



**Producción de metabolitos bioactivos
con actividad antibacteriana y
antifúngica por *Micromonospora fluminis*
A38^T mediante fermentación en estado
sólido**

**Tesis presentada en opción al Título
Académico de Máster en Biotecnología**

Autor: Lic. Yaneisy Lescaylle Veranes

Tutores: Dr.C Miladis I. Camacho Pozo, PA
Dr.C Gabriel LLauradó Maury, PT

Santiago de Cuba

2022



Universidad de Oriente
Facultad de Ciencias Naturales y Exactas
Centro de Estudios de Biotecnología Industrial

Producción de metabolitos bioactivos con actividad antibacteriana y antifúngica por *Micromonospora fluminis* A38^T mediante fermentación en estado sólido

Tesis presentada en opción al Título Académico de Máster en Biotecnología
(Mención Biotecnología Industrial)

Autor: Lic. Yaneisy Lescaylle Veranes

Tutores: Dr. C Miladis I. Camacho Pozo
Dr. C Gabriel Llauradó Maury

Santiago de Cuba

2022

*Solo del trabajo pueden surgir los bienes materiales y espirituales capaces
de satisfacer las necesidades del hombre...*

Fidel Castro Ruz

A Dios, quien me ha servido de fortaleza y guía durante este tiempo.
A mi abuelita del alma por haberse sacrificado tanto por mí y por haberme
conducido por caminos rectos.

AGRADECIMIENTOS

Ha llegado el momento de escribir la última página de esta etapa de mi vida y por tanto de agradecer a las muchas personas que han colaborado directa e indirectamente en la realización de este trabajo.

Primeramente quiero agradecerle a Dios por poner en mi camino a personas que han marcado mi vida de forma positiva y por las bendiciones en el día a día.

A mi abuelita materna y a mi madre por haber luchado todas sus vidas por mí y aunque no estén carnalmente conmigo estarán en cada momento y dondequiera que vaya.

A Giorki mi compañero de vida, mi mejor amigo por confiar en mí y por estar ahí siempre que necesitaba de su ayuda.

A mi familia que me ayudaron y me brindaron su ayuda en todo momento y por ser un apoyo moral en mi vida.

A mis tutores y en especial a Miladis por su dedicación, apoyo, ayuda incondicional contribuyendo decisivamente en la realización de este trabajo, guiándome en todo este largo camino recorrido, aportándome tus conocimientos y tu valioso tiempo. Gracias por existir.

A mis amigos, los nuevos y los de antes, ellos que, aunque estando lejos, están ahí cuando hace falta, en especial Roxana, Enieyis, Lily, Mirtha Elena, Yalén, Andrea, Anabel, Marién, Jordi, Daniuska, Adlena.

A Roberto Machado por su ayuda incondicional cada vez que lo necesitaba.

A Isabela por prestarme su laptop para poder adelantar la escritura de la tesis.

A mis compañeros de la Maestría en especial Radamé, Dagmara, Daniel, José Alberto y su hermano, Henry, Didiet, Yanet, Aliesky, Yoandris. Gracias por compartir buenos momentos durante la colegiatura.

A mis compañeros de trabajo por brindarme su apoyo en todo momento en especial Leonor, Yaixa, Yamila, Juan Carlos, Janet, Kenia, Annia, Natacha, Roberto.

A todos los profesores de la Maestría por aportarme sus conocimientos y puntos de vista para este aprendizaje.

A usted lector porque sin su comprensión tanto trabajo no tendría sentido.

A mí.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
II.1 Metabolitos microbianos bioactivos.....	4
II.2 Actinomicetos.....	4
II.2.2 Importancia biotecnológica de los actinomicetos. Género <i>Micromonospora</i> ...	6
II.3 Fermentación.....	6
II.3.1 Fermentación en Estado Sólido (FES).....	8
II.3.2 Parámetros que influyen en la FES.....	8
II.3.3 Sustratos empleados para la FES.....	10
II.3.4 Aplicaciones de la FES.....	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS	16
III.1 Preparación del inóculo.....	16
III.2 Caracterización de los sustratos.....	16
III.2.1 Determinación de la humedad.....	16
III.2.2 Determinación de la solubilidad en agua.....	16
III.2.3 Determinación de carbohidratos.....	16
III.2.4 Determinación de proteínas.....	17
III.3 Fermentación.....	17
III.3.1 Preparación del inóculo.....	17
III.3.2 Fermentación en estado sumergido.....	17
III.3.3 Fermentación en estado sólido.....	17
III.4 Extracción de los metabolitos bioactivos.....	18
III.4.1 Determinación de sólidos totales en los extractos.....	18
III.5 Determinación de la actividad antibacteriana.....	18
III.6 Determinación de la actividad antifúngica.....	19
III.7 Determinación de la actividad enzimática.....	19
III.7.1 Producción de amilasas.....	19
III.7.2 Detección cualitativa de almidón (actividad enzimática indirecta).....	19
III.8 Análisis estadístico.....	20
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
IV.1 Crecimiento de <i>M. fluminis</i> A38 ^T mediante FS.....	21

IV.2 Crecimiento de <i>M. fluminis</i> A38 ^T en residuos agroindustriales mediante FES....	21
IV.3 <i>M. fluminis</i> A38 ^T y sustratos amiláceos.....	25
IV.3.1 Ensayos de solubilidad de los componentes de los sustratos amiláceos	25
IV.3.2 Caracterización química de los sustratos amiláceos.....	25
IV.3.3 Crecimiento de <i>M. fluminis</i> A38 ^T en sustratos amiláceos.....	26
IV.4 Actividad antimicrobiana y antifúngica de los metabolitos producidos por <i>M. fluminis</i> A38 ^T mediante FES.....	29
IV.4.1 Actividad antibacteriana	30
IV.4.2 Actividad antifúngica	30
V. CONCLUSIONES	32
VI. RECOMENDACIONES	33
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

No.	Tablas	Páginas
1	Diferencias entre la fermentación en estado sumergido (FS) y la fermentación en estado sólido.....	/ 7 y 8
2	Enzimas celulasas detectadas en el genoma (de <i>M. fluminis</i> A38 ^T , empleando la base de datos BV-BRC.....	/22 y 23
3	Valores de los parámetros calculados en los sustratos amiláceos ensayados para el crecimiento y la producción de metabolitos bioactivos por <i>M. fluminis</i> A38 ^T mediante FES.....	/24 y 25
3.1	Valores de la determinación de carbohidratos y proteínas con o sin la aplicación de calor (~70 °C) a las muestras.....	/24 y 25
4	Valores de los parámetros calculados en los sustratos amiláceos ensayados luego de la FES durante 21 días, empleando la cepa <i>M. fluminis</i> A38 ^T	/26 y 27
5	Resultados de la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos con solventes de diferentes polaridades de los metabolitos bioactivos producidos por <i>M. fluminis</i> A38 ^T en arroz y sorgo durante la FES.....	/29 y 30

No.	Figuras	Páginas
1	Micelio vegetativo e hifas de <i>Micromonospora fluminis</i> A38 ^T portando esporas únicas.....	/ 6 y 7
2	Representación de la composición de los sustratos lignocelulósicos.....	/11 y 12
3	Productos derivados de la degradación de la hemicelulosa.....	/23 y 24
4	Crecimiento de <i>Micromonospora fluminis</i> A38 ^T en los sustratos amiláceos arroz y sorgo.....	/25 y 26
5	Actividad enzimática cualitativa de las enzimas amilasas producidas por <i>Micromonospora fluminis</i> A38 ^T	/27 y 28
6	Detección de almidón, a través de la adición de lugol, en el arroz y sorgo después de la FES empleando la cepa <i>M. fluminis</i> A38 ^T ...	/27 y 28
7	Actividad antibacteriana del extracto metanólico de los metabolitos bioactivos producidos por <i>M. fluminis</i> A38 ^T durante la FES en el sorgo contra <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 (CCEBI 1032) y <i>B. cereus</i> ATCC 11778 (CCEBI 1033).....	/29 y 30
8	Actividad antifúngica del extracto de diclorometano de los metabolitos bioactivos producidos por <i>M. fluminis</i> A38 ^T durante la FES en el arroz contra <i>A. niger</i> ATCC 9642 (CCEBI 3004).....	/30 y 31
9	Actividad antifúngica de los extractos de metanol y benceno de los metabolitos bioactivos producidos por <i>M. fluminis</i> A38 ^T durante la FES en el sorgo contra <i>A. alternata</i> CECT 2662.....	/30 y 31
10	Efecto del extracto de diclorometano de los metabolitos producidos por <i>M. fluminis</i> A38 ^T en las hifas de <i>A. niger</i> ATCC 9642 (CCEBI 3004).....	/30 y 31
11	Efecto del extracto de benceno de los metabolitos producidos por <i>M. fluminis</i> A38 ^T en las hifas de <i>A. alternata</i> CECT 2662 (CCEBI 3037).....	/30 y 31

RESUMEN

Los microorganismos representan una fuente promisoría de potenciales compuestos bioactivos. Estos compuestos pueden producirse mediante fermentación en estado sólido (FES) en sustratos no convencionales con un alto valor agregado. En esta investigación, se evaluó el crecimiento *Micromonospora fluminis* A38^T y la producción de metabolitos bioactivos con actividad antibacteriana y antifúngica en los residuos lignocelulósicos aserrín y bagazo de caña, en la pulpa de café y en los sustratos amiláceos arroz y sorgo. Los resultados evidenciaron crecimiento de la cepa solo en los sustratos amiláceos, cualitativamente superior en el arroz. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la composición de azúcares totales y reductores, y proteínas de ambos sustratos. Sin embargo, mostró una diferencia significativa en los azúcares totales asimilados por la cepa A38^T para su crecimiento. Una actividad enzimática de $3,83 \pm 0,01 \text{ U mL}^{-1}$ evidenció una mayor producción de enzimas amilasas en el arroz. El extracto metanólico de los metabolitos producidos mediante FES en el sorgo tuvo una actividad antibacteriana ligeramente mayor en *Bacillus subtilis* ATCC 6633 de $10 \pm 0,1 \text{ mm}$. Los extractos mostraron, indistintamente, actividad antifúngica frente a *Aspergillus niger* ATCC 9642 y *Alternaria alternata* CECT 2662. El engrosamiento en la pared celular y abundante vacuolización fueron malformaciones de las hifas observadas debido a la actividad fungitóxica de los compuestos producidos por A38^T. Los sustratos amiláceos son excelentes fuentes para el crecimiento de la cepa A38^T y la producción de sus compuestos bioactivos mediante FES. *M. fluminis* A38^T constituye una promisoría cepa para el desarrollo de antimicrobianos para la industria médico-farmacéutica y la agricultura.

Palabras claves: *Micromonospora fluminis* A38^T; fermentación en estado sólido (FES); metabolitos bioactivos; antibacteriana; antifúngica.

ABSTRACT

Microorganisms represent a promissory source of potential bioactive metabolites. These compounds can be produced through Solid State Fermentation (SSF) on not conventional substrates with a high value added. In this research, the growth and the production of the bioactive metabolites by *Micromonospora fluminis* A38^T with antibacterial and antifungal activity were evaluated on the lignocellulosic residues sugarcane bagasse and wood sawdust, coffee pulp, and starch substrates rice and sorghum. The results evidenced growth of the strain on the amylaceous substrates only, qualitatively higher on rice. Statistically significant differences in the total and reducing sugars composition and, proteins were not observed on both substrates. However, it showed a significant difference in the total sugars assimilated by the strain A38^T for its growth. An enzymatic activity of $3,83 \pm 0,01 \text{ U mL}^{-1}$ evidenced a superior production of amylases enzymes on rice. The methanolic extract of metabolites produced in the sorghum through SSF had an antibacterial activity slightly higher in *Bacillus subtilis* ATCC 6633 of $10 \pm 0,1 \text{ mm}$. The extracts indistinctly showed antifungal activity against *Aspergillus niger* ATCC 9642 and *Alternaria alternata* CECT 2662. Cell wall thickening and abundant vacuolization were hyphal malformations observed due to the fungitoxic activity of compounds produced by A38^T. Starch substrates are excellent sources for the growth of the A38^T strain and the production of its bioactive compounds by FES. *M. fluminis* A38^T is a promising bacterium for the development of antimicrobials for the medical-pharmaceutical industry and agriculture.

Key words: *Micromonospora fluminis* A38^T; Solid State Fermentation (SSF); bioactive metabolites; antibacterial; antifungal.

I. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos representan una fuente promisoría de potenciales compuestos bioactivos. Los antibióticos son productos naturales del metabolismo secundario de los microbios con una potente actividad antimicrobiana (antibacteriana, antifúngica y antiprotozoaria), antiviral y antitumoral. Dentro de la clase Actinobacteria, los actinomicetos han producido el 45 % de todos los bioactivos microbianos conocidos (**Bérdy, 2005**). Dentro de este grupo, las bacterias pertenecientes al género *Streptomyces* han producido el 34 % de los compuestos con importancia para la industria médico-farmacéutica. Sin embargo, una menor cantidad compuestos (11 %) con una compleja diversidad estructural y funcional y baja toxicidad han sido producidos por actinobacterias menos comunes llamadas “actinomicetos raros” (**Bérdy, 2005**). A partir del género *Micromonospora*, uno de los actinomicetos menos comunes, se han sintetizado más de 500 moléculas bioactivas con diferentes propiedades, por lo que se considera el segundo mejor productor de compuestos bioactivos con uso farmacológico (**Genilloud, 2017**).

Tradicionalmente, la mayor parte de los antibióticos provenientes de actinomicetos han sido obtenidos mediante fermentación sumergida (**Singh y col., 2014; Vastrad y Neelagund, 2014; Bundale y col., 2018; Palla y col., 2018; Sapkota y col., 2020**). Sin embargo, una de las desventajas de este proceso es el efecto diluyente del agua, por lo que las cantidades de compuestos obtenidos es muy poca, además de ser más complejo, requiere de una mayor inversión y un riguroso control sobre el proceso (**Vastrad y Neelagund, 2014**).

La fermentación en estado sólido (FES) es llevada a cabo por microorganismos en ausencia total o casi total de agua (**Manan y Webb, 2017**). Desde mediados de los años 1970 ha surgido un gran interés en emplear la tecnología de la FES para producir productos microbianos más que tradicionales alimentos fermentados. Estos productos incluyen enzimas, pigmentos, compuestos aromáticos y saborizantes, lípidos, biosurfactantes, biocombustibles (biobutanol bioetanol, biodiesel y biohidrógeno), ácidos orgánicos y antibióticos (**Lizardi-Jiménez y Hernández-Martínez, 2017**). El éxito de esta tecnología está influenciado por la naturaleza del microorganismo y el sustrato empleado.

Actualmente, la gran diversidad de fuentes naturales provenientes del sector agrícola ha permitido la búsqueda de alternativas para un mejor aprovechamiento de los recursos obtenidos, ya sea de manera directa con la materia prima o residuos provenientes de la misma (**Garro y col., 2021**). En este sentido, los residuos agroindustriales representan un gran potencial para ser empleados en procesos de base biotecnológica, debido a su bajo costo, fácil adquisición y composición nutricional

al ser considerados como una fuente importante de carbono, nitrógeno y minerales, supliendo las necesidades nutricionales del microorganismo.

Se ha demostrado que diversos microorganismos como los hongos filamentosos y actinomicetos son capaces de producir compuestos antagonistas a partir de diversos residuos agroindustriales, lo que representa una alternativa en la FES, teniendo en cuenta las capacidades degradadoras de los microorganismos empleados (**Vastrad y Neelagund, 2014**). Por lo tanto, dichos residuos pueden ser utilizados como sustrato para el crecimiento de microorganismos y la producción de compuestos derivados de su metabolismo de alto valor agregado, reduciendo así su efecto contaminante al medio ambiente (**Barragán y col., 2008; Aceves y Castañeda, 2012; Saval, 2012; Abu y col., 2017**).

Por otra parte, una de las estrategias a seguir ante la emergencia y re-emergencia de patógenos multirresistentes a los antibióticos actuales ha sido la búsqueda de novedosas cepas microbianas productoras de compuestos con actividad inhibitoria del crecimiento de estos patógenos. En este sentido, *Micromonospora fluminis* A38^T, recientemente aislada a partir de estudios de bioprospección en ambientes acuáticos de Santiago de Cuba, fue caracterizada a través de una taxonomía polifásica como una novedosa actinobacteria filamentosa con potencialidades para la producción de enzimas extracelulares con diversas funciones y metabolitos con actividad antibacteriana (**Hernández, 2017; Camacho y col., 2020**). En previos estudios, la cepa A38^T fue cultivada mediante fermentación sumergida (FS) en el medio de cultivo ISP2 (**Shirling y Gottlieb, 1966**) para la producción de metabolitos bioactivos. Sin embargo, no fue posible realizar la extracción de los mismos debido a la excesiva esporulación y al efecto diluyente del agua. Es posible que a partir de un estudio que incluya la FES se puedan recuperar estos metabolitos, lo que hará que la cepa sea más atractiva para la industria biotecnológica y médico-farmacéutica.

A partir de lo anteriormente expuesto nos planteamos el siguiente **Problema científico**:

- No se tienen evidencias científicas sobre el crecimiento y el potencial de *Micromonospora fluminis* A38^T para producir compuestos con actividad antibacteriana y antifúngica mediante FES en sustratos no convencionales.

Para la solución de dicho problema nos planteamos la siguiente **Hipótesis**:

- *Micromonospora fluminis* A38^T es capaz de crecer y degradar sustratos no convencionales mediante FES para la producción de compuestos bioactivos con actividad antibacteriana y antifúngica.

OBJETIVO GENERAL:

- Evaluar el crecimiento y la capacidad de producción de compuestos antibacterianos y antifúngicos de *Micromonospora fluminis* A38^T mediante FES, empleando sustratos no convencionales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Evaluar el crecimiento de *M. fluminis* A38^T en residuos agroindustriales y sustratos amiláceos.
2. Determinar la actividad enzimática de las enzimas producidas por *M. fluminis* A38^T en la degradación de los sustratos amiláceos ensayados.
3. Evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica de los metabolitos bioactivos producidos por la cepa A38^T mediante FES.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 Metabolitos microbianos bioactivos

Los metabolitos secundarios producidos por bacterias son moléculas relativamente pequeñas producidas por un número limitado de cepas, que al parecer no tienen una función determinada en el crecimiento celular (**Martínez y Moreno, 2007**). Estos metabolitos incluyen diferentes tipos de compuestos de importancia económica, dentro de los cuales se encuentran los antibióticos, pigmentos, toxinas, feromonas, inhibidores enzimáticos, agentes inmunomoduladores, antagonistas y agonistas de receptores, pesticidas, agentes antitumorales y promotores del crecimiento en animales y plantas (**Demain, 2014**). Esta gran variedad de compuestos producidos en la naturaleza se ve reflejada en cerca de los más de 23 000 metabolitos microbianos conocidos, de los cuales más de 10 000 de estos compuestos son producidos por actinomicetos. Por lo tanto, la gran capacidad de estas bacterias para producir compuestos bioactivos con diversas estructuras y funciones hace de ellas un grupo promisorio de gran importancia, haciéndose necesario la realización de investigaciones que permitan profundizar en los conocimientos existentes (**Bérdy, 2005; Procópio y col., 2012**).

II.2 Actinomicetos

La palabra actinomiceto etimológicamente significa hongo en forma de rayo de Sol: rayo (*aktis* o *aktin*) y hongos (*mykes*) (**Ørskov, 1923; Soler, 2012**). Los actinomicetos son bacterias filamentosas pertenecientes a la clase Actinobacteria; por lo que, en ocasiones, son llamadas Actinobacterias. Son aerobias en su mayoría, Gram positivas y con un alto contenido en Guanina y Citosina (70 – 80 %) en su ADN (**Kim, 2013**). A pesar de que por su estructura muchos autores los han incluido dentro de los hongos filamentosos, pertenecen al dominio bacteria debido a que la pared celular está compuesta por peptidoglicano, el diámetro de sus hifas es inferior al de los hongos (0,5 a 2,0 μm), son sensibles a los antimicrobianos pero presentan resistencia a los antifúngicos y la disposición de su material genético es típicamente procariótico (**Sylvia, 2005; Trujillo, 2008; Procópio y col., 2012**).

Es un grupo muy diverso pero posee muchas propiedades comunes. Son microorganismos saprófitos, la gran mayoría son no móviles y pueden encontrarse en una amplia variedad de entornos, tanto naturales como modificados por el hombre. Pueden desarrollarse sobre un amplio rango de sustratos como tierra, material vegetal vivo o en descomposición, agua salada, agua dulce, estiércol o compost (**Augustine y col., 2013**). Presentan gran diversidad metabólica. Algunas especies son capaces de descomponer la lignocelulosa de los residuos de plantas y muchas de ellas se han descrito por producir celulasas, xilanasas, amilasas, proteasas y ligninasas (**Trujillo, 2008**). Algunas especies son las responsables del olor típico a suelo húmedo debido a

su actividad metabólica y a la producción de un compuesto terpenoide volátiles llamado geosmina (1,10-dimetil-9-decalol) (Prada, 2013).

Los actinomicetos se reconocen por la amplia capacidad que tienen de producir una gama muy variada de metabolitos secundarios. Son responsables de la producción del 45 % de estos metabolitos, aproximadamente, representando un 60 % de los antibióticos comerciales que se conocen actualmente (Bérdy, 2005). En la naturaleza, el género *Streptomyces* es el principal componente de la población total de actinomicetos y ha sido el género más estudiado dentro de las bacterias filamentosas por su capacidad para producir sustancias biológicamente activas (34 %) (Bérdy, 2005). Sin embargo, los llamados “actinomicetos raros revisten una gran importancia en la producción de compuestos (11 %) con una amplia diversidad de estructura y funciones y baja toxicidad. Este grupo de actinos son menos abundantes en los ecosistemas naturales por su lento crecimiento y la incapacidad de crecer bajo las condiciones del laboratorio” (Hayakawa, 2008; Kanna y col., 2011; Yasmeen y col., 2016). Actualmente, este grupo está compuesto por más de 200 géneros, destacándose *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora* y *Rhodococcus* por la producción de bioactivos (León y col., 2011; Uzcátegui y col., 2013). El género *Micromonospora* es el segundo mejor productor de MBs, con un potencial biosintético comparable al género *Streptomyces* ((Hifnawy y col., 2020).

II.2.1 Género *Micromonospora*

Micromonospora (Mikros = pequeño, mono = una y spora = espora) es un género de bacterias descrito por Ørkov, (1923), pertenece al orden Micromonosporales y a la familia *Micromonosporaceae* de la clase Actinobacteria. La especie tipo del género es *Micromonospora chalcea* (Goodfellow y col., 2012). Actualmente existen 116 especies y 7 subespecies del género descritas en la Lista de nombres procariotas reconocidos en la nomenclatura (LPSN; del inglés List of Procaryotic with Standing in the Nomenclature; <https://lpsn.dsmz.de/genus/micromonospora>). Se caracteriza por poseer esporas únicas y carecer de micelio aéreo.

La mayor parte de las colonias de *Micromonospora* spp. crecen en medios sólidos, poseen pigmentos carotenoides que muestran colonias de color amarillo o naranja claro, que va cambiando a naranja, rojo, marrón, azul-verdoso o morado. Al madurar las colonias adquieren un color progresivamente más oscuro con la producción de esporas marrón-negras, verde-negras, o negras y se vuelven mucosas (Carro, 2009; Hifnawy y col., 2020). Dichas especies exhiben un complejo ciclo de vida, diferenciándose entre micelio vegetativo y esporas. No presentan micelio aéreo (Hirsh y Valdés, 2009).

II.2.1.1 *Micromonospora fluminis* A38^T

Micromonospora fluminis A38^T es una bacteria filamentososa perteneciente al grupo de los Actinomicetos (Filo: Actinobacteria; Clase: Actinobacteria; Familia; *Micromonosporaceae*; Género: *Micromonospora*), aislada recientemente del sedimento del río San Pablo de Santiago de Cuba durante un estudio de bioprospección de bacterias con actividad antimicrobiana (**Camacho y col., 2020**). Es aerobia, Gram positiva, que forma un extensivo y bien desarrollado micelio vegetativo de color anaranjado-rojizo que se torna anaranjado fuerte-marrón después de la esporulación (Figura 1). Crece a una temperatura de 20 – 45 °C y a un pH de 7 – 8.

Previos estudios y la exploración del genoma de esta bacteria han evidenciado la presencia de grupos de genes para la producción de metabolitos secundarios bioactivos y la producción de enzimas extracelulares con importancia biotecnológica. Por ser una especie recientemente identificada, no existen estudios que refieran los sustratos empleados y las condiciones óptimas para la producción de estos compuestos. Por lo tanto, nuevos ensayos son necesarios para conocer el potencial de la misma para la producción de compuestos bioactivos a gran escala.

II.2.2 Importancia biotecnológica de los actinomicetos. Género *Micromonospora*

Desde el punto de vista biotecnológico, la importancia de este grupo de bacterias radica en su capacidad para producir biomoléculas con aplicaciones en medicina, agricultura y veterinaria (**Bérdy, 2005**). El género *Micromonospora* se considera el segundo mejor productor de compuestos bioactivos con uso farmacológico, sintetizando más de 500 moléculas diferentes con varias propiedades (**Antal y col., 2005; Fiedler y col., 2005; Hong y col., 2009; Genilloud, 2012; Barka y col., 2015**).

A partir de este género se han obtenido importantes antibióticos tales como: aminoglucósidos (gentamicinas y sisomicinas), macrólidos (mycinamicina y rosamicina) y antibióticos polisacáridos (everninomicina) (**Lazzarini y col., 2000**). Compuestos antitumorales tales como calicheamicina, la dinemicina A, retimicina, galtamicina, saquayamicina y lupinamicina han sido obtenidos de diversas especies de *Micromonospora* aisladas de diferentes ambientes (**Lee y col., 1987; Miyoshi-Saitoh y col., 1991; Antal y col., 2005; Igarashi y col., 2007; Hifnawy y col., 2020**). También se les reconoce por producir diversas enzimas extracelulares como: las lipasas, fosfolipasas, proteasas, peptinasas, amilasas, quitinasas, celulasas, ligninasas, entre otras (**Hirsh y Valdés, 2007; Chaudhary y col., 2013; Barka y col., 2015**).

II.3 Fermentación

La fermentación es un proceso metabólico de oxidación. Puede ser aeróbico cuando tiene lugar en presencia de oxígeno y anaeróbico si se producen fuera del contacto con el oxígeno (**Ramírez, 2003; Nout, 2014**). Se produce cuando los microorganismos

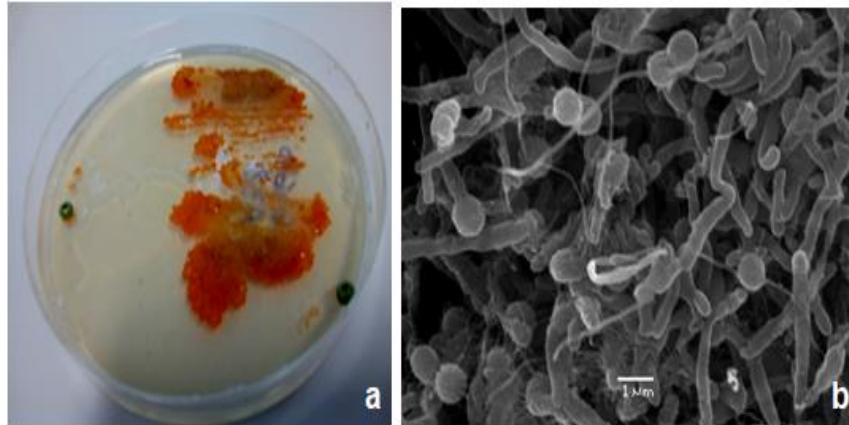


Figura 1. Micelio vegetativo (a) e hifas (1 μm) observadas bajo el microscopio electr3nico (JSM-5600, JEOL; Alemania) (b) de *Micromonospora fluminis* A38^T portando esporas 3nicas.

oxidan los hidratos de carbono de la materia orgánica, proporcionando esqueletos carbonados y energía en forma de ATP para el crecimiento de los mismos y liberando, principalmente, dióxido de carbono, amonio, nitrógeno y agua cuando es aeróbico y, metano, bióxido de carbono, amoníaco, ácido sulfhídrico y nitrógeno e hidrógeno cuando es anaeróbico (**Ramírez, 2003**). Una definición general, más amplia, de fermentación incluye: "un proceso productivo que supone la utilización de células microbianas. Se puede dividir en fermentación en estado sumergido (FS) y fermentación en estado sólido (FES) (**Mitchell y col., 2002; Subramaniyam y Vimala, 2012**).

En las FS existe agua libre en el sistema para el crecimiento de microorganismos. Sin embargo, en la FES los microorganismos se desarrollan en sustratos sólidos húmedos donde no existe agua libre en el sistema. La excreción de los compuestos extracelulares al medio líquido o artificial es una de las principales ventajas de la FS. Además, los sustratos y el oxígeno son utilizados con rapidez y no suelen observarse gradientes de concentración o temperatura, lo que posibilita una correcta homogenización (**Singhania y col., 2010; Subramaniyam y Vimala, 2012; Jaronski y Mascarin, 2017**). Pero, este tipo de fermentación presenta altos costos debido al tamaño y la (**Singhania y col., 2010; Manan y Webb, 2017**).

En la FES, los microorganismos están expuestos a una fase gaseosa que puede desecarlos y las temperaturas pueden elevarse a valores por encima del óptimo de crecimiento debido a una eliminación deficiente del calor metabólico producido (**Ashley y col., 1999**). Dentro del reactor pueden aparecer gradientes, por lo que las condiciones no son homogéneas y, no es posible controlar el crecimiento microbiano. Además, los microorganismos crecen lentamente y, consecuentemente, existe una limitación en la formación del producto. No obstante, el uso de la FES presenta ventajas que garantizan su utilización: produce una mínima cantidad de residuos y efluentes líquidos, mayor rendimiento y productividad, proceso más robusto y resistente a los contaminantes, menor requerimiento de energía, menor (o ausencia) de represión por catabolitos, mayor facilidad para recobrar el producto final, emplea equipos más económicos que los utilizados en la FS por su menor tamaño y simpleza de manejo, y sobre todo, es posible emplear sustratos naturales simples y residuos agroindustriales como una alternativa y un valor añadido a esos residuos poco o no utilizados, lo cual ayuda a reducir el impacto ambiental de los mismos y los costos del proceso (**(Mitchell y col., 2006; Manan y Webb, 2017; Machado de Castro y col., 2018; Torres y col., 2019)**). Otras diferencias entre la FS y la FES las hacen elegibles para un determinado proceso (Tabla 1).

Tabla 1. Diferencias entre la fermentación en estado sumergido (FS) y la fermentación en estado sólido (FES) (Tomado de **Raimbault, 1998**).

Factor	FS	FES
Sustratos	Sustratos solubles (azúcares)	Sustratos poliméricos insolubles
Condiciones asépticas	Esterilización por calor y control aséptico	Tratamiento con vapor; condiciones no estériles
Agua	Alto volumen de agua consumida; efluentes desechados	Consumo limitado de agua; baja actividad de agua; no efluentes
Calentamiento metabólico	Fácil control de la temperatura	Baja capacidad de transferencia de calor; fácil aireación y alta superficie de intercambio aire/sustrato
Control pH	Fácil control del pH	Sustratos sólidos amortiguados
Agitación mecánica	Buena homogenización	Se prefieren condiciones estáticas
Escalado	Equipos industriales disponibles	Necesidad de ingeniería y de nuevos diseños de equipos
Inoculación	Fácil inoculación; proceso continuo	Inoculación de esporas; discontinuo
Contaminación	Riesgo de contaminación por una cepa bacteriana	Riesgo de contaminación por bajo crecimiento fúngico
Consideraciones energéticas	Alto consumo de energía	Bajo consumo de energía
Volumen del equipo	Altos volúmenes y altos costos de la tecnología	Bajos volúmenes y bajo costo de los equipos
Efluentes y contaminación	Altos volúmenes de efluentes contaminantes	No efluentes; menor contaminación
Concentración sustrato/producto	30-80 gL ⁻¹	100-300 gL ⁻¹

II.3.1 Fermentación en Estado Sólido (FES)

La FES es un proceso biológico en el cual cierto microorganismo o consorcio de microorganismos, como bacterias u hongos, crecen en un soporte sólido que contiene los nutrientes y humedad necesaria, y en condiciones aerobias (**Abraham, 2014**). Generalmente, el contenido del agua varía entre un 30 y 85 % y funciona como un solvente para proveer nutrientes y para mantener las estructuras biológicas organizadas a nivel celular y molecular (**Machado de Castro y col., 2018**).

Raimbault, (1998) plantea un concepto más amplio de la FES en función de la matriz debe de absorber agua una o varias veces su peso seco, con una actividad de agua relativamente alta en la interface sólido/gas que permita diversos procesos bioquímicos; la mezcla de aire de oxígeno con otros gases y aerosoles debe fluir bajo una presión relativamente baja; la interface sólido/gas debe de ser un excelente hábitat para el rápido desarrollo de cultivos específicos de mohos, levaduras y bacterias, en cultivos puros o mezclados; las propiedades mecánicas de la matriz sólida debe soportar compresión o agitación suave, según sea necesario en un proceso de fermentación dado. Esto requiere partículas pequeñas granuladas o fibrosas que no se rompan o se peguen unas a las otras; la matriz sólida no debe ser contaminada con inhibidores de actividades microbianas y debe de ser capaz de absorber o contener nutrientes, tales como carbohidratos (celulosa, almidón, azúcares), fuentes de nitrógeno (amonio, urea, péptidos) y sales minerales.

De acuerdo a lo planteado anteriormente, los principales componentes de la FES son el microorganismo y el sustrato sobre el cual se va a desarrollar el proceso fermentativo, factores que garantizan el éxito del proceso (**Mussatto y col., 2012**). Normalmente, la FES es un proceso de múltiples pasos que incluye el pre-tratamiento de los sustratos, a través de procesos mecánicos, químicos y bioquímicos, los cuales garantizan la reducción del tamaño de los componentes, la hidrolización de los sustratos poliméricos primarios (Ej. polisacáridos y proteínas) y el incremento de la disponibilidad de los nutrientes. Sin embargo, los costos de estos pre-tratamientos deben de ser balanceados con el eventual valor de los productos. Otros pasos están relacionados con la utilización (fermentación) de los productos de la hidrólisis y la separación y purificación de los productos finales (**Martínez y García, 2016**).

II.3.2 Parámetros que influyen en la FES

Son varios los factores que influyen en la evolución de la FES y en la obtención del producto final. Entre ellos, la selección de una cepa adecuada, el sustrato y su relación con los parámetros físicos, químicos y bioquímicos del proceso, tal y como se describe a continuación:

Humedad

El contenido de humedad es un parámetro crucial de la FES. Esta variable influye significativamente en el desarrollo microbiano. La actividad de agua tiene una influencia sobre el crecimiento y las actividades metabólicas de los microorganismos. El valor óptimo de contenido de humedad depende del microorganismo, el tipo de producto final y de la matriz sólida que se utiliza. Se han recomendado valores de humedad para una matriz orgánica a fermentar entre 40 – 60 % (**Haug, 1993; Reinoso, 2015**). Un bajo contenido de humedad conduce a una mala difusión de los nutrientes que obstaculizará el crecimiento microbiano (**Pandey y col., 2013**).

Temperatura

La temperatura influye en la velocidad de crecimiento de los microorganismos. Existe una temperatura o rango de temperaturas óptimas para el crecimiento del microorganismo, fuera de este rango el crecimiento se ralentiza o es inexistente. Por otra parte, el incremento térmico generado es proporcional a la actividad metabólica de los microorganismos, lo que puede afectar directamente al crecimiento microbiano, la producción de esporas y/o las propiedades del producto final (**Pandey y col., 2013**).

pH

Generalmente el pH se autorregula durante el proceso, pero es difícil supervisar y controlarlo en procesos de fermentación en estado sólido, debido a la naturaleza de los materiales fermentados, por ser sólidos en ausencia de agua libre. A pesar de estas dificultades, es importante conocer su valor por lo que se hace necesario tener la medida y control durante todo el proceso fermentativo, con el fin de prevenir la muerte de microorganismos por valores que éstos no toleran (**Raimbault, 1998**). Los valores óptimos de pH para que los microorganismos se desarrollen están entre 5 y 8 (**Haug, 1993**).

Tamaño de la partícula

El tamaño inicial de las partículas de la matriz sólida es otro factor importante para la optimización del proceso. A una mayor superficie para el crecimiento microbiano por unidad de masa, más rápida y completa será la reacción. El desmenuzamiento del material facilita la acción de los microorganismos y aumenta la velocidad del proceso. Aunque, un pequeño tamaño de partícula provoca una gran superficie de contacto para el crecimiento microbiano, reduce el espacio entre partículas y aumentan las fuerzas de fricción, lo que limita la difusión de oxígeno hacia el interior y de dióxido de carbono hacia el exterior. Este proceso restringe la proliferación microbiana y puede dar lugar a un colapso microbiano al ser imposible la aireación por convección natural (**Haug, 1993**). Por otra parte, un producto muy fino no es aconsejable por riesgos de compactación (**Rodríguez y col., 2008**).

Aireación

La aireación durante la FES es de gran importancia debido a que, por una parte, proporciona oxígeno para los microorganismos mientras elimina el dióxido de carbono y, por otro, elimina el calor del fermentador y distribuye el vapor de agua de los metabolitos gaseosos y volátiles producidos, evitando que la descomposición de la fase gaseosa afecte la biomasa y la producción enzimática (**Raimbault, 1998**). Una aireación insuficiente puede derivar en una sustitución de los microorganismos aerobios por anaerobios, con el consiguiente retardo en la descomposición, la aparición de sulfuro de hidrógeno y la producción de malos olores. Por otro lado, la excesiva ventilación podría provocar el enfriamiento de la masa y una alta desecación de ésta con la consiguiente reducción de la actividad metabólica de los microorganismos (**Ballardo-Matos, 2016**).

Microorganismos

Entre los microorganismos empleados en los procesos de FES se destacan los hongos filamentosos (50 %), levaduras (30 %), actinomicetos (15 %) y bacterias (5 %) (**Díaz, 2009**). Las bacterias, generalmente, han sido envueltas o empleadas en los procesos de compostaje, ensilaje y en algunos procesos alimenticios. Las levaduras pueden ser empleadas para la producción de etanol y alimentos. Los hongos filamentosos son los que mejor se adaptan en este proceso debido a sus propiedades fisiológicas, enzimáticas y bioquímicas, dominando, por lo tanto, las investigaciones sobre FES (**Raimbault, 1998**).

En la FES, la selección del microorganismo está determinada, principalmente, por la actividad de agua del medio y el producto a obtener (**Brandao, 2003**). Sin embargo, la composición del sustrato, su estructura, la temperatura, concentración de oxígeno, contenido de humedad y pH son importantes en el tipo de actividad de los microorganismos (**Ballardo-Matos, 2016**). No obstante, esta selección no es una tarea fácil, dependerá de la selección conjunta entre el microorganismo y las condiciones en la que se llevará a cabo el proceso de fermentación deseado.

II.3.3 Sustratos empleados para la FES

Dentro de los sustratos empleados para la FES se encuentran los residuos agroindustriales. Estos pueden ser de origen animal o vegetal, los cuales pueden dividirse a su vez en siete grupos: 1) cereales, 2) raíces y tubérculos, 3) plantas oleaginosas, 4) frutas, incluyendo la cáscara, y verduras, 5) productos cárnicos, 6) pescados y mariscos y 7) productos lácteos (**Pandey y col., 2003; Casas y col., 2014**). Muchos de estos sustratos tienen moléculas poliméricas, solubles o parcialmente solubles en agua, pero la mayoría son baratas y fáciles de obtener. En general, los sustratos deben tener un alto contenido de carbohidratos y ser ricos en vitaminas y

minerales, los cuales favorecen el crecimiento microbiano (**Costa y col., 2010; Moyano, 2014**).

Como se mencionó anteriormente, muchos de estos sustratos necesitan una preparación o pretratamientos previos como uno de los pasos claves en la FES, lo que permite realizar su conversión a formas más adecuadas para su asimilación por los microorganismos. Estos pretratamientos incluyen la reducción del tamaño del sustrato por molido, raspaje o troceado; hidrólisis física, química o enzimática de los polímeros para incrementar la disponibilidad del sustrato; suplementación con nutrientes (fósforo, nitrógeno, sales) y establecimiento de un pH y humedad a través de la solución mineral; cocinado o tratamiento con vapor para la pre-degradación de la estructura macromoleular y la eliminación de los principales contaminantes, etc. (**Raimbault, 1998**). Sin embargo, ninguno de estos tratamientos garantiza la degradación total de estos sustratos.

A partir de su contenido de agua los sustratos provenientes de los residuos agro-industriales se clasifican en residuos sólidos o secos y húmedos. Una clasificación determinante en el proceso de adecuación y pretratamiento (**Casas y col., 2014**).

II.3.3.1 Residuos sólidos o secos

Los residuos sólidos pueden ser secos o mezclados con pequeñas cantidades de agua provenientes de actividades de cosecha, como la paja o el rastrojo de la cebada, frijoles, avena, arroz y trigo, así como también el tallo y las hojas del maíz, el algodón, el sorgo, la alfalfa, la soya, entre otros (**Grande, 2016**). Estos residuos o sustratos pueden ser de soporte nutricional (cebada, maíz, arroz, trigo y soja) y de soporte inerte (fibras inertes, aserrín, paja y bagazo, especialmente, de caña), los cuales son susceptibles de aprovechamiento por su alto contenido de hemicelulosa, celulosa, pectina y otros polisacáridos, tal y como muestran algunos ejemplos a continuación:

II.3.3.1.1 Sustratos lignocelulósicos (Bagazo de caña, aserrín)

En los últimos años, los residuos lignocelulósicos han recibido gran atención para la producción y recobrado de muchos productos con alto valor añadido (**Pandey, 2000; Dong y col., 2011**). La lignocelulosa está compuesta, básicamente, de celulosa, hemicelulosa y lignina (Figura 2). La composición elemental en base seca de la biomasa corresponde, esencialmente, a un 30-40 % de oxígeno, 30- 60% de carbono, 5-6% de hidrógeno y un pequeño contenido de ceniza. Entre los elementos inorgánicos se incluyen nitrógeno, cloro, y azufre, que en conjunto conforman menos del 1 % de la biomasa (**Kumar y col., 2017**).

La celulosa es un polímero lineal de unidades repetidas de celobiosa (subunidades de D-glucosa unidas por enlaces β -1,4 glucosídicos) con un alto grado de polimerización (10-100 veces más que la hemicelulosa). Es una estructura altamente cristalina con

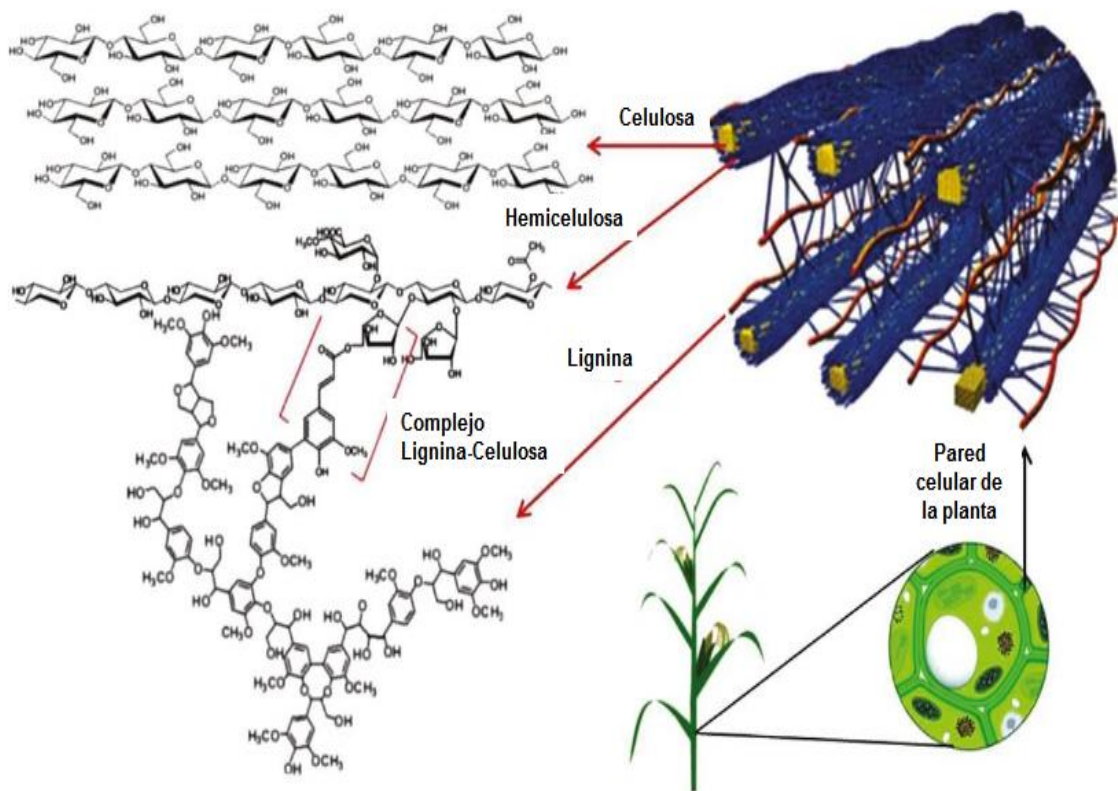


Figura 2. Representación de la composición de los sustratos lignocelulósicos (Tomado de **De la Piedra-Colinas, 2019**).

cadenas lineales rígidas. El grupo hidroxil unido a las cadenas provee una fuerte unión intermolecular. Estas estructuras forman enlaces agrupados los cuales se unen y forman las llamadas microfibrillas de celulosa unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals intermoleculares (**Jørgensen, 2003; Arias-Ortiz y Meneses Cruz, 2016**).

La hemicelulosa es un polímero amorfo compuesto de pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (galactosa, glucosa y manosa) y ácidos de azúcar (urónicos). La lignina es uno de los componentes que no puede ser separado en unidades fácilmente utilizables (degradables) debido a su naturaleza recalcitrante (no es soluble en agua y ópticamente inactivo). Es un complejo variable, hidrofóbico que posee un polímero aromático tridimensional de unidades de p-hidrofenilpropano conectados por enlaces C-C y C-O-C.

Bagazo de caña

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) contiene un 40-45 % de celulosa, 30-33 % de hemicelulosa, 13-18 % de lignina y otros componentes que incluyen carbohidratos solubles, minerales y proteínas (Figura 2; **Ribeiro y col., 2013; Monroy, 2016**). Además, contiene compuestos fenólicos, terpenoides y fitoesteroles (**Feng y col., 2014**).

El bagazo de caña es uno de los residuales de la industria cañera. A nivel mundial se producen más de 1 700 millones de toneladas de caña de azúcar. Por cada tonelada de caña se producen 264 kg de bagazo. La industria cañera ha sido el principal motor del desarrollo socio-económico de Cuba, generándose grandes volúmenes de este residual al año. Su uso, tradicionalmente, se aplica a la producción de pulpa para papel como materia prima y a la obtención de tableros de madera, ceras industriales, alcoholes, azúcares refinados y alimentos para el ganado (**Cordovés-Herrera y col., 2013**). Sin embargo, otros usos le han dado un valor añadido a este residual en nuestro país (**LLanes-Díaz y col., 2015; Cascaret y col., 2020**).

Tradicionalmente, el bagazo de caña es uno de los residuos que mayormente se emplea en la FES para la obtención de etanol. Pero, otros productos han sido obtenidos a partir de su fermentación. Por ejemplo, algunos autores refieren su empleo para la obtención de ácido cítrico (**Soccol y Vandenberghe, 2003; Tuquerres y col., 2020**) empleando *Aspergillus niger*. Por su parte, **Martínez y col., (2017)** lo emplean para la producción de ésteres, aldehídos y alcoholes con *Kluyveromyces marxianus*.

Aserrín

El procesamiento de la madera genera cantidades considerables de desechos en forma de aserrín y pequeños pedazos de madera que causan problemas ambientales por su quema o el vertido en ríos. En Cuba se generan grandes cantidades de aserrín de

diferentes maderas, por lo que se hace necesario su utilización para minimizar los efectos negativos sobre el medio ambiente (**Serret-Guasch y col., 2016**).

El aserrín es también un sustrato lignocelulósico compuesto de los heteropolisacáridos mencionados anteriormente. En nuestro país, su uso ha sido vinculado, principalmente, como recurso energético. Sin embargo, otras investigaciones reflejan su empleo como un residual de alto valor. **López y col., (2018)** utilizaron aserrín de pino utilizando *Trichoderma harzianum* para la producción de enzimas celulolíticas y para la producción de celulasas y xilanasas.

Pulpa de café seca

La pulpa de café es el principal desecho del beneficio húmedo del café y representa alrededor del 29 % del fruto del café. Está compuesta básicamente por fibras, grasas (2.0–7.0 %) y proteínas (7.5–15.0 %). Aunque, también presenta otros componentes como polisacáridos (21–32 %; celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina), cafeína, taninos y ácido clorogénico (**Braham y Bressani, 1978; Noriega-Salazar y col., 2009; Serrat-Díaz y col., 2018; Acevedo y col., 2021**).

En Cuba, la producción de café constituye un renglón fundamental en la agricultura de montaña, siendo las provincias de Santiago de Cuba, Guantánamo y Granma las principales productoras (**Serrat-Díaz y col., 2018**). Ha sido ampliamente utilizada en el cultivo de hongos y para la obtención de enzimas, hormonas, productos inmunocéuticos, abono orgánico, ensilaje destinado a la alimentación animal, etc. La mayor parte de las investigaciones con este sustrato ha implicado el uso de hongos filamentosos. En este sentido, es de destacar las diversas investigaciones realizadas en nuestro Centro de Estudios de Biotecnología Industrial empleando este sustrato y el hongo basidiomiceto *P. ostreatus* (**García, 2008; Rodríguez, 2008; Bermúdez y García, 2010; Morris y col., 2012; Bermúdez y col., 2014**). **Reyes y Franco, (2016)** emplea la pulpa y el hongo *Ceratocystis fimbriata* para la obtención de algunos compuestos aromáticos. No obstante, el empleo de bacterias en algunas investigaciones ha confirmado la utilización de este sustrato para la obtención mediante FES de otros compuestos de gran importancia (**Oktaviani y col., 2020**).

Arroz y sorgo

El arroz (*Oryza sativa*) y el sorgo (*Sorghum bicolor* L.) están compuestos mayormente por almidón (aproximadamente, 80 %). El almidón del sorgo consiste en amilopectina, un polímero de cadena ramificada de la glucosa, y de amilosa, un polímero de cadena lineal. Otros componentes de ambos granos incluyen proteínas, grasas, fibras, minerales (Ca, Fe, P, Mg, Na, K), vitaminas (B1, B2 y B3) y agua (**Domanski y col, 1997; Colina y Guerra, 2009; Herrero-Delicado, 2015; Nava-Berumen y col., 2017**).

El arroz y el sorgo son considerados como alimentos humanos; sin embargo, son sustratos amiláceos de gran utilidad para la obtención de compuestos para la industria, en la producción de almidón, dextrosa, miel de dextrosa, aceites comestibles, bebidas, materias colorantes, cosméticos, papel, productos farmacéuticos, cárnicos, entre otros (**Saucedo, 2008**). Por ejemplo, **Idris y col., (2017)** emplearon sorgo mediante fermentación para optimizar la producción de celulasas utilizando *Trichoderma reesei*, logrando la hidrólisis enzimática de sorgo y convirtiendo los azúcares en etanol con ayuda de *Saccharomyces cerevisiae*. Asimismo, **Adhyaru y col., (2016)** emplearon paja de sorgo para la producción de xilanasa a partir de *Aspergillus tubingensis* bajo FES.

De manera general, múltiples han sido los residuos agroindustriales empleados en la obtención de diversos productos biotecnológicos. Todos representan una fuente de nutrientes para los microorganismos que permiten ser utilizados en la FES. Las investigaciones realizadas por diversos autores le han dado un alto valor agregado a estos residuos como sustratos no convencionales para el crecimiento de microorganismos y la obtención de sus metabolitos bioactivos (**Cortez, 2007; Kassa y col., 2008; Bermúdez y col., 2010; Duhan y Gahlawat, 2014; Amaro y col., 2015; Ávalos y Geoconda, 2016; Mushimiyimana y Tallapragada, 2016; Reddy y col., 2016; Vinícius y col., 2018**).

II.3.3.2 Residuos húmedos

Aquellos residuos con alto contenido de agua son considerados húmedos. Entre ellos se encuentran el estiércol de animales, permeado de queso, desechos de té, piensos, pulpa de café, cítricos, remolacha, manzana y los ensilados de animales (**Grande, 2016; Pandey y col., 2017**). Múltiples han sido los usos de los residuos húmedos en la obtención de diversos productos. Por ejemplo, **Socol y Vandenberghe, (2003)** emplearon pulpa de manzana para la producción de ácido cítrico con *Aspergillus niger*. **Bena y col., (2015)** utilizaron permeado de queso al 20 % como un medio de cultivo alternativo para la producción de esporas de *Bauveria bassiana*. **Biz y col., (2016)** utilizaron la pulpa de cítricos para la obtención de pectinasas, empleando *Aspergillus oryzae*. Los desechos agroindustriales provenientes de aguas residuales de almidón han sido uno de los enfoques más novedosos para producir butanol mediante el *Clostridium beijerinckii* (**Maiti y col., 2016**).

II.3.4 Aplicaciones de la FES

La producción de enzimas ha sido y es una referencia para este tipo de proceso (Anexo 1). Sin embargo, la aplicación de la FES se ha extendido a múltiples campos. En décadas recientes se ha estudiado su uso en la biorremediación y biodegradación de compuestos peligrosos, desintoxicación biológica de residuos agroindustriales, biotransformación de residuos de cultivos, biopulpeo y obtención de productos de valor

agregado. Estos productos incluyen enzimas, antibióticos, ácidos orgánicos, alcaloides, factores de crecimiento de plantas, biofertilizantes, biopesticidas (incluyendo micopesticidas y bioherbicidas) y compuestos aromatizantes (Pandey y col., 2008; Mohammad y col., 2012; Pandey y col., 2013; Thomas y col., 2013; Ashok y col., 2017).

II.3.4.1 Producción de compuestos bioactivos mediante FES

La producción de metabolitos secundarios biológicamente activos se ha atribuido a diversos microorganismos; sin embargo, estas sustancias se producen solo bajo condiciones fisiológicas específicas (Anupama y col., 2007). Los antibióticos son producto del metabolismo secundario de los microorganismos y son producidos, tradicionalmente, por FS. No obstante, algunos autores refieren que su producción es mejor empleando la FES debido a que los microorganismos productores crecen en su hábitat natural (Vastrad y col., 2014). En muchos casos los nutrientes contenidos en el sustrato pueden ser inductores o nutrientes suplementarios para tal producción.

Maximizar los rendimientos cualitativos (pureza química) y cuantitativos de la línea productora (microorganismos) es un objetivo primordial de la industria biotecnológica en el campo de las fermentaciones de metabolitos secundarios. La producción de estos metabolitos para propósitos industriales está dificultada por la regulación metabólica microbiana que tiende a evitar la acumulación de moléculas innecesarias. A pesar de estos problemas, muchos autores han empleado este proceso para la obtención de diversos compuestos farmacológicamente activos.

Yang y Ling (1989) utilizaron el boniato, salvado de arroz y harina de soya para la obtención de tetraciclina mediante FES, empleando la cepa *Streptomyces viridifaciens* ATCC 11989. Otros antibióticos como la neomicina, cefalosporina C, meroparamicina, lovastatina, rifamicina B y rifamicina SV han sido obtenidos mediante FES y con el uso de polvo de semilla de frambuesa, rava de trigo, salvado de trigo, salvado de arroz, arroz, bagazo de la caña, quaker, pan, maíz, cáscara de garbanzo verde, cáscara de frijol negro, cascara de naranja, torta de aceite de coco, torta de aceite de cacahuete, cáscara de nuez molida, torta de cáscara de arroz y aceite de girasol, empleando diferentes tipos microorganismos (*Streptomyces marinensis*, *Acremonium chrysogenum* C10, *Streptomyces* sp., MAR01, *Penicillium funiculosum* NCIM 1174, *Amycolatopsis mediterranea* MTCC14, *Amycolatopsis mediterranei* OVA5-E7 y *Nocardia mediterranei*) (Adinarayana y col., 2003; Ellaiah y col., 2004; Cuadra y col., 2008; El-Naggar y col., 2009; Reddy y col., 2011; Vastrad y Neelagund 2012; Vastrad y col., 2014; Nagavalli y col., 2015).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Preparación del inóculo

Para los ensayos de FES se empleó la cepa bacteriana de actinomiceto *M. fluminis* A38^T, aislada del río San Pablo, Santiago de Cuba en previos estudios y conservada en la Colección de Cultivos del CEBI (CCEBI) en cuña de ISP2 [composición (gL⁻¹): glucosa, 4; extracto de malta, 10; extracto de levadura, 4]; **Shirling y Gottlieb, 1966**] a 4 °C. Los ensayos fueron realizados en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Oriente.

III.2 Caracterización de los sustratos

III.2.1 Determinación de la humedad

La determinación de la humedad se realizó de acuerdo a lo descrito por el Standard methods (**APHA, 1998**).

III.2.2 Determinación de la solubilidad en agua

La solubilidad en agua permite tener un estimado del contenido de sales orgánicas, azúcares, gomas, taninos y pectinas. La determinación de la solubilidad de los sustratos se determinó por adición de 2 g del sustrato en 100 mL de agua. La mezcla se mantuvo en agitación a 150 rpm, durante 48 h. Previamente, los sustratos fueron molidos en un molino (MWM, Alemania) hasta la obtención de un polvo fino. El residuo final se pesó y se determinó la concentración de solubles a partir de la diferencia en el peso.

III.2.3 Determinación de carbohidratos

Se pesaron 0,2 g de muestra y se disolvieron, durante 1 h o más, en 20 mL de un buffer tampón fosfato a pH 8, en agitación constante en una zaranda rotatoria a 120 rpm para garantizar la disolución de todos los azúcares. Se determinó el contenido de azúcares reductores de las muestras preparadas anteriormente por el método 3,5-ácido dinitrosalicílico (DNS; **Miller, 1959**), a partir de una curva patrón empleando la glucosa (20 gL⁻¹) a concentraciones de 0,8, 1, 3, 5 y 10 gL⁻¹. La lectura de la absorbancia se realizó a 540 nm.

Por otra parte se determinó en contenido de azúcares reductores luego de aplicarse calor de ~ 70 °C a las muestras durante 10 min, aproximadamente, y bajo agitación constante. En este caso, se pesaron 0.09 g de los sustratos amiláceos y se disolvieron en 20 mL del buffer tampón fosfato, pH 8. Se determinó en cuál de los dos métodos existe una mayor disolución de los azúcares presentes en las muestras.

Por otra parte, se pesaron 0,09 g de las muestras y se disolvieron en 100 mL de agua destilada. Se les aplicó calor (~ 70 °C) y se determinó el contenido de carbohidratos totales que corresponde al contenido de almidón presente en la muestra (**Nielsen,**

2003) por el método de la Antrona (**Hodge y Hofreiter, 1962**), empleando una solución patrón de glucosa (20 gL^{-1}) a concentraciones de 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1 y $0,2 \text{ gL}^{-1}$. La absorbancia se leyó a 625 nm contra un blanco reactivo, con ayuda de un espectrofotómetro (Ray Leigh UV-2601, China). Los resultados se expresaron en g por cada 100 g de muestra.

III.2.4 Determinación de proteínas

La determinación de proteínas se realizó mediante el método descrito por **Lowry y col., (1951)**, utilizando como estándar la albúmina de suero bovino (20 gL^{-1} ; BDH, Reino Unido) a concentraciones de 1, 3, 5 y 7 gL^{-1} . La absorbancia se leyó a 650 nm. Las muestras se procesaron de manera similar a lo descrito previamente para la determinación de azúcares totales y reductores.

III.3 Fermentación

III.3.1 Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo, se empleó un cultivo de la cepa A38^T sembrada en una placa petri con ISP2 e incubada durante 7 días a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Todo el crecimiento bacteriano fue arrastrado con ayuda de un hisopo de algodón estéril e inoculado en 10 mL de un medio de cultivo a base de sales minerales que contenía K_2HPO_4 (2 gL^{-1}), NaCl (1 gL^{-1}) y $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,1 \text{ gL}^{-1}$).

III.3.2 Fermentación en estado sumergido

La fermentación en estado sumergido se realizó con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos por **Hernández, (2017)**. Erlenmeyers con 100 mL de los medios de cultivo ISP₂ y caldo caseína-almidón [composición (gL^{-1}): almidón soluble, 10; KNO_3 , 2; K_2HPO_4 , 1; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,05; CaCO_3 , 0,02; NaCl, 2; caseína, 0,03] fueron inoculados con una suspensión de esporas de la cepa A38^T al 2 % (v/v) y se incubaron en agitación a 150 r.p.m, aproximadamente, a temperatura ambiente ($25 - 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 15 días.

III.3.3 Fermentación en estado sólido

En una primera etapa, para evaluar el crecimiento de la cepa A38^T y la producción de metabolitos secundarios bioactivos mediante FES, se emplearon los sustratos: aserrín, bagazo de caña y pulpa de café seca, obtenidos a través de trabajadores no estatales (carpintería ubicada en el poblado El Caney), CAI “Dos Ríos” y de la estación experimental agroforestal “III Frente Oriental”, respectivamente. De acuerdo a los resultados obtenidos se emplearon, en una segunda etapa, los sustratos amiláceos sorgo y arroz, obtenidos a través de trabajadores no estatales en el mercado agropecuario La Plaza. Previamente, el sorgo fue triturado en un molino (MRC,

Alemania) hasta la rotura del grano y cocinado, al igual que el arroz, con 100 mL de agua destilada hasta que los granos estuvieron semi-blandos.

III.3.3.1 Preparación de los sustratos e inoculación

Las fermentaciones fueron llevadas a cabo en sistemas discontinuos para los cuales se emplearon Erlenmeyers de 500 mL con 50 g de cada uno de los sustratos a evaluar, a los que se les añadió un volumen de 10 mL de la solución de sales minerales descrita previamente. Luego, fueron esterilizados a 121 °C durante 1 h, excepto el sorgo y arroz que fueron esterilizados durante 20 min. Los reactores fueron inoculados al 20 % (m/v) y se incubaron a 30 ± 2 °C, durante 21 días. Los ensayos se realizaron por triplicado.

III.4 Extracción de los metabolitos bioactivos

Para la extracción de los metabolitos se emplearon solventes de diferentes polaridades como benceno, diclorometano y metanol (ver Anexo 2). A las muestras fermentadas se les añadió 100 mL de cada uno de los solventes y se agitó en una zaranda rotatoria a 150 r.p.m durante dos horas. Posteriormente, se centrifugó a 5 000 r.p.m durante 10 min. El proceso de extracción se repitió cuatro veces. El sobrenadante fue concentrado en un rotaevaporador (Heidolph, Suiza) a 37-40 °C. Los extractos obtenidos fueron recobrados con una pequeña cantidad de los mismos solventes y conservados en viales eppendorf estériles a 4 °C hasta su posterior utilización.

III.4.1 Determinación de sólidos totales en los extractos

La determinación de los sólidos totales del extracto fue realizado según lo establecido en el Procedimiento Normalizativo Operativo (PNO) del Laboratorio de Ensayos Analíticos del CEBI (CEBI/PT/ME/09).

III.5 Determinación de la actividad antibacteriana

La determinación de la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos se realizó por el método de Kirby-Bauer modificado o método de los pocillos. El ensayo consistió en la medición de la actividad antagonista de los metabolitos bioactivos producidos por *M. flumnis* A38^T frente a las bacterias *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (CCEBI 1032), *Bacillus cereus* ATCC 11778 (CCEBI 1033), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (CCEBI 1068) y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CCEBI 1070), conservadas en cuñas de agar nutriente en la Colección de Cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CCEBI) a 4 °C.

Con ayuda de puntas estériles de 6 mm de diámetro se realizaron orificios en placas de agar Müeller-Hinton y se depositaron 20 µL de los extractos a ensayar. Previamente, se diseminaron 100 µL del inóculo de las bacterias, ajustado a una concentración de 10^8 UFC/mL (patrón 5 de Mc Farland), con ayuda de la espátula de Drigalsky. Las placas se dejaron en reposo durante 15 min a 25 °C, aproximadamente, con el objetivo de lograr la máxima difusión de los metabolitos a través del agar. Luego, se incubaron de

forma invertida durante 24 – 48 h a 37 °C La aparición de un halo de inhibición (zona clara alrededor de la colonia) fue tomado como una actividad antibacteriana positiva. Los resultados se expresaron como el promedio \pm desviación estándar, en mm.

III.6 Determinación de la actividad antifúngica

La actividad antifúngica de *M. fluminis* A38^T frente a hongos patógenos se realizó mediante la medición del halo de inhibición del crecimiento de los hongos patógenos, utilizando cepas de *Aspergillus niger* ATCC 9642 (CCEBI 3004) y *Alternaria alternata* CECT 2662 (CCEBI 3037), conservadas en cuñas de agar extracto malta en la CCEBI a 4 °C. En el centro de una placa que contenía agar extracto malta (BIOCEN) se depositaron 5 μ L de los extractos de A38^T. Las placas fueron incubadas de forma invertida, durante 7 días a 37 °C. Luego, un tapón de micelio (6 mm de diámetro) del hongo filamentoso a ensayar fue colocado a una distancia de 3 cm del centro de la placa, incubándose a 30 – 35 °C durante 7 días. La aparición de una zona clara alrededor del pocillo evidenció una actividad antagónica del extracto en el crecimiento del hongo. Los ensayos se realizaron por triplicado y expresados en mm.

III.7 Determinación de la actividad enzimática

III.7.1 Producción de amilasas

La determinación de la actividad amilolítica de *M. fluminis* A38^T se determinó a partir de la capacidad de esta cepa para producir enzimas amilasas. La actividad cualitativa se realizó mediante la adición de almidón (10 gL⁻¹) al medio agar triptona soya. En el centro de placa se depositaron 5 μ L de un cultivo de la cepa que fue crecida durante 7 días en placas de ISP2 a 37 °C. Las placas se incubaron de forma invertida durante la misma cantidad de tiempo y temperatura y, al cabo de este tiempo fueron reveladas con una solución de lugol (I2 + KI). La formación de un halo traslúcido alrededor de la colonia indicó la actividad amilolítica de la cepa.

La actividad cuantitativa amilasa se determinó por el incremento del producto de hidrólisis (azúcares reductores) por el método 3,5-ácido dinitrosalicílico (DNS; **Miller, 1959**). Se realizó una curva patrón empleando la glucosa (20 gL⁻¹) a concentraciones de 0,6, 0,8, 1 y 3 gL⁻¹. La lectura de la absorbancia se realizó a 540 nm. Una actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol/min de extremos reductores (glucosa) bajo las condiciones de ensayo. Los valores se expresaron en UmL⁻¹.

III.7.2 Detección cualitativa de almidón (actividad enzimática indirecta)

Se realizó un análisis cualitativo de la presencia de almidón en los sustratos luego de su fermentación por *M. fluminis* A38^T durante 21 días. La observación de un color azul indicó la presencia de almidón, luego de añadir una solución de lugol a la muestra.

III.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en el Statgraphics versión 5.1 a partir de la realización de tres réplicas en cada uno de los parámetros analizados y empleando la prueba t-Student para un nivel de confiabilidad de 0,05 (5 %).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Crecimiento de *M. fluminis* A38^T mediante FS

Los resultados de la fermentación en estado sumergido de la cepa *M. fluminis* A38^T en los medios de cultivo ISP2 y caldo caseína-almidón durante 21 días fueron similares a los obtenidos por **Hernández, (2017)**, al obtener una excesiva esporulación que limitó la extracción de los compuestos bioactivos con solventes de diferentes polaridades. La excesiva esporulación de la cepa puede estar relacionada con la naturaleza hidrofílica de las esporas de *Micromonospora* (**de Menezes y col., 2012**). Resultados similares a los obtenidos en esta investigación han sido reportados por otros autores, los cuales han observado el comienzo de la esporulación a las 24 h después de haber sido inoculado el fermentador (**Carvajal, 1947**).

Algunos estudios han mostrado que la esporulación o la formación de las llamadas “esporas sumergidas” (las que se forman durante la fermentación sumergida y que se diferencian de las esporas aéreas formadas en placas de agar) de algunos actinomicetos puede ser dependiente de los nutrientes del medio de cultivo; o sea, la esporulación comienza y se incrementa cuando existe una limitación de nutrientes (**Ochi y Inatsu, 1995**). Los medios de cultivo ensayados durante esta investigación se caracterizan por un bajo contenido de nutrientes y/o la presencia de fuentes de carbono complejas (caseína y almidón) y, han sido referenciados por otros autores por la capacidad que tienen algunos actinomicetos de producir compuestos con actividad antibacteriana y antifúngica en ellos.

Es bien conocido que la producción de metabolitos bioactivos (metabolitos secundarios) está relacionada con la limitación de nutrientes, una vez que existe disminución de la disponibilidad de los mismos en la etapa estacionaria de crecimiento de las bacterias. En actinomicetos esta capacidad está relacionada con el inicio de la esporulación de los mismos. Sin embargo, la abundante esporulación dificulta en proceso de extracción, tal y como sucedió en nuestro estudio.

A partir de los resultados obtenidos en el crecimiento de la cepa y por el efecto diluyente del agua, no se realizó la extracción de los metabolitos bioactivos. Se hace necesario un estudio más profundo para el crecimiento de *M. fluminis* A38^T y obtención de metabolitos con actividad antibacteriana y antifúngica producidos por la cepa durante FS. Estos estudios deben incluir el análisis de diferentes medios de cultivo, tiempo de fermentación y extracción de los metabolitos bioactivos, entre otros.

IV.2 Crecimiento de *M. fluminis* A38^T en residuos agroindustriales mediante FES

En una primera etapa se evaluó el crecimiento cualitativo de esta cepa en los residuos agroindustriales bagazo de caña, aserrín y pulpa de café mediante FES. En previos estudios, **Hernández, (2017)** demostró la capacidad de *M. fluminis* A38^T para producir enzimas de diferentes naturalezas (celulasas, ligninasas, quitinasas, pectinasas,

lipasas, amilasas, etc.). Por lo tanto, dicha cepa podría ser potencialmente empleada para la degradación de estos residuos lignocelulósicos. Sin embargo, los resultados mostraron que la cepa no fue capaz de crecer en ninguno de los sustratos ensayados, lo cual puede deberse a la naturaleza de los mismos.

Las biomásas de naturaleza lignocelulósicas como el aserrín y el bagazo de caña son complejos heterogéneos de carbohidratos poliméricos (celulosa, hemicelulosa y lignina) (**Ribeiro y col., 2013**). Estos polímeros son constituyentes muy difíciles para la descomposición por algunos microorganismos. Por ejemplo, las microfibrillas de celulosa están unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals intermoleculares que hacen muy difícil su hidrólisis y su descomposición por actividad enzimática (**Arias-Ortiz y Meneses Cruz, 2016**). Asimismo, la unión que se produce entre la lignina y la hemicelulosa a través de enlaces éster forma una estructura robusta y resistente que evita la acción de las enzimas microbianas contra la celulosa y la hemicelulosa (**Lennox y col., 2010; Saini y col., 2015**). La caña de azúcar contiene, además, pentosanos (contiene ácidos urónicos)

La pulpa de café contiene, además de compuestos lignocelulósicos, sustancias pécticas, polifenoles (taninos), cafeína y potasio. Aunque en estudios previos (**Hernández, 2017**) se demostró que la A38^T es capaz de producir pectinasas (para la degradación de las sustancias pécticas), los otros compuestos podrían ejercer un efecto negativo (tóxico) en el crecimiento de la cepa. La cantidad de fenoles libres en la pulpa se encuentra alrededor del 2,6 % (**Braham y Bressani, 1978**), concentración muy superior (5 veces mayor) a la que podría ser tolerada por esta bacteria cuando se empleó 0,2 % de fenol para su aislamiento. La acción de los compuestos fenólicos incluye muchos sitios de acción a nivel celular. El fenol afecta a los lípidos de la membrana citoplasmática y se producen puentes de hidrógeno a proteínas vitales, lo que causa lisis de la célula y se libera constituyentes celulares esenciales (**Arango y col., 2018; Bouarab-Chibane y col., 2019**). La oxidación de los polifenoles en la pulpa de café seca y las quinonas presentes en el sustrato, junto a los aminoácidos libres y proteínas, produce una disminución en la digestibilidad de las proteínas, y por lo tanto, en la absorción de los nutrientes. Además, los taninos, pueden actuar como inhibidores enzimáticos. Se ha reconocido que el pH de la pulpa de café es de, aproximadamente, 4,5. Este parámetro pudo haber tenido también una fuerte influencia en el crecimiento de *M. fluminis* A38^T, si consideramos que esta bacteria crece en un rango de pH de 7 – 9 (**Camacho y col., 2020**).

Es bien conocido que la degradación enzimática de la lignina incluye las enzimas lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa (Lac) (**Kumar y col., 2018**). La hidrólisis de la celulosa envuelve diferentes tipos de celulasas (exoglucanasas (EC 3.2.1.74), endoglucanasas (EC 3.2.1.4), celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91), y β -glucosidasas (EC 3.2.1.21). Para la degradación de la hemicelulosa

participan las enzimas pertenecientes a las familias glicosil-hidrolasas y glicosil-transferasas (**Saini y col., 2015**). Estudios realizados previamente por otros autores demuestran la producción de enzimas celulasas por *Micromonospora* spp. (**de Menezes y col., 2012**). Un estudio adicional del genoma de *M. fluminis* A38^T realizado en nuestra investigación, a través de la base de datos BV-BRC (<https://www.bv-brc.org/view/Genome/>), evidenció la presencia de genes que codifican, principalmente, para enzimas celulasas (Tabla 2), lo cual corrobora el resultado obtenido por **Hernández, (2017)**. La realización de pretratamientos que permitan la conversión de la hemicelulosa y lignina en materiales más accesibles para la cepa permitirán un fácil acceso de la bacteria a la celulosa de estos sustratos, degradándola para su crecimiento.

Se ha descrito que los tratamientos con peróxido de hidrógeno e hidrotérmico-alcálico, ácido (H₂SO₄, ácido polifosfórico), aplicación de radiación, tratamientos enzimáticos, microondas, pirólisis, explosión de vapor y con CO₂, etc, han permitido el rompimiento o degradación de los constituyentes heteropolisacáridicos (**Shide y col., 2004; Ribeiro y col., 2013; Wang y col., 2017; De la Piedra-Colinas, 2019; Agung y col., 2022**). Sin embargo, en algunos trabajos se ha demostrado que la degradación de estos componentes no es completa y, algunos de estos tratamientos podrían ejercer, posteriormente, un efecto negativo en el crecimiento del microorganismo empleado y en el producto a obtener. De manera general, el uso de estos métodos envuelve reactivos químicos caros, condiciones duras y otros tipos de limitaciones que encarecen el proceso de FES (**Saini y col., 2015**).

La fragmentación mecánica de la biomasa lignocelulósica es uno de los pretratamientos menos costosos que no pudiera tener ningún efecto adverso en el crecimiento y la obtención de los metabolitos bioactivos producidos por los microorganismos debido a que mejora la hidrólisis de los componentes al reducir el tamaño, incrementa el área específica disponible y reduce la polimerización y la cristalinidad de la celulosa (**De la Piedra-Colinas, 2019**). En nuestro estudio, se realizó el desmenuzamiento de los sustratos, específicamente, del bagazo de caña. Sin embargo, los resultados mostraron que no fue suficiente este tratamiento para lograr el crecimiento de A38^T. El molinado del sustrato requiere de un alto flujo de energía por lo que este proceso se considera costoso (**De la Piedra-Colinas, 2019**).

La pasteurización de los sustratos es otro de los métodos que hubiéramos podido considerar, con el objetivo de hacer la lignocelulosa más accesible para su degradación por *M. fluminis* A38^T. Sin embargo, en el proceso de decantación del líquido residual pudieran perderse componentes esenciales (Ej. proteínas y minerales) para el crecimiento de la bacteria. Además, esta temperatura (100 °C) puede producir la hidrólisis incompleta de la lignina, celulosa y hemicelulosa, produciéndose compuestos no deseados como el 5-hidroximetilfurfural (HMF), a partir de las hexosas, y el furfural

Tabla 2. Enzimas celulasas detectadas en el genoma de *M. fluminis* A38^T (6 614 092 pb) empleando la base de datos BV-BRC (<https://www.bv-brc.org/view/Genome/>).

No.	Enzima	E.C	Tamaño	Aminoácidos	Ubicación en el genoma
1.	Precursor de la endoglucanasa E1 (endo-1,4- β -glucanasa E1)	3.2.1.4	1635	544	2206379 - 2208013
2.	Precursor de la endoglucanasa cel A (endo-1,4- β -glucanasa)	3.2.1.4	1452	483	3733002-3734453
3.	Celulosa 1,4- β -celobiosidasa	3.2.1.91	2907	968	2645678-2648584

de las pentosas. El HMF y furfural pueden también descomponerse en ácido levulínico y ácido fórmico, compuestos inhibidores del crecimiento bacteriano (Figura 3; **Ixcotoyac-Cabrera, 2013**).

Por lo tanto, partiendo de la capacidad que presenta la cepa A38^T en la producción de diferentes enzimas, tal y como se mencionó anteriormente, y de las limitaciones de los pretratamientos, uno de los objetivos implícitos en nuestro estudio fue emplear estos sustratos sin previo tratamiento de manera que se minimizaran los costos de la FES y se evitaran daños en el producto a obtener (metabolitos bioactivos), tal y como ha sido reportado por otros autores (**Buraimoh y col., 2015**). Algunos microorganismos como los actinomicetos de los géneros *Streptomyces* y *Rhodococcus*, y hongos, particularmente, los hongos de podredumbre blanca, de podredumbre parda y de podredumbre blanda son mayormente empleados (**Saini y col., 2015; Weng y col., 2021; Tan y col., 2022**).

Por otra parte, una de las características esenciales de los llamados “actinomicetos raros”, dentro de los cuales se incluyen las especies del género *Micromonospora*, es su lento crecimiento bajo las condiciones de laboratorio. Esta característica y la aparición, en ocasiones, de otros microorganismos (bacterias y hongos filamentosos) de rápido crecimiento, pueden ser otras de las causas por la cual a los 21 días no se observó crecimiento de *M. fluminis* A38^T en los residuos agroindustriales ensayados. De modo que otro factor que pudo haber influido en el no crecimiento de A38^T es el tiempo de fermentación. La literatura consultada refiere, generalmente, ensayos de fermentación a partir de los 15 días. Sin embargo, otros refieren hasta 96 días o más. Por ejemplo, **Rosero-Delgado y Dustet-Mendoza, (2017)** ensayaron el crecimiento de *Auricularia auricula* en bagazo de caña y cascarilla de arroz durante 96 días. **De la Piedra-Colinas (2019)** plantea que las bacterias necesitan de un proceso más lento y sus enzimas no son lo suficientemente potentes en este proceso.

De manera general, se considera que las investigaciones sobre la degradación de material lignocelulósico por bacterias no son suficientes (**Buraimoh y col., 2015**) y, en específico, el potencial lignocelulósico de los actinomicetos ha sido muy poco estudiado (**Saini y col., 2015**). La mayor parte de las investigaciones refieren el uso de estos microorganismos en la bioconversión de la lignocelulosa para la obtención de etanol y/o enzimas y proteínas (**Sutto-Ortiz y col. 2017**). En la bibliografía consultada muy pocos estudios refieren el empleo de *Micromonospora* spp. en FES. Por lo tanto, otros estudios deben ser realizados con el objetivo de profundizar en los conocimientos sobre la capacidad de *M. fluminis* A38^T para crecer y producir metabolitos bioactivos con actividad antimicrobiana sobre residuos agroindustriales lignocelulósicos.

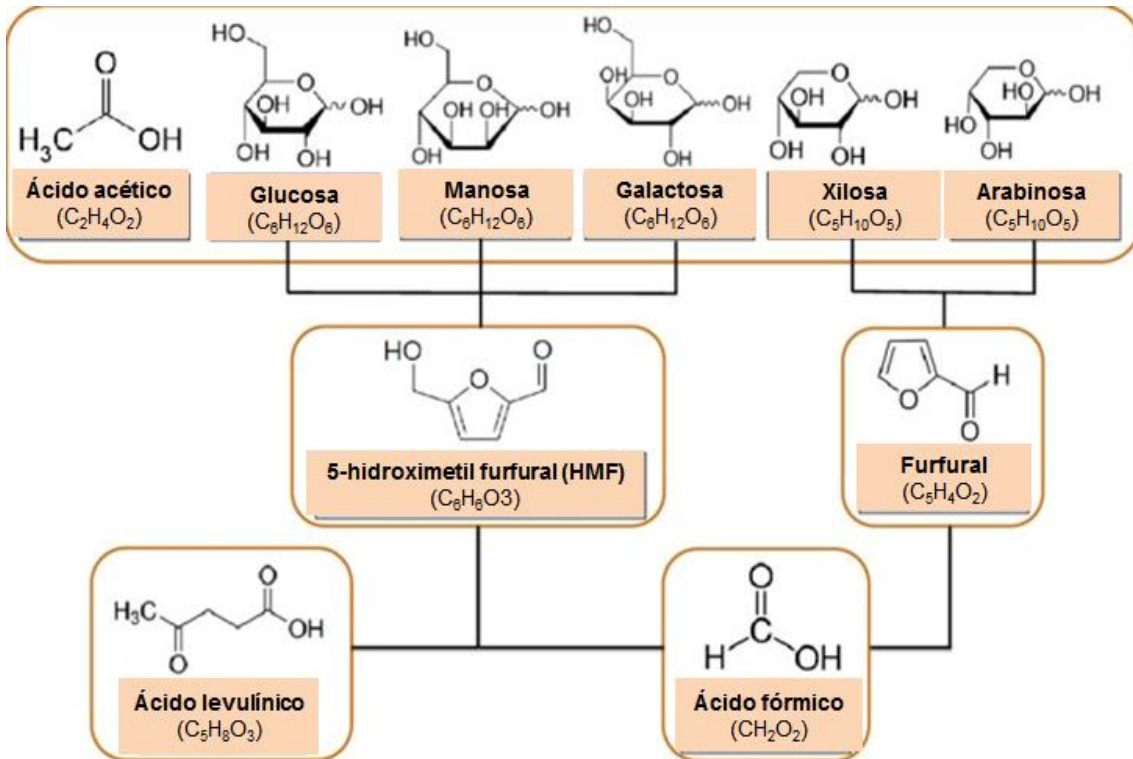


Figura 3. Productos derivados de la degradación de la hemicelulosa (Adaptado de Harahap, 2020).

IV.3 *M. fluminis* A38^T y sustratos amiláceos

En una segunda etapa, basados en previos estudios que mostraron el potencial de la cepa para producir enzimas amilasas capaces de degradar sustratos de naturaleza amilácea (Hernández, 2017), se ensayó el crecimiento de *M. fluminis* A38^T en el sorgo y arroz.

IV.3.1 Ensayos de solubilidad de los componentes de los sustratos amiláceos

A pesar de que el crecimiento de la cepa A38^T se determinó mediante FES, este ensayo se realizó para comprobar la solubilidad de los componentes amiláceos y una mejor caracterización de los mismos. Paradójicamente, los resultados de este ensayo mostraron una mayor solubilidad de los componentes del sorgo, al mostrar valores del contenido de solubles mayores que los del arroz (Tabla 3). Se conoce sobre la presencia de compuestos insolubles en el pericarpo que cubre el endospermo del sorgo como taninos,

Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente (~30 °C) pero el secado no fue completo. Se procedió, entonces, a la aplicación de un leve calor de, aproximadamente, 40-60 °C para el completo secado de las muestras. Sin embargo, se observó una mezcla gomosa en el arroz por la compactación del almidón y el agua, lo cual puede haber interferido en el resultado final de la solubilidad. Yugsi-Lita (2017) demostró que a 30 °C la solubilidad del almidón es poca y que a 60 °C ocurre la gelatinización del almidón. Al alcanzar su máxima solubilidad durante la gelatinización, la amilosa y la amilopectina del almidón, comienzan a interactuar entre sí, llegando a formar complejos insolubles, los cuales precipitan y por tanto la solubilidad disminuye. Otros autores como Tadesse y col., (2019) también han demostrado que existe una mayor solubilidad de componentes amiláceos a medida que se aumenta la temperatura.

IV.3.2 Caracterización química de los sustratos amiláceos

De acuerdo a los resultados previos obtenidos en el ensayo de solubilidad, se procedió a la aplicación de calor a 70 °C para una mayor disolución de los componentes de ambos sustratos; principalmente, del almidón (Yugsi-Lita, 2017). La tabla 3 (Anexos 3-5) muestra el contenido de humedad, carbohidratos (azúcares totales y reductores) y proteínas presentes en ambos sustratos, elementos necesarios para el crecimiento de la cepa bacteriana.

En la tabla 3.1 aparecen los valores para carbohidratos y proteínas cuando le fue aplicado calor a las muestras para lograr una mayor solubilidad de los componentes de ambos sustratos, principalmente de los azúcares presentes en las muestras. El contenido de azúcares reductores cuando no se aplicó calor a las muestras resultó bajo si lo comparamos con los valores después de aplicado el calor. Estos resultados corroboran lo planteado en la literatura sobre la insolubilidad de los gránulos de almidón en agua a temperatura ambiente (Yugsi-Lita, 2017). El calentamiento de las muestras

Tabla 3. Valores de los parámetros calculados en los sustratos amiláceos ensayados para el crecimiento y la producción de metabolitos bioactivos por *M. fluminis* A38^T mediante FES.

Parámetros	Sustratos amiláceos	
	Arroz	Sorgo
Humedad (%)	40,0 ± 0,1	60,0 ± 0,2
Solubilidad (solubles- g/100 mL)	0,15 ± 0,2	0,85 ± 0,4
Carbohidratos totales (g/100 g)	44,9 ± 12,0 ^a	31,4 ± 1,6 ^b
Carbohidratos reductores (g/100 g)	13,8 ± 2,8 ^a	9,9 ± 2,0 ^a
Proteínas (g/100 g)	17,1 ± 1,3 ^a	16,0 ± 3,3 ^a
Actividad enzimática (amilasa) (U mL ⁻¹)	3,83 ± 0,01 ^a	2,76 ± 0,0 ^a

Los valores de los carbohidratos y proteínas se reportan en g por 100 g de muestra. Letras diferentes significan diferencias estadísticamente diferentes para un mismo parámetro en las muestras para un nivel de confiabilidad de 0.05 (Prueba t-Student).

Tabla 3.1 Valores de la determinación de carbohidratos y proteínas con o sin la aplicación de calor (~70 °C) a las muestras.

Parámetros	Condiciones	Sustratos amiláceos	
		Arroz	Sorgo
Azúcares reductores (g/100 g)	Sin calor	1,6 ± 0,2 ^a	1,7 ± 0,1 ^a
	Con calor	13,8 ± 2,8^a	9,9 ± 2,0^a
Proteínas (g/100 g)	Sin calor	17,1 ± 1,3^a	16,0 ± 3,3^a
	Con calor	0,0	0,6 ± 0,5

Los valores en negrita son los reportados para cada parámetro en la tabla 3. Letras diferentes significan diferencias estadísticamente diferentes para un mismo parámetro en las muestras para un nivel de confiabilidad de 0.05 (Prueba t-Student).

garantizó una mayor solubilidad de los carbohidratos presentes en las muestras (almidón). **Yugsi-Lita, (2017)** demostró que a 30 °C (temperatura ambiente) los almidones sedimentan y su solubilidad aumenta a medida que se incrementa la temperatura hasta 70 °C durante 30 min. La solubilidad del almidón se debe a la exudación de amilosa. El almidón se hincha y se disocian las dobles hélices de la amilopectina perdiendo su estructura. La cantidad de agua, la concentración de almidón, el tiempo y la temperatura son factores que permiten la dispersión de las regiones cristalinas, es decir la disolución de la muestra (**Tovar, 2008**). A pesar de que en el arroz se obtuvo una mayor cantidad de azúcares totales y reductores, no diferencias estadísticamente significativas (Tabla 3). El contenido de proteínas fue también ligeramente mayor en el arroz.

Como se esperaba, la concentración de proteínas disminuyó hasta casi su ausencia cuando se le aplicó calor a las muestras. Las proteínas son compuestos termosensibles que se desnaturalizan cuando se aplica una temperatura de 50 – 60 °C. No obstante, en el sorgo, luego de aplicar una temperatura de 70 °C, aún fue posible detectar una pequeña cantidad de proteínas ($0,6 \pm 0,5$ g/100g de sustrato). Es posible que esta temperatura haya influido en el rompimiento de los enlaces taninos-proteínas que se forman en el sorgo, quedando una pequeña cantidad de proteína por cuantificar.

IV.3.3 Crecimiento de *M. fluminis* A38^T en sustratos amiláceos

La observación de un micelio (vegetativo) anaranjado evidenció el crecimiento de la *M. fluminis* A38^T en los sustratos ensayados (Figura 4). Sin embargo, no fue posible cuantificar el crecimiento de la cepa debido al crecimiento micelial de la cepa con hifas vegetativas embebidas en el sustrato (Figura 4). En este sentido, **Pandey, (2008)** plantea que en la FES la estimación de la biomasa microbiana es difícil porque las células microbianas permanecen unidas al sustrato y es difícil separarlos. En el caso de los hongos resulta más difícil pues las hifas penetran en el sustrato. *M. fluminis* A38^T es una cepa de actinomiceto, los cuales presentan características morfológicas similares a las de los hongos filamentosos, por presentar un micelio aéreo y vegetativo con hifas encargadas de portar las estructuras reproductoras (esporas) e hifas responsables de la toma de nutrientes, respectivamente, tal y como es reportado por **Camacho, (2022)** para esta cepa.

El análisis cualitativo mostró un mejor crecimiento de A38^T en el arroz que en el sorgo (Figura 4). Se ha planteado por algunos autores que el sorgo es un alimento “antinutricional” pues posee una baja digestibilidad de la proteína y el almidón presente en el grano debido a la presencia de fitatos [myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis (dihidrogenofosfato)] y taninos (polifenoles). En este caso, los taninos se unen a las proteínas o enzimas formando complejos taninos-proteínas que afectan la digestibilidad de las proteínas. Estos complejos también pueden influir en las enzimas encargadas de degradar el almidón, lípidos y proteínas. Por su parte, el ácido fítico

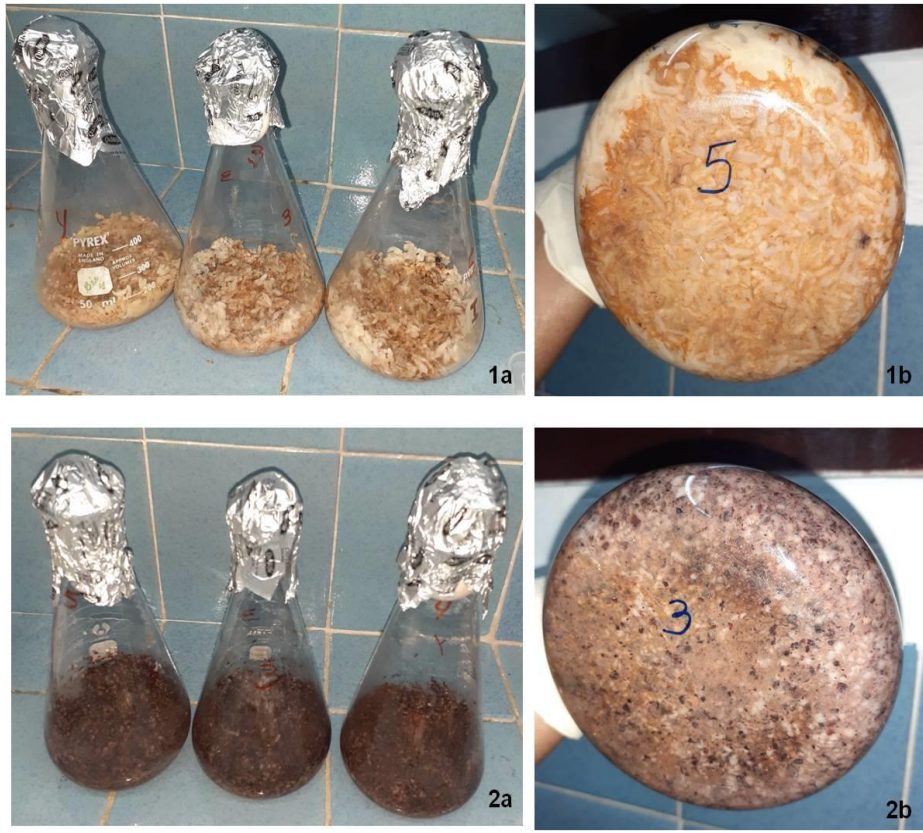


Figura 4. Crecimiento de *Micromonospora fluminis* A38^T en los sustratos amiláceos arroz (1) y sorgo (2).

tiene una potente capacidad de unión a multivalentes cationes y proteínas (**Ge y col., 2020; Putri y col., 2021**).

El grano del sorgo también posee otros compuestos fenólicos como los ácidos fenólicos y flavonoides que también pudieron haber disminuido el crecimiento de la cepa en este sustrato. Algunos de estos componentes constituyen conocidos compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana que mitigan la acción de los microorganismos fermentadores (**Adebo y Medina-Meza, 2021**). No obstante, durante la fermentación del sorgo, es posible que la cepa A38^T produjera tanasa y galato decarboxilasa, enzimas responsables de la degradación de proteínas y de los complejos taninos-proteínas en ácido gálico y glucosa y de la decarboxilación del ácido gálico producido por la actividad de la tanasa (**Putri y col., 2021**). La glucosa producida constituye una fuente de energía de fácil asimilación por la bacteria para su crecimiento. Por otra parte, la aplicación de calor a las muestras, como se explicó anteriormente, pudo haber tenido un efecto en el rompimiento de los enlaces taninos-proteínas, liberando estas últimas para una mejor asimilación por la cepa para su crecimiento y desarrollo.

El molinado de los sustratos a un menor tamaño y su cocción hasta que los granos estuvieron semiblandos fueron pretratamientos que influyeron de manera favorable en el crecimiento de la cepa (Anexo 6), haciéndolos más accesibles para la degradación enzimática. Pero, la capa protectora de pericarpo (presencia de taninos) presente en el grano de sorgo pudo alterar la difusión de nutrientes tales como aminoácidos y azúcares, necesarios para el crecimiento de los organismos fermentadores (**Adebo y Medina-Meza, 2021**), dando como resultado un menor crecimiento de la cepa en este sustrato.

Por otra parte, el establecimiento de las condiciones adecuadas de humedad del sustrato influyó positivamente en el desarrollo microbiano. Aunque el porcentaje de humedad calculado para ambos sustratos no mostró diferencias estadísticamente significativas (Tabla 3) y, la adición de 100 mL de agua destilada y de sales minerales (10 mL) le proporcionaron una humedad mayor al sustrato, consideramos que este factor no tuvo una gran influencia en los resultados obtenidos. Se han recomendado valores de humedad para una matriz orgánica a fermentar entre 40 – 60 % (**Haug, 1993; Reinoso, 2015**).

El análisis de carbohidratos totales y reductores, y de las proteínas después de la fermentación en estado sólido (21 días) de los sustratos amiláceos ensayados (Tabla 4) sustentó los resultados obtenidos relacionados con el crecimiento de la cepa en ambos sustratos. Hubo una degradación del 70 % de los carbohidratos totales por *M. fluminis* A38^T para su crecimiento y desarrollo en el arroz. Sin embargo, en el sorgo solo se empleó el 24,5 % de estos compuestos como fuente de carbono para su crecimiento, con una diferencia estadísticamente significativa entre los carbohidratos asimilados en ambos sustratos ($p=0,0001$). De los carbohidratos, la cepa empleó el 59,4 % y el 60,6

Tabla 4 Valores de los parámetros calculados en los sustratos amiláceos ensayados luego de la FES, durante 21 días, empleando la cepa *M. fluminis* A38^T.

Parámetros		Sustratos amiláceos	
		Arroz	Sorgo
Carbohidratos (g/100 g)	totales	31,4 ± 1,6 ^a	7,7 ± 2,1 ^b
Carbohidratos (g/100 g)	reductores	8,2 ± 4,6 ^a	6,0 ± 1,3 ^a
Proteínas (g/100 g)		17,1 ± 0,3 ^a	15,3 ± 4,0 ^a

Letras diferentes significan diferencias estadísticamente diferentes para un mismo parámetro en las muestras para un nivel de confiabilidad de 0.5 (Prueba t-Student).

% de los azúcares reductores presentes en el arroz y el sorgo, respectivamente, para su crecimiento y desarrollo.

Por otra parte, los resultados obtenidos en este estudio evidenciaron que a los 21 días, la cepa no necesitó de las proteínas presentes en el arroz para su crecimiento, tal y como se muestra en la tabla 4; o sea, el crecimiento de A38^T se realizó, esencialmente, a expensas de los carbohidratos presentes en el sustrato, y de los macronutrientes y micronutrientes contenidos en la solución de sales minerales añadida previamente ante de la FES. Sin embargo, los valores de las proteínas cuantificadas en el sorgo indican que alrededor de un 4 % de estos componentes podrían haber sido empleados por la bacteria para su crecimiento.

En resumen, ambos sustratos amiláceos permiten un adecuado crecimiento de *M. fluminis* A38^T a partir de la degradación de los mismos. A pesar de que estos sustratos de naturaleza amilácea son considerados como alimentos, muchas son las investigaciones que reflejan su uso para la obtención de diferentes productos con potencial biotecnológico. En nuestro país, **Irimia-Hernández y col., (2016)** emplean los granos de arroz entero para la producción de diferentes especies del género *Trichoderma* como control biológico.

IV.5 Actividad enzimática *M. fluminis* A38^T

La habilidad de *M. fluminis* A38^T para producir enzimas amilasas que degraden los sustratos amiláceos ensayados fue determinada en esta investigación a través de la actividad enzimática cualitativa y cuantitativa. El análisis cualitativo mostró la producción de esta enzima al obtener halos de hidrólisis del almidón cuando fue revelada con una solución de lugol (Figura 5).

En el ensayo adicional realizado al fermento (producto obtenido de la FES de la cepa A38^T en los sustratos arroz y sorgo) para la detección de almidón, a través de la adición de la solución de lugol, se observó que en el sorgo aún quedaba parte de este polisacárido por degradar (Figura 6). El lugol se introduce entre las espiras de la molécula de almidón, formándose un compuesto de inclusión que modifica las propiedades físicas del almidón, apareciendo la coloración azul-violeta. Este resultado supone una menor actividad enzimática de las enzimas amilasas en el sorgo, en consecuencia, quizás, de la necesidad de producir otros tipos de enzimas por la cepa para primero degradar otros componentes complejos (pectina, celulosa, hemicelulosa) de este sustrato.

Tal y como se esperaba, los resultados de la actividad cuantitativa evidenciaron una mayor actividad enzimática en el arroz ($3,83 \pm 0,01 \text{ U mL}^{-1}$) por la producción de enzimas amilasas (Tabla 3), lo cual justifica también el mayor crecimiento de la cepa A38^T visualizado en este sustrato. Estas enzimas catalizan la hidrólisis del almidón al romper los enlaces internos α -1,4-glucosídicos para producir dextrina, oligosacáridos de

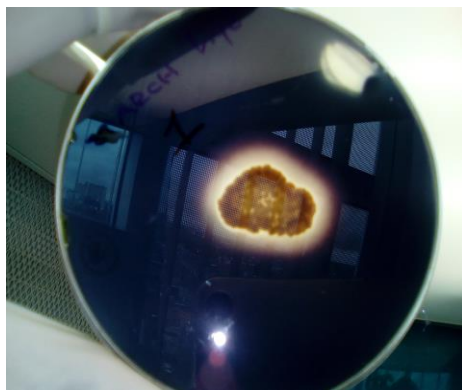


Figura 5. Actividad enzimática cualitativa de las enzimas amilasas producidas por *Micromonospora fluminis* A38^T.

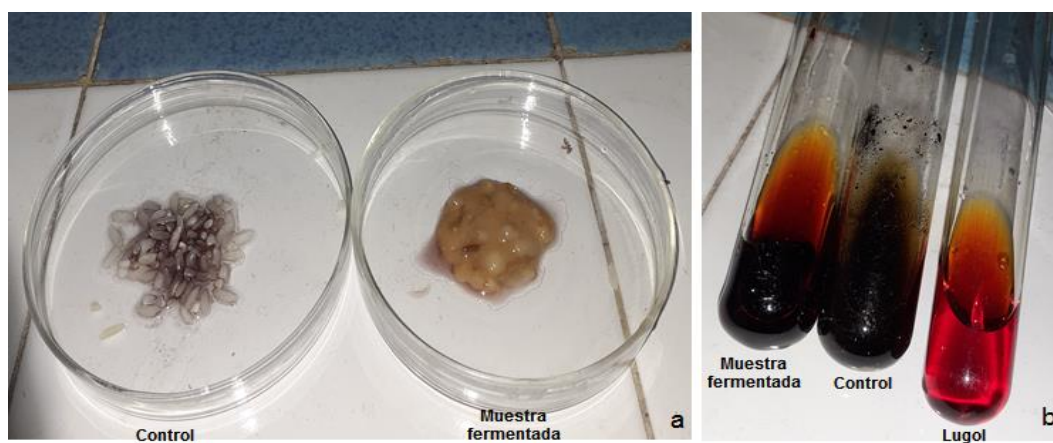


Figura 6. Detección de almidón (color azul-violeta), a través de la adición de lugol, en el arroz (a) y sorgo (b) después de la FES (21 días) empleando la cepa *M. fluminis* A38^T. Control (sustrato + lugol); muestra fermentada (sustrato + microorganismo + lugol).

cadena corta, maltotriosa, maltosa y glucosa (**Chávez-Camarillo y col., 2022**). Estos compuestos resultan de fácil asimilación para la cepa en su crecimiento.

IV.6 Extracción de los metabolitos bioactivos producidos por *M. fluminis* A38^T

El éxito y la eficiencia en la extracción de los metabolitos bioactivos dependen de la elección de los solventes y sus características (polaridad, volatilidad, etc.), el efecto de la temperatura y pH. Sin embargo, estos parámetros pueden alterar la especificidad, la estructura química del compuesto a extraer y la factibilidad del proceso. En nuestro estudio, se emplearon tres solventes de diferentes polaridades (metanol, diclorometano y benceno) para la extracción de los metabolitos producidos por A38^T mediante FES (Anexo 2).

Los resultados de nuestro estudio mostraron una baja extracción de los bioactivos producidos por la cepa A38^T mediante FES en los sustratos amiláceos ensayados. La cuantificación de los sólidos totales en el sorgo + metanol (SM) y sorgo + benceno (SB), mostró valores de 100 mg y 130 mg en 500 µL de extracto, respectivamente. La cantidad de extracto obtenido en las otras extracciones no fue suficiente para la realización de este análisis. Es posible que los elementos que influyen durante el proceso de extracción descritos anteriormente hayan tenido un efecto considerable durante el proceso de extracción. No obstante, es necesario considerar que la cantidad de sustrato empleado (50 g) fue muy poca y que los metabolitos con actividad antimicrobiana se producen en ínfimas cantidades, producto del metabolismo secundario de los microorganismos.

Por otra parte, es válido considerar también la posible producción de compuestos volátiles y semivolátiles de bajo peso molecular por *M. fluminis* A38^T, tal y como se ha descrito en otros actinomicetos (**Ahsan y col., 2017**). La separación e identificación de estos compuestos puede ser lograda empleando la novedosa técnica CG-EM, la cual combina la cromatografía gaseosa (CG) y la espectrometría de masas (EM). A pesar de estos resultados, los extractos obtenidos mostraron un efecto inhibitorio del crecimiento de las bacterias y hongos ensayados, lo cual demuestra la producción de bioactivos por *M. fluminis* A38^T mediante FES, tal y como se muestra a continuación.

IV.4 Actividad antimicrobiana y antifúngica de los metabolitos producidos por *M. fluminis* A38^T mediante FES

La producción de antibióticos por los microorganismos es altamente dependiente de la prevalencia de condiciones ambientales selectivas y la manipulación de las condiciones nutricionales y de crecimiento durante la fermentación. La composición y concentración de los constituyentes está unida a la capacidad metabólica del microorganismo, lo cual tiene una gran influencia en la biosíntesis de moléculas bioactivas (**Uddin y col., 2013**).

La tabla 5 muestra los resultados de la actividad antibacteriana y antifúngica de los metabolitos bioactivos producidos por *M. fluminis* A38^T durante FES en los sustratos

Tabla 5. Resultados de la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos con solventes de diferentes polaridades de los metabolitos bioactivos producidos por *M. fluminis* A38^T en arroz y sorgo durante la FES.

Microorganismos	Actividad antibacteriana de los extractos (mm)					
	Arroz			Sorgo		
	Metanol	Diclorometano	Benceno	Metanol	Diclorometano	Benceno
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	NE	-	NE	10,0 ± 0,1	-	-
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	NE	-	NE	9,5 ± 0,07	-	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	NE	-	NE	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	NE	-	NE	-	-	-
Actividad antifúngica de los extractos (mm)						
<i>A. niger</i> ATCC 9642	NE	11,2 ± 0,6	NE	-	NR	-
<i>A. alternata</i> CECT 2662	NE	NR	NE	19,0± 0,3	NR	19,0± 0,2

Los resultados corresponden al promedio ± desviación estándar. (-) No tuvo actividad; (NE) No extracción de los metabolitos con el solvente en cuestión; (NR) No realizado por la obtención de poca cantidad de extracto.

amiláceos experimentados. Como se mencionó anteriormente, el análisis de los resultados se afectó por el proceso de extracción de los metabolitos con los solventes empleados y, algunos de los extractos obtenidos no pudieron ser testados debido a la obtención de una ínfima cantidad que limitó la cantidad de microorganismos a ser ensayados. Aún así, los resultados evidencian el potencial antimicrobiano de *M. fluminis* A38^T.

IV.4.1 Actividad antibacteriana

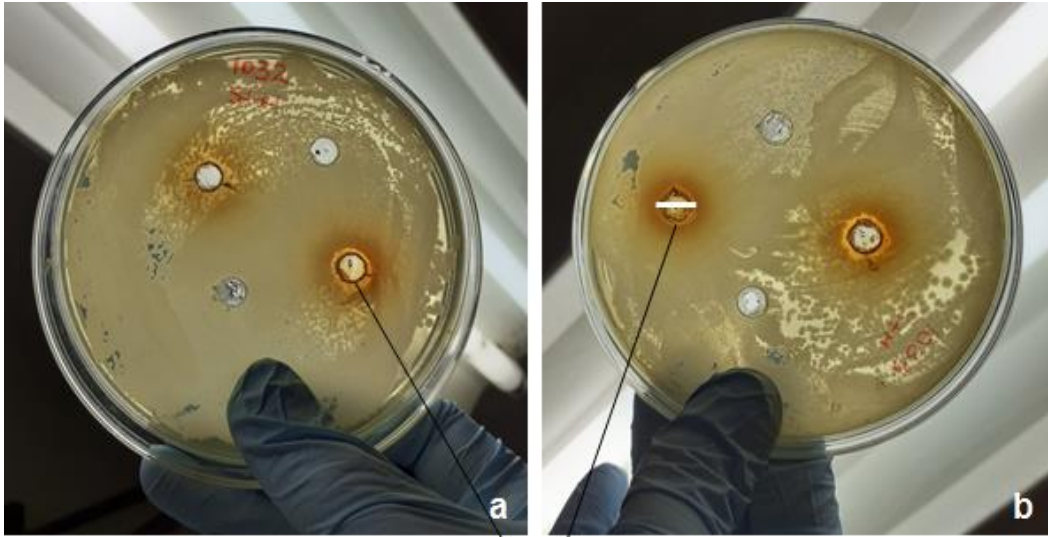
El ensayo de la actividad antibacteriana evidenció que solo el extracto obtenido durante la extracción con metanol de los metabolitos producidos mediante la FES del sorgo fue activo contra alguna de las bacterias ensayadas (Figura 7; tabla 5). Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los halos de inhibición del crecimiento de las bacterias *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. cereus* ATCC 11778, obteniéndose $10,0 \pm 0,1$ mm y $9,5 \pm 0,07$ mm, respectivamente. Dicho extracto no resultó activo contra *E. faecalis* ATCC 29212 y *S. aureus* ATCC 25923. El resto de los extractos del sorgo y el extracto del arroz empleando el diclorometano no mostraron actividad antibacteriana. No se pudo realizar la extracción con el metanol y el benceno de los metabolitos producidos en el arroz.

Los resultados contra la cepa ATCC 6633 estuvieron en concordancia con los obtenidos por **Thawai y col., 2018** y **Agour y col., (2022)** cuando ensayaron los metabolitos producidos por varias cepas de actinomicetos mediante FES en arroz y extraídos empleando el etilacetato (o acetato de etilo), un solvente de mediana polaridad. Otros estudios difieren de nuestros resultados al obtener actividad antibacteriana de *Micromonospora* spp. contra *S. aureus* y *Enterococcus* sp. (**Thawai y col., 2018**; **Nofiani y Ardiningsih, 2022**).

A pesar de que no fue posible realizar una comparación entre los resultados de los diferentes extractos obtenidos, la actividad antibacteriana del extracto metanólico de los metabolitos producidos por *M. fluminis* A38^T durante la FES en el sorgo indica la posible naturaleza polar (hidrofílica) de estos compuestos bioactivos. En estudios previos, durante una minería del genoma de la cepa A38^T realizado por **Camacho, (2022)**, se determinó la presencia de diferentes clusters (grupos) de genes biosintéticos correspondientes a lantipeptidos, péptidos-sintasas no ribosomales, policétidos-sintasas, terpenos y sideróforos. Muchos de estos compuestos se destacan por su naturaleza anfifílica (región polar y apolar), y son referenciados por su marcada actividad antibacteriana (**Carro y col., 2018**).

IV.4.2 Actividad antifúngica

La figura 8 muestra los resultados de la actividad antifúngica del extracto de diclorometano de los metabolitos producidos por la cepa A38^T en el arroz, con un halo de inhibición de $11,2 \pm 0,6$ mm (Tabla 5). A pesar de haber ensayado el extracto sorgo



**Halos de
inhibición**

Figura 7. Actividad antibacteriana del extracto metanólico de los metabolitos bioactivos producidos por *M. fluminis* A38^T durante la FES en el sorgo contra *B. subtilis* ATCC 6633 (CCEBI 1032) y *B. cereus* ATCC 11778 (CCEBI 1033).

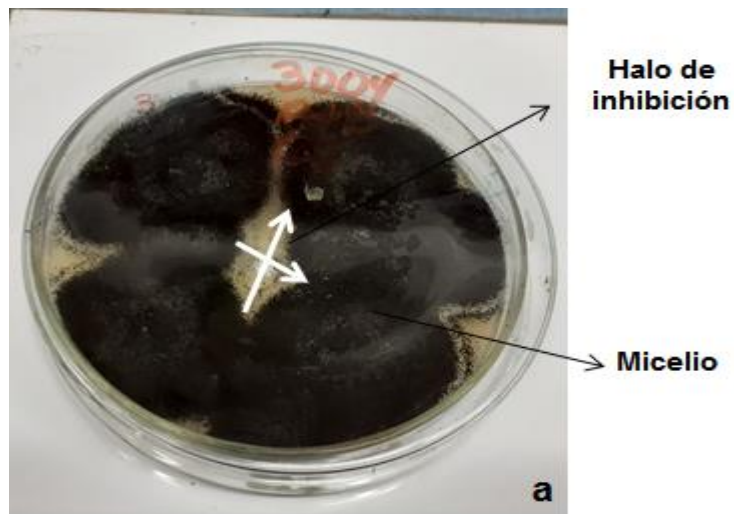


Figura 8. Actividad antifúngica del extracto de diclorometano de los metabolitos bioactivos producidos por *M. fluminis* A38^T durante la FES en el arroz contra *A. niger* ATCC 9642 (CCEBI 3004).

+ diclorometano contra bacterias, la cantidad obtenida no fue suficiente para realizar el ensayo contra hongos. Los extractos sorgo + metanol y sorgo + benceno no fueron activos contra *A. niger* ATCC 9642. Sin embargo, dichos extractos mostraron una actividad antagónica contra *A. alternata* CECT 2662 alrededor de 19,0 mm (Tabla 5; figura 9).

La observación de las hifas de los hongos ATCC 9642 y CECT 2662 bajo el microscopio óptico luego de la acción de los metabolitos de A38^T recobrados en los extractos activos mostró abundante vacuolización y engrosamiento de la pared celular (Figuras 10 y 11). Una respuesta de la célula ante la presencia y posible entrada de compuestos fungitóxicos. Un ligero incremento en la actividad del extracto sorgo + benceno (Tabla 5), indica la posible extracción de un compuesto apolar (hidrofóbico). Sin embargo, a partir de los resultados de los halos de inhibición del crecimiento de los hongos mostrada por el extracto sorgo + metanol (Tabla 5), no es posible descartar la extracción de otros compuestos de naturaleza hidrofílica con actividad antifúngica.

El análisis del genoma de A38^T evidenció la presencia del cluster (grupo) de genes que codifica para la producción de la nistatina, un conocido compuesto antifúngico de naturaleza anfifílica pertenecientes a los polienos. Los polienos se unen al ergosterol de la membrana celular fúngica y forman poros hidrofílicos por donde ocurre la liberación o salida de iones intracelulares (Ej. Potasio) y rompe el potencial de membrana dependiente de los mecanismos de transporte activo, al depolarizar la membrana e incrementar la permeabilidad a protones e iones monovalentes. Otras cepas de *Micromonospora* han sido descritas por su actividad antifúngica (**Kim y col., 1999; Ismet y col., 2004; Zhao y col., 2017; Banfalvi, 2020**).

De manera general, y a pesar de los inconvenientes tenidos durante el proceso de fermentación y extracción de los metabolitos producidos por *M. fluminis* A38^T durante la fermentación, esta investigación aporta evidencias sobre la capacidad que presenta la cepa para crecer y producir metabolitos bioactivos con actividad antibacteriana y antifúngica en sustratos amiláceos. En la literatura consultada, no se encontraron evidencias sobre la capacidad de *Micromonospora* spp. para producir estos tipos metabolitos bajo FES. Solo **Sutto-Ortiz y col., (2017)** relaciona el empleo de una cepa de *Micromonospora* para la obtención de la enzima fosfolipasa A mediante FES empleando el bagazo de caña. La mayor parte de los artículos aporta evidencias para la obtención de bioactivos antimicrobianos bajo FS y para la obtención de enzimas, principalmente. Por lo tanto, esta investigación sienta las bases para futuros estudios sobre la fermentación en estado sólido en sustratos no convencionales para la obtención de antimicrobianos por *M. fluminis* A38^T.

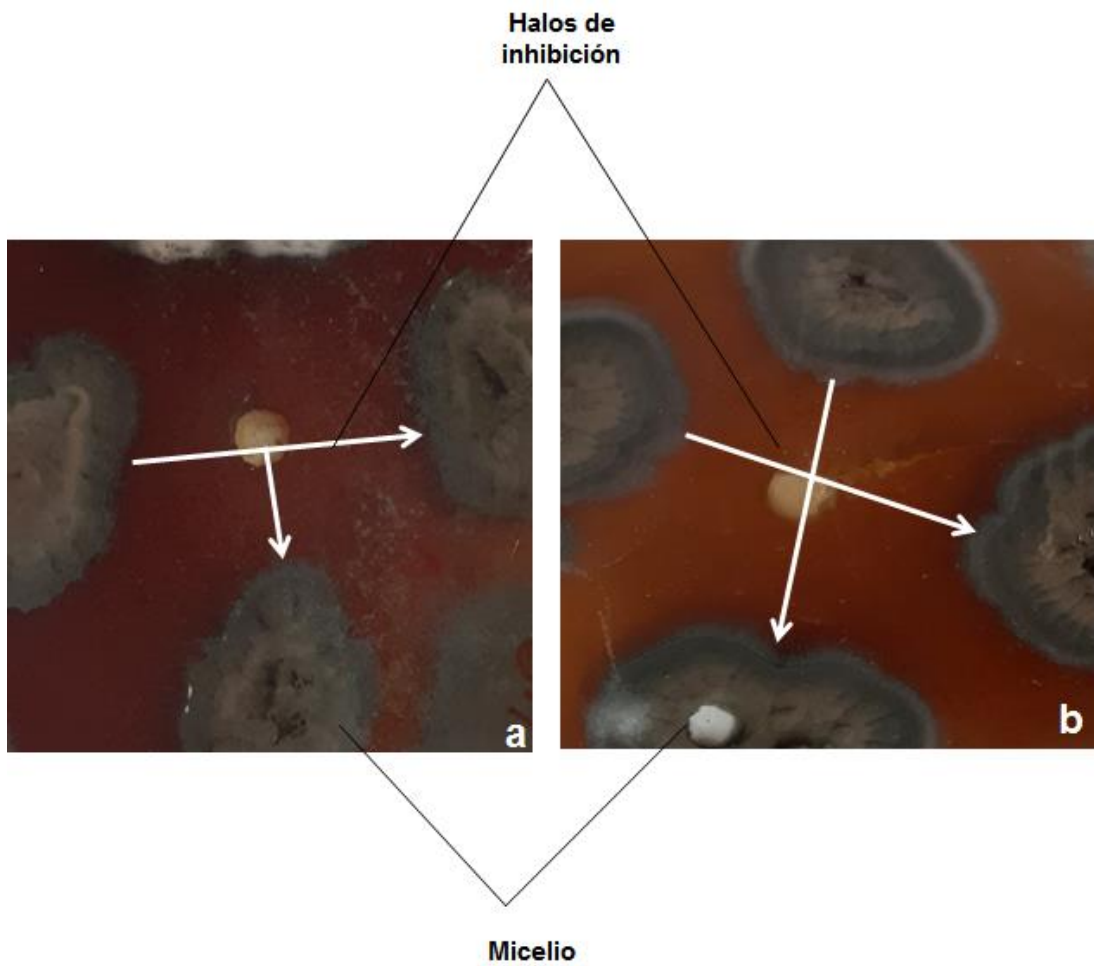


Figura 9. Actividad antifúngica de los extractos de metanol (a) y benceno (b) de los metabolitos bioactivos producidos por *M. fluminis* A38^T durante la FES en el sorgo contra *A. alternata* CECT 2662.

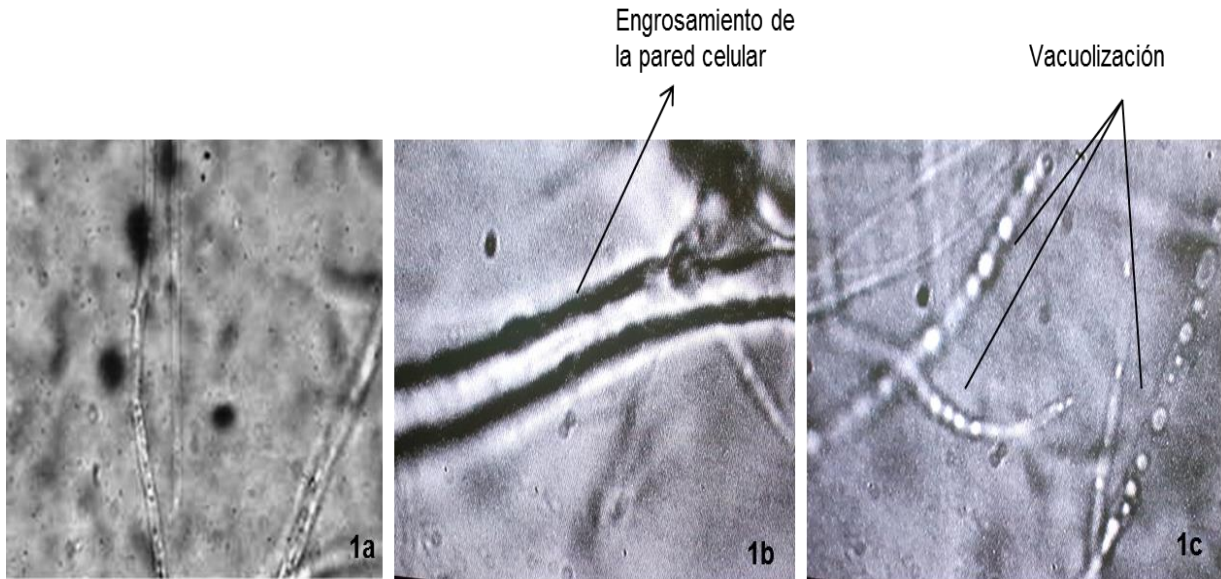


Figura 10. Efecto del extracto de diclorometano de los metabolitos producidos por *M. fluminis* A38^T en las hifas de *A. niger* ATCC 9642 (CCEBI 3004). Hifa control (1a), engrosamiento de la pared celular (1b) y vacuolización (1c). 1a-Microfotografía tomada bajo el microscopio óptico (100x); 1b y c- Microfotografías tomadas bajo el microscopio óptico, y visualizadas en un televisor ATEC Panda (China).

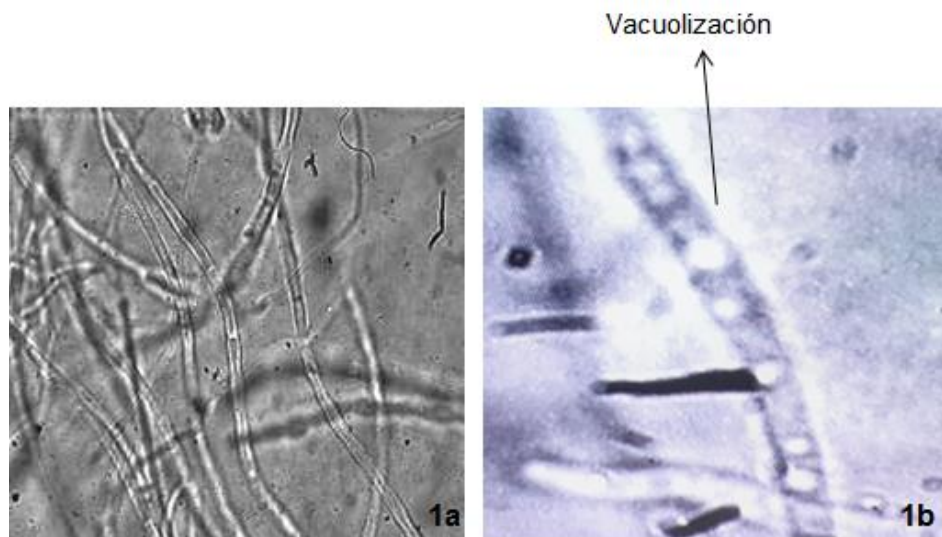


Figura 11. Efecto del extracto de benceno de los metabolitos producidos por *M. fluminis* A38^T en las hifas de *A. alternata* CECT 2662 (CCEBI 3037). Hifa control (1a) vacuolización. 1a-Microfotografía tomada bajo el microscopio óptico (100x); 1b- Microfotografía tomada bajo el microscopio óptico y visualizada en un televisor ATEC Panda.

V. CONCLUSIONES

1. *Micromonospora fluminis* A38^T no fue capaz de crecer en los sustratos lignocelulósicos ensayados (bagazo de caña y aserrín), ni en la pulpa de café, debido, quizás, a los componentes de los mismos.
2. La composición de carbohidratos y la producción de enzimas amilasas le permitió a la cepa A38^T degradar los sustratos amiláceos: sorgo y arroz, y asimilar sus componentes para su crecimiento, con un mayor desarrollo micelial en este último sustrato.
3. Los extractos ensayados de los metabolitos producidos por la cepa A38^T inhibieron el crecimiento de los bacilos Gram positivos *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. cereus* ATCC 11778, y de los hongos *A. niger* ATCC 9642 y *A. alternata* CECT 2662, lo que demuestra el potencial de la misma para producir metabolitos con actividad antibacteriana y antifúngica en los sustratos no convencionales arroz y el sorgo mediante FES.

VI. RECOMENDACIONES

1. Ensayar diferentes condiciones (Ej. cantidad de sustrato, tamaño de partícula, tiempo de fermentación, solventes) que maximicen la producción y obtención de metabolitos con actividad antibacteriana y antifúngica producidos por *M. fluminis* A38^T en el sorgo y el arroz.
2. Ensayar otros tipos de sustratos amiláceos (desechos agroindustriales) para el crecimiento y la producción de metabolitos con actividad antibacteriana y antifúngica por *M. fluminis* A38^T.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abraham J. 2014. Production of proteases from industrial wastes through solid-state fermentation at different scales. Potential applications. Tesis presentada (en opción al grado de Doctor en Filosofía, Ciencia y Tecnología Ambiental). Universidad Autónoma de Barcelona. España.
2. Abu N, Barrena R, Komilis D, Sánchez A. 2017. Solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: a review. *Sustainability*; 9 (2): 224-235.
3. Acevedo MA, Peñaloza-Quintero I, Morales-Fonseca D. 2021. Aprovechamiento de los polisacáridos de la pulpa de café residual para la obtención de bioetanol como estrategia hacia la bioeconomía. *Gest Ambient*; 24(supl. 3): 100-113.
4. Aceves AE, Castañeda LM. 2012. Producción biotecnológica de lipasas microbianas, una alternativa sostenible para la utilización de residuos agroindustriales. *Vitae*; 19 (3): 244-247.
5. Adebo OA, Medina-Meza, IG. 2021. Impact of Fermentation on the Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Whole Cereal Grains: A Mini Review. *Molecules*; 2020, 25: 927.
6. Adhyaru DN, Bhatt NS, Modi HA, Divecha J. 2016. Insight on xylanase from *Aspergillus tubingensis* FDHN1: production, high yielding recovery optimization through statistical approach and application. *Biocatal Agric Biotechnol*; 6 (3): 51-57.
7. Adinarayana K, Ellaiah P, Srinivasulu B, Devi RB, Adinarayana G. 2003. Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for neomycin production by *Streptomyces marinensis* under solid-state fermentation. *Process Biochem*; 38 (11): 1565–1572.
8. Agour MA, Hamed AA, Ghareeb MA, Abdel-Hamid EA, Ibrahim MK. 2022. Bioactive secondary metabolites from marine actinomyces sp. AW6 with an evaluation of ADME related physicochemical properties. *Arch Microbiol*; 204 (8): 1-12.
9. Agung SA, Yanto DH, Meryandini A, Candra T. 2022. Pretreated sugarcane bagasse result in more efficient degradation by *Streptomyces* sp S2. *Microbiol Indones*; 16 (1): 13-22.
10. Ahsan T, Chen J, Zhao X, Irfan M, Wu Y. 2017. Extraction and identification of bioactive compounds (eicosane and dibutyl phthalate) produced by *Streptomyces* strain KX852460 for the biological control of *Rhizoctonia solani* AG-3 strain KX852461 to control target spot disease in tobacco leaf. *AMB Express*; 7 (1): 54.
11. Amaro L, Romero O, Huerta LM, Rivera TA. 2015. Producción de *Trichoderma viridae* en diferentes sustratos agrícolas. *Int Res J Biol Sci*; 2(4):1-7.

12. Antal N, Fiedler HP, Stackebrandt E, Beil W, Stroch K, Zeeck A. 2005. Retymicin, galtamycin B, saquayamycin Z and ribofuranosyllumichrome, novel secondary metabolites from *Micromonospora* sp. Tü 6368. *J Antibiot*; 58 (2): 95-102.
13. Anupama M, Narayana KJ, Vijayalakshmi M. 2007. Screening of *Streptomyces purpeofuscus* for antimicrobial metabolites. *Res J Microbiol*; 2: 992-4.
14. APHA AWWA, WPCF (Eds.). 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water. 20th edition.
15. Arango C, Acosta-Gonzalez A, Parra-Giraldo CM, Sánchez-Quitian ZA, Kerr R. 2018. Characterization of class actinobacterial communities from *Arauca river* sediments (Colombia) reveals antimicrobial potential presented in low abundant isolates. *Open Microbiol J*; 12: 181–194
16. Arias-Ortíz RA, Meneses-Cruz JD. 2016. Caracterización físico-química de residuos agroindustriales (cascarilla de arroz y cascarilla de café), como materia prima potencial para la obtención de bioetanol. Laboratorios de Química UNAN-Managua I-II semestre. Tesis presentada (en opción al título de Licenciado en Química Industrial). Facultad de Ciencias e Ingenierías Departamento de Química. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua. Nicaragua.
17. Ashley V, Mitchell D, Howes T. 1999. Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. *Biochem Eng J*; 3: 141-150.
18. Ashok AK, Doriya, DR, Kumar DS. 2017. Design of solid state bioreactor for industrial applications: an overview to conventional bioreactors. *Biocatal. Agric. Biotechnol*; 9:11-18.
19. Augustine D, Jacob JC, Ramya KD, Philip R. 2013. Actinobacteria from sediment samples of Arabian Sea and Bay of Bengal: Biochemical and physiological characterization. *Int J Mar Sci*; 2 (2): 56-63.
20. Badui-Dergal S. 2012. Química de los Alimentos (Quinta Edición ed.). Pearson Educación. México.
21. Ballardo-Matos CV. 2016. Valorización de residuos sólidos orgánicos como sustratos para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* mediante fermentación en estado sólido: aplicación a la fracción orgánica de residuos municipales para la producción de compost con efecto biopesticida. Tesis presentada (en opción al grado de Doctor) Departamento de Ingeniería Química, Biológica y Ambiental. Universidad Autónoma de Barcelona. España.
22. Banfalvi G. 2020. Antifungal Activity of Gentamicin B1 Against Systemic Plant Mycoses. *Mol*; 25: 2401.
23. Barka EA, Vatsa P, Sánchez L, Vaillant N. 2015. Taxonomy, physiology and natural products of actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*; 80 (1):1-43.

24. Barragán B, Téllez Y, Laguna T. 2008. Utilización de residuos agroindustriales. *Rev Sist Ambient*; 2 (1): 44-50.
25. Bena P, Talaei R, Askary H. 2015. Comparison of some natural broth media for production and virulence of *Beauveria bassiana* blastospores against the browntail moth, *Euproctis chrysorrhoea* (Lep.: Lymantriidae). *J Crop Prot*; 4 (3): 313-320.
26. Bérday J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot*; 58:1-26.
27. Bermúdez RC, Donoso C, Martínez CE, Ramos EI, Morris HJ. 2002. Efecto de la luz en la concentración de micosteroides de *Pleurotus ostreatus* var. Florida. *Rev Cub Alimen Nutrición*; 16 (1): 13-18.
28. Bermúdez RC, García N, Murlot A. 2007. Fermentación sólida para la producción de *Pleurotus* sp. sobre mezclas de pulpa de café y viruta de cedro. *Tecnol Quím*; 27 (2): 55-62.
29. Bermúdez RC, García N, Serrano M, Rodríguez MI, Mustelier I. 2014. Conversión de residuales agroindustriales en productos de valor agregado por fermentación en estado sólido. *Tecnol Quím*; 34 (3): 217-225.
30. Bermúdez RC, García N. 2010. "Cultivo de setas comestibles (*Pleurotus*) en el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), Cuba". En: Martínez D, Curvetto N, Sobal M, Morales P, Mora VM. (Eds). Hacia un Desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en latinoamérica: Avances y perspectivas en el Siglo XXI. México: Red latinoamericana de hongos comestibles y medicinales: producción, desarrollo y consumo. Colegio de posgraduados, 489-512.
31. Bernal MR. 2016. Obtención de actinomicetos marinos con acción probiótica en ostiones y camarones. Tesis presentada (en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias). Universidad Central Martha Abreu de las Villas. Santa Clara. Cuba.
32. Biz A, Finkler AT, Pitol LO, Medina BS, Krieger N, Mitchell DA. 2016. Production of pectinases by solid-state fermentation of a mixture of citrus waste and sugarcane bagasse in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Bioch Eng J*; 111 (87): 54-62.
33. Bouarab-Chibane L, Forquet V, Lantéri P, Clément Y, Léonard L, Oulahal N, Degraeve P, Bordes C. 2019. Antibacterial properties of polyphenols: characterization and QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationship) Models. *Front Microbiol*; 10: 829.
34. Braham J, Bressani R. 1978. Coffee pulp. Composition, technology and utilization. Institute of Nutrition of Central America and Panama. *Inter Devlop Res Centre*; 108e: 11-16.
35. Brandao M. 2003. Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido. Tesis (en opción al grado de doctor en Ingeniería Química). Universidad Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

36. Bundale S, Singh J, Begde D, Nashikkar N, Upadhyay A. 2018. Culturable rare actinomycetes from Indian forest soils: Molecular and physicochemical screening for biosynthetic genes. *Iranian J Microbiol*; 10 (2): 132–142.
37. Buraimoh OM, Llori MO, Amund OO, Micher Jr, Grewal SK. 2015. Assessment of bacterial degradation of lignocellulosic residues (Sawdust) in a tropical estuarine microcosm using improvised floating raft equipment. *Int Biodeter Biodegr*, 104: 186-196.
38. Camacho MI, Wieme AD, Rodríguez S, Llauradó G, Peeters Ch, Lescaylle Y, Peña L, Vandamme PA. 2020. *Micromonospora fluminis* sp.nov., isolated from mountain river sediment. *Int J Syst Evol Microbiol*; 70 (12).
39. Camacho MI. 2022. Bioprospecting and taxonomy of isolates of the class Actinobacteria and the genus *Bacillus* of from aquatic ecosystems of Santiago de Cuba. Tesis presentada (en opción al título de Dr Ciencias Biológicas). Centro de Estudios Biotecnología Industrial (CEBI). Universidad de Oriente. Santiago de Cuba. Cuba.
40. Carro L, Nouioui I, Sangal V, Meier-Kolthoff JP, Trujillo ME. 2018. Genome-based classification of micromonosporae with a focus on their biotechnological and ecological potential. *Sci Rec*; 8: 525.
41. Carro, L. 2009. Avances en la sistemática del género *Micromonospora*: estudio de cepas aisladas de la rizosfera y nódulos de *Pisum sativum*. Tesis (en opción al grado de Doctor en Ciencias). Universidad de Salamanca. España.
42. Carvajal F. 1947. The production of spores in submerged cultures by some *Streptomyces*. *Mycologia*; 39 (4): 426-440.
43. Casas L, Coral G, Sandoval F. 2014. “Enzimas en la valorización de residuos agroindustriales,” Dirección General de Servicios de Cómputo Académico, UNAM.
44. Cascaret DA, Rodríguez J, Ricardo CA, Quesada O, Bahín L. 2020. Utilización de bagazo de caña de azúcar natural y tratado químicamente, como material adsorbente para Cu²⁺. *Rev. Cub Quím*; 32 (2): 331-344.
45. Chaudhary HS, Soni B, Shrivastava AR, Shrivastava S. 2013. Diversity and versatility of actinomycetes and its role in antibiotic production. *J Appl Pharm Sci*; 3: 583-594.
46. Chávez-Camarillo GM, López-Nuñez PV, Jiménez-Nava RA, Aranda-García E, Cristiani-Urbina E. 2022. Production of extracellular α -amylase by single-stage steady-state continuous cultures of *Candida wangnamkhiaoensis* in an airlift bioreactor. *PLOS ONE* 17(3): e0264734.
47. Colina J, Guerra M. 2009. Obtención y evaluación de arroz integral de cocción rápida. *Interciencia*; 34 (10): 736-741.

48. Cordovés-Herrera M, Sáenz T, Cabello A. 2013. Los derivados de la caña de azúcar en Cuba. CIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar; 47 (3): 31-37.
49. Cortez H. 2007. Producción de *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* en diferentes sustratos y patogenicidad. *Agric Téc Méx*; 33 (1):83-87.
50. Costa M, Torres M, Magariños H, Reyes A. 2010. Producción y purificación de enzimas hidrolíticas de *Aspergillus ficuum* en fermentación sólida sobre residuos agroindustriales. *Rev Colomb Biotecnol*; 12 (2): 163-175.
51. Cuadra T, Fernández FJ, Tomasini A, Barrios J. 2008. Influence of pH regulation and nutrient content on cephalosporin C production in solid-state fermentation by *Acremonium chrysogenum* C10. *Lett Appl Microbiol*; 46 (2): 216–220.
52. De la Piedra-Colinas M. 2019. Optimización de estrategias de fraccionamiento de material lignocelulósico con tecnologías de bajo consumo energético. Título (en opción al grado de ingeniería de tecnologías industriales). Escuela de Ingenierías Industriales. Universidad de Valladolid.
53. de Menezes AB, McDonald JE, Allison HE, McCarthy AJ. 2012. Importance of *Micromonospora* spp. as colonizers of cellulose in freshwater lakes as demonstrated by quantitative reverse transcriptase PCR of 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*; 78(9): 3495-3499.
54. Delgado J, Barbosa A. 2014. Transport phenomena and drying of solids and particulate materials. In *Advanced Structured Materials: Advanced Structured Materials* 48.
55. Demain AL. 2014. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *J Ind Microbiol Biotechnol*; 41: 185-201.
56. Díaz A. 2009. Reciclado del orujo de uva como medio sólido de fermentación para la producción de enzimas hidrolíticas de interés industrial. Tesis (en opción al grado de Doctor en Ciencias). Universidad de Cádiz. España.
57. Domanski C, Giorda LM, Feresin O. 1997. Composición y calidad del grano de sorgo. Sitio Argentino de Producción Animal. Cuaderno de Actualización; 7: 47-50.
58. Dong X, Dong M, Lu Y, Turley A, Jin T, Wu C. 2011. Antimicrobial and antioxidant activities of lignin from residue of corn stover to ethanol production. *Indust Crops Prods*; 34 (3): 1629-1634.
59. Duhan JS, Gahlawat SK. 2014. Production of ethanol from tuberous plant (sweet potato) using *Saccharomyces cerevisiae* MTCC-170. *Afr J Biototechnol*; 13 (28): 2874-2883.

60. Ellaiah P, Srinivasulu B, Adinarayana K. 2004. Optimization studies on neomycin production by a mutant strain of *Streptomyces marinensis* in solid state fermentation. *Process Biochem*; 39 (5): 529–534.
61. El-Naggar MY, El-Assar SA, Abdul-Gawad SM. 2009. Solid-state fermentation for the production of meroparamycin by *Streptomyces* sp. strain MAR01. *J Microbiol Biotechnol*; 19 (5): 468–473.
62. Feng S, Luo Z, Zhang Y, Zhong Z, Lu B. 2014. Phytochemical contents and antioxidant capacities of different parts of two sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars. *Food Chem*; 151: 452–458.
63. Fiedler HP, Bruntner C, Bull AT, Wards MG, Potterat O, Puder C, Mihm G. 2005. Marine actinomycetes as source of novel secondary metabolites. *Antonie Van Leeuwenhoek*; 87: 37-42.
64. García N. 2008. Producción de setas comestibles y enzimas lacasas por fermentación en estado sólido de la pulpa de café con *Pleurotus* spp. Tesis (en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Técnicas). Universidad de Oriente. Santiago de Cuba. Cuba.
65. Garro MS, Rivas FP, Garro OA. 2021. Solid state fermentation in food processing: advances in reactor design and novel applications. *Innov Food Process Technol*; 3 (21): 165-182.
66. Ge YF, Xiao JL, Wang WH, Zhao ST, Shen M, Liu D, Kang Z, Cao L. 2020. Effect of natural fermentation of sorghum on resistant starch molecular structure and fermentation. *J Chem*; 2020 (6): 1-11.
67. Genilloud O. 2012. Genus *Micromonospora*: In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 5. Eds, Goodfellow P, Kämpfer HJ, Busse ME. (NewYork, NY:Springer),1039–105735.
68. Genilloud O. 2017. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. Royal Society of Chemisty. *Nat Prod Rep*; 34 (10): 1203-1232.
69. Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Suzuki KI, Ludwig W, Whitman WB . 2012. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Actinobacteria. Part A and Part B 5 (2). Springer.Verlag, New York, NY: 1-2031.
70. Grande CD. 2016. Valoración biotecnológica de residuos agrícolas y agroindustriales. *Rev Colomb Biotecnol*; 21 (1): 85-103.
71. Harahap BM. 2020. Degradation techniques of hemicellulose fraction from biomass feedstock for optimum xylose production. *J Keteknikan Pertanian Tropis dan Biosistem*; 8 (2): 107-124.
72. Haug RT. 1993. The practical handbook of compost engineering. Lewis Publishers, Boca Ratón.
73. Hayakawa M. 2008. Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes in soil. *Actinomycetologica*; 22: 12-19.

74. Hernández D. 2017. Evaluación de la actividad antimicrobiana y de la capacidad de producción de enzimas por la cepa *Micromonospora* sp. A38/R-67670. Tesis presentada (en opción al grado de Licenciada en Biología). Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba. Cuba.
75. Herrero-Delicado R. 2015. Estudio nutricional de la composición mineral de los arroces de Calasparra. Tesis presentada (en opción al título de Doctor). Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. España.
76. Hifnawy MS, Fouda MM, Sayed AM, Mohammad R. 2020. The genus *Micromonospora* as a model microorganism for bioactive natural product discovery. *RSC Adv*; 10 (35): 20939-20959.
77. Hirsch AM, Valdés M. 2010. *Micromonospora*: an important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biol Biochem*; 42 (4): 536-542.
78. Hodge J, Hofreiter B. 1962. Determination of reducing sugars and carbohydrates. I analysis and preparation of sugars. In: Whistler R, Wolfrom M. (eds). *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Vol. I, Academic. New York, 380.
79. Idris AS, Pandey A, Rao S, Sukumaran RK. 2017. Cellulase production through solid state tray fermentation, and its use for bioethanol from sorghum stover. *Biores Technol*; 242: 265-271.
80. Igarashi Y, Trujillo ME, Molina ME, Yanase S, Miyanaga S, Obata T, Sakurai H, Saiki I, Fujita T, Furumai T. 2007. Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov. *Bioorganic Med Chem Lett*; 17: 3702-3705.
81. Irimia-Hernández MI, Rodríguez AL, Castellanos L. 2016. Niveles de humedad, cepa y cantidad de sustrato de arroz entero para la reproducción de *Trichoderma* spp. *Revista Científica Agroecosistemas*; 4 (1): 38-45.
82. Ismet A, Vikineswar S, Paramaswari S. 2004. Production and chemical characterization of antifungal metabolites from *Micromonospora* sp. M39 Isolated from mangrove rhizosphere soil. *World J Microbiol Biotechnol*; 20: 523-528.
83. Ixcotoyac-Cabrera ER. 2013. Efecto de la temperatura y concentración de ácido sulfúrico de pretratamiento de aserrín de *Pinus* spp. en la producción de azúcares y 5-hidroximetilfurfural. Tesis presentada (en opción al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria). Escuela Agrícola Panamericana. Zamoranom. Honduras.
84. Jaronski ST, Mascarin GM. 2017. Mass production of fungal entomopathogens. In Lacey LA. (Ed.), *Microbial control of insect and mite pests: From theory to practice*. Academic Press; 141-155.

85. Jørgensen H, Eriksson T, Börjesson J, Olsson L. 2003. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. *Enzyme Microb Technol*; 32 (7): 851-861.
86. Kanna M, Solanki R, Lai R. 2011. Selective selection of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compounds. *Int J Adv Biotech Res*; 2 (3): 357–375.
87. Kassa A, Brownbridge M, Parker BL, Skinner M, Gouli V, Gouli S, Gou M, Lee F, Hata T. 2008. Whey mycological research for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Mycol Res*; 112 (5): 583-591.
88. Kim BS, Moon SS, Hwang BK. 1999. Isolation, antifungal activity, and structure elucidation of the glutarimide antibiotic, streptimidone, produced by *Micromonospora coerulea*. *J Agric Food Chem*; 47 (8): 3372-80.
89. Kim SK. 2013. Marine microbiology: Bioactive compounds and biotechnological applications. *Mar Ecol*; 37 (6): 580.
90. Kumar M, Oyedun AO, Kumar A. 2017. A review on the current status of various hydrothermal technologies on biomass feedstock. *Renew Sus Energ Rev*; 81 (2): 1742-1770.
91. Kumar M, Mishra A, Singh SS, Srivastava S, Thakur IS. 2018. Expression and characterization of novel laccase gene from *Pandoraea* sp. ISTKB and its application. *Int J Biol Macromol*; 115: 308–316.
92. Lazzarini A, Cavaletti L, Toppo G, Marinelli F. 2000. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek*; 78: 399-405.
93. Lee SJ, Kim HW, Choi ECh, Kim BK. 1987. Studies on screening and isolation of esterase inhibitors from soil microorganisms (I). Identification of strain DMC-498 producing esterase inhibitors. *Arch Pharm Res*; 10 (2): 103-109.
94. Lennox C, Ariba N, Akubuenyi FC. 2010. Comparative degradation of sawdust by microorganisms isolated from it. *Afr J Microbiol Res*; 4 (13): 1352-1355.
95. Lizardi-Jiménez MA, Hernández-Martínez R. 2017. Solid state fermentation: Diversity of applications to valorize waste and biomass. *Biotech*; 7 (1): 1-9.
96. Llanes-Díaz A, Fernández Y, Rodríguez M, Torí AF, Núñez E. 2015. Uso del bagazo de caña de azúcar en sustitución del afrecho de trigo en la dieta de *Galleria mellonella* (L.), hospedero artificial para la reproducción de *Tetrastichus howardi* (Olliff). *Rev Protección Veg*; 30 (1): 105.
97. López N, Volke T, Gaime I, Saucedo G, Favela E. 2018. Effect of stirring on growth and cellulolytic enzymes production by *Trichoderma harzianum* in a novel bench scale solid state fermentation bioreactor. *Bioresour Technol*; 265: 291-298.

98. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Medición de proteínas con el reactivo de fenol de Folin. *Rev Quím Biol*; 193 (1): 265-75.
99. Machado De Castro A, Freire D, S AF. 2018. Solid state fermentation for the production of proteases and amylases and their application in nutrient medium production. *Current Develop Biotechnol Bioeng*; 185-210.
100. Maiti S, Sarma SJ, Brar SK, Le Bihan Y, Drogui P, Buelna G, Verma M. 2016. Agro-industrial wastes as feedstock for sustainable bio-production of butanol by *Clostridium beijerinckii*. *Food Bioprod Process*; 98: 217-226.
101. Manan MA, Webb C. 2017. Design aspects of solid state fermentation as applied to microbial bioprocessing. *J Appl Biotechnol Bioeng*; 4 (1): 511-532.
102. Martínez ZE, Moreno A. 2007. Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. *Rev Biotecnol*; 11 (3): 37-50.
103. Martínez CM, García Y. 2016. Utilización de pretratamientos básicos y específicos para la producción de biogás. Revisión y análisis. *Rev Cie Téc Agr*, 25 (3): 81- 92.
104. Martínez O, Sánchez A, Font X, Barrena R. 2017. Valorization of sugarcane bagasse and sugar beet molasses using *Kluyveromyces marxianus* for producing value-added aroma compounds via solid state fermentation. *J Clean Prod*; 158: 8–17.
105. Miller G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*; 31: 426-428.
106. Mitchell DA, Berovic M, Krieger N. 2002. Overview of solid state bioprocessing. *Biotechnol Annual Rev*; 8: 183.
107. Mitchell DA, Berovic M, Krieger N. 2006. Solid state fermentation bioreactors. *Springer*; 19: 1-12.
108. Mohammad N, Alam, MZ, Kabbashi N, Ahsan A. 2012. Effective composting of oil palm industrial waste by filamentous fungi: A review. *Resour Conserv Recycl*; 58: 69-78.
109. Monroy AC. 2016. Proceso de ensilaje a partir de bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). Tesis presentada (en opción al título de Magíster en Ingeniería con énfasis en Química). Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia.
110. Morris HJ, Llauradó G, Lebeque Y, Fontaine R, Bermúdez RC, García N, Gutiérrez A. 2012. "Otros usos de los macromicetos" En: Sánchez JE, Mata G (Eds). Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica: Investigación y desarrollo en un entorno multicultural. México: INECOL-ECOSUR, 309-318.

111. Moyano M. 2014. Fermentación en Estado Sólido (FES) de la papa (*Solanum tuberosum*), como alternativa para la alimentación animal. Tesis presentada (en opción al título de Especialidad). Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Colombia.
112. Mushimiyimana I, Tallapragada P. 2016. Bioethanol production from agro wastes by acid hydrolysis and fermentation process. *J Sci Ind Res*; 75 (6): 383–388.
113. Mussatto SI, Ballesteros LF, Martins S, Teixeira JA. 2012. Use of agro-industrial wastes in solid state fermentation processes. In Kuan-Yeow S, Guo X. (Ed.), *Industrial Waste. In Tech waste/use of agroindustrial wastes in solid state fermentation-processes*, 121-140.
114. Nagavalli M, Ponamgi SPD, Girijashankar V, Venkateswar L. 2015. Solid state fermentation and production of rifamycin SV using *Amycolatopsis mediterranei*. *Lett Appl Microbiol*; 60 (1): 44-51.
115. Nava-Berumen CA, Rosales R, Jiménez R, Carrete FO, Pablo Alfredo Domínguez, Murillo M. 2017. Rendimiento y valor nutricional de tres variedades de sorgo dulce cultivadas en cuatro ambientes de Durango. *Rev Mex Cienc Pecu*; 8(2): 147-155.
116. Nielsen S. 2003. *Food Analysis Laboratory Manual*. (Suzanne, Ed.) New York, Estados Unidos de América: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
117. Nofiani R, Ardiningsih P. 2022. Antibacterial activities of *Micromonospora* sp. 2310 isolated from marine sediment, Baru Island, West Kalimantan. *J Kim Sains Apl*; 25 (1): 20-26.
118. Noriega-Salazar A, Silva R, García M. 2009. Composición química de la pulpa de café a diferentes tiempos de ensilaje para su uso potencial en la alimentación animal. *Zootec Trop*; 27 (2): 135-141.
119. Nout MJR. 2014. *Food Technologies: Fermentation*. In: Holt S, Phadnis R (Eds). *Encyclopedia of Food Safety. 3: Foods, Materials, Technologies and Risks*; 168-177.
120. Ochi K, Inatsu Y. 1995. Comparative study of GTP content during growth of *Streptomyces griseus* and *Streptomyces setae* in relation to sporulation. *Actinomycetol*; 9 (2): 184-187.
121. Oktaviani L, Astuti DI, Rosmiati M, Abduh MY. 2020. Fermentation of coffee pulp using indigenous lactic acid bacteria with simultaneous aeration to produce cascara with a high antioxidant activity. *Heliyon*; 6 (7), e04462.
122. Ørskov J. 1923. Investigation into the morphology of the ray fungi. Levin and Munksgaard, Copenhagen. *Arch Intern Med Chic*; 38 (3): 412.
123. Palla MS, Guntukua GS, Kumar MK, Pingalia S, Kumar P. 2018. Isolation and molecular characterization of antifungal metabolite producing actinomycete from mangrove soil. *J Basic Appl Sci* ; 7 (2): 250-256.

124. Pandey A, Soccol CR, Pooman-Nigan P Soccol VT. 2000. Biotechnological potential of agroindustrial residues. I: Sugarcane bagasse. *Bioresour Technol*; 7 (1): 69-80.
125. Pandey A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochem Eng J*; 13(2-3): 81-84.
126. Pandey A, Soccol CR, Larroche C. 2008. Current developments in solid state fermentation. *Springer Science Business Media*.
127. Pandey A, Soccol CR, Larroche C. 2013. Current developments in solid state fermentation. *Biochem Eng J*; 81: 146-161.
128. Pandey A, Negi S, Soccol CR. 2017. Current developments in biotechnology and bioengineering. *Adv Bioprocess Eng*; 823-854.
129. Pinciroli M. 2010. Proteínas de arroz. Propiedades estructurales y funcionales. Tesis presentada (en opción al título de Máster en Tecnología e Higiene de los Alimentos). Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires. Argentina.
130. Prada L. 2013. "Identificación de ácidos orgánicos causantes de la solubilización de fósforo inorgánico sintetizados por actinomicetos aislados de suelos en los andes orientales colombianos". Tesis (para optar al grado de Magister). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Bogotá. Colombia.
131. Procópio RE, Martins MK, Azevedo JL, Araújo JM. 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces* sp. *J Infect Dis*; 16 (5): 466- 471.
132. Putri SN, Utari DP, Martati E, Putri WD. 2021. Study of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) grains fermentation with *Lactobacillus plantarum* ATCC 14977 on tannin content. IOP Conf. Ser. *Earth Environ Sci*; 924 (1): 012037.
133. Raimbult M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electron J Biotechnol*; 1 (3): 174-189.
134. Ramírez L. 2003. Fermentaciones aplicadas a la industria de alimentos. Universidad del Valle, contribución a la II muestra agroindustrial. Facultad de Ciencias Agropecuarias (Cuca); 1 (1):45-49.
135. Reddy DSR, Latha DP, Latha KPJ. 2011. Production of lovastatin by solid state fermentation by *Penicillium funiculosum* NCIM 1174. *Drug Invent Today*; 3 (6): 75–77.
136. Reddy GB, Vijayavani S, Swarnabala G, Reddy KV. 2016. Evaluation of locally available substrates for conidial biomass production of *Beauveria bassiana* MCC0044 employing solid substrate fermentation. *J Agric Vet Sci Ver*; 9 (7): 2319-2372.
137. Reinoso B. 2015. Diseño de un fermentador de bandeja a escala piloto para la producción de enzimas con actividad ligninolítica y celulolítica a partir del hongo *Phanerochaete chrysosporium* mediante fermentación en medio sólido con aserrín de eucalipto. Tesis (en opción al título de

- Ingeniero Químico). Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria. Escuela Politécnica Nacional. Quito. Ecuador.
138. Reyes G, Franco, M. 2016. Producción biotecnológica de sabores, pigmentos y aromas a partir de hongos miceliales y levaduras. *Univ Sci*; 11(2): 23-30.
 139. Ribeiro MA, Oikawa H, Mori MN, Napolitano CM, Duarte CL. 2013. Degradation mechanism of polysaccharides on irradiated sugarcane bagasse. *Radiat Phys Chem*; 84:115–118.
 140. Rodríguez J, Socool C, Pandey A, Rodríguez DE. 2008. Factors affecting solid state fermentation. En Pandey A, Socool CR, Larroche C. (Eds.). *Current developments in solid state fermentation* (1ra Ed., 26-47).
 141. Rodríguez S. 2008. "Decolourisation of mushroom farm wastewaters by *Pleurotus ostreatus*". *Biodegradation*; 19: 519-526.
 142. Rosero-Delgado EA, Duster-Mendoza JC. 2017. Cinética de fermentación en estado sólido de cascarilla de arroz y bagazo de caña con *Auricularia auricula*. ICIDCA. *Sobre los derivados de la caña de azúcar*; 51 (1): 28-38.
 143. Saini A, Aggarwal NK, Sharma A, Yadav A. 2015. Actinomycetes: A Source of Lignocellulolytic Enzymes. *Enzyme Res*; 2015: 27938
 144. Sapkota A, Thapa A, Budhathoki A, Sainju M, Aryal S, Shrestha P. 2020. Isolation, characterization, and screening of antimicrobial-producing actinomycetes from soil samples. *Int J Microbial*; 2020; 2020: 2716584.
 145. Saucedo OM. 2008. Empleo del sorgo en la alimentación animal y humana. Taller nacional sobre empleo del sorgo. Universidad Central de Las Villas. Villa Clara. Cuba.
 146. Saval S. 2012. Aprovechamiento de residuos agroindustriales: Pasado, presente y futuro. *Biotechnol*; 16 (2): 14-46.
 147. Serrat-Díaz M, De la Fé-Isaac AD, De la Fé-Isaac JA, Montero-Cabrales C. 2018. Extracción y caracterización de pectina de pulpa de café de la variedad Robusta. *Rev Cub Quím*; 30 (3): 522-538.
 148. Serret-Guasch N, Giralt-Ortega G, Quintero-Ríos Mairet. 2016. Caracterización de aserrín de diferentes maderas. *Tecnol Quím*; 36 (3): 395-405.
 149. Shide EG, Wuyep PA, Nok AJ. 2004. Studies on the degradation of wood sawdust by *Lentinus squarrosulus* (Mont.) Singer. *Afr J Biotechnol*; 3 (8): 395-398.
 150. Shirliing EB, Gottlieb D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces*. *Int J Syst Bacteriol*; 16 (3): 313-340.
 151. Singh LS, Sharma H, Talukdar N.C. 2014. Production of potent antimicrobial agent by actinomycete, *Streptomyces sannanensis* strain SU118 isolated from phoomdi in Loktak Lake of Manipur. India. *BMC Microbiol*; 14 (278): 1-13.

152. Singhanía RR, Sukumaran RK, Patel AK, Larroche C, Pandey A. 2010. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme Microb Technol*; 46 (7): 541-549.
153. Soccol CR, Vandenberghe, LP. 2003. Overview of applied solid state fermentation in Brazil. *Biochem Eng J*; 13 (2–3): 205-218.
154. Soler A. 2012. Biodiversidad de actinomicetos aislados de plantas depuradoras de aguas residuales. Estudio de la capacidad de biodegradación de compuestos tóxicos. Tesis presentada (en opción al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia). España.
155. Subramaniyam R, Vimala R. 2012. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *Int J Secur Netw*; 3 (3): 480-486.
156. Sutto-Ortiz P, Camacho MA, Kirchmayr MR, El Alaoui M, Camacho RM, Mateos JC, Noiriél A, Carrière F, Abousalham A, Rodríguez JA. 2017. Screening of phospholipase A activity and its production by new actinomycete strains cultivated by solid-state fermentation. *Peer J*; 11 (5): e3524.
157. Sylvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG, Zuberer DA. 2005. Principles and applications of soil microbiology. *J Environ Qual*; 34 (2): 731-732.
158. Tadesse SA, Bultosa G, Abera S. |2019. Functional and physical properties of sorghum-based extruded product supplemented with soy meal flour. *Cogent Food Agric*; 5 (1): 1707608.
159. Tan F, Cheng J, Zhang Y, Jiang X, Liu Y. 2022. Genomics analysis and degradation characteristics of lignin by *Streptomyces thermocarboxydus* strain DF3-3. *Biotechnol Biofuels Bioprod*; 15 (1): 78.
160. Thawai C, Kanchanasin P, Ohkuma M, Kudo T, Tanasupawat S. 2018. Identification and antimicrobial activity of *Micromonospora* strains from Thai peat swamp forest soils. *J Appl Pharm Sci*; 8 (4): 119-125.
161. Thomas L, Larroche C, Pandey A. 2013. Current developments in solid-state fermentation. *Biochem Eng J*; 13 (81): 146-161.
162. Torres C, Ramírez N, Ascacio J, Serna L. 2019. Solid-state fermentation with *Aspergillus niger* to enhance the phenolic contents and antioxidative activity of Mexican mango seed: A promising source of natural antioxidants. *Food Sci Technol*; 112 (2): 108236.
163. Tovar T. 2008. Caracterización morfológica y térmica del almidón de maíz (*Zea mays* L) obtenido por diferentes métodos de aislamiento. Tesis presentada (en opción al título de Licenciado en Química en alimentos). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Hidalgo. México.

164. Trujillo ME. 2008. Actinobacteria. Encyclopedia of Life Sciences (ELS). Wiley J & Sons. Chichester.
165. Tuquerres H, Cerda G, Tenemasa V, Diéguez K, Carrera K, Pérez A. 2020. Diseño del proceso para la obtención de ácido cítrico a partir del bagazo de caña disponible en Pastaza, Ecuador. *Centro Azúcar*; 47 (2): 86–96.
166. Uddin M, Mahmud N, Anwar N, Manchur MA. 2013. Bioactive metabolite production by *Streptomyces albolongus* in favourable environment. *Journal Microbiol Infect Dis* ; 3 (2): 75-82
167. Uzcátegui MC, Serrano JA, Panizo MM. 2013. Condiciones de cultivo que fomentan la producción de sustancias antimicrobianas en actinomicetos patógenos y del suelo. *Rev Soc Ven Microbiol*; 33 (2): 134-139.
168. Vastrad BM, Neelagund SE. 2012. Optimization of process parameters for rifamycin by production under solid state fermentation from *Amycolatopsis mediterranean* MTCC14. *Int J Curr Pharm Res*; 4 (2): 101-108.
169. Vastrad BM, Neelagund SE, Liger SR, Godbole AM, Kulkarni V. 2014. Improved rifamycin B production by *Nocardia mediterranei* MTCC 14 under solid-state fermentation through process optimization. *Biochem Res Int*; 14 (1): 13.
170. Vastrad BM, Neelagund SE. 2014. Optimization of medium composition for the production of neomycin by *Streptomyces fradiae* NCIM2418 in solid state fermentation. *Biotechnol Res Int*; 2014: 11.
171. Vinícius G, Karp SG, Medeiros AB, Ferreira ES, Bissoqui L, Soccol CR. 2018. Solid state fermentation for the production of mushrooms. *Current Developments Biotechnol Bioeng*; 285-318.
172. Wang S, Dai G, Yang H, Luo Z. 2017. Lignocellulosic biomass pyrolysis mechanism: A state-of-the-art review. *Prog Energy Combust Sci*; 62: 33–86.
173. Weng C, Peng X, Han Y. 2021. Depolymerization and conversion of lignin to value-added bioproducts by microbial and enzymatic catalysis. *Biotechnol Biofuels*; 14 (1): 1- 22.
174. Yang SS, Ling MY. 1989. Tetracycline production with sweet potato residue by solid state fermentation. *Biotechnol Bioeng*; 33 (8): 1021-1028.
175. Yasmeen S, Muvva V, Munaganti RK. 2016. Taxonomic characterization of rare actinobacteria isolated from mangrove ecosystem of Gilakaladindi, Krishna district, Andhra Pradesh. *Int J Curr Res*; 8 (5): 31060–31066.
176. Yugsi- Lita JY. 2017. Estudio comparativo de los Métodos Fenol- Ácido Sulfúrico y Antrona para determinar la pureza de dos almidones; usando muestras de almidón de maíz (*Zea mays*) y papa (*Solanum tuberosum*). Tesis presentada (en opción al título de Ingeniería en Alimentos). Universidad San Francisco de Quito. Ecuador.

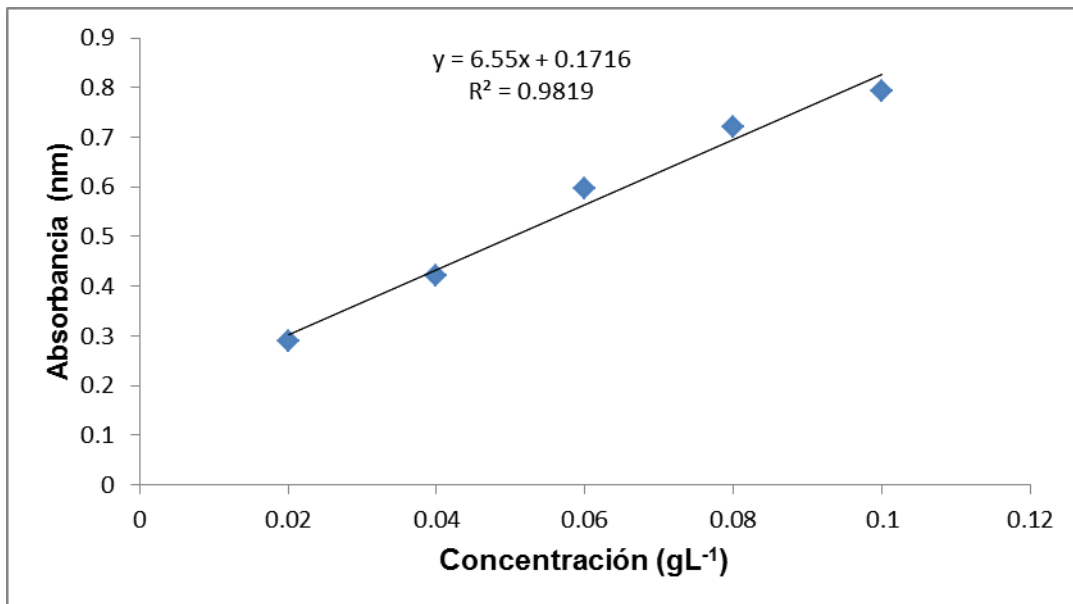
- 177.** Zhao S, Liu C, Zheng W, Ma Z, Cao T, Zhao J, Yan K, Xiang W, Wang X. 2017. *Micromonospora parathelypteridis* sp. nov., an endophytic actinomycete with antifungal activity isolated from the root of *Parathelypteris beddomei* (Bak.) Ching. *Int J Syst Evol Microbiol*; 67 (2): 268-274.

Anexo 1. Enzimas producidas por diferentes microorganismos mediante FES (Tomado de Lizardi-Jiménez y Hernández-Martínez, 2017).

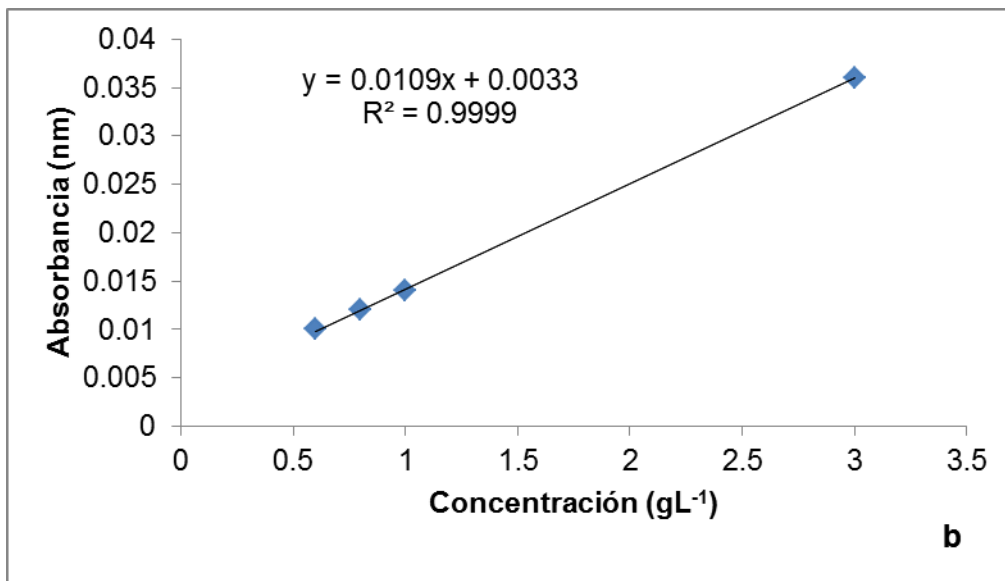
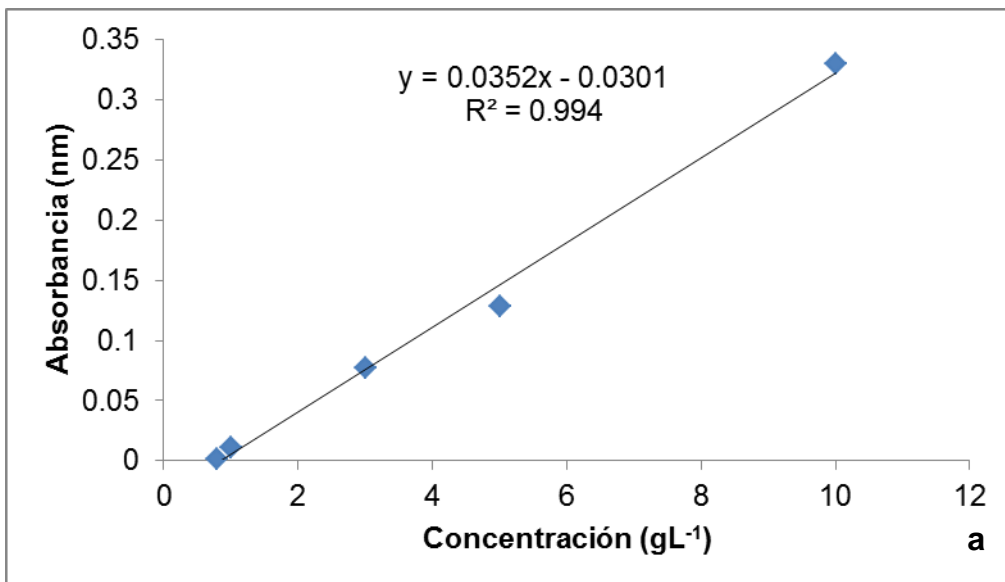
Enzimas	Sustratos	Microorganismos	Referencias
Poligalacturonasa	Bagazo de manzana y salvado de trigo	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium</i> sp. EGC5	Abbasi y col., (2011)
α -Amilasa	Cáscara de arroz, cáscara de plátano, mijo, salvado de lentejas, cáscara de sandía, salvado de trigo y torta de aceite de maíz	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	Özdemir y col., (2012)
Lipasa	Semilla de girasol y bagazo de caña de azúcar	<i>Burkholderia</i>	Liu y col., (2013)
Proteasa	Salvado de trigo y harina de soja	<i>Bacillus subtilis</i>	Imtiaz y Mukhtar, (2013)
Celulosa y hemicelulosa	Paja de maíz, cascarilla de arroz, pasto en polvo, barbojo de caña de azúcar y bagazo de caña de azúcar	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Saratale y col., (2014)
Fitasa	Salvado de trigo	<i>Escherichia coli</i>	McKinney y col., (2015)
Lacasa	Aserrín de álamo	<i>Ganoderma lucidum</i> <i>Trametes versicolor</i>	Kuhar y col., (2015)

Anexo 2. Solventes empleados para la extracción de los metabolitos bioactivos producidos por *M. fluminis* A38^T.

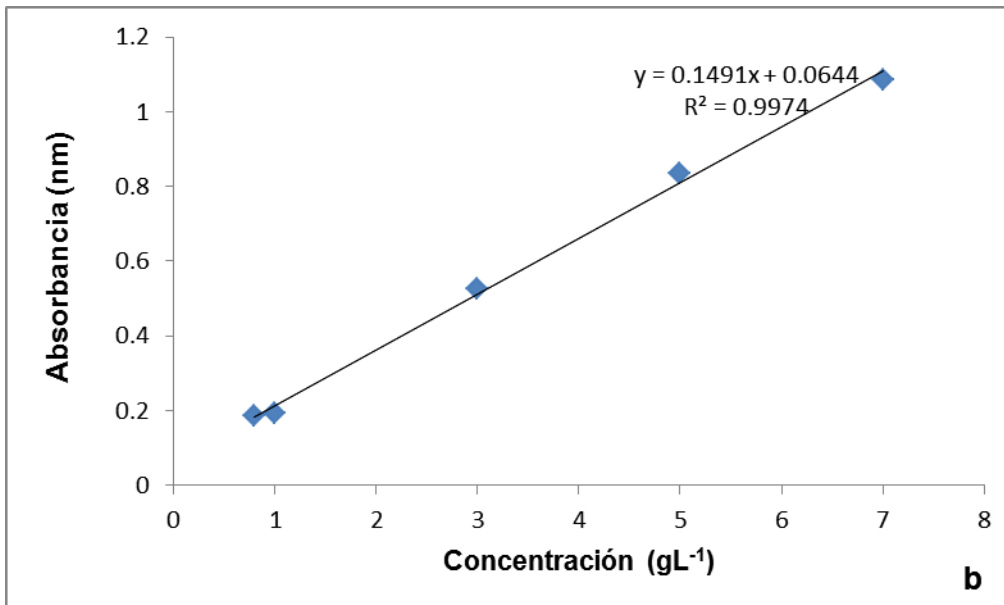
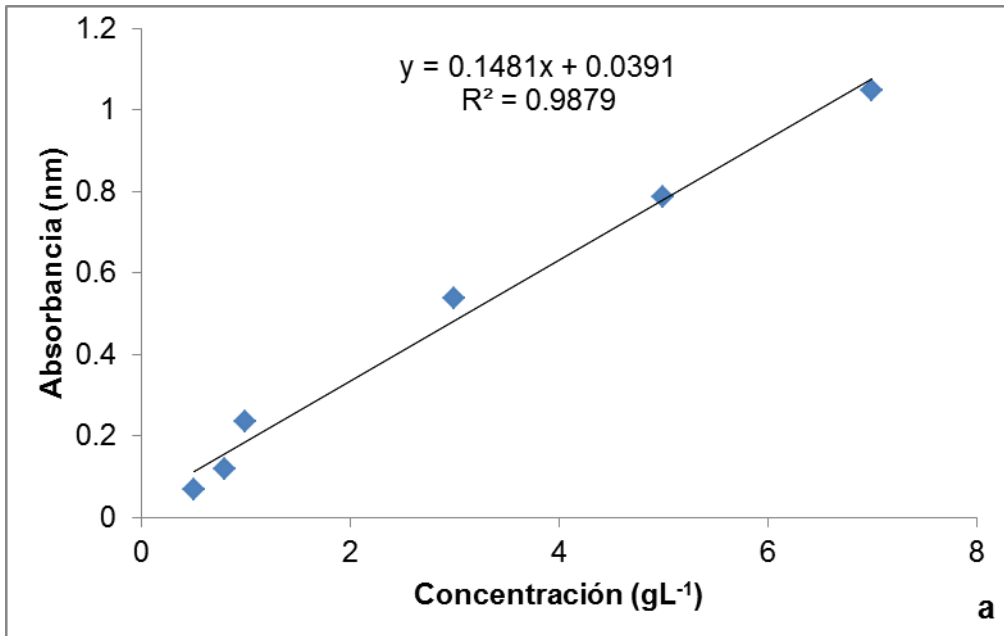
Solventes	Densidad g /cm ³	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Polaridad relativa
Benceno	0.8786	5.45	80.05	3,0
Diclorometano	1.33 a 20°C	-95	40	3,4
Metanol	0.7918	-97.16	64.7	5,1



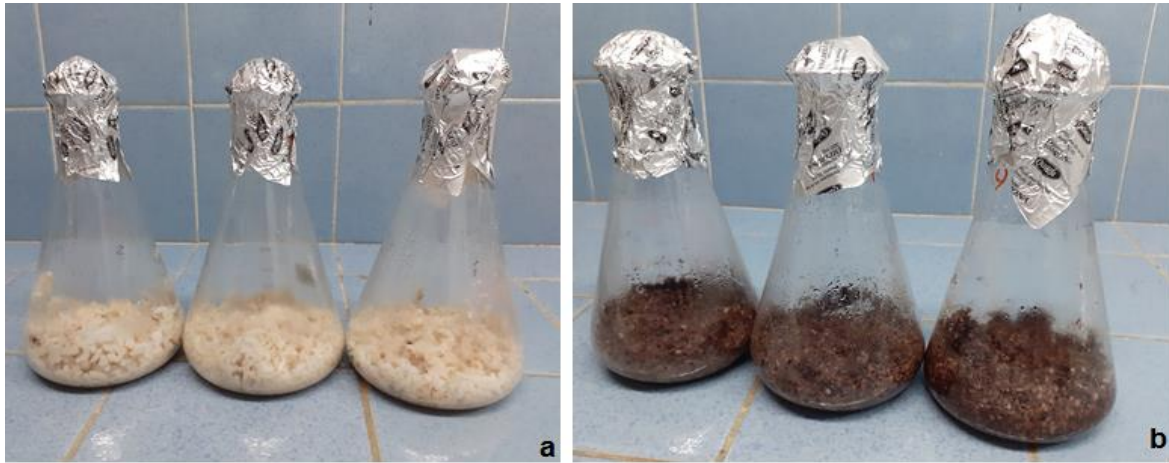
Anexo 3. Curva patrón de Glucosa (20 gL⁻¹) para la determinación de azúcares totales.



Anexo 4. Curva patrón de Glucosa (20 gL^{-1}) para la determinación de azúcares reductores. (a) Sin calor y (b) con calor.



Anexo 5. Curva patrón de Albúmina de Suero Bovino (20 gL⁻¹) para la determinación de proteínas. (a) Sin calor y (b) con calor.



Anexo 6. Sustratos amiláceos: arroz (a) y sorgo (b) luego de cocinados en plancha de calentamiento (~ 100 °C).

Anexo 3.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS