyces wortmannii</i> LMB-HP14 en fermentación sumergido durante 10 días.	66
Figura 34: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa <i>Talaromyces wortmannii</i> LMB-HP14 en fermentación sumergido durante 10 días.	66
Figura 35: Producción de colorante por la cepa <i>Talaromyces wortmannii</i> LMB-HP14 en fermentación por biopelícula durante 10 días.	67
Figura 36: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa <i>Talaromyces wortmannii</i> LMB-HP14 en fermentación por biopelícula durante 10 días.	67
Figura 37: Producción de colorante por la cepa <i>Talaromyces wortmannii</i> LMB-HP14 en fermentación por estado sólido durante 10 días.	68
Figura 38: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa <i>Talaromyces wortmannii</i> LMB-HP14 en fermentación por estado sólido durante 10 días.	68

Figura 39: Comparación de la producción de colorantes con base en el rendimiento UC/g biomasa entre <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP37, <i>Talaromyces brunneus</i> LMB-HP43, <i>Penicillium maximae</i> LMB-HP33, <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP19 y <i>Talaromyces wortmannii</i> LMB-HP14 a los 7 días, en fermentación en sumergido y fermentación por adhesión a superficies: biopelícula y estado sólido con caldo Czapek.	70
Figura 40: Producción de colorantes por <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP37 en fermentación en sumergido durante 7 días.	78
Figura 41: Producción de colorantes por <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP37 en fermentación por biopelícula durante 7 días.	78
Figura 42: Producción de colorantes por <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP37 en fermentación en estado sólido durante 7 días.	79
Figura 43: Producción de colorantes por <i>Talaromyces brunneus</i> LMB-HP43 en fermentación en sumergido durante 7 días.	79
Figura 44: Producción de colorantes por <i>Talaromyces brunneus</i> LMB-HP43 en fermentación por biopelícula durante 7 días.	80
Figura 45: Producción de colorantes por <i>Talaromyces brunneus</i> LMB-HP43 en fermentación en estado sólido durante 7 días.	80
Figura 46: Producción de colorantes por <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP19 en fermentación en sumergido durante 7 días.	81
Figura 47: Producción de colorantes por <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP19 en fermentación por biopelícula durante 7 días.	81
Figura 48: Producción de colorantes por <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP19 en fermentación en estado sólido durante 7 días.	82
Figura 49: Producción de colorantes por <i>Penicillium maximae</i> LMB-HP33 en fermentación en sumergido durante 7 días.	82
Figura 50: Producción de colorantes por <i>Penicillium maximae</i> LMB-HP33 en fermentación por biopelícula durante 7 días.	83
Figura 51: Producción de colorantes por <i>Penicillium maximae</i> LMB-HP33 en fermentación en estado sólido durante 7 días.	83
Figura 52: Producción de colorantes por <i>Talaromyces wortmannii</i> LMB-HP14 en fermentación en sumergido durante 7 días.	84
Figura 53: Producción de colorantes por <i>Talaromyces wortmannii</i> LMB-HP14 en fermentación por biopelícula durante 7 días.	84

Figura 54: Producción de colorantes por <i>Talaromyces wortmannii</i> LMB-HP14 en fermentación en estado sólido durante 7 días.....	85
Figura 55: Electroforesis horizontal en gel de agarosa (1 por ciento) de productos de PCR convencional para la detección de genes de biosíntesis de ocratoxina, usando los cebadores degenerados KA y KAOTA.	88
Figura 56: Electroforesis horizontal en gel de agarosa (1 por ciento) de productos de RT-PCR semicuantitativa de la cepa <i>Talaromyces brunneus</i> LMB-HP43.....	91
Figura 57: Electroforesis horizontal en gel de agarosa (1por ciento) de productos de RT-PCR semicuantitativa de la cepa <i>Talaromyces brunneus</i> LMB-HP43.....	92
Figura 58: Electroforesis horizontal en gel de agarosa (1por ciento) de productos de RT-PCR semicuantitativa de la cepa <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP37.....	92
Figura 59: Electroforesis horizontal en gel de agarosa (1por ciento) de productos de RT-PCR semicuantitativa de la cepa <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP37.....	93

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Cuantificación de biomasa de las cinco cepas por peso seco en FB y FS	115
Anexo 2: Curva estándar de BSA para cuantificación de proteínas por método de Lowry para <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP37.....	116
Anexo 3: Curva estándar de proteína intracelular (mg/ml) vs biomasa seca (g) para <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP37	116
Anexo 4: Curva estándar de BSA para cuantificación de proteínas por método de Lowry para <i>Talaromyces brunneus</i> LMB-HP43	117
Anexo 5: Curva estándar de proteína intracelular (mg/ml) vs biomasa seca (g) para <i>Talaromyces brunneus</i> LMB-HP43	117
Anexo 6: Curva estándar de BSA para cuantificación de proteínas por método de Lowry para <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP19	118
Anexo 7: Curva estándar de proteína intracelular (mg/ml) vs biomasa seca (g) para <i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP19	118
Anexo 8: Curva estándar de BSA para cuantificación de proteínas por método de Lowry para <i>Penicillium maximae</i> LMB-HP33	119
Anexo 9: Curva estándar de proteína intracelular (mg/ml) vs biomasa seca (g) para <i>Penicillium maximae</i> LMB-HP33	119
Anexo 10: Curva estándar de BSA para cuantificación de proteínas por método de Lowry para <i>Talaromyces wortmannii</i> LMB-HP14	120
Anexo 11: Curva estándar de proteína intracelular (mg/ml) vs biomasa seca (g) para <i>Talaromyces wortmannii</i> LMB-HP14	120
Anexo 12: Pruebas estadísticas para confirmar los supuestos en R	121
Anexo 13: Prueba de Friedman para el análisis de los tres sistemas de fermentación	122
Anexo 14: Prueba de Kruskal Wallis para el análisis de las cinco cepas	123

RESUMEN

Se comparó la producción de colorantes de cinco hongos filamentosos (*Penicillium mallochii* LMB-HP19, *Penicillium maximae* LMB-HP33, *Penicillium mallochii* LMB-HP37, *Talaromyces brunneus* LMB-HP43 y *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14) en dos sistemas de fermentación: Sumergida (FS) y por Adhesión a Superficies (FAS), utilizando medio Czapek. En el sistema FAS se incluyó la Fermentación en Estado Sólido (FES) y Fermentación en Biopelículas (FB), utilizando soportes inertes (perlita de horticultura y tela de poliéster, respectivamente). Los rendimientos de producción de colorantes se calcularon mediante espectrofotometría UV-Visible, considerando las unidades de colorante (UC) producidas con respecto a la formación de biomasa (g). Se observaron diferencias en la producción de colorantes en los tres sistemas de fermentación. De las cinco cepas evaluadas, LMB-HP37 y LMB-HP43 presentaron los mayores rendimientos de producción en los tres sistemas de fermentación, mostrando el sistema FES los valores más altos de rendimiento (633.75 UC/g biomasa y 1019.92 UC/g biomasa, respectivamente), mientras que en las cepas LMB-HP33 y LMB-HP14 no se detectó producción de colorantes en este sistema. Sin embargo, LMB-HP14 alcanzó los valores más altos en el sistema FB. Los resultados obtenidos evidenciaron que existe un efecto significativo del tipo de sistema de fermentación y de la cepa fúngica sobre la producción de colorantes. Adicionalmente, debido a la estrecha relación que existe entre las vías de síntesis de policétidos para la producción de colorantes y micotoxinas, se evaluó la expresión de genes *pks* en LMB-HP37 y LMB-HP43. Si bien se detectó la presencia de un gen *pks* en el genoma de ambas cepas, mediante RT-PCR semicuantitativo solo se detectó la expresión de este gen en la cepa LMB-HP37 en FS. No obstante, este resultado no necesariamente supondría la producción de ocratoxinas por parte de esta cepa, puesto que el gen *pks* no es exclusivo de la vía de síntesis de estos compuestos.

Palabras clave: Fermentación en estado sólido, biopelículas, colorantes, ocratoxinas y genes *pks*.

ABSTRACT

The production of colourants from five filamentous fungi (*Penicillium mallochii* LMB-HP19, *Penicillium maximae* LMB-HP33, *Penicillium mallochii* LMB-HP37, *Talaromyces brunneus* LMB-HP43 and *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14) was compared in two fermentation systems: Submerged (SF) and by Surface Adhesion (SAF), using Czapek medium. Solid-State Fermentation (SSF) and Biofilm Fermentation (BF) were included in the SAF system, using inert supports (horticultural perlite and polyester cloth, respectively). The colourant production yields were calculated by UV-Visible spectrophotometry, considering the colourant units (CU) produced regarding biomass formation (g). Differences in the production of colourants were observed in the three fermentation systems. From these five strains, LMB-HP37 and LMB-HP43 presented the highest production yields in the three fermentation systems, showing the SSF system the highest yield values (633.75 CU/g biomass and 1019.92 CU/g biomass, respectively). While in the strains LMB-HP33 and LMB-HP14 no colourant production was detected in this system. However, LMB-HP14 achieved the highest values in the BF system. The results showed that exists a significant effect from the type of fermentation system and the fungal strain in the colourant production. In addition, due to the close relationship between the polyketide pathways for colourants and mycotoxins production, the expression of *pks* genes was evaluated in LMB-HP37 and LMB-HP43. Although the presence of a *pks* gene was detected in the genome of both strains, only the expression of this gene in the LMB-HP37 strain in SF was detected by semi-quantitative RT-PCR. Nevertheless, this result would not necessarily imply the production of ochratoxins by this strain, since the *pks* gene is not unique to the synthesis pathway of these compounds.

Keywords: Solid state fermentation, biofilm, colourants, ochratoxin and *pks* genes.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la demanda de colorantes naturales se encuentra en aumento debido a los inconvenientes que implica el uso de colorantes sintéticos en las industrias alimentaria, cosmética, textil y farmacéutica, tales como efectos nocivos a la salud y al medio ambiente (Poorniammal, Prabhu, Dufossé, & Kannan, 2021).

Para de Oliveira, Hirai, Simas, Pereira, & Santos-Ebinuma, (2020), la demanda de colorantes naturales registrará una tasa de crecimiento anual compuesta de 5.4 por ciento en términos de ingresos, alcanzando los 1620 millones dólares en 2023. Mientras que para Meruvu & dos Santos, (2021), proyecta que el mercado mundial de carotenoides alcanzará los 2000 millones de dólares para 2026, y se prevé que el mercado internacional de riboflavina aumente en un 4,8 por ciento durante los próximos 5 años, con estimaciones que oscilan entre 7790 y 10,300 millones de dólares durante 2019-2024. En tal sentido, es evidente que la producción global de colorantes naturales aumentará a nivel global en el largo plazo.

En la industria alimentaria la producción de colorantes naturales continúa creciendo en todo el mundo, debido principalmente a la concientización en nutrición y salud y a la demanda de ingredientes naturales por parte de los consumidores (Poorniammal et al, 2021; Kalra, Conlan, Goel, 2020). En tanto, en la industria textil, los problemas de toxicidad y la creciente preferencia por los productos naturales llegaron al sector de la confección y muchas marcas se están adaptando para cumplir con las expectativas de productos sostenibles (Pimenta, Gomes, Cardoso & Takahashi, 2021).

Las plantas y los microorganismos son las principales fuentes de colorantes naturales. No obstante, a diferencia de los microorganismos, los colorantes producidos por las plantas son inestables en presencia de luz, calor, cambios de pH, presentan baja solubilidad en agua y muchas de estas plantas son estacionales, por lo que no están disponibles todo el año (Kumar, Shankar Vishwakarma, Singh, & Kumar, 2015).

Además, el uso de plantas a gran escala puede llevar a la pérdida de valiosas especies. Por estas razones, el proceso puede no ser considerado viable (Downham & Collins, 2000).

Por su parte, la producción de colorantes por microorganismos presentan ventajas sobre las plantas en disponibilidad durante todo el año, estabilidad, altos rendimientos, fácil procesamiento (Tuli, Chaudhary, & Beniwal, 2015) independencia de las condiciones climáticas (Narsing Rao, Xiao, & Li, 2017), tecnología de cultivo (Kumar et al., 2015) y menores costos de producción (Sen, Barrow, & Deshmukh, 2019). Entre las moléculas producidas están los carotenoides, melaninas, flavinas, quinonas y más específicamente, monascinas, violaceína (Tuli et al., 2015), ficocianina, azafilonas e índigo (Dufossé, 2016; Vendruscolo et al., 2016). Estas también se pueden utilizar como aditivos, antioxidantes, intensificadores de color e ingredientes de alimentos funcionales (Sen et al., 2019).

Los hongos filamentosos son conocidos por producir una extraordinaria gama de colorantes, actualmente considerados seguros y económicos. Hongos como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Monascus*, *Trichoderma* y *Laetiporus* producen quinonas, antraquinonas, rubropunctamina, rubropunctatina, ankaflavina, monascina, β -caroteno y muchos otros colorantes responsables de varios colores, rojo, morado, amarillo, marrón, naranja y verde. Estos son productos fermentativos, por lo que se ven afectados por la temperatura, el pH, la fuente de carbono, la aireación y el tipo de fermentación (fermentación en estado sólido o sumergida) (Mukherjee, Mishra, & Deshmukh, 2017).

El cultivo en biorreactores tiene el potencial para competir con cualquier otro sistema de producción y potencialmente puede proporcionar cantidades ilimitadas de colorantes (Mapari, Meyer, Thrane, & Frisvad, 2009), además de explorar las ventajas de los diferentes sistemas de fermentación (fermentación en estado sólido, sumergido y biopelícula) en busca de la mayor eficiencia en la producción de colorantes.

1.1. OBJETIVO GENERAL

Utilizar dos sistemas de fermentación: fermentación sumergida y fermentación por adhesión a superficies (biopelículas y en estado sólido) para comparar la producción de colorantes con hongos filamentosos.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar la producción de colorantes mediante espectrofotometría UV- VIS a partir de cinco cepas de hongos filamentosos empleando los sistemas de fermentación en sumergido y fermentación por adhesión a superficies: biopelículas y fermentación en estado sólido.
- Analizar la expresión de genes posiblemente asociados a la síntesis de colorantes, con énfasis en producción de micotoxinas mediante RT-PCR semicuantitativa.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. COLORANTES

2.1.1. Definición y clasificación

Los colorantes son compuestos que imparten color a una sustancia (Rapp, 2009). En la región del espectro visible, el color observado corresponde a las longitudes de onda de luz que transmite, no que absorbe. Así, el color que absorbe es el complementario del color que transmite (García, 2016).

Los colorantes poseen estructuras llamados cromóforos y auxocromos, el primero es un sistema deslocalizado con dobles enlaces conjugados. El cromóforo es una región molecular donde exhibe resonancia de electrones que le permite absorber luz en la región visible de espectro electromagnético. Mientras que, los auxocromos son grupos de átomos responsables de reforzar la acción de un cromóforo, cambiar la longitud de onda y controlar la solubilidad del colorante (Venant, Nambela, & Mgani, 2019). De este modo, un cambio de la máxima absorción a una mayor longitud de onda se llama cambio batocrómico, entre tanto, el cambio a una menor longitud de onda se llama cambio hipsocrómico (Räisänen, 2002).

Para el marketing, los colores proveen de una atractiva apariencia a los productos alimenticios, textiles y farmacéuticos (Kumar et al., 2015; Narendrababu & Shishupala, 2017).

De acuerdo con el origen y la legislación, los colorantes pueden ser clasificados en tres categorías (Mapari, Thrane, & Meyer, 2010)

- Natural: son colorantes sintetizados, acumulados o excretados por organismos o producidos por la modificación del material a partir de organismos vivos. Estos son considerados como seguros y saludables para los consumidores.
- Idénticos al natural: Son sustancias orgánicas cuya estructura química es idéntica al principio activo aislado del colorante natural.
- Sintéticos: son colorantes artificiales que no se encuentran en la naturaleza; estos son en su mayoría colorantes azoicos. Los consumidores, sin embargo, perciben únicamente dos clases de colorantes, los naturales y sintéticos.

Los metabolitos secundarios son un grupo extremadamente diverso de productos sintetizados por plantas, hongos, bacterias, algas y animales. En general, estos compuestos no son indispensables para el crecimiento, desarrollo y reproducción del organismo. Sin embargo, pueden otorgarle ventajas ecológicas (Ballester et al., 2015).

Diferentes clases de estos metabolitos son a menudo asociados a un conjunto limitado de especies dentro de un grupo filogenético (Agostini-Costa, Vieira, Bizzo, Silveira, & Gimenes, 2012) y pueden constituir la fuente de importantes compuestos bioactivos (Agostini-Costa et al., 2012; Ballester et al., 2015) entre estos se encuentran los colorantes naturales.

2.1.2. Fuentes de colorantes naturales

Las fuentes de colorantes naturales provienen de los animales, minerales, plantas y microorganismos (Bechtold, 2009; Caro et al., 2012; Lebeau et al., 2017; Rodríguez-Amaya, 2016; Sen et al., 2019)(Tabla 1).

Los colorantes naturales de origen animal han sido utilizados desde la antigüedad. Especies como *Kermes vermilio* (kermes), *Porphyrophora polonica* (cochinilla polaca), *Porphyrophora hamelii* (cochinilla armenia), *Dactylopius coccus* (cochinilla americana) y *Kerria lacca* (lac, conocida por su nombre antiguo: *Laccifer lacca*), han sido utilizadas por años de las cuales, la cochinilla y la laca son las más utilizadas (Mortensen, 2006). Los mayores ejemplos de colorantes naturales de origen animal son el carmín y la púrpura imperial y se obtienen de la

excreción o de los cuerpos secos de estos (Venant et al., 2019). La púrpura imperial, es un tinte púrpura de alta calidad que proviene de las glándulas hipobranquiales de los caracoles marinos del género *Murex.sp* y son utilizados en la industria textil, sin embargo, el costo de su producción es elevado, para un 1 g de colorante se requiere alrededor de 10 000 moluscos (Marzano, 2013). Situación similar sucede con la cochinilla, que también se utiliza en industria textil y farmacéutica, posee una producción costosa dado que se requiere alrededor de 130000 cochinillas para conseguir un kilogramo de carmín (Cano Lasso, 2011), además, se considera que la técnica no es inocua para el medio ambiente y perturba el ecosistema (Venant et al., 2019).

Por otro lado, los colorantes naturales de origen mineral son obtenidos a partir de sales metálicas inorgánicas y óxidos metálicos. Se pueden obtener colorantes rojos de óxidos de hierro y plomo, colorantes verdes de hidrosilicatos de hierro, magnesio, aluminio y potasio, colorantes azules de azurita, colorantes blancos de carbonato de calcio, plomo y yeso, así como colorantes negros de carbón molido. No obstante, estos colorantes están asociados a efectos nocivos para el ambiente y la salud debido a la presencia de metales pesados como el plomo y el cromo (Yusuf, Shabbir, & Mohammad, 2017).

Los colorantes naturales de origen vegetal se pueden extraer de hojas, flores, frutos, raíz, tallo (Vele Caymayo, 2017), semillas, cortezas y troncos. Estos son muy utilizados en industria textil, alimentaria y farmacéutica (Venant et al., 2019). Entre los colorantes de origen vegetal obtenidos se encuentran los carotenoides, licopeno, antocianinas, curcumina, clorofila, riboflavina, betalaínas, entre otros (Cano Lasso, 2011; Mortensen, 2006). La actual producción de colorantes naturales a partir de plantas presenta ciertas desventajas: está limitado por las irregularidades de las cosechas, las normas de uso de la tierra, la intensiva mano de obra, la competencia por la misma tierra de cultivo con la producción de alimento (Gmoser, Ferreira, Lundin, Taherzadeh, & Lennartsson, 2018) y dependencia de la alimentación externa, potencialmente resultando en variaciones de lote a lote del colorante extraído. Además, estos son, en la mayoría de sus casos, mezclas de composición voluble que depende de la variedad y de las condiciones climáticas y, por lo tanto, no es fácil de caracterizar con respecto a la pureza y los contaminantes (Mapari et al., 2010). A todo lo anterior, se incluye la existencia de una gran variación en estabilidad y funcionalidad de las diferentes clases de colorantes alimentarios naturales (Mortensen, 2006).

Por lo que, la utilización de microorganismos es una alternativa ya que presentan ventajas en términos de producción en comparación con los colorantes similares extraídos de vegetales o animales que presentan inestabilidad, baja solubilidad y variaciones estacionales (General, Prasad, Kim, Vadakedath, & Cho, 2014). Además, al ser microorganismos con una alta velocidad de crecimiento, la producción de colorantes por bioprocesos puede ser más competitivo a nivel de la producción industrial (Panesar et al., 2015). Los microorganismos como bacterias, microalgas y hongos producen colorantes estables como carotenoides, flavonoides, quinonas, riboflavina, prodigiosina (Tuli et al., 2015) y más concretamente monascinas, violaceína, ficocianina o índigo (Yusuf et al., 2017).

Tabla 1: Colorantes alimentarios autorizados de origen natural y sus fuentes principales

Pigments	Sources	Colour range	EU code	Comments
Anthocyanins	Elderberries, black grape skin, black carrots, red cabbage	Pink/red to mauve/blue depending on pH	E163	Colour is pH-dependent, heat-sensitive and subject to oxidation
Betanin	Red beetroots	Pink to red	E162	Heat, light and oxygen-sensitive
Caramel colour	Food-grade carbohydrates	Brown	E150 (A–D)	Commonly used colouring agent
<i>Carbo medicinalis</i>	Plant	Black	E153	From burnt plant material; banned in USA
Carminic acid and carmine	Female cochineal insect from Peru and Equador	Orange to red Pink to red	E120	Price-sensitive
Carotenoids				
β-carotene ^a	Palm oil	Yellow to orange	E160a	Provitamin A activity makes carotenoids favourable from both a nutritional and an aesthetic point of view. They exhibit good pH stability in most foods, are sparingly oil soluble, easily oxidised and have a limited colour range
bixin or norbixin	Seeds from Annatto (<i>Bixa orellana</i>) from South America	Orange	E160b	
capsanthin/capsorubin	Paprika (<i>Capsicum annum L.</i>)	Reddish orange	E160c	
lycopene	Tomato (<i>Lycopersicum esculentum</i>)	Orangish red	E160d	
lutein	Marigold (<i>Tagetas erecta</i>)	Golden yellow	E161b	
canthaxanthin	Salmon, shrimp and flamingos	Orangish pink	E161g	
Chlorophyll	Grass, luceme and nettle	Green to olive	E140	Subject to photo-oxidation
Chlorophyllins (copper complex of chlorophyll)	Grass, luceme and nettle	Bluish green	E141	Not usually claimed as 'natural' on food labels
Curcumin	Plant rhizome (<i>Curcuma longa</i>) from India	Orange-yellow	E100	Must be debittered to avoid its odour and sharp taste
Riboflavin ^a	Semisynthetically using ribose produced by bacterial fermentation	Yellow	E101	Green fluorescence, light-sensitive and bitter taste

^a β-Carotene and riboflavin are also fermentatively produced by the fungi *Blakeslea trispora* and *Ashbya gossypi*, respectively.

FUENTE: Tomado de Mapari et al., (2005).

2.1.3. Colorantes de origen fúngico

Los hongos son grandes productores de metabolitos secundarios y entre estos se encuentran los colorantes utilizados en la industria (Torres et al., 2016; Xin, Pan, Zhang, & Wang, 2019). Según el tipo de compuesto, estos pueden presentar diferentes funciones dentro de la célula, así, los carotenoides pueden ser protectores de una foto-oxidación, la melanina brinda protección en contra del estrés ambiental o la flavina actúa como cofactor en la catálisis enzimática (Mapari et al., 2005).

Para Maldonado & Ibarra, (2005), los hongos ascomicetos y basidiomicetos son conocidos por producir una amplia gama de colores, de los cuales solo 355 especies del reino fungi han sido exploradas para la producción de colorantes. De los cuales para Mapari et al., (2009), los hongos ascomicetos son los más adecuados para la producción biotecnológica, gracias a sus altos rendimientos de producción y fácil cultivo.

Los colorantes naturales fúngicos poseen grandes ventajas; son biodegradables, en su mayoría no son tóxicos, pueden crecer en sustratos de bajo costo (Heo et al., 2018; Lopes et al., 2013), su producción es independiente de las condiciones meteorológicas, amplia gama de colores (Akilandeswari & Pradeep, 2016; Lagashetti, Dufossé, Singh, & Singh, 2019; Lopes et al., 2013), producción a gran escala, alta tasa de crecimiento y rendimiento de producción (Torres et al., 2016), viabilidad de desarrollo de bioprocesos (Tirumale & Wani, 2018) y algunos colorantes pueden ser estables frente a la luz, el calor y el pH (Bouhri et al., 2020). Varios investigadores están apostando por la mejora genética de las cepas, la optimización de los procesos de fermentación para aumentar el rendimiento de la producción de colorantes y la utilización de desechos agroindustriales baratos para reducir el costo de producción (Aruldass, Dufossé, & Ahmad, 2018).

Los hongos pueden producir colorantes del tipo antraquinonas, hidroxiantraquinonas, naftaquinonas, quinonas (Mapari et al., 2010) y también, derivados de los policétidos, llamados azafilonas (Figura 1). Estas últimas vienen siendo utilizadas en la industria farmacéutica, gracias a sus efectos antibióticos, anticancerígenos, antiproliferativos e inmunosupresores (Tirumale & Wani, 2018). Las azafilonas son producidas por hongos pertenecientes a los géneros *Monascus*, *Aspergillus*, *Penicillium* (Dufossé, Fouillaud, Caro,

Mapari, & Sutthiwong, 2014; Mapari et al., 2005; Méndez, Pérez, Montañez, Martínez, & Aguilar, 2011; Velmurugan, Lee, et al., 2010), *Talaromyces* (Frisvad et al., 2013; Zhai et al., 2016), *Paecilomyces* (Cho et al., 2002), *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Emericella* y *Epicoccum* (Tirumale & Wani, 2018).

Monascus sp. es el género más reconocido en términos de producción de colorantes azafilonas, con estructuras moleculares y propiedades químicas similares. Producen colorantes amarillos (ankaflavina y monascina), naranjas (rubropunctatina y monascorubrina) y rojas o púrpuras (rubropunctamina y monascorubramina) (Torres et al., 2016) y experimentan baja solubilidad en agua, termosensibles e inestables en el rango de pH de 2 a 10 (Dufossé, 2019).

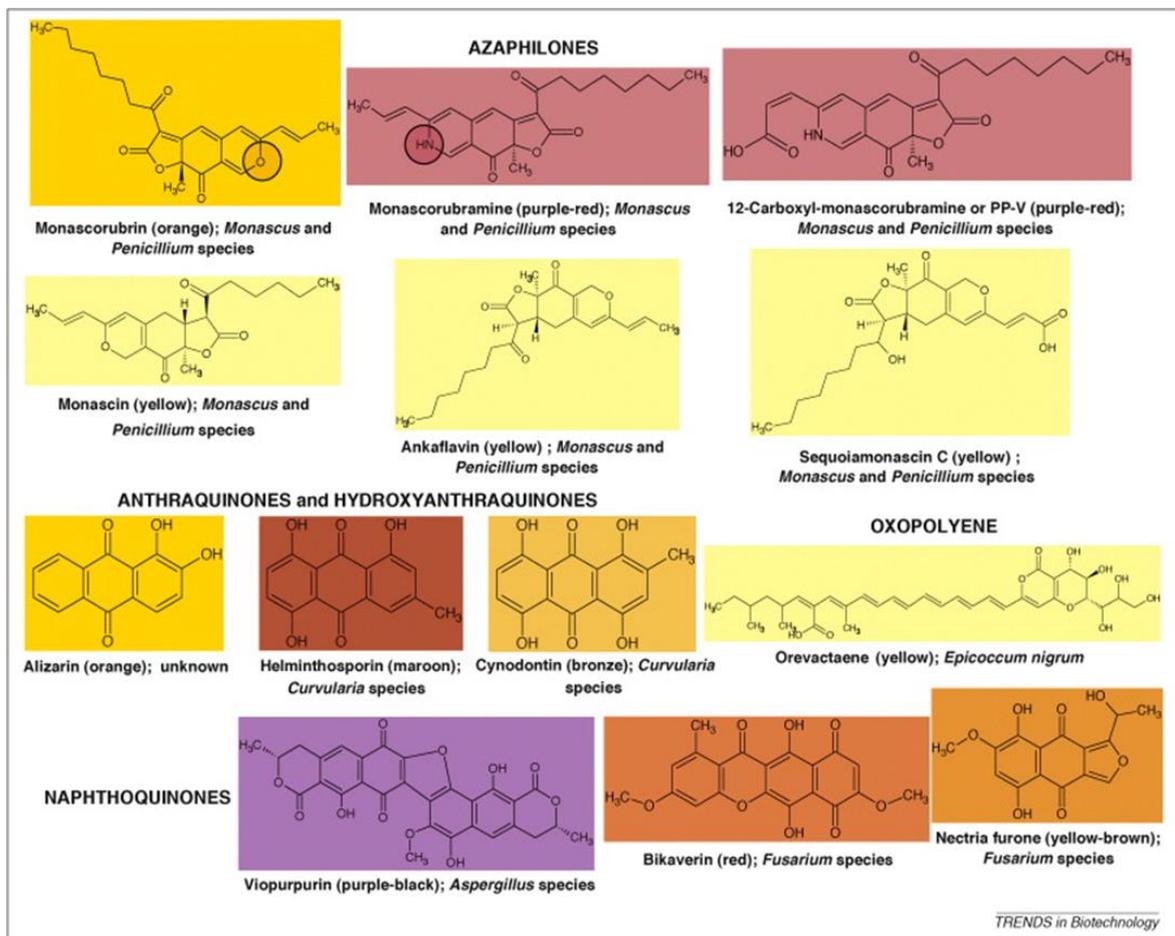


Figura 1: Ejemplos de familias químicas de colorantes de origen fúngico

FUENTE: Tomada de Mapari et al., (2010).

a. Colorantes producidos por cepas de *Talaromyces sp.* y *Penicillium sp.*

Autores como Frisvad et al., (2013); Morales-Oyervides, Oliveira, Sousa-Gallagher, Mendez-Zavala, & Montañez, (2017a); Pandit, Mekala Ramesh, Puttananjaiah, & Dhale, (2019); Zaccarim et al., (2019) han investigado la producción de colorantes en *Talaromyces sp.* y *Penicillium sp.* y actualmente las consideran como fábricas de células para el proceso de producción de colorantes a escala industrial.

Los colorantes producidos por las cepas *Talaromyces sp.* y *Penicillium sp.*, como se puede observar en la tabla 2, incluye a esclerotiorina, bisorbicilinoideas (dihidrotrichodimerol, tetrahydrotrichodimerol), peniazafilonas (A-D), derivados de naftoquinona, talaraconvolutina A, purpactina C, mitorubrininas, purpurogenona, atrovenetina, derivados de aminonaftol, mitorubrinol entre otros (Morales-Oyervides et al., 2020). Las especies de *Talaromyces* producen colorantes amarillos, naranjas y rojos en el micelio (de Oliveira et al., 2020). Se sabe en general que las vías metabólicas se llevan a cabo mediante una serie de reacciones de condensación de unidades de acetil CoA y malonil CoA o mediante la vía de los ácidos grasos (Chen, Feng, Molnár, & Chen, 2019; Woo et al., 2014). Lo que genera una diversidad química en los colorantes; así, el colorante naranja se obtiene del β -cetoácido (a partir de la vía de los ácidos grasos) y esterificación de un cromóforo de policétidos (a partir de la ruta de policétidos); el colorante amarillo se obtiene por reducción del colorante naranja; el colorante rojo se obtiene mediante una reacción de aminación (Chen et al., 2017).

Muchos de los colorantes producidos por *Talaromyces sp.* y *Penicillium sp.* son estructuralmente policétidos, específicamente azafilonas (de Oliveira et al., 2020) (Figura 2). Estas son colorantes con estructuras pirona-quinona con un núcleo bicíclico altamente oxigenado, generalmente conocido como isócrono y un centro cuaternario quiral (Pandit, Puttananjaiah, Serva Peddha, & Dhale, 2019; Tolborg, Ødum, Isbrandt, Larsen, & Workman, 2019).

Como se mencionó anteriormente tanto *Monascus sp.*, *Talaromyces sp.* y *Penicillium sp.* producen colorantes pertenecientes al grupo de las azafilonas, además, es posible encontrar colorantes producidos similares entre estos géneros. No obstante, existen diferencias con respecto a la cantidad, tipo y diversidad de colorantes de azafilona producidos.

Tabla 2: Especies de *Taloromyces/Penicillium* productoras de colorantes, colorantes identificados y fórmulas propuestas.

Strain	Pigment	Proposed formula	Color	Reference
<i>P. carmino-violaceum</i>	Carviolin	$C_{16}H_{12}O_6$	Yellow-red	Hind (1940)
	Carviolacin	$C_{20}H_{16}O_7$	Orange-red	Hind (1940)
<i>P. notatum</i>	Penitricin Acid	$C_{15}H_{17}O_5N$	Yellow	Moyer et al. (1945)
<i>P. islandicum</i>	Trihydroxymethyl-antraquinone	$C_{15}H_{10}O_5$	Dark red	Howard and Raistrick (1949)
<i>P. atrovenetum</i>	Atrovenetin	$C_{19}H_{18}O_6$	Yellow	Raistrick and Stossi (1958)
	Northerquinone	$C_{19}H_{18}O_7$	Red	Raistrick and Stossi (1958)
<i>P. rubrum</i>	Mitorubrin	$C_{21}H_{18}O_7$	Orange-yellow	Büchi et al. (1965)
	Mitorubrinol	$C_{21}H_{18}O_8$	Yellow	Büchi et al. (1965)
<i>P. herquei</i>	Naphthalic anhydride	$C_{21}H_{22}O_9$	Red	Narasimhachari and Vining (1968)
	Phenalenone derivative	$C_{76}H_{64}O_9N_2Zn$	Blue	Robinson et al. (1992)
<i>P. astrosanguineum</i>	Phoenicin	$C_{14}H_{10}O_6$	Red	Christensen et al. (1999)
<i>P. simplicissimum</i>	Xanthopocin	$C_{30}H_{22}O_{14}$	Yellow	Igarashi et al. (2000)
<i>P. pinophilum</i>	Monascorubrin	$C_{23}H_{26}O_5$	Orange	Mapari et al. (2008a, 2008b)
<i>P. melinii</i>	Atrovenetin	$C_{19}H_{18}O_6$	Yellow	Teixeira et al. (2012)
<i>P. sclerotiorum</i>	Sclerotiorin	$C_{21}H_{23}ClO_5$	Yellow-orange	Celestino et al. (2014)
<i>P. mallochii</i>	Sclerotiorin	$C_{21}H_{23}O_5Cl$	Orange-yellow	dos Santos et al. (2019)
<i>P. flavigenum</i>	dihydrotrichodimerol	$C_{28}H_{34}O_9$	Yellow	da Costa Souza et al. (2016); Liu et al. (2005)
	Tetrahydrotrichodimerol	$C_{28}H_{36}O_8$	Yellow	Liu et al. (2005)
<i>P. verruculosum</i>	Monascin	$C_{21}H_{26}O_5$	Yellow	Shah et al. (2014)
	Monascorubrin	$C_{23}H_{26}O_5$	Orange	Shah et al. (2014)
<i>P. minioluteum</i>	Monascorubin	$C_{23}H_{27}NaO_6$	Red	Ring et al. (2018); Zahan et al. (2020)
<i>P. regulosum</i>	8-aminonaphthol	$C_{16}H_{16}NO$	Brown	Atalla et al. (2011)
	4,4'-bis-(1-naphthol-8-amino-3,6-disulfonic acid)	$C_{26}H_{16}N_2O_{14}S_4$	Brown	Atalla et al. (2011)
	4-(1-naphthol-8-amino)-4'-(1'-naphthol-8'-amino-3',6'-disulfonic acid)	$C_{26}H_{16}N_2O_8S_2$	Reddish brown	Atalla et al. (2011)
<i>P. italicum</i>	8-aminonaphthol	$C_{16}H_{16}NO$	Brown	Atalla et al. (2011)
	4-(1-naphthol-8-amino)-4'-(1'-naphthol-8'-amino-6'-sulfonic acid)	$C_{20}H_{16}N_2O_5S$	Reddish brown	Atalla et al. (2011)
	4,4'-bis-(1-naphthol-8-amino-3,6-disulfonic acid)	$C_{26}H_{16}N_2O_{14}S_4$	Brown	Atalla et al. (2011)
<i>P. aculeatum</i>	Monascorubrin	$C_{23}H_{26}O_5$	Orange	Mapari et al. (2008a, 2008b)
	Xanthomonasin A	$C_{21}H_{24}O_7$	Yellow	Mapari et al. (2008a, 2008b)
<i>P. marneffi</i>	Ankaflavin	$C_{23}H_{30}O_5$	Yellow	Afshari et al. (2015); Krishnamurthy et al. (2018)
	Herquinone-like	-	Red	Bhardwaj et al. (2007)
<i>P. chrysogenum</i>	Monascorubrin	$C_{23}H_{26}O_5$	Orange	Woo et al. (2014)
	Ankaflavin	$C_{23}H_{30}O_5$	Yellow	Woo et al. (2014)
	8-aminonaphthol	$C_{16}H_{16}NO$	Brown	Atalla et al. (2011)
<i>P. oxalicum</i>	4,4'-bis-(1-naphthol-8-amino-3,6-disulfonic acid)	$C_{26}H_{16}N_2O_{14}S_4$	Brown	Atalla et al. (2011)
	4-(1-naphthol-8-amino)-4'-(1'-naphthol-8'-amino-3',6'-disulfonic acid)	$C_{26}H_{16}N_2O_8S_2$	Reddish brown	Atalla et al. (2011)
	Xantocillin	$C_{18}H_{12}N_2O_2$	Yellow	Lopes et al. (2013)
<i>P. oxalicum</i>	Chrysogine	$C_{10}H_{10}N_2O_2$	Yellow	Viggiano et al. (2018)
	Arpink red™	$C_{22}H_{13}O_4(OH)_1$	Red	Sardaryan (2002)
	8-aminonaphthol	$C_{16}H_{16}NO$	Brown	Atalla et al. (2011)
	4-(1-naphthol-8-amino)-4'-(1'-naphthol-8'-amino-6'-sulfonic acid)	$C_{20}H_{16}N_2O_5S$	Reddish brown	Atalla et al. (2011)
<i>P. purpurogenum</i>	4,4'-bis-(1-naphthol-8-amino-3,6-disulfonic acid)	$C_{26}H_{16}N_2O_{14}S_4$	Brown	Atalla et al. (2011)
	4-(1-naphthol-8-amino)-4'-(1'-naphthol-8'-amino-3',6'-disulfonic acid)	$C_{26}H_{16}N_2O_8S_2$	Reddish brown	Atalla et al. (2011)
	Purpurogenone	$C_{29}H_{20}O_{11}$	Crimson	Roberts and Thompson (1971a)
	Deoxypurpurogenone	$C_{29}H_{20}O_{10}$	Red	Roberts and Thompson (1971b)
	Purpactin C	$C_{23}H_{24}O_7$	Yellow	Nishida et al. (1991)
	PP-V	$C_{23}H_{26}NO_6$	Violet	Arai et al. (2015); Kojima et al. (2016); Ogihara et al. (2000a)
	PP-R	$C_{22}H_{31}NO_5$	Purple-Red	Ogihara et al. (2001)
	PP-O	$C_{23}H_{24}O_7$	Orange	Arai et al. (2015); Ogihara and Oishi (2002)
	PP-Y	$C_{23}H_{26}O_5$	Yellow	Arai et al. (2015); Ogihara and Oishi (2002)
	PP-Z	$C_{25}H_{30}NO_6$	Red	Jin et al. (2018)
<i>Penicillium</i> sp.	N-glutarylmonascorubramine	$C_{28}H_{23}NO_8$	Red	Mapari et al. (2009b)
	N-glutaryl rubropunctamine	$C_{26}H_{29}NO_8$	Red	Mapari et al. (2009b)
	Peniazaphilone-A	$C_{25}H_{29}NO_5$	Red	Zhang et al. (2016)
	Peniazaphilone-B	$C_{27}H_{30}NO_6$	Red	Zhang et al. (2016)
	Peniazaphilone-C	$C_{23}H_{29}NO_5$	Red	Zhang et al. (2016)
	Peniazaphilone-D	$C_{23}H_{28}NO_4$	Red	Zhang et al. (2016)
<i>T. convolutus</i>	Talaroconvolutin A	$C_{32}H_{41}NO_3$	Yellow	Suzuki et al. (2000)
<i>T. ruber</i>	N-Glutaryl rubropunctamine	$C_{26}H_{29}NO_8$	Red	Yilmaz et al. (2012)
	Mitorubrin	$C_{21}H_{18}O_7$	Orange-yellow	Yilmaz et al. (2012)
<i>T. amestolkiae</i>	N-Glutaryl rubropunctamine	$C_{26}H_{29}NO_8$	Red	Yilmaz et al. (2012)
	Mitorubrinic acid	$C_{21}H_{16}O_9$	Yellow	Yilmaz et al. (2012)

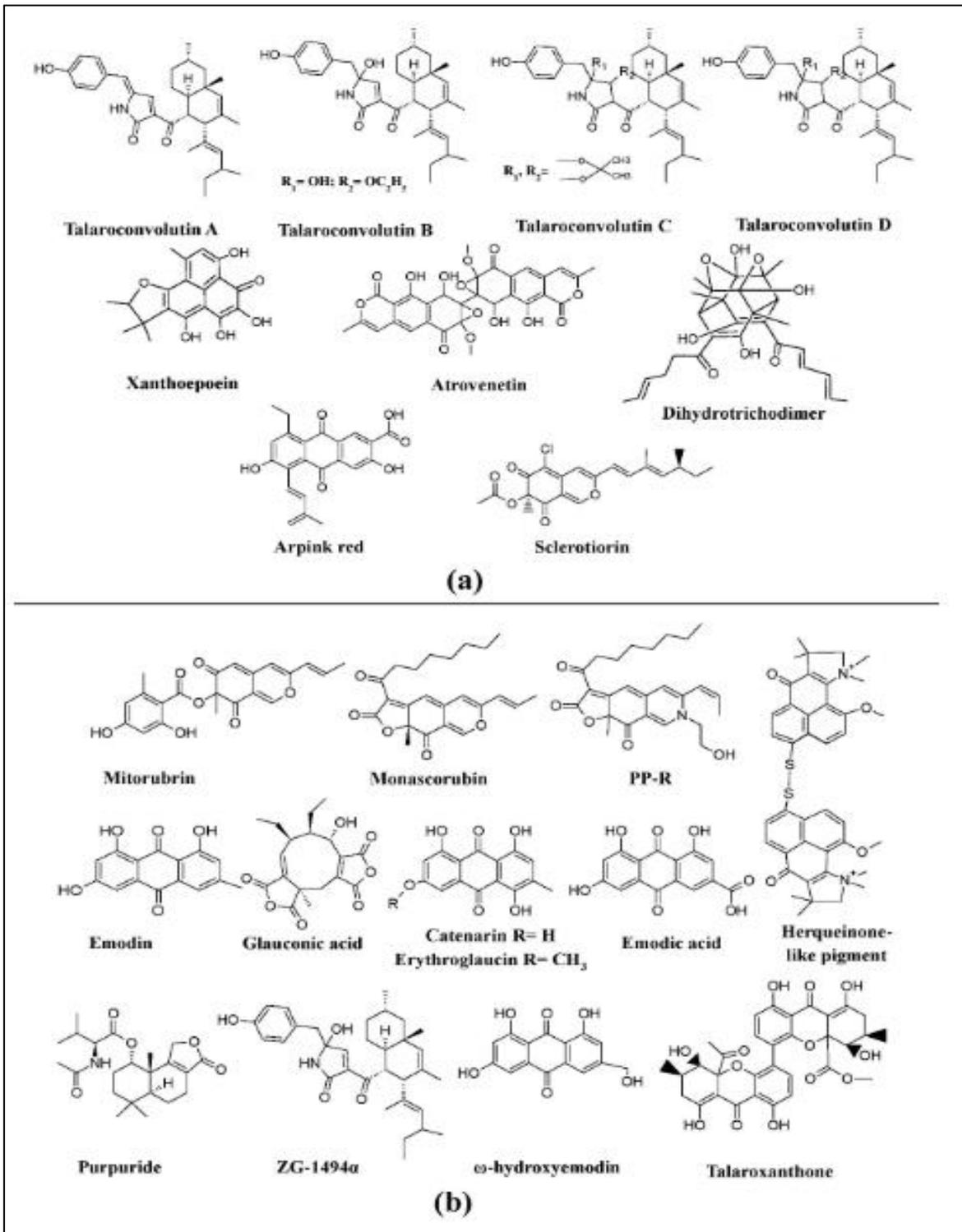
Continuación

Strain	Pigment	Proposed formula	Color	Reference
<i>T. atrovirens</i>	Mitorubrin	C ₂₁ H ₁₈ O ₇	Orange-yellow	Frisvad et al. (2013)
	Mitorubrinol	C ₂₁ H ₁₈ O ₈	Yellow	Frisvad et al. (2013)
	Monascorubramine	C ₂₃ H ₂₇ NO ₄	Red	Frisvad et al. (2013)
	Monascorubrin	C ₂₁ H ₁₈ O ₇	Orange	Frisvad et al. (2013)
	N-glutarylmonascorubramine	C ₂₈ H ₃₃ NO ₈	Red	Frisvad et al. (2013)
	PP-O	C ₂₃ H ₂₄ O ₇	Red-orange	Frisvad et al. (2013)
	PP-R	C ₂₅ H ₃₁ NO ₅	Purple-red	Frisvad et al. (2013)
	Purpurogenone	C ₂₉ H ₂₀ O ₁₁	Crimson	Frisvad et al. (2013)
	Atrosins	-	Red	Isbrandt et al. (2020); Tolborg et al. (2020)
	<i>T. albobiverticillius</i>	Mitorubrin	C ₂₁ H ₁₈ O ₇	Orange-yellow
Mitorubrinic acid		C ₂₁ H ₁₆ O ₉	Yellow	Frisvad et al. (2013)
Mitorubrinol		C ₂₁ H ₁₈ O ₈	Yellow	Frisvad et al. (2013)
Monascin		C ₂₁ H ₂₆ O ₅	Yellow	Frisvad et al. (2013)
Monascorubramine		C ₂₃ H ₂₇ NO ₄	Red	Frisvad et al. (2013)
Monascorubrin		C ₂₁ H ₁₈ O ₇	Orange	Frisvad et al. (2013)
PP-R		C ₂₅ H ₃₁ NO ₅	Purple-red	Frisvad et al. (2013)
Rubropunctatin		C ₂₁ H ₂₂ O ₅	Orange	Frisvad et al. (2013)
PP-O		C ₂₃ H ₂₄ O ₇	Red-orange	Venkatachalam et al. (2018b, 2019)
N-glutaryl rubropunctamine		C ₂₆ H ₂₉ NO ₈	Red	Venkatachalam et al. (2018b, 2019)
N-threonine monascorubramine		C ₂₇ H ₃₃ NO ₇	Purple-Red	Venkatachalam et al. (2018b, 2019)
N - GABA-PP-V		C ₂₇ H ₃₁ NO ₈	Red	Venkatachalam et al. (2018b, 2019)
PP-O		C ₂₃ H ₂₄ O ₇	Red-Orange	Pandit et al. (2020)
PP-R		C ₂₅ H ₃₁ NO ₅	Purple-Red	Pandit et al. (2019, 2020)
<i>T. purpureogenus</i>		Arginine-monascorubrin	C ₂₉ H ₃₈ N ₄ O	Red
	Purpurquinone-A	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	Yellowish	Pandit et al. (2020)
	Ankaflavin	C ₂₃ H ₃₀ O ₅	Yellow	Pandit et al. (2020)
	Purpactin-C	C ₂₃ H ₂₄ O ₇	Yellow	Pandit et al. (2020)
	Peniazaphilone-A	C ₂₅ H ₂₉ NO ₅	Red	Pandit et al. (2019)
	N-Glutaryl rubropunctamine	C ₂₆ H ₂₉ NO ₈	Red	Yilmaz et al. (2012)
	Luteoskyrin	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₂	Yellow	Yilmaz et al. (2012)
	Mitorubrin	C ₂₁ H ₁₈ O ₇	Orange-yellow	Yilmaz et al. (2012)
	Mitorubrinic acid	C ₂₁ H ₁₆ O ₉	Yellow	Yilmaz et al. (2012)
	Mitorubrinol	C ₂₁ H ₁₈ O ₈	Yellow	Yilmaz et al. (2012)
	Talaroxanthone	C ₃₂ H ₃₀ O ₁₄	Yellow	Koolen et al. (2013)
	Talanaphthoquinone A	C ₁₅ H ₁₅ O ₅	Yellow	Liu et al. (2020)
	Talanaphthoquinone B	C ₁₅ H ₁₅ O ₇	Red	Liu et al. (2020)

FUENTE: Tomada de Morales-Oyervides et al., (2020).

Todo esto puede deberse a que estos géneros comparten un grupo de genes en común responsable de la producción de colorantes, pero, la organización y el contenido de los genes pueden variar con respecto a la evolución (Chen, Feng, Molnár, & Chen, 2019).

Los colorantes de las especies de *Penicillium* y *Talaromyces* poseen un gran potencial para la industria, sin embargo, para esto es importante conocer la estabilidad de los colorantes en diferentes condiciones de procesamiento. Para que los costos de producción sean razonables y el proceso sea factible de escalar, es necesario desarrollar altos rendimientos de producción de colorantes (Morales-Oyervides et al., 2020), por lo que es vital elegir el mejor sistema de fermentación y las condiciones óptimas de producción.



Continuación

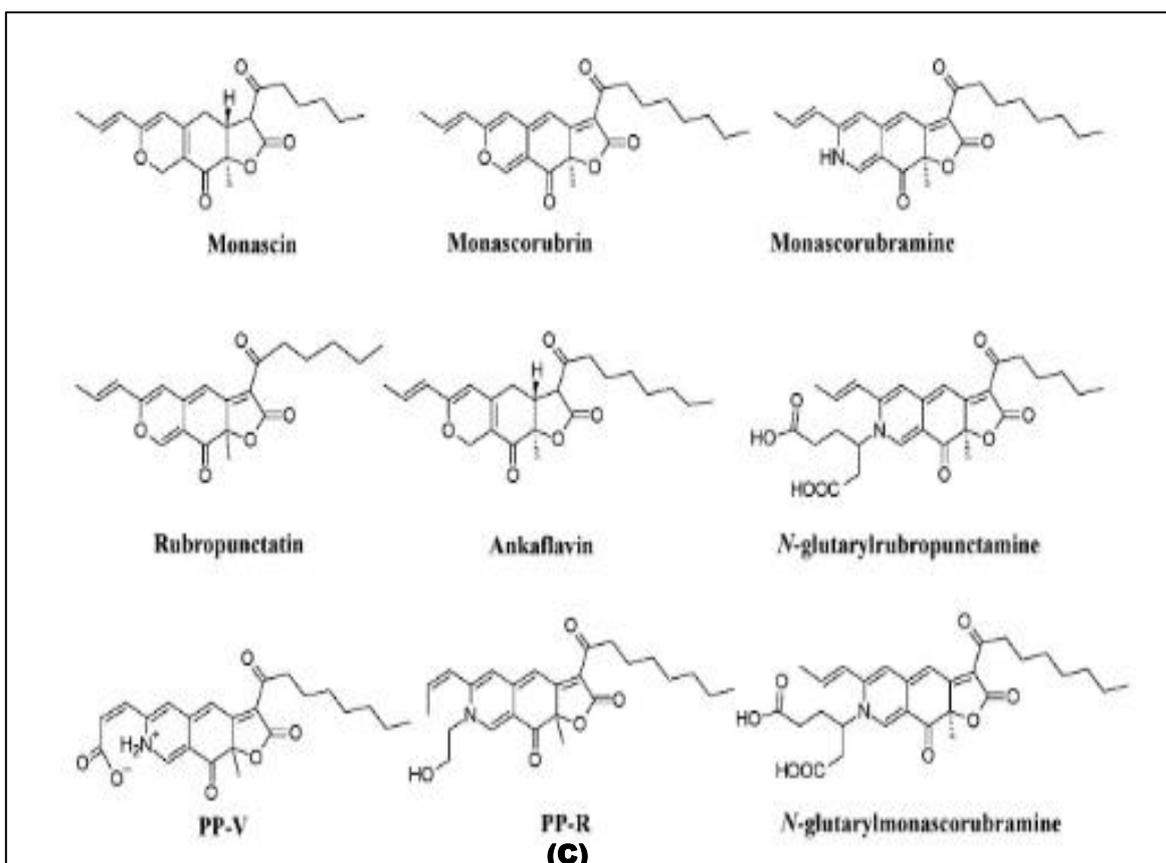


Figura 2: Estructura de algunos colorantes de los géneros *Penicillium* y *Talaromyces*.

(a) Diferentes colorantes producidos por especies de *Penicillium*. (b) Colorantes producidos por especies de *Talaromyces*. (c) Colorantes de azafilona similares a los de *Monascus* de las especies *Penicillium* y *Talaromyces*.

FUENTE: Tomada de Lagashetti et al., (2019).

2.2. MICOTOXINAS

Los hongos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Talaromyces* son ampliamente conocidos por la producción de una amplia variedad de metabolitos secundarios, como la obtención de nuevas enzimas y muchos otros extrolitos dirigidos a una amplia gama de aplicaciones, sin embargo, también pueden producir compuestos nocivos, como las micotoxinas (Perrone & Susca, 2017; Teixeira et al., 2012), limitando así, el uso de una especie en particular en biotecnología (Frisvad et al., 2013).

Hasta la fecha se han identificado alrededor de 300 a 400 tipos diferentes de micotoxinas y entre las más conocidas se encuentran la aflatoxina, ocratoxina, patulina, zearalenona y tricotecenos (Fadlalla et al., 2020; Tam, Tsang, Lau, & Woo, 2015). Entre los efectos tóxicos se pueden encontrar nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, carcinogenicidad, teratogenicidad, genotoxicidad e inmunosupresión (Banani et al., 2016; Wang et al., 2016).

Se ha visto que algunas de las cepas productoras de colorantes, como *Penicillium marneffeii*, comparten la misma ruta biosintética que la micotoxina citrinina (Woo et al., 2014). También especies de *Talaromyces* que secretan grandes cantidades de colorantes rojos como *Talaromyces purpurogenus* pueden producir micotoxinas tales como rubratoxina A y B y luteosquirina (Dufossé, 2019; Frisvad et al., 2013) o *Talaromyces funiculosus*, especie no reportada como productora de colorantes pero sí de patulina (Barral et al., 2020).

2.2.1. Ocratoxina

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina de bajo peso molecular producida por varias especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, en este último género se ha encontrado como principales productores de OTA a *Penicillium verrucosum* y *Penicillium nordicum* (Perrone & Susca, 2017). Sin embargo, existen otras especies reportadas de *Penicillium*, como *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium glycyrrhizicola* y *Penicillium polonicum*, que pudieron sintetizar OTA en pasto fresco o seco y otras especies como *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium olsonii* y *Penicillium oxalicum* que produjeron niveles muy bajos de OTA, menos de 0,1 ppb, aun así, solo *Penicillium verrucosum* y *Penicillium nordicum* están 100 por ciento confirmadas como productoras de OTA.

La ocratoxina se ha detectado en diferentes tipos de alimentos en todo el mundo como cereales, especias, pan, cerveza, frijoles, café, nueces, cacao, uva y productos de uva como el vino, debido a su estabilidad química frente a los tratamientos térmicos y la hidrólisis. Además, se ha encontrado que en la cadena alimenticia existe la transferencia y acumulación de toxinas en los animales, lo que puede generar la aparición de OTA en productos animales como la leche y carne. (Gil-Serna, Vázquez, González-Jaén, & Patiño, 2018; Zhang et al., 2017). Esta toxina presenta efectos nefrotóxicos, neurotóxicos, propiedades teratogénicas e inmunotóxicas tanto para los animales como para los seres humanos y se ha clasificado como un posible

carcinógeno humano por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (Gil-Serna, et al., 2018).

Para Gallo & Perrone, (2017) la vía de biosíntesis de ocratoxina A (OTA) aún no se ha aclarado por completo. Sin embargo, el estudio de Wang et al., (2018) lograron identificar una ruta biosintética consenso que inicia con un policétido sintasa (PKS), OtaA, que utiliza acetil coenzima A (acetil-CoA) y malonil-CoA para sintetizar 7-metilmelleína, esta se oxida a OTβ por la citocromo P450 monooxigenasa (OtaC). OTβ y L-β-fenilalanina se combinan mediante una péptido sintetasa no ribosómica (NRPS), OtaB, para formar un enlace amida y sintetizar OTB. Finalmente, OTB es clorado por una halogenasa (OtaD) a OTA (ver figura 3).

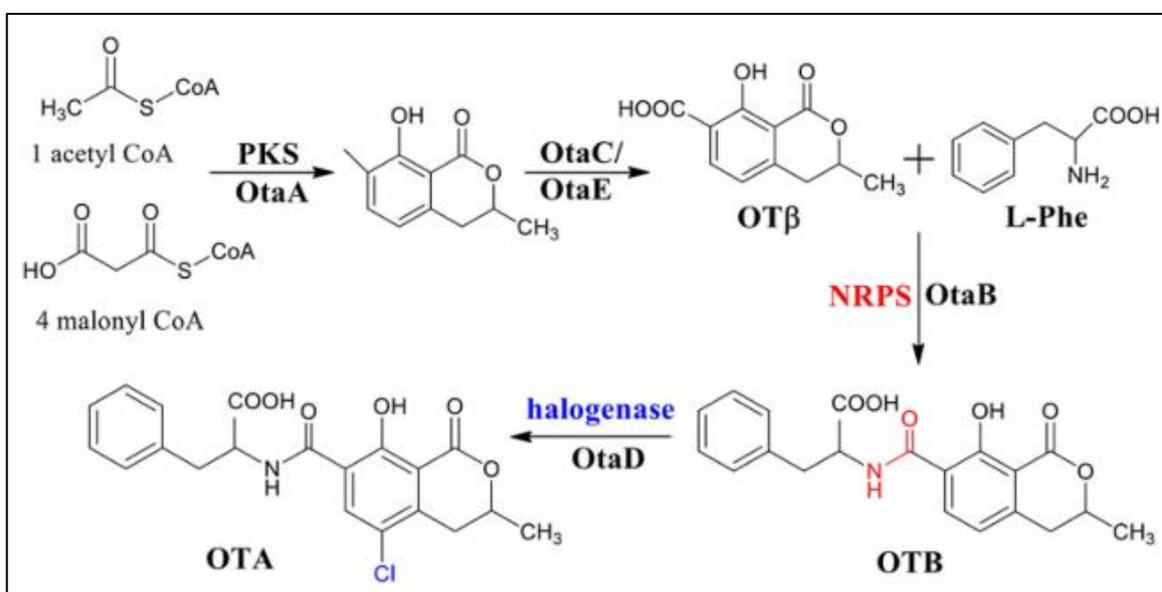


Figura 3: Vía biosintética propuesta de ocratoxina (OTA), que incluye metabolitos intermedios y enzimas catalíticas.

FUENTE: Tomada de Wang et al., (2018).

Los policétidos sintasas (PKS) son complejos enzimáticos o enzimas multidominios, que contiene dominios aciltransferasa (AT), ceto-sintasa (KS), tioesterasa (TE) y dominios opcionales (Wang et al., 2020). Los genes que codifican estos PKS se encuentran muy próximos entre sí y cerca a estos loci hay genes adicionales que codifican enzimas modificadoras. Tanto los genes *pks* junto con estos genes de enzimas modificadoras forman clusters de genes biosintéticos (Tam et al., 2015).

Los métodos más utilizados, reproducibles y precisos que se aplican para identificar ocratoxinas, son los métodos de análisis instrumental, análisis químicos e inmunoensayos. En el método instrumental se incluye la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS / MS). Dentro del método de análisis químico esta la cromatografía en capa fina (TLC), mientras que los anticuerpos monoclonales en inmunoensayos (Fadlalla et al., 2020; M. Zhang et al., 2017).

2.3. SISTEMAS DE FERMENTACIÓN

Los metabolitos secundarios y enzimas producidas por hongos pueden variar según los sistemas de fermentación empleados (Gamarra, Villena, & Gutiérrez-Correa, 2010; Gutiérrez-Correa, Ludena, Ramage, & Villena, 2012). De hecho, estos hongos productores pueden crecer de diferentes formas: desde micelio libre y pellets en fase líquida, hasta pellet y micelio a conidias en una interfaz sólido-aire (Musoni, Destain, Thonart, Bahama, & Delvigne, 2015). Así, la clasificación de los sistemas de fermentación depende de las propiedades biológicas, ya sea de adhesión a soportes bióticos o abióticos, señalización microbiana entre otros (Gutiérrez-Correa & Villena, 2010). En este contexto, Musoni et al., (2015) consideran que existen tres tipos de sistemas: fermentación en sumergido (FS), fermentación en estado sólido (FES) y fermentación en biopelícula (FB), aunque estos dos últimos para Gutiérrez-Correa & Villena, (2010) están dentro de un grupo llamado fermentación por adhesión a superficies.

2.3.1. Fermentación en sumergido

La fermentación a escala industrial para la producción de metabolitos secundarios más utilizada es el sistema en sumergido, debido a la familiaridad y sencillez del proceso (Robinson, Singh, & Nigam, 2001). Este tipo de fermentación es 100 por ciento líquido, posiblemente, con algunos sólidos en suspensión y las células se encuentran suspendidas en el medio rico nutricionalmente (Gutiérrez-Correa & Villena, 2010; Singhania, Sukumaran, Patel, Larroche, & Pandey, 2010). Para Subramaniyam & Vimala, (2012), la FS utiliza sustratos líquidos que fluyen libremente, como melazas y caldos y los metabolitos bioactivos producidos se secretan extracelularmente en el caldo de fermentación. En FS se presentan con mayor frecuencia dos tipos de morfologías, es decir, micelio libre (con diferentes grados de ramificación) y pellets (Musoni et al., 2015).

Las ventajas del uso de esta técnica incluyen un buen control de los parámetros ambientales, gracias al uso de dispositivos de control y métodos sencillos de seguimiento durante la producción (Venkatachalam, Shum-Chéong-Sing, & Dufossé, 2020), costos laborales relativamente bajos, requisitos reducidos de espacio y de escalado en comparación con la fermentación en estado sólido (Singhania et al., 2010). En caso de llevar la producción a escala, el modelamiento matemático es sencillo (Gutiérrez-Correa & Villena, 2010). La purificación de los productos es más fácil, principalmente en la extracción de metabolitos secundarios (Subramaniyam & Vimala, 2012).

Sin embargo, la fermentación en sumergido requiere el consumo de grandes cantidades de agua, energía y espacio (Jain, Morlok, & Henson, 2013). Además de esto, los procesos en FS a pesar que pueden ser mejor controlados que en otros tipos de sistemas, son muy sensibles a varios factores abióticos, como el pH del medio, la temperatura, la velocidad de agitación (difusión de gas) y tiempo de fermentación. Estos factores antes mencionados crean una fuerte presión sobre el patrón de crecimiento de hongos (Venkatachalam et al., 2020). Al final de la fermentación, en comparación a FES, las concentraciones de productos son bajas (Hongzhang, 2013).

A pesar de esto, ha sido muy utilizada en la producción de colorantes con *Penicillium purpurogenum* GH-2 (Méndez et al., 2011), un nuevo *Penicillium purpurogenum* (Santos-Ebinuma, Roberto, Teixeira, & Pessoa, 2014), *Monascus purpureus* (Wang, Ju, & Zhou, 2005), *Paecilomyces sinclairii* (Cho et al., 2002), *Talaromyces* sp. (Morales-Oyervides, Oliveira, & Sousa-Gallagher, 2017) y *Penicillium sclerotiorum* FS50 (Xin et al., 2019).

2.3.2. Fermentación por adhesión a superficies

a. Fermentación en biopelícula

Otra alternativa prometedora para la producción de metabolitos y que combina las ventajas de la fermentación en sólido, en términos de biología y desarrollo de hongos y usa la tecnología de la fermentación en sumergido, en términos de control del proceso, es la fermentación en biopelícula (Musoni et al., 2015). Ambos tipos de sistemas FB y FES son variantes de la categoría llamada fermentación por adhesión a superficie, pero difieren en la cantidad de agua del sistema (Gutiérrez-Correa et al., 2012). Para Musoni et al., (2015) la formación de biopelículas está representada por el desarrollo de micelio sobre un soporte inerte, como acero inoxidable, vidrio o material de teflón integrado en un reactor adaptado.

En su hábitat natural los microorganismos tienden a crecer adheridos a superficies formando biopelículas, conformando una comunidad compleja y organizada, razón por la cual son más productivos y resistentes a los productos químicos antimicrobianos (Gamarra et al., 2010). La biopelícula microbiana posee una arquitectura 3D compleja, caracterizada por huecos intersticiales y canales de agua con células generalmente encapsuladas dentro de una matriz extracelular (Stoodley, Sauer, Davies, & Costerton, 2002) y posee una variedad de funciones vitales, tales como transporte de material, conversión de energía, reconocimiento celular, entrega de información y regulación metabólica (Hongzhang, 2013).

Es importante resaltar que la adhesión celular a las superficies desencadena una expresión diferencial de genes que promueve cambios en la fisiología de las células dentro de la biopelícula (Fanning & Mitchell, 2012; Gamarra et al., 2010; Villena, Venkatesh, Yamazaki, Tsuyumu, & Gutiérrez-Correa, 2009).

Si bien no existen muchos reportes de producción de colorantes por biopelículas, un estudio previo reportó que, usando un soporte sólido en combinación con las condiciones de un cultivo sumergido, se obtuvo altos rendimientos de producción de colorantes en *Penicillium sp.* (Mapari et al., 2010).

b. Fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido se ha definido como un bioproceso heterogéneo de tres fases (fase sólida, líquida y gaseosa) llevado a cabo en ausencia o casi ausencia de agua libre, en donde se puede desarrollar micelio en la superficie y en el interior de un sustrato sólido (Costa, Treichel, Kumar, & Pandey, 2018; Musoni et al., 2015). Es importante que el sustrato posea suficiente humedad para dar soporte al crecimiento y a la actividad metabólica del microorganismo. Este puede ser la fuente de carbono o podría ser un material inerte para apoyar el crecimiento de los microorganismos en él, previamente embebida en una solución o caldo con nutrientes (Costa et al., 2018). Así pues, investigaciones que emplearon grano de arroz (Rosenblitt, Agosin, Delgado, & Pérez-Correa, 2000) maíz y bagazo de caña de azúcar (Raja Rajeswari, Ponnusami, & Sugumaran, 2014) y residuos de uva (Velmurugan et al., 2011) como sustrato sólido y a su vez fuente de carbono, revelaron un alto rendimiento de colorantes, además, de ser más económico que otros sistemas (Sindhu, Pandey, & Binod, 2015), asimismo con un menor requerimiento de energía (Gutiérrez-Correa & Villena, 2010).

Es atractiva la perspectiva acerca de la fermentación en estado sólido porque imita el entorno natural y las condiciones en la que la mayoría de los microorganismos habitan (Jain et al., 2013). Aparentemente, esta es la principal razón por la que los microorganismos se desempeñan bien y dan altos rendimientos de producción en FES con respecto a FS (Costa et al., 2018).

Los principales factores que afectan el crecimiento y la actividad microbiana en FES incluyen la selección adecuada de un microorganismo y sustrato. De este último, se debe tener en cuenta el pretratamiento, el tamaño de partícula (espacio entre partículas y área de superficie), el contenido de humedad, la actividad de agua (a_w), tipo y tamaño del inóculo (Krishania et al., 2018).

Se han encontrado en las últimas décadas grandes ventajas biotecnológicas del uso de esta técnica de fermentación; tecnología rentable, menor represión catabólica, de requerimiento de agua, de requisitos de energía, de producción de aguas residuales (con menor riesgo de contaminación bacteriana), mayor estabilidad del producto final (Costa et al., 2018) y mayor producción del metabolito. De este último se ha visto un alto rendimiento en producción de

colorante gracias a que el hongo penetra dentro del sustrato sólido a manera de anclaje, permitiendo que se libere el colorante a la superficie, a diferencia de FS en donde el colorante presenta baja solubilidad y se acumula en el micelio (Rajeswari et al., 2014).

Por otro lado, las desventajas son en gran parte al momento de escalonar la producción. Problemática con el modelamiento matemático a escala (Gutiérrez-Correa & Villena, 2010) y estandarización (Jain et al., 2013). Dificultad en la transferencia de calor metabólico generado durante el metabolismo de la célula, en el control de pH, temperatura, en la transferencia de oxígeno, período de cultivo, mantenimiento de la homogeneidad (Krishania et al., 2018; Sindhu et al., 2015), en la transferencia de masa, dificultad de cuantificar la biomasa, en la aireación constante, en gradientes de humedad. La cinética y las curvas de crecimiento aún son complejas para determinar (Manan & Webb, 2017).

2.4. ESPECTROSCOPIA DE UV-VISIBLE

La espectroscopía UV-Visible es muy utilizada para la determinación de compuestos en los campos de la agricultura, industria alimentaria, farmacéutica y medio ambiente. En una técnica simple, sensible, confiable e incluso de bajo costo (respecto a otras técnicas como la resonancia magnética nuclear o cromatografía líquida de alta resolución) (Passos & Saraiva, 2019). Además, brinda información sobre la naturaleza de los enlaces químicos de una muestra, los cuales están delimitado por transiciones electrónicas, así como su relación con otros compuestos o grupos funcionales (Rosas, 2017). Adicionalmente a las ventajas antes mencionadas, este método permite un análisis e identificación rápida de compuestos incluso dentro de mezclas relativamente complejas, sin necesidad de algún tipo de tratamiento a la muestra a analizar, ni la purificación individual de compuestos (Borello & Domenici, 2019; Sen et al., 2019)(Borello & Domenici, 2019).

Es por esto que la gran mayoría de los autores estiman la producción de colorantes mediante este método (de Oliveira et al., 2020; Gmoser et al., 2018; Heo et al., 2018; Hernández, Galleguillos, Thibaut, & Müller, 2019; M. A. Manan, 2017; Morales-Oyervides et al., 2017b; Narendrababu & Shishupala, 2017; N. Pandey, Jain, Pandey, & Tamta, 2018; Woo et al., 2014; Yilmaz et al., 2016). Para determinar esto, se utiliza la absorbancia máxima a una longitud de onda dentro de la región del UV-Visible, de 390nm a 720 nm (Borello & Domenici, 2019).

Sin embargo, se debe tener en cuenta que el valor de la absorbancia puede estar influenciada por diferentes factores como las características del espectrofotómetro, pH, fotodegradación de las moléculas, presencia de interferencias, compuestos fluorescentes en la muestra, interacciones entre el analito y el disolvente (Tissue, 2012).

Como se observa en la tabla 3, representa el color que absorbe un analito a determinada longitud de onda y el color que se observa es el complementario del que absorbió (García, 2016).

Tabla 3: Colores absorbidos y colores observados dentro del espectro UV-Visible

λ	<i>Color absorbido</i>	<i>Color observado</i>
380 - 450	violeta	amarillo-verdoso
450 - 495	azul	amarillo
495 - 570	verde	violeta o rojo violeta
570 - 590	naranja	azul
590 - 620	amarillo	azul-verdoso
620 - 750	rojo	verde-azuloso

FUENTE: Tomada de García, (2016)

2.5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR SEMICUANTITATIVA (RT-PCR)

La RT-PCR se fundamenta en la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mientras que esta última es una herramienta eficiente para la evaluación cualitativa de ácidos nucleicos, la primera se ha aplicado ampliamente a la medición cuantitativa de ARN mensajeros de baja abundancia (Chen, Segal, & Mash, 1999) o para el análisis de muestras disponibles en cantidades limitadas.

Mayormente cuando se requiere un análisis de ARN, un estudio cualitativo no es suficiente para brindar una respuesta satisfactoria, más bien, lo que se busca es la cuantificación de los transcritos y la detección de cualquier variación en sus niveles de expresión génica en diferentes condiciones experimentales (Marone, Mozzetti, Ritis, Pierelli, & Scambia, 2001). Para Freeman, Walker, & Vrana, (1999), la elección de un protocolo cuantitativo o

semicuantitativo para determinar los niveles de expresión génica en RT-PCR, se deben considerar 4 parámetros:

- Viabilidad en el laboratorio.
- Estudiar diferentes marcadores en la misma muestra.
- Disponibilidad de muestra.
- Precisión requerida para la aplicación específica, es decir, medir el número de moléculas de ARN o variaciones aproximadas en los niveles de ARN.

La RT-PCR utiliza ADNc sintetizado por retrotranscriptasa a partir de ARN mensajero y genes normalizadores (*housekeeping genes*). Es un método altamente sensible y específico, sin embargo, debido a la naturaleza exponencial de la amplificación por PCR, la cuantificación por RT-PCR puede ser problemática, dando posibles estimaciones falsas de la abundancia de los mensajes diana (Chen et al., 1999).

Para el análisis cuantitativo de las bandas, estas se expresan como unidades de absorbancia relativa. La relación entre la muestra de ARN que se va a determinar y el housekeeping elegido, se calcula para normalizar las variaciones iniciales en la concentración de la muestra y como control de la eficacia de la reacción (Marone et al., 2001).

A pesar de la mayor precisión de las técnicas desarrolladas recientemente, como la PCR en tiempo real, los métodos de PCR semicuantitativos todavía se utilizan ampliamente y son apropiados para muchos propósitos. La razón principal de su popular uso es que el método semicuantitativo proporciona una combinación de PCR tradicional y cuantificación de transcripciones a un costo relativamente bajo. Se confirmó igualmente que la PCR semicuantitativa también genera resultados como los métodos más avanzados. (Martiansyah, Amanah, & Putranto, 2018).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

Laboratorio de Micología y Biotecnología. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias.
Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.2. MATERIALES CONSUMIBLES

- Algodón
- Asa de Khole
- Cámara de Newbauer
- Cinta de embalaje
- Gorra
- Guantes
- Ligas
- Mascarilla
- Matraces de 250 ml
- Microtubos de 1.5 ml
- Microtubos de 2.0 ml
- Papel filtro de paso rápido
- Perlitas para horticultura (Agrolite, Schultz Co., St. Louis, USA)
- Pipetas graduadas de 10 y 5 ml
- Placas Petri de vidrio de 10cm x15cm
- Probetas de 1000 ml, 100 ml y 50 ml
- Puntas de micropipeta de 1-10 μ l, 10-200 μ l, 100-1000 μ l
- Tela de poliéster
- Tubos de centrifuga de 15 ml y 50 ml
- Tubos de ensayo 25 x 250 mm

- Tubos tapa rosca de 70 ml /25x200mm
- Vasos de precipitado
- Viales de 5 ml

Soluciones

- Ácido clorhídrico 0.2 M
- Etanol al 70° y al 95°
- Hidróxido de sodio 0.2 M
- Tetraciclina 10 mg/ml
- Tween 80 al 0.1 por ciento
- Peróxido de hidrógeno 3 por ciento
- Lejía 1 por ciento

Reactivos para bioquímica

- Reactivos para la cuantificación de proteínas a través del método de Lowry.

Reactivos de Biología Molecular

- Agarosa
- Agua libre de nucleasas
- Buffer de corrida de ADN para electroforesis
- Buffer TAE 50X
- Buffer TAE 1X
- Mix GelRed® (Thermo Scientific)
- Dinucleótidos trifosfatados (dNTPS)
- Oligo(dT)₁₅ (Promega)
- Kit RNA Direct-zol(ZYMO RESEARCH)
- Kit de PCR KAPA Taq de Sigma-Aldrich
- Reverse Transcription System Promega©
- Enzima transcriptasa inversa M-MLV RT (*Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*) (Promega)
- Marcador de corrida 50 pb, 100 pb y 1kb
- Tampón de reacción PCR (Promega)
- Cebadores

Equipos

- Agitador mecánico orbital
- Autoclave
- Balanza analítica
- Balanza de platillo
- Baño María
- Cámara de flujo laminar
- Cámara fotográfica digital
- Cámara húmeda
- Cámara y peines de electroforesis
- Centrífuga
- Congeladora de -20°C
- Congeladora de -80°C
- Desionizador de agua
- Equipo de Baño María
- Espectrofotómetro UV-Visible
- Horno de secado
- Horno microondas
- Incubadora de 28°C
- Microcentrífuga
- NanoDrop 2000(Thermo Scientific)
- Potenciómetro
- Purificador de H₂O
- Refrigeradora -80°C, -20°C, 4°C
- Agitador orbital
- Termociclador S1000TM–BIORAD
- Transiluminador
- Vórtex
- Micropipetas

3.3. MICROORGANISMOS

Se utilizaron cinco cepas de hongos filamentosos, pertenecientes al cepario del Laboratorio de Micología y Biotecnología (tabla 4), aislados previamente por investigaciones anteriores, de suelo del bosque primario Macuya en Pucallpa- Ucayali y seleccionados por su capacidad de producir colorantes.

Estas cepas fueron mantenidas durante tres meses en tubos con cuñas de medio PDA, para esto, se transfirió en cada tubo fragmentos de cultivos previamente sembrados en placas Petri. Se incubaron a 28°C por 7 días y luego conservados en la refrigeradora a 4°C. Cada una de las cinco cepas fueron conservadas en tubos de criopreservación a largo plazo a -80°C en glicerol estéril al 30 por ciento (V/V), a partir de una suspensión de esporas.

Tabla 4: Especies del cepario del Laboratorio de Micología y Biotecnología utilizadas en este trabajo

ESPECIES	CÓDIGO DEL CEPARIO
<i>Penicillium mallochii</i>	LMB-HP37
<i>Talaromyces brunneus</i>	LMB-HP43
<i>Penicillium mallochii</i>	LMB-HP19
<i>Penicillium maximae</i>	LMB-HP33
<i>Talaromyces wortmannii</i>	LMB-HP14

FUENTE: Elaboración propia

3.4. MEDIOS DE CULTIVO

3.4.1. Medio PDA (Potato Dextrose Agar)

Para un litro de medio: 15g de Agar, 10g de dextrosa, 200g de papa y agua destilada c.s.p. Se cortó la papa en trozos, se colocó dentro de un vaso de precipitado con agua destilada y se llevó al microondas hasta cocinarla. Se filtró con la ayuda de un embudo y algodón grueso, se agregó y mezcló los demás reactivos. Luego se licuó el agar en el microondas y se enrasó al volumen final.

Se dispuso de este agar en tubos para el mantenimiento de las cepas y en una capa fina en matraces de 250 ml para la cosecha de esporas a los 7 días. Se autoclavó a 121°C y 15 psi de presión durante 20 minutos.

3.4.2. Medio caldo Czapek-Dox Modificado

Para un litro de medio: 2g NaNO₃, 1g K₂HPO₄, 0.5 g KCl, 0.5 g MgSO₄·7H₂O, 0.001g FeSO₄·7H₂O, 0.01g/L, 20g sacarosa, pH 6.5. En un vaso de precipitado con agua destilada se agregó cada sal hasta disolver, luego se agregó la sacarosa hasta disolver. Se midió el pH a 6.5 (se rectificó con NaOH 0.1 N o HCL 0.1N según corresponda) y se enrasó a 1 L. Se autoclavó a 121°C y 15 psi de presión durante 20 minutos.

Este caldo se utilizó como medio de cultivo para la producción de colorantes en los dos sistemas de fermentación: fermentación en sumergido y biopelícula

3.4.3. Medio caldo Czapek-Dox Modificado 7X

Se empleó el medio de cultivo descrito en el punto 3.4.2. pero a 7 veces su concentración. Esto se utilizó para embeber a las perlitas usadas como soporte en el sistema de fermentación en estado sólido.

3.5. SISTEMAS DE FERMENTACIÓN

En esta investigación se trabajó con tres sistemas de fermentación: Fermentación en sumergido, biopelícula y estado sólido. Como se detallará líneas abajo, los tres sistemas fueron tratados con las mismas condiciones de cultivo, es decir, tiempo de cultivo, agitación (para el caso de FS y FB), temperatura, pH inicial y esporas obtenidas a los 7 días.

Previamente, para la obtención del inóculo, se cosecharon las esporas de los cinco hongos filamentosos. Utilizando un fragmento de agar de un cultivo previo, se introdujo dentro de un matraz con 10 ml de PDA y se incubó por siete días a 28°C (este procedimiento se repitió para cada uno de los hongos seleccionados). Al séptimo día se añadió \pm 10 ml de Tween 80 al 0.1 por ciento (V/V) a cada matraz y se agitó para remover las esporas del agar; después se traspasó la suspensión de esporas a tubos de centrifuga de 50ml estériles para su posterior conteo en la cámara de Neubauer. Finalmente, se realizaron diluciones hasta obtener la concentración de 10^7 esporas/ml y solo en el caso de la fermentación en estado sólido se buscó la concentración de 0.42×10^7 esporas/ml. Aun así, en los tres sistemas se inoculó un volumen que permitió conseguir la misma concentración de esporas.

3.5.1. Fermentación en sumergido (FS)

Por medio de una cámara de siembra con lámpara UV, mechero y manteniéndose la esterilidad, se inocularon 2.1 ml de suspensión de esporas (volumen equivalente al 3 por ciento V/V) a una concentración de 10^7 esporas/ml en 70 ml del medio caldo Czapek en matraces de 250 ml. Luego de esto, se llevaron los matraces inoculados a un agitador orbital húmedo a 175 rpm y 28°C, donde se controlaron diariamente estos factores.

El tiempo de incubación estuvo en función a las metodologías que se detallan a continuación.

a. Curva de productividad en FS

Para realizar las curvas de productividad (UC/L/horas) de las cinco cepas en FS, se realizaron los mismos pasos descritos en el punto 3.5.1 y se incubaron los matraces inoculados durante 10 días. Todos los días, empezando desde el día uno hasta el día diez, se sacó con micropipeta 1 ml de muestra para ser analizado mediante espectrofotometría de UV-Visible. En el punto 3.8.1 se explica el procedimiento para calcular las unidades de colorante (UC).

b. Rendimiento de producción de colorante en FS

Para obtener los rendimientos de producción de colorante en FS, se cultivó tal cual los pasos descritos en el punto 3.5.1 y se incubaron los matraces inoculados durante siete días. Al séptimo día, se extrajo la biomasa y el colorante del medio para determinar el peso seco y las unidades de colorante por espectrofotometría UV-Visible.

3.5.2. Fermentación en biopelícula (FB)

Se siguió el procedimiento de Villena & Gutiérrez-Correa, (2006), con algunas modificaciones en la concentración de esporas del inóculo, el medio de producción de colorante, los tiempos de lavados, entre otros que se detallan a continuación en el protocolo utilizado.

Se mantuvo la proporción “área del soporte / volumen del medio de cultivo” constante, igual a 0.27cm²/ml. Posteriormente, se cortaron cuadrados de 3.1x3.1 cm de tela de poliéster 100/1, los cuales se lavaron minuciosamente varias veces con agua destilada, se secaron en el horno a 100°C por 24 horas y se pre-pesaron antes de ser esterilizados mediante autoclave.

El proceso constó de tres etapas, las cuales se describen a continuación:

- Con el apoyo de una cámara de siembra con lámpara UV y un mechero, se procedió a la adhesión de las esporas. Para este fin, se inocularon 2.1 ml de suspensión de esporas (volumen equivalente al 3 por ciento V/V) a una concentración de 10⁷ esporas/ml directamente en el soporte (tela de poliéster) dentro de matraces de 250 ml con 70 ml de

agua destilada estéril. Seguidamente, los matraces inoculados se llevaron a incubar por 15 minutos a 28°C y 175 rpm en un agitador orbital húmedo.

- Pasado los 15 minutos de incubación, los soportes con las esporas adheridas de cada matraz se trasvasaron a nuevos matraces con 70 ml de agua destilada estéril y se llevaron a incubación por 15 minutos a 28°C y 175 rpm. Este proceso de lavado se repitió una vez más.
- Luego de estos dos lavados, se trasladaron los soportes inoculados a nuevos matraces de 250 ml con 70 ml de medio caldo Czapek. Finalmente, los matraces se incubaron en un agitador orbital húmedo a 28°C y 175 rpm.

El tiempo de incubación estuvo en función a las metodologías que se detallan a continuación.

a. Curva de productividad en FB

Para realizar las curvas de productividad (UC/L/horas) de las cinco cepas en FB, se realizaron los mismos pasos descritos en el punto 3.5.2 y los matraces inoculados se incubaron durante 10 días. Todos los días, empezando desde el día uno hasta el día diez, se sacó con micropipeta 1 ml de muestra para ser analizado mediante espectrofotometría de UV-Visible. En el punto 3.8.1 se explica el procedimiento para calcular las unidades de colorante (UC).

b. Rendimiento de producción de colorante en FB

Para obtener los rendimientos de producción de colorante en FB, se cultivó tal cual los pasos descritos en el punto 3.5.2 y se incubaron los matraces inoculados durante siete días. Al séptimo día, se extrajo la biomasa y el colorante del medio para determinar el peso seco y las unidades de colorante por espectrofotometría UV-Visible.

3.5.3. Fermentación en estado sólido (FES)

Para la presente investigación, los ensayos de fermentación en estado sólido realizados corresponden a una metodología adaptada sobre la base de la investigación de Gamarra et al., (2010). A continuación, se describen las etapas desarrolladas.

Preparación de medio y soporte

- Se utilizó como soporte perlitas para horticultura (Agrolite, Schultz Co., St. Louis, USA), la cual se tamizó cuidadosamente hasta lograr un tamaño de partícula entre 0.7 a 1,5 mm. Se lavó tres veces con agua destilada y se llevó al horno de secado a 70°C por 24 horas. Pasado ese tiempo, se calculó la densidad aparente de las perlitas para determinar la cantidad a agregarse a cada matraz.
- Considerando que el sistema requiere una humedad del 75 por ciento, se determinó la cantidad de agua necesaria que se debería agregar al sistema (considerando 5 ml de inóculo), a partir de la fórmula de humedad relativa.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{W \text{ agua}}{W \text{ sustrato}} \times 100$$

Para conseguir esos datos, se recurrió a la siguiente relación:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(W3 - W1) - (W2 - W1)}{(W2 - W1)} \times 100$$

Donde,

W1: Peso del matraz de 250 ml

W2: Peso del matraz con el soporte (cantidad de perlita calculada anteriormente)

W3: Peso del matraz con el soporte y agua (cantidad de agua estimada para obtener 75% de humedad)

- Seguidamente, se preparó el medio caldo Czapek siete veces concentrado a pH 6.5, como se detalló en el punto 3.4.3.
- En cada matraz se embebieron las perlitas con 70 ml de caldo Czapek siete veces concentrado. Estos se llevaron por dos días al congelador. Al tercer día, se secaron en horno a 60°C por tres días. Una vez observado que todo el caldo de cultivo se secó, se autoclavarón a 121°C, 15 psi de presión por 20 minutos. Culminado este procedimiento, los matraces con el soporte embebido quedaron listos para la inoculación.

Inoculación

- Con la ayuda de una cámara de siembra con lámpara de UV y un mechero, se inocularon 5 ml de suspensión de esporas a una concentración de 0.42×10^7 esporas/ml. Con este valor se consiguió un inóculo más diluido sin afectar la concentración final de esporas usado en fermentación en sumergido y biopelícula.
- En los matraces inoculados, se agregó agua destilada estéril (anteriormente calculada), la cantidad necesaria para obtener el 75% de humedad en el sistema. Se mezcló bien con leves golpes en la base del matraz.

Incubación

- Dentro de una cámara de humedad se colocó una cama de algodón embebida con agua destilada estéril para mantener la humedad. Dentro de ella se colocaron todos los matraces y ésta a su vez se guardó dentro de una incubadora a 28°C, sin agitación.

El tiempo de incubación estuvo en función a las metodologías que se detallan a continuación.

a. Curva de productividad en FES

Para realizar las curvas de productividad (UC/L/horas) de las cinco cepas en FES, se realizaron los mismos pasos descritos en el punto 3.5.3 y los matraces inoculados se incubaron durante 10 días. Todos los días, empezando desde el día uno hasta el día diez, se sacó con micropipeta 1 ml de muestra para ser analizado por espectrofotometría de UV-Visible. En el punto 3.8.1 se explica el procedimiento para calcular las unidades de colorante (UC).

b. Rendimiento de producción de colorante en FES

Para obtener los rendimientos de producción de colorante en FES, se cultivó tal cual los pasos descritos en el punto 3.5.3 y se incubaron los matraces inoculados durante siete días. Al séptimo día, se extrajo la biomasa y el colorante del medio para determinar el peso seco y las unidades de colorante por espectrofotometría UV-Visible.

3.6. EXTRACCIÓN DE COLORANTES

3.6.1. Extracción de colorantes en FS y FB

Al término del séptimo día de incubación para FS y FB, se separó el sobrenadante de la biomasa mediante filtración al vacío con papel filtro de paso medio pre-pesado. El filtrado se colectó en tubos de centrifuga de 50 ml estériles para su posterior análisis en el espectrofotómetro UV-Visible.

3.6.2. Extracción de colorantes en FES

Para el caso del sistema FES, el medio sólido fue resuspendido con 70 ml de agua destilada estéril. Con la ayuda de una cuchara metálica estéril se logró cortar el medio para que ingrese el agua y se llevó al agitador orbital durante 15 minutos a 180 rpm para que se mezcle y libere el colorante. Después, el extracto se coló para luego ser filtrado al vacío con papel filtro de paso lento, con la finalidad de separar los restos de perlita. Por último, utilizando un filtro de jeringa se limpiaron los remanentes de soporte y esporas que permanecieron en el colorante

filtrado al vacío. Finalmente, el colorante se colectó en tubos de centrifuga de 50 ml estériles para su posterior análisis en el espectrofotómetro UV-Visible

3.7. DETERMINACIÓN DE BIOMASA

3.7.1. Determinación de biomasa en FS y FB

Luego de lo indicado en el punto 3.6.1, la biomasa en el papel filtro pre-pesado fue lavado tres veces con 30 ml de agua destilada estéril. Para FS, la biomasa en el papel filtro se secó en horno a 100°C por 24 horas y se calculó el peso de la biomasa por diferencia de peso seco. Mientras que, para FB, tanto la biomasa no adherida en el papel filtro como la biopelícula en el papel aluminio pre-pesado, se secaron en horno a 100°C por 24 horas. Luego, se calculó el peso seco de la biomasa no adherida al restar el peso del papel filtro pre-pesado y de la biomasa de la biopelícula al restar el peso del papel aluminio y la tela de poliéster.

3.7.2. Determinación de biomasa en FES

La biomasa producida en FES se determinó indirectamente mediante la cuantificación de proteína intracelular. Se utilizó la metodología de hidrólisis alcalina (modificada), propuesta por Sehnem, Ramos de Bittencourt, Camassola, & Dillon, (2006) y los pasos se detallan a continuación:

a. Curva estándar Albúmina Sérica Bovina (BSA)

Se utilizó el método de Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, (1951). Para ello, se desarrolló una curva estándar de BSA (ver anexos del 2 al 11). El procedimiento fue el siguiente:

- A partir de una solución stock de BSA (10 mg/ml), se calculó las concentraciones 0.031 mg/ml, 0.062 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.4 mg/ml y 0.5 mg/ml. Las reacciones se efectuaron por duplicado en tubos de ensayos de 5ml.

- De cada concentración anterior se utilizó 200 ul para la reacción con 1000 ul de solución C, se homogenizó en vortex e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Luego, se añadió 400 µL de reactivo de Folin 1 N a cada reacción anterior, se homogenizó e incubó 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
- Por último, se realizó la lectura de absorbancias (tres réplicas técnicas) a 550 nm. Con estos datos se armó la curva estándar de BSA (ver anexos del 2 al 11).
- Reactivo C: se mezcló las soluciones A (Na_2CO_3 al 2 por ciento en 1 M de NaOH), B1 ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5 por ciento) y B2 (tartrato de sodio al 1 por ciento) en proporción de 100:1:1.

b. Curva estándar de biomasa vs proteína intracelular

- Se realizó el cultivo en FES de las 5 cepas como se explica en el apartado 3.5.3 y se incubó por 7 días.
- Luego de los 7 días, el contenido se filtró y se recuperó la biomasa del soporte. Esta se enjuagó repetidas veces con agua destilada estéril. En seguida, se llevó al horno de secado por 24 horas a 70°C.
- A partir de la biomasa seca en el soporte, se pesaron 0.025g; 0.05g, 0.075g, 0.100g, 0.125g, 0.150g y 0.175g; estas se distribuyeron en tubos de vidrio con tapa rosca de 70 ml.
- A cada tubo se le agregó una solución de 20ml de NaOH 0.2M y se llevó a autoclavar durante 10 min a 111°C.
- Para neutralizar la reacción se adicionaron 20ml de HCl 0.2M a cada tubo y se filtró al vacío. El filtrado se utilizó para cuantificar las proteínas por el método de Lowry.

- Finalmente, a partir de la curva estándar BSA se calculó la curva estándar de la proteína intracelular (mg/ml) vs biomasa seca (g) (ver anexos 2 al 11). Gracias a esta correlación se obtuvo la ecuación que sirvió para estimar la biomasa producida en el apartado “b” del punto 3.5.3.

3.8. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO DE LOS COLORANTES PRODUCIDOS

Para el análisis de los colorantes se empleó un espectrofotómetro de UV-Visible con arreglo de diodos y cubetas de acrílico, el cual permitió obtener espectros de absorción en el rango desde los 200nm hasta los 800nm.

Primero se calibró el instrumento utilizando el control (caldo Czapek) de FS y FB y para FES fue el control resuspendido en agua destilada, tal cual se realizó para la extracción de colorante. Seguidamente se determinaron las longitudes de onda de mayor absorbancia para los colorantes producidos en FS, FB y FES. Se consideraron válidos los datos de absorbancia menores a 1, sino se realizaron diluciones. Cada muestra tuvo su réplica técnica.

3.8.1. Determinación de la concentración y rendimiento de producción de colorante

Se convirtió los valores de absorbancia (λ_{max}) a unidades de colorante, según la siguiente fórmula:

$$\text{Unidad de colorante} = \text{ABS } \lambda_{max} \times \text{dilución} \times \text{volumen del extracto}$$

Y se calculó el rendimiento en base a la biomasa producida, según la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Unidad de colorante}}{\text{biomasa } \left(\frac{g}{L}\right)}$$

3.9. ANÁLISIS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GENES DE OCRATOXINA

3.9.1. Extracción y purificación de ADN

Previo a la extracción de ADN, los materiales de porcelana y metal se llevaron a esterilización a 200°C por 2 horas en horno seco y el material de plástico se autoclavó a 121°C por 15 minutos.

1. Se pesó 300 µg de biomasa molida con nitrógeno líquido y se colocó en microtubos de 1.5 ml.
2. Se agregó 700 µL de tampón de extracción (50 mM TrisHCl a pH 7.2, 50 mM EDTA, dodecil sulfato sódico 3%, 2-mercaptoetanol 1%), vórtex por 2 minutos y se incubó a 65°C durante 1 hora.
3. Luego, se agregó 600 µL de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión y se centrifugó a 14000 rpm a 4°C por 10 minutos. Se recuperó y se trasladó el sobrenadante del microtubo a uno nuevo.
4. Se adicionó al nuevo microtubo, tampón acetato de sodio 3M a pH 5.8 (cantidad igual a la mitad del volumen del sobrenadante recuperado), se mezcló por inversión y se refrigeró a 4°C por 30 minutos.
5. La mezcla se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos y se recuperó el sobrenadante.
6. Al sobrenadante se le agregó isopropanol (cantidad igual al doble del volumen del sobrenadante recuperado), se mezcló por inversión y se refrigeró a -20°C por una hora y así permitir la precipitación del material genético.
7. Después, se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado con 500 µL de etanol al 70%.

8. Se centrifugó el pellet con el etanol a 14000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido secó a temperatura ambiente y se disolvió en 20 μ L de tampón (TrisHCl 10 mM a pH 8.2). Finalmente, se agregaron 15 μ L de RNAsa (10mg/ml) a cada microtubo y se incubó a 37°C por 15 minutos. Pasado ese tiempo se guardó en refrigeración a -20°C.

Se analizó la calidad y cantidad de las muestras de ADN extraídas con la ayuda del NanoDrop™ 2000, tomándose como valores aceptables 1.8-2.0 para la ratio 260/280 y 1.8-2.2 para la ratio 260/230. Esta información espectrofotométrica se complementó con la visualización de la integridad del ADN a través de la electroforesis en gel de agarosa 1 por ciento (p/v) con buffer TAE 1X y 1 por ciento de una solución de bromuro de etidio 5 μ g/ml en el gel, cuyas bandas se observaron mediante el uso de un transiluminador de luz UV.

- Buffer TAE 50X: 242 g de Tris base, 57.1 ml de ácido acético glacial, 100 ml de 0.5 M EDTA y agua ultra pura c.s.p. 1 L a pH 8.0, este se autoclavó para luego ser diluido a 1X con agua ultra pura.
- Bromuro de etidio: para hacer la solución 1 por ciento, se pesó 1 mg de bromuro de etidio en 100 ml de agua miliq. Se forró el recipiente con papel aluminio u otro que impida el paso de la luz.

3.9.2. Cebadores

Para la identificación de genes involucrados en la biosíntesis de ocratoxina, se tomaron dos parejas de cebadores para PCR, utilizados en estudios anteriores y se detallan en la siguiente tabla 5.

Tabla 5: Cebadores utilizados para la amplificación y posterior secuenciamiento

Gen	Cebadores	Secuencia (5'-3')	T ^o m	Referencia
<i>Policétido sintasa pks</i>	KAF1_f	GAR KSI CAY GGI ACI GGI AC	58°C	(Amnuaykanjanasin et al., 2005)
	KAR2_r	CCA YTG IGC ICC YTG ICC IGT RAA		
	KAOTA_f	GAR GCI CAY GGC ACI GGI AC	60°C	(Storari, Pertot, Gessler, & Brogгинi, 2010)
	KAOTA_r	CCA RTT IGC ICC YTG ICC IGT RAA		

FUENTE: Elaboración propia.

3.9.3. Amplificación de genes de *pks* para ocratoxina usando PCR convencional

Se utilizó los primers de la sección 3.9.2 y el kit de PCR KAPA Taq de Sigma-Aldrich para un volumen total final de reacción de 20 µL, como se detalla en tabla 6:

Tabla 6: Reactivos para el master mix de una PCR a 20 µL de volumen final de reacción

Reactivos	Volumen	Concentración final
Tampón de reacción 10X	2 µL	1x
Cloruro de magnesio 25mM	1.2 µL	1.5 mM
Mix de dNTP, 10mM c/u	0.4 µL	0.2 mM
Cebador forward 10 µm	0.8 µL	0.4 µm
Cebador reverse 10 µm	0.8 µL	0.4 µm
KAPA Taq polimerasa 5 U/µL	0.08 µL	0.4 U/µL
Muestra de ADN	2 µL	150 ng/µL
Agua libre de nucleasas	c.s.p	

FUENTE: Elaboración propia

La reacción de PCR se realizó en un Termociclador S1000TM-BIORAD con las siguientes condiciones de amplificación para un PCR con gradientes de temperaturas:

Tabla 7: Condiciones de amplificación para una PCR

Proceso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	1
Desnaturalización	95°C	1 minuto	
Alineamiento	58°C-60°C	30 segundos	30
Extensión	72°C	48 segundos	
Extensión final	72°C	5 minutos	1

FUENTE: Elaboración propia

Para visualizar los productos amplificados se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1 por ciento (p/v) con buffer TAE 1X y 1 por ciento de una solución de bromuro de etidio 5 µg/ml en el gel, cuyas bandas se observaron mediante el uso de un transiluminador de luz UV. Enseguida, se cortó el gel de agarosa para purificar las bandas mediante Wizard® Genomic DNA purification Kit y se mandaron a secuenciar. Finalmente, ya con los productos secuenciados se procedió a identificar los genes mediante BLASTX.

3.10. ANÁLISIS PARA LA EXPRESIÓN DE GENES DE OCRATOXINA MEDIANTE PCR SEMICUANTITATIVA (RT-PCR)

Previamente a los pasos 3.10.1 y 3.10.2, se limpiaron las superficies de trabajo con alcohol de 70 por ciento y lejía 1 por ciento, seguido por peróxido de hidrógeno 3 por ciento para eliminar la contaminación con ARNasas. Además, los materiales de vidrio, porcelana y metal a usar, fueron esterilizados en un horno a 200°C por 2 horas mientras que el material de plástico se esterilizó por autoclave a 121°C por 15 min.

3.10.1. Recuperación de la biomasa en FS y FB

Para la obtención de biomasa, se realizaron cultivos de acuerdo a lo detallado en el apartado b de los puntos 3.5.1 y 3.5.2, referidos a los rendimientos de producción de colorantes en los sistemas FS y FB.

Para la extracción de ARN de la biomasa de FS y FB, estas fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril, filtradas al vacío y conservadas inmediatamente a -80°C en tubos centrífuga con su respectivo etiquetado.

3.10.2. Recuperación de la biomasa en FES

Para la obtención de biomasa, se realizaron cultivos de acuerdo a lo detallado en el apartado b del punto 3.5.3, referido al rendimiento de producción de colorantes en el sistema FES. Para la separación de la biomasa del sistema en fermentación en estado sólido, se desarrolló un protocolo en el que se procuró la menor manipulación posible de biomasa, considerando que la muestra sería sometida a un análisis de expresión de genes.

Cabe mencionar que se desarrollaron ensayos anteriores, donde el soporte y la biomasa fueron molidos en conjunto, generando un polvillo difícil de separar y dificultando la extracción de ARN. Por este motivo, en el presente procedimiento se procuró conseguir biomasa sin soporte adherido (perlitas). Los pasos desarrollados se detallan a continuación:

- Durante todo el proceso se trató de trabajar a bajas temperaturas, para lo cual se tenían cubetas con hielo y botellas refrigeradas con agua destilada estéril.
- Dentro de una cámara de siembra con lámpara UV, se introdujo una cuchara larga de metal estéril y refrigerada con cuidado dentro del matraz con la biomasa, de manera que se realizó un corte en forma de cruz hasta la base del medio sólido.
- En seguida, se le agregó agua destilada estéril refrigerada y se llevó a agitación orbital a 175 rpm por 5 minutos.
- Culminado ese tiempo, el matraz se retiró del agitador y se colocó inmediatamente dentro de una cubeta con hielo por 3 minutos.
- Transcurrido ese tiempo, el matraz se llevó al vortex y luego a una cubeta de hielo durante un intervalo de 1 minuto cada uno, por 6 minutos en total. Durante ese tiempo

con la ayuda de la cuchara de metal estéril y evitando quebrar las perlitas, se retiró delicadamente la biomasa pegada en las paredes del matraz.

- Luego, la biomasa resuspendida en el matraz se filtró al vacío con papel filtro esterilizado y se lavó dos veces con agua destilada estéril. Utilizando una cuchara de metal se retiró la biomasa del papel filtro y se colocó dentro de un tubo de centrifuga debidamente rotulado para ser conservado a -80°C .

3.10.3. Extracción y purificación de ARN de cultivos en FS, FB y FES

El protocolo utilizado para la extracción y purificación de ARN fue el kit Direct-Zol™ RNA Miniprep de Zymo Research:

1. Con un mortero y pilón de porcelana se pulverizó la biomasa utilizando nitrógeno líquido.
2. Se pesó aproximadamente 25 mg del pulverizado en un microtubo de 2 ml. Para el caso de FB se colocó además en otro microtubo la tela de poliéster. La biomasa pulverizada restante se almacenó en un microtubo a -80°C .
3. Únicamente para FB, al microtubo con la tela se le añadió 600 μL del reactivo TRI Reagent® y se homogenizó con la ayuda del vórtex, se recuperó el sobrenadante y se transfirió al microtubo con los 25 mg de biomasa. Luego se homogenizó con vórtex. Mientras que para para los 25 mg de biomasa de FS y FES, se le agregó directamente los 600 μL del reactivo TRI Reagent® y se homogenizó con el vórtex.
4. La reacción anterior se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.
5. A la muestra tratada con reactivo TRI Reagent® se le añadió igual volumen de etanol (95-100 por ciento) y se homogenizó con vórtex.

6. La mezcla en el microtubo se transfirió dentro de una columna zymo-spin™ IIC con su respectivo tubo colector y se centrifugó a 12000 g por 1 minuto a temperatura ambiente. Después de ello, la columna se transfirió dentro de un nuevo tubo colector y se descartó el contenido del tubo colector.
7. Se añadió 400 µL de RNA Wash Buffer a la columna y se centrifugó a 12000 g por 30 segundos.
8. Tratamiento con DNasa I: En un microtubo nuevo se mezcló 10 µL de DNasa I (12 U) y 75 µL de DNA Digestion Buffer. Esta mezcla se añadió directamente a la columna.
9. Se incubó con la enzima por 30 minutos a temperatura ambiente.
10. Pasado el tiempo de reacción de la enzima, dentro de la columna se añadió 400 µL del RNA PreWash, se centrifugó a 12000 g por 1 minuto y se descartó el contenido del tubo colector. Se repitió este paso.
11. Se añadió 700 µL de RNA Wash Buffer a la columna y se centrifugó a 12000 g por 2 minutos.
12. La columna fue transferida cuidadosamente a un nuevo microtubo rotulado.
13. Para eluir el ARN se añadió 50 µL de agua libre de nucleasas (provista por el kit) dentro de la columna y se centrifugó a 12000 g por 2 minutos. El ARN extraído se conservó a - 20°C por un mediano periodo.

Con la ayuda del NanoDrop™ 2000 se analizó la calidad y cantidad de las muestras de ARN extraídas, tomándose como valores aceptables ~2.0 para la ratio 260/280 y 2.0-2.2 para la ratio 260/230. Esta información espectrofotométrica se complementó con la visualización de la integridad del ARN ribosomal a través de la electroforesis en gel de agarosa 1 por ciento (p/v) con buffer TAE 1X y mix GelRed®, cuyas bandas se observaron mediante el uso de un transiluminador de luz UV.

- Buffer TAE 50X: 242 g de Tris base, 57.1 ml de ácido acético glacial, 100 ml de 0.5 M EDTA y agua ultra pura c.s.p. 1 L a pH 8.0, este se autoclavó para luego ser diluido a 1X con agua ultra pura.
- Mix GelRed®: 87 por ciento de DNA Gel Loading Dye 6X (Thermo Scientific) y 13 por ciento de GelRed® diluido 1/10 con agua libre de nucleasas.

3.10.4. Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Para la síntesis de ADNc se utilizó el kit Transcription System Promega©. Esta fue sintetizada a partir de 1 ug de ARN total proveniente de una mezcla homogénea de ARN de 3 réplicas biológicas. Aplicando las instrucciones del fabricante, primero se incubaron a 70°C por 5 minutos las muestras de ARN con 0.5 µg de Oligo (dT)₁₅ e inmediatamente después de culminado ese tiempo se colocaron en hielo. Luego, se mezcló con los otros componentes del kit y la enzima transcriptasa inversa M-MLV RT (*Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*) y se incubó a 42°C por 60 minutos. Cada una de las muestras sintetizadas tuvieron su respectivo control sin enzima transcriptasa reversa (NRT) para verificar la ausencia de ADN genómico. Se conservaron a -20°C.

3.10.5. PCR Semicuantitativa (RT-PCR)

Para la RT-PCR semicuantitativa, se emplearon el kit de PCR KAPA Taq de Sigma-Aldrich a un volumen total final de 20 µL (ver tabla 8), los ADNc sintetizados en la sección 3.10.4, los cebadores de la sección 3.9.2 y el gen actina como gen de referencia o normalización (housekeeping genes) en base a la bibliografía revisada, siendo la secuencia de los cebadores para un producto de 256 pb las siguientes:

F: TGGTATCCACGAGACCACCTTCAA

G: TGGAAGAAGGAGCAAGAGCAGTGA

Tabla 8: Reactivos para el master mix de una PCR semicuantitativa a 20 μ L de volumen final de reacción

Reactivos	Volumen	Concentración final
Tampón de reacción 10X	2 μ L	1x
Cloruro de magnesio 25mM	1.2 μ L	1.5 mM
Mix de dNTP, 10mM c/u	0.4 μ L	0.2 mM
Cebador forward 10 μ m	0.8 μ L	0.4 μ m
Cebador reverse 10 μ m	0.8 μ L	0.4 μ m
KAPA Taq polimerasa 5 U/ μ L	0.08 μ L	0.4 U/ μ L
Muestra de ADNc	2 μ L	120 ng/ μ L
Agua libre de nucleasas	c.s.p	

FUENTE: Elaboración propia.

La reacción de PCR semicuantitativa se realizó en un Termociclador S1000TM-BIORAD con las siguientes condiciones de amplificación para un RT-PCR semicuantitativa.

Tabla 9: Condiciones de amplificación para una PCR semicuantitativa

Proceso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	1
Desnaturalización	95°C	1 minuto	
Alineamiento	60°C	30 segundos	40
Extensión	72°C	48 segundos	
Extensión final	72°C	5 minutos	1

FUENTE: Elaboración propia.

Para visualizar los productos amplificados se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1 por ciento (p/v) con buffer TAE 1X y mix GelRed®, cuyas bandas se observaron mediante el uso de un transiluminador de luz UV.

3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Todos los análisis fueron llevados a cabo con el programa estadístico R tomando las siguientes consideraciones:

- Nivel de confianza de 95 por ciento.

- Nivel de significación de 0.05 ($\alpha=0.05$).

- Antes de a realizar las pruebas estadísticas paramétricas, primero se verificaron los supuestos de normalidad con la prueba Shapiro-Wilks y homogeneidad de varianza con la prueba varianza no constante. Como los supuestos presentaron resultados p-valor menor a 0.05, se optó por usar pruebas no paramétricas.

- Se rechazó la hipótesis nula si el p-valor obtenido es menor a 0.05

- Para el caso de comparar los tres sistemas de fermentación se empleó la prueba no paramétrica de Friedman.

- Para el caso de comparar los cinco tipos de cepas se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. CURVAS DE PRODUCTIVIDAD DE COLORANTES

Se realizaron las curvas de productividad de colorantes (UC/L/hora) de las cepas *Talaromyces brunneus* LMB-HP43, *Penicillium mallochii* LMB-HP37, *Penicillium maximae* LMB-HP33, *Penicillium mallochii* LMB-HP19 y *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14 cultivadas durante 10 días, con la finalidad de determinar el tiempo óptimo de cultivo donde se presenta la mayor productividad de colorantes. En el punto 5.2 se presenta información adicional que soportan estos resultados.

En la figura 4, para la cepa *Talaromyces brunneus* LMB-HP43 se observa que tanto el sistema de fermentación en biopelículas (1.50 UC/L/hora) y el de estado sólido (12.01 UC/L/hora) tuvieron la mayor productividad de colorante al séptimo día; mientras que para el sistema en fermentación sumergida (12.89 UC/L/hora) se presentó en el cuarto día de cultivo. En este caso, no se podría escoger cuatro días como el tiempo óptimo de cultivo, ya que hasta ese día no se observó producción de colorantes o la producción de colorantes fue muy baja para el caso de los sistemas FES y FB.

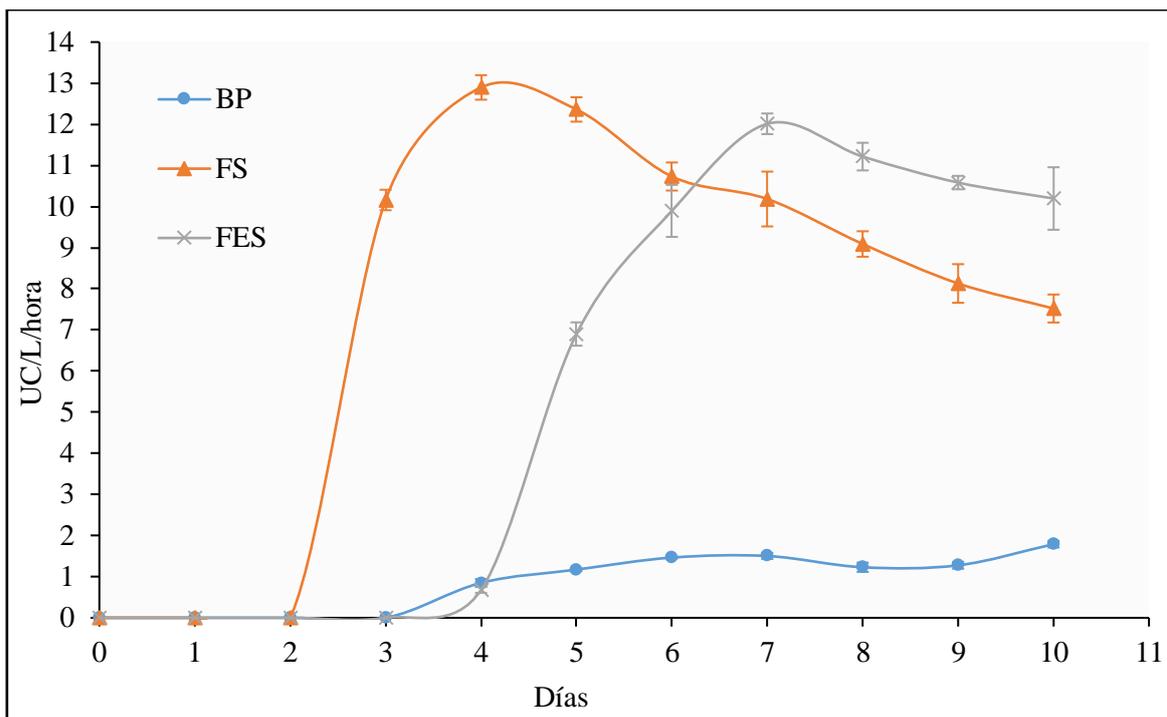


Figura 4: Curva de productividad de colorantes (UC/L/hora) de *Talaromyces brunneus* LMB-HP43 en fermentación sumergida (FS), biopelícula (FB) y en fermentación en estado sólido (FES) con medio Czapek.

Por otro lado, para la cepa *Penicillium mallochii* LMB-HP37, los tres sistemas de fermentación sumergido, biopelícula y estado sólido exhiben su mayor productividad de colorante (6.55 UC/L/hora, 1.75 UC/L/hora y 11.89 UC/L/hora respectivamente) al séptimo día de cultivo (ver figura 5).

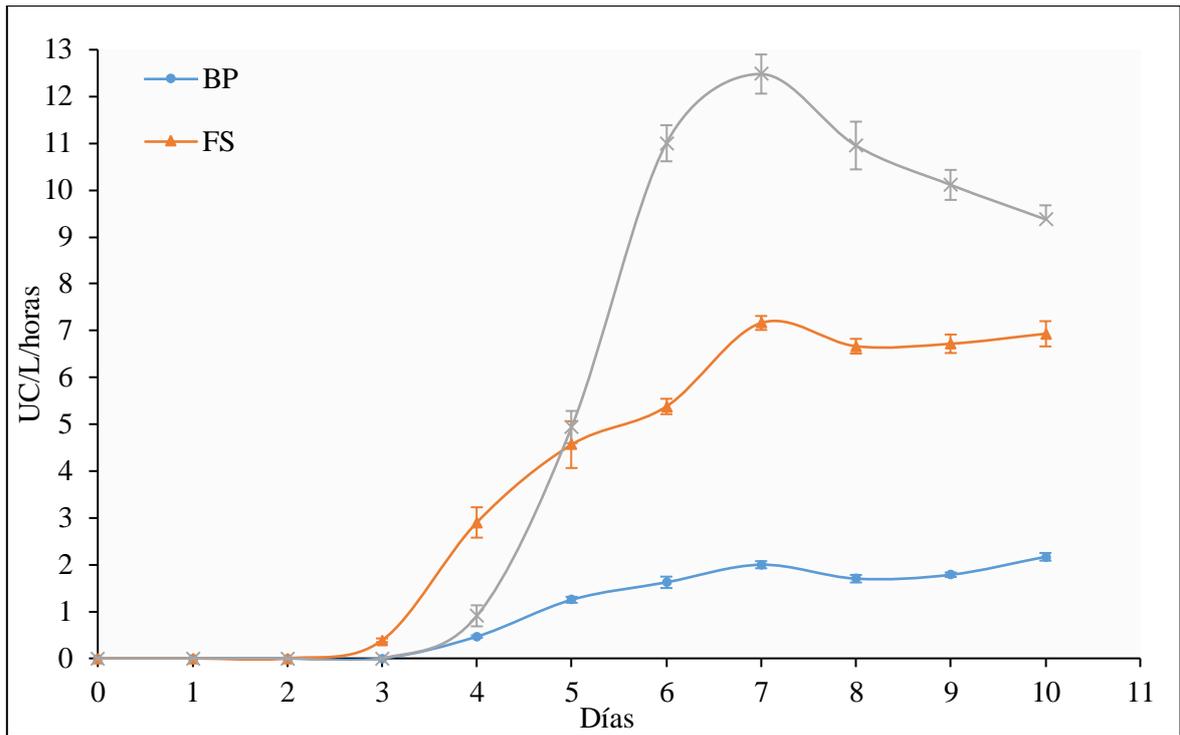


Figura 5: Curva de productividad de colorantes (UC/L/hora) de *Penicillium mallochii* LMB-HP37 en fermentación sumergido (FS), biopelícula (FB) y fermentación en estado sólido (FES) con medio Czapek.

Para la cepa *Penicillium maxillae* LMB-HP33 se obtuvo información de los sistemas de fermentación sumergida y biopelícula, más no en fermentación en estado sólido debido a que no produjo colorante durante los 10 días de evaluación. Los sistemas FS (8.36 UC/L/hora) y FB (0.82 UC/L/horas) exhibieron una mayor productividad de colorante a partir del quinto día de cultivo (ver figura 6).

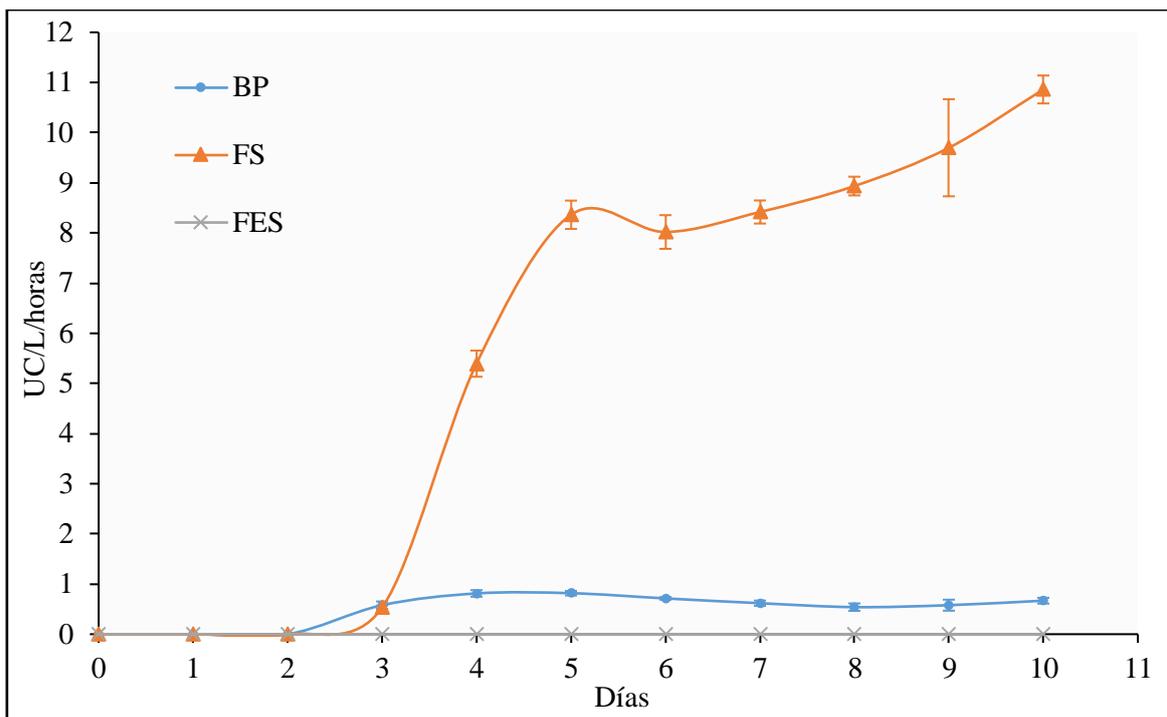


Figura 6: Curva de productividad de colorantes (UC/L/hora) de *Penicillium maximae* LMB-HP33 en fermentación sumergida (FS), biopelícula (FB) y fermentación en estado sólido (FES) con medio Czapek

En la figura 7 se observa la tendencia ascendente de la productividad de colorante en FS y FES durante los 10 días de evaluación de *Penicillium mallochii* LMB-HP19. Sin embargo, los días 8, 9 y 10 no presentan diferencias significativas de productividad. Por consiguiente, el séptimo día sería el óptimo día para la mayor productividad de colorantes en FS (1.57 UC/L/hora), FES (0.49 UC/L/hora) y FB (0.33 UC/L/hora).

Similar a lo sucedido con *Penicillium maximae* LMB-HP33, en la figura 8 *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14 tampoco produjo colorante en fermentación en estado sólido durante los 10 días de evaluación. Al quinto día, el sistema FS presentó el mayor valor de productividad de colorante (1.08 UC/L/hora). Mientras que para el sistema FB se observa la tendencia ascendente de la productividad de colorante durante los 10 días de evaluación. Sin embargo, los días 8, 9 y 10 no presentan diferencias significativas de productividad.

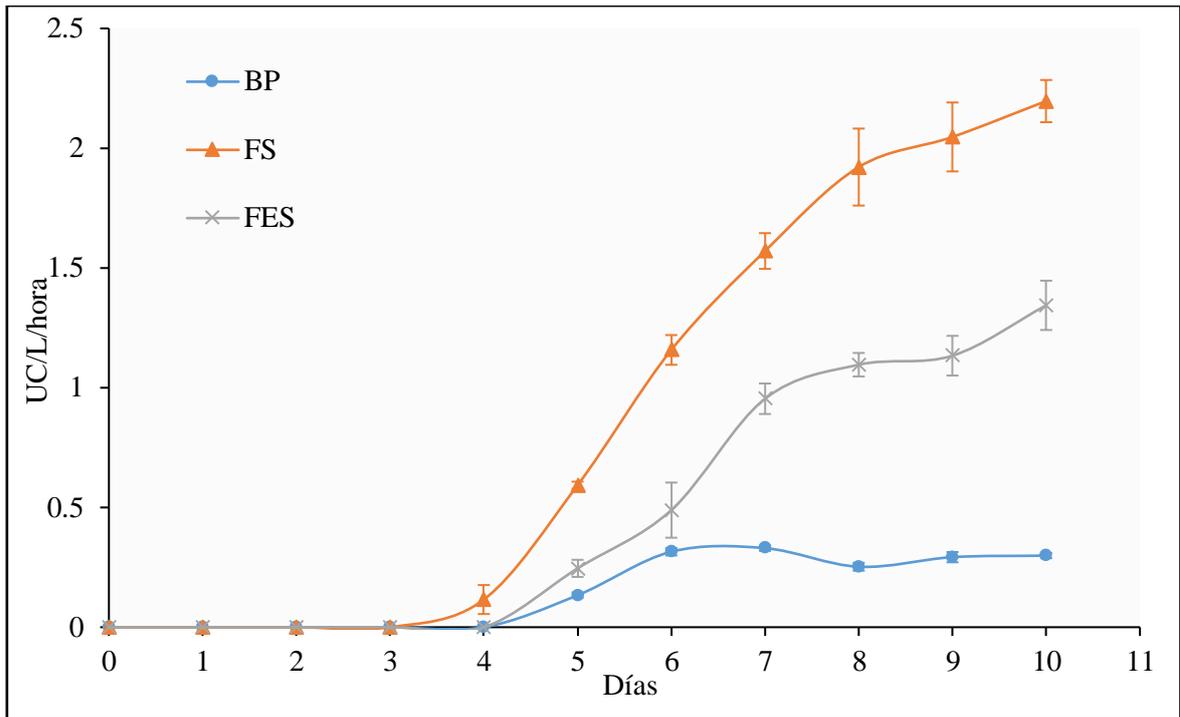


Figura 7: Curva de productividad de colorantes (UC/L/hora) de *Penicillium mallochii* LMB-HP19 en fermentación sumergida (FS), biopelícula (FB) y fermentación en estado sólido (FES) con medio Czapek.

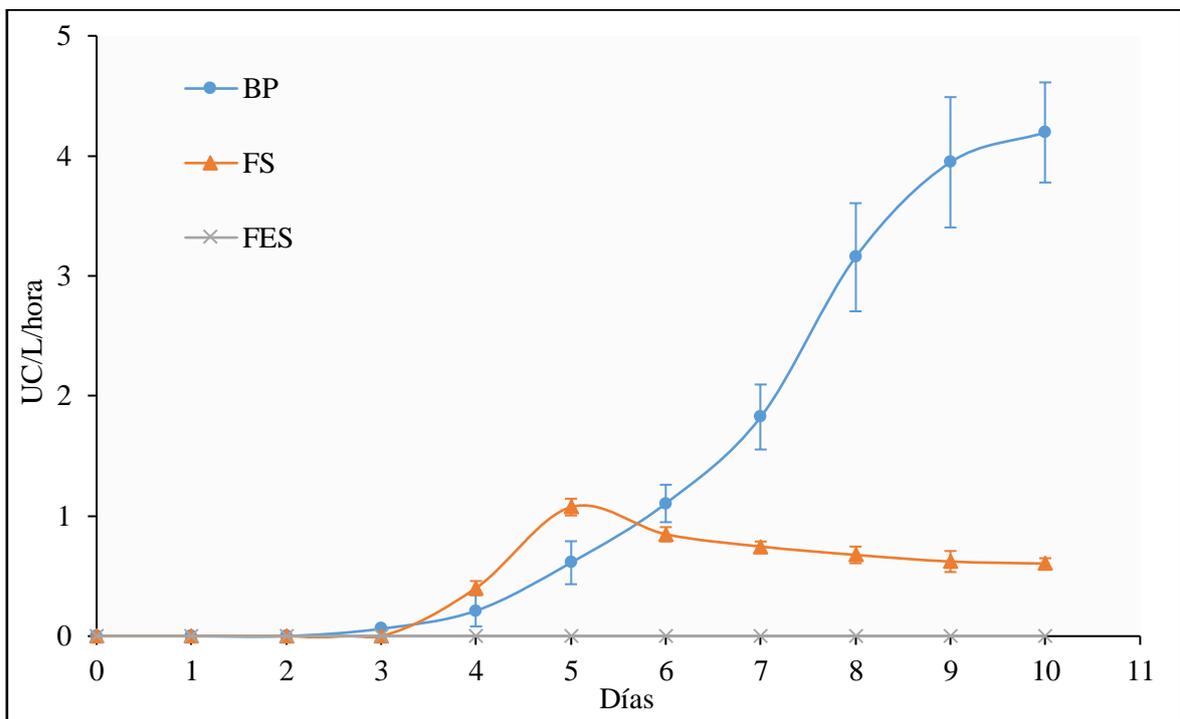


Figura 8: Curva de productividad de colorantes (UC/L/horas) de *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14 en fermentación sumergida (FS), biopelícula (FB) y fermentación en estado sólido (FES) con medio Czapek.

De acuerdo con las curvas de productividad mostradas en los gráficos anteriores, se determinó que el séptimo día es óptimo para la producción de colorantes en las cinco cepas. De esta manera, los tres sistemas de fermentación fueron evaluadas en un mismo tiempo de cultivo. Este resultado es congruente con las investigaciones de Darwesh, Matter, Almoallim, Alharbi & Oh, (2020), Heo et al.,(2018), de Oliveira et al (2020) y Xin et al, (2019), además para Heo et al, (2018), indican que los hongos pueden tener la mayor producción de colorante a los siete días, de acuerdo a la especie de hongo, ya que para ese tiempo pueden terminar rápidamente su fase de crecimiento y producir metabolitos secundarios, a diferencia de otros hongos que necesitan de un estado de déficit nutricional que se logra a partir de las cuatro semanas de incubación..

Aunque para algunos autores la máxima producción de colorantes en FS se da a los 14 días (de Oliveira et al, 2019; Zaccarim et al, 2019) y en FES (Ismail, Fitriana & Sukandar, 2021), no aplica para la presente investigación. Como se observa en los gráficos anteriores, de acuerdo al sistema de cultivo, las cepas mermaron notablemente la producción de colorantes a partir del octavo día. Esta condición se corrobora con lo expuesto por Velázquez, (2013) quién menciona que los rendimientos en producción de colorantes pueden variar de un sistema de cultivo a otro inclusive con la misma cepa.

4.2. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE COLORANTES EN MEDIO CZAPEK DURANTE 10 DÍAS

Para realizar las curvas de productividad de *Talaromyces brunneus* LMB-HP43 se utilizaron los valores de las absorbancias medidas en FS durante diez días. Se realizó un gráfico con los espectros de absorción en UV-Visible (ver figura 10) y así lograr evidenciar el comportamiento de la producción de colorante durante este periodo. En la figura 9 se observa el matraz con la producción de colorantes durante los diez días.

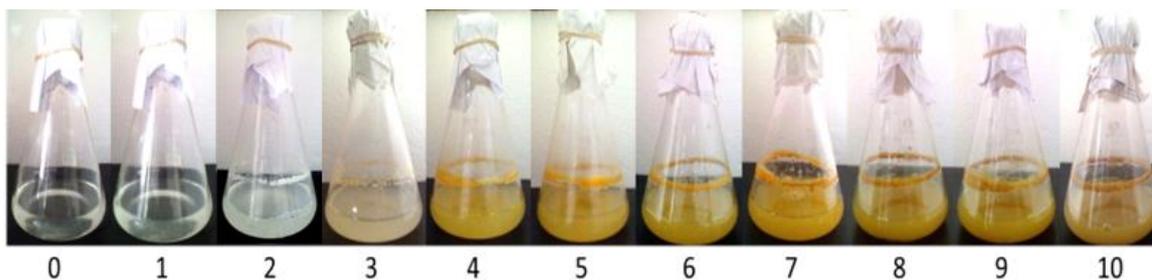


Figura 9: Producción de colorante por la cepa *Talaromyces brunneus* LMB-HP43 en fermentación sumergido durante 10 días.

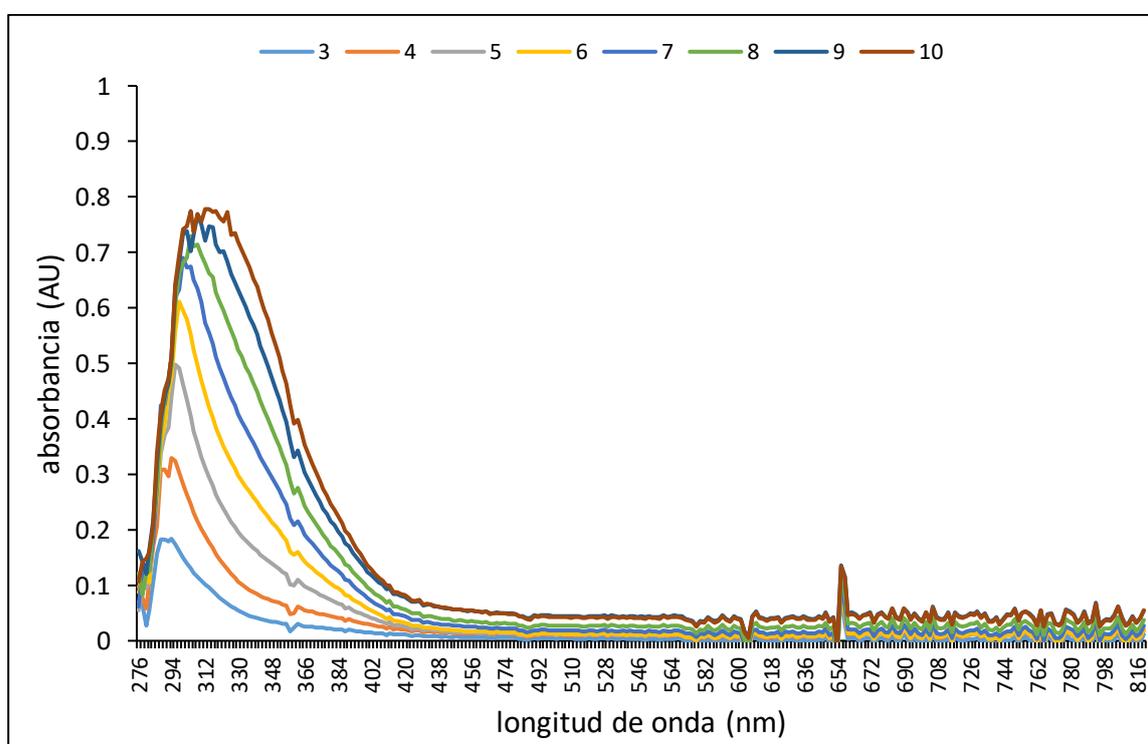


Figura 10: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa *Talaromyces brunneus* LMB-HP43 en fermentación sumergido durante 10 días.

Para realizar las curvas de productividad de *Talaromyces brunneus* LMB-HP43 se utilizaron los valores de las absorbancias medidas en FB durante diez días. Se realizó un gráfico con los espectros de absorción en UV-Visible (ver figura 12) y así lograr evidenciar el comportamiento de la producción de colorante durante este periodo. En la figura 11 se observa el matraz con la producción de colorantes durante los diez días.

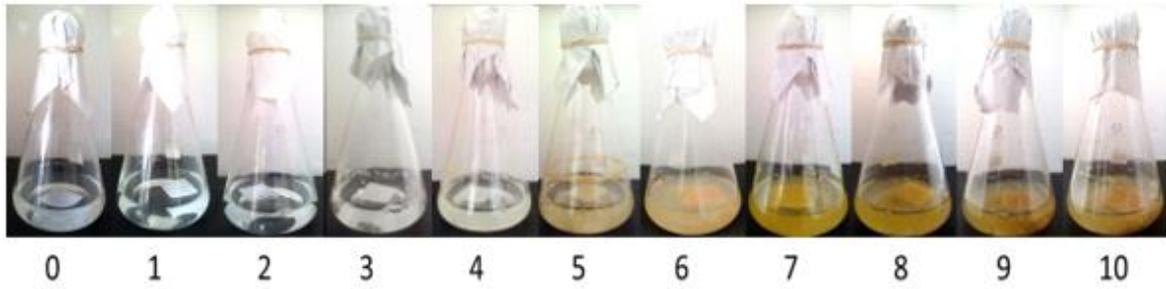


Figura 11: Producción de colorante por la cepa *Talaromyces brunneus* LMB-HP43 en fermentación por biopelícula durante 10 días.

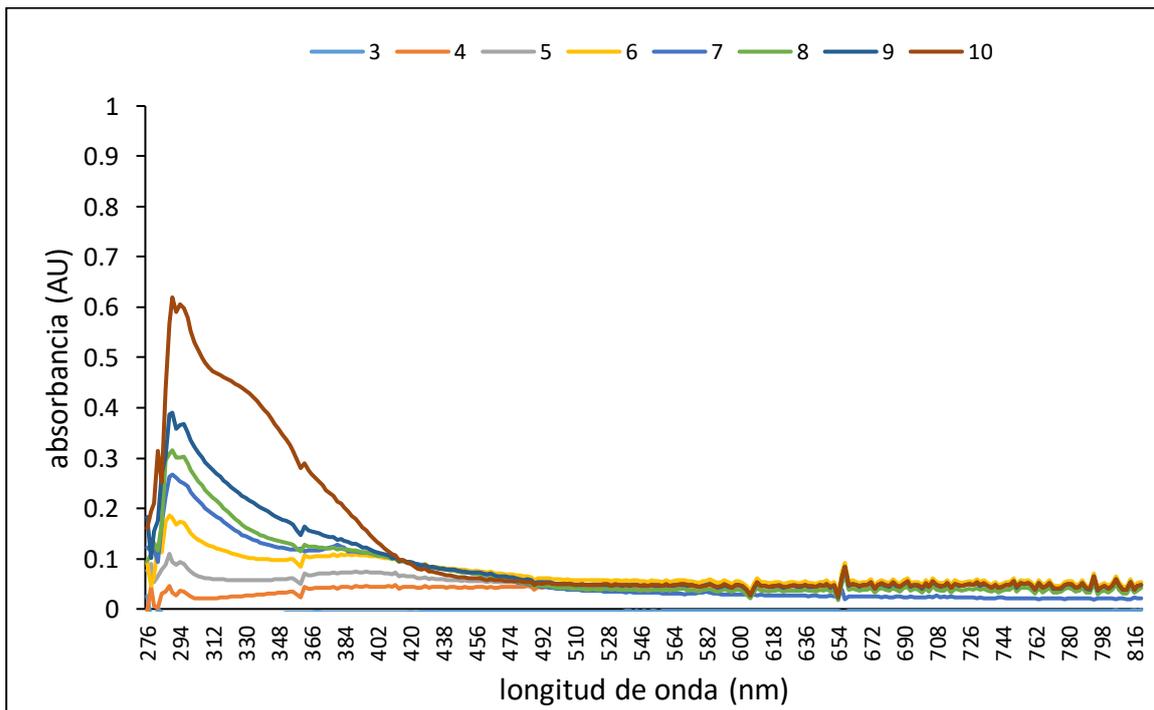


Figura 12: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa *Talaromyces brunneus* LMB-HP43 en fermentación por biopelícula durante 10 días.

Para realizar las curvas de productividad de *Talaromyces brunneus* LMB-HP43 se utilizaron los valores de las absorbancias medidas en FES durante diez días. Se realizó un gráfico con los espectros de absorción en UV-Visible (ver figura 14) y así lograr evidenciar el comportamiento de la producción de colorante durante este periodo. En la figura 13 se observa el matraz con la producción de colorantes durante los diez días.

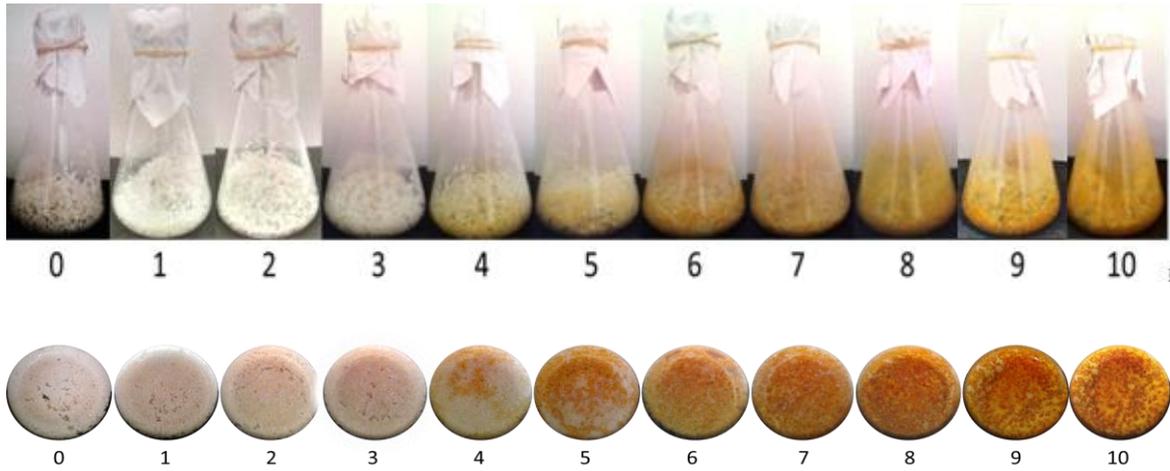


Figura 13: Producción de colorante por la cepa *Talaromyces brunneus* LMB-HP43 en fermentación por estado sólido durante 10 días.

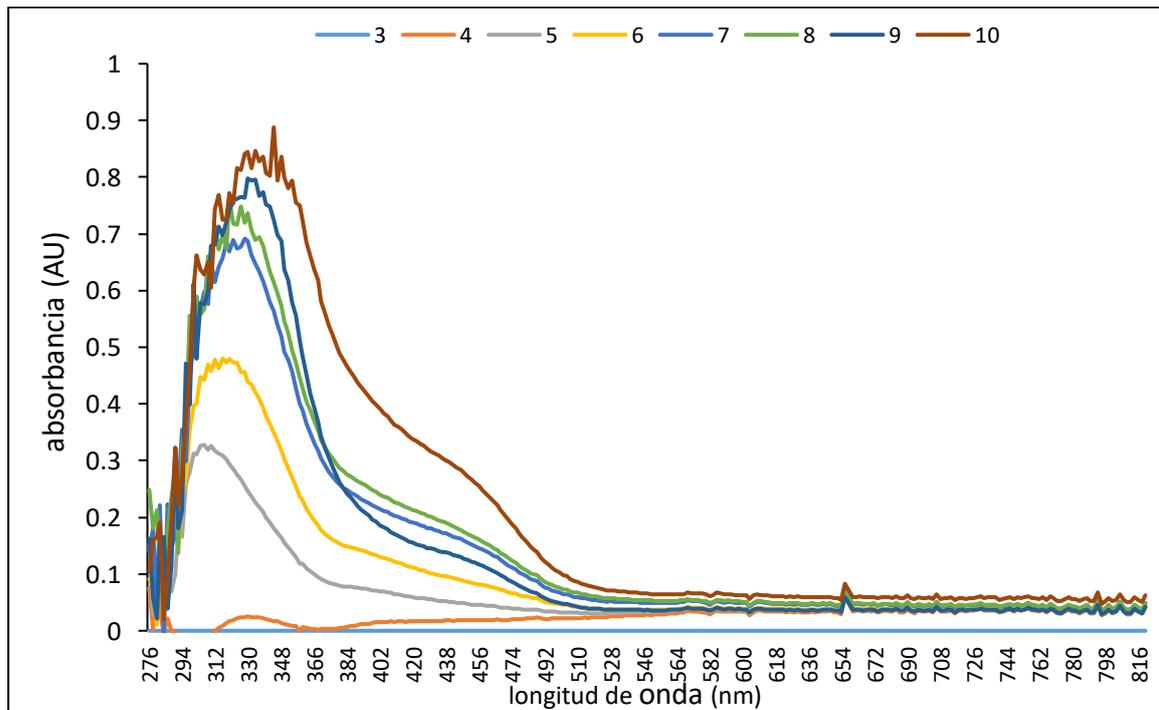


Figura 14: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa *Talaromyces brunneus* LMB-HP43 en fermentación por estado sólido durante 10 días.

Para realizar las curvas de productividad de *Penicillium mallochii* LMB-HP37 se utilizaron los valores de las absorbancias medidas en FS durante diez días. Se realizó un gráfico con los espectros de absorción en UV-Visible (ver figura 16) y así lograr evidenciar el comportamiento de la producción de colorante durante este periodo. En la figura 15 se observa el matraz con la producción de colorantes durante los diez días.

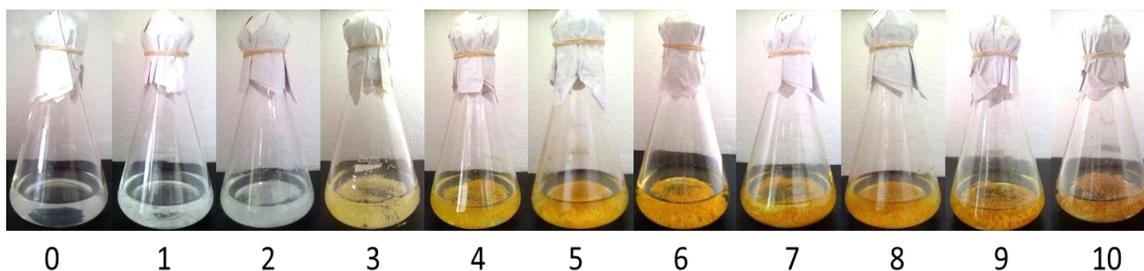


Figura 15: Producción de colorante por la cepa *Penicillium mallochii* LMB-HP37 en fermentación en sumergido durante 10 días.

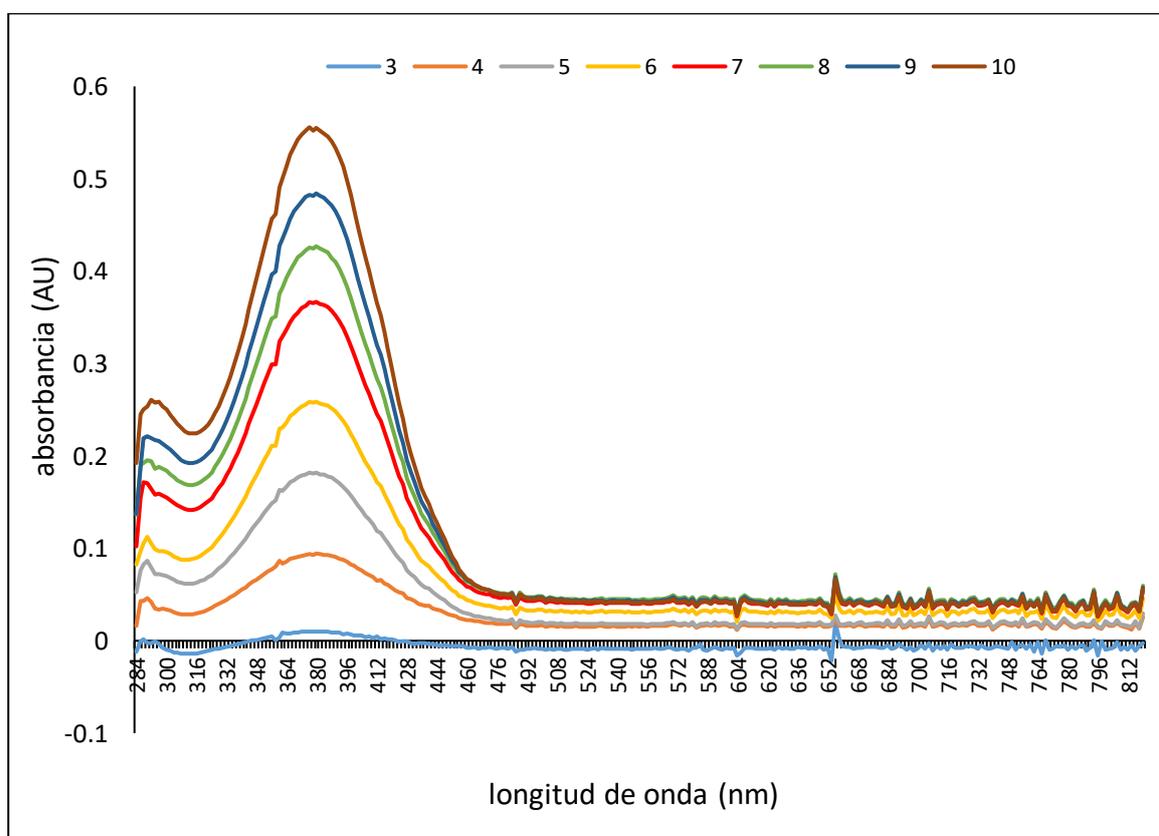


Figura 16: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa *Penicillium mallochii* LMB-HP37 en fermentación sumergido durante 10 días.

Para realizar las curvas de productividad de *Penicillium mallochii* LMB-HP37 se utilizaron los valores de las absorbancias medidas en FB durante diez días. Se realizó un gráfico con los espectros de absorción en UV-Visible (ver figura 18) y así lograr evidenciar el comportamiento de la producción de colorante durante este periodo. En la figura 17 se observa el matraz con la producción de colorantes durante los diez días.



Figura 17: Producción de colorante por la cepa *Penicillium mallochii* LMB-HP37 en fermentación por biopelícula durante 10 días.

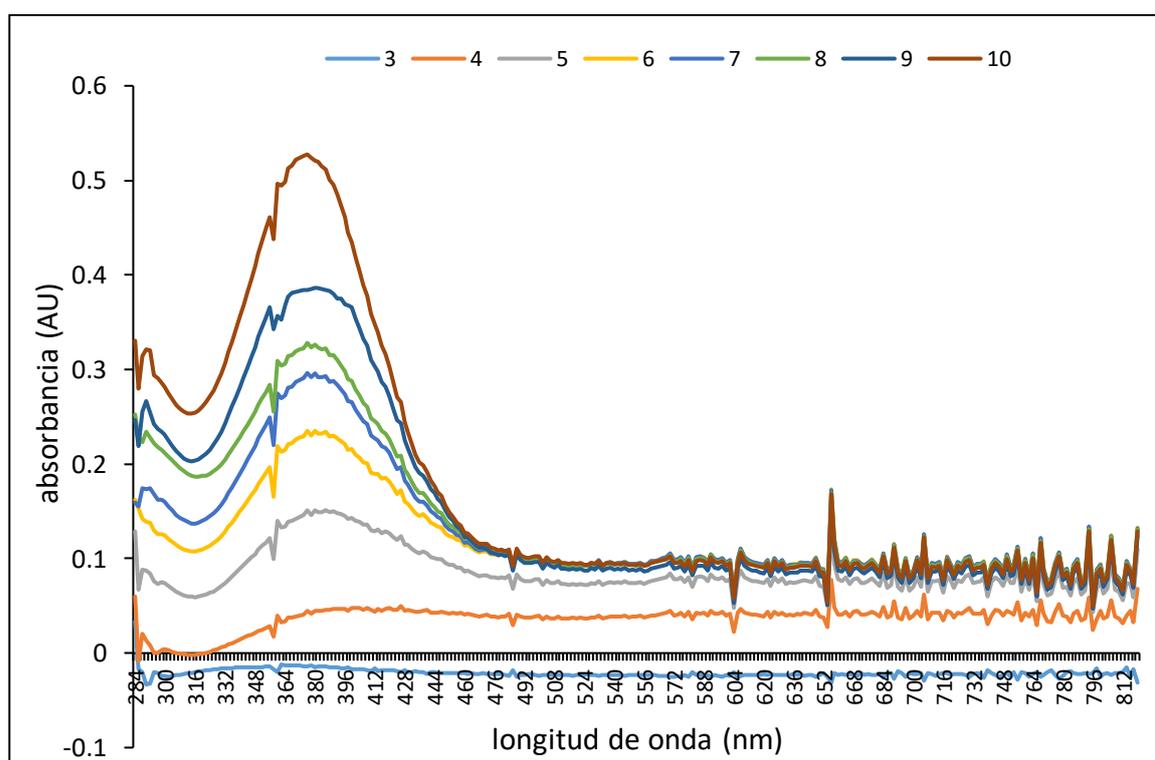


Figura 18: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa *Penicillium mallochii* LMB-HP37 en fermentación por biopelícula durante 10 días.

Para realizar las curvas de productividad de *Penicillium mallochii* LMB-HP37 se utilizaron los valores de las absorbancias medidas en FES durante diez días. Se realizó un gráfico con los espectros de absorción en UV-Visible (ver figura 20) y así lograr evidenciar el comportamiento de la producción de colorante durante este periodo. En la figura 19 se observa el matraz con la producción de colorantes durante los diez días.



Figura 19: Producción de colorante por la cepa *Penicillium mallochii* LMB-HP37 en fermentación por estado sólido durante 10 días.

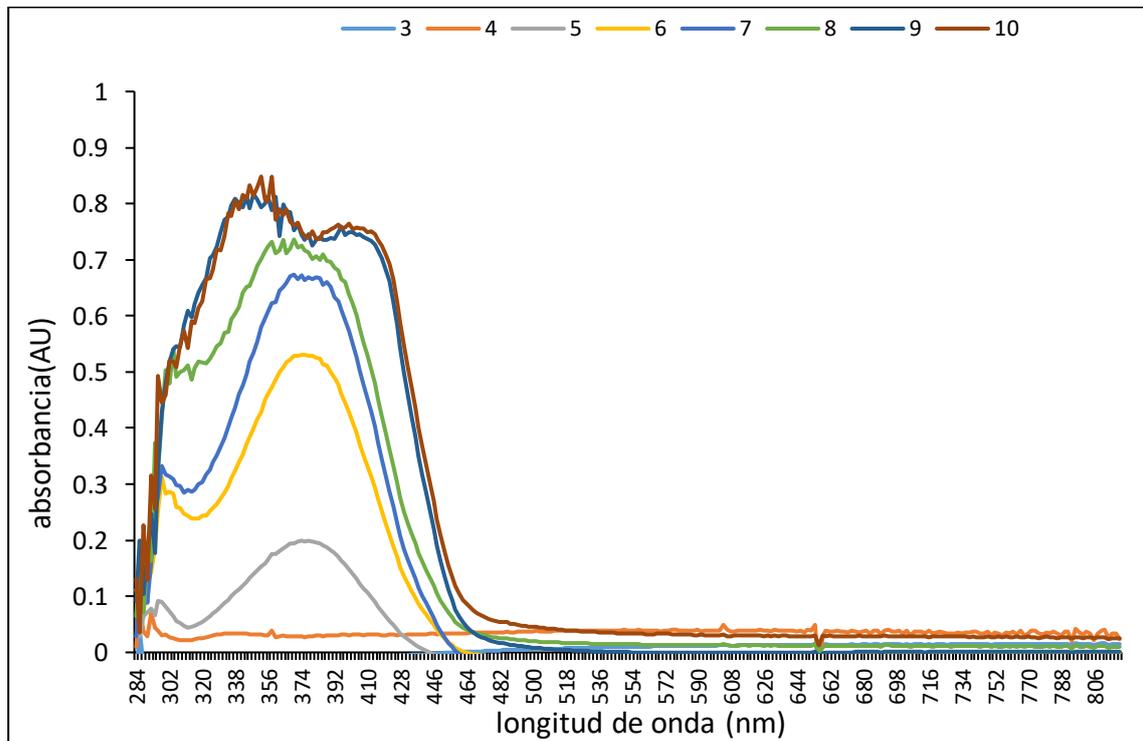


Figura 20: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa *Penicillium mallochii* LMB-HP37 en fermentación por estado sólido durante 10 días.

Para realizar las curvas de productividad de *Penicillium maximae* LMB-HP33 se utilizaron los valores de las absorbancias medidas en FS durante diez días. Se realizó un gráfico con los espectros de absorción en UV-Visible (ver figura 22) y así lograr evidenciar el comportamiento

de la producción de colorante durante este periodo. En la figura 21 se observa el matraz con la producción de colorantes durante los diez días.

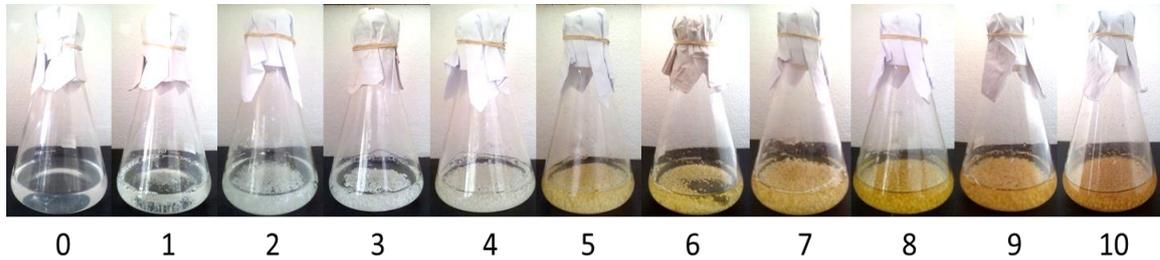


Figura 21: Producción de colorante por la cepa *Penicillium maximae* LMB-HP33 en fermentación sumergido durante 10 días.

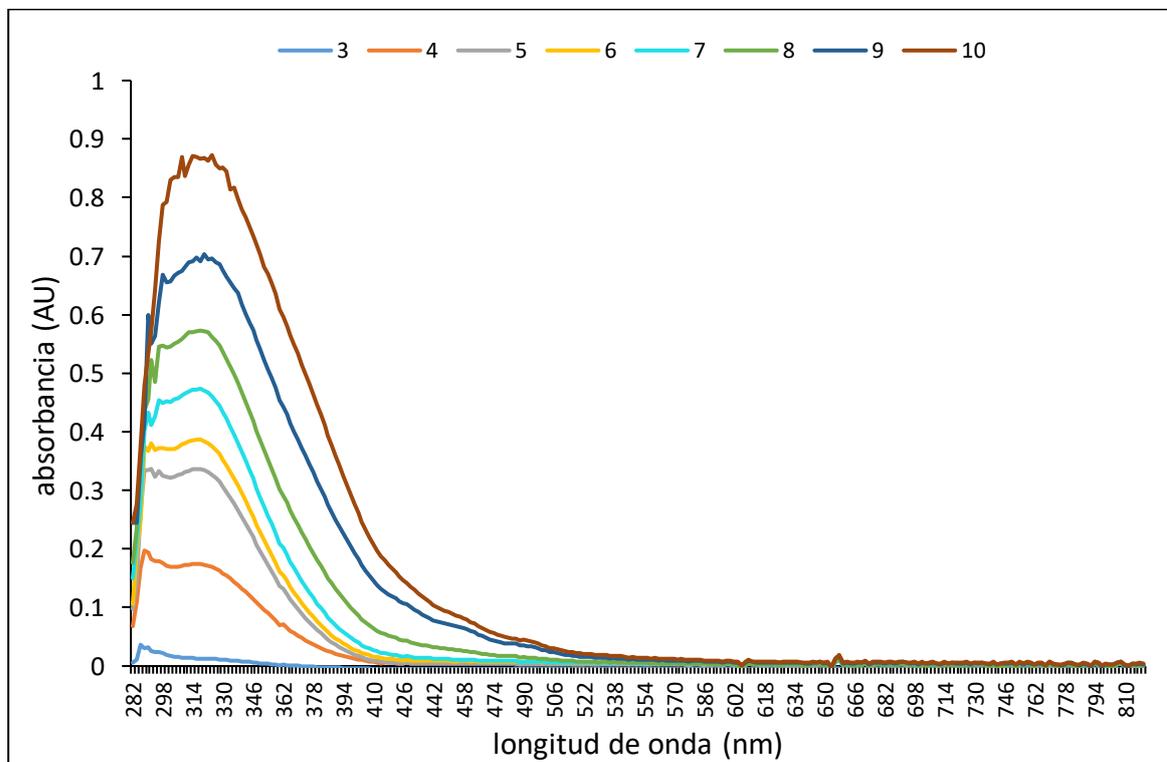


Figura 22: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa *Penicillium maximae* LMB-HP33 en fermentación en sumergido durante 10 días.

Para realizar las curvas de productividad de *Penicillium maximae* LMB-HP33 se utilizaron los valores de las absorbancias medidas en FB durante diez días. Se realizó un gráfico con los espectros de absorción en UV-Visible (ver figura 24) y así lograr evidenciar el comportamiento de la producción de colorante durante este periodo. En la figura 23 se observa el matraz con la producción de colorantes durante los diez días.

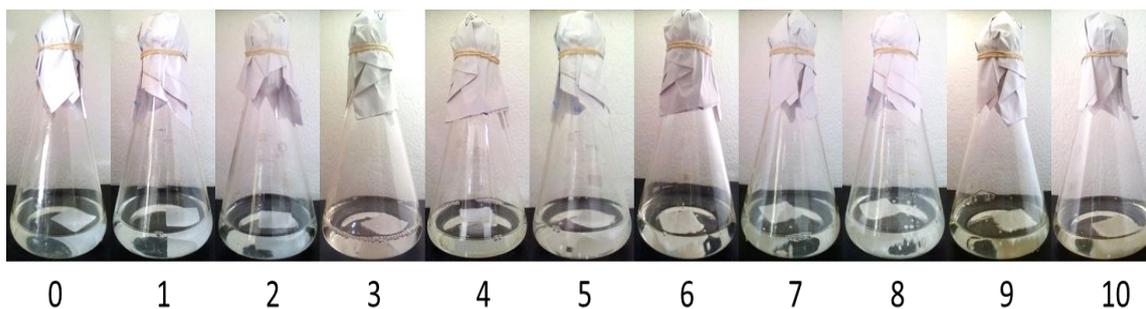


Figura 23: Producción de colorante por la cepa *Penicillium maximae* LMB-HP33 en fermentación por biopelícula durante 10 días.

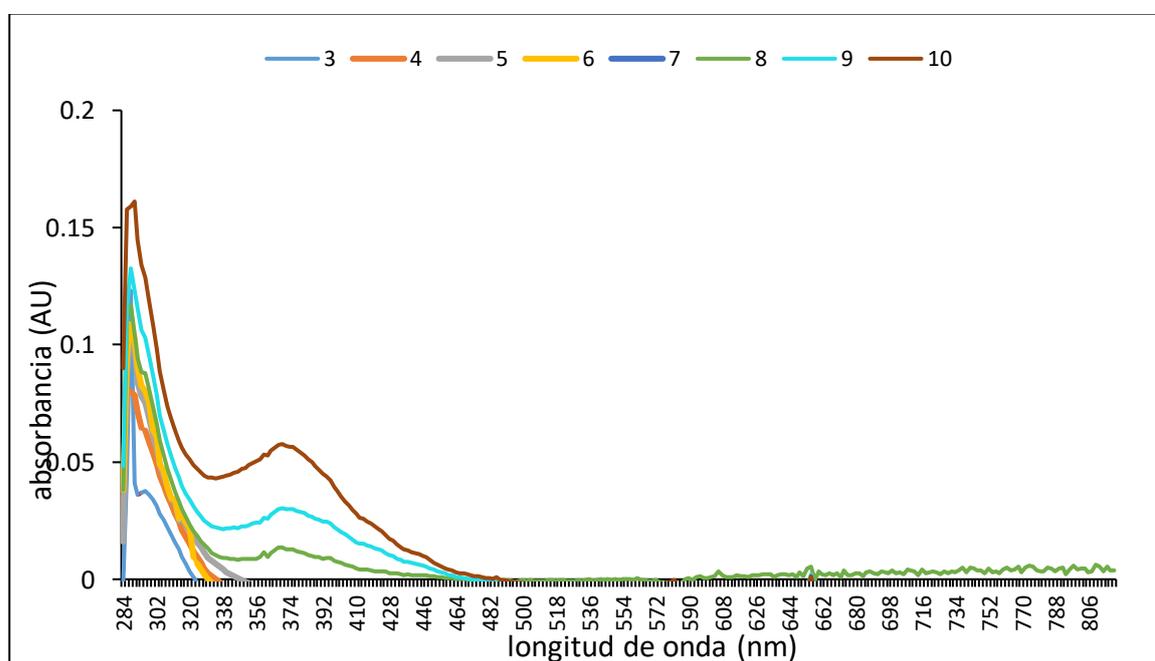


Figura 24: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa *Penicillium maximae* LMB-HP33 en fermentación por biopelícula durante 10 días.

Para realizar las curvas de productividad de *Penicillium maximae* LMB-HP33 se utilizaron los valores de las absorbancias medidas en FES durante diez días. Se realizó un gráfico con los espectros de absorción en UV-Visible (ver figura 22). En la figura 21 se observa el matraz con el crecimiento de los hongos sin producción de colorante durante los diez días.



Figura 25: Producción de colorante por la cepa *Penicillium maximae* LMB-HP33 en fermentación por estado sólido durante 10 días.

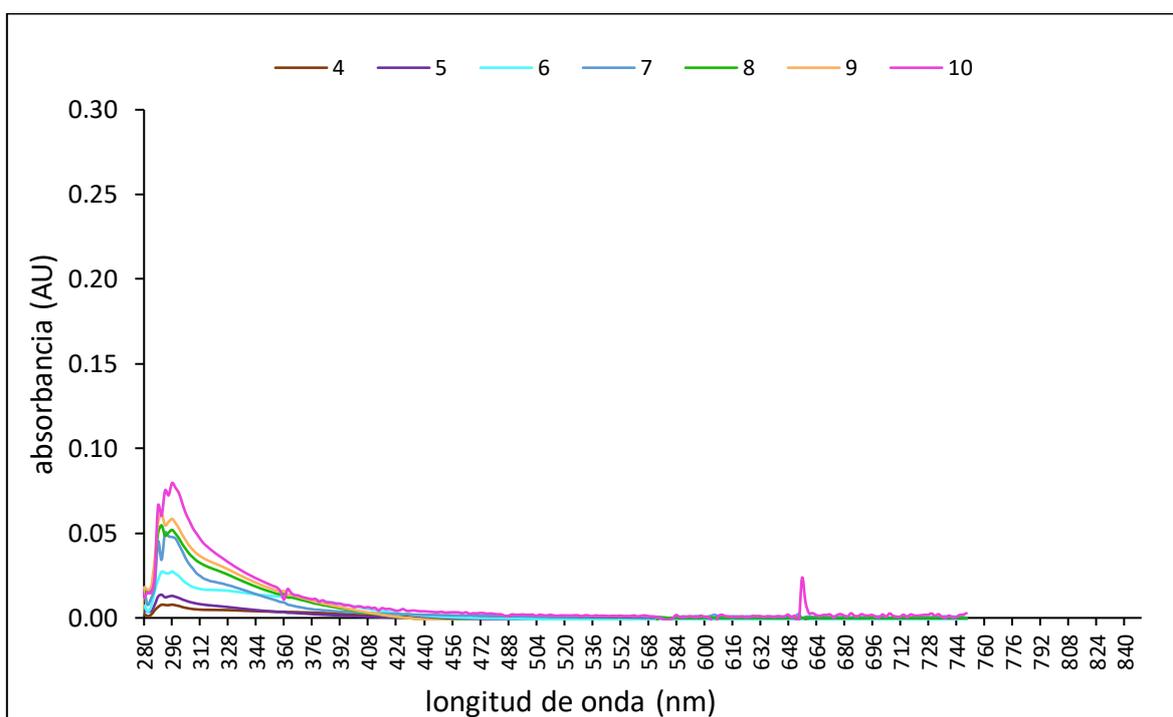


Figura 26: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa *Penicillium maximae* LMB-HP33 en fermentación en sumergido durante 10 días.

Para realizar las curvas de productividad de *Penicillium mallochii* LMB-HP19 se utilizaron los valores de las absorbancias medidas en FS durante diez días. Se realizó un gráfico con los espectros de absorción en UV-Visible (ver figura 28) y así lograr evidenciar el comportamiento de la producción de colorante durante este periodo. En la figura 27 se observa el matraz con la producción de colorantes durante los diez días.

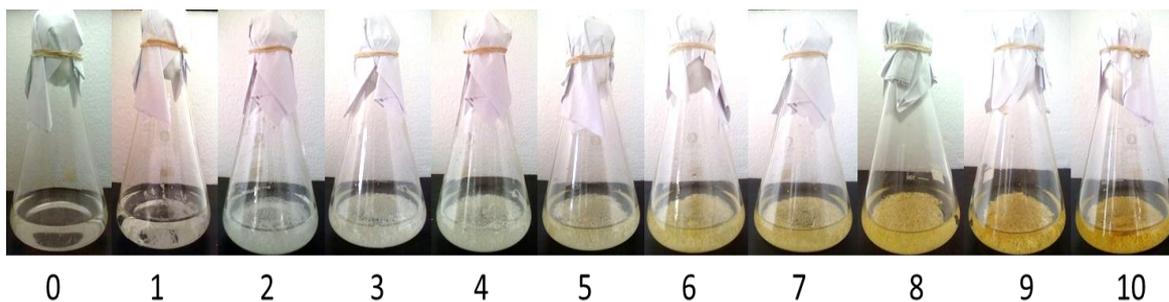


Figura 27: Producción de colorante por la cepa *Penicillium mallochii* LMB-HP19 en fermentación en sumergido durante 10 días.

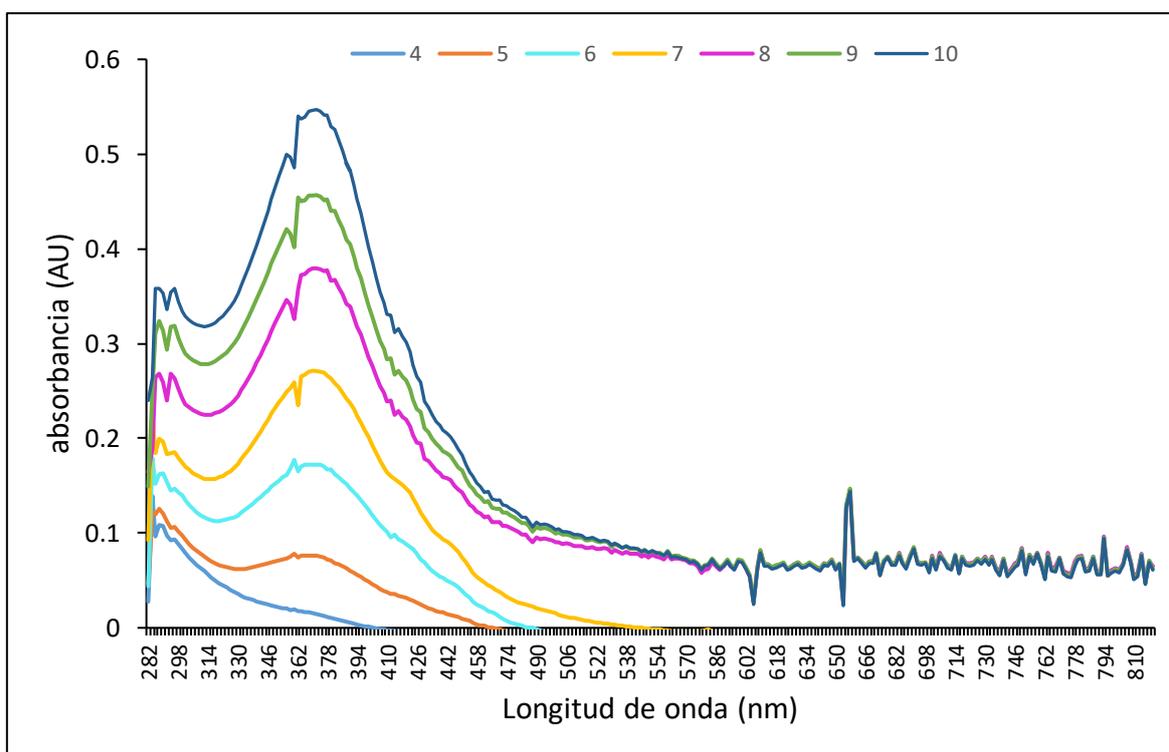


Figura 28: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa *Penicillium mallochii* LMB-HP19 en fermentación en sumergido durante 10 días.

Para realizar las curvas de productividad de *Penicillium mallochii* LMB-HP19 se utilizaron los valores de las absorbancias medidas en FB durante diez días. Se realizó un gráfico con los espectros de absorción en UV-Visible (ver figura 30) y así lograr evidenciar el comportamiento de la producción de colorante durante este periodo. En la figura 29 se observa el matraz con la producción de colorantes durante los diez días.

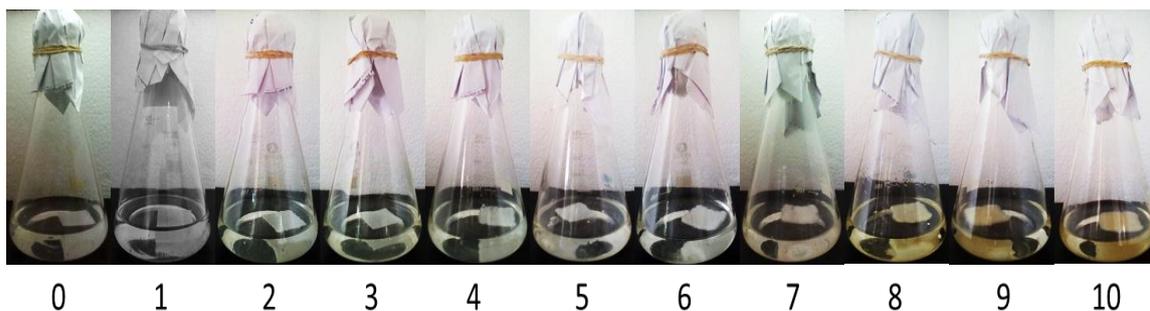


Figura 29: Producción de colorante por la cepa *Penicillium mallochii* LMB-HP19 en fermentación por biopelícula durante 10 días.

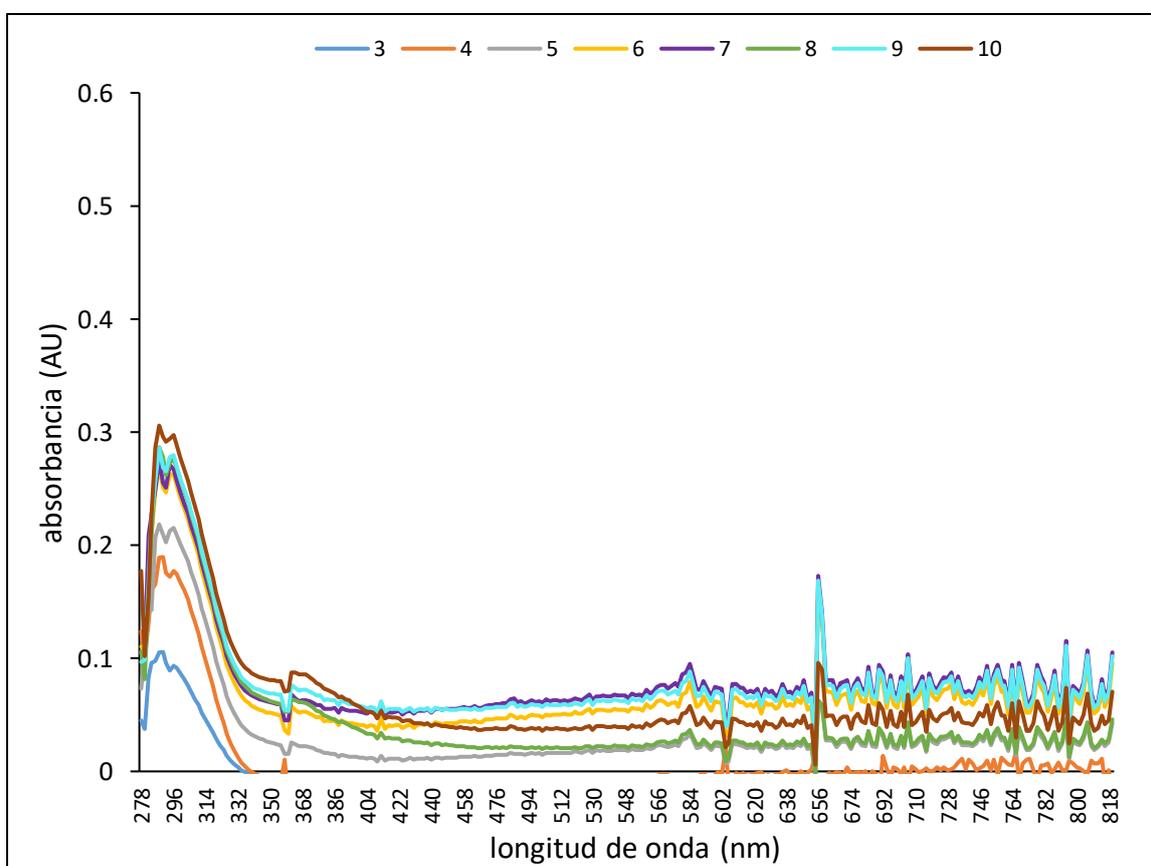


Figura 30: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa *Penicillium mallochii* LMB-HP19 en fermentación por biopelícula durante 10 días.

Para realizar las curvas de productividad de *Penicillium mallochii* LMB-HP19 se utilizaron los valores de las absorbancias medidas en FES durante diez días. Se realizó un gráfico con los espectros de absorción en UV-Visible (ver figura 32) y así lograr evidenciar el comportamiento de la producción de colorante durante este periodo. En la figura 31 se observa el matraz con la producción de colorantes durante los diez días.

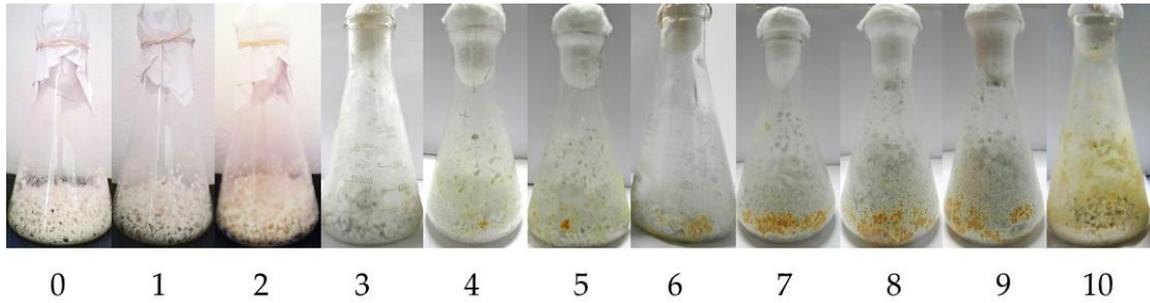


Figura 31: Producción de colorante por la cepa *Penicillium mallochii* LMB-HP19 en fermentación por estado sólido durante 10 días.

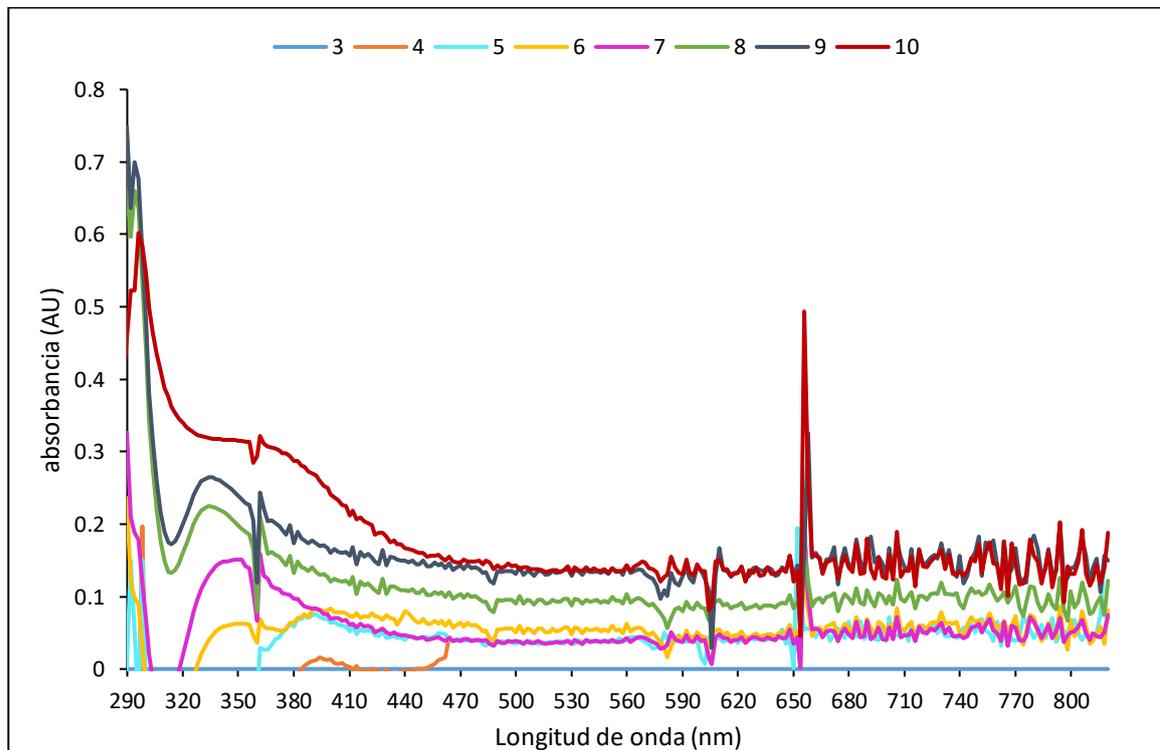


Figura 32: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa *Penicillium mallochii* LMB-HP19 en fermentación por estado sólido durante 10 días.

Para realizar las curvas de productividad de *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14 se utilizaron los valores de las absorbancias medidas en FS durante diez días. Se realizó un gráfico con los espectros de absorción en UV-Visible (ver figura 34) y así lograr evidenciar el comportamiento de la producción de colorante durante este periodo. En la figura 33 se observa el matraz con la producción de colorantes durante los diez días.

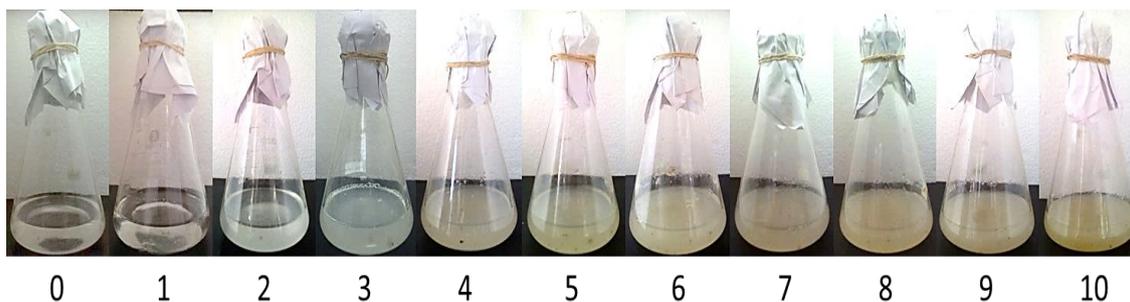


Figura 33: Producción de colorante por la cepa *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14 en fermentación sumergido durante 10 días.

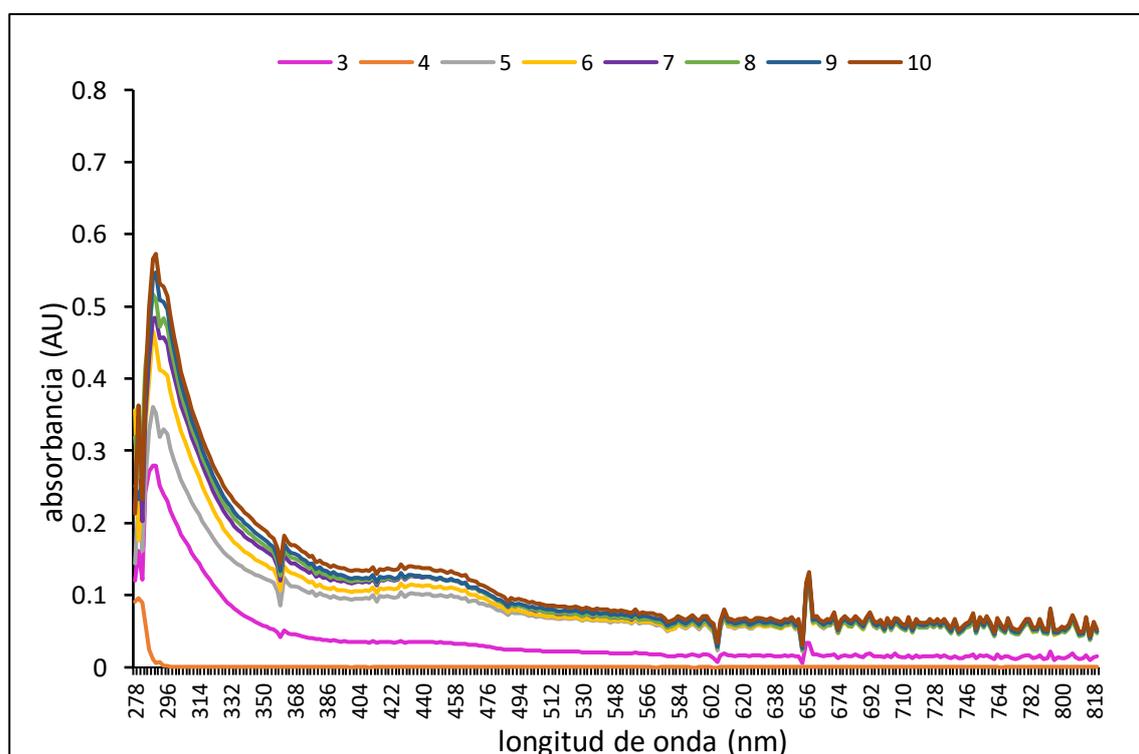


Figura 34: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14 en fermentación sumergido durante 10 días.

Para realizar las curvas de productividad de *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14 se utilizaron los valores de las absorbancias medidas en FB durante diez días. Se realizó un gráfico con los espectros de absorción en UV-Visible (ver figura 36) y así lograr evidenciar el comportamiento de la producción de colorante durante este periodo. En la figura 35 se observa el matraz con la producción de colorantes durante los diez días.

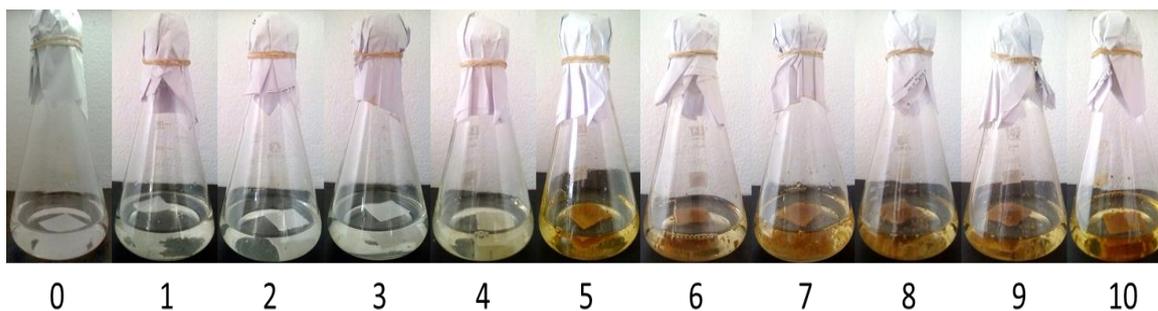


Figura 35: Producción de colorante por la cepa *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14 en fermentación por biopelícula durante 10 días.

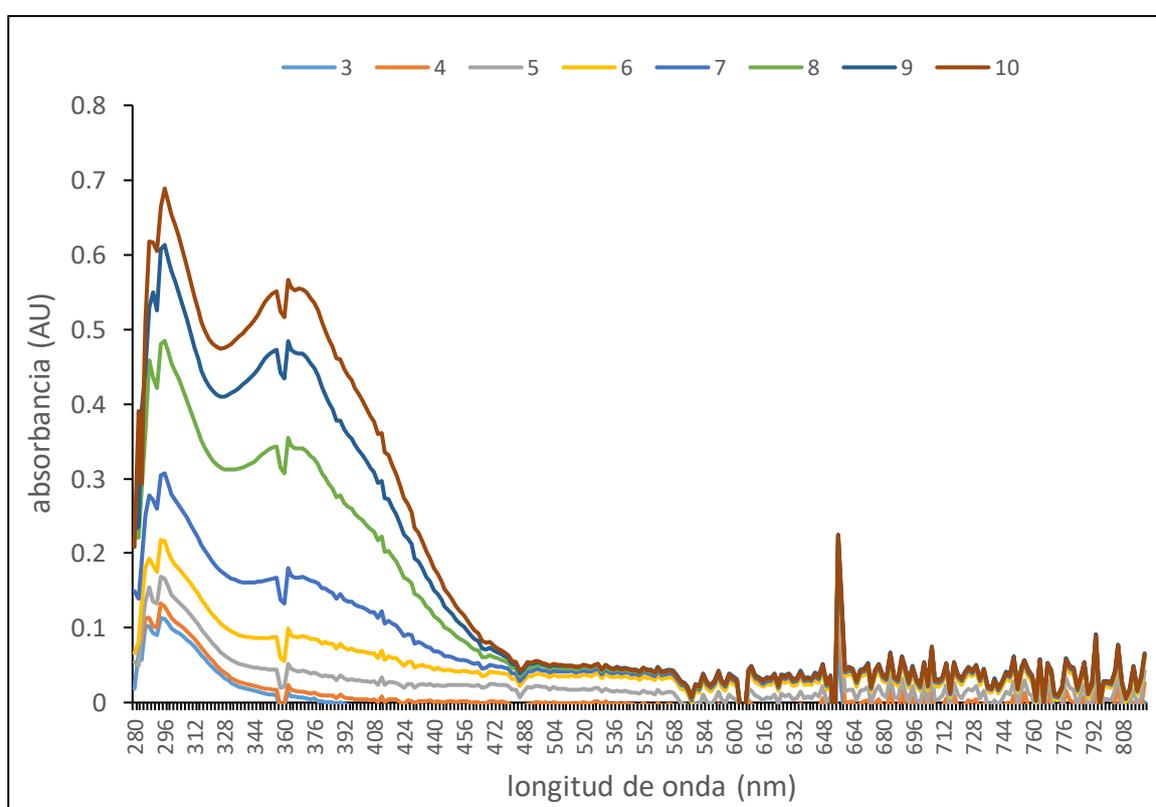


Figura 36: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14 en fermentación por biopelícula durante 10 días.

Para realizar las curvas de productividad de *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14 se utilizaron los valores de las absorbancias medidas en FES durante diez días. Se realizó un gráfico con los espectros de absorción en UV-Visible (ver figura 38). En la figura 37 se observa el matraz con el crecimiento de los hongos sin producción de colorante durante los diez días.

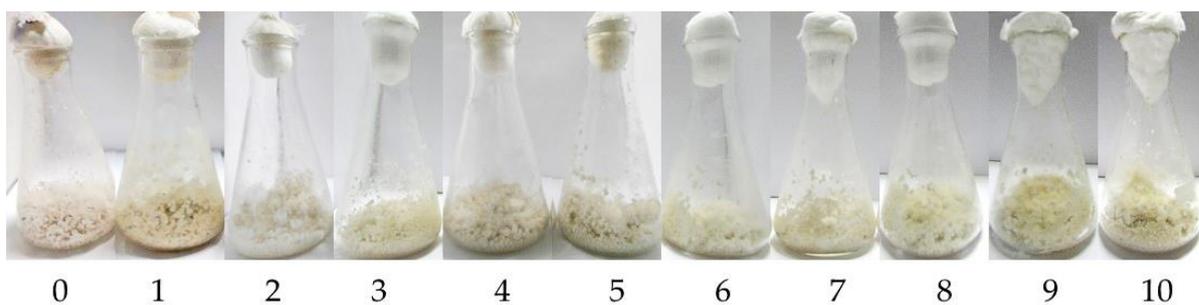


Figura 37: Producción de colorante por la cepa *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14 en fermentación por estado sólido durante 10 días.

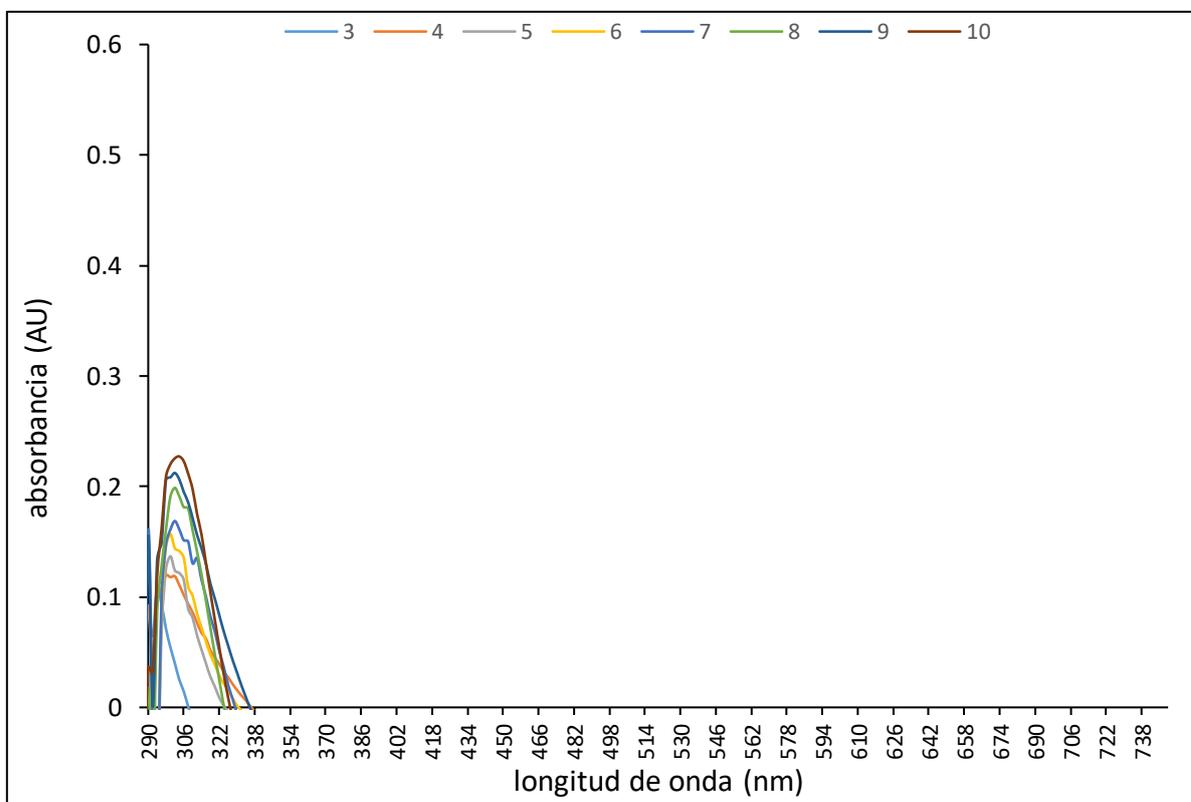


Figura 38: Espectros de absorción UV-Visible del colorante producido por la cepa *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14 en fermentación por estado sólido durante 10 días.

4.3. COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE COLORANTES EN LAS 5 CEPAS A LOS 7 DÍAS

Los colorantes son productos fermentativos, por lo que se ven afectados por la temperatura, el pH, la fuente de carbono, la aireación y el tipo de fermentación (Mukherjee et al., 2017). Todos estos factores serán tratados en los siguientes párrafos.

Para el caso del sistema de fermentación en estado sólido (FES) se utilizó un soporte inerte impregnado con caldo de cultivo Czapek. Ooijkaas, Weber, Buitelaar, Tramper, & Rinzema, (2000), consideran que con este tipo de soporte se obtiene un sistema más definido, que permite un mejor control y monitoreo del proceso, además de una mayor consistencia del mismo y un producto de alta pureza, en comparación con el cultivo utilizando soportes sólidos naturales (Hongzhang, 2013). Adicionalmente, el soporte inerte, en este caso perlita (Agrolite, Schultz Co., St. Louis, USA), tiene suficiente porosidad y superficies disponibles para la adhesión de esporas y el crecimiento de micelios (Gamarra et al., 2010).

Como se observa en la figura 39, existen diferencias en la producción de colorantes entre los tres sistemas de fermentación evaluados. FES exhibe el mayor rendimiento de producción de colorantes frente a los otros dos sistemas, siendo *Talaromyces brunneus* LMB-HP43 la cepa con mayor rendimiento de producción de colorantes (1019.92 UC/g biomasa), seguido por *Penicillium mallochii* LMB-HP37 (633.75 UC/g biomasa). Este resultado puede deberse a que los colorantes producidos, al tener una baja solubilidad en el medio líquido de una FS, son retenidos en el micelio; a diferencia del sistema FES, donde los colorantes intracelulares se difunden en la matriz sólida circundante. Esta condición generaría una desrepresión de la síntesis de colorantes en sistemas sólidos (Dufossé, 2019). Manan, (2017), concuerda en ese sentido con Dufossé, (2019) y agrega que este fenómeno podría deberse a una inhibición mínima por parte del producto.

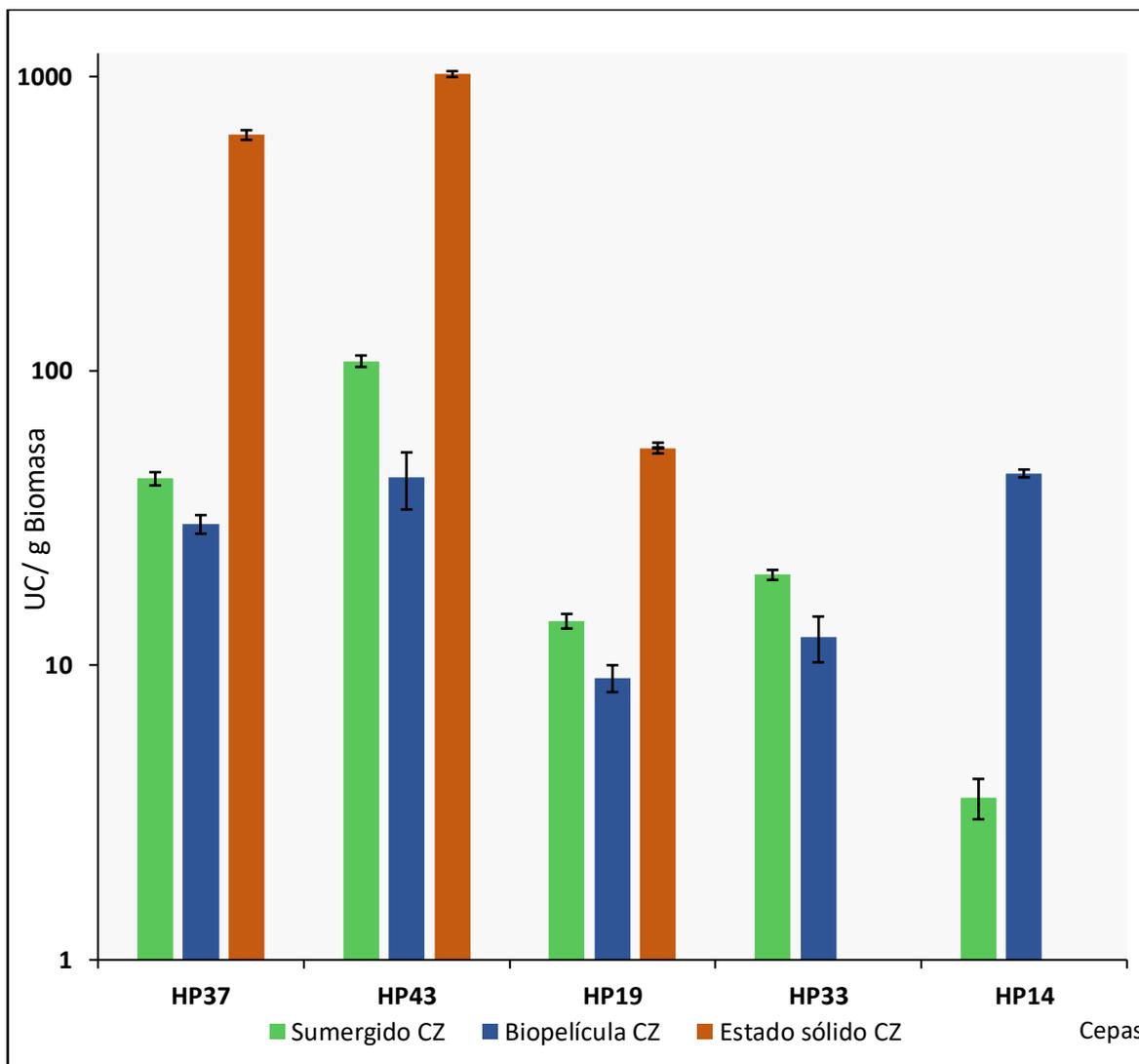


Figura 39: Comparación de la producción de colorantes con base en el rendimiento UC/g biomasa entre *Penicillium mallochii* LMB-HP37, *Talaromyces brunneus* LMB-HP43, *Penicillium maximae* LMB-HP33, *Penicillium mallochii* LMB-HP19 y *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14 a los 7 días, en fermentación en sumergido y fermentación por adhesión a superficies: biopelícula y estado sólido con caldo Czapek.

Cabe mencionar que la morfología micelial es más adecuada para la producción de metabolitos secundarios microbianos (Srivastava, Srivastava, Ramteke, & Mishra, 2019), ya que la capacidad de excreción se incrementa cuando la biomasa fúngica se adhiere a un soporte determinado (Musoni et al., 2015).

Por lo tanto, las ventajas que presenta el sistema FES podrían estar relacionadas con las propiedades fisiológicas y genéticas de los microorganismos que crecen adheridos a la superficie de los soportes, los cuales podrían desencadenar los mecanismos de expresión

génica diferencial, ausentes en la fermentación sumergida convencional (Gamarra et al., 2010; Gutiérrez-Correa et al., 2012).

Por el contrario, las cepas *Penicillium maximae* LMB-HP33 y *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14 no generaron colorantes en FES (ver figura 39), a pesar que todas las cepas fueron tratadas con los mismos parámetros de pH, temperatura, humedad, tamaño de inóculo, tipo y tamaño de sustrato inerte. No obstante, aún existen vacíos referidos a investigaciones sobre las interacciones entre parámetros físico-químicos del medio de cultivo y el establecimiento de vínculos entre la morfología de los hongos y los niveles de colorantes. (Gmoser, Ferreira, Lennartsson, & Taherzadeh, 2017). Adicional a esto, Morales-Oyervides et al., (2020), menciona que los colorantes producidos por *Talaromyces sp.* y *Penicillium sp.* dependerán en gran medida de las condiciones de fermentación y la composición del medio. Mientras que Manan & Webb, (2018a) indican que para mantener un crecimiento homogéneo en el sistema FES se suele recomendar un inóculo de gran tamaño, el cual podría impactar profundamente el resultado del proceso. Por lo que, es posible que las dos cepas antes mencionadas hayan necesitado de un ajuste en los valores de los parámetros ya sea de pH, temperatura y humedad. Son temas de investigación aún por esclarecer.

Por otro lado, se observa en la figura 39 que *Penicillium mallochii* LMB-HP37, *Talaromyces brunneus* LMB-HP43, *Penicillium mallochii* LMB-HP19 y *Penicillium maximae* LMB-HP33 en sistema FS presentan un mayor rendimiento de producción de colorante (43.10 UC/g biomasa, 108.07 UC/g biomasa, 14.15 UC/g biomasa y 20.32 UC/g biomasa respectivamente), respecto a FB. Sin embargo, *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14, a pesar de no generar colorante en FES, es la única cepa que presenta un mayor rendimiento de producción de colorante en FB (44.91 UC/g biomasa) respecto a FS (3.56 UC/g biomasa).

Este comportamiento variable en los rendimientos en FS en cada una de las cinco cepas, podría deberse a la morfología propia de cada hongo. Los hongos pueden adoptar diversas morfologías cuando se cultivan en sistema FS, como filamentos largos y uniformes o enredados en pellets o grumos, lo cual influye en la secreción de metabolitos. En este sentido, una alta concentración de hongos con micelios enredados genera una suspensión muy viscosa, como lo visualizado en los cultivos de *Talaromyces brunneus* LMB-HP43 y *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14, con propiedades no newtonianas, lo que reduce la homogeneidad en

la nutrición, la temperatura, el oxígeno y otros parámetros. Por otro lado, el crecimiento en forma de pellets densos crea un medio menos viscoso con propiedades newtonianas; no obstante, la tasa de transferencia de masa interna está limitada por el tamaño y compacidad del pellet, lo que generaría cambios en la transferencia de masa-gas-líquido que afectarían la formación y secreción de colorantes (Gmoser et al., 2017; Torres et al., 2016). Por lo tanto, es posible que además de la morfología propia de cada cepa existan otros factores que influyan en el rendimiento de producción de colorantes.

Mapari & Meyer, (2008) y Méndez et al., (2011), concuerdan en que el crecimiento en sistema FS en forma de pellets favorece la producción de colorantes amarillos, lo cual coincide con la morfología y rendimientos de *Penicillium mallochii* LMB-HP37, *Penicillium mallochii* LMB-HP19 y *Penicillium maximae* LMB-HP33 (ver figura 40, 46 y 49 respectivamente) mas no de *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14 (ver figura 52) y *Talaromyces brunneus* LMB-HP43 (ver figura 43). Esta última, a pesar de poseer un crecimiento en filamentos sin formación de pellets y muy viscosa, exhibe uno de los rendimientos más altos.

De acuerdo con Gmoser et al., (2017) y Morales-Oyervides et al., (2020), la morfología y posterior producción de colorantes de estos hongos están influenciadas por la temperatura, pH, agitación y condiciones nutricionales. Teniendo en cuenta lo anterior, la mayoría de los estudios en los que se evaluaron las condiciones ambientales para la producción de colorantes, han reportado una temperatura óptima entre 24 °C y 30 °C. Sin embargo, Pandey, Jain, Pandey, & Tamta, (2018) han informado que la máxima producción en cepas de *Penicillium sp.* se puede dar a temperaturas bajas (15 °C). En la presente investigación se utilizó y controló una temperatura igual a 28 °C, considerando la bibliografía revisada y el ecosistema de donde fueron extraídos los hongos (punto 3.3).

Desde otro punto de vista, es difícil interpretar los resultados obtenidos en FS debido al uso de cultivos en matraces agitados, en los que el pH cambia durante el cultivo (Manan, 2017). El pH inicial puede interactuar con otros factores, como los componentes del medio, dando como resultado diferentes niveles óptimos de pH. Un claro ejemplo de esta condición son los estudios realizados para la producción de colorantes a partir de *T. amestolkiae* DPUA 1275 (anteriormente citado como *P. purpurogenum* DPUA 1275) en donde se establecen pH óptimos de 4.5, 5 y 7 en diferentes medios (Morales-Oyervides et al., 2020). El pH inicial

utilizado en la presente investigación fue de 6.5; aun cuando dicho valor se encuentre dentro del rango de 4.5 a 6.5 mayormente utilizado por algunos autores (Afshari, Shahidi, Mortazavi, Tabatabai, & Es'haghi, 2015; de Oliveira, Pedrolli, Texeira, & Santos-Ebinuma, 2019; Méndez et al., 2011; V. C. Santos-Ebinuma et al., 2014), no se podría descartar que durante el cultivo y el metabolismo, el pH varíe ampliamente y pueda originar cambios químicos o estructurales en la membrana celular y en consecuencia, generar alteraciones morfológicas en la pared celular. Esta condición podría ocasionar una sobreproducción de colorantes como mecanismo de defensa para regular el daño a nivel de la membrana (Méndez et al., 2011) o afectar la ruta de biosíntesis de colorantes, como lo demostrado por Jia et al., (2019) quienes indicaron que niveles más bajos de pH inhiben la reacción de aminación de monascorubrina y rubropunctatina.

Por otro lado, la agitación utilizada en los sistemas FS y FB fue de 175 rpm. Cabe mencionar que Venkatachalam, Shum-Chéong-Sing, & Dufossé, (2020), evaluaron este valor durante el proceso de producción de colorantes en *Talaromyces albobiverticillius* 30,548 y concluyeron que los colorantes y la biomasa son afectados negativamente a velocidades de agitación por encima de 158 rpm. Estos resultados son apoyados por Afshari et al., (2015); de Oliveira et al., (2019); Gamarra et al., (2010); Heo et al., 2018; Shah, (2015); Tirumale & Wani, (2018). Por consiguiente, una mayor velocidad de agitación implica una mayor tasa de absorción de oxígeno del microorganismo y en consecuencia, una mayor tasa de transferencia de nutrientes (Garcia-Ochoa, Gomez, Santos, & Merchuk, 2010).

Respecto a las condiciones nutricionales, se trabajó en los tres sistemas con medio Czapek (NaNO_3 , 2.0 g/l, K_2HPO_4 , 1.0 g/l, KCl, 0.5 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001g/l, sacarosa, 20 g/l). De acuerdo a la revisión de literatura, las fuentes de carbono que promueven altos rendimientos de producción de colorantes son sacarosa (Chadni, Rahaman, Jerin, & Hoque, 2017) y ramnosa (Celestino et al., 2014). Santos-Ebinuma et al., (2013) encontraron que la sacarosa era la mejor fuente de carbono para el crecimiento de micelios, mientras que el almidón era el mejor para la producción de colorantes. Por lo expuesto, en la presente investigación se decidió utilizar la sacarosa como fuente de carbono, ya que la mayoría de estos autores señalan que el uso de carbohidratos simples (glucosa o fructosa) inducen el crecimiento celular, pero inhiben la producción de colorantes. Este comportamiento es

conocido como represión por catabolito (Morales-Oyervides et al., 2020; Santos-Ebinuma et al., 2013).

Adicional a la fuente de carbono utilizada también es muy importante la fuente de nitrógeno, el cual afecta el perfil de las moléculas de colorantes obtenido (Morales-Oyervides et al., 2020). En la presente investigación se utilizó una fuente inorgánica, el nitrato de sodio (NaNO_3), aunque para algunos estudios, las fuentes orgánicas son mucho mejores que las inorgánicas (Celestino et al., 2014; de Oliveira et al., 2019; Morales-Oyervides et al., 2020; Santos-Ebinuma et al., 2013). Se ha visto que para la esclerotiorina, un colorante producido por *Penicillium mallochii*, el uso de peptona y extracto de levadura favoreció en seis veces más su producción en comparación con el nitrato de sodio (usado comúnmente en el medio Czpek)(Celestino et al., 2014). En general, se ha visto que las fuentes de carbono y nitrógeno influyen en el crecimiento de hongos, el tipo de colorante producido y el rendimiento del mismo (Pisareva & Kujumdzieva, 2010), lo cual se confirma con el trabajo de Rosas, (2017) en donde utilizaron las mismas cepas de esta investigación, *Penicillium mallochii* LMB-HP37, *Talaromyces brunneus* LMB-HP43, *Penicillium maximae* LMB-HP33, *Penicillium mallochii* LMB-HP19, *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14 pero cultivadas en FS con caldo papa dextrosa (papa 5 por ciento p/v, glucosa 20 por ciento p/v), evidenciándose diferentes rendimientos en la producción de colorantes para cada cepa.

Por otra parte, si FB es un sistema de producción homogéneo dentro de un ambiente líquido basado en la infraestructura del proceso de FS con la eficiencia productiva del FES (Gutiérrez-Correa et al., 2012), entonces se esperaría un mayor rendimiento de producción de colorante en FB en comparación a FS para todas las cepas. De acuerdo a las investigaciones de Gamarra et al., (2010); Gutiérrez-Correa et al., (2012); Gutiérrez-Correa & Villena, (2010), la fermentación en biopelículas es un sistema potencialmente efectivo que muestra altos rendimientos de producción y mayor eficiencia metabólica. No obstante, sólo *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14 exhibió un mayor rendimiento en FB (44.91 UC/g biomasa) entre las cepas, aunque es un valor que no exhibe grandes ventajas productivas frente al máximo rendimiento en FS (108.07 UC/g biomasa) de *Talaromyces brunneus* LMB-HP43 (ver figura 39).

Para algunos autores, los hongos que crecen en biopelículas tienen un fenotipo único, comparado con las células libres (Castrillón Rivera, Palma Ramos, & Padilla Desgarenes, 2013; Desai, Mitchell, & Andes, 2014) de un cultivo FS, los cuales le confieren varias ventajas ecológicas, como la disponibilidad de nutrientes, cooperación metabólica, protección del medio ambiente y la adquisición de nuevas características (Rodrigues & Černáková, 2020). Sin embargo, los resultados antes mencionados no exhiben esas ventajas en rendimiento de producción respecto a los otros dos sistemas de fermentación. Pese a que en la presente investigación los cinco hongos crecieron formando biopelícula y produciendo colorantes en mayor o menor medida, es posible considerar que existan otras variables, además de los factores mencionados anteriormente, como la adhesión de las esporas al soporte, la cual es diferente para cada hongo. Asimismo, las características de las esporas, como el tamaño y las propiedades de la superficie, también pueden influir en la cinética de la biopelícula (Siqueira & Lima, 2013). En esta última, la rugosidad de la superficie de las esporas juega un papel importante en su primera unión física a la superficie de apoyo, y este proceso es ayudado por la producción de material adhesivo que forma almohadillas debajo de las esporas (Gamarra et al., 2010; Gutiérrez-Correa et al., 2012).

Para Gamarra et al., (2010) a diferencia de FS, en donde se ha investigado más el desarrollo de la morfología, en FB los estudios sobre los patrones de crecimiento de hongos afectados por el tipo de soporte son limitados; pese a ello, considerando que en la presente investigación se utilizó tela de poliéster como soporte para FB, García, (2020) observó que la adhesión en tela de poliéster no es la más óptima, pero sí en fibra de poliéster para cultivo en FB, e incluso disminuyó la biomasa con respecto al uso del soporte de tela. Es una posibilidad para futuras investigaciones probar con otros tipos de soportes que aseguren una mejor adhesión y compatibilidad con cada cepa, tomando en cuenta las propiedades físicas del soporte como la hidrofobicidad, la carga electrostática y la rugosidad de la superficie (Gutiérrez-Correa et al., 2012), además de un diseño experimental con factores químicos y físicos específicos para cada cepa.

Es interesante como la cepa *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14 tiene un mayor rendimiento en FB más no en FS, considerando que este último es un sistema bastante utilizado para la producción de colorantes en *Talaromyces. sp* y *Penicillium.sp* (Gunasekaran & Poorniammal, 2008; Méndez et al., 2011). Sin embargo, la producción de colorante en FS genera el caldo de

cultivo más viscoso de todas las cepas, lo cual podría deberse a su propia morfología o a la producción de algún tipo de exopolisacárido. Existen varios grupos de microorganismos productores de exopolisacáridos (EPS) con diferentes propiedades y aplicaciones (Abou Zied, Abd El-Zaher, Elsharquawy, & Hammad, 2017). Estos EPS pueden afectar significativamente la viscosidad de todo el caldo de cultivo, más que el propio micelio de la biomasa (E. J. Cho, Oh, Chang, & Yun, 2006) y depende principalmente de las condiciones de cultivo, morfología celular y el tipo de cepa (Al-Manhel, 2017; Mahapatra & Banerjee, 2013; Osinska-Jaroszuk et al., 2015). Todo esto podría explicar el porqué de un mejor desempeño en FB, con un caldo de cultivo menos viscoso y con mayor contenido de colorantes, en donde la morfología de la biopelícula se describe como una estructura tridimensional compleja con células generalmente encerradas dentro de una matriz extracelular compuesta por sustancias poliméricas (EPS) (Costa-Orlandi et al., 2017; Siqueira & Lima, 2013). Sin embargo, a la fecha no existe información que confirme este supuesto, por lo cual sería un tema para investigaciones futuras.

Estadísticamente (ver anexo 14), *Penicillium mallochii* LMB-HP37 y *Talaromyces brunneus* LMB-HP43, son las dos cepas con mejores rendimientos de producción de colorantes en los tres sistemas de fermentación y con mayores proyecciones para futuras investigaciones en colorantes fúngicos y optimización de procesos respecto al resto de las cepas estudiadas (ver figura 39). *Penicillium mallochii* LMB-HP37 ha sido identificada como productora de esclerotiorina, (Bouhri et al., 2020; dos Santos et al., 2019; Morales-Oyervides et al., 2020) un colorante de la familia de las azafilonas con actividad contra las bacterias *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Streptomyces pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y la levadura *Candida albicans* (Hernández, 2012). Esclerotiorina es el componente principal del grupo de metabolitos esclerotiorina. Aunque wortmina pertenece a este grupo, es un metabolito que ha sido aislado de *Talaromyces wortmannii* (dos Santos et al., 2019). A la actualidad no existe información sobre la producción de micotoxinas en *Penicillium mallochii* LMB-HP37. Por otro lado, la especie *Talaromyces brunneus* LMB-HP43 ha sido reportada como productora de rugulosina, skyrina, mitorubrina, mitorubrinol y acetato de mitorubrinol (Yilmaz, Visagie, Houbraken, Frisvad, & Samson, 2014), de los cuales se sabe que rugulosina y skyrina son micotoxinas (Tolosa, Barba, Pallarés, & Ferrer, 2020; Yilmaz et al., 2016); mientras que mitorubrina, mitorubrinol y acetato de mitorubrinol son colorantes amarillos policétidos del tipo azafilona (Yilmaz et al., 2014). Es importante profundizar en la producción

de colorantes ausentes de micotoxinas, o en la determinación de los sistemas de fermentación donde se expresaría la producción de micotoxinas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación, se podría recomendar la producción de colorantes en FES, debido a los altos rendimientos observados frente a FS y FB. Sin embargo, pese a estos resultados cuantitativos y visuales, el análisis estadístico determinó que no existen diferencias significativas entre los tres sistemas (ver anexo 13). Considerando el alto costo que supuso el desarrollo del sistema FES en la presente investigación, al utilizar un medio definido siete veces concentrado (Czapek) y un soporte inerte específico (no se utilizaron desechos industriales como en otras investigaciones), además de la aplicación de un proceso de “downstream” y el control complejo de parámetros fisicoquímicos (pH, temperatura, agitación y transferencia de calor) (Srivastava et al., 2019), se podría optar por el sistema FS, el cual es un sistema fácil de realizar en comparación de FES. No obstante, FES es una forma de producción fermentativa altamente efectiva que requiere de mayores investigaciones.

Por último, es posible que el origen de la variabilidad en los rendimientos de producción de colorantes entre los tres sistemas de fermentación se deba a la interacción entre los diferentes factores de temperatura, pH, agitación, fuente de carbono y nitrógeno, por lo que no se podría considerar el cambio de una sola variable de manera independiente. Aunque es complicado dar respuesta a la variación de los rendimientos en cada sistema de fermentación, se debe resaltar que se trabajó con cinco hongos entre los géneros *Penicillium sp.* y *Talaromyces sp.* con características y necesidades propias de su especie para su crecimiento y producción óptimos de colorantes (lo cual quedó demostrado en los análisis estadísticos). Por tanto, el método más apropiado para la elección de un sistema de fermentación en particular debe elegirse en función de la simplicidad del procedimiento, costo y precisión (Manan & Webb, 2018b).

4.4. ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE COLORANTES A LOS 7 DÍAS.

A continuación, se presentan los espectros de absorción de colorantes producidos durante siete días en FS, FB y FES.

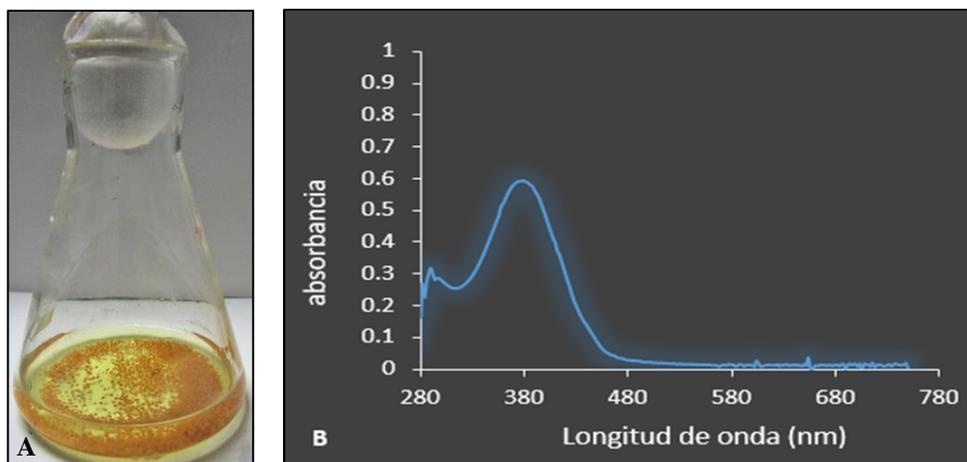


Figura 40: Producción de colorantes por *Penicillium mallochii* LMB-HP37 en fermentación en sumergido durante 7 días.

A, Foto del matraz con el colorante producido por la cepa *Penicillium mallochii* LMB-HP37. B, Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido.

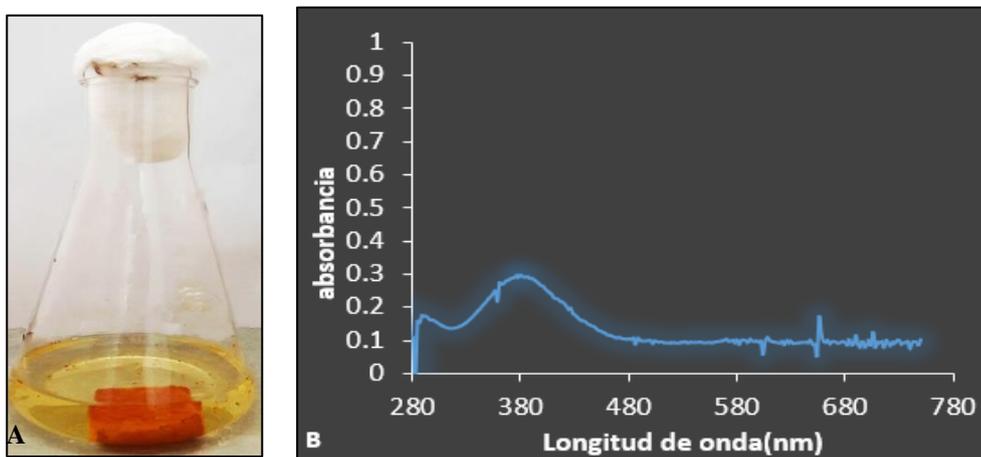


Figura 41: Producción de colorantes por *Penicillium mallochii* LMB-HP37 en fermentación por biopelícula durante 7 días.

A, Foto del matraz con el colorante producido por la cepa *Penicillium mallochii* LMB-HP37. B, Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido

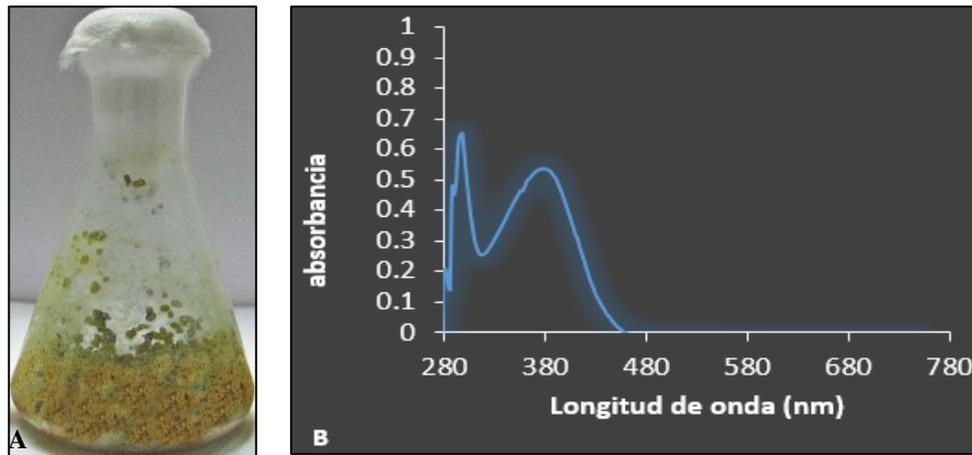


Figura 42: Producción de colorantes por *Penicillium mallochii* LMB-HP37 en fermentación en estado sólido durante 7 días.

A, Foto del matraz con el colorante producido por la cepa *Penicillium mallochii* LMB-HP37. B, Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido.

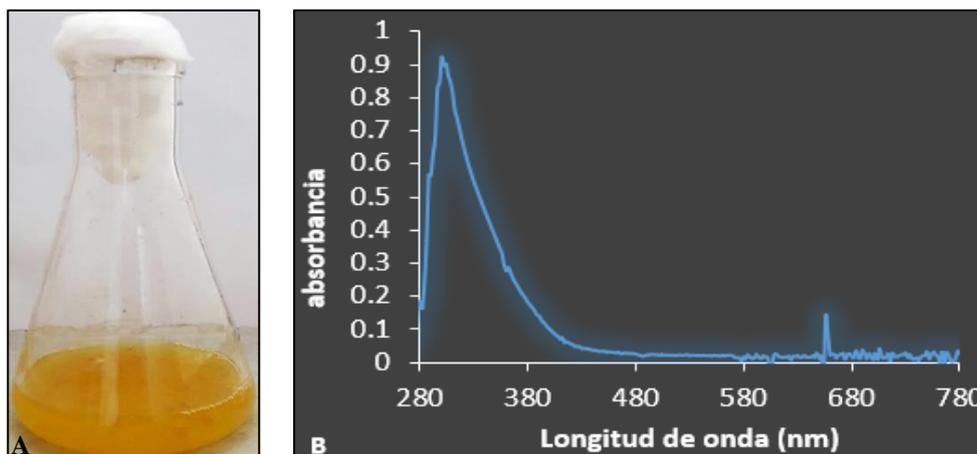


Figura 43: Producción de colorantes por *Talaromyces brunneus* LMB-HP43 en fermentación en sumergido durante 7 días.

A, Foto del matraz con el colorante producido por la cepa *Talaromyces brunneus* LMB-HP43. B, Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido.

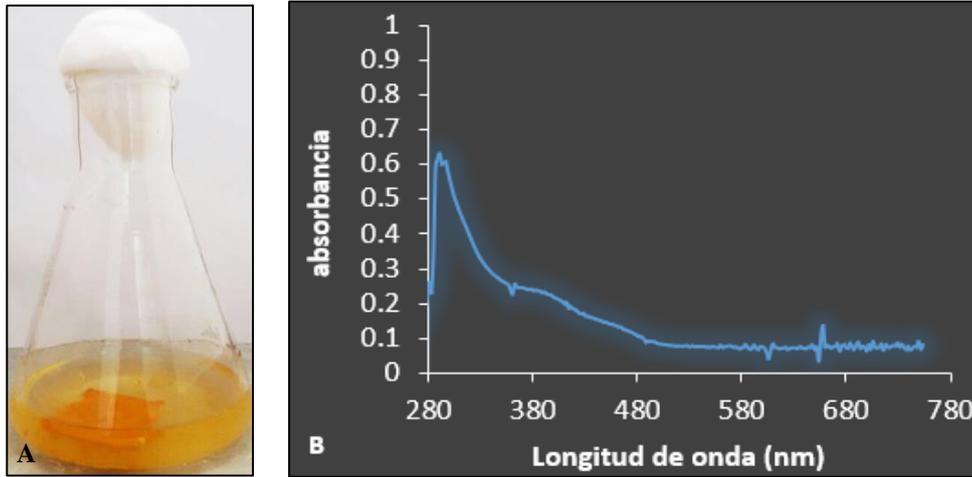


Figura 44: Producción de colorantes por *Talaromyces brunneus* LMB-HP43 en fermentación por biopelícula durante 7 días.

A, Foto del matraz con el colorante producido por la cepa *Talaromyces brunneus* LMB-HP43. B, Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido.

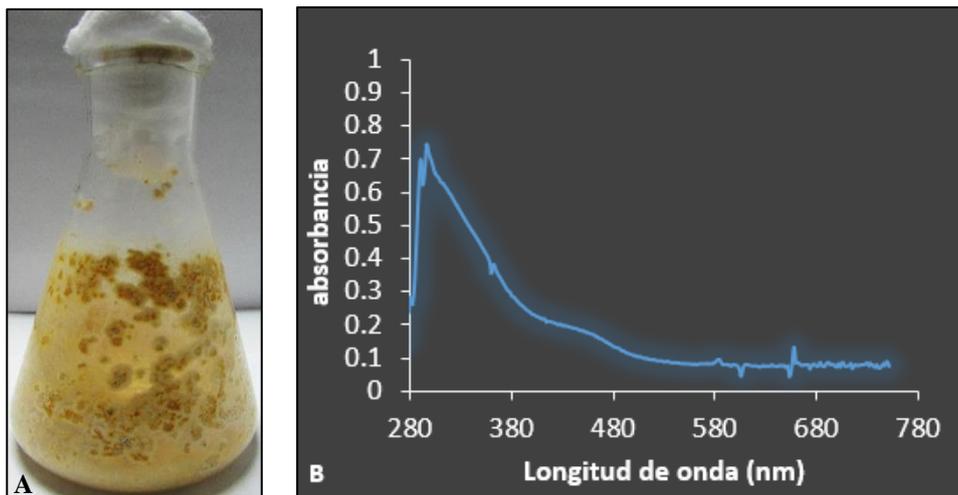


Figura 45: Producción de colorantes por *Talaromyces brunneus* LMB-HP43 en fermentación en estado sólido durante 7 días.

A, Foto del matraz con el colorante producido por la cepa *Talaromyces brunneus* LMB-HP43. B, Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido.

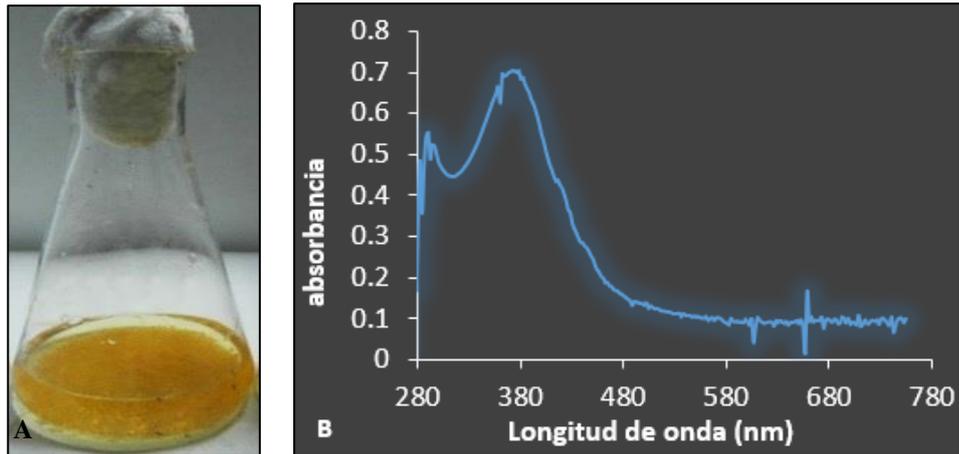


Figura 46: Producción de colorantes por *Penicillium mallochii* LMB-HP19 en fermentación en sumergido durante 7 días.

A, Foto del matraz con el colorante producido por la cepa *Penicillium mallochii* LMB-HP19. B, Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido.

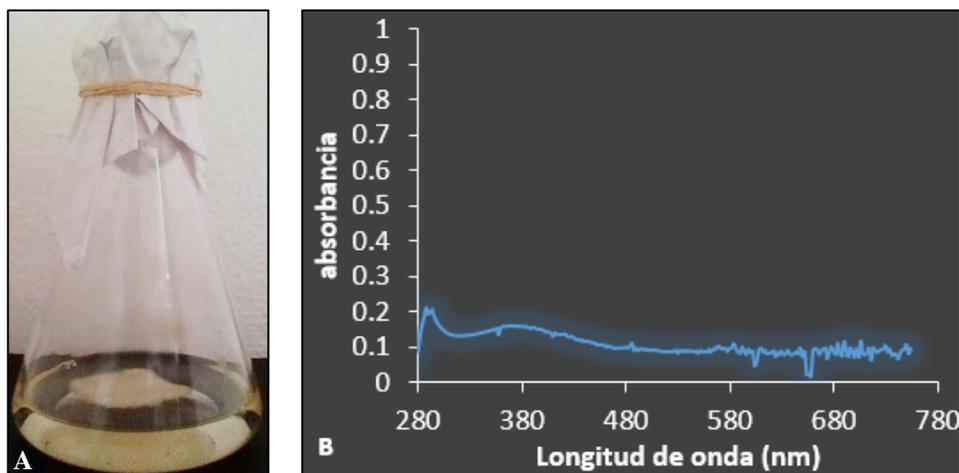


Figura 47: Producción de colorantes por *Penicillium mallochii* LMB-HP19 en fermentación por biopelícula durante 7 días.

A, Foto del matraz con el colorante producido por la cepa *Penicillium mallochii* LMB-HP19. B, Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido.

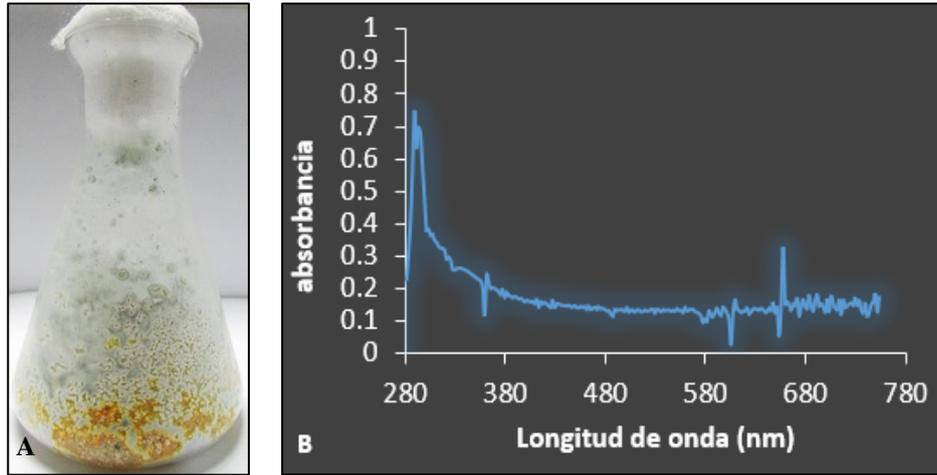


Figura 48: Producción de colorantes por *Penicillium mallochii* LMB-HP19 en fermentación en estado sólido durante 7 días.

A, Foto del matraz con el colorante producido por la cepa *Penicillium mallochii* LMB-HP19. B, Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido.

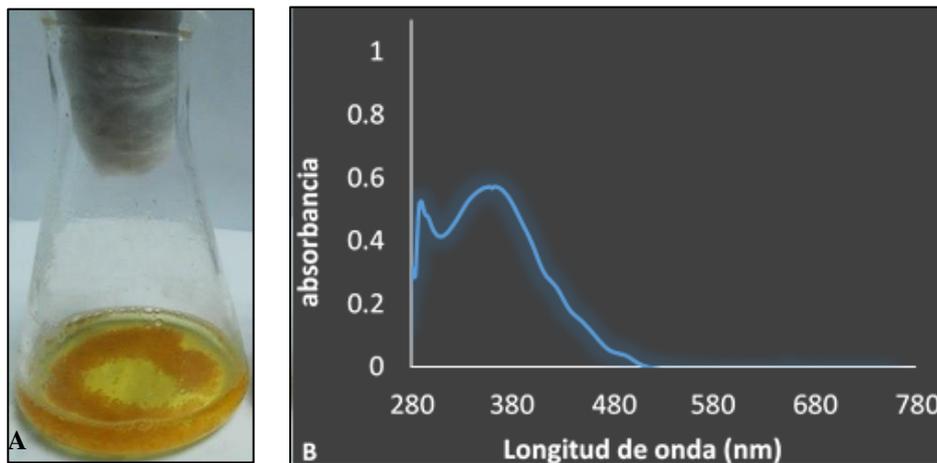


Figura 49: Producción de colorantes por *Penicillium maximae* LMB-HP33 en fermentación en sumergido durante 7 días.

A, Foto del matraz con el colorante producido por la cepa *Penicillium maximae* LMB-HP33. B, Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido.

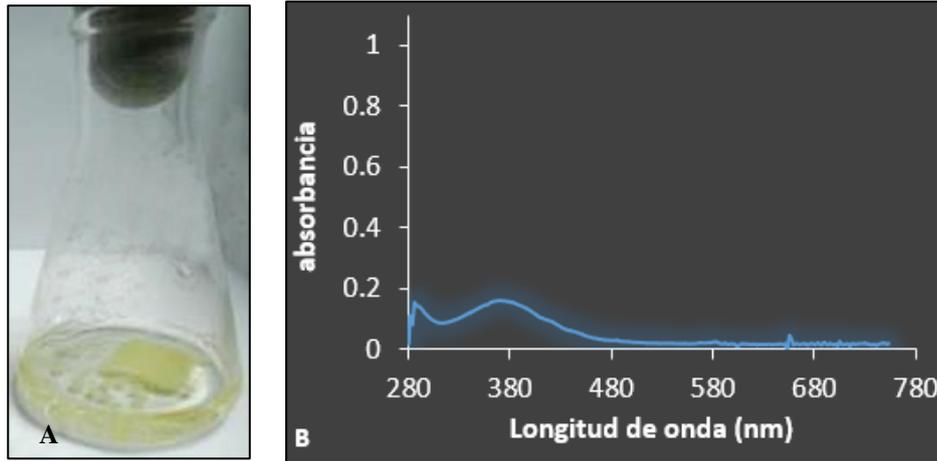


Figura 50: Producción de colorantes por *Penicillium maximae* LMB-HP33 en fermentación por biopelícula durante 7 días.

A, Foto del matraz con el colorante producido por la cepa *Penicillium maximae* LMB-HP33. B, Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido.

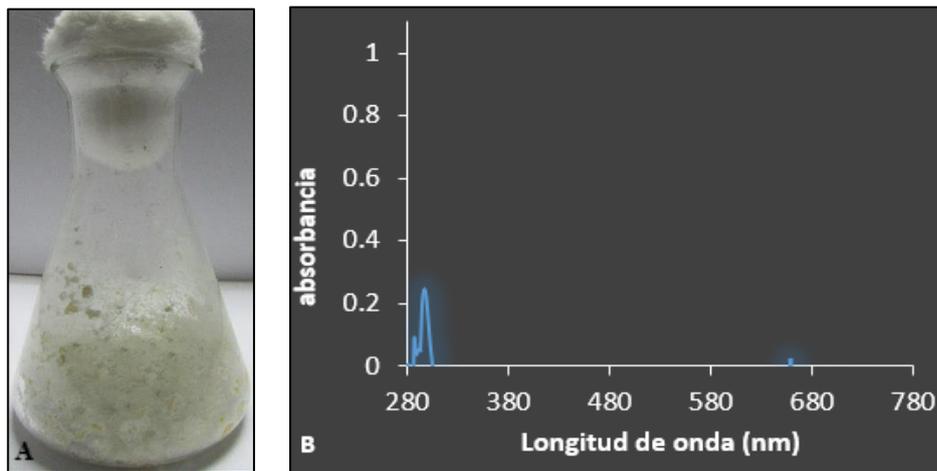


Figura 51: Producción de colorantes por *Penicillium maximae* LMB-HP33 en fermentación en estado sólido durante 7 días.

A, Foto del matraz con el colorante producido por la cepa *Penicillium maximae* LMB-HP33. B, Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido.

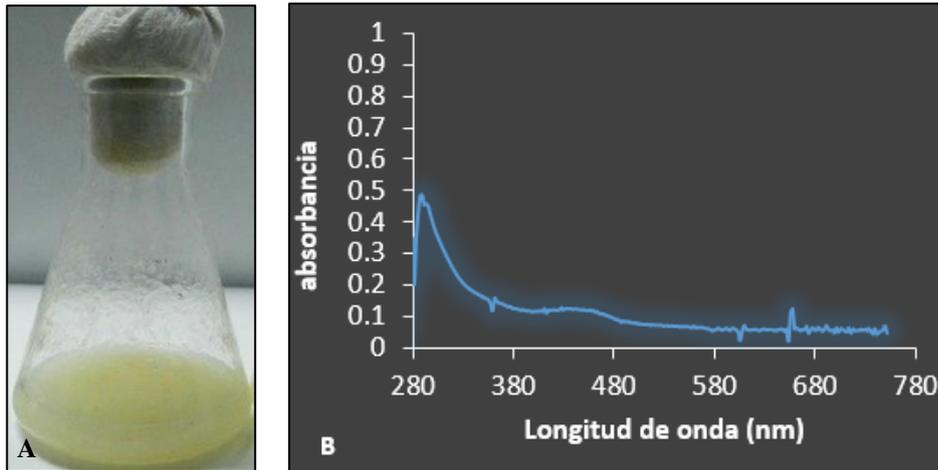


Figura 52: Producción de colorantes por *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14 en fermentación en sumergido durante 7 días.

A, Foto del matraz con el colorante producido por la cepa *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14. B, Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido.

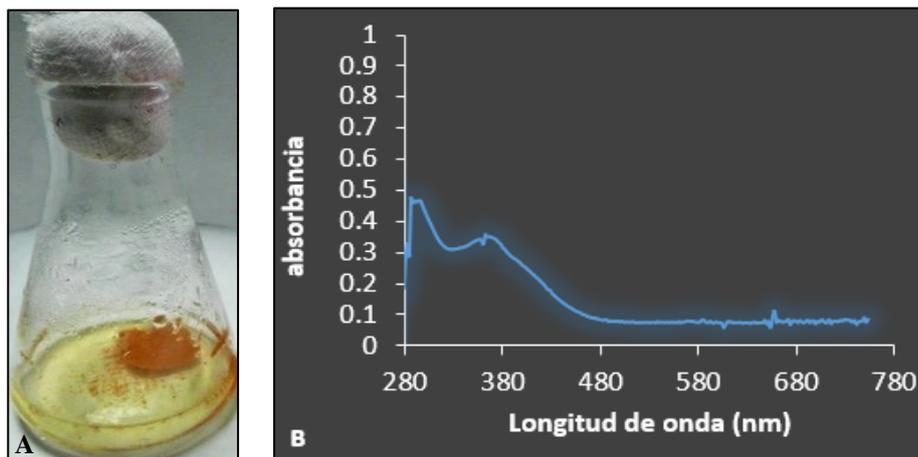


Figura 53: Producción de colorantes por *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14 en fermentación por biopelícula durante 7 días.

A, Foto del matraz con el colorante producido por la cepa *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14. B, Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido.

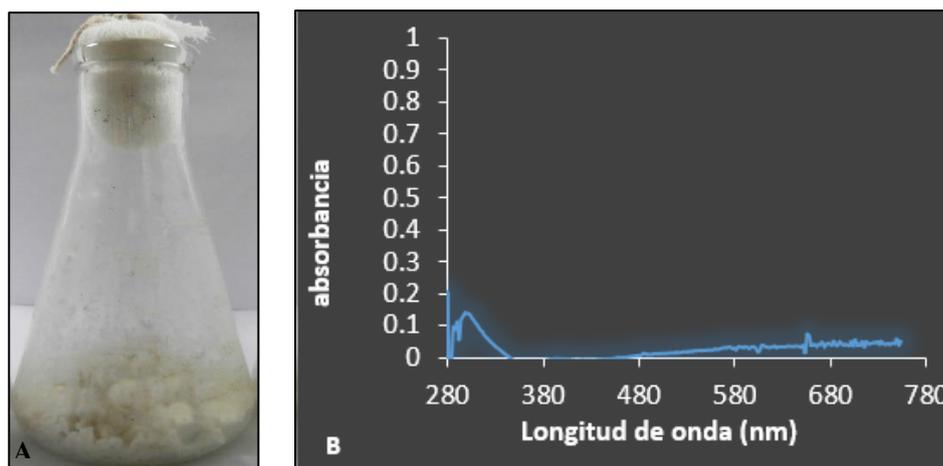


Figura 54: Producción de colorantes por *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14 en fermentación en estado sólido durante 7 días.

A, Foto del matraz el colorante producido por la cepa *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14. B, Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido.

Desde la figura 40 hasta la figura 54, se observan los espectros de absorción en UV-Visible de las cinco cepas en los tres sistemas de fermentación. Coincidente con la bibliografía revisada (Afshari et al., 2015; Bouhri et al., 2020; Lebeau et al., 2017; Morales-Oyervides et al., 2017, 2020; Rivera et al., 2012), se observan matraces con extracto de colorantes que presentan tonalidades de amarillo a naranja, pertenecientes a los géneros *Penicillium sp.* y *Talaromyces sp.*

Si bien en los objetivos de la presente investigación no se considera la caracterización química de los colorantes, se cuenta como referencia bibliográfica la investigación realizada por Rosas, (2017), la cual solo consiguió identificar como quinonas a los colorantes de *Penicillium mallochii* LMB-HP37 y *Penicillium maximae* LMB-HP33. A pesar de ello, a partir de la revisión bibliográfica se determinó que los colorantes producidos por las cinco cepas pertenecen al grupo de los policétidos, específicamente a las azafilonas y antraquinonas (Bouhri et al., 2020; Caro et al., 2012; dos Santos et al., 2019; Morales-Oyervides et al., 2020; Samson & Houbraken, 2011; Suzuki et al., 1999; Woo et al., 2012; Yilmaz et al., 2014).

Las máximas absorbancias en las cinco cepas y tres sistemas FS, FB y FES, se dieron entre 360 nm (Woo et al., 2012) y 380 nm (Narendrababu & Shishupala, 2017; Rosas, 2017) longitudes a las cuales la luz emitida es color amarillo, a excepción de *Penicillium maximae* LMB-HP33 y *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14, los cuales no produjeron colorantes

visibles en FES y solo se observó mínimas absorbancias en la región del UV, en 296 nm y 298 nm respectivamente. La lectura de estas absorbancias podrían deberse a algún tipo de contaminante producto de la perlita utilizada en FES, ya que la absorción de los rayos UV es muy sensible a las impurezas (Manan & Webb, 2018b) o por algún otro tipo de metabolito aromático extracelular.

No obstante, se observó una tonalidad intensa de colorante amarillo a absorbancias de 300 nm. Este resultado no es apoyado por Narendrababu & Shishupala, (2017), quienes mencionan que longitudes de onda menores o iguales a 300 nm no indican la presencia de colorantes y solo las sustancias que absorben a luz visible (380-700 nm) presentan color. Por otro lado, Fouillaud, Venkatachalam, Girard-Valenciennes, Caro, & Dufossé, (2016); Lebeau et al., (2017), apoyan los resultados donde se obtuvieron tonalidades intensas de colorante amarillo a absorbancias de 300 nm y determinan que los colorantes derivados de policétidos, como las antraquinonas o azafilonas, se caracterizan por absorber en la región del UV entre 200 nm a 300 nm debido a la fusión de anillos bencénicos, mientras que las máximas absorbancias se dan en la región de luz visible en el rango de los 400 nm y dependen en gran medida de la naturaleza y el número de grupos sustituidos.

Cabe señalar que los colorantes obtenidos de las cinco cepas pueden ser mezclas de otros compuestos con diferentes absorbancias (Manan, 2017), formando asociaciones intermoleculares, generando efectos hipsocrómicos o batocrómicos y por consiguiente, variaciones en la longitud de onda correspondientes a la máxima absorción o en la cantidad de absorbancia (Rosas, 2017). Aun así, la gran mayoría de autores estiman la producción de colorantes mediante este método analítico (Manan & Webb, 2018b).

4.5. IDENTIFICACIÓN DE GENES DE OCRATOXINA

La ocratoxina A (OTA), es una micotoxina producida por especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* (Geisen, Schmidt-Heydt, & Karolewicz, 2006; Gil-Serna, García-Díaz, González-Jaén, Vázquez, & Patiño, 2018; Hayat, Paniel, Rhouati, Marty, & Barthelmebs, 2012; O'Callaghan et al., 2013; Wang et al., 2016) y ciertos estudios mencionan que también es producida por cepas de *Talaromyces* (Perrone, Logrieco, & Frisvad, 2017; X. Zhang et al., 2016). Por esta razón, fue importante detectar la presencia de genes de biosíntesis de ocratoxina en las dos cepas, *Penicillium mallochii* LMB-HP37 y *Talaromyces brunneus* LMB-HP43, con mayores desempeños en producción de colorantes en los tres sistemas de fermentación.

En la bibliografía revisada, se han descrito diferentes genes posiblemente implicados en la síntesis de OTA que codifican PKS y NRPS en especies de *Penicillium* y *Aspergillus*. Sin embargo, los genes *pks* y *nrps* reportados en *Penicillium* (*otapksPN* y *npsPN*) parecen no ser homólogos a los reportados hasta ahora en especies de *Aspergillus*, lo que indica que podrían ser específicos de género (Wang et al., 2016). Adicional a esto, durante el tiempo en el que se desarrolló la presente investigación, la bibliografía revisada presentó información insuficiente sobre rutas biosintéticas establecidas, por lo cual se optó por utilizar cebadores degenerados KAOTA y KA, evaluados anteriormente para la detección de genes involucrados en biosíntesis de ocratoxina (Amnuaykanjanasin et al., 2005; Storari, Pertot, Gessler, & Broggin, 2010).

Como se observa en la figura 55, las dos cepas seleccionadas amplificaron genes para los pares de cebadores degenerados KAR/F y KAOTAF/R. Con estos resultados se procedió al secuenciamiento de las bandas obtenidas en el gel de electroforesis.

En las tablas 10 y 11 se observan los alineamientos de las secuencias usando BLAST X, donde efectivamente lo obtenido en el genoma son genes relacionados a la vía de síntesis de policétidos.

Las secuencias de cada cepa con mayor porcentaje de identidad y cobertura para cada cebador, se ingresaron en la base de datos Expasy/Swiss-Prot para el análisis de proteínas (<https://www.expasy.org/swissprot>), el cual indica que:

Son dominios de proteínas transportadoras (CP) o dominios de tiolación, componentes cruciales para la transferencia de intermediarios unidos a éster de tiol durante la biosíntesis de metabolitos primarios y secundarios como ácidos grasos, policétidos y péptidos no ribosomales. Son responsables de transportar el sustrato y los péptidos intermedios no ribosomales. Son responsables de transportar el sustrato y los intermedios de cadena a los centros catalíticos de las líneas de ensamblaje de policétido sintasa (PKS), péptido sintetasa no ribosomal (NRPS) y ácido graso sintasa (FAS).

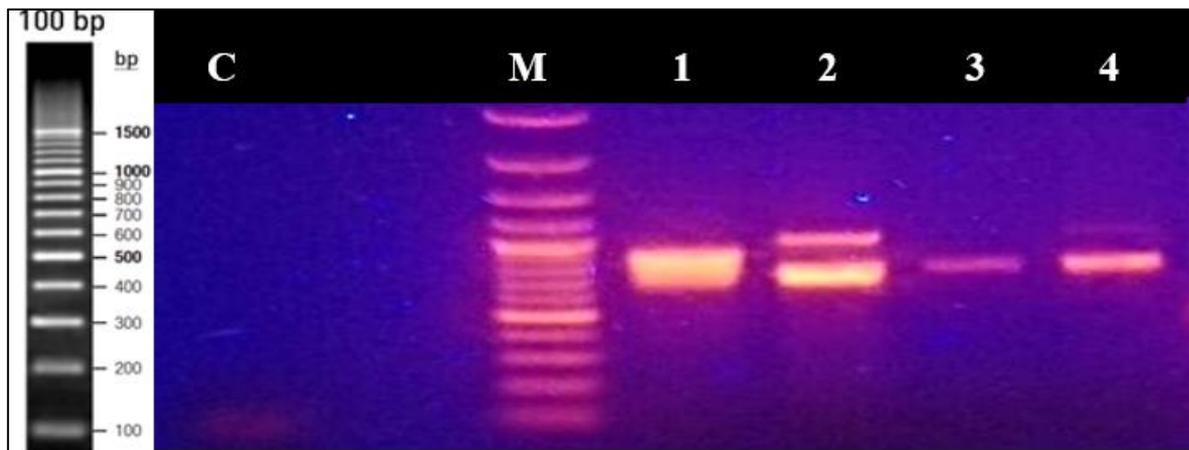


Figura 55: Electroforesis horizontal en gel de agarosa (1 por ciento) de productos de PCR convencional para la detección de genes de biosíntesis de ocratoxina, usando los cebadores degenerados KA y KAOTA. C, control negativo. M, marcador de 100 BP. Para el primer KA con T° de alineación 58°C: 1, ADN de *Talaromyces brunneus* LMB-HP43. 2, ADN de *Penicillium mallochii* LMB-HP37. Para el primer KAOTA con T° de alineación 60°C: 3, ADN de *Talaromyces brunneus* LMB-HP43. 4, ADN de *Penicillium mallochii* LMB-HP37.

Lo antes mencionado apoya el resultado del secuenciamiento indicado en las tablas 10 y 11, sin embargo, si bien es cierto el gen *pks* está en la vía de síntesis de ocratoxina, no es exclusiva de esta vía, por lo que no se podría asegurar se está sintetizando ocratoxina (Wang et al., 2020).

Tabla 10: Resultados del alineamiento con BLAST X del secuenciamiento de las amplificaciones de genes de biosíntesis de ocratoxina A de la cepa *Penicillium mallochii* LMB-HP37 utilizando cebadores KA F/R y KAOTAF/R

CEPA	GEN	CÓDIGO	MICOTOXINA	SECUENCIA	IDENTIFICACIÓN NCBI	% COBERTURA	% IDENTIDAD	E value	ACCESIÓN
<i>Penicillium mallochii</i> LMB-HP37	Fragmentos de genes de policétidos sintasa	KA F/R	Ocratoxina	Forward	hypothetical protein M434DRAFT_397985 [<i>Hypoxylon sp.</i> CO27-5]	91%	68%	1.00E-70	OTA90454.1
					polyketide synthase [<i>Humicola fuscoatra</i>]	83%	68%	2.00E-70	ACT53004.1
					putative polyketide synthase [<i>Hypoxylon sp.</i> EC38]	91%	67%	3.00E-70	OTA59680.1
				Reverse	polyketide synthase [<i>Humicola fuscoatra</i>]	98%	60%	2.00E-57	ACT53004.1
					hypothetical protein M434DRAFT_397985 [<i>Hypoxylon sp.</i> CO27-5]	98%	60%	4.00E-52	OTA90454.1
					putative polyketide synthase [<i>Hypoxylon sp.</i> EC38]	98%	59%	5.00E-51	OTA59680.1
		KAOTA F/R		Forward	Nonribosomal peptide synthetase 14 [<i>Talaromyces islandicus</i>]	98%	55%	2.00E-62	CRG92673.1
					polyketide synthase [<i>Metarhizium sp.</i> BCC2566]	98%	50%	6.00E-61	AII99997.1
					polyketide synthase [<i>Metarhizium anisopliae</i>]	98%	50%	2.00E-59	ABD47709.1
				Reverse	Nonribosomal peptide synthetase 14 [<i>Talaromyces islandicus</i>]	95%	55%	1.00E-60	CRG92673.1
					polyketide synthase [<i>Metarhizium sp.</i> BCC2566]	96%	51%	8.00E-60	AII99997.1
					polyketide synthase [<i>Metarhizium anisopliae</i>]	94%	50%	2.00E-58	ABD47709.1

Tabla 11: Resultados del alineamiento con BLAST X del secuenciamiento de las amplificaciones de genes de biosíntesis de ocratoxina A de la cepa *Talaromyces brunneus* LMB-HP43 utilizando cebadores KA F/R y KAOTAF/R

CEPA	GEN	CÓDIGO	MICOTOXINA	SECUENCIA	IDENTIFICACIÓN NCBI	% COBERTURA	% IDENTIDAD	E value	ACCESIÓN
<i>Talaromyces brunneus</i> LMB-HP43	Fragmentos de genes de policétidos sintasa	KA F/R	Ocratoxina	Forward	putative polyketide synthase 31 [<i>Talaromyces islandicus</i>]	67%	30%	3.50E-02	CRG91166.1
				Reverse	PREDICTED: ubiquitin-conjugating enzyme E2 20-like isoform X1 [<i>Populus euphratica</i>]	43%	36%	5.7	XP_011032073.1
		KAOTA F/R		Forward	Acyl transferase/acyl hydrolase/lysophospholipase [<i>Penicillium expansum</i>]	56%	79%	9.00E-32	XP_016595492.1
					Acyl transferase/acyl hydrolase/lysophospholipase [<i>Penicillium expansum</i>]	56%	79%	9.00E-32	KGO43579.1
					Acyl transferase/acyl hydrolase/lysophospholipase [<i>Penicillium expansum</i>]	56%	79%	2.00E-31	KGO58480.1
				Reverse	Acyl transferase/acyl hydrolase/lysophospholipase [<i>Penicillium expansum</i>]	76%	46%	8.00E-23	KGO58480.1
					Acyl transferase/acyl hydrolase/lysophospholipase [<i>Penicillium expansum</i>]	76%	46%	2.00E-22	XP_016595492.1
					Acyl transferase/acyl hydrolase/lysophospholipase [<i>Penicillium expansum</i>]	76%	46%	2.00E-22	KGO43579.1
					Acyl transferase/acyl hydrolase/lysophospholipase [<i>Penicillium expansum</i>]	76%	46%	2.00E-22	KGO43579.1

4.6. PCR SEMI CUANTITATIVA USANDO ADNc (RT-PCR)

Se ensayó una PCR semicuantitativa con ADNc en las dos cepas con mayor rendimiento, *Penicillium mallochii* LMB-HP37 y *Talaromyces brunneus* LMB-HP43. En cada una se probó la expresión de genes en los tres sistemas de fermentación (FS, FB y FES) utilizando los cebadores KA y KAOTA y el gen actina como control interno.

Cabe indicar que se utilizó 40 ciclos en el termociclador, con una temperatura de alineación de 60 °C para los dos cebadores y 2 ul de ADNc. Para la comprobación de los resultados se utilizaron las réplicas biológicas.

Para la cepa *Talaromyces brunneus* LMB-HP43 no se evidenciaron productos amplificados en ningún sistema de fermentación utilizando los cebadores KA/KAOTA (ver figura 56 y 57). El ADNc sintetizado se descartó como causa de la no amplificación de genes, ya que se evidenció la amplificación del gen de control interno en los tres sistemas. Además, se descartó la calidad de los cebadores en la figura 57, probándose los cebadores KA/KAOTA en ADN. No obstante, no se puede afirmar la inexistencia de genes para la biosíntesis de ocratoxina



Figura 56: Electroforesis horizontal en gel de agarosa (1 por ciento) de productos de RT-PCR semicuantitativa de la cepa *Talaromyces brunneus* LMB-HP43.

M1, marcador 50 pb. M2, marcador 1 KB. C, control negativo. Para el gen *actina* se usó ADNc en: 1, FS. 2, FB. 3, FES. Para el primer KA se usó ADNc en: 4, FS. 5, FB. 6, FES. Para el primer KAOTA se usó ADNc en: 7, FS. 8, FB. 9, FES.

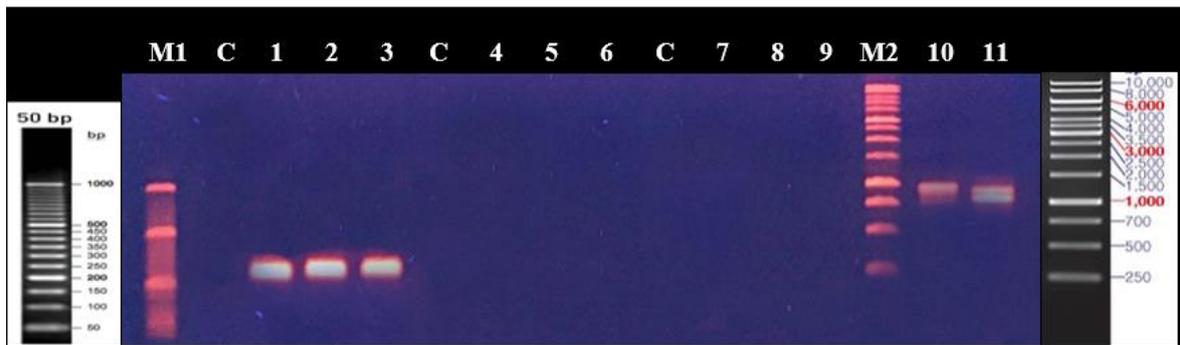


Figura 57: Electroforesis horizontal en gel de agarosa (1por ciento) de productos de RT-PCR semicuantitativa de la cepa *Talaromyces brunneus* LMB-HP43.

M1, marcador 50 pb. M2, marcador 1 KB. C, control negativo. Para el gen *actina* se usó ADNc de la réplica biológica en: 1, FS. 2, FB. 3, FES. Para el primer KA se usó ADNc de la réplica biológica en: 4, FS. 5, FB. 6, FES. Para el primer KAOTA se usó ADNc de la réplica biológica en: 7, FS. 8, FB. 9, FES. ADN usando los cebadores: 10, KA. 11. KAOTA.

Mientras que en la figura 58, para *Penicillium mallochii* LMB-HP37 se observa solo un producto amplificado con el primer KA en el sistema de fermentación en sumergido. Este resultado se corrobora en la figura 59 utilizando la réplica biológica, aunque en este caso la banda no fue tan intensa como en la figura 58 y es posible que ocurriera durante el proceso de síntesis de ADNc puesto que, esta técnica requiere una cantidad relativamente grande de ADNc (Romero, Grasa, Esteve, Fernández-López, & Alemany, 2007)

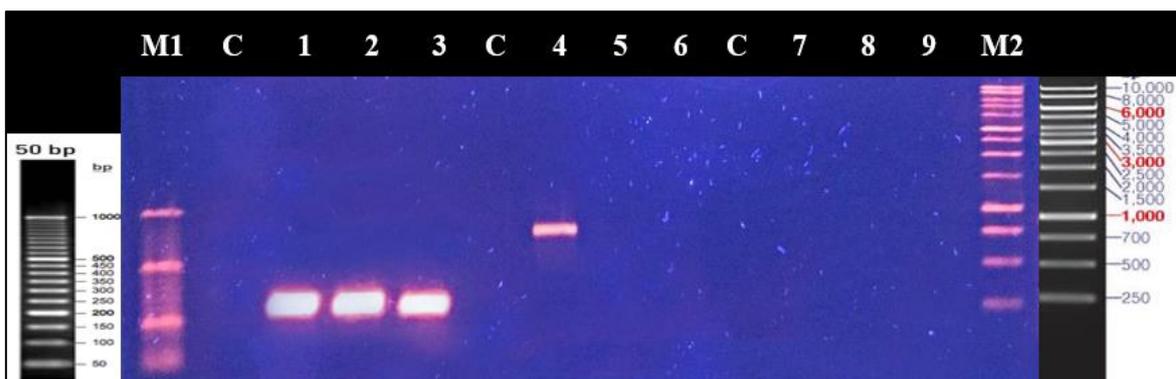


Figura 58: Electroforesis horizontal en gel de agarosa (1por ciento) de productos de RT-PCR semicuantitativa de la cepa *Penicillium mallochii* LMB-HP37.

M1, marcador 50 pb. M2, marcador 1 KB. C, control negativo. Para el gen *actina* se usó ADNc en: 1, FS. 2, FB. 3, FES. Para el primer KA se usó ADNc en: 4, FS. 5, FB. 6, FES. Para el primer KAOTA se usó ADNc en: 7, FS. 8, FB. 9, FES.

A pesar de ello, es interesante observar la expresión de este gen relacionado a la biosíntesis de policétidos solo en el cultivo sumergido, aunque se podría descartar que se trate de genes relacionados a la producción de colorantes dado que se produjeron colorantes en los tres sistemas, los cuales fueron determinados estructural y químicamente como policétidos en los estudios anteriores (Rosas, 2017) y bibliografía.

Este resultado es la primera etapa de un estudio amplio de expresión de genes, sin embargo, lo que se tiene claro es que se está expresando un gen para un metabolito de naturaleza policétida, como puede ser la ocratoxina u otra micotoxina. Aun así, el conocimiento de esta información contribuye a la futura elección del sistema de fermentación para la producción de colorantes.

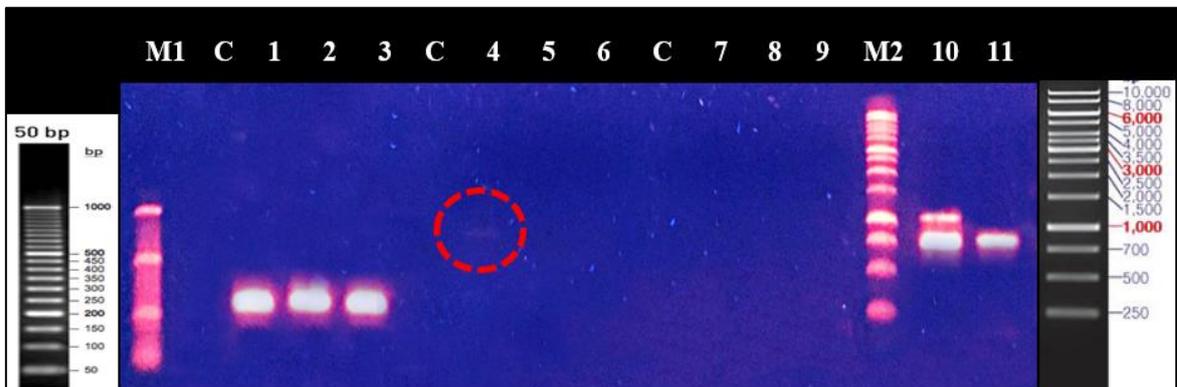


Figura 59: Electroforesis horizontal en gel de agarosa (1por ciento) de productos de RT-PCR semicuantitativa de la cepa *Penicillium mallochii* LMB-HP37.

M1, marcador 50 pb. M2, marcador 1 KB. C, control negativo. Para el gen *actina* se usó ADNc de la réplica biológica en: 1, FST. 2, FB. 3, FES. Para el primer KA se usó ADNc de la réplica biológica en: 4, FS. 5, FB. 6, FES. Para el primer KAOTA se usó ADNc de la réplica biológica en: 7, FS. 8, FB. 9, FES. ADN usando los cebadores: 10, KA. 11. KAOTA.

V. CONCLUSIONES

1. La comparación de la producción de colorantes por cinco hongos filamentosos, en fermentación en sumergido, biopelículas y estado sólido, reveló que, aunque estadísticamente no se evidenció diferencias significativas entre ellos, biológicamente sí se observó estas diferencias siendo FES el sistema que presenta los mayores rendimientos de producción de colorantes respecto a los otros dos sistemas de fermentación.

2. De las cepas evaluadas, *Penicillium mallochii* LMB-HP37 y *Talaromyces brunneus* LMB-HP43 produjeron colorantes con los mayores rendimientos en los tres sistemas de fermentación. Por lo tanto, estas dos cepas pueden ser consideradas como grandes potenciales para la producción de colorantes a nivel industrial.

3. Los resultados del secuenciamiento de amplicones para policétidos de *Penicillium mallochii* LMB-HP37 y *Talaromyces brunneus* LMB-HP43 revelaron que los productos amplificados correspondiente a los cebadores utilizados mostraron relación con la ruta biosintética de policétidos.

4. Mediante PCR semicuantitativa (RT-PCR) de *Penicillium mallochii* LMB-HP37 y *Talaromyces brunneus* LMB-HP43 no se detectó la expresión del gen de ocratoxina utilizando los cebadores KA y KAOTA. A diferencia del sistema de fermentación en sumergido para *Penicillium mallochii* LMB-HP37. Sin embargo, el amplicon detectado, estando vinculado a la síntesis de policétidos en general, no sería exclusivo para la biosíntesis de ocratoxina.

VI. RECOMENDACIONES

1. Para la producción de colorantes en fermentación en estado sólido probar un mayor tiempo de incubación y soportes más económicos, como los residuos y subproductos agro-industriales. Mientras que para el sistema de biopelículas, realizar una etapa de pre-crecimiento y probar fibra de poliéster como soporte
2. Evaluar la producción de micotoxinas utilizando métodos analíticos específicos y posteriormente optimizar la producción de colorantes para *Penicillium mallochii* LMB-HP37 y *Talaromyces brunneus* LMB-HP43.
3. Realizar a los colorantes producidos, ensayos de estabilidad en diferentes condiciones de pH, temperatura, incidencia de luz y sales. Asimismo, para comprobar la inocuidad de estos colorantes fúngicos en los ecosistemas marinos, se recomienda desarrollar pruebas de ecotoxicología (prueba de toxicidad aguda con *Daphnia magna* y *Artemia franciscana*).
4. Debido a su visible retención de colorante en la biomasa y que para estos fines es frecuente el uso de técnicas de extracción con solventes orgánicos, se sugiere el uso de metodologías amigables con el medio ambiente como la extracción de líquido presurizado, sistemas micelares acuosos bifásicos o el uso de líquidos iónicos a base de imidazol.
5. La cromatografía líquida unida a espectrometría de masas (LC-MS) sería una excelente opción de mayor precisión para la purificación, identificación y cuantificación de colorantes y micotoxinas.
6. Realizar un estudio global de expresión de genes (RNAseq) para dilucidar posibles rutas involucrados en la biosíntesis de ocratoxina.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abou Zied, A., Abd El-Zaher, E., Elsharquawy, H., & Hammad, T. (2017). Exopolysaccharides production and characterization from marine-derived *Penicillium commune* KP942881.1 with some medical potential applications. *Egyptian Journal of Botany*, 57(13), 17–30. <https://doi.org/10.21608/ejbo.2017.944.1076>
- Afshari, M., Shahidi, F., Mortazavi, S. A., Tabatabai, F., & Es'haghi, Z. (2015). Investigating the influence of pH, temperature and agitation speed on yellow pigment production by *Penicillium aculeatum* ATCC 10409. *Natural Product Research*, In press(January), 1–7. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.999059>
- Agostini-Costa, T. S., Vieira, R. F., Bizzo, H. R., Silveira, D., & Gimenes, M. A. (2012). Secondary Metabolites. In S. Dhanarasu (Ed.), *Chromatography and Its Applications* (pp. 131–164). <https://doi.org/10.5772/35705>
- Akilandeswari, P., & Pradeep, B. V. (2016). Exploration of industrially important pigments from soil fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(4), 1631–1643. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7231-8>
- Al-Manhel, A. J. (2017). Production of exopolysaccharide from local fungal isolate. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 5(3), 338–346. <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.5.3.19>
- Amnuaykanjanasin, A., Punya, J., Paungmoung, P., Rungrod, A., Tachaleat, A., Pongpattanakitsote, S., ... Tanticharoen, M. (2005). Diversity of type I polyketide synthase genes in the wood-decay fungus *Xylaria* sp. BCC 1067. *FEMS Microbiology Letters*, 251(1), 125–136. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.07.038>
- Aruldass, C. A., Dufossé, L., & Ahmad, W. A. (2018). Current perspective of yellowish-orange pigments from microorganisms- a review. *Journal of Cleaner Production*, 180, 168–182. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.093>

- Ballester, A., Marcet-houben, M., Levin, E., Sela, N., Selma-lázaro, C., Carmona, L., ... Gabaldón, T. (2015). Genome, transcriptome, and functional analyses of *Penicillium expansum* provide new insights into secondary metabolism and pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(3), 232–248. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-14-0261-FI>
- Banani, H., Marcet-Houben, M., Ballester, A.-R., Abbruscato, P., González-Candelas, L., Gabaldón, T., & Spadaro, D. (2016). Genome sequencing and secondary metabolism of the postharvest pathogen *Penicillium griseofulvum*. *BMC Genomics*, 17(19), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2347-x>
- Barral, B., Chillet, M., Doizy, A., Grassi, M., Ragot, L., Mathieu, L., ... Schorr-Galindo, S. (2020). Diversity and toxigenicity of fungi that cause pineapple fruitlet core rot bastien. *Toxins*, 12(339). <https://doi.org/10.3390/toxins12050339>
- Bechtold, T. (2009). Natural Colorants – Quinoid , Naphthoquinoid and Anthraquinoid Dyes. En T. Bechtold & R. Mussak (Eds.), *Handbook of Natural Colorants* Edited (pp. 151–182). <https://doi.org/10.1002 / 9780470744970.ch10>
- Bingle, L. E. H; Simpson, T. J; Lazarus, C. M. 1999. Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes. *Fungal Genetics and Biology* 26(3), 209–223. <https://doi.org/10.1006 / fgbi.1999.1115>.
- Borello, E., & Domenici, V. (2019). Determination of pigments in virgin and extra-virgin olive oils: A comparison between two near UV-vis spectroscopic techniques. *Foods*, 8(1), 4–8. <https://doi.org/10.3390/foods8010018>
- Bouhri, Y., Askun, T., Tunca, B., Deniz, G., Aksoy, S. A., & Mutlu, M. (2020). The orange-red pigment from *Penicillium mallochii*: Pigment production, optimization, and pigment efficacy against Glioblastoma cell lines. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, 101451. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101451>
- Cano, A. P. (2011). Extracción y uso de tres colorantess naturales a partir de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav.*), mortiño (*Vaccinium mytillus L.*) y mora de castilla (*Rubus glaucus*) como alternativa colorante natural para alimentos (Tesis de licenciatura, Escuela Politecnia del Ejército). Recuperado de: <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/4929>
- Caro, Y., Anamale, L., Fouillaud, M., Laurent, P., Petit, T., & Dufosse, L. (2012). Natural

hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants: an overview. *Natural Products and Bioprospecting*, 2, 174–193. <https://doi.org/10.1007/s13659-012-0086-0>

Castrillón, L., Palma, A., & Padilla, M.C. (2013). Biopelículas Fúngicas. *Dermatología Revista Mexicana*, 57, 350–361. Recuperado de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/derrevmex/rmd-2013/rmd135g.pdf>

Celestino, J. D. R., Carvalho, L. E., Lima, M. P., Lima, A. M., Ogusku, M. M., & Braga de Souza, J. V. (2014). Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. *Process Biochemistry*, 49(4), 569–575. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.01.018>

Chadni, Z., Rahaman, H., Jerin, I., & Hoque, K. M. F. (2017). Extraction and optimisation of red pigment production as secondary metabolites from *Talaromyces verruculosus* and its potential use in textile industries. *Mycology*, 8(1), 48–57. <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1302013>

Chen, L., Segal, D. M., & Mash, D. C. (1999). Semi-quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction: an approach for the measurement of target gene expression in human brain. *Brain Research Protocols*, 4, 132–139. [https://doi.org/10.1016 / s1385-299x \(99\) 00009-4..](https://doi.org/10.1016 / s1385-299x (99) 00009-4..)

Chen, W., Chen, R., Liu, Q., He, Y., He, K., Ding, X., ... Chen, F. (2017). Orange, red, yellow: Biosynthesis of azaphilone pigments in *Monascus* fungi. *Chemical Science*, 8, 4917–4925. <https://doi.org/10.1039/C7SC00475C>

Chen, W., Feng, Y., Molnár, I., & Chen, F. (2019). Nature and nurture: confluence of pathway determinism with metabolic and chemical serendipity diversifies *Monascus* azaphilone pigments. *The Royal Society of Chemistry*, 36(4), 561–572. <https://doi.org/10.1039/c8np00060c>

Cho, E. J., Oh, J. Y., Chang, H. Y., & Yun, J. W. (2006). Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of a mushroom *Tremella fuciformis*. *Journal of Biotechnology*, 127(1), 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.06.013>

Cho, Y. J., Park, J. P., Hwang, H. J., Kim, S. W., Choi, J. W., & Yun, J. W. (2002). Production of red pigment by submerged culture of *Paecilomyces sinclairii*. *Letters in Applied Microbiology*, 35(3), 195–202. <https://doi.org/10.1046/j.1472->

- Costa, J. A. V, Treichel, H., Kumar, V., & Pandey, A. (2018). Advances in Solid-State Fermentation. En A. Pandey, C. Larroche, & C. Soccol (Eds.). Current Developments in Biotechnology and Bioengineering (pp. 1–17). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00001-3>
- Costa-Orlandi, C. B., Sardi, J. C. O., Pitangui, N. S., de Oliveira, H. C., Scorzoni, L., Galeane, M. C., ... Mendes-Giannini, M. J. S. (2017). Fungal biofilms and polymicrobial diseases. *Journal of Fungi*, 3(2), 1–24. <https://doi.org/10.3390/jof3020022>
- Darwesh, O. M., Matter, I.A., Almoallim, H.S., Alharbi, S.A, Oh, Y-K. (2020). Isolation and optimization of monascus ruber OMNRC45 for red pigment production and evaluation of the pigment as a food colorant. *Applied Sciences*; 10(24), 8867. <https://doi.org/10.3390/app1024886>
- de Oliveira, F., Hirai, P. R., Simas, M. F., Pereira, J., & Santos-ebinuma, V. (2020). *Talaromyces amestolkiae* cell disruption and colorant extraction using imidazolium-based ionic liquids. *Separation and Purification Technology*, 257, 117759. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117759>
- de Oliveira, F., Pedrolli, D. B., Texeira, M. F. S., & Santos-Ebinuma, V. (2019). Water-soluble fluorescent red colorant production by *Talaromyces amestolkiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(16), 6529–6541. <https://doi.org/10.1007 / s00253-019-09972-z>
- Desai, J. V, Mitchell, A. P., & Andes, D. R. (2014). Fungal biofilms, drug resistance, and recurrent infection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*4, 4(10), 1–18. <https://doi.org/10.1101 / cshperspect.a019729>
- dos Santos, P., Ferraz, C. G., Ribeiro, P. R., Miranda, F. M., da Silva, F., de Souza, J. T., ... Soares, A. C. F. (2019). Antioxidant and antibacterial activities of the chlorine pigment sclerotiorin from *Penicillium mallochii* and its chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, 86(103915), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2019.103915>
- Downham, A., & Collins, P. (2000). Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science and Technology*, 35(1), 5–22.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2000.00373.x>

- Dufossé, L. (2016). Current and potential natural pigments from microorganisms (Bacteria, Yeasts, Fungi, Microalgae). In Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages: Industrial Applications for Improving Food Color (pp. 337–354). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100371-8.00016-6>
- Dufossé, L. (2019). Pigments, microbial. In T. M. Schmidt (Ed.), Encyclopedia of Microbiology (4^o ed.). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.13091-2>
- Dufossé, L., Fouillaud, M., Caro, Y., Mapari, S. A. S., & Sutthiwong, N. (2014). Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. Current Opinion in Biotechnology, 26, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.007>
- Fadlalla, M. H., Ling, S., Wang, R., Li, X., Yuan, J., Xiao, S., ... Wang, S. (2020). Development of ELISA and lateral flow immunoassays for ochratoxins (OTA and OTB) detection based on monoclonal antibody. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 10(80), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00080>
- Fanning, S., & Mitchell, A. P. (2012). Fungal biofilms. PLoS Pathogens, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002585>
- Fouillaud, M., Venkatachalam, M., Girard-Valenciennes, E., Caro, Y., & Dufossé, L. (2016). Anthraquinones and derivatives from marine-derived fungi: Structural diversity and selected biological activities. Marine Drugs, 14(4). <https://doi.org/10.3390/md14040064>
- Freeman, W. M., Walker, S. J., & Vrana, K. E. (1999). Quantitative RT-PCR : Pitfalls and Potential. BioTechniques, 26(1), 112–125.
- Frisvad, J. C., Yilmaz, N., Thrane, U., Rasmussen, K. B., Houbraken, J., & Samson, R. A. (2013). *Talaromyces atroroseus*, a new species efficiently producing industrially relevant red pigments. PLoS One, 8(12), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084102>
- Gallo, A., & Perrone, G. (2017). Targeting ochratoxin biosynthetic genes. En A. Moretti & A. Susca (Eds.), Mycotoxigenic fungi: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology (pp. 191–200). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0>

- Gamarra, N. N, Villena, G. K., & Gutiérrez-Correa, M. (2010). Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2), 545–551. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2540-4>
- García, K. R. (2020). Obtención de biopelículas fúngicas mixtas de *Trichoderma reesei* y *Aspergillus spp.* y análisis de expresión génica de celulasas mediante PCR cuantitativa (Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Agraria La Molina). Recuperado de: <https://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/4424>
- García, M. (2016). Apuntes para Espectrometría de Radiación Ultravioleta Visible (UV/VIS). In Repositorio Universidad Autónoma Del Estado de México. Retrieved from <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/68318>
- García-Ochoa, F., Gomez, E., Santos, V. E., & Merchuk, J. C. (2010). Oxygen uptake rate in microbial processes : An overview. *Biochemical Engineering Journal*, 49(3), 289–307. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.01.011>
- Geisen, R., Schmidt-Heydt, M., & Karolewicz, a. (2006). A gene cluster of the ochratoxin A biosynthetic genes in *Penicillium*. *Mycotoxin Research*, 22(2), 134–141. <https://doi.org/10.1007/BF02956777>
- General, T., Prasad, B., Kim, H. J., Vadakedath, N., & Cho, M. G. (2014). *Saccharina japonica*, a potential feedstock for pigment production using submerged fermentation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 19(4), 711–719. <https://doi.org/10.1007/s12257-013-0709-2>
- Gil-Serna, J., García-Díaz, M., González-Jaén, M. T., Vázquez, C., & Patiño, B. (2018). Description of an orthologous cluster of ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus* and *Penicillium* species . A comparative analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 268, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.028>
- Gil-Serna, J., Vázquez, C., González-Jaén, M. T., & Patiño, B. (2018). Wine contamination with ochratoxins : A review. *Beverages*, 4(6), 1–21. <https://doi.org/10.3390/beverages4010006>
- Gmoser, R., Ferreira, J. A., Lennartsson, P. R., & Taherzadeh, M. J. (2017). Filamentous ascomycetes fungi as a source of natural pigments. *Fungal Biology and*

- Biotechnology, 4(1), 1–25. <https://doi.org/10.1186/s40694-017-0033-2>
- Gmoser, R., Ferreira, J. A., Lundin, M., Taherzadeh, M. J., & Lennartsson, P. R. (2018). Pigment production by the edible filamentous fungus *Neurospora intermedia*. *Fermentation*, 4(11), 1–15. <https://doi.org/10.3390/fermentation4010011>
- Gunasekaran, S., & Poorniammal, R. (2008). Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Penicillium sp.* under submerged cultivation. *African Journal of Biotechnology*, 7(12), 1894–1898. <https://doi.org/10.4314/ajb.v7i12.58846>
- Gutiérrez-Correa, M., & Villena, G. K. (2010). Characteristics and techniques of fermentation systems. En A. Pandey, C.R. Soccol, E. Gnansounou & C. Dussap (eds.), *Comprehensive Food Fermentation and Biotechnology* (pp 183–227). Recuperado de: http://www.academia.edu/3349851/Characteristics_and_techniques_of_fermentation_systems_Chapter_7
- Gutiérrez-Correa, M., Ludena, Y., Ramage, G., & Villena, G. K. (2012). Recent advances on filamentous fungal biofilms for industrial uses. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(5), 1235–1253. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9555-5>
- Hayat, A., Paniel, N., Rhouati, A., Marty, J. L., & Barthelmebs, L. (2012). Recent advances in ochratoxin A-producing fungi detection based on PCR methods and ochratoxin A analysis in food matrices. *Food Control*, 26(2), 401–415. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.060>
- Heo, Y. M., Kim, K., Kwon, S. L., Na, J., Lee, H., Jang, S., ... Kim, J. J. (2018). Investigation of filamentous fungi producing safe, functional water-soluble pigments. *Mycobiology*, 46(3), 269–277. <https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1513114>
- Hernández, E. (2012). Evaluación de la actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios detectados en la fermentación líquida de una cepa nativa de *Penicillium sp.* SPG 64 aislada del páramo de Guasca, Cundinamarca (Tesis de licenciatura, Pontificia Universidad Javeriana). Recuperado de: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/11796/HernandezTorresEliana2012.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Hernández, V. A., Galleguillos, F., Thibaut, R., & Müller, A. (2019). Fungal dyes for textile

- applications: testing of industrial conditions for wool fabrics dyeing. *Journal of the Textile Institute*, 110(1), 61–66. <https://doi.org/10.1080/00405000.2018.1460037>
- Ismail, G.A., Fitriana, A. D., & Sukandar, U. (2021). Medium optimization for production of *Monascus purpureus* pigment through solid-state fermentation. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*, 1143. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/1143/1/012019>
- Hongzhang, C. (2013). *Modern Solid State Fermentation: Theory and practice*. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6043-1>
- Instituto Suizo de Bioinformática SIB. (2011). ExPasy/Swiss-Prot [base de datos]. Recuperado de: <https://www.expasy.org/swissprot>
- Jain, A., Morlok, C. K., & Henson, J. M. (2013). Comparison of solid-state and submerged-state fermentation for the bioprocessing of switchgrass to ethanol and acetate by *Clostridium phytofermentans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2), 905–917. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4511-4>
- Jia, L., Tu, X., He, K., Wang, C., Yin, S., Zhou, Y., & Chen, W. (2019). Monascorubrin and rubropunctatin: Preparation and reaction characteristics with amines. En *Dyes and Pigments* (Vol. 170, p. 107629). <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107629>
- Kalra, R., Conlan, X., & Goel, M. (2020). Fungi as a potential source of pigments: harnessing filamentous fungi. *Frontiers in Chemistry*, 8, 1-23. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00369>
- Krishania, M., Sindhu, R., Binod, P., Ahluwalia, V., Kumar, V., Sangwan, R. S., & Pandey, A. (2018). Design of Bioreactors in Solid-State Fermentation. In A. Pandey, C. Larroche, & C. Soccol (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 83–96). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00005-0>
- Kumar, A., Shankar Vishwakarma, H., Singh, J., & Kumar, M. (2015). Microbial pigments: production and their applications in various industries. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 5(1), 203–212. Recuperado de: www.ijpcbs.com
- Lagashetti, A. C., Dufossé, L., Singh, S. K., & Singh, P. N. (2019). Fungal pigments and their prospects in different industries. *Microorganisms*, 7(604), 1–36. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120604>

- Lebeau, J., Venkatachalam, M., Fouillaud, M., Petit, T., Vinale, F., Dufossé, L., & Caro, Y. (2017). Production and new extraction method of polyketide red pigments produced by ascomycetous fungi from terrestrial and marine habitats. *Journal of Fungi*, 3(3), 21. <https://doi.org/10.3390/jof3030034>
- Lopes, F. C., Tichota, D. M., Pereira, J. Q., Segalin, J., De Oliveira Rios, A., & Brandelli, A. (2013). Pigment production by filamentous fungi on agro-industrial byproducts: An eco-friendly alternative. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(3), 616–625. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0392-y>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Mahapatra, S., & Banerjee, D. (2013). Fungal exopolysaccharide: Production , composition and applications. *Microbiology Insights*, 6, 1–16. <https://doi.org/10.4137/MBI.S10957>
- Maldonado, M.C., & Ibarra, L.V. (2005). Organic dyes from fungi and lichens. En Deshmukh, S.K. y Rai, M.K. (Eds.) In *Biodiversity of Fungi Their Role in Human Life* (pp. 375–407). Enfield: Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd.
- Manan, M. A. (2017). *Monascus spp.*: A source of natural microbial color through fungal biofermentation. *Journal of Microbiology and Experimentation*, 5(3), 1-19. <https://doi.org/10.15406/jmen.2017.05.00148>
- Manan, M. A., & Webb, C. (2017). Design aspects of solid state fermentation as applied to microbial bioprocessing. *Applied Biotechnology and Bioengineering*, 4(1), 511–532. <https://doi.org/10.15406/jabb.2017.04.00094>
- Manan, M. A., & Webb, C. (2018a). Evaluation of standard procedures for inoculum transfer for homogeneous distribution during the start-up of a fungal solid state fermentation process. *Journal of Biotech Research*, 9, 48–57. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/327446983_Evaluation_of_standard_procedures_for_inoculum_transfer_for_homogeneous_distribution_during_the_start_up_of_a_fungal_solid_state_fermentation_process
- Manan, M. A., & Webb, C. (2018b). Estimating fungal growth in submerged fermentation in the presence of solid particles based on colour development. *Biotechnology and*

Biotechnological Equipment, 32(3), 618–627.
<https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1440974>

- Mapari, S. A., & Meyer, A. S. (2008). Evaluation of *Epicoccum nigrum* for growth , morphology and production of natural colorants in liquid media and on a solid rice medium. *Biotechnology Letters*, 30, 2183–2190. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9798-y>
- Mapari, S. A., Meyer, A. S., Thrane, U., & Frisvad, J. C. (2009). Identification of potentially safe promising fungal cell factories for the production of polyketide natural food colorants using chemotaxonomic rationale. *Microbial Cell Factories*, 8, 24. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-24>
- Mapari, S. A., Nielsen, K. F., Larsen, T. O., Frisvad, J. C., Meyer, A. S., & Thrane, U. (2005). Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(2), 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.03.004>
- Mapari, S. A., Thrane, U., & Meyer, A. S. (2010). Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? *Trends in Biotechnology*, 28(6), 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.03.004>
- Marone, M., Mozzetti, S., Ritis, D. De, Pierelli, L., & Scambia, G. (2001). Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biological Procedures*, 3(1), 19–25. <https://doi.org/10.1251 / FBo20>
- Martiansyah, I., Amanah, D., & Putranto, R. (2018). Semi-quantitative RT-PCR analysis of transcripts encoding protease inhibitor in *Hevea brasiliensis* Muell . *Arg latex*. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 183(012004). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/183/1/012004>
- Marzano, A. (2013). Murex, purple dye, and other ‘fruits of the sea’. En *Harvesting the Sea: The Exploitation of Marine Resources in the Roman Mediterranean* (pp. 142–172). <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199675623.003.0006>
- Méndez, A., Pérez, C., Montañez, J. C., Martínez, G., & Aguilar, C. N. (2011). Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. *Journal of Zheijang University Science B*, 12(12), 961–968. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1100039>

- Meruvu, H., & dos Santos, J. C. (2021). Colors of life: a review on fungal pigments. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1–25. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1901647>
- Morales-Oyervides, L, Oliveira, J., Sousa-Gallagher, M., Mendez-Zavala, A., & Montañez, J. (2017a). Selection of best conditions of inoculum preparation for optimum performance of the pigment production process by *Talaromyces spp.* using the Taguchi method. *Biotechnology Progress*, 33(3), 621–632. <https://doi.org/10.1002/btpr.2470>
- Morales-Oyervides, L, Oliveira, J., Sousa-Gallagher, M., Méndez-Zavala, A., & Montañez, J. (2017b). Assessment of the dyeing properties of the pigments produced by *talaromyces spp.* *Journal of Fungi*, 3(3), 1–9. <https://doi.org/10.3390/jof3030038>
- Morales-Oyervides, L., Oliveira, J., & Sousa-Gallagher, M. (2017). Perstraction of intracellular pigments through submerged fermentation of *Talaromyces spp.* in a surfactant rich media : A novel approach for enhanced pigment recovery. *Journal of Fungi*, 3(3), 33. <https://doi.org/10.3390/jof3030033>
- Morales-Oyervides, L, Ruiz-Sánchez, J. P., Oliveira, J., Sousa-Gallagher, M., Méndez-Zavala, A., Giuffrida, D., ... Montañez, J. (2020). Biotechnological approaches for the production of natural colorants by *Talaromyces/Penicillium*: A review. *Biotechnology Advances*, 43, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107601>
- Mortensen, A. (2006). Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure and Applied Chemistry*, 78(8), 1477–1491. <https://doi.org/10.1351/pac200678081477>
- Mukherjee, G., Mishra, T., & Deshmukh, S. K. (2017). Fungal Pigments: An Overview. In J. B. Satyanarayana T., Deshmukh S. (Ed.), *Developments in Fungal Biology and Applied Mycology* (pp. 525–541). Springer, Singapore. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-10-4768-8_26
- Musoni, M., Destain, J., Thonart, P., Bahama, J., & Delvigne, F. (2015). Bioreactor design and implementation strategies for the cultivation of filamentous fungi and the production of fungal metabolites : from traditional methods to engineered systems. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, 19(4), 430–442. Recuperado de: <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=12469>
- Narendrababu, B., & Shishupala, S. (2017). Spectrophotometric detection of pigments from

- Aspergillus* and *Penicillium* isolates. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 5(01), 53–58. <https://doi.org/10.7324/jabb.2017.50109>
- Narsing Rao, M. P., Xiao, M., & Li, W. (2017). Fungal and bacterial pigments : Secondary metabolites with wide applications. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01113>
- O’Callaghan, J., Coghlan, A., Abbas, A., García-Estrada, C., Martín, J. F., & Dobson, A. (2013). Functional characterization of the polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Penicillium verrucosum*. *International Journal of Food Microbiology*, 161(3), 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.014>
- Ooijkaas, L. P., Weber, F. J., Buitelaar, R. M., Tramper, J., & Rinzema, A. (2000). Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends in Biotechnology*, 18(8), 356–360. [https://doi.org/10.1016 / s0167-7799 \(00\) 01466-9](https://doi.org/10.1016 / s0167-7799 (00) 01466-9).
- Osińska - Jaroszuk, M., Jarosz-Wilkolazka, A., Jaroszuk - Ścisiel, J., Szaląpata, K., Nowak, A., Jaszek, M., ... Majewska, M. (2015). Extracellular polysaccharides from Ascomycota and Basidiomycota : Production conditions , biochemical characteristics , and biological properties. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31, 1823–1844. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1937-8>
- Pandey, N., Jain, R., Pandey, A., & Tamta, S. (2018). Optimisation and characterisation of the orange pigment produced by a cold adapted strain of *Penicillium sp.* (GFBI _ P155) isolated from mountain ecosystem. *Mycology*, 9(2), 81–92. <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1423127>
- Pandit, S. G., Mekala Ramesh, K. P., Puttananjaiah, M., & Dhale, M. A. (2019). *Cicer arietinum* (Bengal gram) husk as alternative for *Talaromyces purpureogenus* CFRM02 pigment production : Bioactivities and identification. *LWT - Food Science and Technology*, 116, 108499. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108499>
- Pandit, S. G., Puttananjaiah, M., Serva Peddha, M., & Dhale, M. A. (2019). Safety efficacy and chemical profiling of water-soluble *Talaromyces purpureogenus* CFRM02 pigment. *Food Chemistry*, 310, 125869. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125869>
- Passos, M. L., & Saraiva, M. L. (2019). Detection in uv-visible spectrophotometry:

- Detectors, detection systems, and detection strategies. *Measurement*, 135, 896–904.
<https://doi.org/10.1016/j.measurement.2018.12.045>
- Perrone, G., & Susca, A. (2017). *Penicillium* species and their associated mycotoxins. In A. Moretti & A. Susca (Eds.), *Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (pp. 107–119). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0>
- Perrone, G., Logrieco, A. F., & Frisvad, J. C. (2017). Comments on “Screening and identification of novel ochratoxin A-producing fungi from grapes. *Toxins* 2016, 8, 333”—in reporting ochratoxin a production from strains of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces*. *Toxins*, 9(2), 3–7. <https://doi.org/10.3390/toxins9020065>
- Pimenta, L.P.S., Gomes, D.C., Cardoso, P.G. & Takahashi, J.A. (2021). Recent Findings in Azaphilone Pigments. *Journal of Fungi*; 7(7), 541. <https://doi.org/10.3390/jof7070541>
- Pisareva, E. I., & Kujumdzieva, A. V. (2010). Influence of carbon and nitrogen sources on growth and pigment production by *Monascus pilosus* C1 strain. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 24, 501–506. <https://doi.org/10.1080/13102818.2010.10817890>
- Poorniammal, R., Prabhu, S., Dufossé, L., & Kannan, J. (2021). Safety Evaluation of Fungal Pigments for Food Applications. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 7(9), 692. <https://doi.org/10.3390/jof7090692>
- Räisänen, R. (2002). Anthraquinones from the fungus *Dermocybe sanguinea* as textile dyes. (Tesis de licenciatura, Universidad Helsinki). Recuperado de: <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-10-5928-5>
- Raja Rajeswari, T., Ponnusami, V., & Sugumaran, K. R. (2014). Production of *Monascus* pigment in low cost fermentation. *International Journal of ChemTech Research*, 6(5), 2929–2932. Recuperado de: [https://sphinxesai.com/2014/vol6pt5/5/\(2929-2932\)S-2014.pdf](https://sphinxesai.com/2014/vol6pt5/5/(2929-2932)S-2014.pdf)
- Rapp, G. R. (2009). Pigments and Colorants. In *Archaeomineralogy* (2° ed., pp. 197–217). https://doi.org/10.1007/978-3-662-05005-7_9
- Rivera, K. G., Díaz, J., Chavarría-Díaz, F., Garcia, M., Urb, M., Thorn, R. G., ... Seifert, K. (2012). *Penicillium mallochii*. *Mycotaxon*, 119, 315–328. <http://dx.doi.org/10.5248/119.315>

- Robinson, T., Singh, D., & Nigam, P. (2001). Solid-state fermentation : a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 284–289. <https://doi.org/10.1007/s002530000565>
- Rodrigues, C. F., & Černáková, L. (2020). Farnesol and tyrosol: Secondary metabolites with a crucial quorum-sensing role in candida biofilm development. *Genes*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/genes11040444>
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2016). Natural food pigments and colorants. *Current Opinion in Food Science*, 7, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.08.004>
- Romero, M., Grasa, M. del M., Esteve, M., Fernández-López, J. A., & Alemany, M. (2007). Semiquantitative RT-PCR measurement of gene expression in rat tissues including a correction for varying cell size and number. *Nutrition and Metabolism*, 4(26), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-4-26>
- Rosas, P. (2017). Aislamiento y selección de hongos productores de colorantes (Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Agraria La Molina). Recuperado de: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/111/browse?type=author&value=Rosas+Ramos%2C+Paola>
- Rosenblitt, A., Agosin, E., Delgado, J., & Pérez-Correa, R. (2000). Solid substrate fermentation of *Monascus purpureus*: Growth, carbon balance, and consistency analysis. *Biotechnology Progress*, 16(2), 152–162. <https://doi.org/10.1021/FB0000048>
- Samson, R. A., & Houbraken, J. (2011). Phylogenetic and taxonomic studies on the genera *Penicillium* and *Talaromyces*. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0616\(14\)60061-0](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0616(14)60061-0)
- Santos-Ebinuma, V. C., Roberto, I. C., Texeira, M. F. S., & Pessoa, A. (2013). Improving of red colorants production by a new *Penicillium purpurogenum* strain in submerged culture and the effect of different parameters in their stability. *Biotechnology Progress*, 29(3), 779–785. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.03.004>
- Santos-Ebinuma, V. C., Roberto, I. C., Teixeira, M. F. S., & Pessoa, A. (2014). Improvement of submerged culture conditions to produce colorants by *Penicillium purpurogenum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2), 731–742. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000200049>

- Santos-Ebinuma, V. C., Teixeira, M. F. S., & Pessoa, A. (2013). Submerged culture conditions for the production of alternative natural colorants by a new isolated *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(6), 802–810. <https://doi.org/10.4014/jmb.1211.11057>
- Sehnem, N. T., Ramos de Bittencourt, L., Camassola, M., & Dillon, A. J. . (2006). Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 163–167. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0251-z>
- Sen, T., Barrow, C. J., & Deshmukh, S. K. (2019). Microbial pigments in the food industry challenges and the way forward. *Frontiers in Nutrition*, 6, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00007>
- Shah, S. (2015). Production and characterization of colored metabolites and pigments of microbial isolates (Tesis doctoral, Quaid-i-Azam University). Recuperado de: <http://pr.hec.gov.pk/jspui/handle/123456789//7621>
- Sindhu, R., Pandey, A., & Binod, P. (2015). Solid-state fermentation for the production of poly (hydroxyalkanoates). *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 29(2), 173–181. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2014.2256>
- Singhania, R. R., Sukumaran, R. K., Patel, A. K., Larroche, C., & Pandey, A. (2010). Enzyme and microbial technology advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(7), 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.03.010>
- Siqueira, V. M., & Lima, N. (2013). Biofilm formation by filamentous fungi recovered from a water system. *Journal of Mycology*, 2013(3). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2013/152941>
- Srivastava, N., Srivastava, M., Ramteke, P. W., & Mishra, P. K. (2019). Solid-state fermentation strategy for microbial metabolites production: An overview. In G. Vijai & P. Anita (Eds.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Secondary Metabolites Biochemistry and Applications* (pp. 345–354). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63504-4.00023-2>
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56, 187–209.

<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>

- Storari, M., Pertot, I., Gessler, C., & Brogгинi, G. A. L. (2010). Amplification of polyketide synthase gene fragments in ochratoxigenic and nonochratoxigenic black aspergilli in grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 49(3), 393–405. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-8647
- Subramaniam, R., & Vimala, R. (2012). Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: A comparative study. *International Journal of Science and Nature*, 3(3), 480–486. Recuperado de: https://www.academia.edu/19985568/Solid_state_and_submerged_fermentation_for_the_production_of_bioactive_substances_a_comparative_study
- Suzuki, S., Hosoe, T., Nozawa, K., Yaguchi, T., Udagawa, S. I., & Kawai, K. I. (1999). Mitorubrin derivatives on ascospores of some *Talaromyces* species of ascomycetous fungi. *Journal of Natural Products*, 62(9), 1328–1329. <https://doi.org/10.1021/np990146f>
- Tam, E. W. T., Tsang, C. C., Lau, S. K. P., & Woo, P. C. Y. (2015). Polyketides, toxins and pigments in *Penicillium marneffei*. *Toxins*, 7(11), 4421–4436. <https://doi.org/10.3390/toxins7114421>
- Teixeira, M. F., Martins, M. S., da Silva, J. C., Kirsch, L. S., Fernandes, O. C. C., Carneiro, A. L. B., ... Durán, N. (2012). Amazonian biodiversity: pigments from *Aspergillus* and *Penicillium* characterizations, antibacterial activities and their toxicities. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 6(3), 300–311. Recuperado de: <https://www.semanticscholar.org/paper/Amazonian-Biodiversity%3A-Pigments-from-Aspergillus-Teixeira-Martins/5256560d3b75edc5e04dc25c15ae577e54cdf889>
- Tirumale, S., & Wani, N. A. (2018). Biopigments: Fungal pigments. In P. Gehlot & J. Singh (Eds.), *Fungi and their Role in Sustainable Development: Current Perspective* (pp. 413–426). https://doi.org/10.1007/978-981-13-0393-7_23
- Tissue, B. M. (2012). Ultraviolet and visible absorption spectroscopy. In E. Kaufmann (Ed.), *Characterization of Materials* (pp. 688–698). <https://doi.org/doi:10.1002/0471266965.com059.pub2>
- Tolborg, G., Ødum, A. S. R., Isbrandt, T., Larsen, T. O., & Workman, M. (2019). Unique processes yielding pure azaphilones in *Talaromyces atroroseus*. *Applied*

- Microbiology and Biotechnology, 104, 603–613. <https://doi.org/10.1007 / s00253-019-10112-w>.
- Tolosa, J., Barba, F. J., Pallarés, N., & Ferrer, E. (2020). Mycotoxin identification and in silico toxicity assessment prediction in atlantic salmon. *Marine Drugs*, 18(629), 1–17. <https://doi.org/10.3390 / md18120629>.
- Torres, F., Zaccarim, B., de Lencastre Novaes, L., Jozala, A., Dos Santos, C., Teixeira, M. F., & Santos-Ebinuma, V. (2016). Natural colorants from filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(6), 2511–2521. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7274-x>
- Tuli, H. S., Chaudhary, P., & Beniwal, V. (2015). Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. *Journal Food Science and Technology*, 52, 4669–4678. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1601-6>
- Velázquez, M. E. (2013). Producción de pigmentos fúngicos (*Monascus purpureus* 2955) en residuos agroindustriales por fermentación sólida (Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro). Retrieved from <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/542/62759s.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Vele Caymayo, M. A. (2017). Determinación de colorantes naturales textiles de la Parroquia Tarqui (Tesis de licenciatura, Universidad del Azuay). Recuperado de: <https://docplayer.es/95396089-Determinacion-de-colorantes-naturales-textiles-de-la-parroquia-tarqui.html>
- Velmurugan, P., Hur, H., Balachandar, V., Kamala-Kannan, S., Lee, K. J., Lee, S. M., ... Oh, B. T. (2011). *Monascus* pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112(6), 590–594. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.08.009>
- Velmurugan, P., Lee, Y. H., Venil, C. K., Lakshmanaperumalsamy, P., Chae, J. C., & Oh, B. T. (2010). Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(4), 346–350. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.10.003>
- Venant, L., Nambela, L., & Mgani, Q. (2019). A review on source, chemistry, green

- synthesis and application of textile colorants. *Journal of Cleaner Production*, 246, 1–58. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119036>
- Vendruscolo, F., Bühler, R. M. M., de Carvalho, J. C., de Oliveira, D., Moritz, D. E., Schmidell, W., & Ninow, J. L. (2016). Monascus: a reality on the production and application of microbial pigments. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178(2), 211–223. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1880-z>
- Venkatachalam, M., Shum-Chéong-Sing, A., & Dufossé, L. (2020). Statistical optimization of the physico-chemical parameters for pigment production in submerged fermentation of *Talaromyces albobiverticillius* 30548. *Microorganisms*, 8(5), 711. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050711>
- Villena, G. K., & Gutiérrez-Correa, M. (2006). Production of cellulase by *Aspergillus niger* biofilms developed on polyester cloth. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 262–268. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01960.x>
- Villena, G. K., Venkatesh, L., Yamazaki, A., Tsuyumu, S., & Gutiérrez-Correa, M. (2009). Initial intracellular proteome profile of *Aspergillus niger* biofilms. *Revista Peruana de Biología*, 16(1), 101–108. Recuperado de: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v16n1/a13v16n1.pdf>
- Wang, J., Zhang, R., Chen, X., Sun, X., Yan, Y., Shen, X., & Yuan, Q. (2020). Biosynthesis of aromatic polyketides in microorganisms using type II polyketide synthases. *Microbial Cell Factories*, 19(110), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01367-4>
- Wang, Y., Wang, L., Liu, F., Wang, Q., Selvaraj, J. N., Xing, F., ... Liu, Y. (2016). Ochratoxin A producing fungi, biosynthetic pathway and regulatory mechanisms. *Toxins*, 8(3), 1–15. <https://doi.org/10.3390/toxins8030083>
- Wang, Y., Wang, L., Wu, F., Liu, F., Wang, Q., Zhang, X., ... Liu, Y. (2018). A consensus ochratoxin A biosynthetic pathway: insights from the genome sequence of *Aspergillus ochraceus* and a comparative genomic analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(19), 1–15. <https://doi.org/10.1128 / AEM.01009-18>
- Wang, Y.-Z., Ju, X.-L., & Zhou, Y.-G. (2005). The variability of citrinin production in *Monascus* type cultures. *Food Microbiology*, 22(1), 145–148.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.01.006>

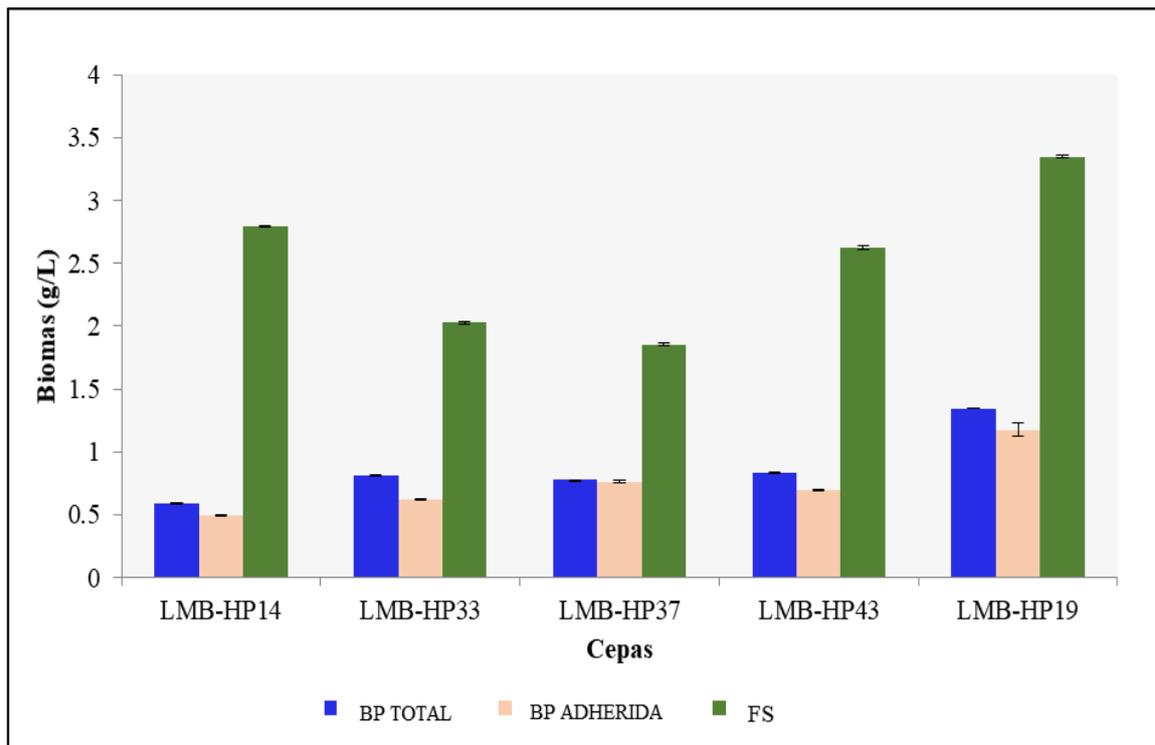
- Woo, P. C. Y., Lam, C. -W., Tam, E. W. T., Leung, C. K. F., Wong, S. S. Y., Lau, S. K. P., & Yuen, K. Y. (2012). First discovery of two polyketide synthase genes for mitorubrinic acid and mitorubrinol yellow pigment biosynthesis and implications in virulence of *Penicillium marneffe*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(10), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001871>
- Woo, P. C. Y., Lam, C.-W., Tam, E. W. T., Lee, K.-C., Yung, K. K. Y., Leung, C. K. F., ... Yuen, K.-Y. (2014). The biosynthetic pathway for a thousand-year-old natural food colorant and citrinin in *Penicillium marneffe*. *Scientific Reports*, 4, 6728. <https://doi.org/10.1038/srep06728>
- Xin, Q., Pan, T., Zhang, W., & Wang, Z. (2019). Submerged culture of marine-derived *Penicillium sclerotiorum* FS50 to produce sclerotiorin. *Process Biochemistry*, 79, 28–31. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.009>
- Yilmaz, N., Visagie, C. M., Frisvad, J. C., Houbraken, J., Jacobs, K., & Samson, R. A. (2016). Taxonomic re-evaluation of species in *Talaromyces* section *Islandici*, using a polyphasic approach. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 36, 37–56. <https://doi.org/10.3767/003158516X688270>
- Yilmaz, N., Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2014). Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. *Studies in Mycology*, 78(1), 175–341. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.08.001>
- Yusuf, M., Shabbir, M., & Mohammad, F. (2017). Natural Colorants : historical , processing and sustainable prospects. *Natural Products and Bioprospecting*, 7(1), 123–145. <https://doi.org/10.1007/s13659-017-0119-9>
- Zaccarim, B. R., de Oliveira, F., Passarini, M. R. Z., Duarte, A. W. F., Sette, L. D., Jozala, A. F., ... Santos-Ebinuma, V. (2019). Sequencing and phylogenetic analyses of *Talaromyces amestolkiae* from Amazon: A producer of natural colorants. *Biotechnology Progress*, 35(e2684). <https://doi.org/10.1002/btpr.2684>
- Zhai, M.-M., Li, J., Jiang, C.-X., Shi, Y.-P., Di, D.-L., Crews, P., & Wu, Q.-X. (2016). The Bioactive secondary metabolites from *Talaromyces* species. *Natural Products and Bioprospecting*, 6(1), 1–24. <https://doi.org/10.1007/s13659-015-0081-3>
- Zhang, M., Yan, L., Huang, Q., Bu, T., Yu, S., Zhao, X., ... Daohong, Z. (2017). Highly

sensitive simultaneous detection of major ochratoxins by an immunochromatographic assay. In Food Control. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.035>

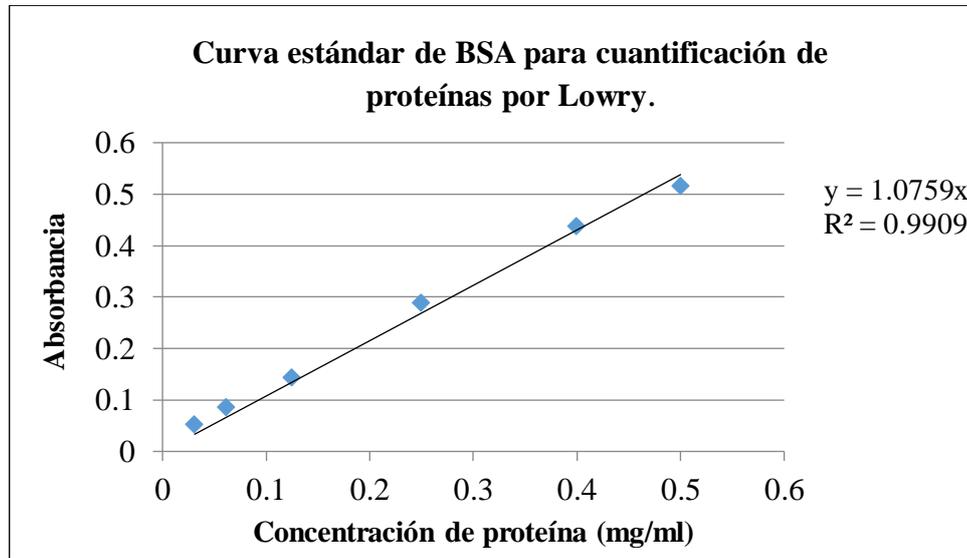
Zhang, X., Li, Y., Wang, H., Gu, X., Zheng, X., Wang, Y., ... Zhang, H. (2016). Screening and identification of novel ochratoxin A producing fungi from grapes. *Toxins*, 8(333), 1–14. <https://doi.org/10.3390/toxins8110333>

VIII. ANEXOS

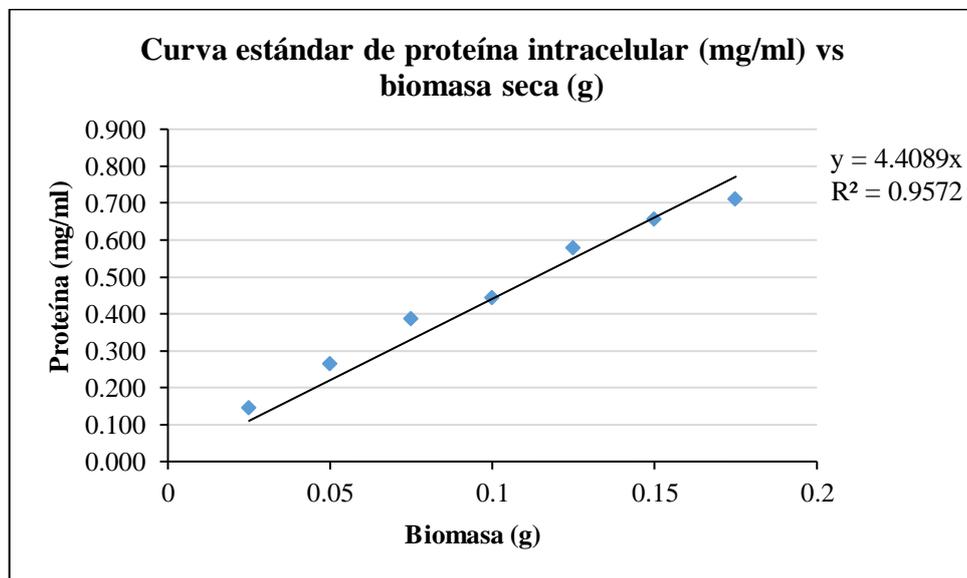
Anexo 1: Cuantificación de biomasa de las cinco cepas por peso seco en FB y FS



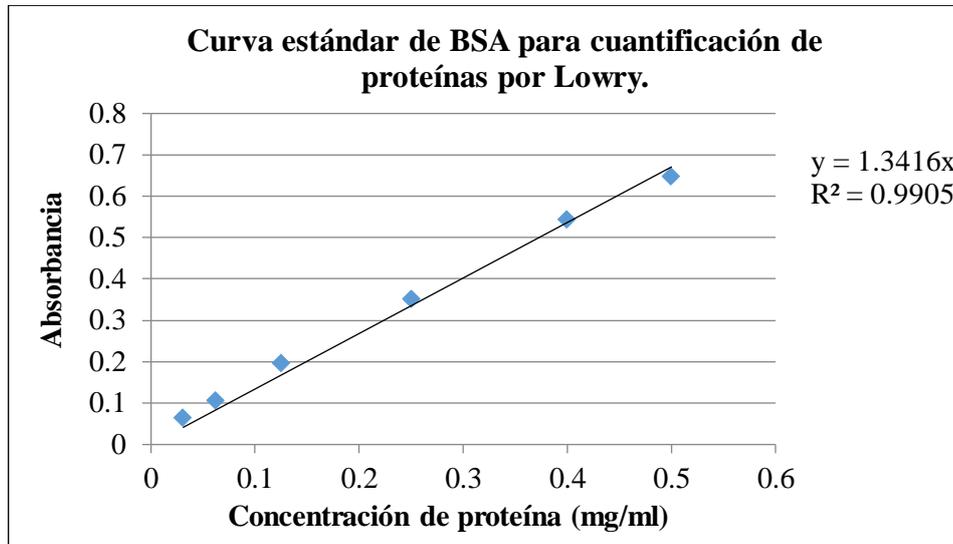
Anexo 2: Curva estándar de BSA para cuantificación de proteínas por método de Lowry para *Penicillium mallochii* LMB-HP37



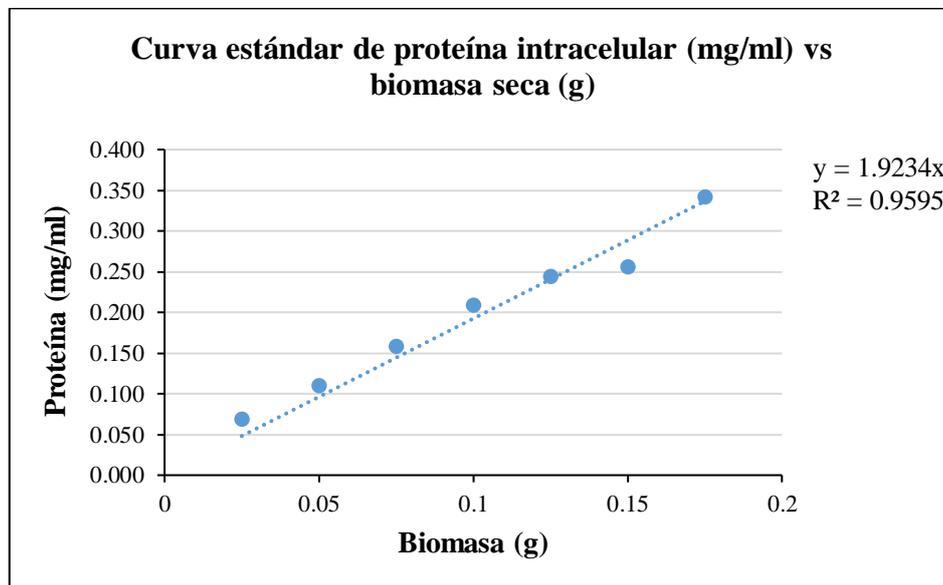
Anexo 3: Curva estándar de proteína intracelular (mg/ml) vs biomasa seca (g) para *Penicillium mallochii* LMB-HP37



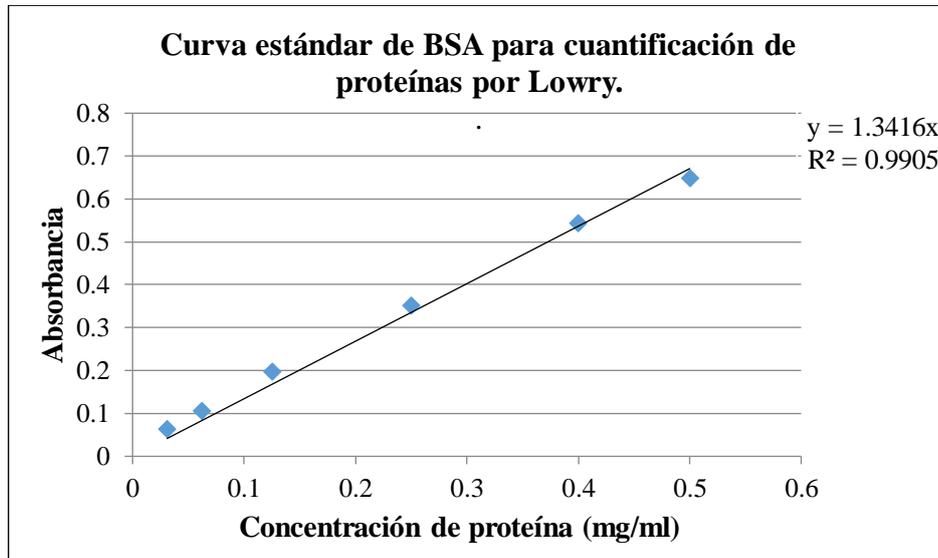
Anexo 4: Curva estándar de BSA para cuantificación de proteínas por método de Lowry para *Talaromyces brunneus* LMB-HP43



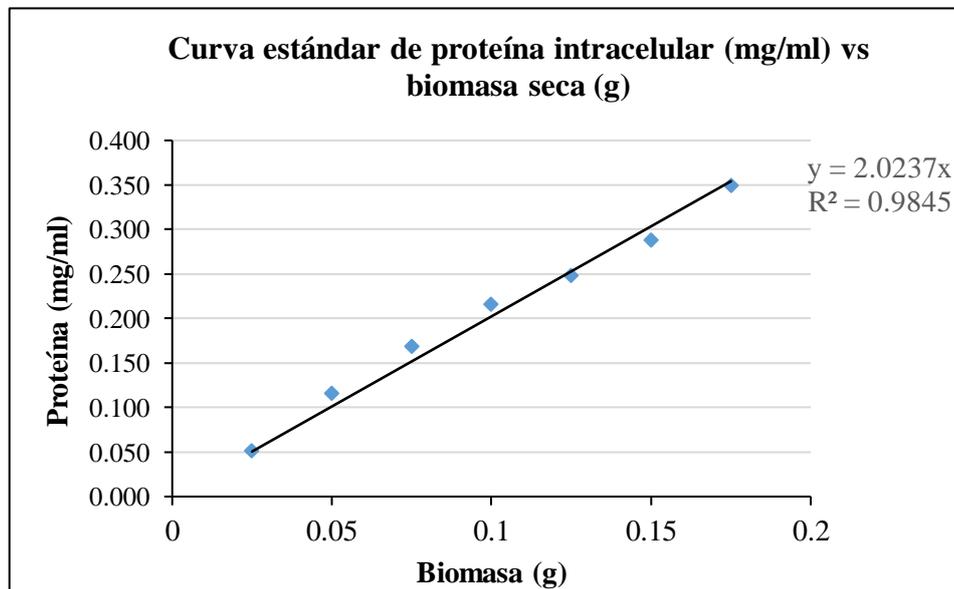
Anexo 5: Curva estándar de proteína intracelular (mg/ml) vs biomasa seca (g) para *Talaromyces brunneus* LMB-HP43



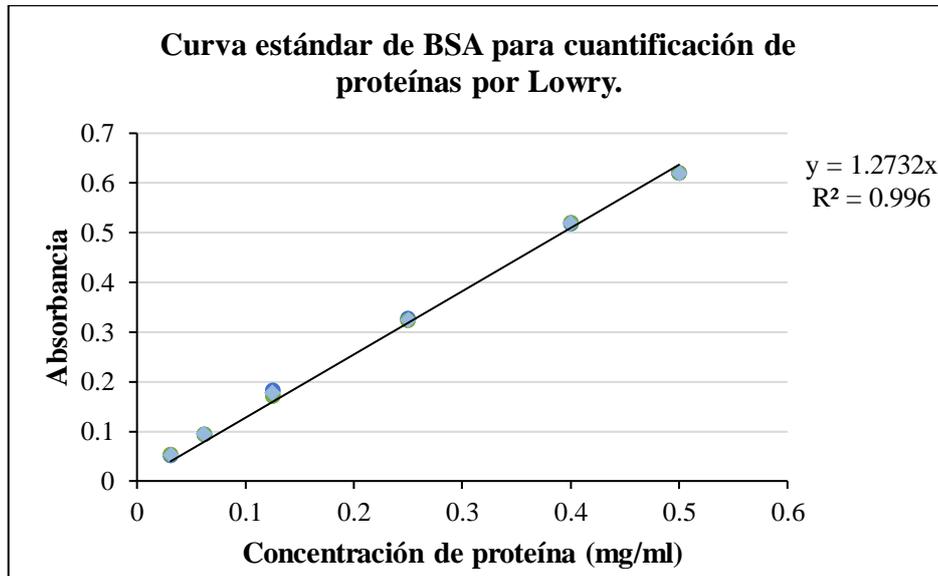
Anexo 6: Curva estándar de BSA para cuantificación de proteínas por método de Lowry para *Penicillium mallochii* LMB-HP19



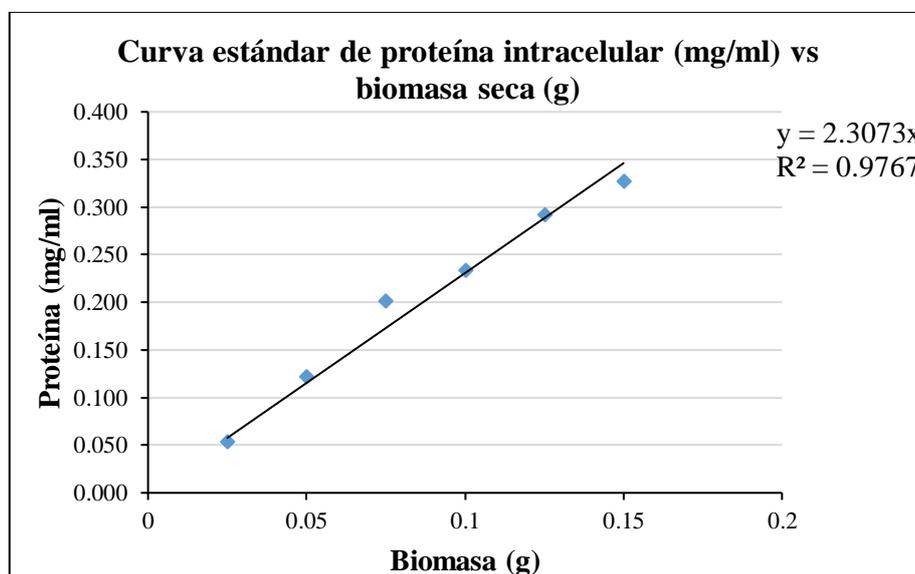
Anexo 7: Curva estándar de proteína intracelular (mg/ml) vs biomasa seca (g) para *Penicillium mallochii* LMB-HP19



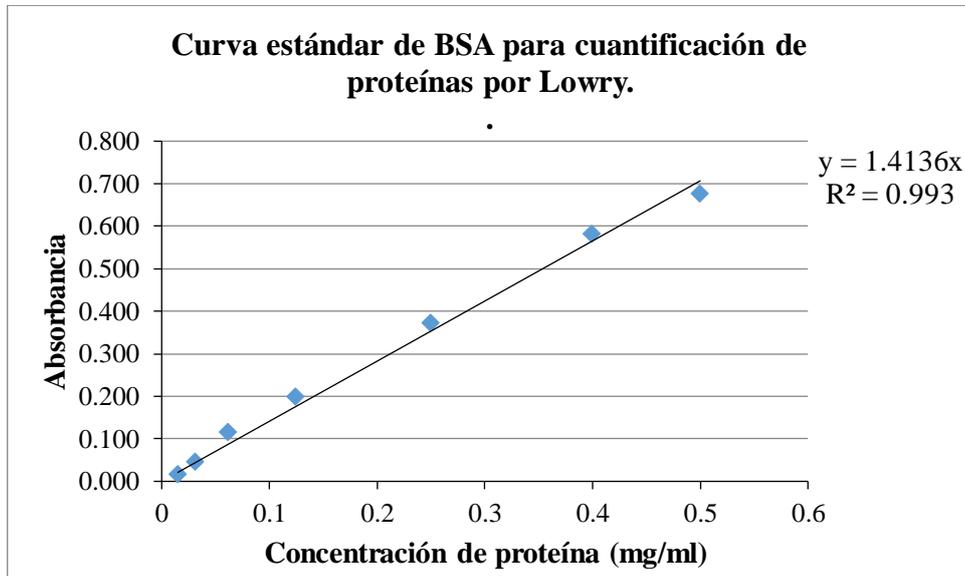
Anexo 8: Curva estándar de BSA para cuantificación de proteínas por método de Lowry para *Penicillium maximae* LMB-HP33



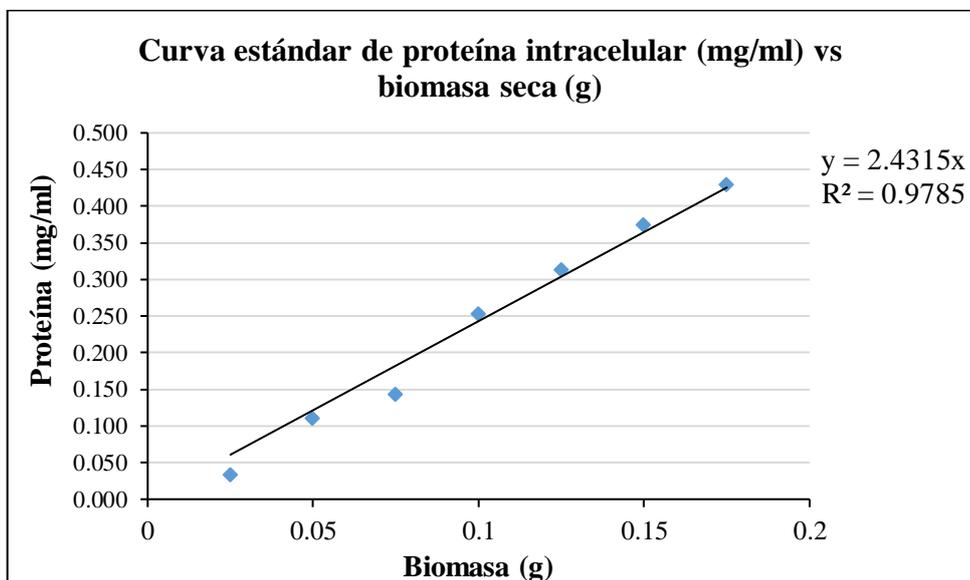
Anexo 9: Curva estándar de proteína intracelular (mg/ml) vs biomasa seca (g) para *Penicillium maximae* LMB-HP33



Anexo 10: Curva estándar de BSA para cuantificación de proteínas por método de Lowry para *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14



Anexo 11: Curva estándar de proteína intracelular (mg/ml) vs biomasa seca (g) para *Talaromyces wortmannii* LMB-HP14



Anexo 12: Pruebas estadísticas para confirmar los supuestos en R

Prueba de Shapiro Wilk para analizar la normalidad de los datos y prueba varianza no constante para analizar homogeneidad de varianza

```
#Pruebas estadísticas para confirmar los supuestos
#Normalidad de los errores en el modelo aditivo lineal
resid <- residuals(modelo1)
nor <- shapiro.test(resid)
#Homogeneidad de varianzas
homo <- car::ncvTest(modelo1)
Resultados <-c(nor$p.value,homo$p)
Resultados
## [1] 2.965942e-05 1.162668e-16
```

Como P valor < 0.05, los supuestos no se cumplen.

Se recomienda usar pruebas no paramétricas.

Anexo 13: Prueba de Friedman para el análisis de los tres sistemas de fermentación

```

#Pruebas no paramétricas
#Friedman con bloqueo según los tipos cepa.
restulados1 <- agricolae::friedman(da$cepa,da$ferm,da$Y,group = F) #en
bloques
restulados1
## $statistics
##   Chisq Df   p.chisq         F DFerror      p.F  t.value    LSD
##   1.2   2 0.5488116 0.5454545         8 0.5888614 2.306004 7.64815
##
## $parameters
##      test name.t ntr alpha
##  Friedman da$ferm  3  0.05
##
## $means
##      da.Y rankSum      std  r      Min      Max      Q25
Q50
## bp   28.01214      8  16.18855 10  8.40026   50.13015 11.67933
30.21716
## fes 341.69033     11 437.59026 10  0.00000 1036.50073  0.00000
54.78153
## fs   37.83990     11  39.49248 10  3.16573  111.51148 13.86798
20.31627
##      Q75
## bp   42.12104
## fes 642.23847
## fs   43.88982
##
## $comparison
##      difference p value signif.    LCL  UCL
## bp - fes      -3 0.3921      -10.65 4.65
## bp - fs       -3 0.3921      -10.65 4.65
## fes - fs       0 1.0000       -7.65 7.65
##
## $groups
## NULL
##
## attr(,"class")
## [1] "group"
\ [H_0: Me_1=Me_2=Me_3\]
\ (H_1:\) Al menos un \ (Me_i\ ) es diferente a los demás \ (i=1,2,3\ )

```

Con un p valor de 0.5488116 no se rechaza la H0, a un nivel de significación del 5% se ha encontrado suficiente evidencia estadística para no rechazar la H0 de que los sistemas de fermentación tienen un efecto igual sobre la mediana de la producción de colorante. Por lo tanto, se puede aceptar que no existen diferencias significativas entre la producción mediana de colorante entre los tipos de fermentación.

Anexo 14: Prueba de Kruskal Wallis para el análisis de las cinco cepas

```

#Pruebas no paramétricas
#Kruskalw para los tipos cepa.
restulados2 <- agricolae::kruskal(y = da$Y,trt = da$cepa,alpha =
0.05,group = F)
restulados2
## $statistics
##      Chisq Df      p.chisq  t.value      MSD
##  15.57874  4 0.003639792 2.059539 7.661311
##
## $parameters
##      test p.adjusted name.t ntr alpha
##  Kruskal-Wallis      none da$cepa  5 0.05
##
## $means
##      da.Y      rank      std r      Min      Max      Q25
Q50
## 1 235.68764 20.666667 308.579790 6 28.66445 650.72947 34.2062049
43.098281
## 2 390.46386 24.833333 488.569717 6 36.66524 1036.50073 63.7553441
108.071204
## 3 26.00289 14.000000 22.437949 6 8.40026 56.41020 10.7052322
14.153864
## 4 10.92550 8.666667 9.223069 6 0.00000 20.87725 2.7246060
12.460245
## 5 16.15740 9.333333 22.340157 6 0.00000 45.88503 0.7914326
3.559883
##      Q75
## 1 473.74445
## 2 780.38633
## 3 43.54605
## 4 18.32198
## 5 33.94324
## $comparison
##      Difference pvalue Signif.      LCL      UCL
## 1 - 2 -4.1666667 0.2733      -11.8279778  3.494645
-----
## 1 - 3 6.6666667 0.0852      -0.9946445 14.327978
## 1 - 4 12.0000000 0.0035      ** 4.3386888 19.661311
## 1 - 5 11.3333333 0.0054      ** 3.6720222 18.994645
## 2 - 3 10.8333333 0.0074      ** 3.1720222 18.494645
## 2 - 4 16.1666667 0.0002      *** 8.5053555 23.827978
## 2 - 5 15.5000000 0.0003      *** 7.8386888 23.161311
## 3 - 4 5.3333333 0.1640      -2.3279778 12.994645
## 3 - 5 4.6666667 0.2213      -2.9946445 12.327978
## 4 - 5 -0.6666667 0.8592      -8.3279778  6.994645
##
## $groups
##  NULL

```

```
## attr(,"class")
## [1] "group"
\[H_0: Me_1=Me_2=Me_3=Me_4=Me_5\]
\ (H_1:\) Al menos un \ (Me_j\ ) es diferente a los demás \ (j=1,2,3,4,5\ )
```

Con un p valor de 0.003639792 se rechaza la H₀, a un nivel de significación del 5% se ha encontrado suficiente evidencia estadística para rechazar la H₀ de que los métodos de fermentación tienen un efecto igual sobre la mediana de la producción de colorante. Por lo tanto, se puede aceptar que existen diferencias significativas entre al menos una de las producciones mediana de colorante entre los tipos de cepas.

Y con respecto a las comparaciones, solo se ven diferencias altamente significativas entre las cepas 1 - 4, 1 - 5, 2 - 3 y diferencias muy altamente significativas entre 2 - 4 y 2 - 5. Siendo las cepas 1 y 2 las que tienen los mejores resultados en la producción de colorante.