

Artículo

Diseño Básico de Bioproceso para la Producción de Extractos Crudos con Actividad Antibacteriana Proveniente de un Cultivo en Estado Sólido de *Diaporthe sojae*

Isabella Giraldo-Rodríguez¹, Lizeth S. Osorio¹, Nelson H. Caicedo^{1,*}

¹ Departamento de Ingeniería Bioquímica, Universidad Icesi, Cali, Colombia; isabella.giraldo.rodriguez1@u.icesi.edu.co; lsoosorio@icesi.edu.co

* Correspondencia: nhcaicedo@icesi.edu.co

Resumen: La farmacorresistencia por parte de algunas especies bacterianas se ha convertido en una amenaza global para la salud pública, por lo que ha aumentado la necesidad de encontrar nuevas moléculas con actividad antibacteriana. De esta manera, los hongos endófitos filamentosos se han demostrado como una fuente potencial de estos compuestos bioactivos, sin embargo, aún existen pocos reportes de procesos fermentativos para la obtención de estas moléculas, especialmente, para el hongo *Diaporthe sojae* identificado recientemente como productor de extractos crudos con actividad antibacteriana. Por ende, este estudio busca proponer un diseño básico de bioproceso con etapas up-stream, fermentación y down-stream de extractos orgánicos crudos con actividad antibacteriana proveniente del cultivo en estado sólido de la cepa fúngica endófito *Diaporthe sojae*, mediante la evaluación de diferentes condiciones operacionales: (i) limitación de fuente de carbono y nitrógeno, (ii) fuentes de nitrógeno extracto de levadura y licor de maíz, y (iii) relación área superficial de transferencia de nutrientes/volumen de medio (cm⁻¹). En conclusión, se presenta el primer esquema de producción de extractos orgánicos crudos extracelulares obtenidos en una fermentación en estado sólido de *D. sojae* limitado por nitrógeno empleando licor de maíz y una relación área superficial/volumen de 1.53 (cm⁻¹) con bioactividades de amplio espectro contra las bacterias patógenas de referencia *S. aureus* (ATCC 25923) y *E. coli* (ATCC 25923) con un IC₅₀ de 0.59 y 0.69 mg/mL, respectivamente.

Palabras claves: diseño básico bioproceso, actividad antibacteriana, cultivo en estado sólido, extractos crudos, hongo endófito filamentosos, *Diaporthe sojae*

1. Introducción

La aparición y propagación de la resistencia a los antimicrobianos (RAM), especialmente a través de bacterias, se ha denominado como la 'pandemia silenciosa' (1,2), esta ha ocasionado más de 700.000 muertes anuales y, para los próximos 25 años, se estima de ser responsable de 10 millones de muertes (3), por lo que se ha convertido en una amenaza global para la salud pública debido a la incapacidad de tratar estas infecciones de manera eficaz. Ante esta situación, la ciencia se ha planteado algunas perspectivas como conocer los mecanismos de diseminación de la resistencia a antibióticos (4) o la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas.

En este sentido, se ha encontrado diversos microorganismos, como los hongos endófitos que colonizan y viven asintóticamente dentro de los tejidos vegetales sin causar efectos negativos (5), que han demostrado ser excelentes biofábricas de metabolitos secundarios estructuralmente novedosos y biológicamente activos con actividad antibacteriana. En consecuencia, el cribado y la producción de nuevos compuestos bioactivos a partir de hongos endófitos representa una fuente potencial para el desarrollo de nuevos antibióticos (6).

Entre estos, las especies del género *Diaporthe* y su anamorfo *Phomopsis* han sido ampliamente estudiadas por la producción de metabolitos secundarios, encontrándose diferentes moléculas orgánicas como cromononas, furanones, pirones, quinones, fenoles, triterpenoides, esteroides, lactonas de diez miembros, alcaloides y ácidos grasos con actividad antibacteriana (7). Asimismo, Charria-Girón *et al.* (8) revelaron el potencial de la especie *Diaporthe sojae* como productora de metabolitos secundarios extracelulares, contenidos en fracciones de extractos crudos, que son un conjunto de diferentes moléculas orgánicas bioactivas, con una actividad antibacteriana de amplio espectro contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

La producción de estos metabolitos fúngicos se realiza mediante fermentaciones en sumergido y en estado sólido. El cultivo en líquido de hongos filamentosos presenta ventajas como una mayor producción de biomasa micelial y de metabolitos bioactivos en un periodo más corto. En esta, la composición del medio, la temperatura, el pH, la aireación, la agitación, el oxígeno disuelto, entre otros, son parámetros que afectan el crecimiento del micelio y a su vez la síntesis de metabolitos (9,10). Por otro lado, las fermentaciones en estado sólido han generado un interés para la producción de metabolitos secundarios pues tienen mayor rendimiento, menor represión de catabolitos y

mayor estabilidad de los productos sintetizados (10,11). Por ejemplo, Harms *et al.* (12) reportaron un cultivo en estado sólido utilizando 28 g de arroz y una base líquida (extracto de levadura 1 g/L, tartrato de sodio 0.5 g/L, KH₂PO₄ 0.5 g/L) como medio para la obtención y bioprospección de moléculas bioactivas antimicrobianas en diferentes especies de hongos filamentosos, incluyendo la cepa de *Diaporthe sojae* ET-028, el cual fue tomado en este artículo como la fermentación de referencia.

Estas moléculas son sintetizadas en el metabolismo primario y secundario de los hongos filamentosos. No obstante, los metabolitos secundarios no son necesarios para la viabilidad celular, aunque proporcionan una ventaja competitiva al microorganismo que lo produce, puesto que pueden mejorar la disponibilidad de nutrientes, protegerlo del estrés ambiental, mejorar las interacciones competitivas nutricionales con otros microorganismos y ser un mecanismo de defensa metabólica (13). La producción de estos se da en condiciones específicas y su biosíntesis está relacionada a diversos controles regulatorios que en su mayoría están dados por la fuente por nitrógeno. Por lo que, la producción de metabolitos secundarios en hongos filamentosos es favorecida en cultivos limitados por la fuente de nitrógeno, ya que bajo limitación de carbono se prioriza el metabolismo primario para la formación de biomasa.

Si bien se conoce la capacidad biosintética de este género y especie para producir metabolitos con una extensa variedad de aplicaciones farmacéuticas contra la resistencia bacteriana, las investigaciones se han enfocado en evaluar la actividad antibacteriana de los extractos orgánicos crudos obtenidos en cultivos sumergidos o sólidos, e identificar las moléculas que en estos existen (7,14,15), es decir, bajo un enfoque metabolómico. Sin embargo, son aún pocos los estudios orientados a la definición de esquemas de producción de extractos crudos con esta funcionalidad (16) y en especial a partir del cultivo de hongos endófitos filamentosos del género *Diaporthe*.

Finalmente, se revela la necesidad de avanzar de la mano de la ingeniería de bioprocesos y tecnologías de fermentación para presentar un diseño básico que permita obtener extractos orgánicos crudos (EOC) con actividad antibacteriana del género *Diaporthe*. Por consiguiente, este estudio tiene como objetivo proponer un esquema de producción, a escala de laboratorio, de EOC con actividad antibacteriana proveniente del cultivo en estado sólido de la cepa fúngica endófito *Diaporthe sojae* ET-028, mediante la evaluación de cultivos limitados por la fuente de carbono y nitrógeno.

2. Materiales y métodos

2.1. Microorganismo

La cepa del hongo endófito filamentosos *Diaporthe sojae* ET-028 productor de extractos crudos con actividad antibacteriana pertenece a la colección y se mantiene conservado en los laboratorios del departamento de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Icesi (Cali, Colombia) en tubos con agar papa dextrosa inclinado a 29°C.

2.2. Caracterización de carbono y nitrógeno del sustrato sólido

El sustrato sólido empleado en las fermentaciones fue el arroz, debido a los resultados obtenidos en trabajos de bioprospección de moléculas bioactivas fúngicas (17,18). Este fue caracterizado fisicoquímicamente en términos del contenido porcentual de nitrógeno amoniacal mediante el método Kjeldahl y de carbono siguiendo la metodología propuesta por Sluiter *et al.* (19). A partir de una muestra de 300 ± 10 mg de arroz molido y tamizado sobre un malla de 180 µm previamente, se adicionó 3 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 72%, agitando cada 10 min durante una hora a temperatura ambiente. Luego, se agregó 84 mL de agua tipo I para llevar el ácido a una concentración de 4%, que se mezcló y esterilizó durante 15 min (ST-50G; Lab Companion) a 121°C. Después de la reacción, se enfrió y filtró al vacío con un filtro de porosidad 5 (Fisherbrand FilterPaper P5, ThermoFisher Scientific™), el permeado se neutralizó en un rango de pH entre 4 y 5 con hidróxido de bario (Ba(OH)₂). Por último, se tomó una alícuota de 1.5 mL del sobrenadante que se filtró con un filtro jeringa de 0.22 µm, este se llevó a viales para HPLC para determinar la concentración de glucosa y fructosa, y así el porcentaje de carbohidratos estructurales del arroz (Ecuación 1).

$$\% \text{ Carbohidratos estructurales} = \frac{[\text{Azúcares}_{\text{HPLC}}] * V_{\text{trabajo}}}{\text{Inicial de la muestra}} * 100 \quad (1)$$

2.3. Desarrollo del inóculo

El microorganismo se reactivó en cajas Petri con agar YMG a pH 6.3 durante siete días a 29°C. Luego, se preparó una suspensión micelial concentrada (30 mL) en una solución acuosa de Tween 80 al 0.01% (Yequirim®, Colombia), realizando un raspado de micelio de tres cajas Petri colonizadas. Para la formación de biomasa requerida para las fermentaciones en estado sólido se llevó a cabo un cultivo en sumergido en matraces Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 50 mL de medio YMG (extracto de malta, 10 g/L; D-glucosa, 4 g/L; extracto de levadura, 4 g/L) preparado con buffer fosfato a 0.2 M (pH 6.3); luego de la esterilización por 15 min (ST-50G; Lab Companion) cada unidad

experimental se inoculó con 1.85 mL de la suspensión micelial. Por último, se incubaron durante siete días a 29°C y 90 rpm en Shaker Actum hasta obtener pellets fúngicos.

2.4. Fermentación en estado sólido

Para los cultivos en estado sólido se evaluaron como factores la fuente de nitrógeno, extracto de levadura (EXLV-LS, Levapan®, Colombia) y licor de maíz (SustProt; Ingredion™, Colombia) que contienen un 12% y 6,88% de nitrógeno respectivamente; la relación área superficial de transferencia de nutrientes/volumen del medio (cm⁻¹) según la unidad experimental de matraces Erlenmeyer de 250 mL y 500 mL; y dos fermentaciones denominadas limitación de fuente de carbono y fuente de nitrógeno (Tabla 1 y 2), las cuales fueron comparadas con la fermentación de referencia. Las variables de respuesta fueron los rendimientos de extractos orgánicos crudos obtenidos y la concentración media inhibitoria (IC₅₀; mg/mL) para cada una de las bacterias patógenas de referencia.

La fermentación de referencia basada en Harms *et al.* (12) contuvo 28 g de arroz, 0.085 g de extracto de levadura o 0.15 g de licor de maíz y 85 mL de base líquida. En el tratamiento de limitación de fuente de carbono se agregó 13.3 g de arroz, 6.3 g de extracto de levadura o 11 g de licor de maíz y 40 mL de base líquida; y para la limitación de nitrógeno 16 g de arroz, 5.3 g de extracto de levadura o 9.2 g licor de maíz y 50 mL de base líquida (Tabla 1). En estos no se tuvo en cuenta el porcentaje de nitrógeno contenido en el sustrato sólido. La base líquida se preparó con buffer fosfato a 0.2 M (pH 6.3), 0.5 g/L de tartrato de sodio y 0.5 g/L de KH₂PO₄, y fue agregada para ajustar la humedad inicial de los cultivos al 75%. Posterior a la esterilización a 121°C durante 15 min (ST-50G; Lab Companion) cada tratamiento se inoculó con la biomasa obtenida de cada unidad experimental del cultivo en sumergido. Por último, se incubó en oscuridad durante ocho días a 29°C.

Tabla 1. Tratamientos fermentación en estado sólido.

Fermentación	Sustrato (Arroz, g)	Fuente de nitrógeno	Cantidad fuente de nitrógeno (g)
Referencia	28	Licor de maíz	0.15 ¹
Limitación de fuente de carbono	13.3	Extracto de levadura	6.3 ²
		Licor de maíz	11 ²
Limitación de fuente de nitrógeno	16	Extracto de levadura	5.3 ³
		Licor de maíz	9.2 ³

¹ En 85 mL, ² 40 mL y ³ 50 mL de base líquida.

Tabla 2. Área superficial de transferencia de nutrientes en fermentaciones en estado sólido.

Fermentación	Área superficial de transferencia (cm ²) / volumen (Erlenmeyer, mL)	Relación área / volumen de medio (cm ⁻¹)
Referencia	53.4 / 250	0.53 ¹
	78.5 / 500	0.78 ¹
Limitación de fuente de carbono	60.2 / 250	1.00 ²
	92.0 / 500	1.53 ²
Limitación de fuente de nitrógeno	60.2 / 250	1.00 ²
	92.0 / 500	1.53 ²

¹ 100 cm³ y ² 60 cm³ volumen del medio sólido.

2.5. Recuperación de extractos orgánicos crudos extracelulares

Para la obtención de los extractos orgánicos crudos se siguió y modificó la metodología propuesta por Charria-Girón *et al.* (8), Yu *et al.* (17) y Yang *et al.* (18). Se realizó una extracción sólido-líquido durante 24 h para obtener los metabolitos de la fermentación en estado sólido, añadiendo a cada unidad experimental 50 mL de acetato de etilo (EtOAc) (Honeywell®, Alemania) como solvente. Después, se separó el medio-arroz exhausto (fase sólida) y la solución de extractos orgánicos disueltos en EtOAc mediante una filtración al vacío con un filtro de porosidad 8 (Fisherbrand FilterPaper P8, ThermoFisher Scientific™). La fase líquida se concentró hasta 5 mL en un rotaevaporador (Rotavapor R-100; Büchi, Suiza) a 45°C y 310 mBar, la solución concentrada se llevó a tubos Eppendorf de 2 mL previamente pesados, que posteriormente se secaron al vacío a 45°C en una centrífuga (Vacufuge plus; Eppendorf AG, Alemania) durante 24 h hasta obtener los extractos orgánicos crudos secos de color marrón.

2.6. Evaluación de actividad antibacteriana

Las evaluaciones de actividad antibacteriana de los extractos crudos obtenidos se realizaron empleando las cepas bacterianas de referencia Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 y Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC 25923. Estas se reactivaron en 50 mL de caldo Luria-Bertani (LB; peptona 10 g/L, cloruro de sodio 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L) a pH 7 tomando 100 μ L de un criovial, se incubaron a 37°C y 150 rpm durante 20 horas. Luego, se realizó una siembra por agotamiento en agar LB durante 20 horas a 37°C y se preparó una suspensión celular en solución salina estéril al 0.9% tomando cuatro colonias de *S. aureus* y *E. coli* con una absorbancia en el rango de 0.08 – 0.1 (OD_{620nm}) correspondiente a una concentración celular de 1×10^8 UFC/mL según la escala de McFarland. A partir de esta se tomó 10 μ L y se diluyó en 9990 μ L de caldo LB para obtener la solución madre bacteriana a una concentración celular de 1×10^5 UFC/mL.

Se diluyó 40 mg de cada extracto crudo en 2 mL de solvente (400 μ L de MeOH y 1600 μ L de DMSO al 1% (v/v)), para tener una concentración madre de 20 mg/mL. Las pruebas de actividad antibacteriana se realizaron en microplatos de 96 pozos (Brandtech®; Essex, Connecticut, Estados Unidos), mediante el método de micro diluciones en caldo para determinar las concentraciones medias inhibitorias (IC_{50}) en mg/mL. Las placas de ensayo se incubaron durante 20 horas a 37°C y 140 rpm antes de estimar la DO_{620nm} en el lector espectrofotométrico (ThermoFisher Scientific™ Varioskan™ LUX, Estados Unidos).

2.7. Análisis estadísticos

La determinación del IC_{50} se realizó en el software RStudio (20) utilizando los paquetes ggplot2 y drc (21,22) ajustado a cuatro parámetros; el análisis jerárquico de clúster el paquete gg dendro (23); y el análisis estadístico se realizó en el software Minitab (24).

3. Resultados

3.1 Caracterización de carbono y nitrógeno del sustrato sólido

El porcentaje de nitrógeno del arroz en términos de nitrógeno amoniacal fue de 12.3% ($g_{nitrógeno}/g_{arroz}$). La concentración de glucosa y fructosa determinados por HPLC fueron de 2.54 y 0.037 g/L respectivamente, obteniendo una concentración de carbohidratos de 2.58 g/L, lo que representa 74.7% ($g_{carbohidratos}/g_{arroz}$) de carbohidratos presentes en el arroz (Ecuación 1).

3.2. Desarrollo del inóculo, fermentación en estado sólido y extracción

La fermentación en sumergido en medio YMG de *Diaporthe sojae* como estrategia de desarrollo de inóculo tuvo un crecimiento rápido de biomasa, observándose pellets fúngicos de color blanco y algunos con coloraciones negras al cuarto día. Además, a partir de ese tiempo el medio exhibió una coloración naranja a rojo terracota en comparación al control del medio YMG.

Por otro lado, en los cultivos en estado sólido *D. sojae* al tercer día colonizó completamente la superficie de la matriz de arroz evidenciándose de color blanco. Al quinto día se observó algunas coloraciones café oscuro, siendo más visibles en las fermentaciones de limitación con extracto de levadura (Tabla 3). Además, en los cultivos con una relación área superficial de transferencia/volumen del medio (cm^{-1}) mayor se evidenció la colonización micelial hasta el fondo de la unidad experimental, en contraste con las de una relación menor que solo colonizó la superficie del sustrato sólido. Asimismo, en las fermentaciones bajo limitación de fuente de carbono y de nitrógeno se percibió una mayor densidad micelial en comparación con el cultivo de referencia, siendo superior cuando se empleó el licor de maíz como fuente de nitrógeno.

Tabla 3. Crecimiento micelial de *Diaporthe sojae* en fermentaciones en estado sólido con arroz como sustrato.

Fuente de nitrógeno	Fermentación		
	Referencia	Limitación de fuente de carbono	Limitación de fuente de nitrógeno
Extracto de levadura	 *		



* Fermentación de referencia basada en Harms *et. al* (12).

Los rendimientos de extractos orgánicos crudos extracelulares obtenidos (Figura 1) aumentaron 2.5 y 5 veces aproximadamente en las unidades experimentales con relación área superficial de transferencia/volumen del medio $> 1.0 \text{ cm}^{-1}$ para las limitadas por carbono y nitrógeno en comparación al cultivo de referencia, respectivamente, obteniéndose mayores rendimientos en los cultivos limitados por la fuente de carbono. No obstante, para las fuentes de nitrógeno suministradas, extracto de levadura y licor de maíz, no se determinó una diferencia significativa, dando como resultado que las fermentaciones limitadas por la fuente de carbono y su interacción con la relación área superficial de transferencia/volumen del medio de 1.53 cm^{-1} presentan mayores rendimientos de EOC obtenidos ($p < 0.05$).

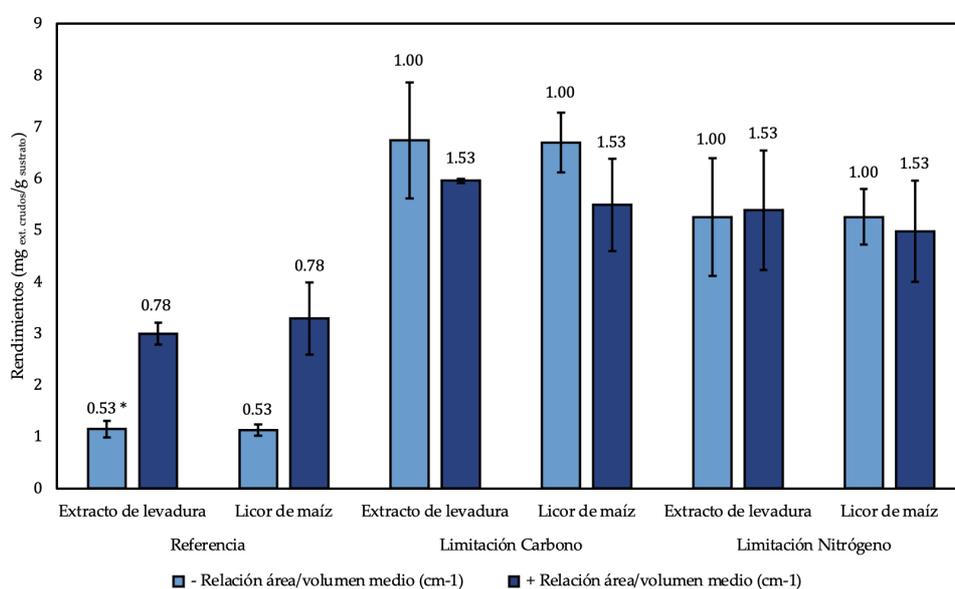


Figura 1. Rendimiento de extractos orgánicos crudos del cultivo en estado sólido de *Diaporthe sojae* respecto a la relación área/volumen medio (cm^{-1}). Cada valor representa la media de dos réplicas biológicas independientes ($n = 2$). *Fermentación de referencia basada en Harms *et. al* (12).

3.3. Evaluación de actividad antibacteriana

La fermentación de referencia presentó un IC_{50} de 3.42 mg/mL y 3.35 mg/mL para *S. aureus* y *E. coli*, respectivamente, siendo aproximadamente dos veces mayores respecto a los cultivos donde se empleó licor de maíz como fuente de nitrógeno y mayor relación/volumen. Además, en las fermentaciones limitadas por la fuente de carbono el IC_{50} fue menor en contraste con el cultivo de referencia presentando el mismo comportamiento, es decir, una menor concentración media inhibitoria debido a la fuente de nitrógeno y relación área/volumen (cm^{-1}); no obstante, el IC_{50} para la bacteria Gram-negativa conservó su valor de 1.39 mg/mL cuando se empleó el licor de maíz en ambas relaciones de área/volumen. Asimismo, para las fermentaciones limitadas por la fuente de nitrógeno se tuvo un valor de IC_{50} de 0.69 mg/mL. En la Tabla 5 se presentan las actividades antibacterianas de los extractos orgánicos crudos obtenidos en los cultivos en estado sólido de *D. sojae* evaluados frente a las bacterias patógenas de referencia *S. aureus* (ATCC 25922) y *E. coli* (ATCC 25923).

Tabla 4. IC_{50} (mg/mL) para extractos crudos obtenidos de los cultivos en estado sólido de *D. sojae*.

Fermentación	Relación área / volumen medio (cm^{-1})	Fuente de nitrógeno	IC_{50} (mg/mL)	
			<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Referencia	0.53	Extracto de levadura	3.42 *	3.35 *
		Licor de maíz	1.35	1.61

Limitación de fuente de carbono	0.78	Extracto de levadura	1.68	1.38
		Licor de maíz	0.53	1.45
	1.00	Extracto de levadura	2.82	2.49
		Licor de maíz	0.94	1.39
1.53	Extracto de levadura	0.66	0.94	
	Licor de maíz	0.72	1.39	
Limitación de fuente de nitrógeno	1.00	Extracto de levadura	1.23	1.77
		Licor de maíz	0.68	0.69
	1.53	Extracto de levadura	1.04	1.68
		Licor de maíz	0.59	0.69

* Fermentación de referencia basada en Harms et. al (12).

Ahora bien, los resultados de IC_{50} , en cuestión de magnitud y orden numérico, no presentaron diferencias significativas frente a las dos cepas evaluadas, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Sin embargo, los factores más significativos fueron el licor de maíz como fuente de nitrógeno y la mayor relación área superficial de transferencia/volumen del medio (cm^{-1}) ($p < 0.05$). Igualmente, el análisis jerárquico de clúster (Figura 2.A) evidencia que los extractos orgánicos crudos obtenidos en la fermentación bajo la limitación de fuente de nitrógeno con licor de maíz y relación de área/volumen de $1.53\ cm^{-1}$ tienen una actividad (LN-L(+)) antibacteriana de amplio espectro para bacterias Gram-positivas y negativas, seguida de la misma fermentación en una relación área/volumen de $1.0\ cm^{-1}$ (LN-L(-)), presentadas en la Figura 2.B de las curvas dosis de respuesta.

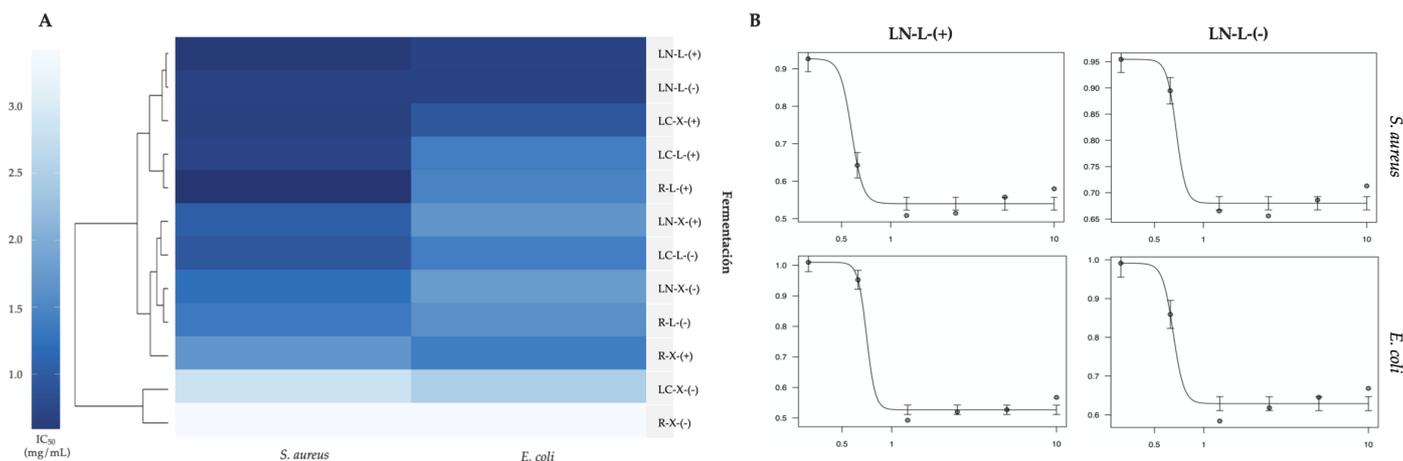


Figura 2. Actividad antibacteriana de los extractos crudos obtenidos de los cultivos en estado sólido de *D. sojae*. **(A)** Análisis jerárquico de clúster (HCA) de los valores de la concentración media inhibitoria (IC_{50}) de los extractos orgánicos crudos (EOC) obtenidos de las fermentaciones en estado sólido. **(B)** Curvas dosis-respuesta para los EOC de las fermentaciones bajo limitación de nitrógeno con licor de maíz en mayor y menor relación área superficial de transferencia/volumen del medio (cm^{-1}) contra ambos patógenos, donde el eje y representa la respuesta normalizada (0-1) y el eje x la concentración del extracto en mg/mL. *LN/LC/R: Limitación de fuente de nitrógeno, carbono y referencia; X/L: Extracto de levadura, licor de maíz; +/-: relación área superficial de transferencia / volumen del medio (cm^{-1}).

3.4. Diseño básico de bioproceso

En consecuencia, este estudio da como resultado un esquema de producción, evidenciado en la Figura 3, para la obtención de extractos orgánicos crudos con actividad antibacteriana de amplio espectro para bacterias Gram-positivas y negativas con valores de IC_{50} de 0.59 y 0.69 mg/mL respectivamente, provenientes del cultivo en estado sólido de la cepa fúngica endófito *Diaporthe sojae* ET-028. Este incluye las etapas de adecuación de materias primas, fermentación en estado sólido bajo condición de limitación de fuente de nitrógeno complementaria (licor de maíz) y una relación área superficial de transferencia de nutrientes/volumen del medio de $1.53\ cm^{-1}$, y la etapa de recuperación del extracto crudo.

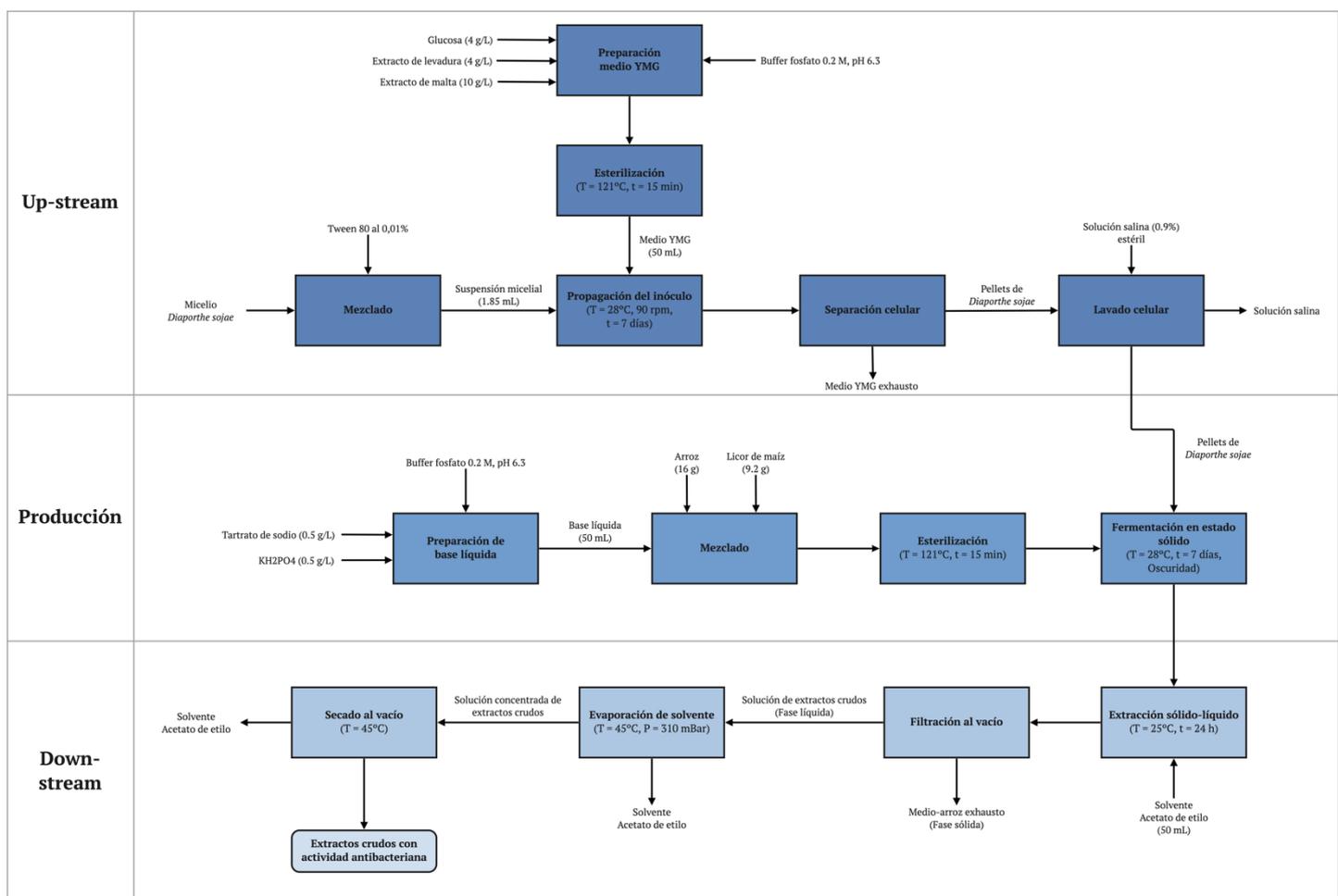


Figura 3. Diseño básico de bioproceso para la producción de extractos orgánicos crudos extracelulares con actividad antibacteriana proveniente del cultivo en estado sólido de *Diaporthe sojae*.

4. Discusión

La producción de metabolitos secundarios extracelulares con actividad antibacteriana por *Diaporthe sojae* se vio favorecida en fermentaciones en estado sólido, acorde a la concentración media inhibitoria (IC₅₀) de los extractos orgánicos crudos extracelulares reportados en este artículo (Tabla 4), en comparación a los reportados por Charria-Girón *et al.* (8) en una fermentación en sumergido que obtuvieron un IC₅₀ de 3.91 para *S. aureus* y 10.5 mg/mL frente a *E. coli*, mientras que los EOC intracelulares 3.42 mg/mL para *S. aureus*. Además, los EOC provenientes de la fermentación en sumergido en una configuración de biorreactor de columna de burbujeo reportados por Parra-Rosero *et al.* (25) evidenció valores de IC₅₀ frente a *S. aureus* de 16.49 y 0.54 mg/mL para los EOC extracelulares e intracelulares, respectivamente. Por lo que, en los EOC extracelulares provenientes de un cultivo en estado sólido presentan una actividad antibacteriana similar a los extractos intracelulares producidos en los cultivos en sumergido.

Por consiguiente, la fermentación en estado sólido promueve la síntesis de metabolitos secundarios extracelulares con actividad antibacteriana de *D. sojae* debido a que se asemejan al hábitat natural y se da un crecimiento micelial. El micelio está compuesto de estructuras llamadas hifas por donde se secretan enzimas y metabolitos fúngicos (26), por lo que extender su red micelial sobre el sustrato habrá una mayor cantidad de hifas, aumentando así la producción de metabolitos contenidos en extractos orgánicos crudos. Además, estas fermentaciones se realizan con sustratos complejos compuestos de macromoléculas como la celulosa, lignina y el almidón, siendo este último polisacárido el más predominante en el arroz empleado como sustrato sólido en esta investigación. Los hongos no pueden metabolizar directamente estas macromoléculas, por lo que promueve la formación y secreción de enzimas hidrolíticas y oxidativas para la conversión a azúcares simples del material complejo (27). Esta respuesta biológica activa diversas rutas metabólicas y cascadas de señalización que inducen a su vez la producción de metabolitos secundarios (10,28).

De esta manera, en las fermentaciones en estado sólido se prefiere una mayor relación área superficial/volumen para obtener mayores rendimientos de producto (28), puesto que el micelio se expande principalmente sobre la superficie del sustrato, involucrando directamente una mayor transferencia de nutrientes, tanto los contenidos en el sustrato sólido como el oxígeno. Esto se vio reflejado en la fermentación control donde los rendimientos de los EOC aumentaron casi el doble al incrementar el 150% de la relación área/volumen, de 0.53 a 0.78

cm⁻¹ (Figura 1). Sin embargo, los rendimientos entre las relaciones de área superficial/volumen en las fermentaciones bajo limitación tanto de la fuente de carbono como de nitrógeno no tuvo un acrecimiento significativo, pero la concentración media máxima inhibitoria (IC₅₀) disminuyó obteniendo mejores resultados.

En primer lugar, se reportó mayores rendimientos de extractos orgánicos crudos (mg_{EOC}/g_{arroz}) en los cultivos limitados por carbono, dado que estas condiciones inducen el metabolismo primario y secundario (28,29) de *D. sojae* para la formación de biomasa, activando el factor de transcripción CreA que controla la expresión de clúster de genes biosintéticos (CGB) en respuesta a la limitación de fuente de carbono (30), produciendo metabolitos primarios y secundarios, ya que están interconectados con el desarrollo fúngico. Cabe aclarar que, los extractos crudos obtenidos se perciben desde un enfoque de *caja negra* pues se desconocen las moléculas bioactivas sintetizadas por *D. sojae* que los componen. Sin embargo, a partir del IC₅₀ se puede deducir que los metabolitos antibacterianos en los EOC obtenidos aumentaron en proporción en la relación área/volumen de 1.53 cm⁻¹, puesto que el IC₅₀ disminuyó el doble para *S. aureus* y conservó su valor de 1.39 mg/mL para *E. coli* (Tabla 4). Por consiguiente, es posible afirmar que el incremento en proporción de dichas moléculas debido al aumento de la relación área/volumen tienen un mayor efecto antibacteriano para bacterias Gram-positivas.

Por otro lado, a pesar de haber obtenido mayores rendimientos en los cultivos limitados por la fuente de carbono, los resultados de IC₅₀ fueron menores en las fermentaciones bajo limitación de fuente de nitrógeno (Figura 2.A); lo cual se relaciona con la calidad y disponibilidad de la fuente de nitrógeno debido a que presenta un impacto tanto en el crecimiento como en la biosíntesis de metabolitos secundarios en hongos filamentosos como *D. sojae*. Es decir, la restricción de nitrógeno puede activar grupos de genes normalmente silenciosos que controlan el crecimiento y afectan la formación de metabolitos secundarios (13), ya que están regulados por nitrógeno. Entonces, la disponibilidad de este puede inducir la regulación del factor de transcripción AreA que controla la expresión de CGB en respuesta a la limitación de nitrógeno (30–32). En consecuencia, se estimula la biosíntesis de compuestos bioactivos antibacterianos eficientes contra las bacterias patógenas *S. aureus* y *E. coli*. Es importante resaltar, que bajo estas condiciones de limitación de nitrógeno se obtuvo una concentración media máxima inhibitoria (IC₅₀) igual cuando se empleó el licor de maíz y se incrementó de 1.0 a 1.53 cm⁻¹ la relación área/volumen con un valor de 0.69 mg/mL para *E. coli* (Tabla 4). No obstante, la diferencia del IC₅₀ para ambos patógenos puede ser despreciable, 0.59 mg/mL para *S. aureus*. Por consiguiente, se confirma que los extractos orgánicos crudos obtenidos en esta fermentación son efectivos contra las bacterias Gram-positivas y negativas.

Ahora bien, como se mencionó anteriormente la naturaleza química orgánica e inorgánica, de la fuente de nitrógeno influye en la formación de metabolitos secundarios en hongos filamentosos. Por ejemplo, El-Enshasy (9) reportó que en un estudio con el ascomiceto *Rhizopus chinensis* se obtuvo una mayor producción de antibiótico cuando se empleó licor de maíz como fuente de nitrógeno en comparación con sulfato de amonio. Por esto, las fuentes empleadas en este estudio, extracto de levadura y licor de maíz, fueron de origen orgánico diferenciadas por su presentación, es decir, el extracto de levadura es sólido, mientras que el licor de maíz es líquido, ambos son ricos en aminoácidos esenciales y vitaminas, que fueron altamente asimiladas por *Diaporthe sojae*. Sin embargo, a pesar de que ambas fuentes son orgánicas los resultados de IC₅₀ mostrados en la Tabla 4 y en el análisis de clúster jerárquico de la Figura 2.A, demuestran que los EOC con alta actividad antibacteriana son los provenientes del cultivo en estado sólido limitado con nitrógeno empleando licor de maíz; debido a que, por un lado, el licor de maíz al ser líquido se absorbe fácilmente en las porosidades del arroz, siendo más disponible para el consumo de *D. sojae*. Además, el licor de maíz es una fuente rica en aminoácidos esenciales como la lisina, metionina, cistina y triptófano (33) que juegan un papel fundamental en la síntesis de metabolitos secundarios (34); también, contiene vitaminas como la colina, niacina, ácido pantoténico, biotina, piridoxina, riboflavina y tiamina que son precursores de rutas metabólicas y cascadas de señalización para la expresión de genes y formación de compuestos bioactivos (35–38).

5. Conclusión

Este estudio da como resultado el primer diseño básico de bioproceso completo con etapas de up-stream, producción y down-stream para la obtención de extractos orgánicos crudos extracelulares con actividad antibacteriana de amplio espectro para bacterias patógenas Gram positivas y negativas, con concentraciones medias máximas inhibitorias (IC₅₀) de 0.59 y 0.69 mg/mL para *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922) y *Escherichia coli* (ATCC 25923), respectivamente como cepas de referencia, provenientes del cultivo en estado sólido de *Diaporthe sojae* bajo limitación de la fuente de nitrógeno empleando licor de maíz y una relación área superficial de transferencia de nutrientes/volumen de medio de 1.53 cm⁻¹, puesto que en este tipo de cultivo y condiciones se favorece la biosíntesis de metabolitos secundarios con actividad biológica antibacteriana de *D. sojae*.

En conclusión, estos hallazgos plantean nuevas perspectivas y abren puertas para seguir avanzando de la mano de la ingeniería de bioprocesos y tecnologías de fermentación para el diseño de bioprocesos para la obtención de extractos orgánicos crudos con actividad antibacteriana de alto espectro provenientes del cultivo en estado sólido de *Diaporthe sojae*, recomendando tener en cuenta la relación área superficial de transferencia de nutrientes/volumen

de medio (cm⁻¹) como parámetro principal en la geometría de futuros diseños de biorreactores para cultivos en estado sólido.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen el importante apoyo de las asistentes de investigación, la disposición de materiales, equipos y espacios de los laboratorios del Departamento de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Icesi Cali, Colombia.

7. Referencias

1. Mahoney AR, Safaee MM, Wuest WM, Furst AL. The silent pandemic: Emergent antibiotic resistances following the global response to SARS-CoV-2. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.isci>.
2. Mendelson M, Sharland M, Mpundu M. Antibiotic resistance: calling time on the 'silent pandemic.' JAC-Antimicrobial Resistance. 2022 Mar 18;4(2).
3. World Health Organization. New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis [Internet]. World Health Organization: WHO; 2019. Available from: <https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis#:~:text=Currently%2C%20at%20least%20700%2C000%20people,die%20from%20multidrug%2Dresistant%20tuberculosis>.
4. de Nies L, Busi SB, Tsenkova M, Halder R, Letellier E, Wilmes P. Evolution of the murine gut resistome following broad-spectrum antibiotic treatment. Nature Communications [Internet]. 2022 Dec 28;13(1):2296. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-29919-9>
5. Tanapichatsakul C, Monggoot S, Gentekaki E, Pripdeevech P. Antibacterial and Antioxidant Metabolites of *Diaporthe* spp. Isolated from Flowers of *Melodorum fruticosum*. Current Microbiology. 2018 Apr 1;75(4):476–83.
6. dos Reis CM, da Rosa BV, da Rosa GP, do Carmo G, Morandini LMB, Ugalde GA, et al. Antifungal and antibacterial activity of extracts produced from *Diaporthe schini*. Journal of Biotechnology. 2019 Mar 20;294:30–7.
7. Xu TC, Lu YH, Wang JF, Song ZQ, Hou YG, Liu SS, et al. Bioactive secondary metabolites of the genus *diaporthe* and anamorph phomopsis from terrestrial and marine habitats and endophytes: 2010–2019. Microorganisms. 2021;9(2):1–49.
8. Charria-Girón E, Espinosa MC, Zapata-Montoya A, Méndez MJ, Caicedo JP, Dávalos AF, et al. Evaluation of the Antibacterial Activity of Crude Extracts Obtained From Cultivation of Native Endophytic Fungi Belonging to a Tropical Montane Rainforest in Colombia. Frontiers in Microbiology. 2021 Sep 17;12.
9. El-Enshasy HA. Chapter 9 - Filamentous Fungal Cultures – Process Characteristics, Products, and Applications. In: Yang ST, editor. Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources [Internet]. Amsterdam: Elsevier; 2007. p. 225–61. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444521149500104>
10. Patil RH, Patil MP, Maheshwari VL. Bioactive Secondary Metabolites From Endophytic Fungi: A Review of Biotechnological Production and Their Potential Applications. In: Studies in Natural Products Chemistry. Elsevier B.V.; 2016. p. 189–205.
11. Srivastava N, Srivastava M, Ramteke PW, Mishra PK. Solid-state fermentation strategy for microbial metabolites production: An overview. In: New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Secondary Metabolites Biochemistry and Applications. Elsevier; 2019. p. 345–54.
12. Harms K, Milic A, Stchigel AM, Stadler M, Surup F, Marin-Felix Y. Three New Derivatives of Zopfinol from *Pseudorhizophila Mangenotii* gen. et comb. nov. Journal of Fungi [Internet]. 2021;7(3). Available from: <https://www.mdpi.com/2309-608X/7/3/181>
13. Tudzynski B. Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. Vol. 5, Frontiers in Microbiology. Frontiers Media S.A.; 2014.
14. Tanapichatsakul C, Monggoot S, Gentekaki E, Pripdeevech P. Antibacterial and Antioxidant Metabolites of *Diaporthe* spp. Isolated from Flowers of *Melodorum fruticosum*. Current Microbiology. 2018;75(4):476–83.
15. Santos PJC Dos, Savi DC, Gomes RR, Goulin EH, Da Costa Senkiv C, Tanaka FAO, et al. *Diaporthe* endophytica and *D. terebinthifolii* from medicinal plants for biological control of *Phyllosticta citricarpa*. Microbiological Research. 2016;186–187:153–60.
16. Caicedo NH, Heyduck-Söller B, Fischer U, Thöming J. Bioproduction of antimicrobial compounds by using marine filamentous cyanobacterium cultivation. Journal of Applied Phycology [Internet]. 2011;23(5):811–8. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9580-0>
17. Yu JJ, Yang HX, Zhang FL, He J, Li ZH, Liu JK, et al. Secondary metabolites from cultures of the kiwi-associated fungus *Diaporthe phragmitis* and their antibacterial activity assessment. Phytochemistry Letters. 2021 Dec 1;46:143–8.
18. Yang X, Wu P, Xue J, Li H, Wei X. Cytochalasans from endophytic fungus *Diaporthe* sp. SC-J0138. Fitoterapia. 2020 Sep 1;145.
19. Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP) (Revised July 2011) [Internet]. 2008. Available from: http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html
20. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2022 [cited 2022 Jun 4]. Available from: <https://www.R-project.org/>

21. Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis [Internet]. Springer-Verlag New York; 2016 [cited 2022 Jun 4]. Available from: <https://ggplot2.tidyverse.org>
22. Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D. Dose-Response Analysis Using R. PLOS ONE [Internet]. 2015 [cited 2022 Jun 4];10(12). Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0146021>
23. de Vries A, Ripley BD. ggdendro: Create Dendrograms and Tree Diagrams Using “ggplot2” [Internet]. 2022 [cited 2022 Jun 4]. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=ggdendro>
24. Minitab L. Minitab [Internet]. 2021 [cited 2022 Jun 4]. Available from: <https://www.minitab.com>
25. Parra-Rosero K, Zuñiga-Jaramillo LC, Caicedo NH. Aproximación de diseño de un bioproceso a escala de laboratorio para la obtención de extractos crudos con actividad antimicrobiana mediante cultivo del hongo endofítico *Diaporthe sojae*. [Cali]: Universidad ICESI; 2021.
26. Lübeck M, Lübeck PS. Fungal Cell Factories for Efficient and Sustainable Production of Proteins and Peptides. Microorganisms [Internet]. 2022;10(4). Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/4/753>
27. Letti L, Vítola F, Pereira G, Karp S, Medeiros A, da Costa E, et al. Solid-State Fermentation for the Production of Mushrooms. In: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. 2018. p. 285–318.
28. Mk G, Krishna C, Moo-Young M. Fungal solid state fermentation - An overview. Applied Mycology and Biotechnology. 2001 Jun;1:305–52.
29. Chen H, Wang L. Chapter 6 - Sugar Strategies for Biomass Biochemical Conversion. In: Chen H, Wang L, editors. Technologies for Biochemical Conversion of Biomass [Internet]. Oxford: Academic Press; 2017. p. 137–64. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128024171000065>
30. Lyu HN, Liu H, Keller N, Yin WB. Harnessing diverse transcriptional regulators for natural product discovery in fungi. Natural Product Reports. 2019 Jun;37.
31. Mosunova O, Navarro-Muñoz JC, Collemare J. The Biosynthesis of Fungal Secondary Metabolites: From Fundamentals to Biotechnological Applications. In: Zaragoza Ó, Casadevall A, editors. Encyclopedia of Mycology [Internet]. Oxford: Elsevier; 2021. p. 458–76. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128096338210728>
32. Netzker T, Fischer J, Weber J, Mattern DJ, König CC, Valiante V, et al. Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. Frontiers in Microbiology [Internet]. 2015;6. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00299>
33. Ingredion. Boletín Técnico SUST PROT. 2013.
34. Keller NP. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2019 Mar;17(3):167–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30531948>
35. Lonsdale D. A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives. Evid Based Complement Alternat Med [Internet]. 2006 Mar;3(1):49–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16550223>
36. Averianova LA, Balabanova LA, Son OM, Podvolotskaya AB, Tekutyeva LA. Production of Vitamin B2 (Riboflavin) by Microorganisms: An Overview. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology [Internet]. 2020;8. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2020.570828>
37. Wu PC, Chen CW, Choo CYL, Chen YK, Yago JI, Chung KR. Biotin biosynthesis affected by the NADPH oxidase and lipid metabolism is required for growth, sporulation and infectivity in the citrus fungal pathogen *Alternaria alternata*. Microbiological Research [Internet]. 2020;241:126566. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501320304341>
38. Markham P, Robson GD, Bainbridge BW, Trinci APJ. Choline: Its role in the growth of filamentous fungi and the regulation of mycelial morphology. FEMS Microbiology Letters [Internet]. 1993;104(3):287–300. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037810979390601W>