



Universidad Católica de Santa María

**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotecnológicas**
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

**Producción de exopolisacáridos por *Fusarium oxysporum* aislado de plátano
(*Musa paradisiaca*)**

Tesis presentada por:

Abarca Apaza, Nicole Katty

ORCID: 0009-0002-9071-253X

Valverde Caballero, Miluska Katherine

ORCID: 0009-0003-0209-766X

para optar el Título Profesional de Ingeniero Biotecnólogo

Asesor:

Dr. Medina Cabrera, Edilberto Vicente

ORCID: 0000-0003-3385-1525

Arequipa – Perú

2026

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 16 de Junio del 2026

Dictamen: 018895-C-EPIB-2026

Visto el borrador del expediente 018895, presentado por:

2017220022 - ABARCA APAZA NICOLE KATTY

2017702782 - VALVERDE CABALLERO MILUSKA KATHERINE

Titulado:

**PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS POR FUSARIUM OXYSPORUM AISLADO DE PLÁTANO
(MUSA PARADISIACA)**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

INGENIERO BIOTECNOLOGO

**44810251 - TERAN HILARES RULY
DICTAMINADOR**



**45945764 - YUGRA CONDORI MONICA MEYLIN
DICTAMINADOR**



**71093620 - JOHNSON CORRALES FABRIZIO
DICTAMINADOR**



Producción de exopolisacáridos por *Fusarium oxysporum* aislado de plátano (*Musa paradisiaca*)

INFORME DE ORIGINALIDAD

10%

INDICE DE SIMILITUD

9%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

4%

TRABAJOS DEL ESTUD

FUENTES PRIMARIAS

1 Submitted to Universidad Católica de Santa María

Trabajo del estudiante

2 repositorio.ucsm.edu.pe

Fuente de Internet

3 hdl.handle.net

Fuente de Internet

4 bdigital.unal.edu.co

Fuente de Internet

5 eprints.uanl.mx

Fuente de Internet

6 Submitted to ITESM: Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey

Trabajo del estudiante

7 repositorio.xoc.uam.mx

Fuente de Internet

8 Submitted to ESIC Business & Marketing School

Trabajo del estudiante

9 repositorio.unal.edu.co

Fuente de Internet

10 Submitted to Universidad Nacional del Santa

Trabajo del estudiante

11 docslib.org

Fuente de Internet

12 Submitted to Universidad Técnica De Ambato- Dirección de Investigación y Desarrollo , DIDE

Trabajo del estudiante

13 10316b55-bcaf-49d1-aa23-a9959305f101.filesusr.com

Fuente de Internet

14 bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080

Fuente de Internet

oldri.ues.edu.sv

DEDICATORIA

Con gratitud y fe, dedico este trabajo a Dios, mi guía y fortaleza en cada paso del camino.

“Todo lo puedo en Aquel que me fortalece” (Filipenses 4:13).

*A mis queridos padres, Germán y Daniela, por su amor, esfuerzo y apoyo incondicional,
siendo siempre mi mayor ejemplo y motivación.*

A mis hermanas, por acompañarme y brindarme su cariño en cada etapa.

Este logro también les pertenece.

Miluska Valverde Caballero

*Con gratitud en el corazón, dedico este trabajo a Dios, quien en silencio sostuvo mis pasos y me
permitió llegar hasta este momento.*

*A mis padres, José y Nora, por su amor constante, su esfuerzo y por enseñarme a no
rendirme.*

A mi hermano, mis tíos y familiares, por su apoyo, cariño y motivación.

Este logro también es suyo

“Sé fuerte y valiente, porque tu Dios te acompañará a donde quieras que vaya” (Josué 1:9)

Nicole Abarca Apaza

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos en primer lugar a Dios, por haber sido nuestra guía constante en cada etapa de este camino, por darnos la fortaleza en los momentos difíciles, la sabiduría para tomar decisiones y la perseverancia para no rendirnos. Gracias por permitirnos alcanzar este logro tan importante en nuestras vidas y acercarnos a nuestro anhelado título como Ingenieras biotecnólogas.

Expresamos nuestro más profundo y sincero agradecimiento a nuestro asesor, el Dr. Medina Cabrera Edilberto Vicente, por su paciencia, dedicación y compromiso a lo largo de este proceso. Su apoyo constante, sus enseñanzas y su confianza en nosotras han sido fundamentales no solo para el desarrollo de esta tesis, sino también para nuestro crecimiento académico y profesional.

De manera muy especial, agradecemos al Dr. Terán Hilaes Ruly por su generosidad al brindarnos las facilidades para el uso de los laboratorios, así como por sus valiosos consejos y orientación. Su disposición y apoyo fueron clave para hacer posible la parte experimental de esta investigación.

A nuestros padres, les dedicamos un agradecimiento lleno de amor, por ser nuestro pilar más importante. Gracias por su esfuerzo, sacrificio, comprensión y apoyo incondicional en cada paso que hemos dado. Este logro también es suyo.

A nuestros familiares, hermanos en fe y amigos, por acompañarnos en este proceso, por sus palabras de aliento, su paciencia y por estar presentes en los momentos de mayor desafío, brindándonos ánimo para seguir adelante.

Finalmente, agradecemos a todas las personas que, de alguna u otra manera, formaron parte de este proceso y contribuyeron a que hoy podamos alcanzar esta meta.

Con gratitud y emoción, culminamos esta etapa que marcará el inicio de nuevos desafíos.

¡Muchas gracias!

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo aislar, caracterizar y optimizar las condiciones de cultivo de una cepa nativa de *Fusarium oxysporum* aislada de *Musa paradisiaca*, con el propósito de incrementar la producción de exopolisacáridos. Para su aislamiento, se tomó un tejido vegetal del pseudotallo de la planta podrida y se identificaron sus características morfológicas, las cuales fueron confirmadas mediante caracterización molecular mediante secuenciación ITS, con similitud con la especie *Fusarium oxysporum* (MK571185.1). Se empleó un diseño Box-Behnken basado en el método de superficie de respuesta (RSM), evaluando el efecto de las variables independientes de la concentración de glucosa (g/L), la concentración de levadura (g/L) y el pH con el fin de optimizar las condiciones de fermentación y maximizar el rendimiento del biopolímero. El análisis estadístico se ajustó adecuadamente a un modelo de interacción de dos factores (2FI), lo que evidencia condiciones óptimas a 10.25 g/L de concentración de glucosa, 6.64 g/L de extracto de levadura y pH cercano a 4.7, favoreciendo la síntesis de los exopolisacáridos y mostrando su capacidad para describir el comportamiento del sistema. Posteriormente, se realizó un perfil cinético para la determinación del punto óptimo de producción de EPS, evaluándose simultáneamente la biomasa, el consumo de azúcares reductores (DNS) y variación del pH en el cultivo. Los resultados mostraron que la producción de EPS alcanzó un valor máximo de 1.684 g/L en el día 15 de cultivo, evidenciando un crecimiento progresivo seguido de una ligera atenuación sin una fase exponencial dentro del periodo evaluado. Finalmente, el exopolisacárido fue caracterizado fisicoquímicamente mediante los métodos fenol-ácido sulfúrico para la determinación de carbohidratos totales, donde se obtuvieron tratamientos con una fracción estimada de carbohidratos complejos de 97% a 99%, evidenciando un alto contenido de estos azúcares. En el análisis por espectroscopía FTIR se observó una alta similitud en las bandas principales, destacando las vibraciones de O–H, C=O y enlaces glucosídicos, así como señales en la región anomérica (892 cm^{-1}) asociadas a posibles enlaces β -glucano.

En conjunto, la presente investigación demostró la capacidad de *Fusarium oxysporum*, aislado a partir de tejido de *Musa paradisiaca* en estado de descomposición, para producir exopolisacáridos con potencial de aplicación biotecnológica. Asimismo, proporciona información sobre las condiciones de producción y las características fisicoquímicas de estos biopolímeros, constituyendo una base para futuras investigaciones orientadas a la optimización del proceso y la evaluación de sus aplicaciones biotecnológicas.

Palabras clave: Exopolisacáridos, *Fusarium oxysporum*, *Musa paradisiaca*.

ABSTRACT

The present study aimed to isolate, characterize, and optimize the culture conditions of a native strain of *Fusarium oxysporum* isolated from *Musa paradisiaca*, in order to enhance exopolysaccharide production. A Box–Behnken design based on Response Surface Methodology (RSM) was employed to evaluate the effect of the independent variable's glucose concentration (g/L), yeast extract concentration (g/L), and pH, to optimize fermentation conditions and maximize biopolymer yield. Statistical analysis showed an adequate fit to a two-factor interaction (2FI) model, revealing optimal conditions at a glucose concentration of 10.25 g/L, a yeast extract concentration of 6.64 g/L, and a pH close to 4.7, favoring exopolysaccharide synthesis and demonstrating the model's ability to describe the system's behavior.

For the isolation process, plant tissue was collected from the pseudostem of a decayed plant, and its morphological characteristics were identified and subsequently confirmed by molecular characterization using ITS sequencing, which showed similarity to the species *Fusarium oxysporum* (MK571185.1). Subsequently, a kinetic profile was performed to determine the optimal EPS production point, simultaneously evaluating biomass, reducing sugar consumption (DNS), and pH variation during cultivation. The results showed that EPS production reached a maximum value of 1.684 g/L on day 15 of cultivation, exhibiting progressive growth followed by slight attenuation without an exponential phase during the evaluated period.

Finally, the exopolysaccharide was physicochemically characterized using the phenol–sulfuric acid method for total carbohydrate determination, obtaining treatments with an estimated complex carbohydrate fraction ranging from 97% to 99%, indicating a high content of these sugars. FTIR spectroscopy analysis revealed high similarity among the main bands, highlighting O–H, C=O, and glycosidic bond vibrations, as well as signals in the anomeric region (892 cm^{-1}) associated with possible β -glucan linkages.

Overall, this study demonstrates the ability of *Fusarium oxysporum*, isolated from decomposing *Musa paradisiaca* tissue, to produce exopolysaccharides with biotechnological potential. Furthermore, it provides information on the production conditions and the physicochemical characteristics of these biopolymers, establishing a foundation for future research aimed at optimizing the production process and evaluating their potential biotechnological applications.

Keywords: Exopolysaccharides, *Fusarium oxysporum*, *Musa paradisiaca*.

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVOS.....	4
CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO	5
1. Marco teórico	6
1.1. Antecedentes de la investigación.....	6
1.1.1. Producción de EPS en microorganismos	6
1.1.2. Producción de EPS en hongos y <i>Fusarium</i> spp.....	7
1.1.3. Factores que influyen en la producción de EPS	9
1.1.4. Vacío de investigación	9
1.2. <i>Musa paradisiaca</i> como sistema de estudio	10
1.2.1. Importancia económica, social y agroindustrial.....	10
1.2.2. Distribución geográfica y relevancia en el Perú.....	10
1.2.3. Características botánicas y fisiológicas.....	11
1.2.4. Composición química y contenido de biomasa.....	11
1.2.5. Problemática fitosanitaria del cultivo.....	11
1.2.6. Marchitez vascular causada por <i>Fusarium oxysporum</i>	12
1.2.7. Potencial biotecnológico y valorización de residuos agroindustriales.....	12
1.3. <i>Fusarium oxysporum</i> : características y potencial biotecnológico	13
1.3.1. Taxonomía y clasificación	13
1.3.2. Diversidad genética y formas especiales.....	13
1.3.3. Morfología y estructuras reproductivas.....	14
1.3.4. Fisiología y condiciones de crecimiento	15
1.3.5. Mecanismos de patogenicidad en plantas	15
1.3.6. Metabolismo fúngico.....	16
1.3.7. Producción de metabolitos secundarios	17

1.3.8.	Producción de exopolisacáridos en hongos filamentosos	17
1.3.9.	Potencial biotecnológico de <i>Fusarium oxysporum</i>	17
1.4.	Exopolisacáridos (EPS): fundamentos y aplicaciones.....	18
1.4.1.	Definición y características generales	18
1.4.2.	Clasificación: homopolisacáridos y heteropolisacáridos.	18
1.4.3.	Estructura química y composición	18
1.4.4.	Mecanismos de biosíntesis de EPS	19
1.4.5.	Regulación metabólica de la síntesis de EPS	20
1.4.6.	Métodos de extracción y purificación	20
1.4.7.	Métodos de cuantificación	21
1.4.8.	Propiedades fisicoquímicas	21
1.4.9.	Aplicaciones industriales, farmacéuticas y cosméticas.....	21
1.5.	Producción de EPS en microorganismos.....	22
1.5.1.	Producción de EPS en bacterias	22
1.5.2.	Producción de EPS en hongos.....	22
1.5.3.	Comparación entre sistemas bacterianos y fúngicos.....	23
1.5.4.	Ventajas de los hongos filamentosos en bioprocesos.....	24
1.6.	Factores que influyen en la producción de exopolisacáridos (EPS).....	24
1.6.1.	Influencia del pH en sistemas microbianos.....	24
1.6.2.	Temperatura y condiciones de incubación	25
1.6.3.	Fuente de carbono	25
1.6.4.	Fuente de nitrógeno	26
1.6.5.	Relación carbono/nitrógeno (C/N)	26
1.6.6.	Aireación y condiciones de cultivo	26
1.6.7.	Tiempo de fermentación.....	27
1.6.8.	Interacción de variables en sistemas biológicos.....	27
1.7.	Cinética y optimización del proceso biotecnológico	27
1.7.1.	Fases de crecimiento microbiano	28
1.7.2.	Cinética de crecimiento en hongos filamentosos	29
1.7.3.	Relación biomasa–sustrato–producto (X–S–P).....	29
1.7.4.	Producción asociada y no asociada al crecimiento	30
1.7.5.	Determinación del tiempo óptimo de producción	30
1.7.6.	Estrategias de optimización en bioprocesos.....	31
1.7.7.	Metodología de superficie de respuesta (RSM)	31

1.7.8.	Diseño experimental Box–Behnken.....	32
1.7.9.	Modelos matemáticos en la optimización de bioprocesos	32
1.7.10.	Análisis de varianza (ANOVA)	32
1.7.11.	Interacción de variables y optimización de condiciones	33
CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS		34
1.	Materiales y métodos	35
1.1.	Área de estudio	35
1.1.1.	Ubicación espacial.....	35
1.1.2.	Ubicación temporal	35
1.1.3.	Ambientes de investigación	35
1.2.	Materiales, reactivos, equipos y software.....	36
1.2.1.	Material biológico	36
1.2.2.	Materiales de laboratorio.....	36
1.2.3.	Reactivos Químicos.....	36
1.2.4.	Equipos.....	37
1.2.5.	Otros materiales.....	38
1.2.6.	Software estadístico.....	38
1.3.	Métodos	38
1.3.1.	Tipo y diseño de investigación.....	38
1.3.1.1.	Tipo de investigación.....	38
1.3.1.2.	Diseño de investigación.....	39
1.3.2.	Variables experimentales y operacionalización	39
1.3.3.	Obtención e identificación de <i>Fusarium oxysporum</i>	40
1.3.3.1.	Recolección de la muestra vegetal.....	40
1.3.3.2.	Aislamiento de <i>Fusarium oxysporum</i>	41
1.3.3.3.	Obtención de cultivos puros	41
1.3.3.3.1.	Siembra del hongo <i>Fusarium</i> en medio de cultivo	41
1.3.3.3.2.	Aislamiento de cultivos puros	41
1.3.3.4.	Caracterización macroscópica	42
1.3.3.5.	Caracterización microscópica.....	42
1.3.3.6.	Identificación molecular	42
1.3.4.	Preparación del inóculo	43
1.3.5.	Evaluación cinética del cultivo	43

1.3.5.1. Preparación del medio de cultivo	43
1.3.5.2. Condiciones iniciales de cultivo	44
1.3.5.3. Diseño del estudio cinético	45
1.3.5.3.1. Tipo de cultivo	45
1.3.5.3.2. Duración y frecuencia de muestreo	45
1.3.5.4. Variables de seguimiento	45
1.3.5.5. Recuperación de exopolisacáridos	45
1.3.5.5.1. Separación de biomasa y clarificación del sobrenadante	45
1.3.5.5.2. Precipitación de exopolisacáridos	46
1.3.5.5.3. Recuperación del precipitado	46
1.3.5.5.4. Secado del EPS	46
1.3.5.6. Métodos analíticos aplicados	46
1.3.5.6.1. Determinación de biomasa	46
1.3.5.6.2. Determinación de pH	47
1.3.5.6.3. Determinación de azúcares reductores (DNS)	47
1.3.5.6.4. Determinación de carbohidratos totales del exopolisacárido (EPS) mediante el método fenol-ácido sulfúrico	47
1.3.5.6.4.1. Evaluación preliminar de la producción de EPS en el punto óptimo mediante lectura en microplaca	48
1.3.5.6.4.2. Cuantificación del EPS en tubos de ensayo en los tratamientos del diseño experimental.	48
1.3.5.7. Procesamiento y análisis de datos cinéticos	49
1.3.5.7.1. Cálculo de biomasa y EPS	49
1.3.5.7.2. Cálculo del consumo de sustrato	49
1.3.5.7.3. Determinación del punto óptimo	49
1.3.5.7.4. Determinación de rendimientos	49
1.3.5.7.4.1. Rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$)	50
1.3.5.7.4.2. Rendimiento producto/sustrato ($Y_{p/s}$)	50
1.3.5.7.4.3. Rendimiento producto/biomasa ($Y_{p/x}$)	51
1.3.6. Diseño experimental Box-Behnken	51
1.3.6.1. Matriz experimental	51
1.3.6.2. Factores y niveles	52
1.3.6.3. Análisis estadístico y optimización	53
1.3.7. Caracterización estructural de EPS	53

1.3.7.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR):	53
1.3.8. Diagrama experimental	54
CAPÍTULO III RESULTADOS	55
1. Resultados	56
1.1. Recolección de la muestra vegetal.....	56
1.2. Aislamiento del microorganismo.....	57
1.3. Caracterización del aislamiento fúngico.....	58
1.3.1. Caracterización macroscópica.....	58
1.3.2. Caracterización microscópica	58
1.3.3. Identificación molecular del microorganismo.....	60
1.4. Evaluación del crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> y perfil cinético de biomasa ..	60
1.4.1. Curva de crecimiento (biomasa vs tiempo).....	60
1.4.2. Variación de pH durante el cultivo	61
1.4.3. Interpretación de fases de crecimiento	62
1.5. Producción de exopolisacáridos (EPS).....	63
1.5.1. Perfil de producción de EPS (g/L) vs tiempo.....	63
1.5.2. Relación biomasa – producción de EPS.....	65
1.5.3. Rendimientos del proceso y su comportamiento cinético.....	66
1.5.4. Evaluación preliminar de la producción de EPS mediante el método fenol-ácido sulfúrico en microplaca.....	68
1.6. Consumo de sustrato y análisis de carbohidratos	69
1.6.1. Cuantificación de azúcares (DNS)	69
1.6.2. Relación sustrato-biomasa-EPS	71
1.6.3. Eficiencia de conversión y análisis metabólico.....	72
1.7. Evaluación del efecto de las variables de cultivo sobre la producción de exopolisacáridos	73
1.7.1. Resultados del diseño experimental	73
1.7.1.1. Cuantificación de EPS en los tratamientos experimentales mediante el método fenol-ácido sulfúrico en tubos de ensayo	76
1.7.2. Modelo cuadrático y análisis estadístico	78
1.7.2.1. Prueba de normalidad	78
1.7.2.2. Residuos vs valores predichos.....	79
1.7.2.3. Residuos vs orden de corrida.....	80

1.7.3.	Interacción de variables.....	81
1.7.3.1.	Interacción entre Glucosa -pH.....	82
1.7.3.2.	Interacción entre Glucosa - Levadura.....	82
1.7.3.3.	Interacción entre Levadura - pH.....	82
1.7.3.3.1.	Interacción glucosa – pH:.....	83
1.7.3.3.2.	Interacción levadura – pH	83
1.7.4.	Validación del punto óptimo	83
1.8.	Caracterización de los exopolisacáridos.....	84
1.8.1.	Purificación del EPS.....	84
1.8.2.	Análisis FTIR (grupos funcionales).....	85
1.9.	Implicaciones biotecnológicas y potencial aplicación de EPS	88
CONCLUSIONES		90
RECOMENDACIONES		91
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		92
ANEXOS.....		103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Condiciones de cultivo y producción de exopolisacáridos (EPS) en hongos.	8
Tabla 2 Operacionalización de Variables.....	39
Tabla 3 Criterios macroscópicos empleados en la caracterización de los aislamientos de <i>Fusarium</i>	42
Tabla 4 Medio de cultivo utilizado para la producción de exopolisacáridos	44
Tabla 5 Matriz experimental del diseño Box-Behnken.....	52
Tabla 6 Niveles de los factores del diseño experimental	52
Tabla 7 Rendimientos.....	66
Tabla 8 Cuantificación de azúcares totales del exopolisacárido (EPS) obtenido al día 15 mediante el método fenol-ácido sulfúrico	68
Tabla 9 Pruebas obtenidas empleando el diseño Box Behnken basado en metodología de respuesta (RSM).....	74
Tabla 10 Modelos propuestos por el software Design-Expert® versión 13.0	74
Tabla 11 Estadística del modelo seleccionado 2FI	75
Tabla 12 Análisis de varianza ANOVA empleando el modelo de 2FI	76
Tabla 13 Concentración de exopolisacáridos determinada mediante el método fenol-ácido sulfúrico y porcentaje respecto a la concentración teórica de referencia.....	77
Tabla 14 Condiciones óptimas determinadas para la producción de EPS mostrado del software con el modelo ajustado 2FI.....	84
Tabla 15 Validez experimental de las tres repeticiones experimentales.....	84
Tabla 16 Grupos funcionales identificados en la región espectral infrarrojo en FTIR	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema conceptual de la valorización biotecnológica de <i>Musa paradisiaca</i> en la producción de exopolisacáridos.	13
Figura 2 Estructuras morfológicas de <i>Fusarium oxysporum</i>	15
Figura 3 Ciclo de infección de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense en banano.	16
Figura 4 Ruta general de biosíntesis de exopolisacáridos (EPS) en microorganismos.	20
Figura 5 Esquema comparativo de la biosíntesis de EPS en bacterias (vías Wzx/Wzy, ABC y sintasa) y hongos filamentosos (síntesis en Golgi y secreción vesicular).	23
Figura 6 Curva de crecimiento microbiano, consumo de sustrato y formación de exopolisacáridos (EPS) en función del tiempo, mostrando las fases de latencia, exponencial, estacionaria y de muerte.	28
Figura 7 Esquema de cultivo de Plátano de Molino Cajanleque ubicado en el distrito de Chocope	35
Figura 8 Diagrama del proceso experimental	54
Figura 9 Planta de banano (<i>Musa paradisiaca</i>)	56
Figura 10 El hongo se cultivó en medio de agar papa dextrosa (PDA)	57
Figura 11 Caracterización microscópica del hongo <i>Fusarium oxysporum</i> aislado de la planta del banano.	59
Figura 12 Curva de crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> en función del tiempo., expresada como biomasa (g/L).	61
Figura 13 Variación del pH durante el cultivo de <i>Fusarium oxysporum</i> en función del tiempo	62
Figura 14 Perfil de producción de exopolisacáridos (EPS) de <i>Fusarium oxysporum</i> en función del tiempo.....	64
Figura 15 Producción de exopolisacáridos (EPS) en función de la biomasa de <i>Fusarium oxysporum</i>	65
Figura 16 Evolución de los rendimientos biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$), producto/sustrato ($Y_{p/s}$) y producto/biomasa ($Y_{p/x}$) durante el cultivo de <i>Fusarium oxysporum</i>	66
Figura 17 Variación de la concentración de azúcares reductores durante el cultivo de <i>Fusarium oxysporum</i>	70
Figura 18 Cinética de biomasa, producción de EPS y consumo de azúcares reductores.....	72
Figura 19 Gráfico de normalidad de residuos	79
Figura 20 Representación gráfica de residuos vs valores predichos	79

Figura 21 Representación gráfica de Residuos vs Orden de corrida.....	80
Figura 22 Gráfico de contorno de las interacciones respecto a la producción de exopolisacáridos,.....	81
Figura 23 Representación de las superficies de respuesta tridimensional, A) Interacción del efecto de la concentración de la glucosa sobre pH, B) Interacción del efecto de la concentración de levadura sobre pH	83
Figura 24 Resultados en el espectro del EPS (P1)	85
Figura 25 Espectro de FTIR obtenido de investigaciones de <i>Fusarium merismoides</i> A6 (178) y <i>Fusarium equiseti</i> ANP2 (175), respectivamente.	87



ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Informe de identificación molecular del hongo aislado	104
Anexo 2 Fotografía de las réplicas del hongo filamentoso, evidenciando las diferentes pigmentaciones en condiciones iguales: 25 °C durante 9 días de incubación.	106
Anexo 3 Secuencia “ITS 1“ con la base de datos de genbank	107
Anexo 4 Base de Datos de GenBank	107
Anexo 5 Datos experimentales de la cinética del cultivo de <i>Fusarium oxysporum</i>	108
Anexo 6 Curva de calibración de glucosa para la determinación de azúcares reductores mediante el método DNS	108
Anexo 7 Preparación de la curva de calibración de glucosa mediante el método DNS en tubos de ensayo.....	109
Anexo 8 Curva de calibración para la determinación de azúcares totales mediante el método de fenol-ácido sulfúrico.....	109
Anexo 9 Gráfico de valores DFFITS vs número de corrida para la respuesta R1.	110
Anexo 10 Gráfico de DFBETAS para el intercepto vs número de corrida.	110
Anexo 11 Gráfico de interacción entre glucosa (A) y levadura (B) sobre la respuesta R1. ..	111
Anexo 12 Gráfico de interacción entre glucosa (A) y pH (C).	111
Anexo 13 Gráfico de interacción entre levadura (B) y pH (C).	112
Anexo 14 Cuantificación de carbohidratos totales y porcentaje de recuperación de EPS mediante el método fenol-ácido sulfúrico	112
Anexo 15 Evidencia fotográfica de la precipitación alcohólica de exopolisacáridos.	113
Anexo 16 Exopolisacáridos obtenidos del cultivo de <i>Fusarium oxysporum</i> de la optimización.	114
Anexo 17 Confirmación del modelo estadístico	114

GLOSARIO DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

2FI: Interacción de dos factores

ANOVA: análisis de varianza

C/N: relación carbono/nitrógeno

DBB: Diseño Box Behnken

EPS: exopolisacáridos

FO: *Fusarium oxysporum*

FTIR: espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

g/L: gramos por litro

ITS: región espaciadora interna transcrita (Internal Transcribed Spacer)

p-value: valor de significancia estadística

P: producto

R²: coeficiente de determinación

RSM: metodología de superficie de respuesta

rpm: revoluciones por minuto

S: sustrato

X: biomasa

μ : Tasa de crecimiento microbiana

Y_{x/s}: Rendimiento biomasa/sustrato

Y_{p/x}: Rendimiento producto/biomasa

Y_{p/s}: Rendimiento producto/sustrato

INTRODUCCIÓN

Los exopolisacáridos (EPS) microbianos constituyen biopolímeros extracelulares de creciente interés en biotecnología debido a sus propiedades funcionales, reológicas y estructurales, tales como la capacidad de modificar la viscosidad, estabilizar sistemas coloidales y formar matrices gelificadas con aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica y ambiental (1,2). En este contexto, los hongos filamentosos representan una fuente relevante para la producción de estos compuestos por su versatilidad metabólica y su capacidad de aprovechar diversas fuentes de carbono para la síntesis de metabolitos extracelulares, destacando el género *Fusarium*, el cual, además de su reconocida importancia fitopatogénica, ha mostrado potencial en la producción de polisacáridos con propiedades de interés industrial (3,4). Diversos estudios han reportado producciones variables de exopolisacáridos en especies del género *Fusarium* y otros hongos filamentosos, observándose diferencias asociadas a la cepa utilizada, la composición del medio y las condiciones de fermentación. Estos antecedentes constituyen un marco de referencia para evaluar el rendimiento alcanzado mediante estrategias de optimización del cultivo. No obstante, la producción de EPS en este tipo de microorganismos está influenciada por múltiples variables del medio, como la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, el pH y las condiciones de fermentación, las cuales presentan interacciones complejas, afectando la redistribución del flujo metabólico hacia la biosíntesis de estos biopolímeros, lo que limita la eficiencia de los enfoques tradicionales de optimización basados en la evaluación de un solo factor a la vez (5).

En este sentido, la aplicación de metodologías multivariantes como la metodología de superficie de respuesta (RSM) permite analizar de manera simultánea los efectos individuales y combinados de los factores de cultivo, facilitando la identificación de condiciones óptimas, siendo el diseño Box–Behnken una herramienta eficiente por su capacidad de reducir el número de ensayos experimentales manteniendo una adecuada precisión predictiva (6,7). A pesar de ello, persiste un vacío de conocimiento en la caracterización y aprovechamiento de cepas nativas de *Fusarium oxysporum* aisladas de matrices vegetales en descomposición, particularmente del banano (*Musa paradisiaca*), que constituyen nichos ecológicos ricos en diversidad microbiana aún poco explorados en términos de su potencial para la producción optimizada de EPS en sistemas de fermentación sumergida, así como en la aplicación integrada de estrategias estadísticas de optimización en este tipo de microorganismos ambientales. En consecuencia, la presente investigación se justifica en la necesidad de explorar y valorizar recursos microbianos nativos asociados a residuos agrobiológicos, contribuyendo al desarrollo

de alternativas sostenibles basadas en biopolímeros biodegradables con potencial aplicación industrial (1,2). Desde esta perspectiva, la evaluación del potencial biotecnológico de una cepa requiere un enfoque integral que combine su identificación morfológica y molecular con el análisis de su comportamiento fisiológico en cultivo, permitiendo establecer su capacidad de crecimiento y producción de metabolitos, mientras que la cuantificación y caracterización de los EPS obtenidos mediante técnicas analíticas como la espectroscopía infrarroja (FT-IR) y la determinación de carbohidratos totales resultan fundamentales para comprender su naturaleza estructural y sus posibles aplicaciones (2,8).

Es por ello, que la presente investigación tiene el objetivo de aislar, caracterizar y optimizar las condiciones de cultivo de una cepa nativa de *Fusarium oxysporum* obtenida de *Musa paradisiaca*, con el propósito de incrementar la producción de exopolisacáridos mediante la aplicación de un diseño de superficie de respuesta tipo Box-Behnken, evaluando el efecto de la concentración de glucosa, el extracto de levadura y el pH, y determinando las condiciones óptimas de fermentación sumergida que maximicen el rendimiento del biopolímero.

HIPÓTESIS

Dado que la importancia de los exopolisacáridos microbianos va en incremento, es posible que el aislamiento de una cepa nativa de *Fusarium oxysporum* a partir de *Musa paradisiaca*, junto con la optimización de las condiciones de cultivo, permita incrementar significativamente la producción de exopolisacáridos.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

1. Evaluar las condiciones de cultivo para la producción de exopolisacáridos por una cepa nativa de *Fusarium oxysporum* aislada del plátano (*Musa paradisiaca*), mediante un diseño de superficie de respuesta (Box–Behnken), evaluando el efecto de la concentración de glucosa, extracto de levadura y pH en fermentación sumergida.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar morfológicamente y molecularmente una cepa nativa de *Fusarium oxysporum* aislada de los tejidos en descomposición de *Musa paradisiaca*.
2. Analizar la relación entre la biomasa, el consumo de sustrato y la producción de exopolisacáridos (EPS) mediante el estudio de la cinética de crecimiento de la cepa.
3. Evaluar el efecto de la concentración de glucosa, extracto de levadura y pH sobre la producción de exopolisacáridos mediante un diseño experimental Box–Behnken, con fines de modelamiento y optimización.
4. Determinar el contenido de carbohidratos totales y caracterizar los exopolisacáridos producidos mediante espectroscopía FT–IR.

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

1. Marco teórico

1.1. Antecedentes de la investigación

1.1.1. Producción de EPS en microorganismos

La producción de exopolisacáridos (EPS) por microorganismos constituye un proceso biotecnológico de alta relevancia debido a la diversidad estructural y funcional de estos biopolímeros, los cuales presentan aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica y ambiental. Los EPS son macromoléculas extracelulares sintetizadas a partir de intermediarios del metabolismo central, como azúcares nucleótidos (p. ej., UDP-glucosa), y su producción se asocia tanto a procesos de crecimiento como a mecanismos de adaptación frente a condiciones de estrés ambiental, incluyendo limitación de nutrientes, variaciones de pH y estrés osmótico (9).

Diversos grupos microbianos han sido ampliamente estudiados por su capacidad de producir EPS. En bacterias, géneros como *Xanthomonas*, *Leuconostoc* y *Bacillus* destacan por la síntesis de polisacáridos extracelulares como xantana, dextrano y levan, respectivamente, los cuales poseen propiedades reológicas de interés industrial, tales como alta viscosidad, estabilidad térmica y comportamiento pseudoplástico (5). Según Freitas et al, estos sistemas bacterianos presentan ventajas como altas tasas de crecimiento y facilidad de escalamiento; sin embargo, su productividad está fuertemente influenciada por la composición del medio y el control preciso de las condiciones de fermentación (1).

Por otro lado, las levaduras, incluyendo especies de *Saccharomyces* y *Cryptococcus*, han sido reportadas como productoras de EPS con propiedades bioactivas, entre ellas actividad antioxidante e inmunomoduladora. A pesar de ello, su rendimiento suele ser inferior al de los sistemas bacterianos, lo que ha limitado su aplicación a gran escala en comparación con otros microorganismos más eficientes (10).

En cuanto a los hongos filamentosos, estos representan una alternativa prometedora debido a su capacidad para sintetizar polisacáridos de mayor complejidad estructural y peso molecular. Los géneros como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* han sido objeto de creciente interés, ya que sus EPS pueden presentar propiedades funcionales diferenciadas, incluyendo actividad biológica y comportamiento reológico adecuado para aplicaciones biomédicas y ambientales. Tal como señalan Mahapatra, S; Banerjee, D estos organismos poseen una notable versatilidad metabólica que les permite utilizar una amplia gama de sustratos, incluidos residuos

agroindustriales, lo que representa una ventaja significativa desde el punto de vista de la sostenibilidad (3).

La producción de EPS está regulada por múltiples factores, entre los que destacan la fuente de carbono, la relación carbono/nitrógeno (C/N), el pH, la temperatura y la disponibilidad de oxígeno (9). La fuente de carbono, en particular, desempeña un papel determinante al actuar como precursor directo en la biosíntesis del polímero, mientras que el nitrógeno modula el equilibrio entre crecimiento celular y producción de metabolitos secundarios. Asimismo, la interacción entre estas variables puede influir significativamente en el rendimiento del proceso, lo que ha impulsado el uso de herramientas de optimización como los diseños experimentales y la metodología de superficie de respuesta (RSM). A pesar de los avances alcanzados, aún persisten limitaciones en la comprensión de los mecanismos de biosíntesis y regulación de EPS en ciertos microorganismos, particularmente en hongos filamentosos como *Fusarium oxysporum*, cuyo potencial biotecnológico ha sido escasamente explorado en comparación con otros sistemas microbianos. En este contexto, resulta necesario profundizar en el estudio de estas especies, especialmente mediante el uso de residuos agrícolas generados en el cultivo del banano, con el fin de desarrollar procesos más eficientes, sostenibles y económicamente viables (6).

1.1.2. Producción de EPS en hongos y *Fusarium spp.*

Los hongos filamentosos constituyen una fuente prometedora de EPS debido a su capacidad para sintetizar polisacáridos de alta complejidad estructural y peso molecular. Según Mahapatra y Banerjee, los EPS fúngicos presentan propiedades bioactivas relevantes, incluyendo actividades antioxidantes, antimicrobianas e inmunomoduladoras, lo que amplía su potencial en aplicaciones biotecnológicas (11).

Diversos géneros han sido estudiados en este contexto. Por ejemplo, en *Ganoderma lucidum* se han identificado polisacáridos con actividad inmunomoduladora, mientras que especies de *Aspergillus* han mostrado altos rendimientos de producción bajo condiciones optimizadas de fermentación. Sin embargo, la producción de EPS en hongos está fuertemente influenciada por factores como la fuente de carbono, el pH y el tiempo de cultivo, lo que genera una alta variabilidad en los resultados reportados (12,13).

En el caso del género *Fusarium*, su estudio ha estado tradicionalmente enfocado en su rol como fitopatógeno. No obstante, investigaciones recientes han evidenciado su potencial para la producción de metabolitos extracelulares. Especies como *Fusarium nygamai* han demostrado

la capacidad de sintetizar EPS con actividad antioxidante y antimicrobiana (14). A pesar de ello, Michielse, C; Rep, M señalan que la investigación en *Fusarium oxysporum* se ha centrado principalmente en aspectos de patogenicidad, existiendo escasa información sobre su capacidad productiva de EPS (15).

Diversos estudios han demostrado que la producción de exopolisacáridos en hongos filamentosos depende significativamente de variables como el pH, la concentración de glucosa y las fuentes de nitrógeno como el extracto de levadura. En la Tabla 1 se presentan condiciones reportadas para diferentes especies (11,16).

Particularmente, *Fusarium oxysporum* presenta una notable versatilidad metabólica que le permite crecer en diversos sustratos, lo que sugiere su potencial para la biosíntesis de biopolímeros. Sin embargo, los estudios específicos sobre su producción de EPS son limitados y reportan rendimientos variables, como se resume en la Tabla 1. En este contexto, el aislamiento de cepas a partir de matrices naturales, como *Musa paradisiaca*, adquiere relevancia, ya que el entorno ecológico puede influir en la expresión metabólica del microorganismo y, por ende, en su capacidad de producción de EPS (17).

Tabla 1
Condiciones de cultivo y producción de exopolisacáridos (EPS) en hongos.

Espece	Medio de cultivo C/N	Condiciones de cultivo (T°, pH, rpm, tiempo)	Producción de EPS	Referencia
<i>Fusarium oxysporum</i> Y24-2	Glucosa: 20 g/L; Extracto de levadura: 3 g/L; Peptona: 5 g/L	25 °C; pH 6.0–6.5; 120–200 rpm; 7 días	0.12 g/L	(25)
<i>Fusarium solani</i> SD5	Glucosa: 9.8 g/L; Extracto de levadura: 0.69 g/L	28 °C; pH 6.46; 120 rpm; ~13–14 días	2.276 g/L	(19)
<i>Ganoderma lucidum</i> CAU5501	Glucosa: 70 g/L (óptimo EPS); relación C/N: 5	30 °C; pH 5.5–6.5; 150 rpm; ~4–7 días	1.723 g/L	(20)
<i>Aspergillus niger</i> NRC9	Glucosa: 100 g/L; Sales minerales + N inorgánico	30 °C; pH 5–6, 200 rpm; 4 días	≈170 U/mL (enzima extracelular)	(21)

Nota: Elaboración propia.

Los valores corresponden a condiciones reportadas en estudios de fermentación sumergida. Los EPS pueden variar según cepa, optimización y diseño experimental (1).

1.1.3. Factores que influyen en la producción de EPS

La producción de EPS es un proceso multifactorial determinado por la interacción de variables nutricionales y condiciones de cultivo. Entre los factores más relevantes se encuentran la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, la relación C/N, el pH, la temperatura y la aireación (1).

La fuente de carbono actúa como precursor directo en la biosíntesis del polímero, mientras que el nitrógeno regula el crecimiento celular y la producción de metabolitos secundarios (18,19). Asimismo, parámetros como el pH y la temperatura influyen en la actividad enzimática involucrada en la síntesis del EPS (11).

Debido a la complejidad de estas interacciones, se han desarrollado metodologías estadísticas como la metodología de superficie de respuesta (RSM), que permiten evaluar simultáneamente múltiples variables y optimizar las condiciones de cultivo. Según Bezerra et al, estos enfoques son fundamentales para mejorar la eficiencia de los bioprocesos, especialmente cuando se busca maximizar la producción de metabolitos como los EPS (6).

1.1.4. Vacío de investigación

A pesar de los avances en la producción de EPS en microorganismos, persisten vacíos importantes en la literatura científica. En primer lugar, existe una limitada evidencia sobre la capacidad de *Fusarium oxysporum* para producir EPS bajo condiciones optimizadas, ya que la mayoría de las investigaciones se han enfocado en su rol fitopatogénico. En segundo lugar, aunque el uso de residuos agroindustriales ha sido ampliamente explorado en sistemas bacterianos, su aplicación en hongos filamentosos, particularmente utilizando residuos de *Musa paradisiaca*, sigue siendo escasa. No se dispone de estudios que integren de manera sistemática el microorganismo, el tipo de sustrato y la optimización de condiciones de cultivo. Finalmente, se identifica una brecha en la aplicación de diseños experimentales, como el modelo de interacción de dos factores (2FI), en la optimización de la producción de EPS en sistemas fúngicos. Esta limitación restringe la comprensión de las interacciones entre variables y dificulta la identificación de condiciones óptimas (15).

En este contexto, la presente investigación se orienta a abordar estas limitaciones mediante la evaluación del potencial de *Fusarium oxysporum* aislado de *Musa paradisiaca* y la optimización de las condiciones de cultivo para la producción de EPS, contribuyendo al desarrollo de procesos biotecnológicos sostenibles.

1.2. *Musa paradisiaca* como sistema de estudio

1.2.1. Importancia económica, social y agroindustrial

El cultivo de *Musa paradisiaca* (Banano/Plátano) constituye un elemento clave dentro de los sistemas productivos de las zonas tropicales y subtropicales, no solo por su amplia adaptación ecológica, sino también por su contribución significativa a la seguridad alimentaria a escala global (20,21). Su presencia es predominante en regiones de América Latina, África y Asia, donde forma parte esencial de la dieta cotidiana, debido a su aporte energético, contenido de micronutrientes y compuestos con relevancia funcional para la salud humana (22,23). En el ámbito socioeconómico, el plátano desempeña un papel relevante en la dinámica de las economías rurales, particularmente en sistemas agrícolas de pequeña escala. En estos contextos, su producción permite tanto el abastecimiento para el consumo familiar como la generación de ingresos mediante su comercialización, favoreciendo la estabilidad económica de los productores y contribuyendo al fortalecimiento de la agricultura familiar (24).

En el caso del Perú, *Musa paradisiaca* adquiere especial importancia en regiones de la Amazonía y la selva alta, donde su cultivo se posiciona como una de las principales actividades agrícolas. El incremento sostenido de su demanda, tanto en estado fresco como en productos transformados, ha impulsado su integración en cadenas agroindustriales orientadas al valor agregado (25). Asimismo, su versatilidad facilita su aprovechamiento en diversos procesos, que incluyen la elaboración de productos alimentarios y la obtención de subproductos con potencial aplicación industrial, lo que refuerza su relevancia desde una perspectiva económica y tecnológica (23).

1.2.2. Distribución geográfica y relevancia en el Perú

La *Musa paradisiaca* se desarrolla preferentemente en ambientes tropicales caracterizados por alta humedad relativa, temperaturas relativamente constantes y suelos con adecuada fertilidad. En el Perú, su cultivo se concentra principalmente en regiones amazónicas como San Martín, Loreto, Ucayali y Amazonas, donde las condiciones agroclimáticas permiten un crecimiento continuo durante todo el año (26).

A nivel productivo, el plátano constituye uno de los cultivos más importantes del país, con una producción que supera los 2 millones de toneladas anuales y con la participación de más de 130 mil productores, lo que refleja su papel clave en la economía rural y la seguridad alimentaria (Figura 1). Esta distribución territorial evidencia una fuerte dependencia de factores climáticos y disponibilidad hídrica, los cuales condicionan la productividad del cultivo (27).

1.2.3. Características botánicas y fisiológicas

Desde el enfoque estructural, *Musa paradisiaca* corresponde a una planta herbácea perenne cuya conformación aérea no presenta un tallo leñoso verdadero, sino un pseudotallo generado por la compactación de vainas foliares. Sus hojas, de gran desarrollo laminar, permiten una eficiente intercepción de la luz, favoreciendo elevados niveles de actividad fotosintética. El sistema radical se distribuye principalmente en los primeros estratos del suelo, lo que incrementa su sensibilidad frente a variaciones en la humedad y disponibilidad de nutrientes. En el plano fisiológico, el crecimiento y la productividad de esta especie dependen significativamente de factores edafoclimáticos, entre ellos la temperatura, el suministro de agua, la reacción del suelo (pH) y la disponibilidad de elementos minerales. Cuando estas condiciones son favorables, la planta manifiesta una rápida expansión vegetativa y una notable acumulación de biomasa. Esta capacidad de generación de materia orgánica ha despertado interés en el ámbito biotecnológico, particularmente como sustrato para la obtención de compuestos de valor agregado (28).

1.2.4. Composición química y contenido de biomasa

La biomasa de *Musa paradisiaca* presenta una matriz lignocelulósica compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, además de azúcares solubles y compuestos bioactivos. Se ha reportado que las fibras del pseudotallo contienen altos niveles de celulosa, lo que favorece su aprovechamiento en aplicaciones industriales y biotecnológicas (29). Asimismo, residuos como la cáscara y pulpa aportan carbohidratos fermentables, incrementando su valor como materia prima en procesos de biorrefinería (30). Mediante pretratamientos adecuados, estos polímeros pueden hidrolizarse a azúcares simples, facilitando su uso en fermentaciones microbianas para la producción de biopolímeros y metabolitos de interés, como celulosa bacteriana y exopolisacáridos (31). Además, la presencia de compuestos funcionales amplía su aplicación en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética (32).

1.2.5. Problemática fitosanitaria del cultivo

El cultivo de *Musa paradisiaca* es altamente susceptible a enfermedades fitosanitarias, especialmente de origen fúngico, las cuales afectan el crecimiento, reducen la calidad del fruto y disminuyen el rendimiento productivo (41). Estas infecciones se ven favorecidas por condiciones ambientales tropicales y por la acumulación de residuos agrícolas (33).

La inadecuada gestión de estos residuos lignocelulósicos puede contribuir a la proliferación de patógenos y a impactos ambientales negativos, lo que incrementa las pérdidas económicas. Por

ello, se plantea la necesidad de estrategias integradas que combinen el control fitosanitario con la valorización de la biomasa residual (30).

1.2.6. Marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum*

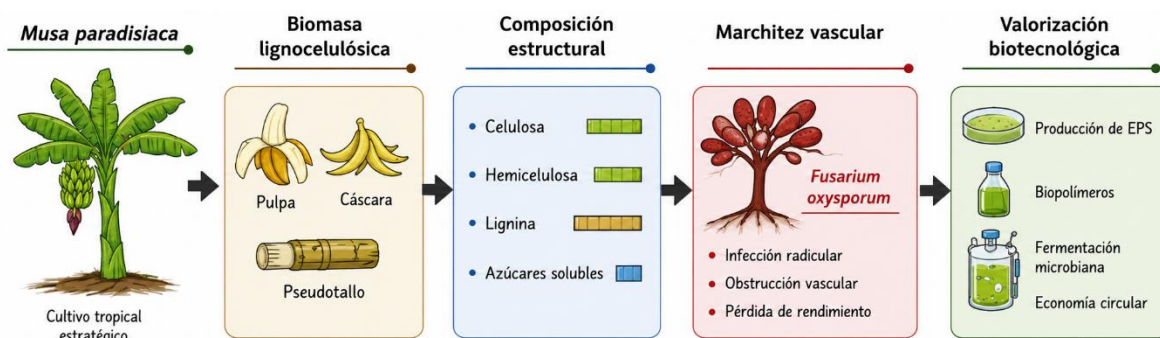
Entre las enfermedades más limitantes en el cultivo de *Musa paradisiaca*, la marchitez vascular asociada a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* destaca por su elevada capacidad destructiva y su impacto a escala global (34). Este fitopatógeno de origen edáfico invade inicialmente el sistema radicular y posteriormente coloniza los tejidos vasculares, estableciéndose de forma preferente en la xilema, donde interfiere con el transporte de agua y nutrientes esenciales (35). La obstrucción progresiva de estos conductos, junto con la producción de toxinas y estructuras fúngicas, desencadena un deterioro fisiológico que se manifiesta en marchitez, clorosis foliar y necrosis sistémica en estadios avanzados. Adicionalmente, la persistencia prolongada del patógeno en el suelo y su eficiente capacidad de dispersión dificultan significativamente su manejo agronómico (36).

1.2.7. Potencial biotecnológico y valorización de residuos agroindustriales

Más allá de su importancia agrícola, *Musa paradisiaca* representa una fuente relevante de biomasa lignocelulósica con aplicaciones emergentes en procesos biotecnológicos sostenibles. Los residuos generados durante su producción, incluyendo pseudotallos, hojas y cáscaras, pueden ser empleados como sustratos en fermentaciones microbianas orientadas a la obtención de metabolitos de interés industrial, tales como enzimas, biopolímeros y biofertilizantes (37,38). En este contexto, la revalorización de subproductos agroindustriales contribuye a la reducción del impacto ambiental asociado a los desechos agrícolas y promueve una gestión más eficiente de los recursos, alineándose con los principios de economía circular. En particular, especies del género *Fusarium*, como *Fusarium oxysporum*, han demostrado capacidad para aprovechar este tipo de sustratos lignocelulósicos en procesos fermentativos, destacando su potencial en la producción de metabolitos como exopolisacáridos de interés biotecnológico (36).

Figura 1

Esquema conceptual de la valorización biotecnológica de *Musa paradisiaca* en la producción de exopolisacáridos.



Nota: Singh et al; Solórzano et al, (28,38).

1.3. *Fusarium oxysporum*: características y potencial biotecnológico

1.3.1. Taxonomía y clasificación

Fusarium oxysporum es un hongo filamentoso perteneciente al filo *Ascomycota*, clase *Sordariomycetes*, orden *Hypocreales* y familia *Nectriaceae*. Este género comprende especies ampliamente distribuidas en suelos agrícolas y ecosistemas naturales, caracterizadas por su capacidad saprofítica y fitopatógena (39).

Dentro del género *Fusarium*, *F. oxysporum* constituye un complejo de especies (species complex) debido a su elevada variabilidad genética y diversidad funcional. Este complejo incluye cepas patógenas altamente especializadas, así como cepas no patógenas con potencial en aplicaciones biotecnológicas (40).

Desde el punto de vista taxonómico, la clasificación de *F. oxysporum* ha evolucionado con el uso de herramientas moleculares, como la secuenciación de genes conservados (por ejemplo, EF-1 α), lo que ha permitido una mejor resolución filogenética y diferenciación entre linajes. Esta base taxonómica resulta clave para estudios de aislamiento y caracterización, como el planteado en la presente investigación (41).

1.3.2. Diversidad genética y formas especiales

Una característica distintiva de *F. oxysporum* es su elevada diversidad genética, la cual se refleja en la existencia de múltiples "formas especiales" (*formae speciales*), definidas por su especificidad hacia hospederos vegetales particulares (15).

Estas formas especiales no necesariamente presentan diferencias morfológicas evidentes, pero sí variaciones en genes asociados a la patogenicidad, especialmente aquellos localizados en cromosomas accesorios o “cromosomas de patogenicidad” (52). Dichos elementos genéticos pueden transferirse horizontalmente entre cepas, contribuyendo a la rápida adaptación del hongo a nuevos hospedadores (42).

En el contexto de *Musa paradisiaca*, se han descrito formas especiales como *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, responsable de la marchitez vascular del banano, lo que evidencia la relevancia agrícola del complejo. Sin embargo, no todas las cepas aisladas de tejidos vegetales son patógenas, lo que abre la posibilidad de identificar variantes con potencial metabólico útil, como en la producción de exopolisacáridos (33).

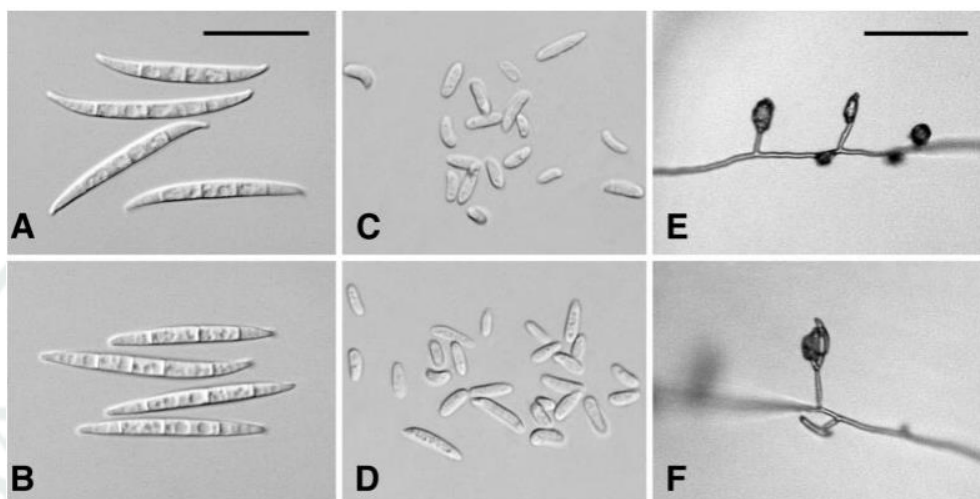
1.3.3. Morfología y estructuras reproductivas

Fusarium oxysporum es un hongo filamentoso que presenta micelio hialino, septado y de rápido crecimiento. En cultivo, forma colonias de aspecto algodonoso con coloración variable entre blanco, rosado o violáceo, dependiendo de las condiciones de incubación. Su identificación se basa en la observación de macroconidios, microconidios y clamidosporas, estructuras clave para su diferenciación taxonómica.

- **Macroconidios:** se originan principalmente en esporodoquios y presentan forma alargada, recta o ligeramente curvada, con paredes delgadas y, típicamente, tres septos, como se observa en la Figura 2 (A–B). La célula apical es cónica y curvada, mientras que la basal puede ser pediforme o puntiaguda. Su abundancia varía entre aislados, aunque suele ser mayor en esporodoquios (40).
- **Microconidios:** son generalmente unicelulares, de forma ovalada a elipsoidal, y se producen en monofiálides cortas, agrupándose en “falsas cabezas” en el micelio aéreo. Suelen presentarse en alta cantidad. Su morfología se muestra en la Figura 2 (C–D).
- **Clamidosporas (clamidoconidios):** son estructuras de resistencia de pared gruesa, formadas de manera individual, en pares o en cadenas cortas. Pueden ubicarse en posiciones terminales o intercalares y presentar superficies lisas o rugosas. Su producción es variable, pero frecuentemente abundante (39,43).

Figura 2
Estructuras morfológicas de *Fusarium oxysporum*.

(A–B) Macroconidios; (C–D) Microconidios; (E–F) Formación de microconidios in situ en medio CLA. Barras de escala: A–D = 25 μ m; E–F = 50 μ m.



Nota: Leslie; Summerell, (39).

Estas estructuras no solo permiten la identificación del hongo, sino que también están relacionadas con su capacidad de supervivencia y adaptación ambiental (41,43).

1.3.4. Fisiología y condiciones de crecimiento

El crecimiento de *F. oxysporum* está influenciado por diversos factores ambientales, entre ellos la temperatura, el pH y la disponibilidad de nutrientes. Generalmente, presenta un crecimiento óptimo entre 25–30 °C y en un rango de pH ligeramente ácido (5.0–6.5) (44).

Desde el punto de vista nutricional, este hongo puede utilizar diversas fuentes de carbono (glucosa, sacarosa, celulosa) y nitrógeno (nitratos, amonio, aminoácidos), lo que le confiere gran versatilidad metabólica. Esta plasticidad fisiológica es fundamental para procesos de optimización de cultivo, como los evaluados en esta investigación, donde la variación de fuentes de carbono y nitrógeno puede influir directamente en la producción de biomasa y metabolitos como los exopolisacáridos (45).

1.3.5. Mecanismos de patogenicidad en plantas

La infección por *Fusarium oxysporum* se inicia principalmente en las raíces, donde conidios y clamidosporas presentes en el suelo germinan en respuesta a exudados radiculares, permitiendo la penetración y colonización de los tejidos corticales (57,59). Durante este proceso, el hongo secreta enzimas hidrolíticas, como celulasas y pectinasas, que degradan la pared celular vegetal

y facilitan la invasión (15). También, produce proteínas efectoras, como las proteínas SIX, que modulan la respuesta inmune del hospedero y favorecen la colonización vascular (46).

Una vez en el xilema, el patógeno se disemina sistémicamente mediante conidios transportados por el flujo transpiratorio. La acumulación de micelio, junto con metabolitos y sustancias gomosas, ocasiona la obstrucción de los vasos, provocando síntomas como clorosis, necrosis y marchitez, que pueden conducir a la muerte de la planta. Este conjunto de eventos forma parte de un ciclo de infección continuo (Figura 3), en el cual las estructuras de resistencia persisten en el suelo y reinician la infección bajo condiciones favorables, asegurando la permanencia del patógeno. Además, estos mecanismos reflejan la capacidad del hongo para secretar moléculas bioactivas, de interés en aplicaciones biotecnológicas (47).

Figura 3

Ciclo de infección de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense en banano.



Nota: Dita et al, (47).

1.3.6. Metabolismo fúngico

El metabolismo de *F. oxysporum* incluye rutas catabólicas y anabólicas complejas que permiten la transformación de sustratos en biomasa y metabolitos secundarios. La glucólisis, el ciclo de Krebs y la vía de las pentosas fosfato desempeñan un papel central en la generación de energía y precursores biosintéticos. Además, este hongo posee la capacidad de secretar enzimas extracelulares que degradan polímeros complejos, facilitando la asimilación de nutrientes. Esta característica es especialmente relevante en medios de cultivo ricos en sustratos complejos. En

el contexto de esta investigación, el estudio del metabolismo permite comprender la relación entre consumo de sustrato (DNS), crecimiento (biomasa) y producción de exopolisacáridos (45).

1.3.7. Producción de metabolitos secundarios

F. oxysporum es capaz de sintetizar diversos metabolitos secundarios, incluyendo micotoxinas, pigmentos y compuestos bioactivos. Estos metabolitos son producidos principalmente durante la fase estacionaria de crecimiento y están influenciados por condiciones ambientales y nutricionales. Entre los compuestos reportados se encuentran fusarinas, beauvericina y ácido fusárico, algunos de los cuales presentan actividades biológicas relevantes. La producción de estos metabolitos refleja la capacidad biosintética del hongo, la cual también se extiende a la síntesis de biopolímeros como los exopolisacáridos (48).

1.3.8. Producción de exopolisacáridos en hongos filamentosos

Los exopolisacáridos (EPS) son polímeros extracelulares de alto peso molecular compuestos principalmente por monosacáridos como glucosa, galactosa y manosa. En hongos filamentosos, estos compuestos cumplen funciones estructurales, protectoras y de interacción con el entorno (5).

La producción de EPS está influenciada por factores como la fuente de carbono, la relación C/N, el pH y la aireación. Generalmente, condiciones de estrés o limitación nutricional favorecen su síntesis (49).

En el caso de *F. oxysporum*, se ha reportado la producción de EPS con posibles aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, debido a sus propiedades viscosas, antioxidantes y bioactivas. Este aspecto es central en la presente investigación, donde se busca optimizar las condiciones de cultivo para maximizar la producción de EPS a partir de un aislamiento obtenido de *Musa paradisiaca* (3).

1.3.9. Potencial biotecnológico de *Fusarium oxysporum*

Más allá de su relevancia como fitopatógeno, *F. oxysporum* posee un importante potencial biotecnológico. Diversas cepas han sido utilizadas en la producción de enzimas industriales, biocontrol de patógenos y síntesis de compuestos bioactivos. De igual manera, su capacidad para producir exopolisacáridos lo posiciona como un candidato prometedor en el desarrollo de biomateriales y productos de valor agregado, especialmente en sectores como el dermocosmético, donde estos compuestos pueden actuar como agentes hidratantes y

estabilizantes. En este contexto, el aislamiento y caracterización de cepas nativas, como la obtenida de *Musa paradisiaca*, representan una estrategia relevante para identificar variantes con alto rendimiento metabólico y potencial aplicación industrial (50).

1.4. Exopolisacáridos (EPS): fundamentos y aplicaciones

1.4.1. Definición y características generales

Los exopolisacáridos (EPS) son biopolímeros extracelulares de naturaleza glucídica producidos por microorganismos como bacterias, levaduras y hongos filamentosos, los cuales pueden encontrarse asociados a la superficie celular o liberados al medio circundante. Estos compuestos desempeñan funciones esenciales en la supervivencia microbiana, incluyendo protección frente a estrés ambiental, retención de agua, interacción célula-sustrato y formación de biopelículas (51).

En hongos filamentosos, particularmente en especies del género *Fusarium*, los EPS también se han vinculado con procesos de colonización vegetal y adaptación a nichos ecológicos específicos. Estudios recientes han demostrado que la producción de EPS en estos organismos puede variar significativamente según la fuente de aislamiento, lo que resalta la importancia de explorar matrices naturales como *Musa paradisiaca* para identificar cepas con alto potencial biotecnológico (52,53).

1.4.2. Clasificación: homopolisacáridos y heteropolisacáridos.

Los EPS se clasifican principalmente en homopolisacáridos y heteropolisacáridos en función de su composición monomérica. Los homopolisacáridos están constituidos por un único tipo de monosacárido (algunos ejemplos son: glucano, manano, galactano, celulosa, almidón y glucógeno), mientras que los heteropolisacáridos presentan combinaciones complejas de diferentes azúcares, incluyendo hexosas, pentosas, ácidos urónicos entre otros (54).

Investigaciones recientes han señalado que los heteropolisacáridos presentan mayor diversidad estructural y funcional, lo que se traduce en propiedades fisicoquímicas más versátiles, tales como mayor capacidad emulsificante, actividad antioxidante y comportamiento reológico superior. En hongos como *F. oxysporum*, la producción predominante de heteropolisacáridos sugiere un potencial significativo para aplicaciones industriales de alto valor agregado (55).

1.4.3. Estructura química y composición

La estructura de los EPS está determinada por factores como el tipo de monosacáridos, la configuración de los enlaces glicosídicos, el grado de ramificación y la presencia de grupos

funcionales adicionales (acetilos, sulfatos o fosfatos). Estas características estructurales influyen directamente en sus propiedades biológicas y fisicoquímicas (56).

Estudios recientes utilizando técnicas como espectroscopía FTIR, RMN y cromatografía han evidenciado que los EPS de origen fúngico presentan estructuras complejas con enlaces β -glucanos y heteropolisacáridos ramificados, los cuales están asociados con actividades bioactivas como inmunomodulación y actividad antioxidante. En el marco de esta investigación, la caracterización estructural de los EPS producidos por *F. oxysporum* permitirá establecer correlaciones entre composición química y funcionalidad, aspecto clave para su valorización biotecnológica (57,58).

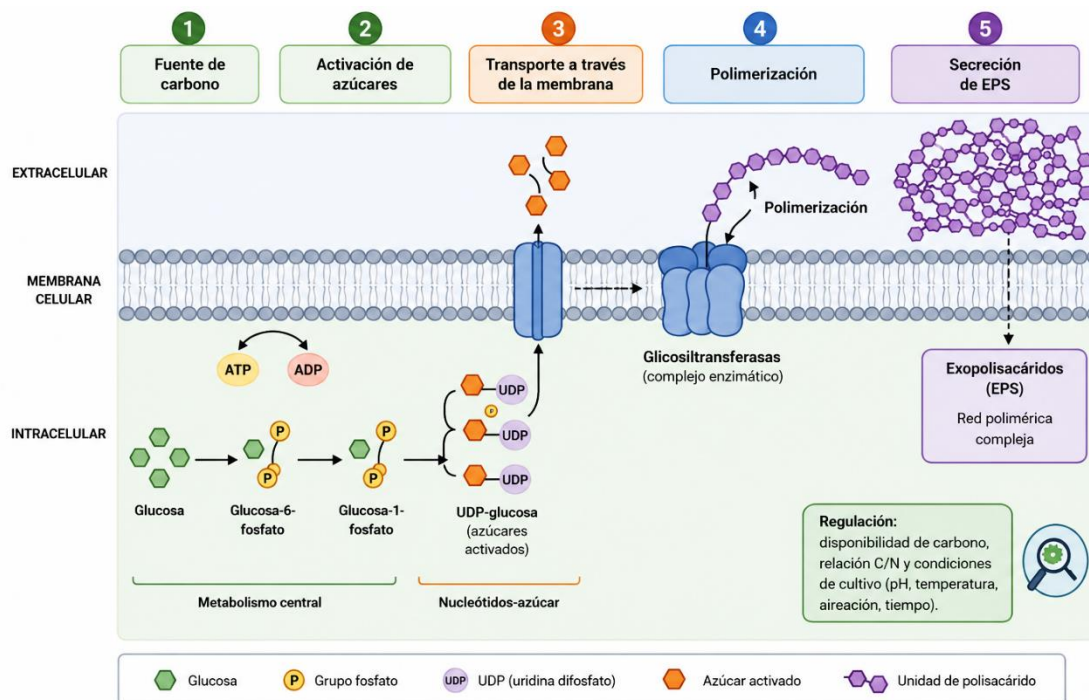
1.4.4. Mecanismos de biosíntesis de EPS

La biosíntesis de exopolisacáridos (EPS) en microorganismos representa un proceso metabólico complejo mediante el cual los intermediarios del metabolismo central son canalizados hacia la formación de biopolímeros extracelulares con elevada diversidad estructural. Este proceso se organiza en tres etapas principales: activación de precursores, polimerización y exportación, las cuales están estrechamente reguladas por factores fisiológicos y ambientales (73,74).

En la fase inicial, los azúcares derivados de rutas como la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato son transformados en azúcares nucleótidos activados, tales como UDP-glucosa, GDP-manosa y UDP-galactosa. Estos compuestos constituyen los sustratos directos para la síntesis del polisacárido, estableciendo un vínculo funcional entre el metabolismo energético celular y la producción de EPS (59,60). La disponibilidad de estos precursores condiciona no solo el rendimiento, sino también la composición química del polímero sintetizado. La etapa de polimerización está mediada por glicosiltransferasas específicas que catalizan la formación de enlaces glucosídicos, determinando la arquitectura primaria del polisacárido. La variabilidad en la secuencia de incorporación de monómeros, así como en el tipo de enlace y grado de ramificación, da lugar a una amplia diversidad estructural que influye directamente en las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los EPS (61,62). Finalmente, la exportación del polisacárido implica sistemas de secreción que permiten su liberación al entorno extracelular o su asociación con la superficie celular, como se observa en la **Figura 4**. Este proceso puede estar acoplado a la síntesis o ocurrir de forma independiente, dependiendo del tipo de microorganismo y del sistema biosintético implicado. La eficiencia de esta etapa es determinante para la acumulación del EPS en el medio de cultivo y, por tanto, para su aprovechamiento biotecnológico (59,63).

Figura 4

Ruta general de biosíntesis de exopolisacáridos (EPS) en microorganismos.



Nota: Liu; Yao, (59).

Aunque estos mecanismos generales son compartidos por diversos grupos microbianos, existen diferencias significativas en la organización celular y en los sistemas enzimáticos involucrados. Estas particularidades serán abordadas en la siguiente sección desde una perspectiva productiva y comparativa (62).

1.4.5. Regulación metabólica de la síntesis de EPS

La síntesis de EPS está sujeta a regulación metabólica compleja influenciada por factores ambientales y nutricionales. Un alto cociente carbono/nitrógeno favorece la acumulación de EPS, debido a la canalización del exceso de carbono hacia rutas de almacenamiento en forma de polisacáridos (64). Adicionalmente, condiciones de estrés como limitación de nutrientes, cambios de pH o estrés osmótico pueden inducir la sobreproducción de EPS como mecanismo de defensa celular (65). Investigaciones recientes han identificado genes reguladores y sistemas de señalización que controlan la expresión de enzimas clave en la biosíntesis de EPS, lo que abre posibilidades para estrategias de ingeniería metabólica (66).

1.4.6. Métodos de extracción y purificación

La recuperación de EPS a partir de cultivos microbianos implica etapas de separación de biomasa, precipitación y purificación. Generalmente, se emplea etanol frío para inducir la

precipitación del polisacárido, seguido de procesos como diálisis, ultrafiltración y cromatografía. Avances recientes han incorporado técnicas más eficientes como la purificación asistida por membranas y cromatografía de alta resolución, que permiten obtener EPS con mayor grado de pureza y reproducibilidad (67).

En el caso de hongos filamentosos, la viscosidad del medio y la presencia de metabolitos secundarios representan desafíos adicionales, por lo que la estandarización del proceso de extracción es fundamental para la caracterización adecuada (68).

1.4.7. Métodos de cuantificación

La cuantificación de EPS puede realizarse mediante métodos clásicos y modernos. El método DNS continúa siendo ampliamente utilizado para la determinación de azúcares reductores tras hidrólisis, mientras que el método gravimétrico permite estimar la producción total de biomasa polisacáridica (69). Adicionalmente, técnicas como el método fenol-ácido sulfúrico y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) permiten una cuantificación más precisa y caracterización detallada de los monosacáridos constituyentes. La combinación de estos métodos proporciona una evaluación robusta de la producción de EPS en estudios experimentales como el presente (70).

1.4.8. Propiedades fisicoquímicas

Los EPS presentan propiedades fisicoquímicas altamente dependientes de su estructura molecular, incluyendo viscosidad, solubilidad, capacidad de retención de agua y comportamiento reológico (71). Estudios recientes han destacado su capacidad para formar geles estables, actuar como agentes emulsificantes y mejorar la estabilidad de sistemas coloidales, lo que los convierte en compuestos de interés en múltiples industrias. En EPS de origen fúngico, se ha observado además actividad antioxidante y biocompatibilidad, características relevantes para aplicaciones biomédicas y cosméticas (52).

1.4.9. Aplicaciones industriales, farmacéuticas y cosméticas

Los EPS tienen aplicaciones ampliamente documentadas en sectores industriales. En la industria alimentaria, se utilizan como estabilizantes y modificadores de textura; en farmacéutica, se investigan por sus propiedades bioactivas, incluyendo actividad inmunomoduladora y antioxidante. En la industria cosmética, los EPS han cobrado creciente interés debido a su capacidad hidratante, formación de películas protectoras y mejora de la sensorialidad de formulaciones dermatológicas (72).

En este contexto, la producción de EPS a partir de *F. oxysporum* aislado de *Musa paradisiaca* representa una estrategia innovadora para el desarrollo de bioproductos sostenibles, alineados con tendencias actuales de economía circular y biotecnología verde (73).

1.5. Producción de EPS en microorganismos

1.5.1. Producción de EPS en bacterias

En bacterias, la producción de EPS se lleva a cabo mediante sistemas biosintéticos organizados principalmente a nivel de la membrana citoplasmática, lo que permite una síntesis eficiente y altamente coordinada. Los mecanismos más relevantes incluyen las vías dependientes de Wzx/Wzy, los sistemas de transporte tipo ABC y las rutas mediadas por polisacárido sintasas. En el sistema Wzx/Wzy, las unidades repetitivas del polisacárido son sintetizadas intracelularmente y posteriormente translocadas a través de la membrana mediante proteínas específicas, donde son polimerizadas. Por otro lado, en los sistemas ABC, el polisacárido completo es ensamblado en el citoplasma y exportado mediante transportadores dependientes de ATP. Asimismo, los sistemas de sintasas permiten la polimerización y exportación simultáneas del polímero, lo que optimiza la eficiencia del proceso (74,75).

Desde el punto de vista biotecnológico, las bacterias presentan ventajas significativas, tales como rápido crecimiento, facilidad de manipulación genética y altos rendimientos de producción, lo que las convierte en sistemas ampliamente utilizados a escala industrial. No obstante, los EPS bacterianos suelen presentar menor complejidad estructural en comparación con los producidos por organismos eucariotas, lo que puede limitar ciertas aplicaciones de alto valor funcional (76).

1.5.2. Producción de EPS en hongos

En los hongos filamentosos, la producción de EPS se caracteriza por un sistema biosintético compartimentalizado, en el que participan organelos como el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi. Este tipo de organización permite una mayor sofisticación en la síntesis y modificación estructural de los polisacáridos (61,62).

Las glicosiltransferasas localizadas en el aparato de Golgi catalizan la elongación y modificación del polisacárido, el cual es posteriormente transportado hacia la membrana plasmática mediante vesículas secretoras. Este mecanismo favorece la generación de EPS con mayor heterogeneidad estructural, ramificación y funcionalidad, lo que se traduce en propiedades fisicoquímicas avanzadas. Aunque los hongos presentan tasas de crecimiento más lentas y requieren condiciones de cultivo más específicas, destacan por su capacidad para

producir biopolímeros con propiedades bioactivas superiores, lo que ha incrementado su relevancia en aplicaciones farmacéuticas, cosméticas y biomédicas (76).

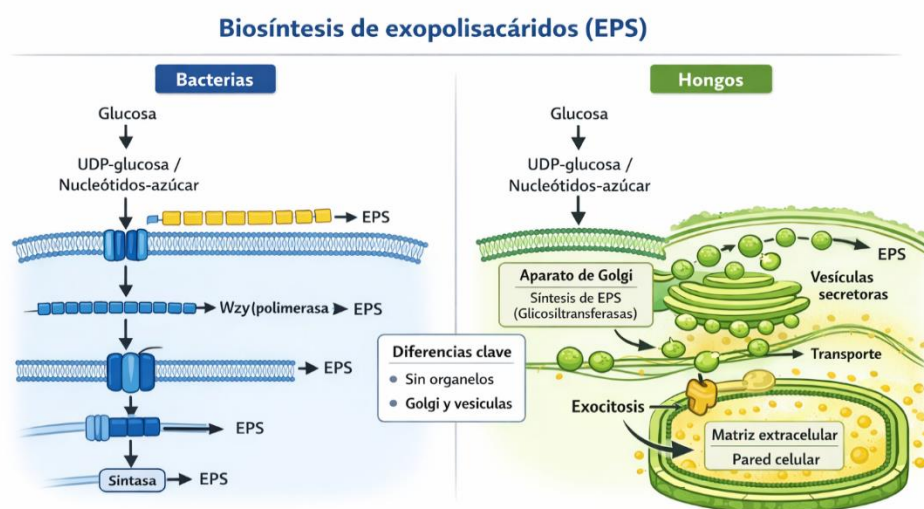
1.5.3. Comparación entre sistemas bacterianos y fúngicos

Las diferencias entre bacterias y hongos en la producción de EPS responden principalmente a su organización celular y a la complejidad de sus sistemas biosintéticos. En bacterias, la síntesis está estrechamente asociada a la membrana plasmática y sigue rutas relativamente directas, lo que favorece altos rendimientos y rapidez en la producción (74). En contraste, los hongos presentan un sistema biosintético compartimentalizado que involucra múltiples etapas intracelulares, incluyendo procesamiento en el aparato de Golgi y transporte vesicular (Figura 5). Esta organización permite la formación de polisacáridos con estructuras más complejas y propiedades funcionales superiores, tales como mayor viscosidad y bioactividad (59).

Desde una perspectiva comparativa, puede establecerse que los sistemas bacterianos están orientados a la eficiencia productiva, mientras que los sistemas fúngicos destacan por la calidad estructural y funcional de los EPS producidos. Esta diferencia resulta clave en la selección del microorganismo dependiendo de la aplicación final del biopolímero, particularmente en sectores donde la funcionalidad biológica es determinante. En este contexto, los hongos filamentosos, como *Fusarium oxysporum*, representan una alternativa prometedora para la producción de EPS con propiedades diferenciadas, aunque su aprovechamiento requiere una optimización rigurosa de las condiciones de cultivo (76).

Figura 5

Esquema comparativo de la biosíntesis de EPS en bacterias (vías Wzx/Wzy, ABC y sintasa) y hongos filamentosos (síntesis en Golgi y secreción vesicular).



Nota: Elaboración propia basada en (89–91).

1.5.4. Ventajas de los hongos filamentosos en bioprocesos

Los hongos filamentosos constituyen sistemas biotecnológicos altamente eficientes para la producción de exopolisacáridos (EPS), principalmente debido a su capacidad de secreción extracelular, lo que facilita los procesos de recuperación y purificación, reduciendo la complejidad del procesamiento downstream y los costos operativos (77).

Adicionalmente, presentan una notable versatilidad metabólica que les permite utilizar diversas fuentes de carbono, incluyendo residuos agroindustriales, contribuyendo a la sostenibilidad de los bioprocesos y al aprovechamiento de subproductos en el marco de la economía circular (78). También, estos microorganismos muestran tolerancia a variaciones en condiciones fisicoquímicas como pH, temperatura y disponibilidad de oxígeno, y pueden desarrollarse tanto en fermentación sumergida como en estado sólido, lo que amplía las estrategias de optimización del cultivo. Como se observa en la **Tabla 1**, estas características se reflejan en la diversidad de hongos productores de EPS y en sus distintos rendimientos bajo condiciones de cultivo específicas. En este contexto, el aislamiento de cepas a partir de *Musa paradisiaca* podría favorecer la obtención de microorganismos adaptados a sustratos naturales, incrementando la eficiencia productiva (79).

1.6. Factores que influyen en la producción de exopolisacáridos (EPS)

La producción de exopolisacáridos (EPS) en hongos filamentosos es un proceso metabólicamente regulado que depende de la interacción de factores fisicoquímicos y nutricionales. Estos biopolímeros se sintetizan a partir de intermediarios del metabolismo central, por lo que su rendimiento está estrechamente vinculado a la disponibilidad de nutrientes y a las condiciones del cultivo. En términos generales, diversos estudios reportan que la producción de EPS en sistemas fúngicos puede situarse en rangos aproximados de 5 a 20 g/L, dependiendo de la cepa y de la optimización de las condiciones de cultivo (80,81).

Asimismo, dichas condiciones influyen en propiedades estructurales del EPS, como el peso molecular y su composición monosacarídica, factores que determinan sus propiedades funcionales y potenciales aplicaciones biotecnológicas (82).

1.6.1. Influencia del pH en sistemas microbianos

El pH del medio de cultivo desempeña un papel fundamental en la regulación de la actividad enzimática, la disponibilidad de nutrientes y la estabilidad de los sistemas celulares. En hongos productores de EPS, se ha descrito que valores ligeramente ácidos, generalmente en un rango de pH 5.0 a 6.5, favorecen la biosíntesis de polisacáridos extracelulares (82,83).

El control del pH contribuye a mantener condiciones óptimas para la actividad de enzimas como las glicosiltransferasas, responsables de la formación de enlaces glucosídicos. Asimismo, el pH actúa como una señal ambiental que modula la expresión génica en hongos, influyendo en rutas metabólicas relacionadas con la secreción de metabolitos. Por el contrario, desviaciones significativas de este rango pueden afectar la estabilidad enzimática y reducir la eficiencia del proceso productivo. En *Fusarium oxysporum*, este parámetro también influye en la morfología micelial y en la capacidad de secreción, por lo que su control es esencial en la optimización del cultivo (80).

1.6.2. Temperatura y condiciones de incubación

La temperatura es un factor clave que regula la velocidad de las reacciones metabólicas y el crecimiento microbiano. En hongos filamentosos, la producción de EPS suele favorecerse en un rango de temperatura de 25 a 30 °C, donde se optimiza la actividad enzimática y la dinámica celular (82).

Condiciones fuera de este rango pueden inducir estrés térmico o disminuir la eficiencia metabólica, afectando la biosíntesis de polisacáridos. Además, la temperatura puede influir en propiedades del medio, como la viscosidad y la difusión de nutrientes, lo que repercute indirectamente en la producción de EPS. En el caso de *Fusarium oxysporum*, la evaluación de este parámetro permitirá identificar condiciones que favorezcan tanto el crecimiento como la producción de metabolitos extracelulares (84).

1.6.3. Fuente de carbono

La fuente de carbono constituye el principal sustrato para la producción de EPS, al proporcionar energía y precursores estructurales. La glucosa es uno de los sustratos más utilizados debido a su fácil asimilación, empleándose comúnmente en concentraciones intermedias que permiten un adecuado equilibrio metabólico (80,82). Sin embargo, el uso de sustratos alternativos, especialmente residuos agroindustriales, ha cobrado relevancia en los últimos años por su bajo costo y sostenibilidad. Estos materiales pueden ser hidrolizados por enzimas fúngicas, liberando azúcares fermentables que contribuyen a la biosíntesis de EPS. Asimismo, el tipo de fuente de carbono influye en la composición y estructura del polisacárido producido, afectando sus propiedades fisicoquímicas y funcionales. En esta investigación, el uso de *Musa paradisiaca* representa una estrategia viable para evaluar su potencial como sustrato alternativo (81).

1.6.4. Fuente de nitrógeno

El nitrógeno es un elemento esencial para la síntesis de proteínas, enzimas y cofactores implicados en la producción de EPS. Pueden ser orgánicas (extracto de levadura, peptonas) o inorgánicas (nitratos, amonio), y su naturaleza influye en la producción de EPS. Las fuentes orgánicas, como el extracto de levadura, son ampliamente utilizadas debido a su contenido en aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento (80,82). La disponibilidad de nitrógeno influye en el balance metabólico del microorganismo. Condiciones de disponibilidad moderada tienden a favorecer la producción de EPS, mientras que concentraciones elevadas promueven el crecimiento celular por encima de la síntesis de metabolitos secundarios. En *Fusarium oxysporum*, la selección de la fuente nitrogenada será determinante para optimizar la eficiencia del proceso productivo (84).

1.6.5. Relación carbono/nitrógeno (C/N)

La relación carbono/nitrógeno (C/N) es un parámetro importante que regula la distribución del metabolismo entre crecimiento celular y producción de EPS. En sistemas fúngicos, se ha reportado que una mayor proporción de carbono respecto al nitrógeno, generalmente entre 20:1 y 40:1, favorece la acumulación de polisacáridos extracelulares (82).

Este comportamiento se asocia con una limitación relativa de nitrógeno, la cual induce al microorganismo a redirigir el carbono hacia la síntesis de compuestos extracelulares. En contraste, relaciones C/N bajas favorecen el crecimiento celular activo. En esta investigación, la relación C/N constituye un factor relevante en la optimización de la producción de EPS en *Fusarium oxysporum* (84).

1.6.6. Aireación y condiciones de cultivo

La aireación es un factor determinante en cultivos aeróbicos, ya que el oxígeno es necesario para la respiración celular y la generación de energía metabólica. En cultivos de hongos filamentosos, la aireación también influye en la morfología del crecimiento, lo que puede afectar la secreción de EPS (97). Condiciones adecuadas de agitación permiten mejorar la transferencia de oxígeno y la homogeneidad del medio, favoreciendo la producción. Sin embargo, niveles excesivos pueden generar daño mecánico en el micelio, afectando negativamente el proceso. En *Fusarium oxysporum*, el control de la aireación será clave para optimizar tanto el crecimiento como la producción de polisacáridos extracelulares (84).

1.6.7. Tiempo de fermentación

El tiempo de fermentación define la fase fisiológica del microorganismo y, en consecuencia, la producción de EPS. En hongos filamentosos, la síntesis de estos biopolímeros suele incrementarse en la fase estacionaria del crecimiento, cuando los nutrientes comienzan a limitarse (80).

En términos generales, la producción máxima se alcanza en periodos intermedios del cultivo, suele alcanzarse entre 7 y 14 días, tras los cuales puede producirse degradación del polímero debido a la actividad enzimática. Por ello, la determinación del tiempo óptimo de fermentación resulta fundamental para maximizar el rendimiento. En esta investigación, este parámetro permitirá identificar el punto de mayor producción de EPS en *Fusarium oxysporum* (83).

1.6.8. Interacción de variables en sistemas biológicos

Los factores que influyen en la producción de EPS no actúan de manera independiente, sino que interactúan entre sí generando efectos sinérgicos o antagonistas. Por ello, la optimización de estos procesos requiere un enfoque multifactorial que considere la interacción entre variables (82).

El uso de herramientas estadísticas, como la metodología de superficie de respuesta, ha demostrado ser eficaz para identificar condiciones óptimas de cultivo, permitiendo mejorar significativamente la producción de EPS. En el contexto de esta investigación, el análisis integrado de variables como pH, temperatura, fuentes nutricionales y tiempo de fermentación permitirá establecer condiciones óptimas para la producción de EPS por *Fusarium oxysporum* aislado de *Musa paradisiaca*, contribuyendo al desarrollo de procesos biotecnológicos sostenibles (80).

1.7. Cinética y optimización del proceso biotecnológico

La cinética de los procesos biotecnológicos constituye un pilar fundamental para comprender, describir y optimizar la producción de metabolitos de interés. En sistemas microbianos, este enfoque permite establecer relaciones cuantitativas entre el crecimiento celular, el consumo de sustrato y la formación de productos, facilitando el diseño de estrategias que maximicen el rendimiento del proceso. En particular, en hongos filamentosos como *Fusarium oxysporum*, la complejidad morfológica y metabólica introduce variaciones en los patrones cinéticos, lo que exige un análisis más detallado para su adecuada optimización. En el contexto de la producción de exopolisacáridos (EPS), la cinética permite identificar condiciones óptimas de cultivo,

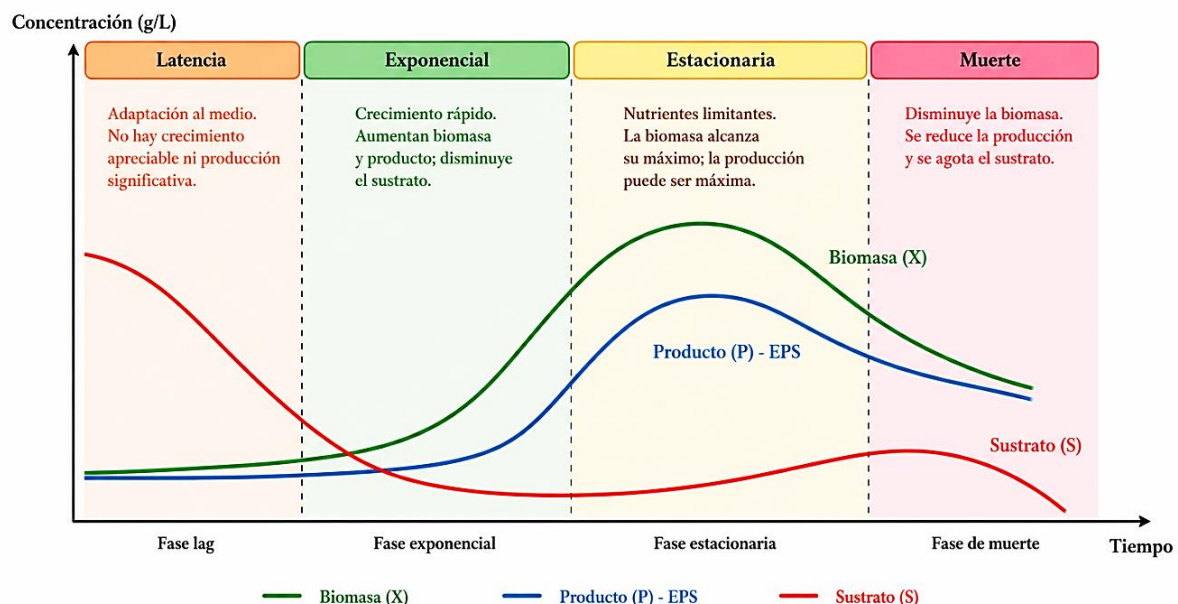
tiempos de cosecha y estrategias de alimentación, aspectos clave para mejorar la productividad del sistema (85,86).

1.7.1. Fases de crecimiento microbiano

El crecimiento microbiano en sistemas discontinuos (batch) sigue un patrón característico dividido en cuatro fases: latencia, exponencial, estacionaria y de muerte. Durante la fase de latencia, los microorganismos se adaptan al nuevo entorno sin incremento significativo en biomasa. Posteriormente, en la fase exponencial, se produce una rápida división celular con una tasa específica de crecimiento constante, considerada máxima bajo condiciones óptimas. La fase estacionaria se caracteriza por un equilibrio entre crecimiento y muerte celular debido al agotamiento de nutrientes o acumulación de metabolitos inhibidores, mientras que la fase de declive implica la disminución progresiva de la viabilidad celular. Como se observa en la **Figura 6**, la dinámica del crecimiento microbiano que sigue un patrón típico dividido en fases de latencia, exponencial, estacionaria y de muerte, donde la producción de exopolisacáridos (EPS) se asocia principalmente con la fase exponencial tardía y la fase estacionaria (87,88).

Figura 6

Curva de crecimiento microbiano, consumo de sustrato y formación de exopolisacáridos (EPS) en función del tiempo, mostrando las fases de latencia, exponencial, estacionaria y de muerte.



Nota: Madigan et al, (87).

En hongos filamentosos, estas fases pueden presentar variaciones debido a la formación de estructuras como micelio disperso o pellets, lo cual influye en la transferencia de oxígeno y nutrientes. En el caso de *Fusarium oxysporum*, estas características morfológicas pueden afectar directamente la producción de EPS, ya que la síntesis de estos biopolímeros suele intensificarse en etapas específicas del crecimiento, particularmente hacia la fase estacionaria (89).

1.7.2. Cinética de crecimiento en hongos filamentosos

La cinética de crecimiento en hongos filamentosos presenta particularidades asociadas a su organización multicelular y a la heterogeneidad del cultivo. A diferencia de bacterias unicelulares, estos organismos desarrollan redes miceliales cuya extensión depende tanto de la tasa de elongación de las hifas como de la ramificación. Este comportamiento dificulta la medición directa de parámetros cinéticos y requiere el uso de modelos adaptados, como el modelo de crecimiento de Monod, con modificaciones que consideran limitaciones difusionales (86,90).

La tasa específica de crecimiento (μ) en estos sistemas no solo depende de la concentración de sustrato, sino también de factores físicos como la viscosidad del medio y la disponibilidad de oxígeno. En cultivos de *Fusarium oxysporum*, se ha observado que la morfología influye significativamente en la eficiencia del proceso, afectando tanto la acumulación de biomasa como la producción de EPS. En este sentido, el control de variables como agitación, aireación y concentración de nutrientes resulta esencial para dirigir la cinética hacia condiciones favorables de producción (91).

1.7.3. Relación biomasa–sustrato–producto (X–S–P)

La relación entre biomasa (X), sustrato (S) y producto (P) constituye la base del análisis cinético en bioprocesos. La relación entre biomasa, sustrato y producto durante el cultivo se representa en la **Figura 5**, evidenciando que el consumo de sustrato precede al incremento en la producción de EPS. Esta relación se describe mediante coeficientes de rendimiento, como el rendimiento de biomasa respecto al sustrato ($Y_{x/s}$) y el rendimiento de producto respecto al sustrato ($Y_{p/s}$), los cuales permiten evaluar la eficiencia del sistema (86,87).

El consumo de sustrato está directamente vinculado tanto al crecimiento celular como a la formación de metabolitos. En el caso de la producción de EPS, parte del carbono asimilado se dirige hacia la síntesis de estos polímeros extracelulares, lo que implica una competencia metabólica entre crecimiento y producción. Para *Fusarium oxysporum*, el estudio de esta

relación resulta crucial, ya que permite determinar condiciones en las cuales el flujo de carbono se favorece hacia la producción de EPS en lugar de la generación exclusiva de biomasa. Esto es especialmente relevante en procesos de optimización, donde se busca maximizar el rendimiento del producto final (1).

1.7.4. Producción asociada y no asociada al crecimiento

La formación de productos en cultivos microbianos puede clasificarse en dos categorías principales: asociada al crecimiento y no asociada al crecimiento. En la producción asociada, la síntesis del producto ocurre principalmente durante la fase exponencial y está directamente ligada a la tasa de crecimiento celular. En contraste, la producción no asociada se manifiesta principalmente en la fase estacionaria, cuando el crecimiento se desacelera o cesa (86,88).

Muchos exopolisacáridos microbianos son considerados metabolitos secundarios o productos parcialmente asociados al crecimiento, ya que su síntesis puede iniciar durante la fase exponencial, pero intensificarse en la fase estacionaria. En *Fusarium oxysporum*, este comportamiento sugiere que la producción de EPS podría seguir un modelo mixto, donde tanto el crecimiento como los factores de estrés ambiental influyen en la síntesis. Este entendimiento permite diseñar estrategias de cultivo más eficientes, como la limitación controlada de nutrientes o la extensión de la fase estacionaria para incrementar la producción (91,1).

1.7.5. Determinación del tiempo óptimo de producción

La determinación del tiempo óptimo de producción es un aspecto crítico en la optimización de bioprocesos, ya que define el momento en el cual se alcanza la máxima concentración del producto de interés antes de que ocurran procesos de degradación o pérdida de actividad (85).

Este parámetro se establece mediante el monitoreo simultáneo de biomasa, consumo de sustrato y formación de producto a lo largo del tiempo. La integración de estos datos permite identificar el punto en el cual la velocidad de producción es máxima o el rendimiento es más favorable. En el caso de la producción de EPS por *Fusarium oxysporum*, el tiempo óptimo suele coincidir con el final de la fase exponencial o el inicio de la fase estacionaria, dependiendo de las condiciones de cultivo. Por ello, el análisis cinético no solo facilita la comprensión del proceso, sino que también orienta la toma de decisiones para la cosecha del cultivo y la maximización del rendimiento (89,91).

1.7.6. Estrategias de optimización en bioprocesos

La optimización de bioprocesos representa un componente esencial en la ingeniería metabólica y de fermentación, ya que permite incrementar la eficiencia de producción mediante el ajuste simultáneo de múltiples variables operacionales. En sistemas biológicos complejos como los hongos filamentosos, la producción de exopolisacáridos (EPS) está influenciada por interacciones no lineales entre factores ambientales y nutricionales, lo que dificulta la predicción mediante enfoques univariantes tradicionales. El enfoque clásico “one-factor-at-a-time” ha sido ampliamente cuestionado debido a su incapacidad para detectar interacciones entre variables y su baja eficiencia experimental. En contraste, los métodos estadísticos multivariantes permiten evaluar simultáneamente efectos principales e interacciones, reduciendo el número de experimentos y aumentando la robustez del modelo predictivo (7).

En bioprocesos fúngicos, estas estrategias son particularmente relevantes debido a la plasticidad metabólica de organismos como *Fusarium oxysporum*, donde la producción de metabolitos extracelulares está estrechamente vinculada a la redistribución del flujo de carbono bajo condiciones ambientales específicas (91).

1.7.7. Metodología de superficie de respuesta (RSM)

La metodología de superficie de respuesta (RSM) es un conjunto de técnicas estadísticas utilizadas para modelar y optimizar procesos en los que una variable de respuesta depende de múltiples factores independientes. Su fundamento se basa en la aproximación de sistemas complejos mediante modelos polinómicos de segundo orden, capaces de describir tanto efectos lineales como interacciones y curvaturas en el espacio experimental. Este enfoque fue formalmente introducido por Box y Wilson en el desarrollo teórico de la optimización experimental. El modelo general se expresa como (92).

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

Donde Y representa la respuesta experimental y X_i los factores independientes y β los coeficientes de regresión asociados a cada término del modelo. En biotecnología, la RSM ha demostrado alta eficiencia en la optimización de metabolitos microbianos, incluyendo polisacáridos, enzimas y compuestos bioactivos, permitiendo identificar condiciones óptimas con menor carga experimental y alta precisión predictiva. En el caso de EPS fúngicos, la RSM es particularmente útil debido a la naturaleza no lineal de su biosíntesis, la cual depende de la interacción entre disponibilidad de carbono, nitrógeno y condiciones físico-químicas del cultivo (93).

1.7.8. Diseño experimental Box–Behnken

El diseño Box–Behnken (BBD) es un diseño experimental de segundo orden ampliamente utilizado dentro de la RSM debido a su eficiencia estadística y su capacidad para evitar combinaciones extremas de factores. Este diseño reduce el número de experimentos requeridos en comparación con diseños factoriales completos, manteniendo alta precisión en la estimación de efectos cuadráticos e interacciones. El BBD es especialmente adecuado para sistemas biológicos sensibles, ya que evita condiciones experimentales extremas que podrían afectar la viabilidad celular o inducir estrés metabólico no representativo del sistema real (7).

En procesos de fermentación fúngica, su aplicación permite optimizar simultáneamente variables críticas como pH, temperatura, concentración de sustrato y tiempo de incubación, maximizando la producción de EPS en condiciones controladas. Un estudio en hongos productores de polisacáridos demostró que el uso de BBD permite alcanzar coeficientes de determinación elevados ($R^2 > 0.98$), validando su capacidad predictiva en sistemas biológicos complejos (94).

1.7.9. Modelos matemáticos en la optimización de bioprocesos

Los modelos matemáticos en bioprocesos constituyen representaciones simplificadas de sistemas biológicos que permiten describir la relación entre variables de entrada y salida. En la producción de EPS, estos modelos integran fenómenos de crecimiento celular, consumo de sustrato y síntesis de metabolitos extracelulares. El modelo polinómico de segundo orden utilizado en RSM no pretende describir mecanismos bioquímicos detallados, sino aproximar el comportamiento global del sistema dentro de un rango experimental definido. Su utilidad radica en su capacidad predictiva y en la identificación de regiones óptimas de operación. En hongos filamentosos como *Fusarium oxysporum*, la producción de EPS está asociada a cambios en el flujo metabólico del carbono hacia rutas de biosíntesis de polisacáridos extracelulares, especialmente bajo condiciones de limitación nutricional o estrés ambiental. Este comportamiento justifica el uso de modelos empíricos, ya que los sistemas biológicos presentan alta complejidad no lineal y variabilidad intrínseca (91).

1.7.10. Análisis de varianza (ANOVA)

El análisis de varianza (ANOVA) es una herramienta estadística fundamental para evaluar la significancia de los modelos obtenidos mediante RSM. Su función principal es determinar si las variaciones observadas en la respuesta son atribuibles a los factores estudiados o al error experimental. Los parámetros clave incluyen el valor F, el nivel de significancia (*p-value*), el

coeficiente de determinación ajustado (R^2 adj) y la prueba de falta de ajuste (Lack of Fit). Un modelo estadísticamente robusto presenta alta significancia global, bajo error residual y ausencia de falta de ajuste significativo. En estudios de optimización de EPS, el ANOVA ha demostrado ser crucial para validar modelos predictivos en sistemas biológicos altamente variables, garantizando la reproducibilidad experimental (93).

1.7.11. Interacción de variables y optimización de condiciones

En sistemas biológicos complejos, las variables no actúan de forma independiente, sino que presentan interacciones sinérgicas o antagonistas que afectan la respuesta global del sistema. Estas interacciones son particularmente relevantes en hongos filamentosos, donde la morfología micelial influye directamente en la transferencia de masa y en la eficiencia de secreción de EPS. La RSM permite cuantificar estas interacciones mediante términos cruzados en el modelo matemático, lo que facilita la identificación de combinaciones óptimas de factores. Desde una perspectiva metabólica, estas interacciones reflejan la regulación simultánea de rutas de carbono, energía y balance redox. En *Fusarium oxysporum*, la interacción entre pH y fuente de nitrógeno puede modificar la actividad enzimática asociada a la síntesis de polisacáridos, generando variaciones significativas en el rendimiento de EPS (91).



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales y métodos

1.1. Área de estudio

1.1.1. Ubicación espacial

Los trabajos de muestreo se realizaron en campos de cultivo de *Musa paradisiaca* con presencia de plantas que presentaban síntomas de pudrición, ubicados en el Centro Poblado Molino Cajanleque, distrito de Chocope, provincia de Ascope, región La Libertad, Perú. El área de estudio presenta un clima cálido-seco subtropical, con una temperatura media anual entre 22 y 28 °C. El sitio de muestreo fue seleccionado en coordinación con el productor agrícola responsable del cultivo, de donde se recolectó tejido vegetal en estado de descomposición para el aislamiento de hongos con potencial biotecnológico.

Figura 7

Esquema de cultivo de Plátano de Molino Cajanleque ubicado en el distrito de Chocope



Nota: Sistema Nacional de Información Ambiental, (95).

1.1.2. Ubicación temporal

El trabajo experimental se realizó entre los meses de enero de 2025 y marzo de 2026 conforme a la disponibilidad de los equipos analíticos.

1.1.3. Ambientes de investigación

La investigación presente fue realizada en los ambientes de investigación del Laboratorio de Bioprocesos (F-405), del Laboratorio de Microalgas (E-406) y del Laboratorio H-301 bajo

condiciones controladas de bioseguridad y esterilidad de nivel básico (BSL-1) de la Universidad Católica de Santa María (UCSM) en la provincia de Arequipa, departamento de Arequipa, Perú.

1.2. Materiales, reactivos, equipos y software

1.2.1. Material biológico

Se extrajeron muestras del micelio correspondiente al sistema vascular de la planta (xilema/floema) de plantas enfermas de banano (cultivo de musáceas, *Musa paradisiaca*), las cuales fueron extraídas con cuidado y procurando evitar la contaminación con la rizosfera o su tejido radicular externo, con el objetivo de obtener aislamientos fúngicos del tejido vascular, para su posterior identificación morfológica y molecular.

1.2.2. Materiales de laboratorio

- Placas Petri 90 x 15 mm, asa de Kolle con punta y aro, mechero Bunsen, cinta Parafilm.
- Lámina portaobjetos, pinzas y cinta adhesiva transparente (para montaje de micelio).
- Tubos de ensayo con tapa rosca de 16 x 150 mm, matraces, fioles, y probetas de vidrio de diferentes volúmenes.
- Vasos de precipitación de 10 ml, 50 ml, 100 ml y 250 ml.
- Bagueta
- Tubos Eppendorf de 1,5 mL
- Tubos Falcon de 15 y 50 ml
- Micropipetas de 200 y 1000 μ L, puntas para micropipeta de 20 – 200 μ L y 100 – 1000 μ L.
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 mL.
- Tiras de pH.
- Piseta, espátula, cucharas, mortero, gradillas

1.2.3. Reactivos Químicos

- PDA (Potato Dextrose Agar)
- Etanol 70 y 96 %, hipoclorito de sodio (4%)
- Azul de Lactofenol

- Fuente de carbono y nitrógeno: Glucosa, Extracto de levadura
- Fuentes de fósforo y fosfatos / Tampones (buffers): Fosfato monopotásico (K_2HPO_4)
- Fuente de Potasio/Osmorregulador: KCl.
- Fuente de iones metálicos/cofactores: sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) y sulfato ferroso heptahidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$).

- Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

- Ácido sulfúrico concentrado

- Fenol al 5%

1.2.4. Equipos

- Balanza analítica Ohaus Adventurer AR2140
- Vortex con cabezal adaptador (código 004050)
- Baño María Selecta Precistern
- Cámara de Flujo Laminar Horizontal C4 (código 03005000107)
- Microscopio óptico Kossodo 0L01640
- Cámara de incubación de metal de estufa (código: 03005004296)
- Refrigeradora
- Autoclave Vertical GEMMY INDUSTRIAL CORP. (N° 1318969)
- Campana de extracción de gases
- Agitador Orbital (03-005-001348)
- Cocinilla Eléctrica
- Desecador para Vacío (03005003987)
- Centrifugadora
- Equipo de FTIR, Thermo Scientific Nicolet Summit FTIR Spectrometer.
- Espectrofotómetro UV–Visible (Shimadzu UV-1800®).
- pH-metro digital y agitador magnético.
- Lector de microplacas

1.2.5. Otros materiales

- Papel Aluminio
- Papel Craft
- Bolsas de Polipropileno
- Guantes, mascarilla y gorra estéril
- Rotuladores, ligas, regla y cinta Masking Tape
- Papel Toalla Absorbente
- Pinzas y bisturí
- Filtros de 0.45 μm

1.2.6. Software estadístico

Se empleó el software Design Expert para obtener los datos estadísticos mediante análisis de varianza (ANOVA), así como para la generación de modelos matemáticos y la generación de gráficas de optimización de las variables evaluadas.

1.3. Métodos

1.3.1. Tipo y diseño de investigación

1.3.1.1. Tipo de investigación

El presente estudio corresponde a una investigación de tipo aplicada, ya que el objetivo fue obtener exopolisacáridos a partir de un hongo *Fusarium Oxysporum*; este microorganismo por ser de carácter patógeno, es causante de la marchitez de la planta de banano, conocido como Mal de Panamá, sin embargo, este estudio busca comprender las condiciones del sistema y optimizar en condiciones controladas la producción de exopolisacáridos y aportar conocimiento práctico que pueda ser aprovechado como potencial aplicación en diversas industrias. La investigación se realizó de manera experimental, en donde se evaluó el efecto de las variables independientes sobre la producción de EPS. Para ello, se eligió el diseño Box-Behnken, que permitió analizar los efectos individuales, así como sus interacciones entre las variables de estudio. A partir del ajuste estadístico mediante el software Design Expert, se seleccionó el mejor modelo de interacción de dos factores (2FI) que permitió describir el comportamiento del sistema. El enfoque en la investigación fue mixto (cuantitativo y cualitativo), porque se emplearon técnicas de caracterización fisicoquímica a partir de la muestra obtenida del

exopolisacáridos. Se emplearon técnicas analíticas como el método fenol-ácido sulfúrico y la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), que permitieron cuantificar azúcares e identificar grupos funcionales del polímero, respectivamente, para complementar la parte experimental y favorecer la interpretación del comportamiento del sistema evaluado (96).

1.3.1.2. Diseño de investigación

La investigación se desarrolló en tres etapas. En la primera etapa se realizó el muestreo de tejido vegetal de *Musa paradisiaca* en estado de descomposición, seguido del aislamiento y la caracterización macroscópica y microscópica del hongo *Fusarium oxysporum*. En la segunda etapa se evaluaron y optimizaron las condiciones de cultivo para la producción de exopolisacáridos mediante un diseño experimental Box-Behnken, considerando como variables independientes la concentración de glucosa, el extracto de levadura y el pH del medio de cultivo. En la tercera etapa se cuantificó el contenido total de carbohidratos de los exopolisacáridos mediante el método fenol-ácido sulfúrico y se caracterizaron sus grupos funcionales mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) (97).

1.3.2. Variables experimentales y operacionalización

Tabla 2
Operacionalización de Variables

Tipo de Variable	Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensiones	Nivel
Independiente	Concentración de Glucosa	Proceso de fermentación en donde la fuente de carbono brinda energía para el desarrollo y crecimiento microbiano, y la síntesis de metabolitos.	Cantidad de glucosa incorporada en el medio de cultivo para tres niveles.	Fuente de carbono	• 10 g/L • 55 g/L • 100 g/L
	Extracto de levadura	Fuente de nitrógeno que proporcionará compuestos orgánicos esenciales para el crecimiento microbiano.	Cantidad de levadura añadida al medio de cultivo para cada tratamiento experimental.	Fuente de nitrógeno	• 0.69 g/L • 3.795 g/L • 6.9 g/L
	pH	Escala del grado de acidez o	Se medirá con un potenciómetro	Valor de pH	• pH 4.5 • pH 5.5 • pH 6.5

		alcalinidad que influirá en la actividad metabólica del hongo.	calibrado en el proceso inicial y final de la fermentación en tres niveles.		
Dependiente	Producción del polímero (EPS)	Cantidad de exopolisacáridos obtenidos durante el proceso de fermentación	Cantidad del polímero obtenido después del proceso de precipitación con etanol y secado.	Producción de los exopolisacáridos (EPS)	Rendimiento (%)
	Tiempo de Incubación	Periodo de incubación del cultivo microbiano para la producción de EPS	Tiempo de incubación del hongo <i>Fusarium Oxysporum</i> durante los 15 días de fermentación.	Duración (días) de incubación	15 días
Controladas	Velocidad de Agitación	Agitación mecánica que favorece la oxigenación del medio de cultivo	Velocidad de agitación constante durante el proceso de fermentación.	Velocidad del cultivo	120 rpm
	Temperatura de Incubación	Cantidad de calor incorporada durante el desarrollo microbiano, que permite darle las condiciones de cultivo para el desarrollo del microorganismo.	Temperatura constante en el medio de cultivo.	Temperatura registrada durante el proceso.	25 °C

Nota: Elaboración propia.

1.3.3. Obtención e identificación de *Fusarium oxysporum*

1.3.3.1. Recolección de la muestra vegetal

El muestreo en plantas de banano (*Musa paradisiaca*) se realizó en el Centro Poblado del Molino Cajanleque, distrito de Chocope, en la provincia de Ascope, departamento de la Libertad. Los aislamientos extraídos fueron de plantas enfermas del banano por infestación vascular (conocida como enfermedad de Panamá). Se seleccionaron plantas que mostraban signos de desecación, pudrición y tallos necróticos, siguiendo los protocolos de bioseguridad

recomendados por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), que menciona lo siguiente: seleccione el área de corte en el pseudotallo; este debe estar a una altura de entre 50 y 60 cm a partir de la base del mismo. Haciendo uso de guantes y con un cuchillo desinfectado, proceda a realizar una incisión en forma de cuadrado de aproximadamente 5 x 8 cm. Haga un corte profundo con el fin de alcanzar varias de las capas internas, se extrajo el micelio correspondiente del sistema vascular de la planta (Xilema/Floema). Se guardaron en bolsas de polipropileno con una etiqueta que contenía el nombre del cultivo, distrito, nombre del lugar y fecha (98). Para la conservación, las muestras se mantuvieron con bolsas de hielo hasta su procesamiento lo antes posible en el Laboratorio de la Universidad Católica de Santa María.

1.3.3.2. Aislamiento de *Fusarium oxysporum*

Para su aislamiento del patógeno, se realizó la técnica de siembra en medios de cultivo de PDA. En condiciones asépticas, se tomó el tejido vegetal correspondiente del sistema vascular de la planta del banano, y se hicieron cortes pequeños del Xilema/Floema (corno y pseudotallos) de 3 x 5 mm. Luego los trozos se transfirieron a una solución de hipoclorito de sodio (1-3%) durante 1 minuto. Se enjuagaron los trozos con agua destilada estéril tres veces durante 1 minuto. Finalmente se dejan secar en papel toalla estéril o papel absorbente para eliminar el exceso de humedad en una cámara de flujo laminar hasta que estén totalmente secas (98). En condiciones controladas (incubación a 25 °C), se permite el desarrollo del micelio algodonoso y el color de la colonia en tonos blanquecinos a amarillos, rosados o púrpuras, respectivamente (99).

1.3.3.3. Obtención de cultivos puros

1.3.3.3.1. Siembra del hongo *Fusarium* en medio de cultivo

Para el cultivo se pesaron 3.9 g de medio PDA para preparar 100 ml., se esterilizó a 121 °C en autoclave durante 15 minutos. Posteriormente se colocaron en cada caja de Petri 20 mL de medio de cultivo. Para la siembra se colocaron 4 trozos del tejido en la superficie de la placa Petri con medio PDA y se incubaron a una temperatura de 25 °C durante 9 días.

1.3.3.3.2. Aislamiento de cultivos puros

Se seleccionaron a partir de un micelio joven con aspecto algodonoso blanquecino y de pigmentación rosa o púrpura propios del género *Fusarium* para ser aislados en medios de PDA y obtener su purificación (100). Se incubó por 9 días a una temperatura de 25 °C, evaluando a partir del quinto día sus características macroscópicas. La identificación microscópica fue

realizada según el método de cinta con azul de lactofenol para visualizar la estructura del hongo *Fusarium* (101).

1.3.3.4. Caracterización macroscópica

Para el medio de fermentación, el hongo *Fusarium oxysporum* debe encontrarse en una fase de crecimiento activa y vigorosa. Para tener una producción eficiente y consistente de exopolisacáridos se deben tomar en cuenta las siguientes características.

Generalmente en los días 7 – 9, los bordes de la colonia son esponjosos y/o algodonosos, con aspecto joven que cubre aproximadamente el 60 % de la superficie de agar.

Tabla 3
Criterios macroscópicos empleados en la caracterización de los aislamientos de *Fusarium*

VARIABLE	EVALUACION	DESCRIPCION
Color Del Micelio	Blanco	Tonos blanquecinos a amarillos, rosados indican fase activa logarítmica del hongo.
	Rosados	
	Purpuras	
Textura del micelio	Densa	60 – 70% de micelio algodonoso
	Pulverulenta	
	Algodonosa	
Zona Activa del Hongo	Borde	El borde exterior de la colonia es óptimo porque permite que las hifas se expandan activamente hacia nutrientes nuevos.
	Centro	

Nota: Booth, (99).

1.3.3.5. Caracterización microscópica

Para la identificación microscópica se tomó un segmento del borde del micelio joven con cinta adhesiva, se colocó en un portaobjetos con una gota de azul de lactofenol y se observó al microscopio con un aumento de 40X. Se anotó si había presencia de hifas activas, clamidosporas, macroconidias y microconidias.

1.3.3.6. Identificación molecular

Para confirmar molecularmente el hongo aislado, se extrajo el quinto repique de la placa original que contenía la cepa aislada del cultivo de banano (*Musa paradisiaca*) para la

extracción del ADN y la amplificación de la región ITS1 mediante PCR, para poder ser enviado al Instituto de Biotecnología del ADN Uchumayo E.I.R.L., un servicio externo para su procedimiento. (Anexo 1).

Teniendo la secuencia del hongo, se hizo una comparación con la base de datos del NCBI usando el software BLAST. Esta secuencia es utilizada para el análisis de identificación de la especie.

1.3.4. Preparación del inóculo

El cultivo de *Fusarium oxysporum* se realizó en medio sólido Papa Dextrosa Agar (PDA). Para ello, el medio fue preparado y esterilizado a 121 °C durante 15 minutos en autoclave. Posteriormente, bajo condiciones asépticas, se dispensaron 20 mL del medio en placas Petri estériles.

La inoculación se efectuó mediante la transferencia de discos miceliales de 5 mm de diámetro obtenidos de la zona periférica o borde activo de colonias con la misma edad de crecimiento (9 días de incubación). Con la finalidad de mantener la uniformidad del inóculo entre los diferentes ensayos, todos los discos fueron obtenidos bajo las mismas condiciones de cultivo, empleando el mismo diámetro de corte y seleccionando la misma región fisiológicamente activa del micelio.

Las placas inoculadas fueron incubadas a 25 °C, permitiendo el crecimiento óptimo del micelio. Una vez alcanzado el desarrollo adecuado, los cultivos fueron conservados a 4 °C hasta su utilización como fuente de inóculo.

1.3.5. Evaluación cinética del cultivo

1.3.5.1. Preparación del medio de cultivo

Para la producción de exopolisacáridos (EPS), se empleó un medio de cultivo semidefinido modificado, basado en formulaciones reportadas para especies del género *Fusarium* productoras de polisacáridos extracelulares (5,1).

Tabla 4
Medio de cultivo utilizado para la producción de exopolisacáridos

Componente	Concentración	Función Principal
Glucosa	100 g/L	Sirve como fuente de carbono y energía para muchos microorganismos.
KH_2PO_4	0.05 g/L	A menudo actúa como fuente de fósforo y puede ayudar a tamponar el medio.
Extracto de levadura	6.9 g/L	Proporciona una serie de nutrientes esenciales, como vitaminas y aminoácidos.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.005 g/L	El magnesio es un ión esencial para muchos procesos celulares.
KCl	0.05 g/L	El potasio es un ión importante para muchas funciones celulares.
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.005 g/L	El hierro es un oligoelemento necesario para muchos microorganismos. Es importante porque es necesario para la función de muchas enzimas y proteínas en la célula.
pH	5.5	El pH del medio fue ajustado a 5.5 previo a la esterilización considerando condiciones óptimas reportadas para el crecimiento de hongos filamentosos y la producción de metabolitos secundarios.

Nota: Elaboración propia.

Composición del medio de cultivo utilizado para la producción de exopolisacáridos.

1.3.5.2. Condiciones iniciales de cultivo

La producción de exopolisacáridos se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 150 mL, conteniendo 50 mL del medio de cultivo previamente preparado.

Cada matraz fue inoculado con tres discos de micelio de 5 mm de diámetro provenientes de cultivos jóvenes de *Fusarium oxysporum*. Los cultivos fueron incubados a 25 °C en un agitador orbital a 120 rpm durante un periodo de 17 días, en condiciones de oscuridad, con el fin de favorecer la producción de metabolitos extracelulares.

1.3.5.3. Diseño del estudio cinético

1.3.5.3.1. Tipo de cultivo

El estudio se desarrolló mediante un sistema de cultivo sumergido en modo batch, caracterizado por la ausencia de reposición de nutrientes durante el periodo experimental, permitiendo evaluar el comportamiento cinético del microorganismo bajo condiciones controladas (86).

1.3.5.3.2. Duración y frecuencia de muestreo

El cultivo fue monitoreado durante un periodo total de 17 días, con muestreos realizados cada 48 horas (días 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 y 17). En cada punto de muestreo, se extrajo una alícuota de 1 mL de cada matraz para la evaluación de las variables cinéticas, como la cuantificación de azúcares reductores mediante el método DNS.

Las muestras fueron almacenadas a 4 °C en tubos Eppendorf de 1.5 mL hasta su posterior análisis. Posteriormente, el cultivo fue sometido a un proceso de separación (centrifugación) para la determinación de biomasa y exopolisacáridos (EPS).

1.3.5.4. Variables de seguimiento

Durante el desarrollo del estudio, se determinaron las siguientes variables:

- Biomasa (g/L)
- Producción de exopolisacáridos (EPS) (g/L)
- pH del medio de cultivo
- Concentración de azúcares reductores mediante método DNS (g/L)

Estas variables permitieron establecer la relación entre el crecimiento microbiano, el consumo de sustrato y la producción de metabolitos.

Adicionalmente, se determinó el contenido de carbohidratos totales en dos etapas: primero, en el punto de máximo crecimiento identificado en la cinética de crecimiento, y posteriormente en los ensayos del diseño experimental.

1.3.5.5. Recuperación de exopolisacáridos

1.3.5.5.1. Separación de biomasa y clarificación del sobrenadante

Cada matraz fue procesado individualmente. El cultivo fue sometido a centrifugación a 3000 rpm durante 20 minutos, con la finalidad de separar la biomasa fúngica del medio líquido. Posteriormente, el sobrenadante fue separado y filtrado al vacío con papel filtro de 8 µm, con

el objetivo de eliminar partículas celulares residuales y obtener una solución clarificada que contiene los exopolisacáridos extracelulares.

1.3.5.5.2. Precipitación de exopolisacáridos

La recuperación de los exopolisacáridos (EPS) se realizó mediante precipitación con etanol al 96 %. Para ello, al sobrenadante clarificado obtenido previamente se le adicionó etanol en una proporción de 3:1 (v/v) (etanol). La mezcla fue homogeneizada suavemente para favorecer el contacto entre ambas fases y posteriormente incubada en refrigeración a aproximadamente 4 °C durante un periodo de 12 a 24 horas. Este procedimiento permitió la disminución de la solubilidad de los polisacáridos en el medio, favoreciendo su precipitación (102).

1.3.5.5.3. Recuperación del precipitado

Finalizado el periodo de incubación, la mezcla fue sometida a centrifugación a 3000 rpm durante 20 minutos para recuperar el material precipitado. Posteriormente, el sobrenadante fue descartado cuidadosamente y el pellet obtenido, correspondiente a los exopolisacáridos precipitados, fue recuperado y transferido para su posterior secado.

1.3.5.5.4. Secado del EPS

El precipitado recuperado fue sometido a secado en estufa a una temperatura de 60–70 °C hasta alcanzar peso constante. Este procedimiento permitió la eliminación de la humedad residual y la obtención del exopolisacárido en forma seca para su posterior cuantificación mediante el método gravimétrico.

1.3.5.6. Métodos analíticos aplicados

1.3.5.6.1. Determinación de biomasa

La biomasa micelial se determinó mediante el método gravimétrico de peso seco, técnica ampliamente empleada en estudios de crecimiento microbiano por su confiabilidad y precisión (87). Para ello, el cultivo fue filtrado utilizando un sistema previamente pesado, y el material retenido se lavó con agua destilada con el fin de eliminar restos del medio de cultivo. Posteriormente, la muestra fue sometida a secado en estufa a 60 °C hasta alcanzar peso constante, garantizando la remoción de la humedad residual.

La biomasa seca se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Biomasa seca (g)} = \text{Peso final seco (g)} - \text{Peso inicial del recipiente vacío (g)} \quad (2)$$

Donde la biomasa seca (g) corresponde a la masa del material biológico tras el secado; el peso final seco (g) representa la masa del sistema completo después del tratamiento térmico; y el peso del recipiente vacío (g) corresponde a la masa inicial del sistema sin muestra.

Para expresar los resultados en función del volumen del cultivo, se utilizó la siguiente relación:

$$\text{Concentración de Biomasa (g/L)} = \frac{\text{Biomasa seca (g)}}{\text{Volumen del medio de cultivo (L)}} \quad (3)$$

Los valores obtenidos permitieron cuantificar la biomasa producida y expresar su concentración en el medio de cultivo, siendo estos datos fundamentales para el análisis cinético del crecimiento microbiano. La aplicación consistente de este método asegura la reproducibilidad de los resultados y su comparabilidad entre diferentes condiciones experimentales (86).

1.3.5.6.2. Determinación de pH

El pH del medio de cultivo fue medido utilizando un potenciómetro previamente calibrado, registrándose en cada punto de muestreo y permitiendo monitorear los cambios durante el proceso fermentativo.

1.3.5.6.3. Determinación de azúcares reductores (DNS)

La cuantificación de azúcares reductores se realizó mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), según lo descrito por Miller (103).

Se mezcló 1 mL de muestra con 1 mL de reactivo DNS, seguido de calentamiento en el digestor a 100 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se añadieron 3.5 mL de agua destilada y se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro.

La concentración de glucosa residual fue determinada mediante una curva estándar preparada con soluciones de glucosa en el rango de 0.1 a 1.0 g/L.

1.3.5.6.4. Determinación de carbohidratos totales del exopolisacárido (EPS) mediante el método fenol-ácido sulfúrico.

La determinación de carbohidratos totales se realizó mediante el método colorimétrico de fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois et al., con modificaciones para su aplicación en dos etapas experimentales de evaluación. Este método se basa en la hidrólisis y deshidratación de los carbohidratos por acción del ácido sulfúrico concentrado, generando compuestos furfúricos que reaccionan con fenol para formar un complejo coloreado cuya intensidad es proporcional a la concentración de carbohidratos y medible a 490 nm. Inicialmente, se realizó una evaluación

preliminar en microplaca para estimar la concentración de carbohidratos en el punto de máxima producción de EPS. Posteriormente, el método se aplicó en tubos de ensayo a mayor escala para cuantificar la producción de EPS en los tratamientos establecidos en el diseño experimental (8).

1.3.5.6.4.1. Evaluación preliminar de la producción de EPS en el punto óptimo mediante lectura en microplaca

Se realizó una evaluación preliminar del contenido de carbohidratos totales en la muestra correspondiente al día 15 de cultivo; fue seleccionada debido a que correspondió al punto de máxima producción de EPS previamente identificado durante la evaluación del crecimiento del cultivo.

El fenol al 5% (p/v) se preparó disolviendo fenol cristalizado en agua destilada. Para el ensayo, se empleó un reactivo de color constituido por una mezcla de fenol al 5% y ácido sulfúrico concentrado en proporción aproximada 1:5 (v/v), preparado bajo condiciones de enfriamiento debido al carácter exotérmico de la reacción. Las muestras y soluciones estándar se analizaron en microplacas de 96 pozos, empleando microvolúmenes; a cada alícuota de muestra (80 μ L) se le adicionó el reactivo de color correspondiente. La reacción se dejó desarrollar durante 10 minutos a temperatura ambiente y la absorbancia fue medida a 490 nm en un lector de microplacas. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Se empleó glucosa como estándar para la construcción de la curva de calibración. Se preparó una solución madre de 9.0 g/L, a partir de la cual se realizaron diluciones sucesivas para obtener soluciones estándar en un rango de 0.018 a 2.70 g/L (equivalente a 0.1–15 mmol/L). Para cada estándar, se tomó un volumen calculado de la solución madre y se aforó a 10 mL con agua destilada. Esta curva permitió estimar el contenido de carbohidratos en el punto óptimo de producción, expresando los resultados en g/L para mantener la coherencia en el análisis de los datos (104,86).

1.3.5.6.4.2. Cuantificación del EPS en tubos de ensayo en los tratamientos del diseño experimental.

La cuantificación de EPS se realizó en volúmenes mayores, empleando tubos de ensayo, como parte de la evaluación de la producción de EPS bajo las condiciones establecidas en el diseño experimental.

Para la preparación de reactivos, se elaboró una solución de fenol al 5% (p/v) disolviendo 1.25 g de fenol cristalizado en 25 mL de agua destilada, manteniendo la solución fría. Para el ensayo, se colocaron 0.5 mL de muestra de EPS diluida en tubos de ensayo, a los cuales se adicionaron

0.75 mL de fenol y 3.75 mL de ácido sulfúrico concentrado, mezclando cuidadosamente. La reacción se incubó en estufa a 80 °C durante 35 minutos, permitiendo el desarrollo completo del color característico. La absorbancia de las muestras se midió a 490 nm utilizando como blanco una solución que contenía todos los reactivos excepto la muestra. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Para la cuantificación, se construyó una curva estándar utilizando glucosa como patrón, en un rango de concentraciones de 0.02 a 1 g/L, tratadas bajo las mismas condiciones que las muestras. La concentración de EPS se determinó a partir de la curva de calibración empleando la ecuación de regresión obtenida a partir de los valores de absorbancia. Los resultados fueron expresados en g/L (104,105).

1.3.5.7. Procesamiento y análisis de datos cinéticos

1.3.5.7.1. Cálculo de biomasa y EPS

Los datos experimentales fueron expresados en g/L, considerando el volumen inicial del cultivo. Se construyeron perfiles cinéticos en función del tiempo para evaluar la dinámica del crecimiento microbiano y la producción de metabolitos.

1.3.5.7.2. Cálculo del consumo de sustrato

El consumo de glucosa fue estimado mediante la diferencia entre la concentración inicial y la concentración residual determinada por DNS:

$$S_{consumido} = S_0 - S_t$$

Donde S_0 corresponde a la concentración inicial de glucosa (100 g/L) y S_t a la concentración residual determinada por el método DNS en el tiempo.

1.3.5.7.3. Determinación del punto óptimo

El punto óptimo de producción fue determinado mediante el análisis conjunto de las variables cinéticas, considerando la máxima producción de EPS y la estabilización del crecimiento microbiano. Se determinó el punto de máxima producción de EPS mediante el análisis de las variables cinéticas evaluadas.

1.3.5.7.4. Determinación de rendimientos

Los coeficientes de rendimiento constituyen parámetros fundamentales en estudios biotecnológicos, ya que permiten evaluar la eficiencia de conversión del sustrato en biomasa y productos de interés. Estos parámetros se emplean para caracterizar el comportamiento

metabólico del microorganismo y optimizar procesos de producción de metabolitos, como los exopolisacáridos (90,88). Asimismo, su interpretación se sustenta en principios microbiológicos y fisiológicos del crecimiento de microorganismos descritos ampliamente en la literatura (106).

En el presente estudio, los rendimientos fueron calculados a partir de los datos experimentales obtenidos durante el seguimiento cinético del cultivo de *Fusarium oxysporum*, considerando la concentración de biomasa, producto y sustrato a lo largo del tiempo.

1.3.5.7.4.1. Rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$)

El rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$) expresa la cantidad de biomasa generada por unidad de sustrato consumido, y se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$$

donde:

X = concentración de biomasa en el tiempo (g/L)

X_0 = biomasa inicial (g/L)

S_0 = concentración inicial de sustrato (g/L)

S = concentración residual de sustrato (g/L)

Este coeficiente permite evaluar la eficiencia del crecimiento microbiano. Valores elevados de $Y_{x/s}$ indican una conversión eficiente del sustrato en biomasa celular, mientras que valores bajos pueden sugerir que una fracción significativa del sustrato es desviada hacia la producción de metabolitos secundarios (107,108,16).

1.3.5.7.4.2. Rendimiento producto/sustrato ($Y_{p/s}$)

El rendimiento producto/sustrato ($Y_{p/s}$) representa la cantidad de exopolisacáridos producidos por unidad de sustrato consumido, siendo uno de los parámetros más importantes para evaluar la eficiencia del proceso biotecnológico:

$$Y_{p/s} = \frac{P - P_0}{S_0 - S}$$

donde:

P = concentración de EPS en el tiempo (g/L)

P_0 = concentración inicial de EPS (g/L)

Este parámetro permite cuantificar la eficiencia global del sistema en la conversión del sustrato en producto de interés. Valores elevados de $Y_{p/s}$ indican un proceso altamente eficiente desde el punto de vista productivo, lo cual es deseable en aplicaciones industriales orientadas a la obtención de biopolímeros (86,88,102).

1.3.5.7.4.3. Rendimiento producto/biomasa ($Y_{p/x}$)

El rendimiento producto/biomasa ($Y_{p/x}$) establece la relación entre la producción de exopolisacáridos y la biomasa generada:

$$Y_{p/x} = \frac{P - P_0}{X - X_0}$$

Este coeficiente permite inferir la asociación entre el crecimiento microbiano y la síntesis del producto. Valores elevados de $Y_{p/x}$ sugieren que la producción de exopolisacáridos está estrechamente vinculada a la actividad metabólica del microorganismo, mientras que valores bajos pueden indicar una producción limitada o dependiente de condiciones específicas del cultivo (105,90).

1.3.6. Diseño experimental Box-Behnken

1.3.6.1. Matriz experimental

En esta etapa experimental se aplicó un diseño de superficie de respuesta (RSM) basado en Box-Behnken, en el que se analizaron tres factores ($K=3$) y tres niveles por cada variable (-1, 0, +1). En la Tabla 5 se analizaron 15 corridas, incluidas las de puntos centrales, que permitieron evaluar el efecto individual y las interacciones entre los factores sobre la producción de exopolisacáridos (EPS). Este diseño experimental permitió optimizar el sistema con un número reducido de experimentos.

Los factores estudiados fueron: la concentración de glucosa (g/L), la concentración de extracto de levadura (g/L) y el pH. En la tabla 6, se muestran los niveles de los factores del diseño experimental, en donde cada factor fue evaluado en tres niveles codificados (-1, 0, +1). Las repeticiones centrales (nivel 0) estiman el error puro y la estabilidad del sistema estudiado.

El RSM (diseños de superficie de respuesta) favorece la evaluación eficiente de las interacciones y sus combinaciones entre variables. Por ende, este DBB permitió analizar los factores empleados en esta investigación, como la concentración de glucosa, la concentración de extracto de levadura y el pH, evaluando el comportamiento del sistema y su optimización en

sus condiciones de cultivo, considerando principalmente los efectos principales e interacciones de bajo orden (109).

Tabla 5
Matriz experimental del diseño Box-Behnken

Número de corridas experimentales	Factor A	Factor B	Factor C
	Glucosa g/L	Levadura g/L	pH
01	10	0.69	5.5
02	100	0.69	5.5
03	10	6.9	5.5
04	100	6.9	5.5
05	10	3.795	4.5
06	100	3.795	4.5
07	10	3.795	6.5
08	100	3.795	6.5
09	55	0.69	4.5
10	55	6.9	4.5
11	55	0.69	6.5
12	55	6.9	6.5
13	55	3.795	5.5
14	55	3.795	5.5
15	55	3.795	5.5

Nota: Elaboración propia.

La matriz experimental del diseño Box-Behnken fue generada mediante el software Design-Expert versión 13.

1.3.6.2. Factores y niveles

Tabla 6
Niveles de los factores del diseño experimental

Factor	Variable	Nivel (-1)	Nivel (0)	Nivel (+1)
A	Glucosa (g/L)	10	55	100
B	Levadura (g/L)	0.69	3.795	6.9
C	pH	4.5	5.5	6.5

Nota: Mahapatra; Banerjee, (11).

1.3.6.3. Análisis estadístico y optimización

Los datos experimentales obtenidos fueron analizados mediante el software Design Expert versión 13. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar la significancia estadística de los factores evaluados y sus interacciones sobre la producción de exopolisacáridos. La adecuación del modelo se evaluó mediante el coeficiente de determinación (R^2), R^2 ajustado, R^2 predicho y la prueba de falta de ajuste (Lack of Fit). Se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$. Posteriormente se generaron superficies de respuesta y gráficos de contorno para determinar las condiciones óptimas de cultivo.

1.3.7. Caracterización estructural de EPS

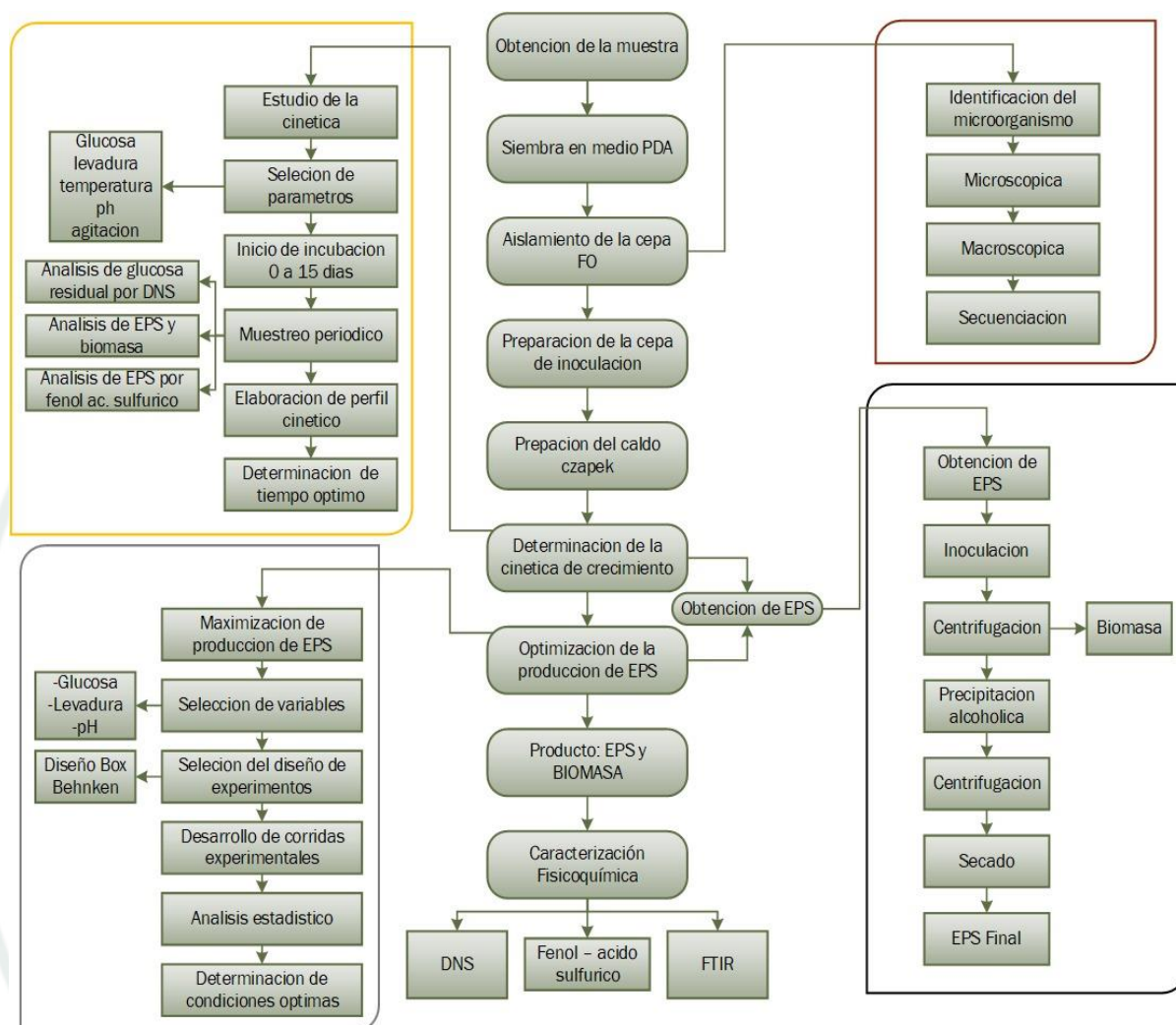
1.3.7.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR):

Este método analítico es empleado para identificar compuestos químicos, detectar grupos funcionales presentes en una muestra y analizar la estructura molecular de materiales sólidos, el cual, se realizó en el Laboratorio de Investigación de Procesos (UCSM). Experimentalmente, se usó una fracción de la muestra seca del EPS y se pulverizó en partículas más pequeñas y finas en un crisol. Previamente, se colocó a secar una pastilla de KBr (bromuro de potasio) en la estufa a 105 °C por 1 hora, que fue usada como blanco. Después se añadieron 50 mg de KBr seco y se mezclaron 0.5 mg de la muestra pulverizada que contiene EPS; la muestra se comprimió con la ayuda de un prensador y fue llevada a leer en el espectrofotómetro FTIR en una región espectral de 400 a 4000 cm^{-1} .

Se utilizó el equipo Nicolet Summit FTIR Spectrometer, equipado con detector DTGS con ventana de KBr y divisor de haz de KBr para la caracterización estructural de las muestras, en donde las mediciones se hicieron en modo de transmisión usando el accesorio iD1, operando a una resolución digital de 24 bits y velocidad óptica de 0.4747.

1.3.8. Diagrama experimental

Figura 8
Diagrama del proceso experimental



Nota: Elaboración propia.



CAPÍTULO III

RESULTADOS

1. Resultados

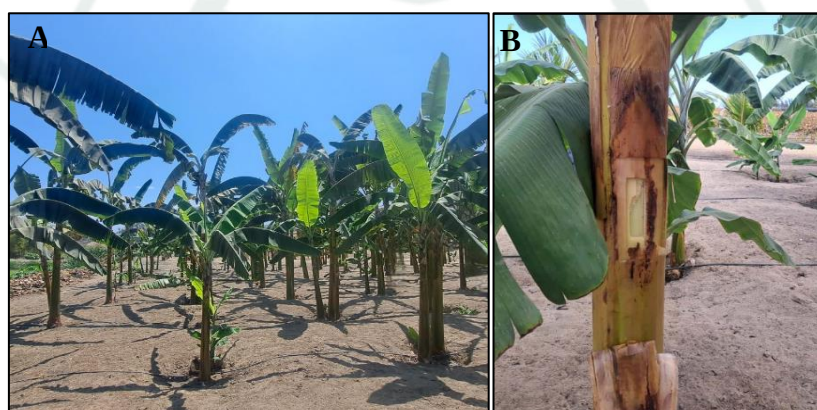
1.1. Recolección de la muestra vegetal

El campo que se visitó fue el Centro Poblado del Molino Cajanleque, se hizo un registro de las condiciones climáticas del cultivo, las cuales eran normales con una temperatura de 25°C, cielo despejado, poca afluencia de viento a su alrededor, luego se identificaron plantas enfermas que mostraba signos de desecación, pudrición, y tallos necróticos (Figura 9.A), se observó a nivel de campo, el amarillamiento o clorosis inicial y necrosis en el borde de las hojas hacia la nervadura central, característico del hongo *Fusarium oxysporum* por la producción de una fitotoxina, llamada ácido fusarico, señalado como causa de clorosis foliar. Por otro lado, los pecíolos de las hojas estaban doblados, adheridos alrededor del pseudotallo, formando una falda hawaiana (Figura 9.B). Luego, se cortó el tallo para observar los síntomas internos de la planta. Se pudieron observar los haces vasculares, que tenían necrosis continua de color morado oscuro. En el pseudotallo, en corte longitudinal, se observaron estrías continuas y, en corte transversal, como anillo (Figura 9.B). Esta sintomatología descrita y analizada en campo coincide con lo que se menciona (144) que describe la marchitez por *Fusarium* en banano (33). Por último, se extrajo una porción pequeña del micelio correspondiente al sistema vascular de la planta (Xilema/Floema), que fue rotulada, sellada para la identificación de la cepa en laboratorio.

Figura 9

Planta de banano (*Musa paradisiaca*)

En el que se observa: A) Lugar de muestreo en el Centro Poblado del Molino Cajanleque, B) Planta enferma por infestación vascular por *Fusarium* (enfermedad de Panamá).



Nota: Elaboración propia.

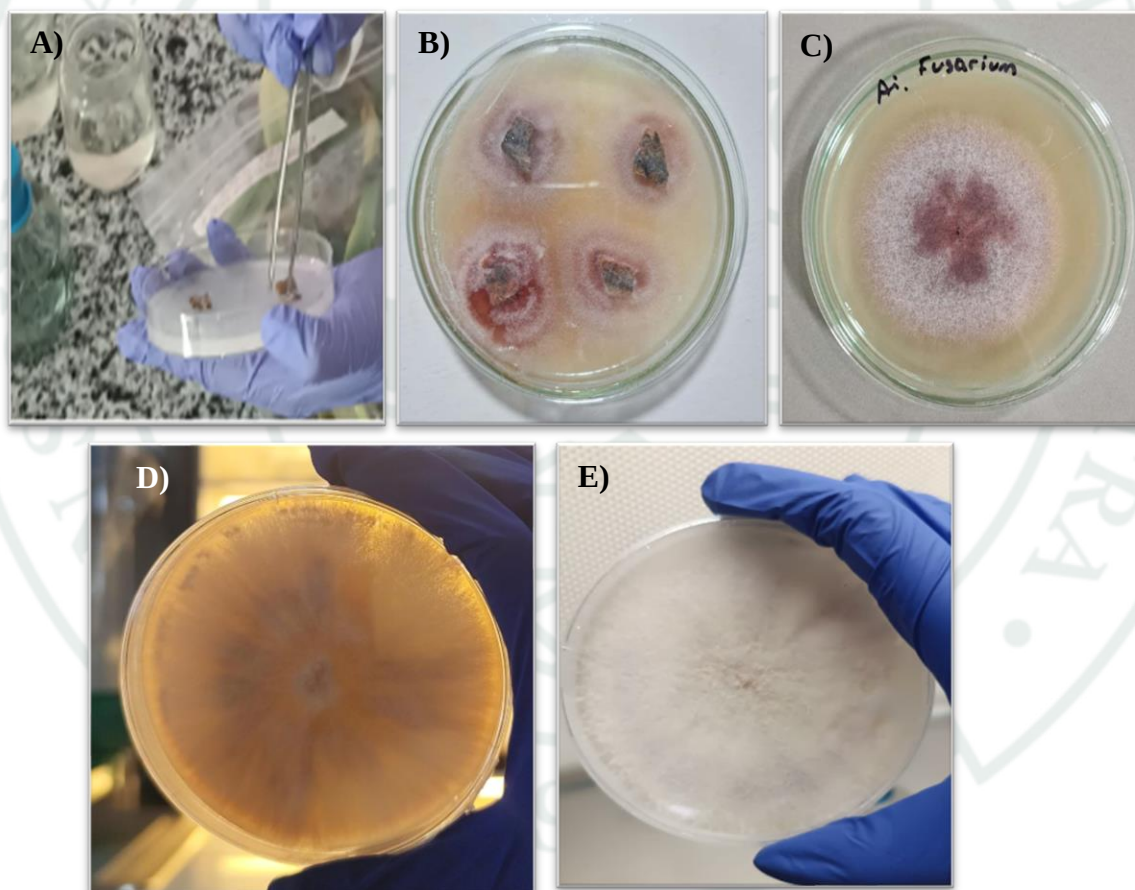
1.2. Aislamiento del microorganismo

Fusarium oxysporum fue aislado en medio sintético PDA con 4 pequeños fragmentos del tejido vegetal infectado (Figura 10.A), en donde se observaron colonias con micelio de color blanco de aspecto algodonoso, abundante y uniforme en su etapa inicial, en la zona central se tornó de color púrpura predominante, pero blanco hacia el borde externo de la colonia conforme se desarrollaba. (Figura 10.B).

Figura 10

El hongo se cultivó en medio de agar papa dextrosa (PDA)

A Y B) aislamiento de *Fusarium oxysporum* a partir del cultivo de banano, C) colonia purificada en su primer repique, D y E) colonias seleccionadas para la producción de EPS



Nota: Elaboración propia.

A partir del cultivo aislado, se inoculó un disco de 5 mm de diámetro hasta 8 repiques realizados en medio PDA en las mismas condiciones para obtener la purificación del hongo, de los cuales 2 subcultivos fueron seleccionados con características propias de *Fusarium oxysporum*.

1.3. Caracterización del aislamiento fúngico

1.3.1. Caracterización macroscópica

Durante la etapa inicial del crecimiento del hongo, se identificó en la parte superior de la placa micelio de aspecto algodonoso y denso de color blanco, su crecimiento fue uniforme que gradualmente cubrió la superficie de la placa, conforme pasaron los días, en la parte inferior de la placa, se desarrolló una pigmentación de color melón violáceo de forma radial desde el centro hacia los bordes, pero predominó con mayor vigor la tonalidad en la zona central por lo que se plantea que en el desarrollo del hongo filamentoso se produjo la formación de pigmentos como se aprecia en la Figura 10.C y 10.D), ambas colonias seleccionadas son del 7 y 8 repique a 9 días de incubación a una temperatura de 25°C respectivamente.

Estos resultados obtenidos demostraron que el hongo causaba síntomas en las hojas del plátano, causando su pudrición, como lo informan varios estudios realizados. Además, en este estudio se comprobó que las características morfológicas de este hongo son patógenas para el banano, causadas por *Fusarium oxysporum f.sp. cubense* (110).

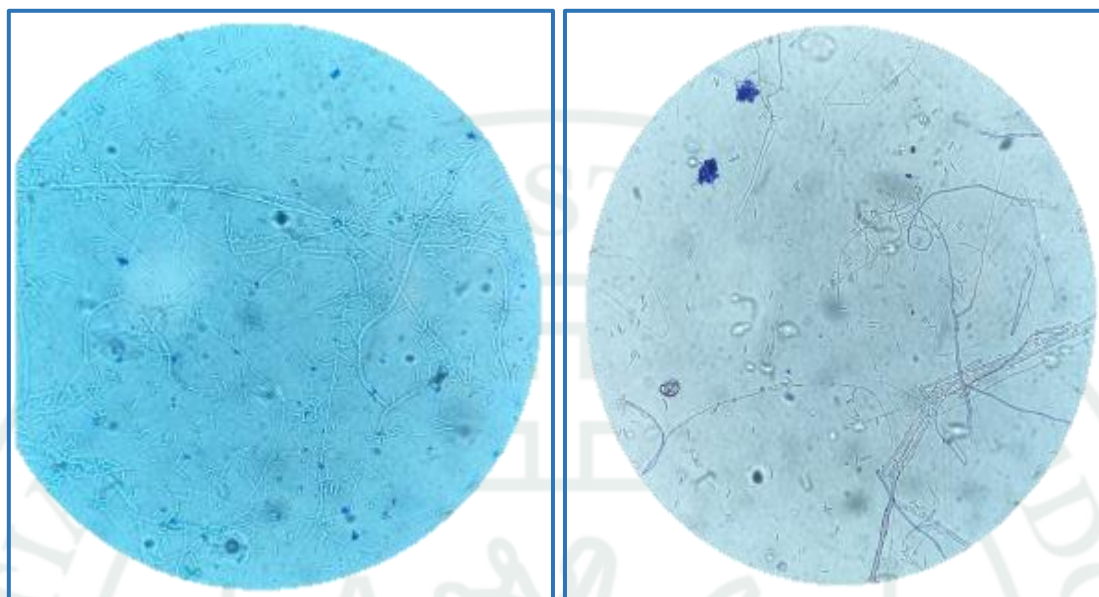
Según The *Fusarium* Laboratory Manual afirma que las morfologías de las colonias en medio PDA varían ampliamente (91). El micelio puede ser floco, escaso o abundante, y su color varía del blanco al violeta pálido. Otra investigación descrita coincide con las características del mismo (111,100).

Fusarium oxysporum suele producir un pigmento de color violeta pálido a oscuro o magenta oscuro en el agar, pero algunos aislados no producen pigmentos (109). Otros autores confirman que el fitopatógeno *F. oxysporum* cultivado en medio PDA, presentó diversidad de pigmentación (100). También en la Guía de laboratorio para la identificación de las principales especies se describe que la pigmentación en el medio de cultivo en PDA puede mostrar de color blanco, salmón, morado o violeta (Anexo 2) (99).

1.3.2. Caracterización microscópica

La identificación microscópica se realizó usando la técnica de la cinta con azul de lactofenol usando el microscopio de la marca KOSSODO con codificación 0L01640, brindado por el encargado del Laboratorio del H-301. Esto permitió observar y registrar la estructura del hongo filamentoso, si tiene presencia o ausencia de: microconidios, macroconidios y clamidosporas, entre otros.

Figura 11
Caracterización microscópica del hongo *Fusarium oxysporum* aislado de la planta del banano.



Nota: Elaboración propia.

Con la ayuda de un trozo de cinta adhesiva se obtuvieron muestras de una porción de la colonia de la placa y se colocaron en portaobjetos para ser observadas en el microscopio a 40 X lo siguiente:

- Se observaron hifas hialinas, septadas y delgadas, esparcidas de manera ramificada en todo el campo microscópico. También, se evidenció algo muy característico, el crecimiento filamentoso de las hifas interconectadas entre cada estructura, como se aprecia en la Figura 1.B, mostrando el estado activo de crecimiento del micelio.
- En el caso de las estructuras conoidales, se observaron morfológicamente estructuras ovaladas a levemente elipsoidales dispersas de menor a mayor cantidad, estando el día 9 de incubación.
- En el caso de los macroconidios, no se observaron de forma clara en el campo, es decir, es escasa su presencia.
- En ambos campos microscópicos, se evidenció una dispersión heterogénea en algunas estructuras, principalmente microconidios, como, por ejemplo, algunas agrupaciones y otras no.

Cabe resaltar que no se observaron clamidosporas ni una concentración alta de macroconidios y/o microconidios. Esto coincide con The *Fusarium* Laboratory Manual (148), que menciona: la mayoría de las especies de *Fusarium* esporulan en CLA en 6-10 días. Los cultivos en CLA producen macroconidios que son más uniformes en tamaño y forma que los cultivos en medios ricos en carbohidratos como PDA o Czapek-Dox. Las condiciones de cultivo y el tipo de medio influyen mucho en la densidad de las microconidios o Macroconidios, en el caso de medio CLA, las Macroconidios, son de longitud corta a media, falciformes o casi rectas, de pared delgada y generalmente triseptadas, y las microconidias suelen ser oseptadas, pueden ser ovaladas, elípticas o reniformes (en forma de riñón), las clamidosporas se forman abundantemente en las hifas sobre la superficie del agar en la mayoría de los aislados (39).

1.3.3. Identificación molecular del microorganismo

Se seleccionó una placa de PDA del aislamiento obtenido del 5.º repique para ser enviada al Instituto de Biotecnología del ADN Uchumayo E.I.R.L., en donde, para hongos, la región ITS del ADNr se utilizó como objetivo principal y fue amplificada con los primers ITS-1 y ITS-4. El resultado de la secuencia obtenida se encuentra en el Anexo 3. El análisis de comparación de la secuencia “ITS 1” con la base de datos de GenBank, mediante el software Blast, muestra una similitud de 100% con la especie: *Fusarium oxysporum* isolate Fo07 accesión MK571185.1 (Anexo 4).

1.4. Evaluación del crecimiento de *Fusarium oxysporum* y perfil cinético de biomasa

1.4.1. Curva de crecimiento (biomasa vs tiempo)

El crecimiento de *Fusarium oxysporum* en cultivo batch evidenció un incremento progresivo de la biomasa a lo largo del tiempo, mostró un comportamiento típico de crecimiento microbiano. Los datos experimentales completos utilizados para la construcción de la curva se presentan en el Anexo 1. Se registró un valor inicial de 2.166 g/L en el día 1, seguido de un aumento sostenido hasta alcanzar un máximo de 12.876 g/L en el día 15, para posteriormente presentar una ligera disminución a 12.434 g/L en el día 17 (Figura 12).

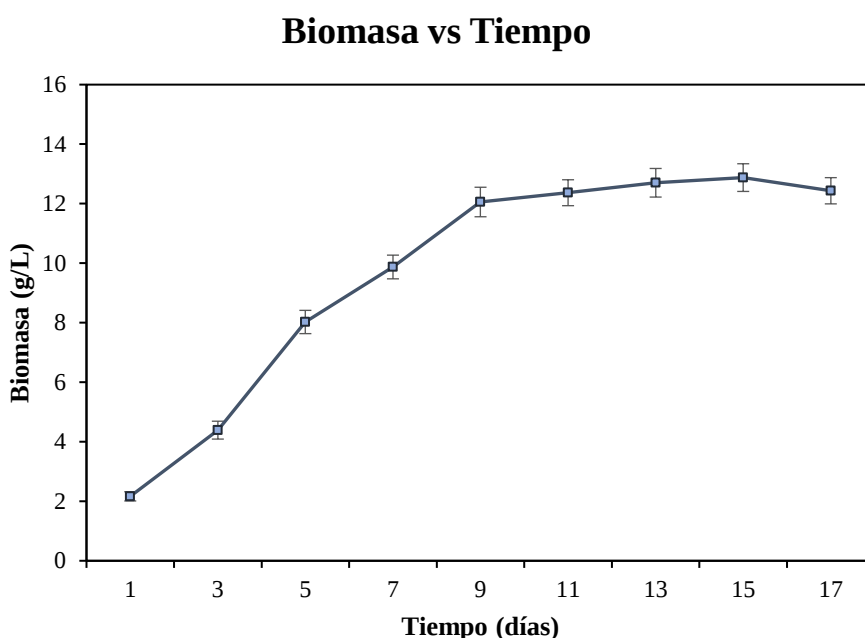
El perfil obtenido muestra una tendencia característica de crecimiento microbiano, con un incremento acelerado entre los días 3 y 9 (de 4.39 a 12.056 g/L), lo cual indica una elevada actividad metabólica y una eficiente asimilación de los nutrientes disponibles en el medio. Este comportamiento es consistente con estudios recientes en *Fusarium oxysporum*, donde la fase exponencial se asocia con una alta tasa de crecimiento y rápida acumulación de biomasa bajo condiciones óptimas de cultivo (112).

A partir del día 11, se observa una desaceleración en la acumulación de biomasa, evidenciando una transición hacia la fase estacionaria. Este fenómeno suele estar relacionado con la limitación progresiva de nutrientes y la acumulación de metabolitos secundarios que pueden ejercer efectos inhibitorios sobre el crecimiento celular (107).

Asimismo, el patrón observado concuerda con investigaciones donde *Fusarium oxysporum* alcanza su máximo crecimiento en periodos intermedios del cultivo, seguido de una estabilización debido a factores ambientales y metabólicos (108).

Figura 12

Curva de crecimiento de *Fusarium oxysporum* en función del tiempo., expresada como biomasa (g/L).



Nota: Elaboración propia.

1.4.2. Variación de pH durante el cultivo

El pH del medio de cultivo presentó una tendencia descendente desde 5.53 en el día 1 hasta un valor mínimo de 4.73 en el día 11, seguido de una ligera recuperación hasta 5.12 en el día 17 (Figura 13).

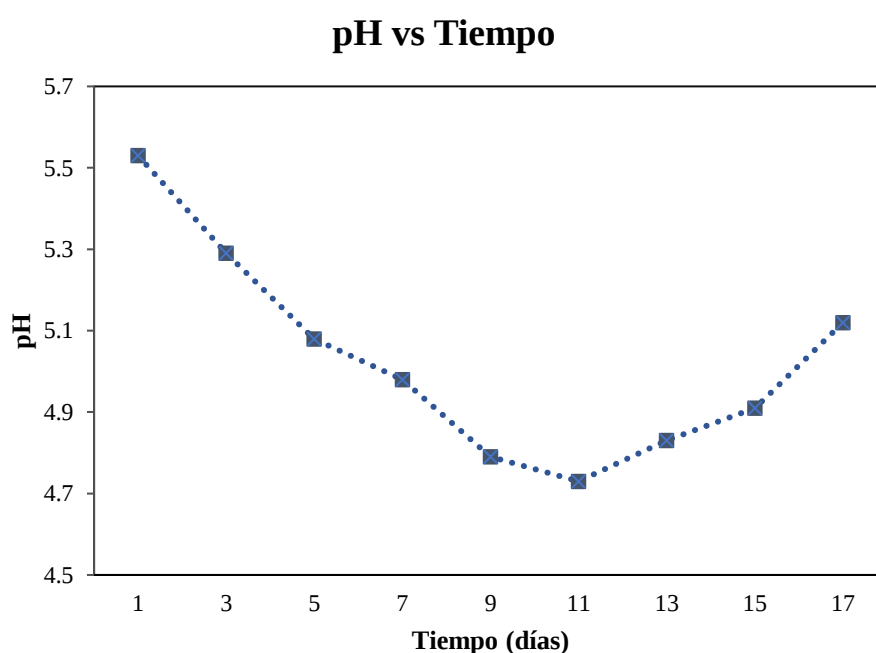
La disminución progresiva del pH coincide con el periodo de mayor incremento de biomasa, lo cual evidencia una estrecha relación entre el crecimiento celular y la actividad metabólica del microorganismo. Este comportamiento ha sido atribuido a la producción de metabolitos ácidos durante el metabolismo activo del hongo (112).

Estudios recientes han demostrado que el crecimiento de *Fusarium oxysporum* está influenciado por el pH del medio, presentando un óptimo en rangos ligeramente ácidos que favorecen la producción de biomasa (113).

Por otro lado, la estabilización y ligera recuperación del pH a partir del día 11 puede asociarse a una disminución en la actividad metabólica, así como al consumo de los ácidos previamente producidos o a la liberación de compuestos de carácter básico (114). Este comportamiento es característico de sistemas donde el crecimiento entra en fase estacionaria.

Figura 13

Variación del pH durante el cultivo de *Fusarium oxysporum* en función del tiempo



Nota: Elaboración propia.

1.4.3. Interpretación de fases de crecimiento

La integración de los perfiles de biomasa y pH permitió establecer las fases características del crecimiento de *Fusarium oxysporum* en cultivo batch.

Durante la fase lag (días 1–3), la biomasa mostró un incremento moderado, mientras que el pH se mantuvo relativamente estable, indicando un proceso de adaptación fisiológica del microorganismo al medio (112).

En la fase exponencial (días 3–11), se observó un incremento acelerado de la biomasa, acompañado de una disminución significativa del pH. Esta relación evidencia una intensa

actividad metabólica, caracterizada por el consumo de sustrato y la producción de metabolitos ácidos. Estudios recientes confirman que esta fase representa el periodo de mayor eficiencia en la conversión de nutrientes en biomasa en *Fusarium oxysporum* (113).

Posteriormente, en la fase estacionaria (días 11–15), la biomasa se mantuvo prácticamente constante (12.3–12.8 g/L), mientras que el pH mostró una tendencia a la estabilización. Este comportamiento sugiere un equilibrio entre crecimiento y muerte celular, asociado a la limitación de nutrientes y acumulación de metabolitos secundarios (138). En esta etapa, se ha reportado que se favorece la producción de compuestos secundarios, como exopolisacáridos (EPS) (108).

Finalmente, en la fase de declinación (días 15–17), se evidenció una ligera disminución de la biomasa, junto con una leve recuperación del pH. Este fenómeno puede atribuirse al agotamiento del sustrato, la lisis celular y la reducción de la actividad metabólica (107).

En conjunto, los resultados evidencian una cinética de crecimiento típica de *Fusarium oxysporum*, donde la biomasa y el pH están estrechamente interrelacionados y reflejan los cambios fisiológicos del microorganismo durante el cultivo (112).

1.5. Producción de exopolisacáridos (EPS)

1.5.1. Perfil de producción de EPS (g/L) vs tiempo

La producción de exopolisacáridos (EPS) por *Fusarium oxysporum* incrementó progresivamente desde 0.242 g/L (día 1) hasta alcanzar un máximo de 1.684 g/L en el día 15, seguido de una ligera disminución a 1.588 g/L en el día 17. Los datos cuantitativos completos se presentan en el Anexo 5. Todo ello evidencia un perfil cinético típico de hongos filamentosos en cultivo sumergido, donde la biosíntesis de EPS se intensifica durante la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria temprana; este comportamiento es consistente con lo reportado en sistemas fúngicos donde la producción de polisacáridos extracelulares se maximiza bajo condiciones de limitación de nutrientes y estrés metabólico.

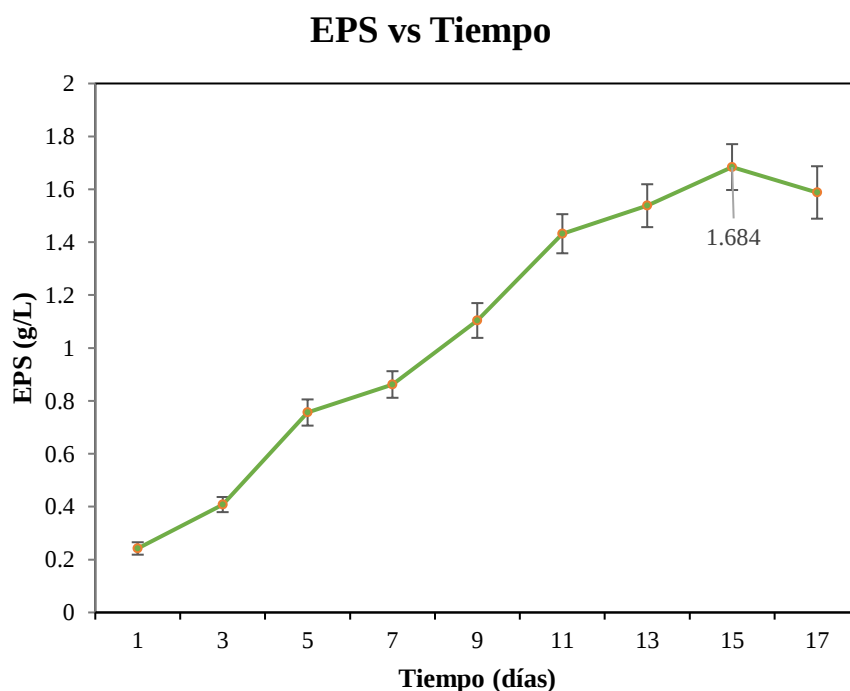
La concentración máxima obtenida en este estudio fue considerablemente superior a la reportada para *Fusarium oxysporum* Y24-2 (0.12 g/L), lo que evidencia una mayor eficiencia productiva bajo las condiciones de cultivo optimizadas empleadas. Asimismo, el valor alcanzado fue cercano al reportado para *Ganoderma lucidum* CAU5501 (1.723 g/L) e inferior al observado para *Fusarium solani* SD5 (2.276 g/L). Estas diferencias pueden atribuirse a variaciones inherentes entre especies y cepas, así como a factores asociados al proceso fermentativo, incluyendo la composición nutricional del medio, la concentración de la fuente

de carbono, el pH, la temperatura de incubación y las condiciones de aireación. En este sentido, Guo et al. señalaron que la producción de EPS en *Fusarium oxysporum* depende significativamente de la interacción entre dichos factores, los cuales regulan la actividad metabólica involucrada en la biosíntesis y secreción de polisacáridos extracelulares (16).

Por otra parte, la elevada producción observada al día 15 sugiere que las condiciones optimizadas de glucosa, extracto de levadura y pH favorecieron el flujo metabólico hacia la formación de EPS, permitiendo maximizar el aprovechamiento de los precursores carbonados requeridos para la síntesis del biopolímero. La ligera disminución observada en el día 17 puede atribuirse a procesos de degradación parcial del polisacárido o a su reutilización como fuente alternativa de carbono en fase estacionaria tardía, fenómeno reportado en bioprocesos fúngicos donde los EPS pueden presentar dinámica metabólica en etapas avanzadas del cultivo (3).

Figura 14

Perfil de producción de exopolisacáridos (EPS) de *Fusarium oxysporum* en función del tiempo



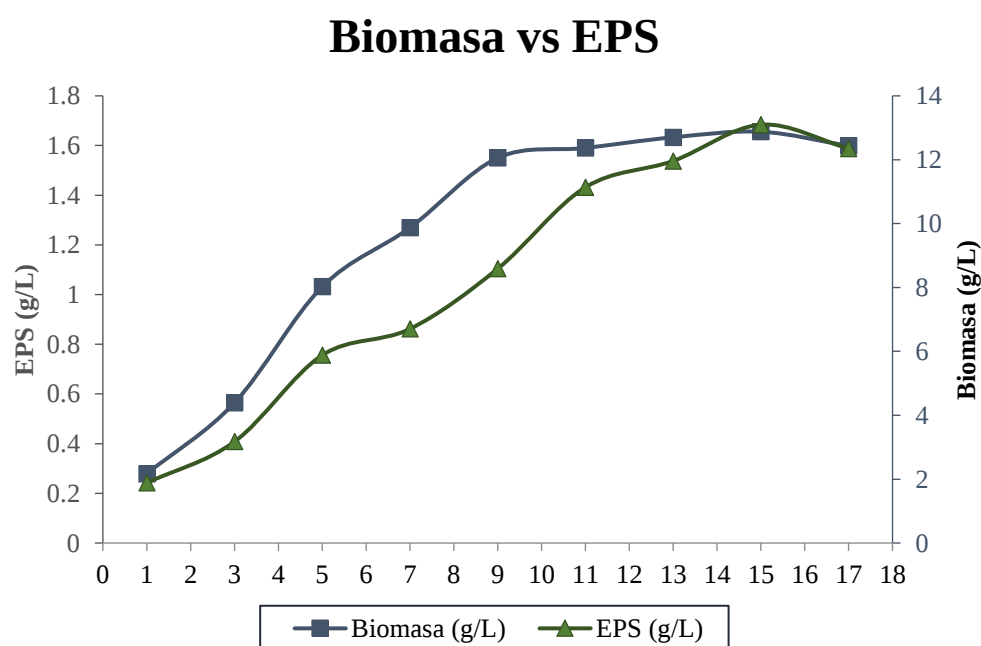
Nota: Elaboración propia.

1.5.2. Relación biomasa – producción de EPS

La biomasa de *Fusarium oxysporum* aumentó de 2.166 g/L a 12.876 g/L (día 15), mostrando inicialmente una tendencia paralela con la producción de EPS, lo que indica una asociación parcial entre el crecimiento celular y la síntesis del polisacárido extracelular; sin embargo, a partir del intervalo de días 11 a 15 se observa un desacoplamiento progresivo, ya que la biomasa tiende a estabilizarse mientras la producción de EPS continúa incrementándose hasta su valor máximo, evidenciando que la síntesis de EPS no es estrictamente crecimiento-dependiente sino que responde a una transición metabólica hacia la fase estacionaria. Este comportamiento ha sido descrito en fermentaciones fúngicas donde la producción de EPS puede comportarse como un metabolito mixto, parcialmente asociado al crecimiento y parcialmente a la fase estacionaria, dependiendo del estado fisiológico del microorganismo y la disponibilidad de sustrato. En este contexto, el incremento sostenido de EPS aun con biomasa estabilizada sugiere una redirección del flujo de carbono hacia metabolitos extracelulares como estrategia adaptativa frente a limitaciones ambientales, lo que implica que la optimización del proceso no debe centrarse únicamente en maximizar biomasa, sino en inducir condiciones que favorezcan la producción de EPS, siendo la fase estacionaria temprana el punto óptimo de producción biotecnológica (106,14).

Figura 15

Producción de exopolisacáridos (EPS) en función de la biomasa de *Fusarium oxysporum*



Nota: Elaboración propia.

1.5.3. Rendimientos del proceso y su comportamiento cinético

Los coeficientes de rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$), producto/sustrato ($Y_{p/s}$) y producto/biomasa ($Y_{p/x}$) fueron determinados a lo largo del cultivo con el fin de evaluar la eficiencia del proceso de producción de exopolisacáridos (EPS) por *Fusarium oxysporum* (Tabla 7).

Tabla 7
Rendimientos

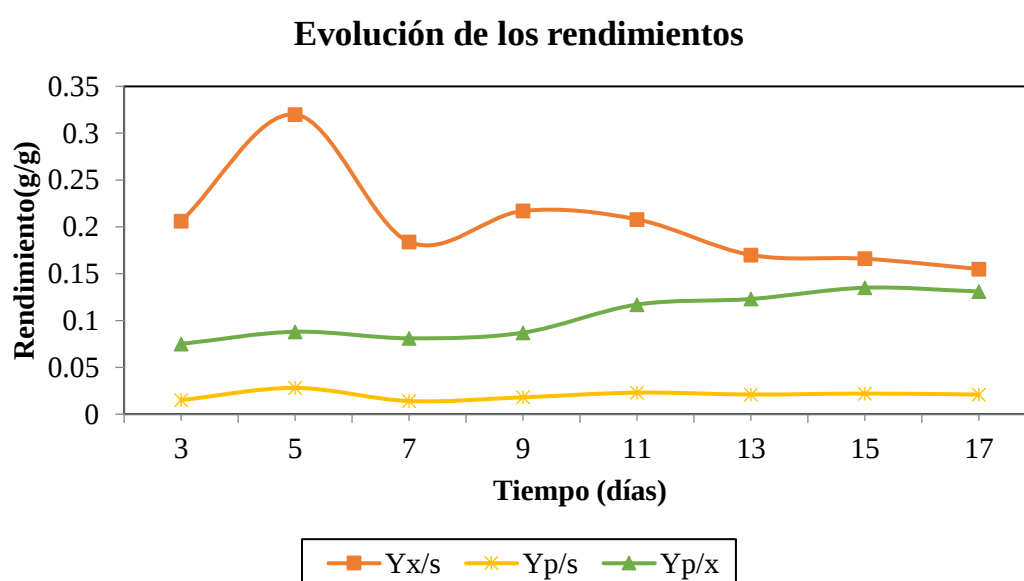
Tiempo (días)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$Y_{p/x}$ (g/g)
3	0.206	0.015	0.075
5	0.320	0.028	0.088
7	0.184	0.014	0.081
9	0.217	0.018	0.087
11	0.208	0.023	0.117
13	0.170	0.021	0.123
15	0.166	0.022	0.135
17	0.155	0.021	0.131

Nota: Elaboración propia.

La evolución de estos parámetros se presenta en la Figura 16, donde se evidencian cambios asociados a las diferentes fases del crecimiento microbiano.

Figura 16

Evolución de los rendimientos biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$), producto/sustrato ($Y_{p/s}$) y producto/biomasa ($Y_{p/x}$) durante el cultivo de *Fusarium oxysporum*



Nota: Elaboración propia.

Se observó que el rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$) presentó un incremento durante los primeros días del cultivo, alcanzando un valor de 0.320 g/g en el día 5. Este comportamiento podría estar relacionado con una etapa de elevada actividad metabólica y rápida proliferación celular, en la cual *Fusarium oxysporum* convirtió el sustrato con mayor eficiencia en nueva biomasa. La presencia de este pico sugiere una fase de adaptación y crecimiento exponencial en la que el consumo de sustrato se orienta principalmente hacia procesos anabólicos y síntesis celular, fenómeno que ha sido descrito previamente en sistemas microbianos durante las etapas tempranas del cultivo (88).

Posteriormente, el rendimiento $Y_{x/s}$ disminuyó progresivamente hasta alcanzar un valor de 0.155 g/g en el día 17. Esta disminución no implica una reducción de la biomasa acumulada, sino una menor eficiencia en la conversión del sustrato consumido en nueva biomasa. En efecto, aunque la concentración de biomasa continuó incrementándose hasta alcanzar su valor máximo de 12.876 g/L en el día 15, la velocidad de crecimiento comenzó a disminuir a partir del día 11, indicando la transición hacia la fase estacionaria. Durante esta etapa, una mayor proporción del carbono consumido fue destinada al mantenimiento celular y a la síntesis de metabolitos extracelulares, como los exopolisacáridos, en lugar de emplearse exclusivamente en la formación de nueva biomasa. Este comportamiento es característico de los hongos filamentosos productores de metabolitos secundarios y ha sido descrito previamente para especies del género *Fusarium* (1).

En cuanto al rendimiento producto/sustrato ($Y_{p/s}$), se evidenció un incremento progresivo a lo largo del cultivo, alcanzando valores máximos de aproximadamente 0.022–0.023 g EPS/g sustrato entre los días 11 y 15. Esta tendencia sugiere una mayor utilización del sustrato para la síntesis de exopolisacáridos (EPS) en etapas más avanzadas del proceso. Dicho comportamiento coincide con reportes previos donde la producción de EPS se favorece bajo condiciones de limitación nutricional, especialmente cuando disminuyen las fuentes de carbono disponibles para el crecimiento celular (115).

Por otro lado, el rendimiento producto/biomasa ($Y_{p/x}$) presentó un incremento continuo desde 0.075 g/g hasta alcanzar su valor máximo de 0.135 g/g en el día 15, disminuyendo ligeramente en el día 17. Este resultado indica que, conforme disminuyó la velocidad de crecimiento celular, la biomasa formada adquirió una mayor capacidad para sintetizar EPS, lo que sugiere que la producción de este biopolímero estuvo parcialmente asociada a la fase estacionaria del cultivo. Este patrón ha sido descrito en diversos hongos filamentosos y microorganismos productores

de biopolímeros, donde los metabolitos extracelulares se sintetizan con mayor intensidad cuando la velocidad de crecimiento disminuye (116).

En conjunto, los resultados muestran que el máximo rendimiento biomasa/sustrato no coincide necesariamente con la máxima concentración de biomasa. Mientras que el mayor valor de $Y_{x/s}$ se registró en el día 5, reflejando la etapa de mayor eficiencia en la conversión del sustrato en biomasa durante la fase exponencial, la concentración máxima de biomasa se alcanzó en el día 15 como consecuencia de la acumulación progresiva del crecimiento a lo largo del cultivo. Paralelamente, los mayores valores de $Y_{p/s}$ y $Y_{p/x}$ también se observaron alrededor del día 15, indicando que en esta etapa el metabolismo del microorganismo se orientó preferentemente hacia la producción de exopolisacáridos. Por ello, el día 15 constituye el tiempo óptimo de cosecha para la obtención de EPS, ya que combina la mayor concentración de biomasa con la mayor eficiencia de producción del biopolímero. Desde el punto de vista biotecnológico, este comportamiento permite identificar un tiempo de cultivo potencialmente adecuado para optimizar la producción de biopolímeros de interés industrial (1).

1.5.4. Evaluación preliminar de la producción de EPS mediante el método fenol-ácido sulfúrico en microplaca

En el punto óptimo de producción determinado en el día 15 de cultivo, se realizó la cuantificación de exopolisacáridos (EPS) mediante el método colorimétrico de fenol-ácido sulfúrico en formato de microplaca. A partir de la curva de calibración previamente establecida, se interpolaron las absorbancias obtenidas para las muestras analizadas por triplicado.

Tabla 8

Cuantificación de azúcares totales del exopolisacárido (EPS) obtenido al día 15 mediante el método fenol-ácido sulfúrico.

Réplica	Concentración (g/L)
A	0.58
B	0.59
C	0.58
Media $\pm$ SD	0.58 $\pm$ 0.01

Nota: Elaboración propia.

Como se muestra en la Tabla 8, las concentraciones de azúcares totales del exopolisacárido (EPS) obtenidas en las tres réplicas analíticas fueron de 0.58, 0.59 y 0.58 g/L, respectivamente, registrándose un valor promedio $\pm$ desviación estándar de 0.58 ± 0.01 g/L. La baja dispersión

observada entre los resultados evidencia una adecuada repetibilidad del método analítico empleado y una buena consistencia en las mediciones realizadas.

Con base en este valor promedio, la concentración experimental de EPS fue de 0.58 g/L. Considerando una concentración teórica de referencia de 1.00 g/L, se obtuvo un porcentaje de recuperación de 58 %, lo cual refleja la proporción de producto efectivamente recuperado respecto al valor esperado bajo condiciones ideales. Adicionalmente, se registró una biomasa (pellet) de 0.069 g, correspondiente al crecimiento celular de *Fusarium oxysporum* obtenido durante el proceso de cultivo. El porcentaje de recuperación obtenido confirma la producción de EPS en el punto óptimo del cultivo. Este comportamiento es consistente con lo reportado en la literatura, donde se describe que la síntesis de exopolisacáridos tiende a incrementarse en fases tardías del crecimiento microbiano, particularmente en fase estacionaria. La concentración promedio de exopolisacáridos obtenida fue de 0.58 ± 0.01 g/L. La baja desviación estándar observada evidencia una adecuada precisión analítica y una buena reproducibilidad entre las réplicas evaluadas, lo que respalda la confiabilidad de los resultados obtenidos. En términos comparativos, el porcentaje de recuperación obtenido (58 %) puede considerarse satisfactorio para un proceso de extracción de exopolisacáridos, debido a que la recuperación de estos biopolímeros suele verse afectada por pérdidas durante las etapas de centrifugación, filtración, precipitación con etanol y recuperación del precipitado. Esto sugiere que el sistema evaluado presenta una eficiencia moderada, con posibilidad de optimización en las etapas de recuperación (1).

Por otro lado, es importante considerar que el método fenol-ácido sulfúrico cuantifica carbohidratos totales sin diferenciar entre tipos de polisacáridos, lo cual puede influir en la exactitud de la cuantificación del EPS (8,104).

En conjunto, los resultados evidencian que el día 15 constituye un punto óptimo para la producción de EPS, aunque se recomienda optimizar las condiciones de extracción y purificación para mejorar el rendimiento del biopolímero.

1.6. Consumo de sustrato y análisis de carbohidratos

1.6.1. Cuantificación de azúcares (DNS)

Los valores de azúcares reductores (DNS) disminuyen progresivamente de 99.2 g/L a 31.5 g/L, lo que confirma la utilización activa de carbohidratos durante la fermentación.

La cuantificación se realizó mediante el método DNS empleando una curva de calibración con glucosa estándar, cuya ecuación de regresión lineal fue $y = 2.0407x - 0.0559$ y un

coeficiente de determinación $R^2 = 0.999$, evidenciando alta linealidad del método (ver Anexo 6 y 7). Para asegurar que las mediciones se encontraran dentro del rango lineal de la curva de calibración, las muestras fueron previamente diluidas cuando fue necesario.

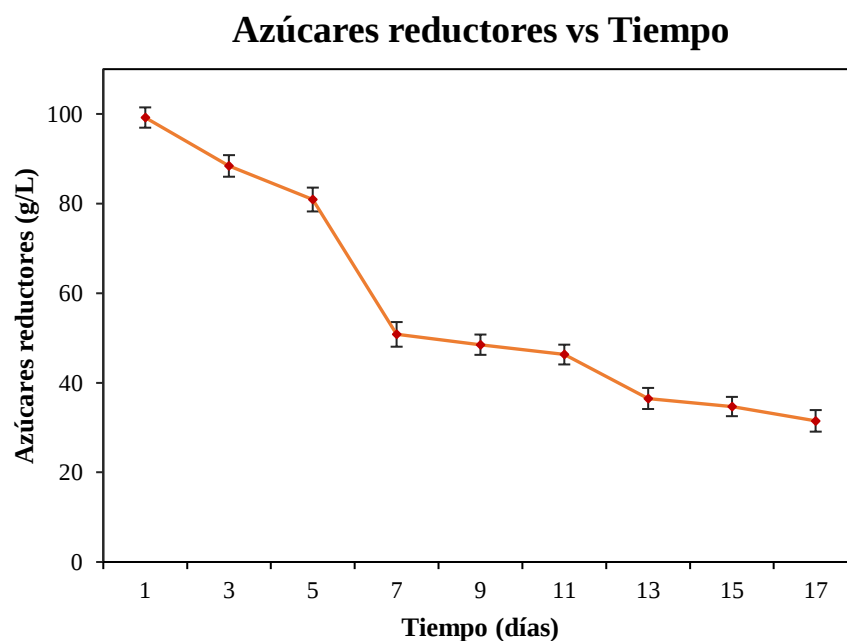
Esta reducción es consistente con el consumo de glucosa durante el cultivo y su conversión en biomasa y exopolisacáridos (EPS). Asimismo, la relación inversa observada entre la concentración de azúcares reductores y la producción de EPS sugiere que estos compuestos fueron utilizados como sustratos para la biosíntesis de polisacáridos extracelulares.

Diversos estudios han demostrado que los EPS fúngicos están compuestos principalmente por monosacáridos como glucosa, galactosa y manosa, derivados directamente del metabolismo de azúcares simples presentes en el medio (162). Por tanto, la disminución de azúcares reductores es un indicador indirecto de la síntesis de EPS.

Asimismo, la disminución más marcada en etapas intermedias del cultivo coincide con la fase de mayor producción de EPS, lo cual ha sido reportado previamente en fermentaciones donde los carbohidratos se canalizan hacia la formación de metabolitos extracelulares (117).

Figura 17

Variación de la concentración de azúcares reductores durante el cultivo de *Fusarium oxysporum*.



Nota: Elaboración propia.

1.6.2. Relación sustrato–biomasa–EPS

Los resultados experimentales evidencian una relación dinámica y estrechamente acoplada entre el consumo de sustrato (DNS), la formación de biomasa y la producción de exopolisacáridos (EPS) a lo largo del cultivo. Los datos experimentales que sustentan este análisis se encuentran en el Anexo 1. Inicialmente, se observa una elevada concentración de azúcares reductores (99.2 g/L en el día 1), la cual disminuye progresivamente hasta 31.5 g/L al día 17, lo que indica un consumo sostenido del sustrato por el microorganismo. Este comportamiento es consistente con procesos fermentativos donde el carbono disponible es utilizado tanto para crecimiento celular como para la síntesis de metabolitos extracelulares (106).

En términos de biomasa, se evidencia un incremento rápido durante los primeros días, pasando de 2.166 g/L a 12.702 g/L (día 13), seguido de una fase de estabilización. Este patrón sugiere una cinética típica de crecimiento microbiano con transición de fase exponencial a estacionaria, donde la limitación de sustrato y la acumulación de productos metabólicos comienzan a restringir la proliferación celular (88).

De manera paralela, la producción de EPS muestra un incremento sostenido, alcanzando un máximo de 1.684 g/L en el día 15. Es importante destacar que la síntesis de EPS continúa incluso cuando la biomasa entra en fase estacionaria, lo cual sugiere que estos biopolímeros están asociados a un metabolismo secundario o parcialmente desacoplado del crecimiento celular. Este comportamiento ha sido ampliamente reportado en microorganismos productores de polisacáridos, donde la producción de EPS se intensifica bajo condiciones de estrés o limitación de nutrientes (1).

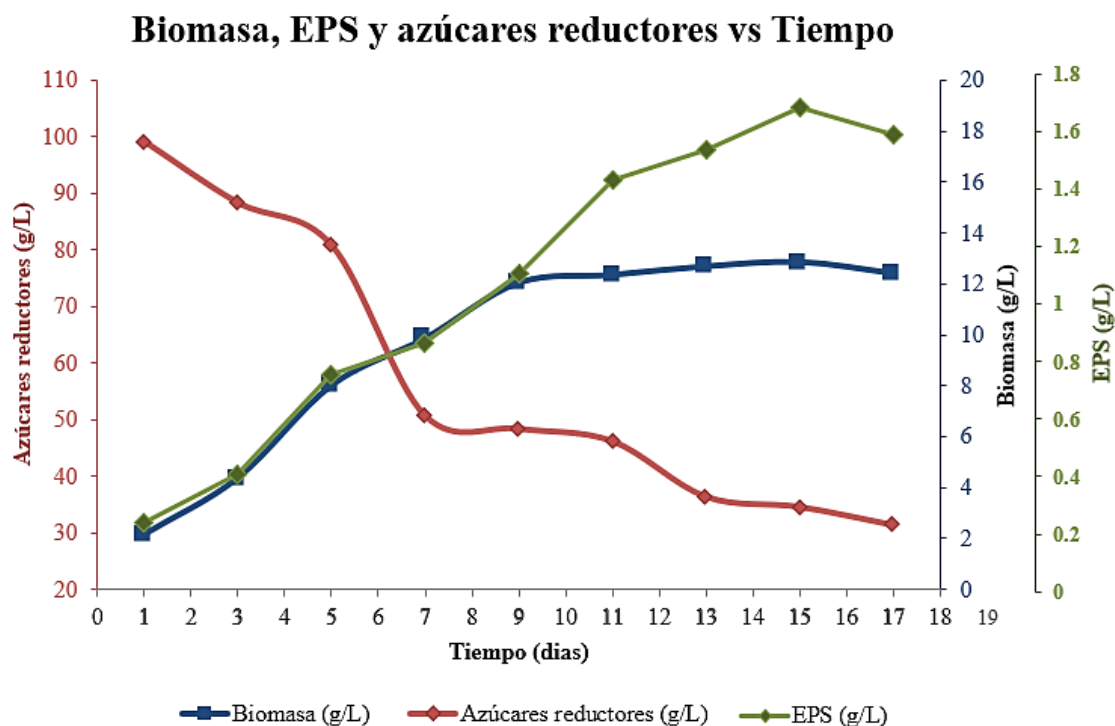
Asimismo, la relación inversa entre la concentración de azúcares reductores y la acumulación de biomasa y EPS confirma la eficiencia del microorganismo en la conversión del sustrato. Durante la fase intermedia del cultivo (días 7–13), se observa una disminución más pronunciada del DNS coincidiendo con incrementos significativos en biomasa y EPS, lo que sugiere un periodo de alta actividad metabólica y elevada tasa de asimilación de carbono.

Adicionalmente, el comportamiento del pH (ligera acidificación inicial seguida de estabilización) indica la posible producción de metabolitos orgánicos durante la fase de crecimiento, lo cual puede influir en la regulación enzimática y en la síntesis de EPS. Este tipo de variaciones es común en sistemas fermentativos donde el metabolismo del carbono genera ácidos orgánicos como subproductos (118).

En conjunto, los resultados demuestran que existe una clara interdependencia entre el consumo de sustrato, el crecimiento celular y la producción de EPS, siendo el sustrato la fuerza impulsora principal que regula tanto la cinética de crecimiento como la biosíntesis de metabolitos extracelulares.

Figura 18

Cinética de biomasa, producción de EPS y consumo de azúcares reductores



Nota: Elaboración propia.

1.6.3. Eficiencia de conversión y análisis metabólico

La eficiencia de conversión del sustrato puede evaluarse a partir de la relación entre la cantidad de sustrato consumido y los productos generados (biomasa y EPS). En este estudio, la reducción significativa de los azúcares reductores (~68% del valor inicial) se traduce en un incremento notable de biomasa (~12.8 g/L) y producción de EPS (~1.68 g/L), lo cual indica una adecuada capacidad del microorganismo para canalizar el carbono hacia rutas anabólicas. Desde una perspectiva metabólica, el carbono proveniente del sustrato es dirigido principalmente hacia dos rutas: (i) la generación de energía y precursores celulares mediante la glucólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, y (ii) la biosíntesis de polisacáridos extracelulares a través de rutas específicas de activación de azúcares (UDP-glucosa, GDP-manosa, entre otros). La persistencia

en la producción de EPS durante la fase estacionaria sugiere que esta ruta metabólica permanece activa aun cuando la división celular disminuye (119).

Por otro lado, la ligera disminución de EPS después del día 15 podría estar asociada a fenómenos de degradación enzimática o a limitaciones energéticas, lo cual ha sido reportado en sistemas donde el balance entre síntesis y consumo de polisacáridos se ve afectado por condiciones ambientales o agotamiento de nutrientes (2).

En términos de rendimiento, la relación sustrato-producto observada en este estudio es comparable con reportes previos en sistemas microbianos productores de EPS, donde se ha demostrado que la optimización de las condiciones de cultivo permite maximizar la conversión de carbono hacia metabolitos de interés biotecnológico (120).

Finalmente, el análisis integrado de los datos sugiere que el sistema presenta una eficiencia metabólica adecuada, con una clara transición de metabolismo primario (crecimiento) hacia metabolismo secundario (producción de EPS), lo cual es clave para procesos de optimización y escalamiento industrial.

1.7. Evaluación del efecto de las variables de cultivo sobre la producción de exopolisacáridos

1.7.1. Resultados del diseño experimental

Inicialmente, para esta investigación se eligió el diseño Box –Behnken, aplicando la metodología de superficie de respuesta (RSM) que permite optimizar el rendimiento (%) de los exopolisacáridos. Este diseño permite encontrar el punto óptimo a partir de múltiples combinaciones e interacciones de las variables independientes estudiadas sobre la variable de respuesta.

Se usó el software Design Expert Version 13.0, en donde se obtuvieron 15 tratamientos experimentales (Tabla 9) con tres replicas centrales, para evaluar el efecto de 3 factores: concentración de glucosa (g/L), concentración de levadura (g/L); y pH sobre la variable de respuesta; rendimiento, expresado en porcentaje (R%), que indica la relación entre la masa de EPS producida y la masa inicial de glucosa presente en el medio de cultivo como se muestra en la siguiente ecuación.

$$\text{Variable de respuesta (Y): } Y_{P/S} = R(\%) = \frac{\text{Producto formado}}{\text{Sustrato inicial}} = \frac{\text{EPS}}{\text{glucosa inicial}}$$

Tabla 9

Pruebas obtenidas empleando el diseño Box Behnken basado en metodología de respuesta (RSM)

Identificación de la muestra	Glucosa (g/l)	Levadura (g/l)	pH	R (%)
N01	10	0.69	5.5	1.4900
N02	100	0.69	5.5	0.1960
N03	10	6.9	5.5	3.6000
N04	100	6.9	5.5	1.9240
N05	10	3.795	4.5	4.1000
N06	100	3.795	4.5	0.8700
N07	10	3.795	6.5	0.4000
N08	100	3.795	6.5	1.1840
N09	55	0.69	4.5	0.9745
N10	55	6.9	4.5	3.6400
N11	55	0.69	6.5	0.4982
N12	55	6.9	6.5	1.6400
N13	55	3.795	5.5	1.2255
N14	55	3.795	5.5	1.7745
N15	55	3.795	5.5	1.8982

Nota: Elaboración propia.

Estos resultados obtenidos se compararon con diferentes modelos lineales, modelos cuadráticos y modelos de 2Fi en el software, en el cual, el modelo 2FI mostró mejor ajuste, debido a su alta significancia estadística (valor $p < 0.0001$), demostrando que el modelo es confiable. También se muestra en la Tabla 10 que el Lack of fit (falta de ajuste) fue de 0.9097, indicando un análisis no significativo. Así como los coeficientes de determinación ajustado (R^2 ajustado) y predicho (R^2 predicho) de 0.9601 y 0.9334, respectivamente, mostrando su adecuada capacidad predictiva.

Tabla 10

Modelos propuestos por el software Design-Expert® versión 13.0

Modelo	Valor p	Falta de Ajuste	R^2 ajustado	R^2 predicho	
Lineal	0.0012	0.2068	0.6809	0.4760	
2FI	0.0002	0.9097	0.9601	0.9334	Sugerido
Cuadrático	0.8252	0.7932	0.9458	0.8634	
Cúbico	0.7932		0.9119		

Nota: Elaboración propia.

Por ende, en esta etapa experimental, se seleccionó el modelo de interacción de dos factores (2Fi), teniendo un R^2 de 0.9772 (Tabla 11), mostrando que los datos se ajustan a un modelo

lineal y no cuadrático, evidenciando que el 97,72 % puede ser interpretado sobre la variable de respuesta, es decir, en el rendimiento de los exopolisacáridos (% g/g).

Tabla 11
Estadística del modelo seleccionado 2FI

DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0.2411	R²	0.9772
MEDIA	1.69	R² ajustado	0.9601
C.V. %	14.23	R² predicho	0.9334
		Precisión adecuada	23.9837

Nota: Elaboración propia.

En el análisis de ANOVA, se muestra que el modelo es significativo con un valor F de 57.09, indicando que existe la relación entre las variables independientes y la variable de respuesta, es decir, que existe solo un 0,01 % de probabilidad de que un valor F tan elevado se deba al ruido. Teniendo en cuenta lo que se mostró en el software lo siguiente:

- Los valores p inferiores a 0,0500 indican que los términos del modelo son significativos. En este caso, las variables independientes como **A** (concentración de glucosa), **B** (concentración de levadura), **C** (pH) y las interacciones **AC** (concentración de glucosa – pH) tienen un valor $p < 0.0001$ y la interacción entre **BC** (concentración de levadura y pH) un valor de $p < 0.0134$, mostrando que estos resultados son términos significativos. No obstante, la interacción entre **AB** (concentración de glucosa – levadura) no muestra valores significativos, es decir, que cada variable actúa de forma independiente.
- El valor F de falta de ajuste de 0,27 implica que la falta de ajuste no es significativa en relación con el error puro. Existe un 90,97 % de probabilidad de que un valor F de falta de ajuste tan elevado se deba al ruido. Una falta de ajuste no significativa es positiva, ya que buscamos que el modelo se ajuste correctamente.

Tabla 12
Análisis de varianza ANOVA empleando el modelo de 2FI

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>df</i>	<i>Promedio de Cuadrados</i>	<i>Valor F</i>	<i>Valor p</i>	
Modelo	19.91	6	3.32	57.09	< 0.0001	Significativo
A-glucosa	3.67	1	3.67	63.07	< 0.0001	
B-levadura	7.31	1	7.31	125.67	< 0.0001	
C-pH	4.30	1	4.30	73.89	< 0.0001	
AB	0.0365	1	0.0365	0.6275	0.4511	
AC	4.03	1	4.03	69.29	< 0.0001	
BC	0.5804	1	0.5804	9.98	0.0134	
Residual	0.4651	8	0.0581			
Falta de Ajuste	0.2087	6	0.0348	0.2713	0.9097	No significativo
Error Puro	0.2564	2	0.1282			
Total	20.38	14				

Nota: Elaboración propia.

Cabe resaltar que el diseño experimental tuvo como objetivo evaluar la producción de exopolisacáridos como variable de respuesta principal, es por ello que los datos de la biomasa no se incluyeron dentro del análisis estadístico. Esto se basa en el objetivo de la investigación de poder evaluar la producción de EPS de manera independiente del desarrollo del microorganismo.

1.7.1.1. Cuantificación de azúcares totales presentes en el EPS de los tratamientos experimentales mediante el método fenol-ácido sulfúrico en tubos de ensayo

La cuantificación de carbohidratos totales, asociados a la producción de exopolisacáridos (EPS), se realizó mediante el método colorimétrico de fenol-ácido sulfúrico, empleando lecturas espectrofotométricas en tubos de ensayo. Este método permitió determinar la concentración de carbohidratos presentes en las muestras obtenidas bajo las diferentes condiciones experimentales evaluadas. Los resultados mostraron una variabilidad en la concentración de EPS entre los tratamientos, con valores comprendidos entre 0.143 y 0.993 g/L (Tabla 13). Cada tratamiento fue analizado por triplicado y los resultados se expresan como el promedio de las determinaciones.

Tabla 13

Concentración de exopolisacáridos determinada mediante el método fenol-ácido sulfúrico y porcentaje respecto a la concentración teórica de referencia.

Tratamiento	Concentración (g/L)	Porcentaje respecto a la concentración teórica (%)
N01	0.464	46
N02	0.411	41
N03	0.175	18
N04	0.993	99
N05	0.453	45
N06	0.652	65
N07	0.143	14
N08	0.632	63
N09	0.606	61
N10	0.828	83
N11	0.477	48
N12	0.634	63
N13	0.534	53
N14	0.967	97
N15	0.520	52

Nota: Elaboración propia.

Se observa que los tratamientos N04 y N14 presentaron las mayores concentraciones de EPS, con 0.993 y 0.967 g/L, respectivamente, mientras que los tratamientos N07 y N03 registraron las menores concentraciones, con 0.143 y 0.175 g/L, respectivamente. Estos resultados evidencian que las diferentes combinaciones de concentración de glucosa, extracto de levadura y pH influyeron en la producción de exopolisacáridos por *Fusarium oxysporum*.

Con fines comparativos, los resultados también se expresaron como porcentaje respecto a una concentración teórica de referencia de 1 g/L, obteniéndose valores comprendidos entre 14 % y 99 %. Este porcentaje permitió comparar de manera relativa la concentración alcanzada por cada tratamiento respecto al valor de referencia establecido, sin representar una medida de recuperación o pureza del producto.

En general, los tratamientos que presentaron mayores concentraciones de EPS también mostraron los porcentajes relativos más elevados, destacando N04 (99 %) y N14 (97 %). En contraste, los tratamientos N07 (14 %) y N03 (18 %) presentaron los valores más bajos, indicando una menor producción de carbohidratos asociados a los exopolisacáridos bajo dichas

condiciones de cultivo. Las diferencias observadas entre tratamientos sugieren que las variables evaluadas influyeron en la producción de EPS, tanto por sus efectos individuales como por sus posibles interacciones, lo que respalda la aplicación de un modelo estadístico para identificar las condiciones óptimas de producción.

En comparación con la evaluación preliminar en microplaca bajo condiciones óptimas, donde se obtuvo una concentración promedio de 0.58 g/L, los valores del diseño experimental incluyen dicho resultado dentro de su rango, evidenciando coherencia entre ambos enfoques a pesar de las diferencias metodológicas. Asimismo, al comparar los resultados obtenidos mediante el método gravimétrico y el método fenol-ácido sulfúrico, se observó que ambas metodologías permitieron evidenciar diferencias en la producción de exopolisacáridos bajo las distintas condiciones de cultivo evaluadas. Sin embargo, los valores obtenidos no fueron equivalentes debido a la naturaleza de cada técnica analítica. El método gravimétrico cuantifica la masa total del material recuperado tras la precipitación con etanol, mientras que el método fenol-ácido sulfúrico determina específicamente la fracción de carbohidratos presente en la muestra. Por ello, los resultados obtenidos mediante ambos métodos deben considerarse complementarios para la evaluación integral de los exopolisacáridos producidos por *Fusarium oxysporum*.

Finalmente, la cuantificación de los exopolisacáridos se realizó a partir de una curva de calibración con glucosa estándar, la cual presentó adecuada linealidad ($R^2 = 0.9966$), garantizando la confiabilidad del método analítico. La relación entre absorbancia (y) y concentración (x) se describió mediante la ecuación: $y = 3.2835x + 0.2299$, la cual permitió expresar los resultados como equivalentes de glucosa. La curva de calibración se presenta en el Anexo 8.

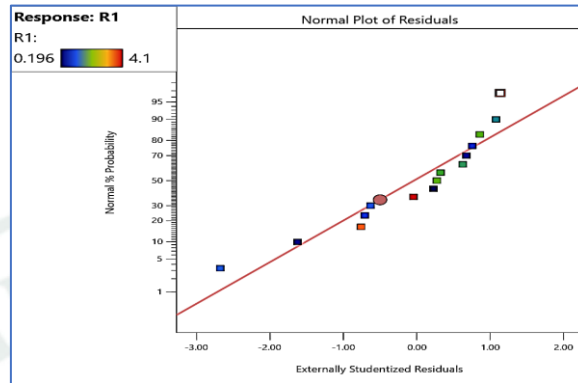
1.7.2. Modelo cuadrático y análisis estadístico

A continuación, se presenta la ecuación del modelo en valores reales, la cual permite calcular y predecir el rendimiento (% g/g) dentro del rango estudiado.

$$\begin{aligned} R = & 9.42650 - 0.135101 * \text{glucosa} + 1.02012 * \text{levadura} - 1.49371 * \text{pH} \\ & - 0.000683 (\text{glucosa} * \text{levadura}) + 0.022300 (\text{glucosa} * \text{pH}) \\ & - 0.122681 (\text{levadura} * \text{pH}) \end{aligned}$$

1.7.2.1. Prueba de normalidad

Figura 19
Gráfico de normalidad de residuos

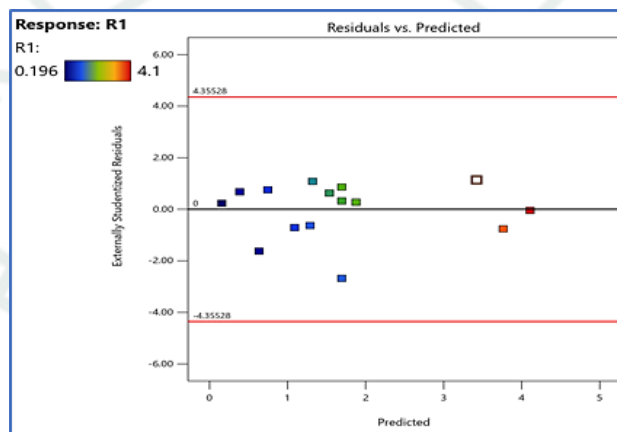


Nota: Elaboración propia.

Analizando la gráfica de probabilidad normal de los residuos mostrada, se denota una distribución aproximadamente lineal de los residuos cercanos a la recta de referencia, aunque en sus extremos presenta variaciones ligeras, lo que indica que están dentro de una distribución aceptable. Esto confirma que la suposición de normalidad de los residuos garantiza que se cumple adecuadamente, lo cual valida el uso de herramientas en el modelo estadístico realizado. Cabe resaltar, que la ausencia de desviaciones o valores atípicos marcados sugieren que no hay outliers significativos que afecten la tendencia esperada.

1.7.2.2. Residuos vs valores predichos

Figura 20
Representación gráfica de residuos vs valores predichos



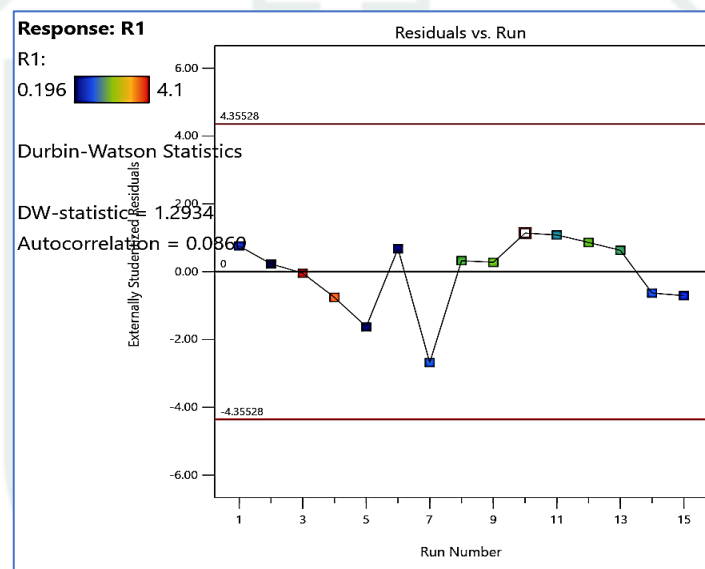
Nota: Elaboración propia.

En el análisis de la gráfica de residuos vs valores predichos se muestran los puntos dispersados aleatoriamente cerca de la línea central. Esto indica que la varianza de los residuos tiene una

dispersión constante aproximadamente a lo largo de los valores predichos. Estos resultados cumplen con la suposición de la homocedasticidad, también se evidencia que no hay presencia de curvaturas o patrones definidos. La falta de estructuras en los residuos evidencia que el modelo describe adecuadamente la relación que existe entre las variables independientes (concentración de glucosa, concentración de levadura y pH) y la variable de respuesta (rendimiento %). En conjunto, el modelo no presenta problemas de no linealidad o falta de ajuste.

1.7.2.3. Residuos vs orden de corrida

Figura 21
Representación gráfica de Residuos vs Orden de corrida



Nota: Elaboración propia.

En torno a la gráfica 3, se observa que los residuos varían aleatoriamente en función del orden en que se desarrollaron los experimentos, es decir, se distribuyen alrededor de la línea central en cero. También se denota que el modelo no presenta tendencias sistematicas o patrones definidos, evidenciándose que los errores experimentales son independientes. Sin embargo, DW – estadístico (estadístico de Durbin-Watson) muestra un valor de 1.29 que indica una autocorrelación positiva y un valor de autocorrelación estimado de (~0.086) que está dentro de un rango aceptable. Estos resultados en conjunto indican la independencia de los residuos, validando el modelo.

En conjunto, los gráficos analizados demuestran que el modelo presenta un ajuste adecuado. Estos resultados confirman:

- Los residuos están distribuidos adecuadamente mostrando su varianza de los residuos constante dentro de los valores predichos.
- Aunque se observa una ligera desviación en los extremos y una autocorrelación débil, es decir, $DW = 1.29$, se puede interpretar que el modelo es confiable y válido.

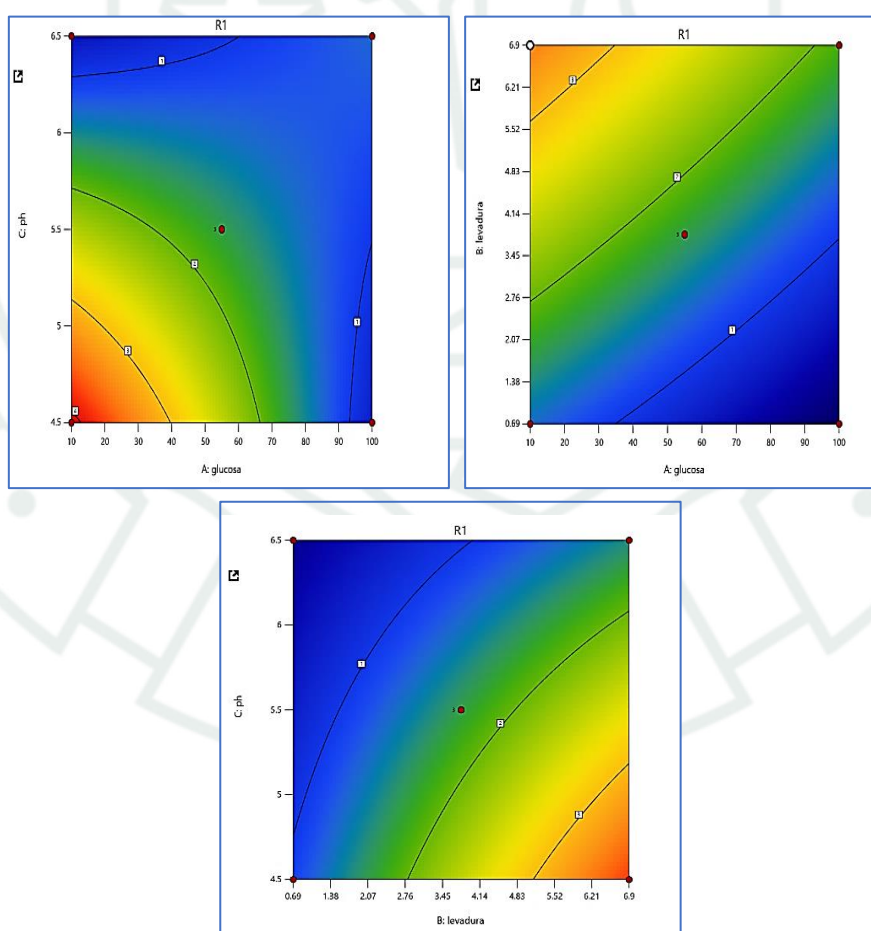
1.7.3. Interacción de variables

Se emplearon gráficos de contorno para evaluar el efecto de las interacciones de las variables sobre la producción de los exopolisacáridos generados a partir del modelo de interacción dos factores (2FI).

Figura 22

Gráfico de contorno de las interacciones respecto a la producción de exopolisacáridos,

A) Interacción de la concentración de glucosa en función al pH, B) Interacción de la concentración de glucosa y levadura, C) Interacción de la concentración de levadura en función del pH.



Nota: Elaboración propia.

1.7.3.1. Interacción entre Glucosa -pH

El gráfico de contorno de la interacción de la concentración de glucosa en función del pH muestra que las máximas respuestas se concentran a bajas concentraciones de glucosa entre ~10 – 20 y pH ácido de ~ 4.5 – 5.0, mientras que la producción de EPS disminuye al incrementar estas variables (glucosa y pH). El sistema describe que la concentración de glucosa está condicionada por el pH del medio, es decir, que la fuente de carbono no actúa de forma independiente, sino que depende del pH. En sistemas biológicos muchas veces influye las condiciones del medio de cultivo, como la disponibilidad de la fuente de carbono y pH que influye en la síntesis de polisacáridos extracelulares (121).

1.7.3.2. Interacción entre Glucosa - Levadura

La interacción entre el factor AB (glucosa – levadura) no es significativa, es decir, actúan de manera independiente cada factor sobre la variable de respuesta. En el gráfico de contorno de interacción entre la concentración de glucosa y el extracto de levadura se observa un gradiente uniforme en la respuesta, en donde la región óptima en la producción de exopolisacáridos claramente aumenta al incrementar la concentración de levadura entre (~6–7) y cuando la glucosa disminuye entre (~10–30). Pero disminuye en elevadas concentraciones de glucosa. También se muestra que las líneas son casi lineales; la interacción entre el factor AB (glucosa – levadura) no es significativa; es decir, actúan de manera independiente, cada factor sobre la variable de respuesta, siendo la levadura un factor dominante positivo (122).

1.7.3.3. Interacción entre Levadura - pH

En el sistema de la concentración de levadura y del pH, se observa que incrementar la concentración de levadura entre ~6–7 y mantener un pH ácido entre ~4.5–5.0 favorece la producción de exopolisacáridos. También se observan en el gráfico líneas de contorno curvas e inclinadas; no son paralelas. Esto indica que el efecto de la levadura depende del pH. La interacción BC demuestra que es significativa, coincidiendo con el ANOVA, evidenciando que la fuente de nitrógeno favorece el crecimiento y metabolismo estimulando la producción de EPS y el pH ácido favorece la actividad enzimática (122).

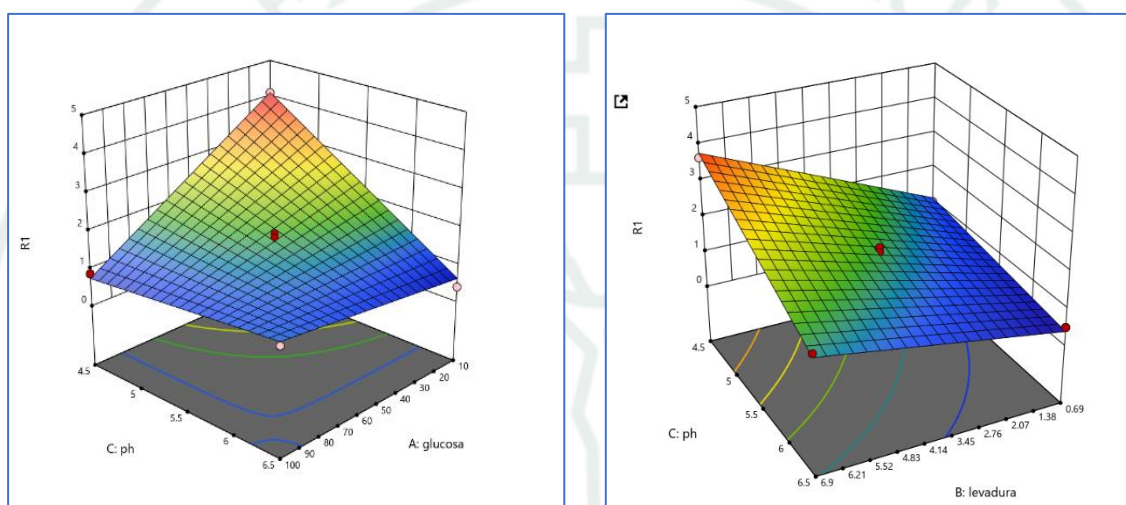
En síntesis, estos resultados muestran que la fuente de nitrógeno, la levadura, tiene una influencia positiva sobre la respuesta, despejando a los demás factores como la glucosa y pH, que presentaron un efecto negativo. Asimismo, se determinó que en condiciones de pH ácido – alta concentración de levadura y baja concentración de glucosa favorecen la producción de exopolisacáridos, expresado en rendimiento (%). Estos resultados son consistentes con los

fundamentos del análisis de superficies de respuesta, donde la interacción entre factores es determinante en la descripción del sistema (109).

En la Figura 23. se visualizó un efecto combinado entre las interacciones de los factores sobre la variable de respuesta gracias a las superficies de respuesta tridimensionales.

Figura 23

Representación de las superficies de respuesta tridimensional, A) Interacción del efecto de la concentración de la glucosa sobre pH, B) Interacción del efecto de la concentración de levadura sobre pH



Nota: Elaboración propia.

1.7.3.3.1. Interacción glucosa – pH:

Se observó en la Gráfica 5.A que la variable de respuesta (R1) disminuyó cuando la glucosa y el pH aumentaron; sin embargo, el R1 (rendimiento %) alcanza valores máximos al tener condiciones bajas de glucosa y pH ácido. La inclinación de la superficie denota que existe un efecto positivo entre ambos factores.

1.7.3.3.2. Interacción levadura – pH

En la gráfica 5.B, el R1 incrementa conforme la levadura se encuentra en valores altos y el pH en valores bajos, identificando la región óptima del sistema.

1.7.4. Validación del punto óptimo

Para la optimización, el software Design Expert evaluó simultáneamente el efecto de las variables independientes sobre la respuesta, en donde generó 100 soluciones, y se seleccionó la solución número 94 por tener un valor de deseabilidad igual a 1.000, el cual permitió describir

adecuadamente el comportamiento del sistema y el modelo óptimo ajustado. En la Tabla 14 se muestran las condiciones óptimas que corresponden a una concentración de glucosa de 10.25 g/L, extracto de levadura de 6.64 g/l a un pH de 4.68, dando una producción aproximada de 5.12 % de exopolisacáridos.

Tabla 14

Condiciones óptimas determinadas para la producción de EPS mostrado del software con el modelo ajustado 2FI

Glucosa	Levadura	pH	EPS %	Deseabilidad
10.250	6.640	4.675	5.045	1.000

Nota: Elaboración propia.

Se realizaron 3 repeticiones experimentales bajo esas condiciones óptimas con el fin de validar el modelo propuesto. En la Tabla 15 se muestran los valores obtenidos en la producción de exopolisacáridos de 5.16, 4.98, 5.21 %, con un promedio de 5.12 %, respectivamente. Estos resultados experimentales se encuentran en buen acuerdo con el valor predicho por el modelo y dentro del intervalo de predicción al 95%, así como con la desviación estándar (0.24), lo que confirma la validez y capacidad predictiva del modelo desarrollado.

Tabla 15

Validez experimental de las tres repeticiones experimentales

Glucosa (g/l)	Levadura (g/L)	pH	EPS R %	Promedio Experimental R%	Valor Predicho %	Desviación Estándar	Intervalo de predicción (IC=95%)
10.25	6.64	4.68	5.16 4.98 5.21	5.12	5.05	0.24	4.52 – 5.57

Nota: Elaboración propia.

1.8. Caracterización de los exopolisacáridos

1.8.1. Purificación del EPS

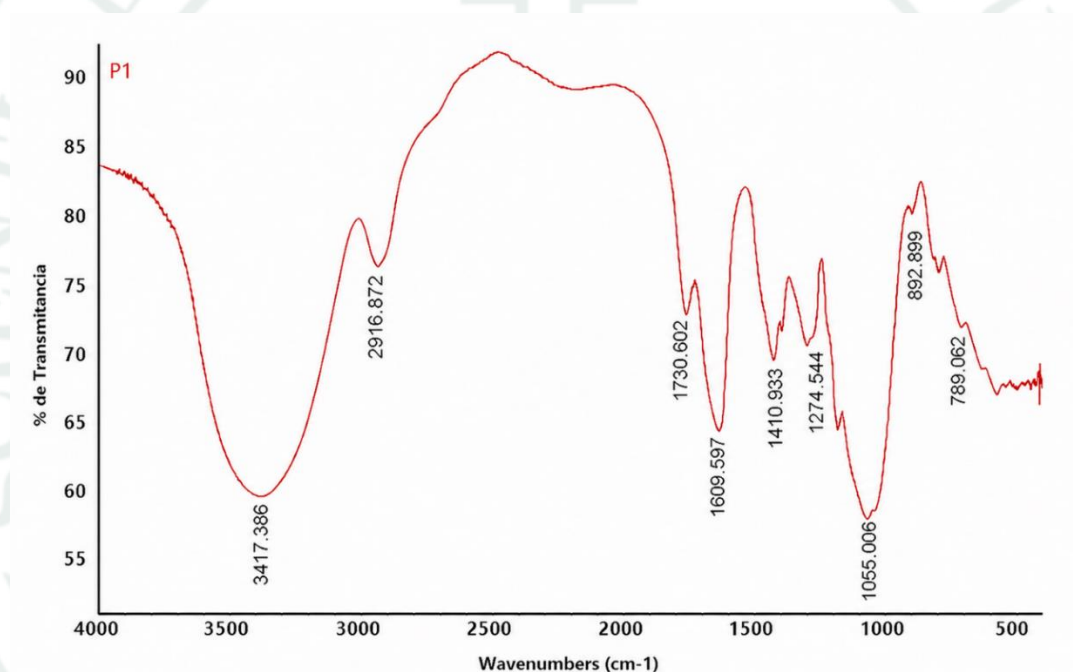
La muestra obtenida del EPS se purificó mediante precipitación con etanol con el fin de eliminar interferencias o impurezas como sales y restos del medio de cultivo que podrían interferir en el espectro en el análisis por FTIR. De esta manera, se pueden obtener señales más definidas de

los grupos funcionales propios de los exopolisacáridos, para así interpretar buenos resultados. Estos análisis fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Investigación de Procesos en el cuarto piso del edificio F de la Universidad Católica de Santa María.

1.8.2. Análisis FTIR (grupos funcionales)

El análisis mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se realizó en un rango espectral de $3884\text{--}594\text{ cm}^{-1}$, empleando 32 barridos tanto para la muestra como para el fondo. En la figura 24 se muestra el espectro obtenido en la investigación, mientras que en la Tabla 16 se presenta un resumen de las bandas identificadas.

Figura 24
Resultados en el espectro del EPS (P1)



Nota: Elaboración propia.

Tabla 16
Grupos funcionales identificados en la región espectral infrarrojo en FTIR

Posición (cm ⁻¹)	Asignación de la banda	Grupo Funcional
3417.386	Vibración de estiramiento de los polisacáridos	-OH
2916.872	Vibraciones de grupo CH / típicas de carbohidratos microbianos	-C-H
1609.597 – 1730.602	Vibración de estiramiento C=O del grupo N-acetilo/ ácido carboxílico protonado	C=O
1410.933	Estiramiento simétrico del grupo COO ⁻	COO ⁻
1055.006	Enlaces glucosídicos/presencia de anillo piranosa	C-O-C / C-O-H
892.899	Carbón de estructura anomérica de la glucosa / β-glucosídico	β-glucano

Nota: Elaboración propia.

En el espectro FTIR se observa una banda ancha e intensa alrededor de 3417 cm⁻¹, característica de vibraciones de estiramiento del grupo hidroxilo (-OH), asociadas a enlaces de hidrógeno presentes en polisacáridos (175, 179, 180). Asimismo, se identifica una banda en 2916 cm⁻¹ atribuida al estiramiento de enlaces C-H de grupos alifáticos, lo cual sugiere a componentes lipídicos de membrana fúngica (123).

En la región de 1200–1000 cm⁻¹ se observa una banda intensa centrada en 1055 cm⁻¹, atribuida a vibraciones de estiramiento de enlaces C–O–C y C–O, características de carbohidratos. Esta zona se asocia a enlaces glucosídicos y a la región anomérica. Diversos estudios reportan señales similares entre 1028 y 1100 cm⁻¹, relacionadas con vibraciones de estos compuestos y la posible presencia de unidades en forma de anillo piranosa (124,125).

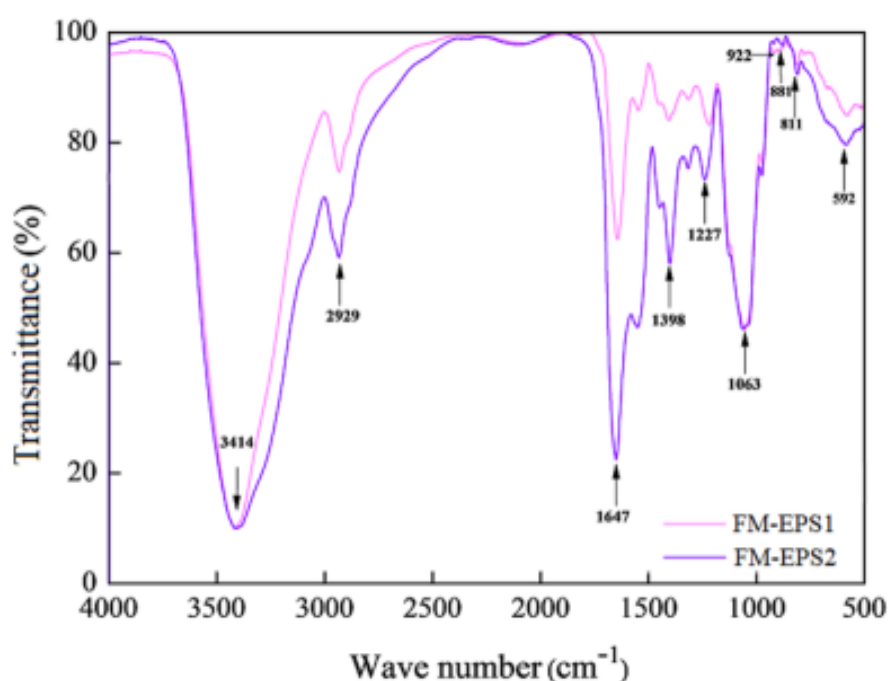
Sin embargo, la banda más resaltante se encontró en 892 cm⁻¹, asociada a vibraciones del carbono anomérico, característica de enlaces β-glucosídicos. Diversos estudios reportan señales en el rango de 880–900 cm⁻¹ como indicativas de este tipo de enlace, lo que respalda la presencia de configuraciones β en la estructura del EPS analizado (126,125).

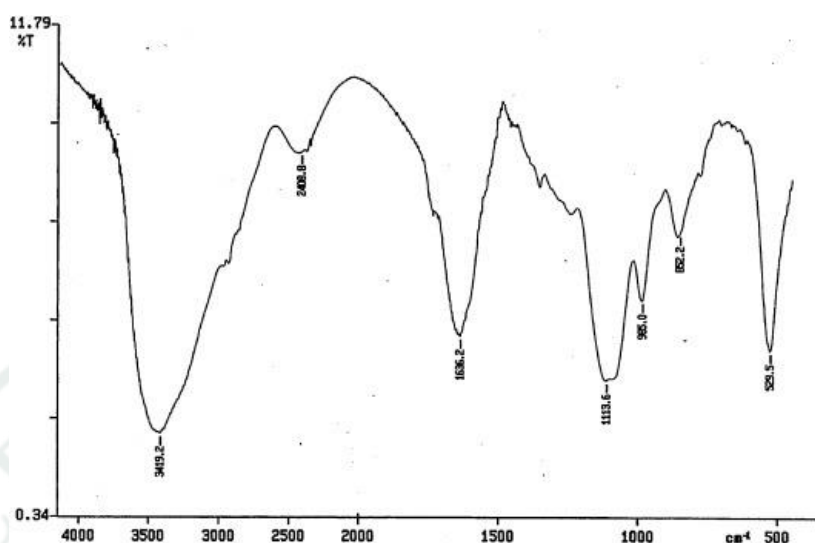
Complementariamente, en la región intermedia se identificaron bandas en 1730, 1609 y 1410 cm^{-1} , asociadas a grupos carbonílicos y carboxilatos. La señal en 1730 cm^{-1} se atribuye a vibraciones de C=O, mientras que la banda en 1609 cm^{-1} se relaciona con estiramientos de C=O o de COO^- , vinculados a ácidos carboxílicos o a grupos N-acetilo. Por su parte, la señal en 1410 cm^{-1} corresponde al estiramiento simétrico de los grupos carboxilato (COO^-). Estas asignaciones han sido reportadas en rangos similares para compuestos con grupos ácidos y posibles residuos proteicos asociados (124,123,126).

En conjunto, el análisis FTIR evidencia un patrón espectral característico, al comparar el espectro obtenido con los reportados en la literatura (Figura 25), se observó una alta similitud en las bandas principales, destacando las vibraciones de O-H ($\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$), C=O ($\sim 1600\text{--}1400 \text{ cm}^{-1}$) y enlaces glucosídicos ($\sim 1000\text{--}900 \text{ cm}^{-1}$), así como señales en la región anomérica ($\sim 880\text{--}900 \text{ cm}^{-1}$) asociadas a posibles configuraciones estructurales. Estas pueden presentar variaciones en el tipo de enlace, grado de ramificación y masa molecular (176), lo que evidencia la complejidad estructural del exopolisacárido analizado. Esta concordancia respalda la naturaleza del EPS producido por *Fusarium oxysporum*, siendo consistente con lo descrito para exopolisacáridos de origen fúngico.

Figura 25

Espectro de FTIR obtenido de investigaciones de *Fusarium merismoides* A6 (178) y *Fusarium equiseti* ANP2 (175), respectivamente.





Nota: Elaboración propia.

1.9. Implicaciones biotecnológicas y potencial aplicación de EPS

Los exopolisacáridos (EPS) producidos por microorganismos como *Fusarium oxysporum* presentan un alto interés biotecnológico debido a sus propiedades fisicoquímicas y funcionales, tales como la capacidad de retención de agua, viscosidad, formación de geles, actividad emulsificante y estabilidad en diferentes condiciones ambientales. Estas características les confieren un amplio potencial de aplicación en diversas industrias.

En el campo de la biotecnología ambiental, los EPS pueden ser utilizados en procesos de biorremediación, debido a su capacidad de adsorber metales pesados y otros contaminantes presentes en agua y suelos, contribuyendo a la reducción de la toxicidad ambiental. Asimismo, su estructura polimérica permite la formación de matrices protectoras que favorecen la supervivencia microbiana en ambientes adversos, lo cual es de interés en tecnologías de bioaumentación.

En la industria alimentaria, los EPS microbianos pueden emplearse como agentes espesantes, estabilizantes y mejoradores de textura, sustituyendo aditivos sintéticos. En el sector farmacéutico y biomédico, destacan por su potencial inmunomodulador, antioxidante y su posible uso en sistemas de liberación controlada de fármacos, debido a su biocompatibilidad y baja toxicidad.

Por otro lado, los EPS derivados de hongos filamentosos como *Fusarium oxysporum* representan una alternativa sostenible frente a polímeros sintéticos, debido a que su producción puede optimizarse mediante procesos fermentativos controlados, utilizando sustratos de bajo

costo y residuos agroindustriales, lo que reduce el impacto ambiental y los costos de producción.

En el contexto de esta investigación, la producción de EPS a partir de *Fusarium oxysporum* adquiere relevancia no solo por su rendimiento biotecnológico, sino también por su potencial aplicación en el desarrollo de bioproductos con valor agregado, orientados a sectores como el ambiental, alimentario y farmacéutico.



CONCLUSIONES

- PRIMERA:** Se evaluaron las condiciones de cultivo para la producción de exopolisacáridos por una cepa nativa de *Fusarium oxysporum* mediante la metodología de superficie de respuesta basada en un diseño Box–Behnken, logrando optimizar el proceso y alcanzar un rendimiento máximo de 5.12 % bajo condiciones óptimas de glucosa (10.25 g/L), extracto de levadura (6.64 g/L) y pH 4.68.
- SEGUNDA:** Se logró el aislamiento, caracterización e identificación molecular de una cepa nativa de *Fusarium oxysporum* proveniente de *Musa paradisiaca*, confirmada mediante análisis morfológico y secuenciación ITS con un 100 % de similitud.
- TERCERA:** El análisis cinético evidenció que la síntesis de EPS presenta un comportamiento parcialmente desacoplado del crecimiento celular, alcanzando su máxima producción en fase estacionaria (día 15). Asimismo, la disminución de azúcares reductores mediante DNS y de carbohidratos totales por el método fenol-ácido sulfúrico demostró que el sustrato consumido por el hongo fue utilizado parcialmente para la síntesis de exopolisacáridos.
- CUARTA:** La producción de exopolisacáridos estuvo fuertemente influenciada por las condiciones de cultivo, destacando el extracto de levadura como el factor con mayor efecto positivo, mientras que altas concentraciones de glucosa y valores elevados de pH ejercieron efectos inhibitorios. Asimismo, el modelo estadístico 2FI presentó alta significancia ($p < 0.0001$) y elevada capacidad predictiva ($R^2 = 0.9772$), permitiendo describir adecuadamente el comportamiento del sistema y predecir la producción de EPS dentro del rango experimental evaluado.
- QUINTA:** La caracterización mediante espectroscopía FTIR confirmó la naturaleza polisacáridica del EPS obtenido, evidenciando grupos funcionales característicos como hidroxilos, enlaces glucosídicos y estructuras tipo piranosa. En conjunto, los resultados demuestran el potencial biotecnológico de *Fusarium oxysporum* y la aplicabilidad de estrategias de optimización estadística para el desarrollo de procesos fermentativos eficientes y escalables.

RECOMENDACIONES

PRIMERA: Para futuros estudios usando *Fusarium oxysporum*, aislado de cultivos de banano en estado de pudrición, siendo este microorganismo con alta actividad metabólica en este tipo de ambientes, se propone usar el aprovechamiento de residuos orgánicos derivados de estos sistemas como sustratos alternativos para la producción de exopolisacáridos, ya que esto promovería la valorización de algunos materiales que se encuentran en descomposición para poder ser utilizados o transformados en productos de interés. De esta manera, estos procesos contribuirán a la integración de procesos en biotecnología relacionados a la sostenibilidad y economía circular.

SEGUNDO: Se recomienda evaluar la influencia de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno en la producción de exopolisacáridos por *Fusarium oxysporum*, que permitirá conocer qué condiciones son favorables no solo en su máximo rendimiento, con el fin de identificar las variaciones del polímero obtenido. Asimismo, este proceso de fermentación permitirá comprender mejor la relación entre el medio de fermentación y las características de los exopolisacáridos.

TERCERO: En cuanto a su caracterización del polímero obtenido, se propone profundizar en investigaciones relacionadas con este hongo, para poder ver sus propiedades no solo a nivel estructural, sino también su capacidad interactiva con contaminantes presentes en el agua, y evaluar los cambios de pH y temperatura en cuanto a su estabilidad y el comportamiento en medios acuosos. Esto permitiría comprender el potencial de aplicación de biopolímero con mayor precisión, con el fin de complementar esta investigación, teniendo en cuenta la limitada disponibilidad de equipos especializados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Freitas et al. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. Trends in biotechnology. [Internet]. 2011; 29(8): 388-398. Disponible en: [https://www.cell.com/trends/biotechnology/abstract/S0167-7799\(11\)00055-2](https://www.cell.com/trends/biotechnology/abstract/S0167-7799(11)00055-2).
2. Donot et al. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. Carbohydrate Polymers. [Internet]. 2012; 87(2): 951-962. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861711007673>.
3. Mahapatra, S; Banerjee, D. Fungal exopolysaccharide: production, composition and applications. Microbiology insights. [Internet]. 2013; 6: MBI-S10957.
4. Sukhavattanakul P, Manuspiya H. Fabrication of hybrid thin film based on bacterial cellulose nanocrystals and metal nanoparticles with hydrogen sulfide gas sensor ability. Carbohydr Polym. [Internet]. 2020; 230: 115566.
5. Sutherland, I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology. [Internet]. 2001; 147: 3–9. DOI: doi:10.1099/00221287-147-1-3.
6. Bezerra et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. Talanta. [Internet]. 2008; 76(5): 965–977. DOI: doi:10.1016/j.talanta.2008.05.019.
7. Ferreira et al. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. Anal Chim Acta. [Internet]. 2007; 597(2): 179–186. DOI: doi:10.1016/j.aca.2007.07.011.
8. Dubois et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal Chem. [Internet]. 1956; 28(3): 350–356.
9. Patel et al. Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Carbohydr Polym. [Internet]. 2012; 87: 1425–35.
10. Wang et al. Characterization of an exopolysaccharide produced by *Cryptococcus* sp. Int J Biol Macromol. [Internet]. 2015; 72: 521–8.

11. Mahapatra S, Banerjee D. Optimization of exopolysaccharide production from endophytic fungus *Fusarium solani* SD5. Carbohydr Polym. [Internet]. 2013; 97(2): 627–634. DOI: doi:10.1016/j.carbpol.2013.05.039.
12. El-Sayed A, Shindia A. Statistical optimization of glucose oxidase production from *Aspergillus niger* NRC9 under submerged fermentation using response surface methodology. Ann Microbiol. [Internet]. 2012; 62: 523–531. DOI: doi:10.1007/s13213-012-0497-5.
13. Yuan et al. Optimization of exopolysaccharide production from a novel strain of *Ganoderma lucidum* CAU5501 in submerged culture. Braz J Microbiol. [Internet]. 2012; 43(2): 490–497. DOI: doi:10.1590/s1517-83822012000200009.
14. El-Mahdy et al. Optimization of exopolysaccharide production by *Fusarium nygamai* using response surface methodology. BMC Microbiol. [Internet]. 2023; 23: 345. DOI: doi:10.1186/s12866-023-03100-8.
15. Michielse C, Rep M. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. Molecular plant pathology. [Internet]. 2009; 10(3): 311. DOI: doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x.
16. Guo et al. Structural elucidation of the exopolysaccharide produced by fungus *Fusarium oxysporum* Y24-2. Carbohydr Res. [Internet]. 2013; 365: 9–13. DOI: doi:10.1016/j.carres.2012.09.026.
17. Macías et al. Producción de biopolímeros microbianos. Investig Cienc UAA. [Internet]. 2016; 24(68): 45–52.
18. Patel et al. Improvement of mechanical properties of bacterial exopolysaccharides and their applications. Carbohydr Polym. [Internet]. 2012; 87(3): 1425–1435. DOI: doi:10.1016/j.carbpol.2011.09.016.
19. Flemming H, Wingender J. The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol. [Internet]. 2010; 8(9): 623–633. DOI: doi:10.1038/nrmicro2415.
20. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Análisis del mercado del banano. Resultados preliminares. [Online].; 2022. Disponible en: <https://www.fao.org/markets-and-trade/publications/banana/en>.
21. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO urges more cooperation in banana sector. [Online].; 2024. Disponible en: <https://www.fao.org/newsroom/detail>.

22. Garcés et al. Modeling of the physicochemical and nutritional composition of *Musa paradisiaca* at different ripening stages in Ecuador. Agriculture. [Internet]. 2025; 15(10): 1025. DOI: doi:10.3390/agriculture15101025.
23. Aparicio et al. Resistant starch from plantain (*Musa paradisiaca* L.) varieties. Food Prod Process Nutr. [Internet]. 2024; 6: 66. DOI: doi:10.1186/s43014-024-00243-7.
24. Leonel et al. Banana-based intercropping systems and crop sustainability. Horticulturae. [Internet]. 2024; 10(9): 956. DOI: doi:10.3390/horticulturae10090956.
25. Waraczewski R, Sołowiej B. Potential valorization of banana production waste in developing countries. Fibers. [Internet]. 2024; 12(9): 72. DOI: doi:10.3390/fib12090072.
26. Robles et al. Micropropagación in vitro del plátano (*Musa paradisiaca* L.) variedad 'Bellaco'(AAB) a partir de hijuelos basales. Manglar: Revista de Investigación Científica. [Internet]. 2025; 22(3): 403-412 Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2414-10462025000300403&script=sci_abstract.
27. Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. Perfil productivo y competitivo de los principales cultivos del sector: plátano. [Online].; 2025. Disponible en: <https://www.midagri.gob.pe/>.
28. Singh et al. Bioactive compounds in banana and their associated health benefits—A review. Food chemistry. [Internet]. 2016;; 1-11.
29. Venegas et al. Development and characterization of plantain (*Musa paradisiaca*) fiber-based biopolymer films. Polymers. [Internet]. 2022; 14(4): 748. DOI: doi:10.3390/polym14040748.
30. Azriena et al. Recent developments in lignocellulosic banana fiber-based biocomposites. Int J Biol Macromol. [Internet]. 2025; 323: 147180. DOI: doi:10.1016/j.ijbiomac.2025.147180.
31. Martinez et al. Production of bacterial cellulose from banana waste (*Musa paradisiaca*). Biocatal Agric Biotechnol. [Internet]. 2025; 63: 103484. DOI: doi:10.1016/j.bcab.2024.103484.
32. Peres et al. Composition and use of plantain peel (*Musa paradisiaca*). Foods. [Internet]. 2026; 15(7): 1133. DOI: doi:10.3390/foods15071133.

33. Ploetz R. *Fusarium* wilt of banana. *Phytopathology*. [Internet]. 2015; 110(7): 1512–1521.
34. Munhoz et al. *Fusarium* Tropical Race 4 in Latin America and the Caribbean: current status and perspectives. *Front Plant Sci*. [Internet]. 2024; 15: 1397617. DOI: doi:10.3389/fpls.2024.1397617.
35. Rocha et al. Improvements in the resistance of banana species to *Fusarium* wilt: a systematic review of methods and perspectives. *J Fungi*. [Internet]. 2021; 7(4): 249. DOI: doi:10.3390/jof7040249.
36. Olivares et al. *Fusarium* wilt of bananas: a review of agro-environmental factors in the Venezuelan production system affecting its development. *Agronomy*. [Internet]. 2021; 11(5): 986. DOI: doi:10.3390/agronomy11050986.
37. Ali et al. Biotechnological advances in combating *Fusarium* wilt of banana: from pathogen biology to sustainable disease management. *Hortic Plant J*. [Internet]. 2025. DOI: doi:10.1016/j.hpj.2025.08.017.
38. Solórzano et al. Current progress in microbial biocontrol of banana *Fusarium* wilt: a systematic review. *Agronomy*. [Internet]. 2025; 15(3): 619. DOI: doi:10.3390/agronomy15030619.
39. Leslie J, Summerell B. *The Fusarium Laboratory Manual*: Ames: Blackwell Publishing[Internet]. 2006.
40. Summerell B. Resolving *Fusarium*: current status of the genus. *Annu Rev Phytopathol*. [Internet]. 2019; 57: 323–39.
41. O'Donnell et al. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic *Fusaria*. *J Clin Microbiol*. [Internet]. 2010; 48(10): 3708–18.
42. Ma et al. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Fusarium*. *Nature*. [Internet]. 2010; 464: 367–73.
43. Nelson et al. *Fusarium* species: An illustrated manual: Pennsylvania: Penn State University Press[Internet]. 1983.
44. Dhingra O, Sinclair J. *Basic Plant Pathology Methods*: Boca Raton: CRC Press[Internet]. 1995.
45. Griffin D. *Fungal Physiology*: 2nd ed. New York: Wiley-Liss[Internet]. 1994.

46. De Sain M, Rep M. The role of effector proteins in plant–fungus interactions: *Fusarium oxysporum* as a model. *Mol Plant Pathol*. [Internet]. 2015; 16(4): 339–347.
47. Dita et al. *Fusarium* wilt of banana: current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. *Front Plant Sci*. [Internet]. 2018; 9: 1468.
48. Desjardins A. *Fusarium* Mycotoxins: Chemistry, Genetics, and Biology: APS Press[Internet]. 2006.
49. Freitas et al. Microbial exopolysaccharides: production, properties and applications. *Trends Biotechnol*. [Internet]. 2011; 29(8): 388–98.
50. Fravel et al. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytol*. [Internet]. 2003; 157: 493–502.
51. Nwodo et al. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *Int J Mol Sci*. [Internet]. 2021; 22(21): 11530.
52. Chen et al. Advances in fungal exopolysaccharides: production and applications. *J Fungi*. [Internet]. 2022; 8(3): 268. DOI: doi:10.3390/jof8030268.
53. Dean et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*. [Internet]. 2020; 21(10): 1353–6.
54. Wang et al. Structural diversity and biological activity of EPS. *Carbohydr Polym*. [Internet]. 2021; 253: 117195.
55. Liu et al. Functional properties of microbial EPS. *Int J Biol Macromol*. [Internet]. 2022; 198: 245–55. DOI: doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.12.096.
56. Zhang et al. Advances in structural characterization of polysaccharides. *Food Hydrocoll*. [Internet]. 2021; 112: 106355. DOI: doi:10.1016/j.foodhyd.2020.106355.
57. Li et al. Structural characterization of fungal polysaccharides. *Int J Biol Macromol*. [Internet]. 2021; 183: 1350–8.
58. Zhao et al. Bioactive polysaccharides from fungi. *Int J Biol Macromol*. [Internet]. 2020; 150: 1103–13.
59. Liu X, Yao T. Types, synthesis pathways, purification, characterization, and functions of microbial exopolysaccharides. *Int J Biol Macromol*. [Internet]. 2024; 281: 136317. DOI: doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.136317.

60. Kumari et al. Microbial exopolysaccharides: classification, biosynthetic pathways and production. *Int J Biol Macromol.* [Internet]. 2025. DOI: doi:10.1016/j.ijbiomac.2025.139917.
61. Nguyen et al. Advances in microbial exopolysaccharides: present and future applications. *Biomolecules.* [Internet]. 2024; 14(9): 1162.
62. Mouro et al. Microbial exopolysaccharides: structure, diversity and applications. *Polysaccharides.* [Internet]. 2024; 5(3): 241–287. DOI: doi:10.3390/polysaccharides5030018.
63. Wu et al. Genomic and functional evaluation of microbial EPS production. *Microb Cell Fact.* [Internet]. 2024; 23: 158. DOI: doi:10.1186/s12934-024-02431-.
64. Sun et al. Regulation of EPS biosynthesis. *Biotechnol Adv.* [Internet]. 2021; 49: 107754.
65. Zannini et al. Stress response and EPS production. *Trends Food Sci Technol.* [Internet]. 2021; 108: 423–35. DOI: doi:10.1016/j.tifs.2020.12.024.
66. Zhao et al. Genetic regulation of EPS synthesis. *Microb Cell Fact.* [Internet]. 2022; 21(1): 45. DOI: doi:10.1186/s12934-022-01752-5.
67. Xu et al. Extraction methods for microbial EPS. *Int J Biol Macromol.* [Internet]. 2020; 164: 420–9.
68. Wang et al. Advances in EPS purification. *Sep Purif Technol.* [Internet]. 2022; 292: 120948. DOI: doi:10.1016/j.seppur.2022.120948.
69. Miller G. DNS method revisited. *Anal Chem.* [Internet]. 2020.
70. Masuko et al. Updated carbohydrate quantification. *Anal Biochem.* [Internet]. 2021; 612: 113930. DOI: doi:10.1016/j.ab.2020.113930.
71. Torres et al. Physicochemical properties of EPS. *Polymers.* [Internet]. 2021; 13(3): 437. DOI: doi:10.3390/polym13030437.
72. Rahbar et al. EPS in pharmaceutical applications. *Biotechnol Rep.* [Internet]. 2021; 30: e00648.
73. Silva et al. Marine and microbial polysaccharides in cosmetics. *Mar Drugs.* [Internet]. 2021; 19(1): 43 Disponible en: [doi:10.3390/md19010043](https://doi.org/10.3390/md19010043).
74. You et al. Engineering exopolysaccharide biosynthesis in bacteria. *ACS Synth Biol.* [Internet]. 2025; 14(2): 373–383. DOI: doi:10.1021/acssynbio.4c00417.

75. Whitney J, Howell P. Bacterial synthase-dependent exopolysaccharide secretion. *Curr Opin Microbiol.* [Internet]. 2024; 79: 102476. DOI: doi:10.1016/j.mib.2024.102476.
76. Liu et al. Advances and challenges in microbial EPS bioproduction. *Carbohydr Polym.* [Internet]. 2025; 367: 124010. DOI: doi:10.1016/j.carbpol.2025.124010.
77. Cairns et al. How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. *Fungal Biol Biotechnol.* [Internet]. 2018; 5: 13. DOI: doi:10.1186/s40694-018-0054-5.
78. Kumar et al. Bioconversion of agro-industrial wastes into value-added products by filamentous fungi. *Bioresour Technol.* [Internet]. 2020; 299: 122580. DOI: doi:10.1016/j.biortech.2019.122580.
79. Thomas et al. Current developments in solid-state fermentation. *Biochem Eng J.* [Internet]. 2013; 81: 146–161. DOI: doi:10.1016/j.bej.2013.10.013.
80. Hamidi et al. Fungal exopolysaccharides: Properties, sources, modifications, and biomedical applications. *Carbohydr Polym.* [Internet]. 2022; 284: 119152. DOI: doi:10.1016/j.carbpol.2022.119152.
81. Li et al. Plant endophytic fungal polysaccharides and their activities: A review. *Int J Biol Macromol.* [Internet]. 2025; 317: 144750. DOI: doi:10.1016/j.ijbiomac.2025.144750.
82. Ahmad et al. Fungal exopolysaccharides: potential applications and future perspectives. *J Asian Nat Prod Res.* [Internet]. 2025. DOI: doi:10.1080/10286020.2025.2544138.
83. Prathumpai et al. Exopolysaccharide production by fungi: optimization and influencing factors. *Front Cell Infect Microbiol.* [Internet]. 2025; 15: 1610403.
84. Zhang et al. Production, characterization and bioactivity of fungal exopolysaccharides. *Int J Biol Macromol.* [Internet]. 2025; 323: 147102. DOI: doi:10.1016/j.ijbiomac.2025.147102.
85. Shuler M, Kargi F. *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*: Upper Saddle River: Prentice Hall[Internet]. 2002.
86. Doran P. *Bioprocess Engineering Principles*: Academic Press[Internet]. 2013.
87. Madigan et al. *Brock Biology of Microorganisms*: Pearson[Internet]. 2021.
88. Stanbury et al. *Principles of Fermentation Technology*: Oxford: Butterworth-Heinemann[Internet]. 2016.

89. Ruiz et al. Biotechnological production of exopolysaccharides by filamentous fungi: current state and perspectives. *Bioengineered*. [Internet]. 2011; 2(2): 86–100.
90. Nielsen et al. *Bioreaction Engineering Principles*. Springer. [Internet]. 2017.
91. Papagianni M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv*. [Internet]. 2004; 22(3): 189–259.
92. Box G, Wilson K. On the experimental attainment of optimum conditions. *J R Stat Soc Series B*. [Internet]. 1951; 13(1): 1–45.
93. Bas D, Boyacı I. Modeling and optimization I: usability of response surface methodology. *J Food Eng*. [Internet]. 2007; 78(3): 836–845.
94. Li et al. Optimization of polysaccharide extraction from *Fusarium oxysporum* using RSM. *Int J Mol Sci*. [Internet]. 2012; 13(5): 5441–5453.
95. Sistema Nacional de Información Ambiental. Declaran al Centro Poblado del Molino Cajanleque, distrito de Chocope, provincia de Ascope, como Capital del Plátano en la región La Libertad. [Online].; 2018.
96. Hernández et al. *Metodología de la Investigación*[Internet]. 2014.
97. Cámara et al. *Metodología de la Superficie de Respuesta (RSM)*[Internet]. 2016.
98. Servicio Nacional de Sanidad Agraria. Instructivo de trabajo: toma y envío de muestras para el diagnóstico de hongos fitopatógenos[Internet]. 2006. Disponible en: <https://www.senasa.gob.pe/intranet/wp-content/uploads/2020/03/ITR-UCDSV-Mic-006-Toma-y-env%C3%ADo-de-muestras-para-diagn%C3%B3stico-de-Hongos-fitopat%C3%B3genos-rev-01.pdf>.
99. Booth C. *Fusarium*, Laboratory Guide to the Identification of the Major Species[Internet]. 1977. Disponible en: [from: https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=942813](https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=942813).
100. Hernández et al. Aislamiento e identificación de *Fusarium oxysporum* obtenidos de zonas productoras de “ají paprika” *Capsicum annumm* L. (Solanaceae) en el distrito de Barranca, Perú. *Arnaldoa*. [Internet]. 2019; 26(2).
101. Client challenge. Tinción Azul de Lactofenol en Hongos[Internet]. 2024.
102. Schmid et al. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Front Microbiol*. [Internet]. 2015; 6: 496.

103. Miller G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem. [Internet]. 1959; 31(3): 426–428.
104. Masuko et al. Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. Analytical Biochemistry. [Internet]. 2005; 339(1): 69–72.
105. Shuler et al. Bioprocess Engineering: Basic Concepts: Upper Saddle River: Prentice Hall[Internet]. 2017.
106. Madigan et al. Brock Biology of Microorganisms: Pearson[Internet]. 2018.
107. Kulik et al. Reduction of *Fusarium* biomass dynamics. J Appl Genet. [Internet]. 2024; 65: 937–947.
108. Saleh et al. Biomass dynamics of *Fusarium oxysporum*. Phytopathol Mediterr. [Internet]. 2023.
109. Montgomery D. Design and Analysis of Experiments: New York, NY: John Wiley & Sons[Internet]. 2012.
110. Udompongsuk M, Soyong K. Isolation, identification, and pathogenicity test from *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense causing banana wilt[Internet]. 2016. Disponible en: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20173120257>.
111. Retana et al. Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* F. SP. Apii asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. Agron Costarric. [Internet]. 2018; 42(1): 115–26.
112. Chakrapani et al. Growth of *Fusarium oxysporum* under variable pH and temperature. Front Microbiol. [Internet]. 2023; 14: 1228442.
113. Manthesha et al. Influence of pH on *Fusarium oxysporum*. Int J Adv Biochem Res. [Internet]. 2024; 8: 485–490.
114. Yang et al. Growth regulation of *Fusarium oxysporum*. Front Microbiol. [Internet]. 2024; 15: 1459906.
115. Wang et al. Optimization of exopolysaccharide production by filamentous fungi: a review. Carbohydr Polym. [Internet]. 2020; 229: 115–125.
116. Ruas P, De los Reyes C. Methods for the screening and characterization of exopolysaccharides produced by microorganisms. J Dairy Sci. [Internet]. 2005; 88(3): 843–856.

117. Ibarburu et al. Growth and exopolysaccharide production kinetics in microbial systems. J Appl Microbiol. [Internet]. 2007; 103: 477–486.
118. García et al. Xanthan gum: production, recovery, and properties. Biotechnol Adv. [Internet]. 2000; 18(7): 549–579.
119. De Vuyst L, Degeest B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev. [Internet]. 1999; 23(2): 153–177.
120. Kumar et al. Bacterial exopolysaccharides: a perception. J Basic Microbiol. [Internet]. 2007; 47: 103–17.
121. Sutherland I. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. International Dairy Journal. [Internet]. 2001; 11(9): 663–674.
122. Salama et al. Characterization, structure, and function of extracellular polymeric substances (EPS) of microbial biofilm in biological wastewater treatment systems: a review. Desalination Water Treat. [Internet]. 2016; 57(35): 16220–37.
123. Salman et al. Detection of *Fusarium oxysporum* fungal isolates using ATR spectroscopy. J Spectrosc. [Internet]. 2012; 27: 5–6.
124. Prathyusha et al. Chemical characterization and antioxidant properties of exopolysaccharides from mangrove filamentous fungi *Fusarium equiseti* ANP2. Biotechnol Rep (Amst). [Internet]. 2018; 19: e00277.
125. Behera et al. Media optimization, extraction, purification and characterization of exopolysaccharide from *Fusarium proliferatum*: A novel source bioactive polysaccharide. Results Chem. [Internet]. 2023; 5(100923) Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rechem.2023.100923>.
126. Chen et al. Extraction, characterization, and biological activities of exopolysaccharides from plant root soil fungus *Fusarium merismoides* A6. Braz J Microbiol. [Internet]. 2023; 54(1): 199–211.
127. Synytsya A, Novák M. Structural diversity of fungal glucans. Carbohydr Polym. [Internet]. 2013; 92(1): 792–809.
128. Duda et al. Differences in production, composition, and antioxidant activities of EPS from *Fusarium culmorum*. Molecules. [Internet]. 2020; 25: 1–20.

129. Freitas et al. Advances in EPS applications. Trends Biotechnol. [Internet]. 2020; 38(7): 780–93. DOI: doi:10.1016/j.tibtech.2019.12.010.
130. Liu et al. Structural characterization and biological activity of polysaccharides from stems of *Houttuynia cordata*. Foods. [Internet]. 2022; 11(22): 3622.





Anexo 1

Informe de identificación molecular del hongo aislado



**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
DEL ADN UCHUMAYO E.I.R.L.**

IDENTIFICACION MOLECULAR DE ESPECIES

Nombre del Solicitante: Nicol Abarca Apaza DNI: 71491953
Dirección:
Email: nicolekabarca@gmail.com Teléfono: 994597722.
País: Perú, Provincia: Arequipa Distrito: Arequipa
Muestra: 1 Cultivo puro de hongos en cuarto repique. Código: Hongo Miluska (HM)

Indicaciones: Identificación Molecular de Hongos por secuenciación del gen ITS1

Introducción.

En general, para hongos, la región ITS del ADNr se utiliza como objetivo principal y es amplificado con los primers ITS-1 y ITS-4. En algunos casos, estos cebadores pueden no proporcionar suficiente identificación y es posible que se requiera una región codificante de proteína.

Metodología:

La identificación consiste en la extracción de ADN de la muestra usando el Kit "The MasterPure™ DNA Purification Kit" que provee todos los reactivos necesarios para la recuperación de ADN utilizado para amplificación de la región ITS1, mediante PCR.

La amplificación correspondiente a la región ITS1 se llevó a cabo usando los primer universales ITS-1, Estos primers amplifican aproximadamente 600 pares de bases de la región ITS1 -5.8S-ITS2 del citrón ribosómico.

Forward: ITS-1 5'-TCCGTAGGTAACCTGCGG
Reverse: ITS-4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC
Temperatura de hibridación: 52°C

Los productos de PCR fueron purificados usando el kit Qiagen PCR purification, y se siguió las instrucciones de la compañía, los productos purificados fueron secuenciados usando la técnica de Sanger que utiliza colorantes Big Dye V3.1 y leídos en un equipo ABI 3730xl.

La secuencias revisadas se compara con la base de datos de NCBI usando el software BLAST ® » blastn suite.

Cuando se hace un análisis filogenético escogiendo 10 especies con mayor similitud, el modelo de árbol "Fast Minimum Evolution" la secuencia evaluada presenta un mayor acercamiento a la especie *Fusarium oxysporum* [MK571185.1](#)

- *Fusarium oxysporum* isolate Fo07 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; in
- *Fusarium oxysporum* clone SF_261 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; i
- *Fusarium oxysporum* f. sp. momordicae strain FuJ22 small subunit ribosomal RNA gene, p
- *Fusarium oxysporum* strain PSD-2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; in
- *Fusarium* sp. isolate s15 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tran
- *Fusarium* sp. strain CS09-8 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal t
- *Fusarium oxysporum* clone SF_245 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; i
- *Fusarium* sp. strain H43-3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tra
- *Fusarium oxysporum* strain BMT1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; in
- *Fusarium oxysporum* strain EF01 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; int
- HM ITS1-F TRIM QUALITY: 20

CONCLUSIONES

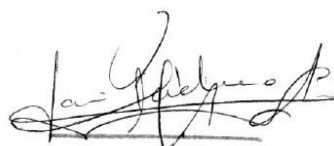
1. El Cultivo puro de hongo, con rotulo "HM", corresponde a *Fusarium oxysporum*

COMENTARIO

El objetivo de un estudio fue seleccionar estreptomicetos antagonistas contra *F. oxysporum* y evaluar *in vitro* e *in vivo* la actividad inhibitoria del extracto bioactivo de aislados de *Streptomyces* sp., para controlar el desarrollo de pudrición en cormos de gladiolo.

Rios-Hernández, Tania Ameyally, Uc-Varguez, Alberto, & Evangelista-Martínez, Zahaed. (2021). Control biológico de *Fusarium oxysporum*, agente causal de la pudrición del cormo en gladiolo, mediante estreptomicetos. *Revista mexicana de fitopatología*, 39(3), 391-413. Epub 13 de diciembre de 2021. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2105-3>

Arequipa, 22 de Abril del 2025

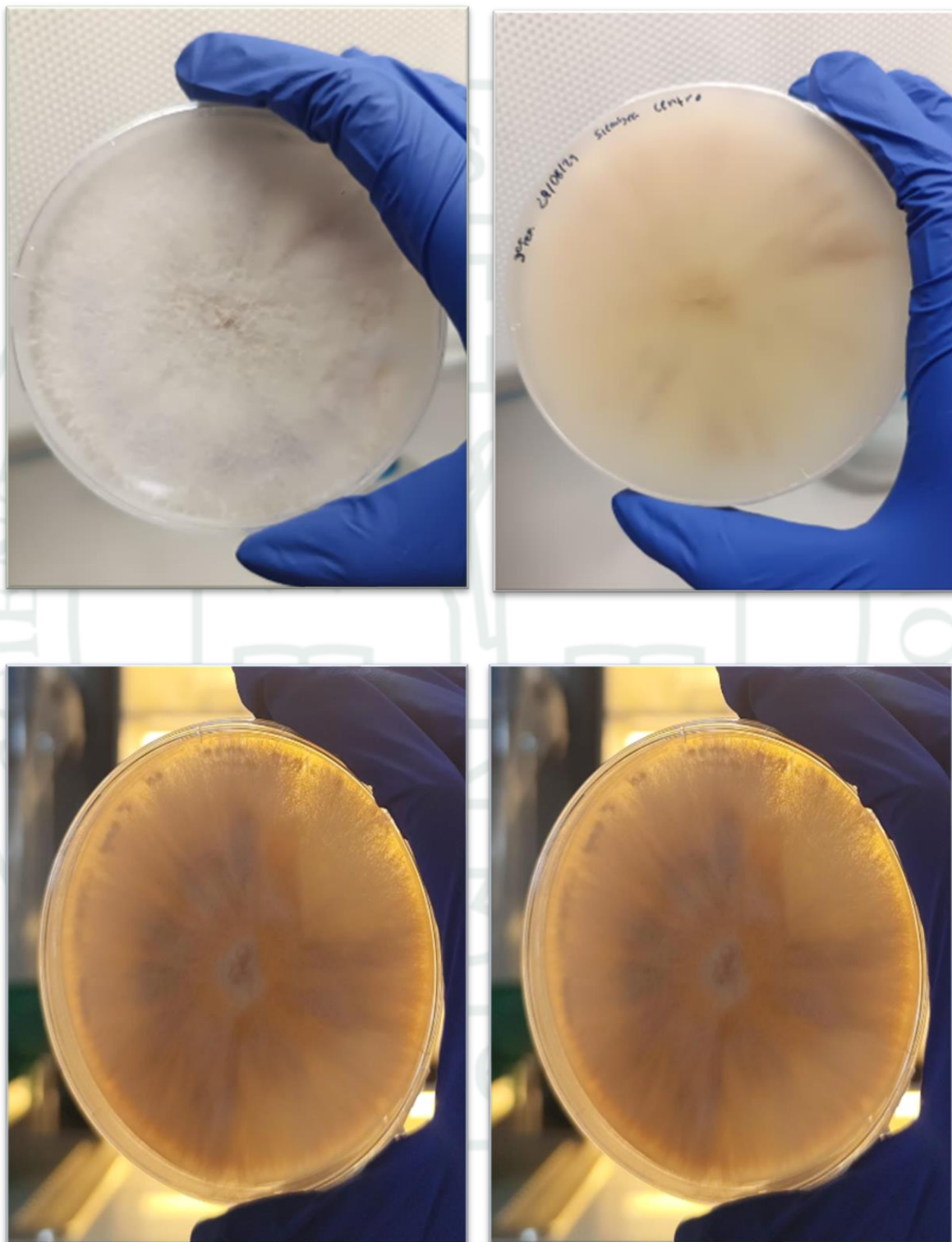


Dra. Jani Pacheco Aranibar
GERENTE



Anexo 2

Fotografía de las réplicas del hongo filamentoso, evidenciando las diferentes pigmentaciones en condiciones iguales: 25 °C durante 9 días de incubación.



Anexo 3

Secuencia “ITS 1” con la base de datos de genbank

CEPA HM

>HM_ITS1-F TRIM QUALITY: 20

TACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCACTTGTTGCCTC
GGCGGATCAGCCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCC
TAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAA
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCA
AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
TGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGC
GTCATTTCAACCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGTTGGGACTCGCGTTAATTTCG
CGTTCCTCAAATTGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGT
AAAACCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACT
TCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGC

Anexo 4

Base de Datos de GenBank

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:10

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☒	Fusarium oxysporum isolate Fo07 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete	920	920	100%	0.0	100.00%	MK571185.1
☒	Fusarium oxysporum clone SF_261 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete	920	920	100%	0.0	100.00%	MT529537.1
☒	Fusarium oxysporum f. sp. moniliforme strain Fw22 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete	920	920	100%	0.0	100.00%	MG242205.1
☒	Fusarium oxysporum strain PSD-2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete	920	920	100%	0.0	100.00%	QIN650393.1
☒	Fusarium sp. isolate s15 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete	920	920	100%	0.0	100.00%	EP024600.1
☒	Fusarium sp. strain CS09-8 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete	920	920	100%	0.0	100.00%	MH630174.1
☒	Fusarium oxysporum clone SF_245 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete	920	920	100%	0.0	100.00%	MT529521.1
☒	Fusarium sp. strain H43-3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete	920	920	100%	0.0	100.00%	MH734919.1
☒	Fusarium oxysporum strain BMT1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete	920	920	100%	0.0	100.00%	QIM876877.1
☒	Fusarium oxysporum strain FE01 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete	920	920	100%	0.0	100.00%	QIK093401.1

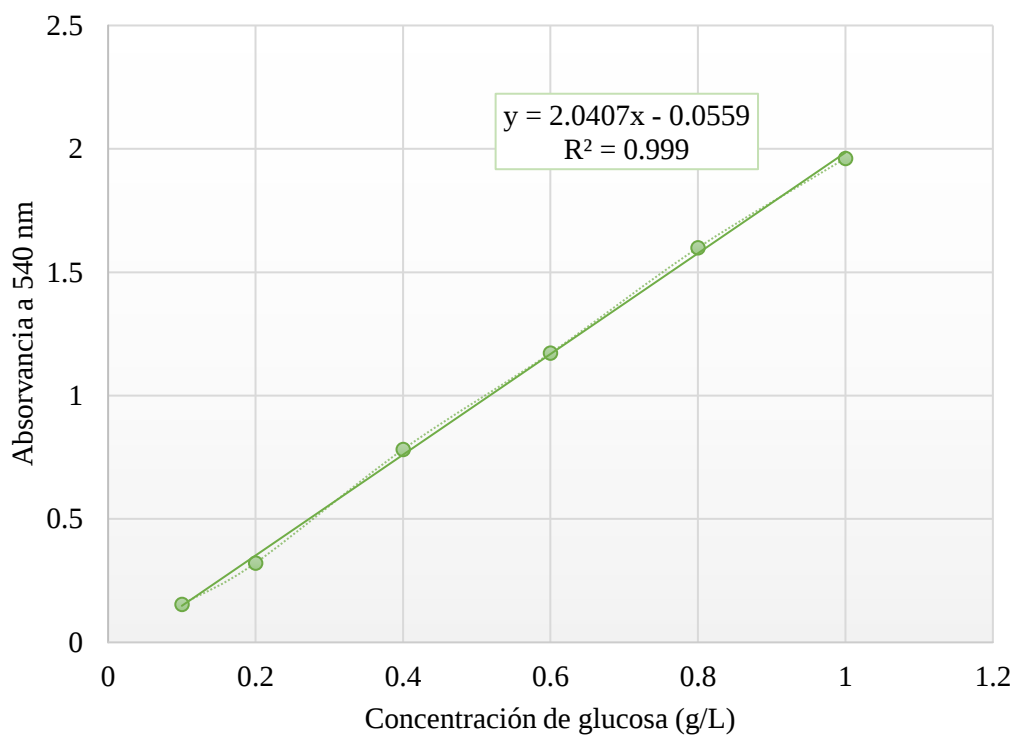
Anexo 5

Datos experimentales de la cinética del cultivo de *Fusarium oxysporum*

Tiempo (días)	Azúcares reductores (g/L)	Biomasa (g/L)	EPS (g/L)	pH
1	99.2	2.166	0.242	5.53
3	88.4	4.39	0.408	5.29
5	80.9	8.024	0.756	5.08
7	50.8	9.872	0.862	4.98
9	48.5	12.056	1.104	4.79
11	46.3	12.368	1.432	4.73
13	36.5	12.702	1.538	4.83
15	34.7	12.876	1.684	4.91
17	31.5	12.434	1.588	5.12

Anexo 6

Curva de calibración de glucosa para la determinación de azúcares reductores mediante el método DNS



Anexo 7

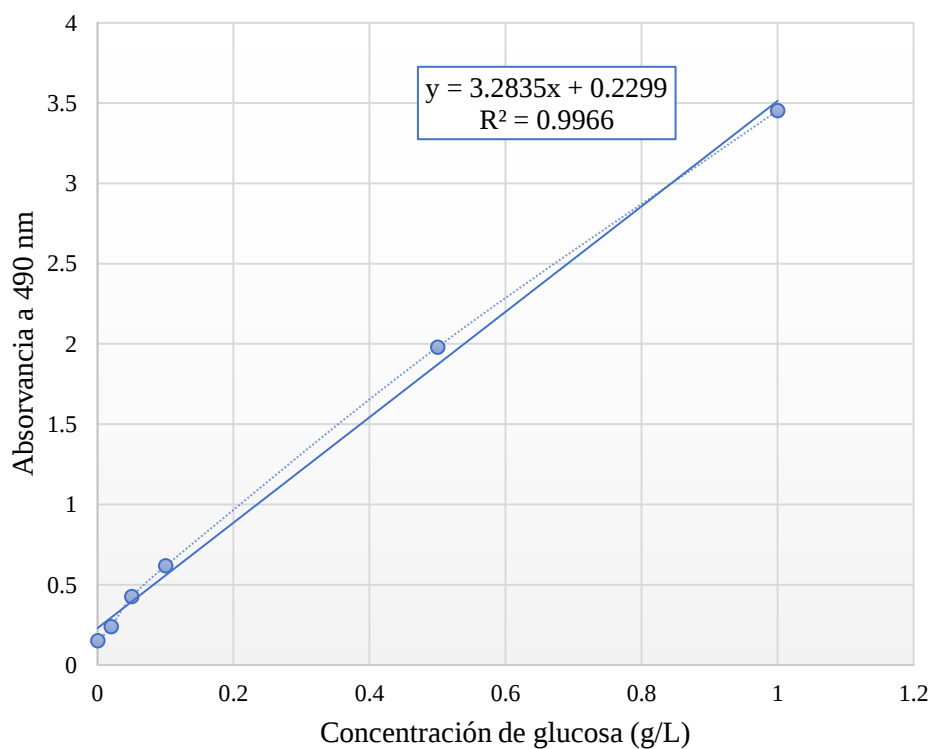
Preparación de la curva de calibración de glucosa mediante el método DNS en tubos de ensayo.

Los tubos contienen diferentes concentraciones de glucosa tratadas con el reactivo DNS, evidenciando un cambio progresivo de color en función de la concentración de azúcares reductores.



Anexo 8

Curva de calibración para la determinación de azúcares totales mediante el método de fenol-ácido sulfúrico.

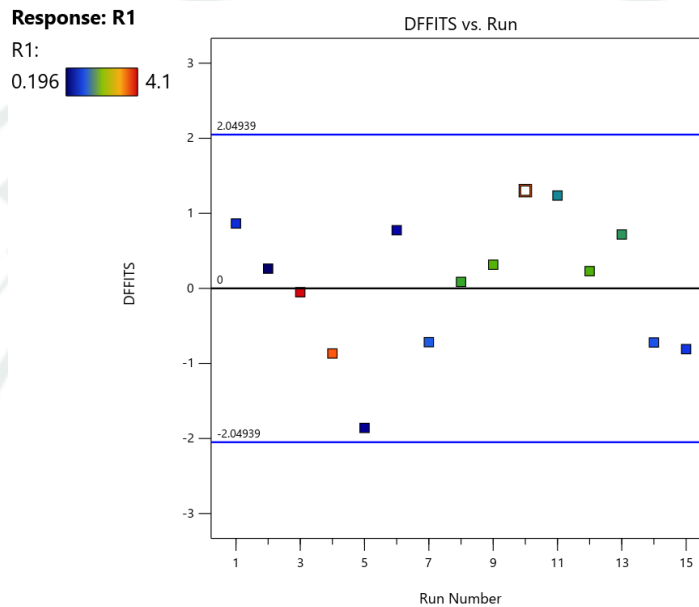


PRUEBAS DEL MODELO ESTADÍSTICO

Anexo 9

Gráfico de valores DFFITS vs número de corrida para la respuesta R1.

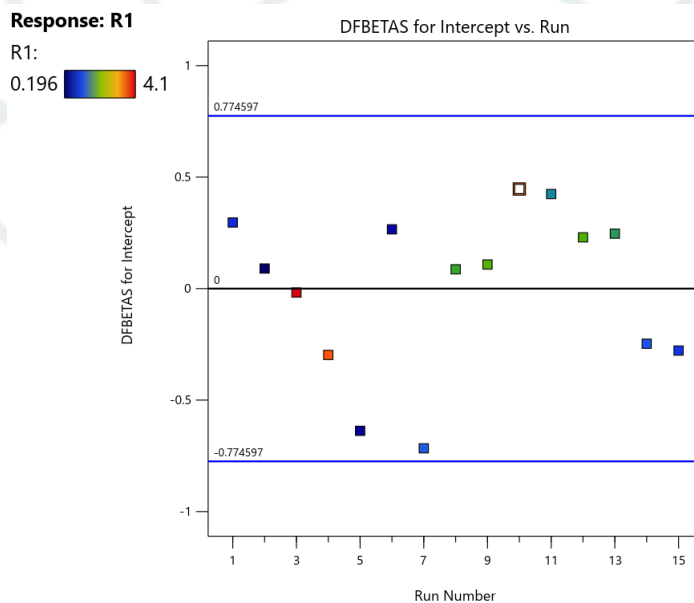
Este gráfico permite identificar observaciones influyentes en el modelo. Se observa que los valores se encuentran dentro de los límites críticos (± 2.04939), indicando que no existen datos con influencia excesiva sobre el ajuste del modelo.



Anexo 10

Gráfico de DFBETAS para el intercepto vs número de corrida.

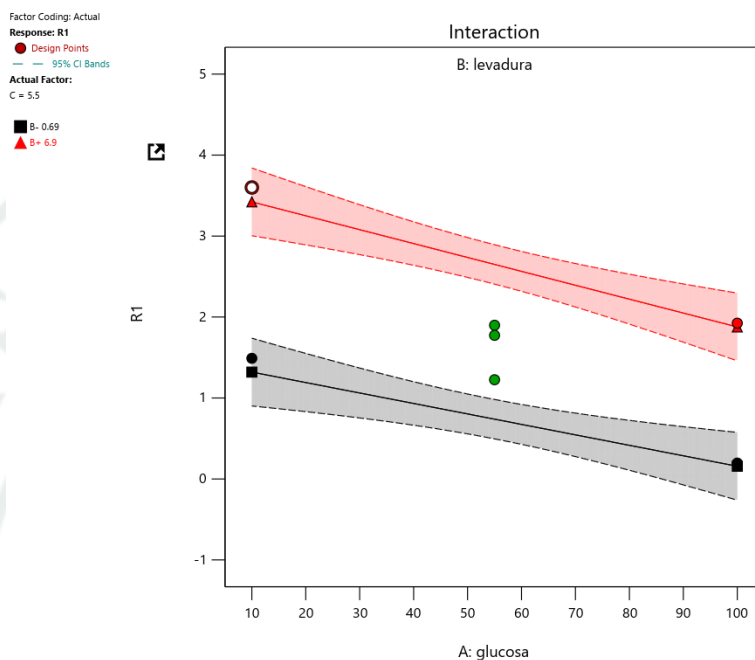
Los valores de DFBETAS se mantienen dentro de los límites establecidos (± 0.775), lo que sugiere que ninguna observación afecta significativamente la estimación del intercepto.



Anexo 11

Gráfico de interacción entre glucosa (A) y levadura (B) sobre la respuesta R1.

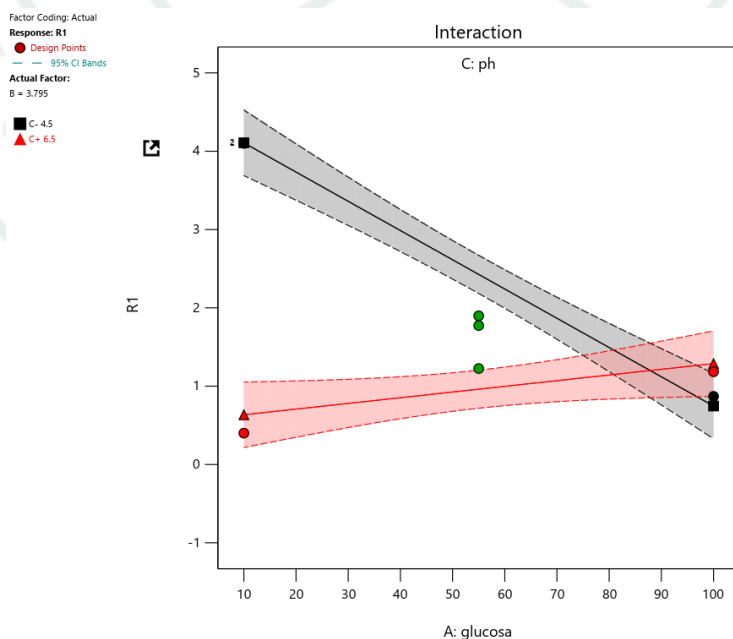
Se observa una tendencia descendente en la respuesta al incrementar la concentración de glucosa, siendo más pronunciada en niveles altos de levadura, lo que indica interacción entre ambos factores.



Anexo 12

Gráfico de interacción entre glucosa (A) y pH (C).

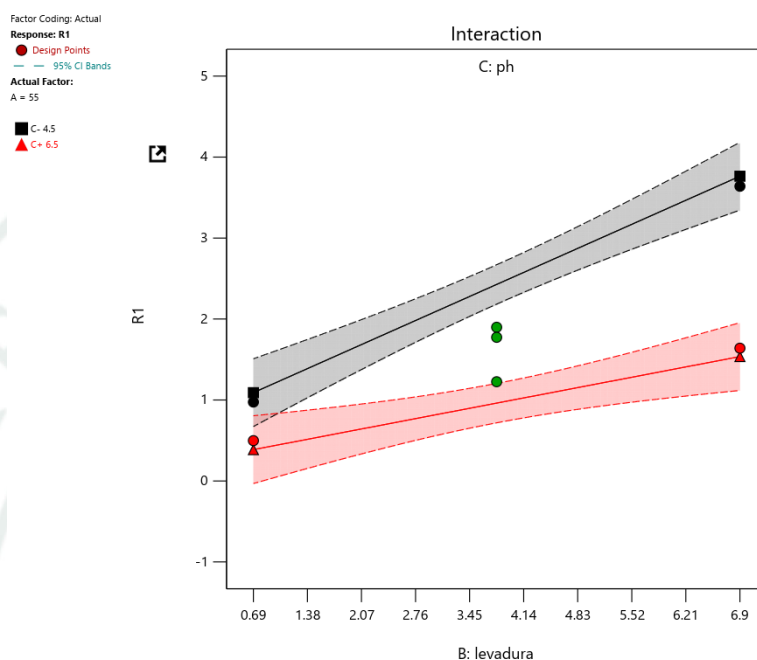
Se evidencia un comportamiento diferencial de la respuesta dependiendo del pH, mostrando una interacción significativa entre ambas variables.



Anexo 13

Gráfico de interacción entre levadura (B) y pH (C).

La respuesta R1 aumenta con el incremento de levadura, siendo más notable a pH bajo, lo que sugiere un efecto combinado entre estos factores.



Anexo 14

Cuantificación de carbohidratos totales y porcentaje de recuperación de EPS mediante el método fenol-ácido sulfúrico



Anexo 15

Evidencia fotográfica de la precipitación alcohólica de exopolisacáridos.



Las imágenes presentan la formación y acumulación del precipitado de exopolisacáridos tras la adición de etanol al sobrenadante del cultivo. La aparición de estructuras blanquecinas y agregados mucilaginosos corresponde a la precipitación del polímero extracelular, debido a la reducción de su solubilidad en presencia de etanol. Este procedimiento permitió la recuperación de los EPS para su posterior purificación y caracterización.

Anexo 16

Exopolisacáridos obtenidos del cultivo de *Fusarium oxysporum* de la optimización.



Anexo 17

Confirmación del modelo estadístico

Solución 94 de 100	Media	Mediana	Observada	Desviación estándar	n	SE Pred	95% PI bajo	Media de Datos	95% PI alto
R1	5.04554	5.04554		0.241117	3	0.267651	4.42834	5.11667	5.66274