

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Caracterización Del Polisacárido Producido Por La Cepa Rim101 De *Ustilago maydis* Para Determinar Su Potencial Uso En El Área Agroalimentaria

Por:

ZDENKO ALDAIR ARELLANO APARICIO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Caracterización Del Polisacárido Producido Por La Cepa Rim101 De *Ustilago maydis* Para Determinar Su Potencial Uso En El Área Agroalimentaria


Por:
ZDENKO ALDAIR ARELLANO APARICIO


TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:
INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría:


Dra. Erika Nohemi Rivas Martínez
Asesor Principal


Dr. Marco Adán Juárez Verdayes
Coasesor


Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo
Coasesor


Dr. Jeronimo Landeros Flores
Coordinador Interino de la División de Agronomía



Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2023

DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

El autor quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos: Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o cita textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, graficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por las autoridades correspondientes. Por lo anterior me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original.

Pasante



Zdenko Aldair Arellano Aparicio

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Por brindarme las herramientas necesarias para ser un profesionalista, por cobijarme durante toda la carrera, por la formación ética y permitirme vivir una de las mejores etapas de mi vida.

A la Dra. Erika Nohemi Rivas Martínez. Por haber aceptado ser mi asesora principal de Tesis y brindarme su conocimiento, permitiéndome aprender de ella, por la paciencia y confianza que me tuvo al empezar a trabajar con este experimento y por apoyarme dentro, así como fuera de la escuela.

Al Dr. Marco Adán Juárez Verdayes, por su amabilidad, al brindarme los conocimientos sobre la realización de la prueba antimicrobiana y por la confianza que me otorgó al estar trabajando en el laboratorio.

A mis padres, Florisel Idalia Aparicio Sandoval y Yair Arellano Morales, por estar siempre al pendiente de mi a pesar de la distancia, brindarme su apoyo incondicional y darme sus consejos en mis momentos de mayor duda, por eso y mucho más, gracias.

A mi hermano, Derek Said Arellano Aparicio. Por darme siempre su apoyo y atención incondicional y estar siempre conmigo cuando lo necesite.

A mis abuelit@s, Hilda Morales, Antonio Arellano, Martina Sandoval y Pablo Aparicio, por su cariño, apoyo incondicional, estar siempre al pendiente de mi y darme sus consejos.

A mis tí@s, Heriberto, Susana, Jair, Ediño y Horacio, por siempre estar al pendiente de mí y darme su apoyo y atención cuando lo necesite.

A mis amig@s, Jorge Méndez, Lázaro Montejó, Lucy Muñoz, Pamela Sánchez, José Jiménez y Carolina Curiel por estar siempre conmigo brindándome su apoyo y permitirme pasar muchas de las mejores experiencias de mi vida en su compañía.

DEDICATORIA

A mis padres *Florisel Idalia Aparicio Sandoval y Yair Arellano Morales*, por haberme dado su apoyo, su amor incondicional, paciencia y valores que me transmitieron, mismos que me han acompañado en mi vida, por siempre estar conmigo para festejar mis logros y también para señalar mis errores motivándome a superarme y siempre dar lo mejor de mi

A mi hermano, *Derek Said Arellano Aparicio* por ser un punto de apoyo en mi vida y brindarme su comprensión y apoyo como persona, pero sobre todo, como hermano.

A mis abuelit@s. *Hilda Morales, Antonio Arellano, Martina Sandoval y Pablo Aparicio* por darme sus enseñanzas, su cariño, paciencia y nunca dejarme solo cuando los necesite.

“La medida de la verdadera gloria no es dar batalla en el brillante medio día de la guerra, rodeado de valientes camaradas en el campo de la victoria, si no luchar valientemente solo en la oscuridad sin esperanza de ayuda o incluso recuerdo y escupir desafiante en el ojo de la media noche.”

Lion el' jonson

INDICE GENERAL

DECLARACIÓN DE NO PLAGIO	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	v
INDICE GENERAL	vi
INDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
RESUMEN.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Justificación	3
1.1. Objetivos	3
1.1.1. Objetivo General.....	3
1.1.1. Objetivos Específicos.....	3
1.2. Hipótesis.....	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1. ¿Que son los polisacáridos?	5
2.2. Fuentes de Obtención de los Polisacáridos y Características Generales.....	6
2.3. Características Físicoquímicas y Reológicas de los Polisacáridos.....	7
2.3.1. Propiedades reológicas.....	7
2.3.2. Variación de los pesos moleculares en los polisacáridos y su efecto en las propiedades de los polisacáridos.....	8
2.4. Propiedades de los Polisacáridos	9
2.5. <i>Ustilago maydis</i>.....	10
2.6. Vía pal/Rim	11
2.7. Métodos para Caracterización de Polisacáridos	12
2.7.1. Rendimiento	12
2.7.2. Prueba de Gelificación.....	13
2.7.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	14
2.7.4. Espectrofotometría Infrarroja de Transformada de Fourier (FT-IR)	15
2.7.5. Actividad Antimicrobiana	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS	17

3.1. Localización geográfica	17
3.2. Obtención de las cepas	17
3.3.1. Caldo y Agar de Medio Completo (M.C.)	18
3.3.2. Caldo de Medio Mínimo (M.M.)	18
3.4. Obtención del polisacárido	19
3.4.1. Activación de las Cepas	19
3.4.2. Precultivo	19
3.4.3. Lavado Celular	19
3.4.4. Conteo de Células	20
3.4.5. Fermentación	21
3.4.6. Recuperación y Secado del Polisacárido	22
3.5. Cálculo de Rendimiento del Polisacárido	24
3.6. Análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	24
3.6.1. Determinación de Punto de Cristalización y Punto de Fusión por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	24
3.6.2. Determinación de Punto de Gelificación por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	25
3.7. Prueba de Gelificación	25
3.8. Espectrofotometría FT-IR	26
3.9. Prueba de Actividad Antimicrobiana	26
3.9.1. Preparación de la cepa de <i>Escherichia coli</i>	26
3.9.2. Preparación del polisacárido	26
3.9.3. Tratamientos y distribución	27
IV. RESULTADOS y DISCUSIÓN	28
4.1. Fermentación y Rendimiento	28
4.2. Calorimetría Diferencial de Barrido	31
4.2.1. Punto de Cristalización y Punto de Fusión por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	31
4.2.2. Punto de Gelificación y Punto de Fusión por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) en Muestra Hidratada	34
4.3. Gelificación Iónica	37
4.4. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)	41
4.5. Actividad antimicrobiana	44
V. CONCLUSIONES	47

VI. PERSPECTIVAS	49
VII. BIBLIOGRAFÍA	50

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cepa Rim101 y FB2 de <i>Ustilago maydis</i>	17
Figura 2. Proceso del conteo celular en cámara de Neubauer. ¡Error! Marcador no definido.....	20
Figura 3. Diagrama del proceso de obtención del polisacárido.....	23
Figura 4. Resultados en g/L obtenidos al final de la fermentación de <i>Ustilago maydis</i>	28
Figura 5. Cálculo del rendimiento mediante la diferencia entre peso seco y húmedo de los polisacáridos de las cepas (a) Rim101 y (b) FB2.....	30
Figura 6. Termograma por DSC del exopolisacárido deshidratado producido por la cepa RIM101 de <i>Ustilago maydis</i>	32
Figura 7. Termograma por DSC del exopolisacárido deshidratado producido por la cepa FB2 de <i>Ustilago maydis</i>	33
Figura 8. Termograma por DSC del exopolisacárido hidratado producido por la cepa RIM101 de <i>Ustilago maydis</i>	35
Figura 9. Termograma por DSC del exopolisacárido hidratado producido por la cepa FB2 de <i>Ustilago maydis</i>	36
Figura 10. Prueba de gelificación iónica del polisacárido de la cepa Rim101 a una concentración del 7% (a y b) y 5% (c y d) en una solución de CaCl ₂ al 4%.....	39
Figura 11. Prueba de gelificación iónica del polisacárido de las cepa FB2 a una concentración del 7% (a y b) y 5% (c y d) con una solución de CaCl ₂ al 4%.....	38
Figura 12. Espectro infrarrojo del exopolisacárido sintetizado por la cepa Rim101.....	41
Figura 13. Espectro infrarrojo del exopolisacárido sintetizado por la cepa FB2.....	43

Figura 14. Evaluación del Efecto Antimicrobiano de los polisacáridos sintetizados por *Ustilago maydis* (cepa Rim101 y FB2) por de la Inhibición de Crecimiento de *E.coli* en Placa.....45

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Fuentes de obtención y características fisicoquímicas de los polisacáridos más comunes.	6
Cuadro 2. Descripción de la simbología de las variables	21
Cuadro 3. Parámetros de Corrida para el Análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) en muestras deshidratadas.....	24
Cuadro 4. Parámetros de Corrida para el Análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) en muestras hidratadas.	25
Cuadro 5. Descripción de Tratamientos y Nomenclatura.	27
Cuadro 6. Resultados obtenidos de la prueba de gelificación.....	39

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1 Frotis de células de <i>Ustilago maydis</i> observadas bajo el objetivo de 100X. Cepa Rim101 a 48 (a) y 72 (b) horas de activación y cepa FB2 a 48 (c) y 72 (d) horas de activación.	18
Anexo 2 Datos obtenidos en el conteo en Cámara de Neubauer.	20
Anexo 3 Datos obtenidos del conteo celular para el inóculo inicial de la fermentación.	21
Anexo 4 Distribución de tratamientos en microplaca para la evaluación de actividad antimicrobiana de los polisacáridos producidos por las cepas Rim101 y FB2 de <i>Ustilago maydis</i> .	26
Anexo 5 Formación de aglomerados en la prueba de gelificación de las soluciones de polisacáridos al 20 % (Rim101 (a) y FB2 (b)) en CaCl ₂ al 7%.	36

RESUMEN

Ustilago maydis es un hongo fitopatógeno de plantas monocotiledóneas, principalmente de la planta del maíz, el cual se presenta como una especie dimórfica, es decir, durante la primera parte de su ciclo vital se presenta en forma levaduriforme y posteriormente en micelial. En México su aprovechamiento se destaca desde la época azteca en la cual se utilizó como ingrediente para la elaboración de algunos platillos, que en la actualidad siguen siendo parte de la dieta de la población mexicana, destacándose en los últimos años su demanda debido al valor nutrimental del “huitlacoche” nombre con el cual se le conoce comúnmente, debido a que es rico en 17 aminoácidos con un alto contenido de lisina, cuenta con hasta 16.4% (p/p) de proteínas y representando en 100 gramos del hongo hasta un 32% de la ingesta diaria recomendada de fibra. Sin embargo, en los últimos años la alta demanda de productos de origen natural ha abierto las posibilidades del uso de los hongos como en otras áreas de la ciencia y la industria, como lo son la biotecnológica, agronómica, farmacológica, médica, alimentaria, entre otras. Incrementando la importancia del estudio de los metabolitos sintetizados por diferentes plantas, animales, bacterias u hongos con la finalidad de obtener nuevas moléculas con usos potenciales en diferentes ramas. Por lo anterior, en el presente trabajo de investigación se basó en proponer al menos un posible uso del polisacárido sintetizado por la cepa Rim101 de *Ustilago maydis* dentro del área agroalimentaria, tomando como base datos que se han obtenido de los análisis fisicoquímicos realizados al metabolito obtenido mediante fermentación en medio mínimo (M.M) por 72 h/28 °C con agitación a 125 rpm.

Las determinaciones realizadas al polisacárido destacaron que se obtienen un rendimiento en peso seco de 6.801 g/L, no presenta actividad antimicrobiana por inhibición de *Escherichia coli* a las concentraciones evaluadas (0.8 mg/mL, 8 mg/mL y 80 mg/mL), la prueba de calorimetría diferencial de barrido (DSC) realizado de 0°C a 300°C en muestra seca se encontraron 2 picos endotérmicos a 98.29 °C y 139.09 °C correspondiente a los puntos de fusión y uno más exotérmico a los 193.89 °C que es el punto de cristalización, mientras que en la muestra hidratada se encontró solo un pico endotérmico 163.59 °C, finalmente se encontró que la molécula es estable a temperaturas de hasta 240 °C. En espectro obtenido por FT-IR se muestran bandas a 1368.85 cm⁻¹ correspondiente a los anillos de glucosa, a 823.99 cm⁻¹ correspondiente a los enlaces β de cadenas glucosídicas, a 1571.02 cm⁻¹ correspondientes a los grupos fenólicos antioxidantes de β-D-glucanos y transmitancia a 1045.26 cm⁻¹ que refleja la diferencia en la forma física de los β-glucanos. Por último, en la prueba rápida de gelificación iónica en frío se encontró que a bajas temperaturas (4 °C) y en presencia de iones de calcio (CaCl₂ a 4%, 5%, 6% y 7%) las soluciones del polisacárido (5%, 7%, 10%, 15% y 20%) muestran una formación de masas gelificadas debido a un cambio de agregación y viscosidad relacionados con un reordenamiento de las cadenas del polisacárido cuando estas son hidratadas. En base a los resultados mostrados en las pruebas de gelificación y calorimetría diferencial de barrido (DSC) se puede proponer continuar con los análisis enfocados a la utilización del polisacárido fúngico como gelificante hasta encontrar la concentración que nos permita utilizarlo como inmovilizador de moléculas o células, o como sustituto del agar o alginato en el área médica, microbiológica o de cultivos de tejidos, así como, plantear su potencial como aditivo en procesos alimentarios o farmacológicos en los que requieran altas temperaturas (hasta 240 °C) de cocción o esterilización sin que este se desnaturalice y pierda sus propiedades, y por último, proponer su empleo en la mejora de la reología y viscosidad de diferentes formulaciones agroalimentarias o industriales.

I. INTRODUCCIÓN

Las diferentes áreas industriales emplean desde hace años una gran variedad de polisacáridos obtenidos de diferentes fuentes, como lo son: las algas, plantas, bacterias u hongos. Algunos ejemplos de dichos polisacáridos son los alginatos, las carrageninas, la karaya, la goma arábica, la goma xantana, el dextran, entre otros; apreciados debido a su composición química (D-manurónico y L-gulurónico, L-ramnosa, D-galacturónico y D-galactosa, entre otros) y propiedades fisicoquímicas para ser utilizados como espesante, estabilizador de emulsiones, retenedores de agua y gelificante de diversas formulaciones (Pasquel, 2001).

En los últimos años, los polisacáridos de origen microbiano (bacterias y hongos) han tomado gran importancia debido a que se pueden producir de manera constante, sin dañar el medio ambiente. En el caso del *Ustilago maydis* que es un hongo conocido como huitlacoche, goza de una gran importancia culinaria, no solo en México, sino en el mundo, considerado un platillo gourmet de la gastronomía mexicana, sin embargo, este hongo es un patógeno basidiomiceto, dimórfico, y biotrófico, que infecta las plantas de maíz (*Zea mays*) causando la enfermedad llamada “carbón común” (Juárez *et al.*, 2011). El desarrollo de este hongo sobre los granos de maíz requiere de condiciones ambientales favorables, con una temperatura de entre 17°C a 20 °C, una humedad relativa de 80 % y la disponibilidad de nitrógeno (Monar *et al.*, 2019). Otro factor que interviene para que *U. maydis* pueda infectar su huésped es su cambio morfológico en respuesta al pH externo, en pH neutro el hongo crece en forma homogénea en forma de levadura no patógena, pero en pH ácido este crece en forma de micelio dimorfo, siendo esta su forma patógena y la cual puede invadir al huésped (Aréchiga y Ruiz, 2005; Cervantes *et al.*, 2020).

El estudio de las distintas respuestas de los hongos a los niveles de pH llevó al descubrimiento de la vía de transducción Pal/Rim en *Aspergillus nidulans*, enviando señales encargadas de responder a los cambios de pH (Aréchiga y Ruiz, 2005), posteriormente, se estudió dicha vía en *Ustilago maydis* realizando mutaciones para desarrollar un hongo mejor adaptado a los cambios de pH sobre todo al pH alcalino, formándose el cepa Rim101 de *Ustilago maydis*, cuya membrana y pared celular al interactuar directamente con el medio externo, presentan adaptaciones al estrés causado por el cambio de pH a través de la vía Rim101/PacC, que interviene en la regulación de genes encargados de codificar algunos componentes de la pared celular, lípidos y proteínas de membrana, así como, los genes que sintetizan glicosiltransferasas, glucano sintasa, glucosidasas, β -1,6-glucano sintasa, quitina sintasas, quitina desacetilasas y quitosinas (Franco *et al.*, 2014), además de mantener los niveles internos de agua. Al modificar la vía Rim101/PacC en *U. maydis* se obtuvo un hongo que produce y libera un polisacárido en el medio de fermentación en un caldo nutritivo líquido, el cual muestra una viscosidad más alta que el polisacárido sintetizado por la cepa no modificada.

Con la finalidad de demostrar los posibles usos del polisacárido sintetizado por *U. maydis* y tener la certeza de sus características fisicoquímicas es necesario analizar al polisacárido obtenido durante un proceso de fermentación mediante diferentes determinaciones que permitan conocer sus características como lo son: pruebas de gelificación iónica en frío, la espectrofotometría FT-IR, pruebas de calorimetría diferencial (DSC) y pruebas de potencial antimicrobiano, con lo cual se pretende obtener datos suficientes para proponer un potencial uso en áreas como la agroalimentaria.

1.1. Justificación

Se ha observado que algunas características fisicoquímicas de los polisacáridos obtenidos de diferentes fuentes naturales (fúngicos, vegetales, algales o animales) brindan un gran potencial para ser usados en diferentes áreas industriales. Lo cual ha permitido proponer la caracterización de un polisacárido producido por la cepa Rim101 de *Ustilago maydis* para determinar si algunas de las características fisicoquímicas de este metabolito fúngico pueden proponerlo como una potencial opción para ser utilizado como sustituto de los polisacáridos que ya se encuentran en el mercado, ya sea como inmunomodulador, sustituto de agentes gelificantes, espesantes o inmovilizantes. Obteniendo de esta manera no solo un sustituto de los polisacáridos comerciales, sino también, la producción de un polisacárido dentro de un proceso que no daña el medio ambiente, disminuyendo en el consumo de fuentes naturales de las que se obtiene la mayoría de los polisacáridos comerciales (plantas, algas o animales) y a su vez dando un valor agregado a un fitopatógeno que puede utilizarse como productor de un metabolito con un potencial uso y aplicación en diferentes áreas industriales.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo General

Evaluar fisicoquímicamente el polisacárido sintetizado por *Ustilago maydis* (cepa RIM101) para proponer por lo menos un potencial uso en algún área de la industria farmacológica, microbiológica o agroalimentaria.

1.1.1. Objetivos Específicos

- Obtener mediante fermentación en medio mínimo el polisacárido producido por *Ustilago maydis* (cepa RIM101).
- Caracterizar por Espectrofotometría FT-IR y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) el polisacárido sintetizado por *Ustilago maydis* (cepa RIM101).
- Evaluar el potencial gelificante y antimicrobiano del polisacárido.
- En base a los resultados obtenidos de las pruebas fisicoquímicas evaluadas proponer por lo menos un posible uso potencial del polisacárido.

1.2. Hipótesis

La caracterización fisicoquímica del polisacárido sintetizado por *Ustilago maydis* (cepa RIM101) permitirán proponer por lo menos una aplicación farmacológica, microbiológica o agroalimentaria del metabolito fúngico.

II. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1. ¿Que son los polisacáridos?

Los polisacáridos son cadenas formadas por monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos que pueden ser en forma lineal o ramificada y con un nivel variable de polimerización dando origen a macromoléculas con múltiples funciones (Castañeda *et al.*, 2020). La presencia de una gran cantidad de grupos hidroxilos en estos polímeros les proporcionan características de biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja toxicidad, con la ventaja de tener múltiples presentaciones del polisacárido en formato de polvo, perlas, fibras, membrana, capsulas, nanopartículas y micropartículas (Smelcerovic *et al.*, 2008).

Muchos de los polisacáridos se forman principalmente en la pared celular de organismos como bacterias y hongos (Amjres *et al.*,2010; Becerra *et al.*, 2011; Albornoz, 2022), como moléculas activas que poseen gran plasticidad y tienen un papel crucial en distintos procesos biológicos (Fernández, 2021), entre los que destacan las propiedades inmunológicas al modificar o dar de manera directa una respuesta inmunitaria con actividad macrófaga, así como, propiedades antioxidantes al retrasar o prevenir el daño por oxidación (Figuroa *et al.*, 2022).

Dentro de las características más sobresalientes de estos polímeros sus propiedades hidrocoloides basadas en su capacidad para la retención de grandes cantidades de agua aumentan la viscosidad del polímero en solución, característica que en algunos casos les permite llegar a formar geles que pueden ser utilizados en una amplia variedad de procesos y productos industriales (Siccha y Lock, 1992; Rodríguez *et al.*, 2003).

2.2. Fuentes de Obtención de los Polisacáridos y Características Generales

Los polisacáridos son polímeros que se obtienen de diferentes fuentes (**Cuadro 1**), como pueden ser: a partir de la degradación química o enzimática de biomasa de plantas y microorganismos (Kadokura *et al.*, 2007; Ospina, 2016), como producto del metabolismo de una gran variedad de hongos y bacterias, o a partir de exudados de algunas plantas (Becerra *et al.*, 2011; López y Sabogal, 2018).

Cuadro 1. Fuentes de obtención y características fisicoquímicas de los polisacáridos más comunes.

Referencias	Tipo de Fuente	Fuente de Obtención	Peso Molecular	Monosacáridos	Polisacárido
Smelcerovic <i>et al.</i> , 2008; De la Cruz y Quezada, 2020; Colachagua y Florentino, 2014	Bacteriano	<i>Leuconostoc</i> , <i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i>	15 a 2 000 KDa	D-Glucosa	Dextrano
Smelcerovic <i>et al.</i> , 2008; Jacobs, 2014	Bacteriano	<i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i>	2000 kDa	D-glucosa D-manosa Ácido D-glucurónico	Xantano
Smelcerovic <i>et al.</i> , 2008 Castilla <i>et al.</i> , 2019	Bacteriano Algas	<i>Azotobacter</i> <i>vinelandii</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Feoficeas</i>	500 a 1900 KDa	Ácido D-manurónico Ácido L-gulurónico	Alginato
Smelcerovic <i>et al.</i> , 2008 Sanchez, 2019	Fúngica Animal	<i>Mucor</i> <i>Abisidia</i> <i>Rhizopus</i> <i>crustaceos</i> <i>insectos</i>	623 a 1632 KDa	D-glucosamina N-acetil-D- glucosamina	Quitosan
Smelcerovic <i>et al.</i> , 2008 Sanchez, 2010	Fúngica Animal	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Allomyces</i> <i>Fusarium</i>	624 a 1632 KDa	N-acetil-D- glucosamina	Quitina
Salazar, 2021	Bacteriano	<i>Shingomonas</i> <i>elodea</i>	500 KDa	α -Lramnosa β -D-ácido glucurónico β -D-glucosa	Gelana
Villada <i>et al.</i> , 2007 Deheco, 2015	Fúngico	<i>Aureobasidium</i> <i>pullulans</i>	70 a 110KDa	pulalan-6- glucanohidrolasa	Pululana

Zhang y Edga, 2014	Bacteriano	<i>Alcaligenes faecalis var. Mixogenes</i>	53 a 2000KDa	(1→3)-β-glucosídico	Curdiana
Mamani et al, 2011	Vegetal	<i>Citrus ssp Malus domestica</i>	50 a 180KDa	ácido α-(1,4)-D-galacturónico	Pectina

Otros, como la quitina y el quitosano, son obtenidos principalmente del exoesqueleto de algunos animales crustáceos como langosta, cangrejo y camarón (Mármol *et al.*, 2011; López y Sabogal, 2018). Algunos de gran importancia industrial son obtenidos a partir de las algas, como lo son: Chlorophytas (algas verdes) de las cuales se obtiene el ulvano, de las Rhodophytas (algas rojas) de las cuales se obtienen los Carragenatos y de las Phaeophyceae (algas pardas) se obtienen alginatos, que han demostrado tener propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antivirales (Peso, 2012).

2.3. Características Fisicoquímicas y Reológicas de los Polisacáridos

2.3.1. Propiedades reológicas

La reología nos permite conocer los diversos factores que actúan sobre el material obtenido, su capacidad de recuperación y si es capaz de almacenar o dispersar energía (Hidalgo, 2012). Factores como el pH, fuerza iónica, tiempo de obtención del polisacárido y sus productos derivados afectan la estructura y los mecanismos moleculares involucrados (Foegeding *et al.*, 2003). Polisacáridos como la xantana con características que le permiten dar la textura y apariencia se utilizan para modificar la reología del producto final en diferentes áreas industriales, otras como la caseína se utilizan en quesos y otros productos al dar propiedades como elasticidad, resistencia y dureza (Hidalgo, 2012).

La mayoría de los polisacáridos presentan como características estar formados por largas cadenas complejas con un alto peso molecular, que se dispersan fácilmente

y se pueden solubilizar parcial o totalmente en agua u otros solventes (Ospina, 2016), son altamente hidrofílicos (tiene gran capacidad de retener el agua) lo que permite formar partículas coloidales altamente hidratadas, construyendo una red tridimensional que, dependiendo de la interacción molecular entre sí, pueden aumentar la viscosidad, espesar o gelificar (Badui, 2006), dichas propiedades permiten utilizarlos para formar suspensiones altamente viscosas, mejorar texturas en alimentos, aumentar la retención de humedad o como sustituto de gluten y reducir la tensión superficial entre la interacción de agua-aceite o agua-aire en diferentes formulaciones (Larrosa, 2014; Ospina, 2016).

2.3.2. Variación de los pesos moleculares en los polisacáridos y su efecto en las propiedades de los polisacáridos

Los polisacáridos son los carbohidratos más abundantes de la naturaleza poseen un rango amplio de pesos moleculares (**Cuadro 1**), lo cual influye en sus características diferenciales en la velocidad o tiempo en que fluye el polímero sobre alguna superficie (Morales *et al.*, 2013) y a su vez en el estado metabólico de la célula o el organismo que lo produce (Mckee y Mckee, 2003; Del Campo, 2016), En algunos polisacáridos como los arabinosilanos el peso molecular que presenta depende de su origen y de la técnica de obtención del polisacárido (Morales *et al.*, 2013). En el caso de la pectina, su peso molecular le permite presentar propiedades gelificantes, excipientes o funcionar como regulador de liberación de compuestos químicos utilizados en medicamentos (Mamani *et al.*, 2011). Otros como la quitina o el quitosano que se obtienen de crustáceos y de algunos hongos, son utilizados como espesantes, gelficantes, emulsificantes, como recubrimiento protector, clarificador de bebidas y pueden actuar o inducir mecanismos de defensa en algunos organismos debido a la gran variedad de pesos moleculares que pueden presentar dependiendo de la fuente de la que son obtenidos (Marmol *et al.*, 2011; Becerra *et al.*, 2011). Es importante resaltar que los pesos influyen en el funcionamiento de algunos polisacáridos, por ejemplo, las heparinas que se obtienen a partir de tejido animal son utilizadas como anticoagulante en el sector

médico, utilizando especialmente los de bajo peso molecular (2,000 a 10,000 Da) ya que su unión a las proteínas plasmáticas es más débil, su tiempo de eliminación y efecto antitrombótico son más prolongado (Agustí *et al.*, 2009). Por otro lado, polisacáridos como el quitosano pueden presentar efectos inhibitorios sobre *Alternaria solani* independientemente del peso molecular que se utilice al evitar la germinación de sus esporas y su desarrollo micelial (Coqueiro y Di Piero, 2011).

2.4. Propiedades de los Polisacáridos

Algunos polisacáridos son biopolímeros que participan en procesos metabólicos o fisiológicos, desde la comunicación entre células hasta brindar protección contra un patógenos externos, tenido aplicaciones terapéuticas, alimenticias, farmacéuticas, industriales, entre otros (Liu *et al.*, 2015). Polisacáridos como los carragenanos que son obtenidos de algas rojas como *Gigartina skottsbergii*, son utilizados como inhibidores de virus como VPH, VSH, VRH, VIH, mientras los alginatos que son obtenidos de las algas pardas como *Laminaria hyperborea* son empleados como agentes antivirales, mejorando significativamente los mecanismos de defensa del organismo (Del Campo, 2016). De semillas de *Ceratonina silivia* se obtiene el polisacárido locuste que es utilizado como espesante, estabilizante de emulsiones, evita la sinéresis en alimentos enlatados, gaseosas, helados, en quesos acelera el proceso de coagulación. El polisacárido de arábigo obtenido del árbol de acacia es utilizado como emulsionante y estabilizante, fijador, encapsulante, evita la oxidación y la volatilización de ciertos componentes del sabor (Parra, 2012).

Los polisacáridos de origen biológico tienen usos dentro del tratamiento de aguas residuales, empelándolos como coagulantes naturales de compuestos contaminantes que permite disminuir el uso de compuestos inorgánicos evitando efectos adversos en la potabilidad del agua (Ajao *et al.*, 2018). El polisacárido galactomanano obtenida de semillas de algarroba, formada por manosa y galactosa, es utilizada como aditivo, estabilizador y espesante en la industria alimentaria, también se utiliza en la industria textil, farmacéutica o para la producción de bioetanol (Karababa y Coskuner, 2012). Un polisacárido con una amplia variedad

de usos industriales son los alginatos extraídos de algas marrones, que por su variedad estructural se utilizan como gelificantes en la formación de películas y fibras, y en industrias como la heladera evita la formación de cristales grandes durante la congelación (López y Sabogal, 2018).

Las ventajas de estos polisacáridos de origen microbiano con los obtenidos de otras fuentes naturales destacan en su producción, no depende de condiciones climáticas externas, menos contaminante, homogénea y controlada, por lo contrario, se requiere de equipo de laboratorio específico y mucha energía lo que hace que el costo de producción sea alto (García *et al.*, 2004)

Polisacáridos como el quitosán, producido por algunos hongos demuestran tener un uso potencial en la agronomía, al controlar *Fusarium oxysporum* f sp *Lycopersici* en tomate bajo condiciones in vitro (Carmona, 2019). En sectores de la salud, los polisacáridos del tipo β -glucano tienen propiedades inmunomoduladoras de amplio espectro, siendo utilizados y probados en tratamientos contra el cáncer y otras enfermedades (Chang, 2002).

Otras como los dextranos, quitina, xantanos alginatos entre otras de origen microbiano han demostrado su utilidad en la rama médica como anticoagulantes, en ingeniería de tejidos, para administrar fármacos y con actividad antimicrobiana, antitumoral y contra enfermedades como VIH (Smelcerovic *et al.*, 2008).

2.5. *Ustilago maydis*

El huitlacoche (*Ustilago maydis*) goza de una gran importancia culinaria, no solo en México, sino en el mundo, considerado un platillo gourmet de la gastronomía mexicana, este hongo es un patógeno, basidiomiceto, dimórfico, y biótrofo, que infecta las plantas de maíz (*Zea mays*) (Juárez *et al.*, 2011; Jiménez, 2016), provocando la formación de tumores, aparición de clorosis en la zona infectada, produciendo pigmentos de tipo antocianinas y finalmente la hiperplasia e hipertrofia de la zona, desarrollándose plenamente sobre los granos de maíz cuando las condiciones ambientales son favorables, es decir, a temperaturas de entre 17°C a

20 °C, humedad relativa de 80 % y disponibilidad de nitrógeno (Monar *et al*, 2019). Un factor de gran importancia que interviene para que *U. maydis* pueda infectar su huésped es el cambio morfológico del hongo en respuesta al pH externo, debido a que a pH neutro el hongo crece en forma homogénea de levadura no patógena, haploide y saprófita, la cual que se reproduce por gemación, sin embargo, en condiciones de pH ácido este hongo crece en forma de micelio dimorfo, siendo esta su forma patógena que invade al huésped (Aréchiga y Ruiz, 2005, Cervantes *et al.*, 2020) cuando dos células son compatibles permitiendo penetrar al huésped a través de algunas aberturas naturales, como las estomas (Jiménez, 2016).

2.6. Vía pal/Rim

Para la producción de polisacáridos a partir de microorganismos se utilizan medios de respuesta a estímulos exteriores, como en el caso de algunos hongos que se adaptan a medios salinos, desecación, resisten altas dosis de rayos UV, entre otros (Franco *et al.*, 2014). Uno de estos estímulos es el pH, que al estudiar su respuesta en *Aspergillus nidulans* llevó al descubrimiento de la vía de transducción Pal/Rim la cual envía señales encargadas de responder a estos cambios (Aréchiga y Ruiz, 2005; Franco *et al.*, 2014) y que se activa gracias a la actividad proteica de transcripción con dedos de zinc que pone en funcionamiento algunos genes a pH alcalino y suprime otros en pH ácido, funcionando la vía Pal en hongos filamentosos y la Rim en levaduras, siendo ambas vías homólogas (Fonseca *et al.*, 2012).

La mutación en la vía Pal/Rim en la especie de *Ustilago maydis* dio origen a una nueva cepa (cepa Rim101) con un fenotipo pleiotrópico (Fonseca *et al.*, 2012) encontrándose en la membrana y la pared celular las adaptaciones de la vía Pal/Rim 101, lo que regula genes encargados de formar y estabilizar los componentes de la pared celular fúngica como lo son: lípidos, proteínas, glicosiltransferasas, glucano sintasa, glucosidasas, quitina sintasas, quitina desacetilasas y quitosinas (Franco *et al.*, 2014), así como, de mantener los niveles internos de agua. La ruta Pal/Rim101 se relaciona con la ruta ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) lo que permite ayudar con el transporte intracelular, regula el ciclo celular, expresar

factores de crecimiento y diferenciación, y participar en el procesamiento de reparación, recombinación y transcripción del ADN y ARN (Franco *et al.*, 2014). En el caso de la ruta Rim101 su activación le permite actuar como represor directo al desactivar genes de expresión ácida, o mediante la represión indirecta bloqueando la acción de otro represor, como por ejemplo Nrg1 o Smp1 (Lamb *et al.*, 2003).

2.7. Métodos para Caracterización de Polisacáridos

Actualmente algunas industrias como la agroalimentaria han tenido un crecimiento en la demanda de nuevos compuestos, para sustituir compuestos químicos no orgánicos que son utilizados como aditivos, espesantes, gelificantes o recubrimientos antimicrobianos, por opciones de origen natural, en vía de buscar una vida más sana y menos dañina con el ambiente (Sánchez, 2010).

Es por ello que al considerar el análisis térmico (DSC, TGA, DMA) complementado con otras técnicas de análisis fisicoquímico (pruebas de rendimiento de extracción, solubilidad, gelificación, viscosidad, microscopia, FT-IR, RMN, entre otras) es posible determinar algunas características de los biopolímeros, como lo son: estabilidad, reactividad, pureza del compuesto, capacidad de retención de agua, reacciones de transición, tipos de enlaces y estructura, entre otros., (Aguilar *et al.*, 2005). Esto es de gran importancia al obtener polisacáridos de diferentes fuentes naturales o sintéticas o a través de diferentes modificaciones en los procesos de fermentación o extracción es necesario caracterizar los polímeros resultantes para una posterior aplicación sin sesgos en cualquiera de los parámetros que determinen sus características o propiedades bioactivas, reológicas o fisicoquímicas.

2.7.1. Rendimiento

La fermentación es un sistema biológico utilizado producir y extraer moléculas de interés, estos sistemas proporcionan una alternativa sustentable y económica para sustituir procesos industriales de gran escala (Ávila, 2021), sin embargo, se ha observado que un cambio en cualquiera de los parámetros de la fermentación (pH,

velocidad de agitación, tamaño de burbuja, concentración de sales en el medio, fuente de carbono, nitrógeno o fósforo), así como, el microorganismo productor y la técnica de extracción ocasionan variaciones en los rendimientos de síntesis y obtención de las biomoléculas de interés.

López *et al.*, 2015 caracterizaron un exopolisacárido sintetizado por *Ganoderma* sp utilizando fermentaciones en Batch e incubando durante 10 días a pH 4.0, reportando los valores de producción más altos en 2.65 g/L. Mientras Alvarado y Romero, 2013 obtuvieron rendimientos mayores de la goma xantana obtenida mediante una fermentación de 72 horas con la bacteria *Xanthomonas campestris* obtenida de diferentes fuentes, obteniendo como resultado una producción máxima de 8.84 g/L. Por otro lado, rendimientos menores son reportados por autores como Ávila, 2021 para el exopolisacárido sintetizado por el alga *Neochloris oleoabundans* en fermentación extractiva en sistema semicontinuo a partir de agentes termosensibles (EOPO) obteniendo rendimientos de 1.067 g/100mL (1.067%) en la fermentación por lotes y un rendimiento de 1.4566 g/100mL (1.4566%) en fermentación de cultivo Batch (semicontinuo).

Lo anterior denota que el parámetro de rendimiento de obtención del polisacárido varía de acuerdo con el tipo de microorganismo que lo sintetiza, el tipo de técnica de fermentación y el tiempo de fermentación llevado a cabo, el cual varía ya que está relacionado directamente con el metabolismo del microorganismo.

2.7.2. Prueba de Gelificación

La formación de un gel se puede considerar un caso especial, donde las moléculas solvofílicas lineales se separan de la solución formando una red extendida que es capaz de atrapar un solvente para producir un cuerpo homogéneo o gel, siendo el resultado la precipitación o cristalización de una solución (Stephen *et al.*, 2006)

Polisacáridos como arabinosilanos obtenidos de la pared celular de cereales en concentraciones del 2% (p/v) y en presencia de ácido ferúlico son capaces de formar

geles mediante una oxidación enzimática que permite unir las cadenas de polisacáridos, la gelificación de este polisacárido fue caracterizada por Fierro, 2014 mediante una técnica de reología dinámica de baja deformación, encontrando que no son afectados por factores como la fuerza iónica, cambio de temperatura o el pH.

Por otro lado, la xantana producida por la *Xanthomonas campestris*, con un peso molecular entre 15 a 50 x 10⁶ dalton, es capaz de hidratarse rápidamente con agua fría, formando soluciones sin aglomerados y con características pseudoplásticas, incluso son capaces de formar geles al mezclarse en diferentes proporciones con otras gomas, como la garrofín, cuya concentración utilizada variará la fortaleza del gel obtenido una estructura más rígida posterior al procedimiento de calentamiento constante a 40 °C y un enfriamiento a 10 °C durante 12 horas (Yoshida *et al.*, 1998).

Otros polímeros, como el alginato, son capaces de gelificar de manera inmediata, al aplicar un entrar en contacto con una solución de CaCl₂ debido a la unión electrostática del catión de los iones Ca²⁺ y los grupos iónicos y polares de las cadenas de alginato (Nieto *et al.*, 2013).

2.7.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Es una técnica para la medición de calor emitido por una muestra, donde una cantidad de calor conocida es aplicada y se va elevando gradualmente hasta provocar un cambio de transición conformacional en la muestra, registrando los datos en forma de picos endotérmicos o exotérmicos, que indican cambios estructurales referente al punto de fusión (endotérmico) y el de cristalización (exotérmico), entre otros (Höhne *et al.*, 2003; León, 2021).

León, 2021 caracterizó por DSC un β-glucano producido por *Pleurotus ostreatus* (6 mg) mediante un calentamiento de 30 a 180 °C, extraído a diferentes temperaturas, (50°C, 170 °C y 91°C) encontrando picos de fusión en 160 °C, 145°C y 133 °C respectivamente. Por otro lado, Lomas *et al.*, 2015, analizaron mediante calorimetría diferencial de barrido un β-glucano obtenido a partir de salvado de avena tratado con anhídrido acético durante 10 y 20 minutos y al 4 y 6 % de grado de acetilación,

utilizando una atmosfera de nitrógeno y un calentamiento de 30 a 200 °C, con una rampa de calentamiento de 10°C/min, encontrando que con 4 % de acetificación y tratado por 10 minutos con anhídrido acético tenían un pico exotérmico probable a la transición de cristalización (155.2 °C) antes de llegar a la degradación.

2.7.4. Espectrofotometría Infrarroja de Transformada de Fourier (FT-IR)

Es una herramienta útil para la identificación de grupos funcionales en materiales o muestras (León, 2021; Khan *et al.*, 2018), basado en la vibración de los enlaces de las moléculas debido a la absorción de energía infrarroja (Khan *et al.*, 2018) y su representación gráfica del número de onda donde esta se absorbe (León, 2021).

Aguilar *et al.*, 2005 caracterizaron por FT-IR la goma xantana producida por la bacteria de *Xanthomonas campestris* y la compararon con una goma xantana Keltol (grado comercial) utilizando un rango de 4000-400 cm^{-1} encontrando bandas semejantes, con un pico característico a los 891 cm^{-1} correspondiente a derivados glucopiranosícos de enlace tipo β , otros a los 1736-1620 cm^{-1} que son pertenecientes a los grupos carboxilos en su forma aniónica y de sal, respectivamente.

Reportes de Fernández, 2021 quién caracterizó por FT-IR, un exopolisacárido proveniente de *Ganoderma australe* en un rango de 4000-500 cm^{-1} destaca la presencia de 2 bandas de importancia para los polisacáridos presentes a 890 cm^{-1} y 1080 cm^{-1} correspondiente a los enlaces β -glucosídicos de los β -glucanos.

Hernández *et al.*, 2009 caracterizaron un polímero de quitosano proveniente de exoesqueletos de crustáceos provenientes de la industria alimenticia, dentro de la región de 500-4000 cm^{-1} para determinar el grado de desacetilación al observar bandas bien definidas alrededor de los 3434 cm^{-1} correspondientes a los grupos OH y a los 3254 cm^{-1} correspondientes a los grupos N-H, resultando en un 64% de desacetilación y un 51.94% de rendimiento de quitosano con respecto al peso inicial de las muestras.

2.7.5. Actividad Antimicrobiana

No *et al.*, 2002 probaron la actividad antibacteriana del quitosano con diferentes pesos moleculares de quitosanos y (28, 224, 470, 746, 1106 y 1671 kDa) y de oligómeros de quitosano (1, 2, 4, 7, 10 y 22 kDa) contra distintas bacterias gram positivas y gram negativas, observando que los oligómeros de quitosano inhibieron ambos tipos de bacteria, siendo los quitosanos de alto peso molecular los que presentaron un efecto mayor en bacterias gram negativas, reportando una concentración mínima inhibitoria de 0.1% de quitina, mientras que para los oligómeros de quitosano fue de 0.05 a > 0.1%.

Trejo, 2011 extrajo un polisacárido a partir de dos cepas del hongo del género *Pleurotus*, así como, otro polisacárido a partir una cepa híbrida del género *Pleurotus*, y evaluó el efecto inhibitorio de estos polisacáridos en bacterias gram positivas y gram negativas mediante la prueba de los halos de inhibición realizada en cajas petri con 25 sensidiscos y medio Müller-Hinton, siendo el polisacárido obtenido a partir de la cepa híbrida el que generó un halo de inhibición mayor para algunas de las bacterias evaluadas.

En otros trabajo, se probó que el quitosán obtenido a partir de camarón con un peso molecular de 400,000 g/mol y 75-85% de acetilación presenta actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* (bacteria gram negativa) y *Staphylococcus aureus* (bacteria gram positiva) al ser probado el polímero madre y derivados metilados de éste, la determinación fue realizada por Goycoolea *et al.*, 2016 mediante la técnica de mediciones de turbidimetría y el método de difusión en placa para observar efecto inhibitorio y la zona de inhibición, respectivamente.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización geográfica

La presente investigación se llevó a cabo en diferentes Laboratorios (Laboratorio de Botánica del Departamento de Botánica, Laboratorio de Fisiología del Departamento de Horticultura y el Laboratorio 2 del Departamento de Tecnología de Alimentos) de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) ubicada en la Calzada Antonio Narro # 1923 Col. Buenavista en la ciudad de Saltillo, Coahuila, con coordenadas 25° 21' 17'' de latitud Norte y 101° 01' 58'' de longitud Oeste con respecto al meridiano de Greenwich a una altura de 1781 m s. n. m.

3.2. Obtención de las cepas

Las cepas de *Ustilago maydis* utilizadas en la presente investigación (cepa Rim101 con una mutación en la vía Rim/PacC y la cepa FB2, cepa salvaje o wild-type strain) (**Figura 1**) fueron proporcionadas por la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, las cuales fueron crioconservadas en 2mL glicerol a -80°C hasta el momento de su utilización.

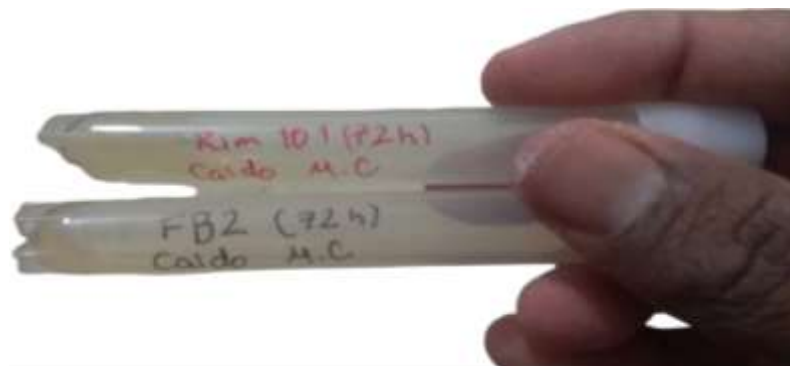


Figura 1. Cepas Rim101 y FB2 de *Ustilago maydis*.

3.3. Preparación de medios de cultivo

Para la preparación del Medio Completo y Medio Mínimo se utilizaron 2 soluciones bases, la solución de “Elementos Traza” (E.T) y la “Solución de Sales” (S.S). La solución de E.T se preparó con 60 mg de H_3BO_3 , 140 mg de $MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$, 400 mg de $ZnCl_2$, 40 mg de $Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$, 100 mg de $FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$ y 400 mg de $CuSO_4 \cdot 5(H_2O)$ disueltos y aforados a 1 L de agua destilada. La S.S se preparó con 16 g de KH_2PO_4 , 4 g de Na_2SO_4 , 8 g de KCl , 2 g de $MgSO_4$, 1 g de $CaCl_2$ y 8 mL de Elementos Traza, aforándolos a 1 L de agua destilada. Estas 2 soluciones fueron la base para la realización de los medios de cultivo que se utilizaron, tanto en medios líquidos como gelificados, obtenidos de Holliday, 1961.

3.3.1. Caldo y Agar de Medio Completo (M.C.)

Para el Caldo de Medio Completo se utilizó 1.5 g de NH_4NO_3 , 62.5 mL de S.S y 25 g de extracto de levadura de peptona y dextrosa (medio YPD) disueltos en 400 mL de agua destilada, ajustando el pH a 7 con NaOH o con HCl, se afora a 500 mL con agua destilada y se esteriliza a $120^\circ C$ por 15 min. En caso de preparar Agar de Medio Completo se gelifica agregando 2% de agar respecto al volumen del medio después de aforar y se esteriliza a $120^\circ C$ por 15min (Holliday, 1961).

3.3.2. Caldo de Medio Mínimo (M.M.)

El Medio Mínimo se preparó a partir de una mezcla en proporciones iguales (50:50) de la Solución A y Solución B. Para la preparación de la Solución A se utilizó 3 g de KNO_3 y 62.5 mL de S.S disueltos en 400 mL con agua destilada, se ajustó a pH a 7 y se aforó a 500 mL con agua destilada. En el caso de la Solución B se preparó con 10 g de glucosa disueltos en 500 mL de agua destilada. Al finalizar la mezcla de las Solución A y Solución B el Medio Mínimo obtenido es esterilizado a $120^\circ C$ por 15 min.

3.4. Obtención del polisacárido

3.4.1. Activación de las Cepas

La activación de las cepas se llevó a cabo mezclando 100 µL de la cepa criopreservada en glicerol en 5 mL del M.C., incubando por 24-48 horas a una temperatura de 28 °C con una agitación constante de 125 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a verificar la esterilidad y el estado levaduriforme del hongo por medio la observación microscópica de un frotis teñido con azul de algodón (**Anexo 1**).

3.4.2. Precultivo

Para el precultivo fúngico se tomaron 200 µL de la cepa activa y se agregaron a 50 mL de M.C en un matraz de 250 mL, posteriormente se incubaron a 28 °C con una agitación constante de 125 rpm durante 24 a 72 horas en un Shaker Eppendorf™ Innova™ 44R M1282-0016. Las células fúngicas se traspasan a tubos plásticos estériles de 50 ml bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar (marca HEPOBIO Modelo BSC-1100IIA2-X), llevándose a cabo todo el proceso por triplicado.

3.4.3. Lavado Celular

Para separar y lavar el contenido celular del medio de precultivo se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante resultante y se agregó 25mL de agua destilada estéril al pellet (pastilla) celular, se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones anteriores, repitiéndose 3 veces el procedimiento de lavado. Se agregó 50mL de agua destilada estéril a la pastilla obtenida al final del tercer lavado y se incubó a 28 °C por 2 horas.

3.4.4. Conteo de Células

Para el conteo celular se procedió a realizar 3 diluciones se utilizó la solución resultante del paso anterior (pellet del tercer lavado en 50mL de agua destilada estéril) como solución celular madre. Para la **primera dilución** se tomaron 100 μL de solución madre y se mezcló con 900 μL de agua destilada estéril (**concentración 1:10**), la **segunda dilución** se preparó a partir de 100 μL de la primera dilución (1:10) y se mezclaron con 900 μL de agua destilada estéril (**concentración 1:100**), continuando este procedimiento secuencialmente para formar la **tercera dilución (concentración 1:1000)**. Dicho procedimiento se realizó para ambas cepas de *U. maydis* evaluadas (cepa Rim101 y cepa FB2).

Para cuantificar la concentración de células fúngicas levaduriformes en cada una de las diluciones se realizó un conteo en cámara de Neubauer colocando 6 μL de la dilución y contando al microscopio mediante el objetivo de 40X el número de células fúngicas en el cuadro central formado por 25 cuadros, tomando solo la cuenta de las células ubicadas en los cuadros de las 4 esquinas y en cuadro central (**Figura 2**).

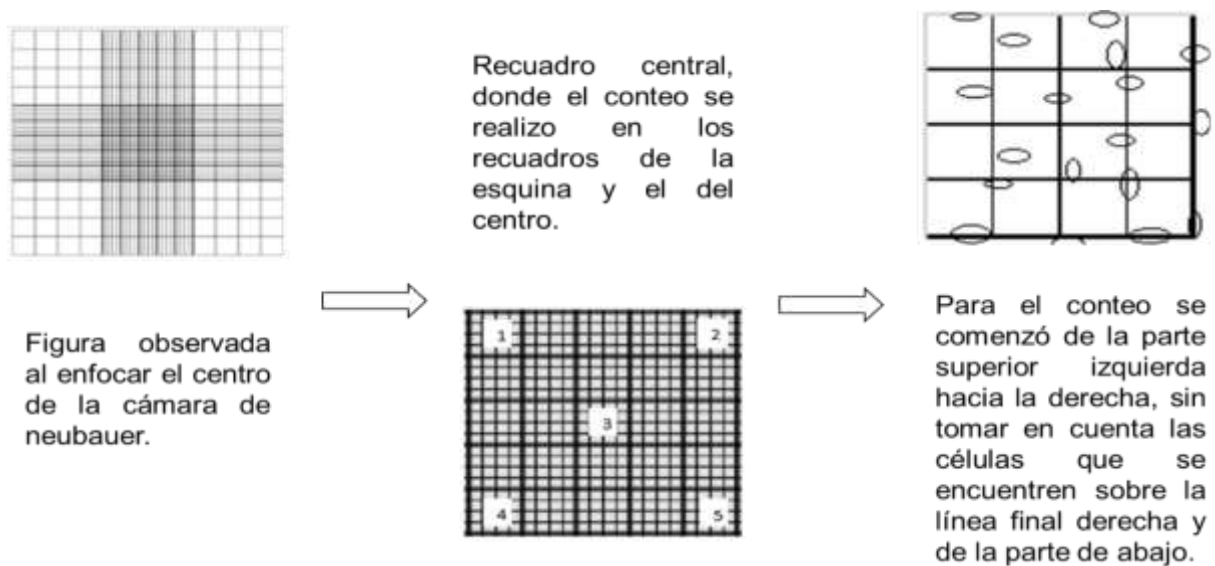


Figura 2. Proceso del conteo celular en cámara de Neubauer.

Para seleccionar la dilución que nos permita obtener un pool de 100,000 células/mL se utilizaron los datos del conteo celular obtenidos en el conteo mediante la Cámara de Neubauer correspondientes a cada dilución (**Anexo 2**) y se calculó el volumen necesario de cada dilución para obtener el pool celular especificado anteriormente mediante la aplicación de la siguiente fórmula despejando las variables mostradas en el **Cuadro 2**:

$$Cél/ml = P.C * \frac{1\ 000\ mm^3}{0.1\ mm^3} * 1\ ml * 100 \rightarrow P.C * 10\ 000 * 1\ ml * 100$$

Cuadro 2. Descripción de la simbología de las variables.

Componente de la formula	Descripción
C/ml	Células por Mililitro
P.C	Promedio de Células
1 000 mm ³	Equivalencia de 1 mL
0.1 mm ³	Volumen de Cada Recuadro
1 ml	Volumen Total de la Dilución
100	Concentración de la Dilución
Fórmula Simplificada	$Cel/ml = P.C * 1\ 000\ 000$

3.4.5. Fermentación

Para iniciar la fermentación se procedió a calcular el volumen necesario para inocular 100 000 células levaduriformes en 50 ml de Medio Mínimo mediante la siguiente fórmula:

$$C1V1 = C2V2 \rightarrow V1 = \frac{C2 * C2}{C1} = \frac{\left(\frac{100,000\ cel}{mL}\right) (50mL)}{\frac{cel}{mL} \text{ en medio completo}} = \frac{5,000,000}{\frac{cel}{mL} \text{ en medio completo}}$$

Donde:

C1: Células lavadas por mililitro

V1: Volumen necesario

C2: 100 000 células/ml

V2: 50 ml de medio mínimo

Fórmula Simplificada:

$$mL \text{ requeridos} = \frac{5\,000\,000}{\frac{\text{células}}{mL} \text{ en medio completo}}$$

El volumen de fermentación es de 50 mL Medio Mínimo al cual se le agrega el volumen de la dilución celular correspondiente que contenga 100,000 células/mL (**Anexo 3**) y se deja incubar (fermentar) durante 72 horas en una incubadora con agitación (Shaker Eppendorf™ Innova™ 44R M1282-0016) a 28 °C con agitación constante de 125 rpm.

3.4.6. Recuperación y Secado del Polisacárido.

Al término de la fermentación el producto resultante se centrifuga a 16,000 rpm por 15 minutos y se separa el líquido sobrenadante (Polisacárido) de la pastilla de sedimentación (Células Fúngicas) para posteriormente almacenar el polisacárido obtenido de cada matraz de fermentación de ambas cepas a -80 °C en frascos estériles previamente etiquetados (**Figura 3**). Una vez congelados los sobrenadantes polisacáridos estos fueron deshidratados en un liofilizador (Marca Labconco) a condiciones de 0.470 mBar y -83 °C hasta completar la eliminación total del contenido de agua en las muestras (aproximadamente de 5 a 8 días) (**Figura 3**). Posteriormente el polisacárido en polvo es almacenado en frascos herméticos estériles dentro de bolsas herméticas con silica gel.

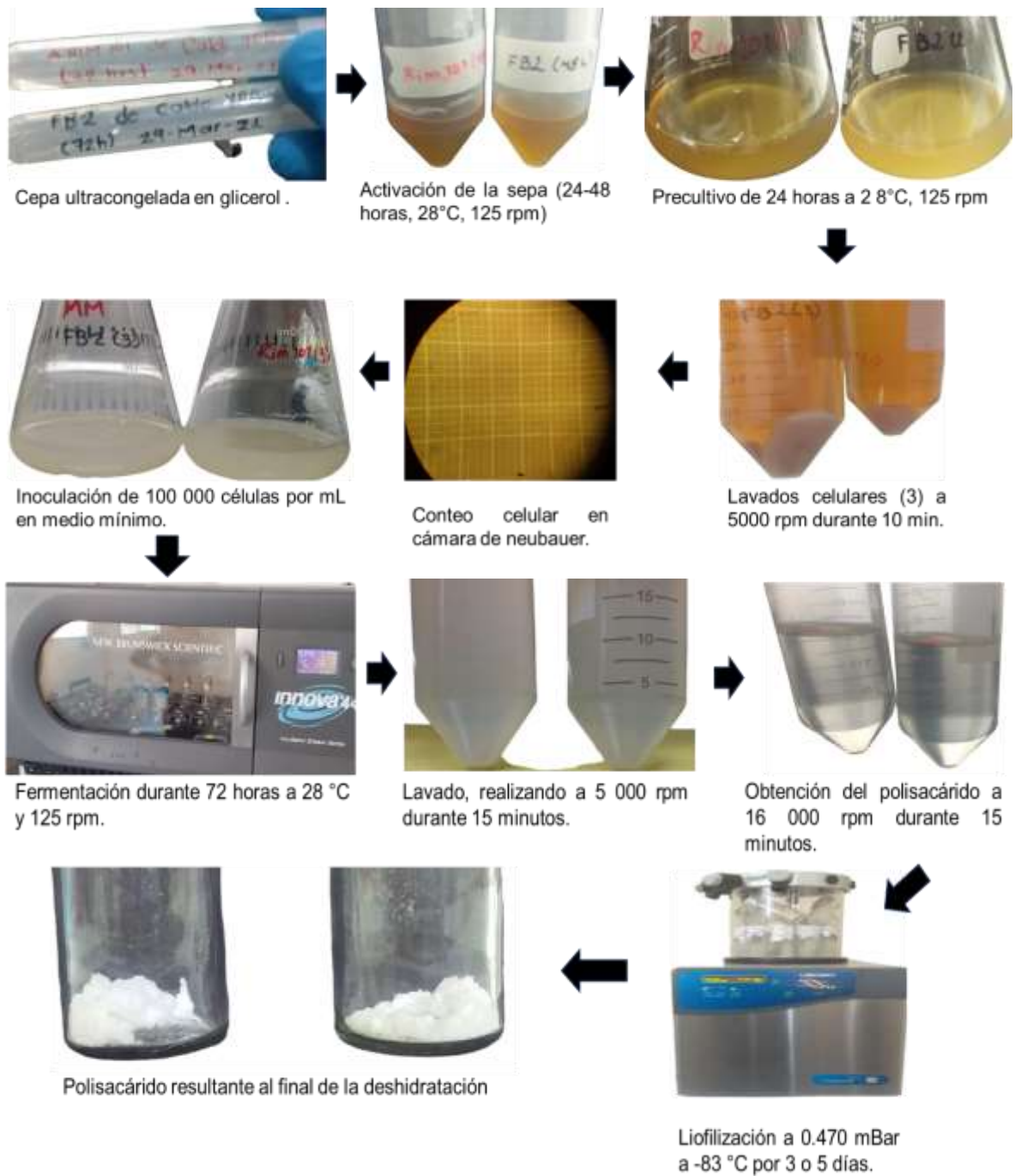


Figura 3. Diagrama del Proceso de Obtención del Polisacárido.

3.5. Cálculo de Rendimiento del Polisacárido

El cálculo del rendimiento se realizó para cada uno de los polisacáridos sintetizados por ambas cepas de *U. maydis* registrando el peso seco del polisacárido obtenido a partir de un volumen conocido de medio de cultivo utilizado para la fermentación. Los cálculos fueron realizados por triplicado y se reportaron en g/L.

3.6. Análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Para analizar los puntos de fusión, cristalización y gelificación se empleó un analizador térmico DSC Discovery Q2500 de TA Instruments y celdas DSC estándar de aluminio para analizar las transiciones térmicas en muestras de exopolisacáridos liofilizadas y en solución que son producidas por las cepas Rim101 y FB2.

3.6.1. Determinación de Punto de Cristalización y Punto de Fusión por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Para determinar el punto de cristalización y fusión en los exopolisacáridos producidos por las cepas Rim101 y FB2 de *Ustilago maydis* se utilizaron 10mg de muestra liofilizada de cada uno de los exopolisacáridos y se sometieron a un análisis térmico mediante un DSC Discovery Q2500 de TA Instruments, con celda DSC estándar, bajo las siguientes condiciones experimentales (**Cuadro 3**).

Cuadro 3. Parámetros de Corrida para el Análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) en muestras deshidratadas. **Cal:** Calentamiento, **Enf:** Enfriamiento

Parámetro	Valor
Porta muestra	Aluminio
Velocidad de Cal/Enf/Cal	10°C/min
Masa de la muestra	10.00 mg aprox.
Calibración con estándares	Indio-Estaño
Intervalo de temperatura	0-300°C
Atmósfera	N ₂ alta pureza (50ml/min)
Sistema de enfriamiento	Refrigerado

3.6.2. Determinación de Punto de Gelificación por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Para determinar el punto de gelificación en los exopolisacáridos producidos por las cepas RIM101 y FB2 de *Ustilago maydis* se utilizó 6.6mg y 7.1mg, respectivamente de cada exopolisacárido diluidos en 10µL de agua, posteriormente se sometieron a un análisis térmico mediante un DSC Discovery Q2500 de TA Instruments, con celda DSC estándar, bajo las siguientes condiciones experimentales (**Cuadro 4**).

Cuadro 4. Parámetros de Corrida para el Análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) en muestras hidratadas. **Cal:** Calentamiento, **Enf:** Enfriamiento.

Parámetro	Valor
Porta muestra	Aluminio
Velocidad de Cal/Enf/Cal	10°C/min
Masa de la muestra	6.6 mg (RIM101) y 7.1mg (FB2)
Volumen de Disolución	10µL de agua
Calibración con estándares	Indio-Estaño
Intervalo de temperatura	0-300°C
Atmosfera	N ₂ alta pureza (50ml/min)
Sistema de enfriamiento	Refrigerado

3.7. Prueba de Gelificación

Para la prueba de gelificación se prepararon soluciones del polisacárido liofilizado a las siguientes concentraciones de 5%, 7%, 10%, 15% y 20% y soluciones de CaCl₂ al 4%, 5%, 6% y 7% en agua destilada. Posteriormente, en placas con agitación constante se colocaron vasos de precipitado con 5 mL de las diferentes soluciones de CaCl₂, las cuales se mantuvieron frías durante todo el proceso mediante su inmersión en hielo. Se gotearon individualmente las soluciones a diferentes concentraciones de cada polisacárido en cada una de las soluciones de CaCl₂. Se verificó visualmente la presencia o ausencia de la formación de un aglomerado viscoso o formación de un gel. Las pruebas fueron realizadas por triplicado.

3.8. Espectrofotometría FT-IR

El análisis de los grupos funcionales presentes en las muestras se realizó mediante espectrofotometría FT-IR, en la cual se utilizaron 5mg de muestra seca en polvo, la cual fue colocada en el portamuestra (microplato) del espectrofotometro FT-IR (Perkin-Elmer Spectrum IR Versión 10.6.2) y analizada bajo las siguientes condiciones: determinación de bandas en el espectro comprendido entre 550cm^{-1} a 4000cm^{-1} con 32 escaneos a una resolución de 4 cm^{-1} contra una referencia de aire.

3.9. Prueba de Actividad Antimicrobiana

3.9.1. Preparación de la cepa de *Escherichia coli*

Se inició con un precultivo de *Escherichia coli*, incubando 100 μL de bacteria en 15 mL de medio LB (Luria-Bertani) por 12 horas, para después tomar una muestra de 100 μL y agregarlo a otro tubo con 20 mL de medio LB estéril, el cual fue incubado y muestreado cada 2 horas para verificar la turbidez relacionada con el crecimiento bacteriano mediante una lectura espectrofotométrica a 600 nm hasta conseguir una absorbancia de 0.5 que es indicativa de una concentración bacteriana de 1.5×10^8 células. Al llegar a la concentración de células bacterianas deseadas se preparó una dilución a 1:200 (24 μL de precultivo de *E. coli* en 4776 μL de medio LB estéril) en un volumen final de 4.8 mL.

3.9.2. Preparación del polisacárido

Se disolvieron 200 mg del polisacárido liofilizado en 2.5 mL de agua destilada estéril para obtener una solución madre concentrada de polisacárido (**dilución a 80 mg/mL**). Posteriormente, se tomaron 200 μL de la solución madre (80 mg/mL) y se diluyeron en 1800 μL de medio LB (**dilución a 8.0 mg/mL**). Finalmente, se tomaron 200 μL de la dilución concentrada a 8 mg/mL y se diluyeron en 1800 μL de medio LB (**dilución a 0.8 mg/mL**). Este procedimiento de diluciones secuenciales nos permitió obtener 3 diluciones a diferentes concentraciones del polisacárido que se

utilizaron como tratamientos en la prueba de actividad antimicrobiana. La prueba se realizó por triplicado para cada polisacárido de las cepas Rim101 y FB2 de *U. maydis*.

3.9.3. Tratamientos y distribución

Para realizar la prueba antimicrobiana se colocaron 100 μ L de cada dilución del polisacárido en diferentes pocillos de una microplaca y se les añadió 100 μ L de la solución de *E. coli* (Dilución a 1:200). Se utilizó como control positivo una mezcla de 100 μ L de la solución de *E. coli* en 100 μ L de medio LB, mientras como control negativo analítico se empleó una solución compuesta por 100 μ L de la dilución del polisacárido en 100 μ L de medio LB, y finalmente, como control negativo absoluto se utilizó una mezcla de 200 μ L de medio LB. Este procedimiento se realizó para las 3 diluciones de los 2 polisacáridos producidos por cada cepa, obteniendo 14 tratamientos totales (**Cuadro 5**) que fueron distribuidos como se muestra en la **Anexo 4**. La prueba se realizó con 6 repeticiones de cada tratamiento evaluado.

Cuadro 5. Descripción de Tratamientos y Nomenclatura.

Polisacárido	Concentración (100 μL)	Tratamiento	Nomenclatura
Rim101	80 mg/mL	100 μ L de <i>E. coli</i>	T1 (R1, R2...R6)
		100 μ L de LB	T2 (R1, R2...R6)
	8 mg/mL	100 μ L de <i>E. coli</i>	T3 (R1, R2...R6)
		100 μ L de LB	T4 (R1, R2...R6)
	0.8 mg/mL	100 μ L de <i>E. coli</i>	T5 (R1, R2...R6)
		100 μ L de LB	T6 (R1, R2...R6)
FB2	80 mg/mL	100 μ L de <i>E. coli</i>	T7 (R1, R2...R6)
		100 μ L de LB	T8 (R1, R2...R6)
	8 mg/mL	100 μ L de <i>E. coli</i>	T9 (R1, R2...R6)
		100 μ L de LB	T10 (R1, R2...R6)
	0.8 mg/mL	100 μ L de <i>E. coli</i>	T11 (R1, R2...R6)
		100 μ L de LB	T12 (R1, R2...R6)
Control	Negativo Absoluto	200 μ L de LB	T13 (R1, R2...R6)
	Positivo	100 μ L de <i>E. coli</i> + 100 μ L de LB	T14 (R1, R2...R6)

IV. RESULTADOS y DISCUSIÓN

4.1. Fermentación y Rendimiento

Una de las señales de que el hongo *U. maydis* ha sintetizado y secretado el polisacárido al medio se relaciona con la turbidez y viscosidad del medio de cultivo donde se desarrolla, debido a que estos dos parámetros se relacionan con el aumento de células fúngicas y la posterior secreción del polisacárido (Aréchiga y Ruíz, 2005), sin embargo, se observan diferencias en ambos parámetros al analizar los medios al final de la fermentación realizada con las cepas Rim101 y FB2, por lo que se determinó el rendimiento del polisacárido por diferencia de peso inicial (peso del polisacárido húmedo) y peso seco (polisacárido liofilizado) para cada cepa con la finalidad de determinar numéricamente dicho dato.

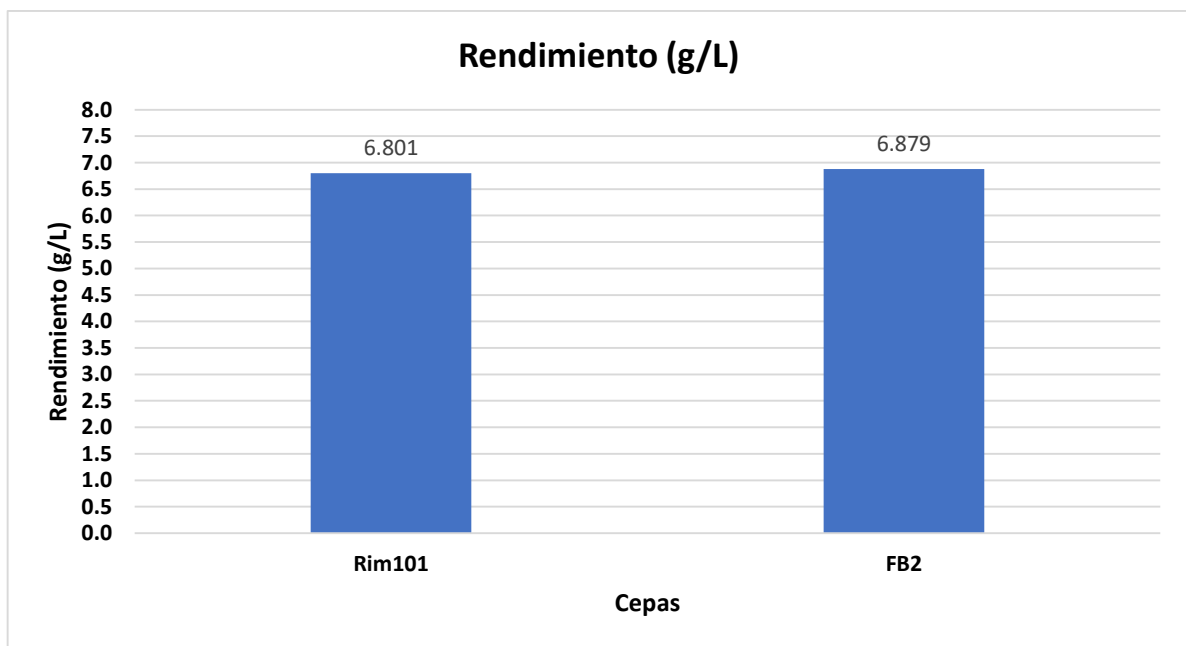


Figura 4. Resultados en g/L obtenidos al final de la fermentación de *Ustilago maydis*.

Los datos de rendimiento mostrados en la **Figura 4** denotan que ambas cepas (Rim101y FB2) tuvieron una producción similar de polisacárido, encontrando para la cepa FB2 una producción de 6.879 g/L y para la cepa Rim101 una producción de 6.801 g/L, con una diferencia de 0.078 g/L entre ambas.

Los valores de rendimiento mostrados para ambas cepas de *U. maydis* son más altos a los reportados por López *et al.*, 2015 para el polisacárido sintetizado por *Ganoderma* sp. producido mediante fermentaciones en Batch bajo una incubación a 30 °C por 10 días a un pH de 4.0 con agitación de 150 rpm, reportando 2.65 g/L como el valor de rendimiento más eficiente obtenido.

Alvarado y Romero, 2013 caracterizaron diferentes variedades de goma Xantana sintetizada por *Xanthomonas campestris*, la cual fue activada en agar con medio de carbonato de calcio de levadura (YCD) incubándola en un rango de temperatura de 28-30 °C por 48 horas, para posteriormente realizar una en medio de carbonato de calcio de levadura (2%) e incubarlo a 28°C por 72 horas con agitación constante de 250 rpm, encontrando al final de la fermentación 8.84 g/L como el mayor rendimiento obteniendo de Xantana.

Por otro lado, Azuaje y Sánchez, 1999 reportaron que de distintas variedades de *Xanthomonas campestris*, la variedad “ocumo” es capaz de producir valores más altos de goma xantana bajo condiciones de incubación a 30 °C y con agitación de 250-1000 rpm, obteniendo rendimientos de hasta de 10 g/L, lo cual probablemente se debe a la diferente capacidad de síntesis del polisacárido entre cada variable de la bacteria.

Autores como Hernández *et al.*, 2009 obtuvieron un rendimiento del 51.94 g/kg (51.94%) de quitosano al ser extraído a partir de exoesqueletos de crustáceos mediante procesos químicos, obteniendo un peso neto de 15.583 g de quitosano a partir de 30g iniciales de muestra compuesta de exoesqueletos de crustáceo, siendo este polisacárido de origen animal uno de los que muestran los más altos rendimientos de obtención.

La goma producida por *U. maydis* tiene un rendimiento promedio de 6.8g/L, el cual está por debajo de los rendimientos de otros polisacáridos de origen bacteriano o animal, pero por arriba de su contraparte de origen fúngica, sin descartar las posibilidades de aumentar la productividad y rendimiento por medio de diferentes modificaciones como lo han hecho con otros polisacáridos, esto lo podemos observar en los resultados y procedimientos para la producción el polisacárido derivado de *Ganoderma* sp. (López *et al.*, 2015), el cual aumenta los rendimientos del polisacárido al prolongar los tiempos de incubación hasta 10 días, por lo que es posible pensar que variación en el tiempo de incubación pudiera modificar los rendimientos de los polisacáridos producidos por las cepas Rim101 y FB2. López *et al.*, 2015 también reporta haber hecho la fermentación con un cambio significativo en el pH, por lo que se pudiera pensar que el cambio estos valores pudiera modificar los resultados obtenidos con las cepas de *U. maydis*.

Por otro lado, los resultados obtenidos en polisacáridos bacterianos como los reportados por Alvarado y Romero, 2013, para la goma xantana nos dan la posibilidad mejorar nuestros resultados de rendimientos al considerar agregar algunos nutrientes al medio durante el proceso de fermentación.



Figura 5. Cálculo del rendimiento mediante la diferencia entre pesos seco y húmedo de los polisacáridos de las cepas (a) Rim101 y (b) FB2.

4.2. Calorimetría Diferencial de Barrido

Al realizar el análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) se pudieron registrar múltiples picos endotérmicos y exotérmicos que se presentaron a lo largo de los dos ciclos de calentamiento y el ciclo de enfriamiento encontrando diferentes puntos de cristalización y fusión en las muestras de exopolisacárido seco y otras temperaturas de gelificación y fusión en las muestras de exopolisacárido hidratado.

4.2.1. Punto de Cristalización y Punto de Fusión por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Se pudo observar en el termograma (**Figura 6**) obtenido para el exopolisacárido secretado por la cepa Rim101, que para el primer calentamiento (línea azul) se presentaron dos picos endotérmicos el primero y más grande a 98.29 °C con inicio a los 51.63 °C con una energía de 86.674 J/g para efectuar el cambio, el segundo a 139.09 °C iniciando a los 134.83 °C con una energía requerida de 6.6854 J/g y solo un pico exotérmico a los 193.89 °C con inicio a los 170.89 °C con 34.956 J/g de energía, posiblemente atribuible a un reordenamiento estructural en las moléculas que conforman la cadena del polisacárido.

Para el ciclo de enfriamiento (línea verde) se presentó un pico exotérmico a los 181.11 °C iniciando a los 194.73 °C con un registro de energía de 1.9630 J/g, mostrando la temperatura de cristalización.

Para el segundo ciclo de calentamiento (línea roja) se registraron dos picos, endotérmicos a los 117.50 °C, con inicio a los 110.19 °C con un registro de energía de 1.3577 J/g y el otro a los 220.71 °C iniciando a los 188.68 °C con 3.6568 J/g.

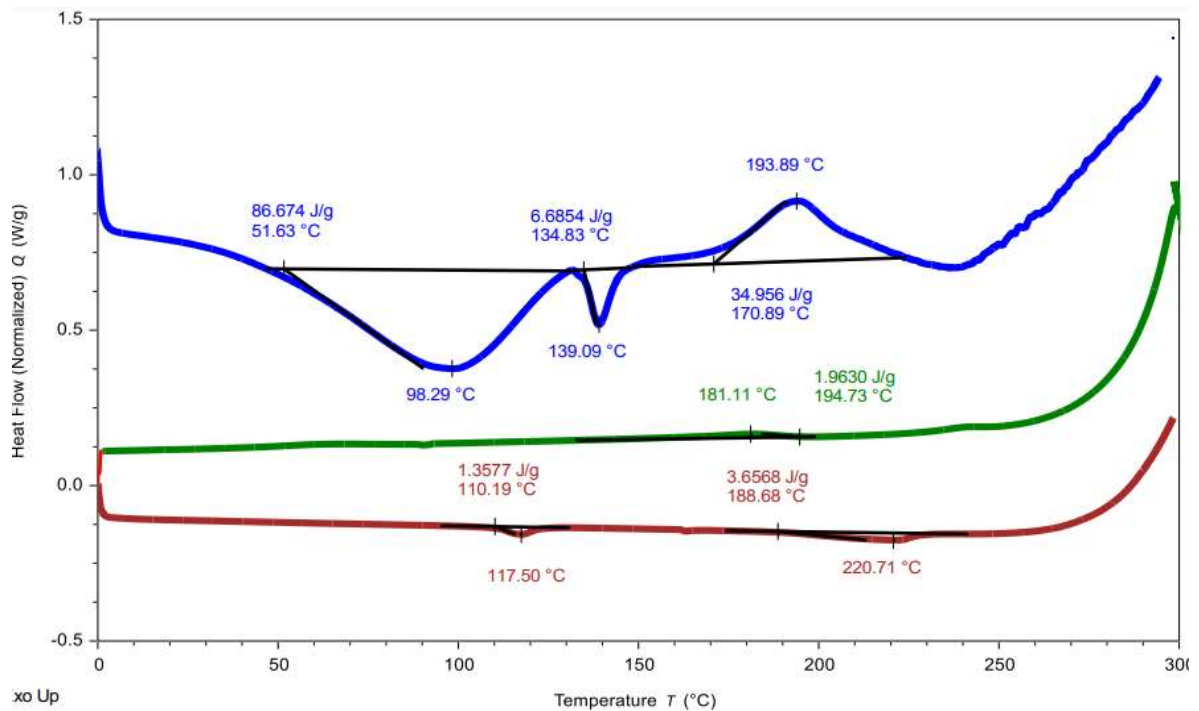


Figura 6. Termograma por DSC del exopolisacárido deshidratado producido por la cepa RIM101 de *Ustilago maydis*.

Para el termograma (**Figura 7**) obtenido del análisis al exopolisacárido secretado por FB2 se observó que durante el primer ciclo de calentamiento (línea azul) se presentaron tres picos endotérmicos, el primero a los 74.21 °C con inicio a los 32.35 °C con una energía de 70.678 J/g, el segundo a los 140.16 °C iniciando a los 135.80 °C con un pico de energía de 11.720 J/g y el tercero a los 175.81 °C con inicio a los 153.38 °C y un pico de energía de 25.458 J/g, atribuyéndose posiblemente a la reestructuración en las moléculas que conforman la cadena del polisacárido,

Para el ciclo de enfriamiento (línea verde) registrando la temperatura de cristalización al presentarse un pico exotérmico a los 185.02 °C con inicio a los 205.821°C con un registro de energía de 4.9606 J/g.

Para el segundo periodo de calentamiento (línea roja) se observan dos picos endotérmicos referentes a la fusión del polisacárido, presentándose el primero a los 109.78 °C iniciando a los 98.40 °C con 3.6523 J/g de energía y el segundo a los 211.75 °C con inicio a los 184.04 °C con 6.5405 J/g de energía.

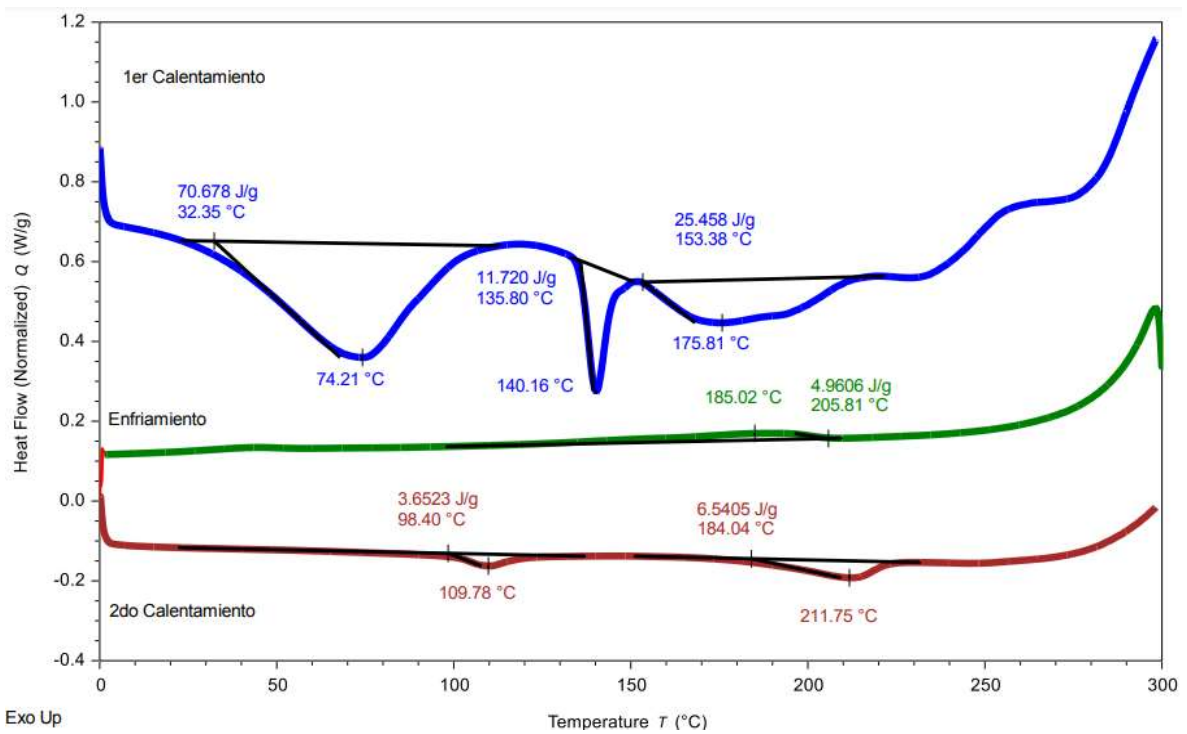


Figura 7. Termograma por DSC del exopolisacárido deshidratado producido por la cepa FB2 de *Ustilago maydis*.

Ambos termogramas muestran picos de fusión similares para Rim101 y FB2, 140.60°C y 139.09°C respectivamente, siendo valores más altos que los reportados por Aguilar *et al.*, 2005 al analizar goma xantana proveniente de dos diferentes fuentes, una producida por la cepa mutante *Xanthomonas campestris* 11S-1 y la otra goma de grado comercial, *Xantano Keltrol* de grado alimenticio, dando picos de fusión de 122.3 y 126.4 °C respectivamente, lo que indica que se requiere mayor temperatura para que el reacomodo estructural de las gomas de *U. maydis* lo guie a su fusión. Por otro lado, solo se presentó un pico exotérmico significativo para Rim101 a los 193.89 °C, más bajo que los picos presentados por las gomas xantana y keltrol de 267.5 °C y 281.0 °C respectivamente, lo que indica que la temperatura de cristalización del polisacárido de la cepa Rim101 se presenta a temperaturas más bajas para el observado para la goma xantana de origen comercial y la producida por la cepa mutante de *X. campestris* 11S-1.

Para otros polisacáridos para el β -glucano obtenido a 3 diferentes temperaturas de extracción acuosa a partir de *Pleurotus ostreatus* (50, 70 y 91 °C) se reportan

termogramas con temperaturas de fusión a temperaturas de 160°C, 145 °C y 133 °C respectivamente (León, 2021), atribuidos a la ruptura de los puentes de hidrogeno y cadenas de carbono, teniendo valores similares a los polisacáridos reportados en el presente trabajo.

Gordon *et al.*, 2018 reportan un pico endotérmico a los 100 °C (pico de fusión), un pico exotérmico alrededor de los 240 °C (pico de cristalización) y una posterior degradación que comienza a los 380 °C de una muestra de alginato extraída a partir de algas pardas del género *Padina*, encontrando que las temperaturas a las se presenta la fusión, cristalización y la degradación en el alginato son mayores a las encontradas para el polisacárido producido por la cepa Rim101 y cepa FB2 de *U. maydis*, lo que denota una mayor estabilidad del alginato frente a los polisacáridos sintetizados por ambas cepas de *U. maydis*.

4.2.2. Punto de Gelificación y Punto de Fusión por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) en Muestra Hidratada

En el termograma (**Figura 8**) obtenido del exopolisacárido hidratado secretado por la cepa Rim101 se observó que durante el primer ciclo de calentamiento (línea azul) se registraron 3 picos endotérmicos, el primero encontrándolo a 55.40 °C con inicio a los 37.07 °C con un registro de energía de 6.0424 J/g, el segundo a 163.59 °C iniciando a los 163.02 °C con energía de 541.05 J/g.

Mientras durante el ciclo de enfriamiento (línea verde) se registró un pico referente al punto de gelificación a 110.70 °C con inicio a los 111.99 °C y 2.2854 J/g.

Finalmente, en el segundo ciclo de calentamiento (línea roja) se registró un pico endotérmico a los 129.30 °C iniciando en los 127.11 °C con un pico de energía de 2.2136 J/g.

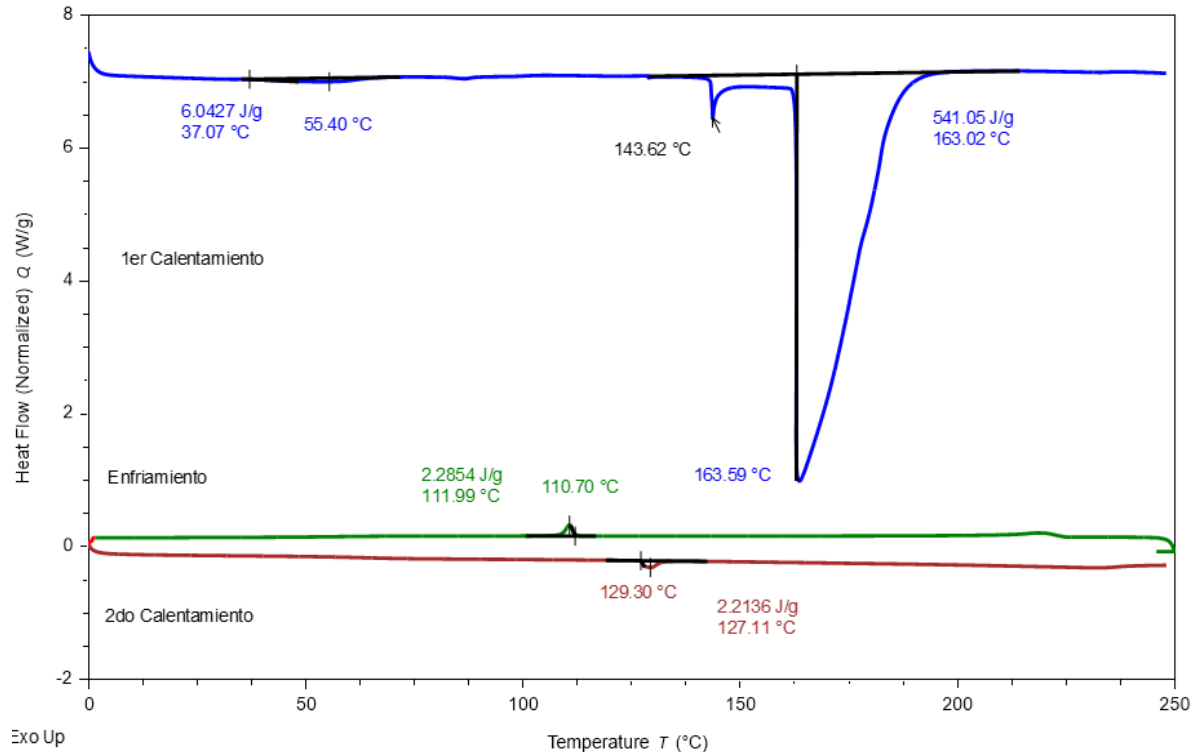


Figura 8. Termograma por DSC del exopolisacárido hidratado producido por la cepa RIM101 de *Ustilago maydis*.

En el termograma (**Figura 9**) obtenido de la muestra del exopolisacárido hidratado producido por la cepa FB2 muestra que durante el primer ciclo de calentamiento (línea azul) se registraron dos picos endotérmicos, a los 127.50 °C y a 136.83 °C iniciando a los 132.91 °C con una energía de 693.18 J/g, mientras que durante el ciclo de enfriamiento (línea verde) y el segundo ciclo de calentamiento (línea roja), no se registraron picos endotérmicos o exotérmicos en la muestra del exopolisacárido hidratado.

De acuerdo a lo anterior, para las muestras hidratadas de los polisacáridos se reporta su punto de fusión a los 163.59 y 136.38°C para Rim101 y FB2 respectivamente, encontrando que el punto de fusión de FB2 es más bajo que el de su homólogo deshidratado (140.16 °C), mientras que el de Rim101 se vio aumentado en comparación a la muestra seca (139.09 °C), presentándose los puntos de fusión en todos los casos (muestras secas e hidratadas) a temperaturas

mayores que los que se muestran en gomas como la xantano que tiene picos de fusión alrededor de 122.5 °C (Aguilar *et al.*, 2005).

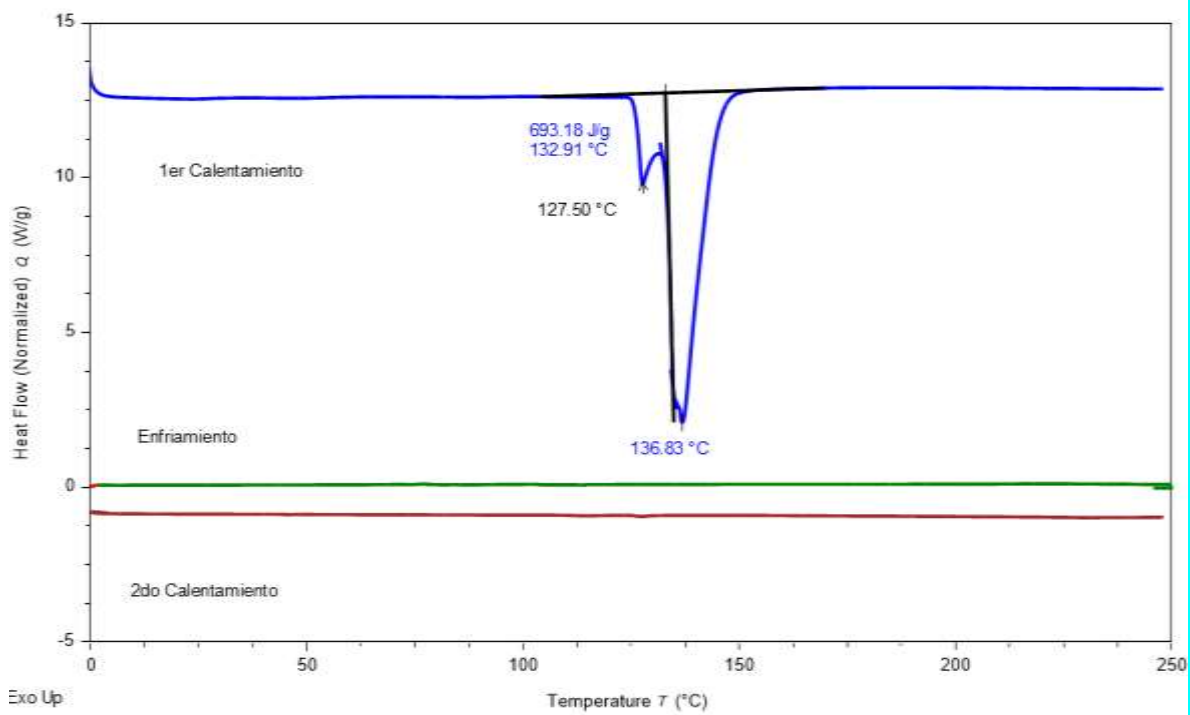


Figura 9. Termograma por DSC del exopolisacárido hidratado producido por la cepa FB2 de *Ustilago maydis*.

Sin embargo, al comparar los termogramas de ambos polisacáridos producidos por las dos cepas de *U. maydis* se observa que los puntos de fusión son similares a las del beta glucano producido por *Pleurotus ostreatus* que aparecen a los 153 °C , 145 °C y 160 °C dependiendo de la temperatura de extracción que se haya utilizado para obtener cada uno de ellos (León, 2021) encontrándose a la par que la temperatura a la cual se degradan las moléculas de las gomas de *U. maydis* es mayor (250 °C), lo que origina que el polisacárido hidratado presente mejor estabilidad a mayores temperaturas que las observadas en las muestras secas de estos mismos.

La estabilidad a temperaturas por encima de los 240 °C tanto en los polisacáridos hidratados como secos permitiría proponerlos para ser utilizados en procesos que requieran altas temperaturas, por encima de otras opciones ya comerciales como lo es la goma xantano debido a que posee propiedades similares que le permitirán ser

empleados como espesante, estabilizante y agente para mantener suspensiones (López y Sabogal, 2018).

Conocer la temperatura a la cual ocurre la transición o punto de fusión de los polisacáridos nos permite establecer la temperatura de almacenamiento de estos polímeros o de los productos que lo contengan como ingrediente activo sin que este sufra cambios físicos o estructurales, así como, la temperatura a la que ocurre la cristalización nos permite conocer la temperaturas a las cuales se puede observar la formación de cristales al someterse a diferentes cambios de temperatura durante el almacenamiento o transporte del polisacárido o productos derivados de este. Finalmente, la temperatura de degradación nos permite conocer la temperatura máxima a la cual se puede someter el polímero sin presentar desnaturalización estructural, y por consecuente pérdida de las propiedades o características fisicoquímicas o de actividad biológica de la molécula, así como, la temperatura a la cual puede ser sometido el producto en procesos de calentamiento o esterilización al utilizarse en productos alimenticios, farmacológicos, u otros.

4.3. Gelificación Iónica

En la prueba de gelificación iónica en frío se tomó como resultado positivo para la presencia de gelificación la formación de pequeños agregados del polisacárido en solución que al hidratarse y en presencia de iones de calcio formaron un conglomerado en soluciones a las concentraciones de Rim101 (**Figura 10**), observándose una relación directamente proporcional entre el aumento de la concentración de polisacárido y la formación de agregados más grandes y estables formados al entrar en contacto con la solución fría de CaCl_2 (**Anexo 5**).

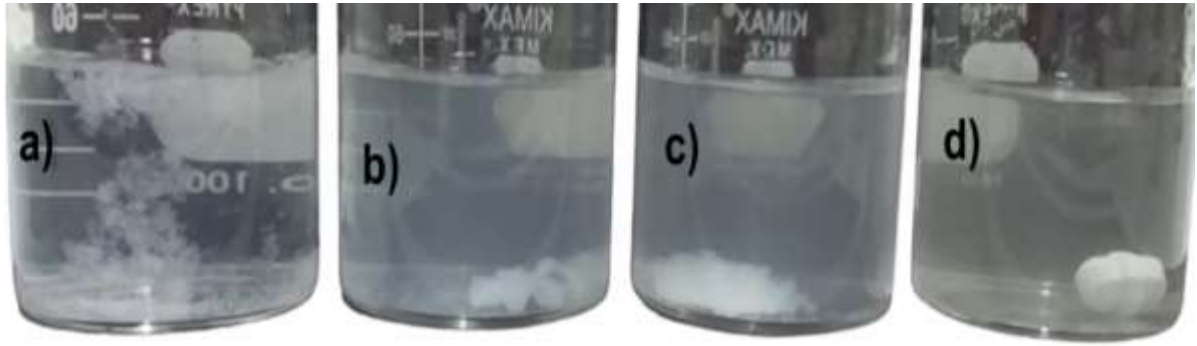


Figura 10. Prueba de gelificación iónica del polisacárido de la cepa Rim101 a una concentración del 7% (a y b) y 5% (c y d) en solución de CaCl₂ al 4%.

En el caso del polisacárido sintetizado por la cepa FB2 se observó que se requiere concentraciones más altas del polisacárido, así como, de una solución más concentrada de CaCl₂ (concentración más alta de iones de calcio) para lograr obtener unos pequeños agregados (**Figura 11**), observando en algunos casos solo cambios en la viscosidad de la solución del polisacárido al entrar en contacto con la solución de CaCl₂, lo cual indica que aunque se obtienen rendimientos parecidos de los polisacáridos al finalizar la fermentación, entre dichos polímeros se presentan diferencias en sus propiedades.

En el **Cuadro 6** se muestra que las soluciones a diferentes concentraciones del polisacárido obtenido a partir de la fermentación realizada con la cepa Rim101 de *U. maydis* presenta formación de agregados gelificantes a todas las concentraciones evaluadas del polisacárido (5%, 7%, 10%, 15% y 20%) en contacto con CaCl₂ a diferentes concentraciones de la sal (4%, 5%, 6% y 7%).

Caso contrario se muestra para las soluciones del polisacárido sintetizado por la cepa FB2 en los cuales solo se observó la formación de agregados gelificantes a partir del contacto con iones calcio presentes en soluciones de CaCl₂ más concentradas (6% y 7%).

Cuadro 6. Resultados obtenidos de la prueba de gelificación.

Cepa	% de polisacárido	% de CaCl ₂			
		4%	5%	6%	7%
Rim101	5%	Si	Si	Si	Si
	7%	Si	Si	Si	Si
	10%	Si	Si	Si	Si
	15%	Si	Si	Si	Si
	20%	Si	Si	Si	Si
FB2	5%	No	No	Si	Si
	7%	No	No	Si	Si
	10%	No	No	Si	Si
	15%	No	No	Si	Si
	20%	No	No	Si	Si

Se realizaron 3 réplicas de cada tratamiento.

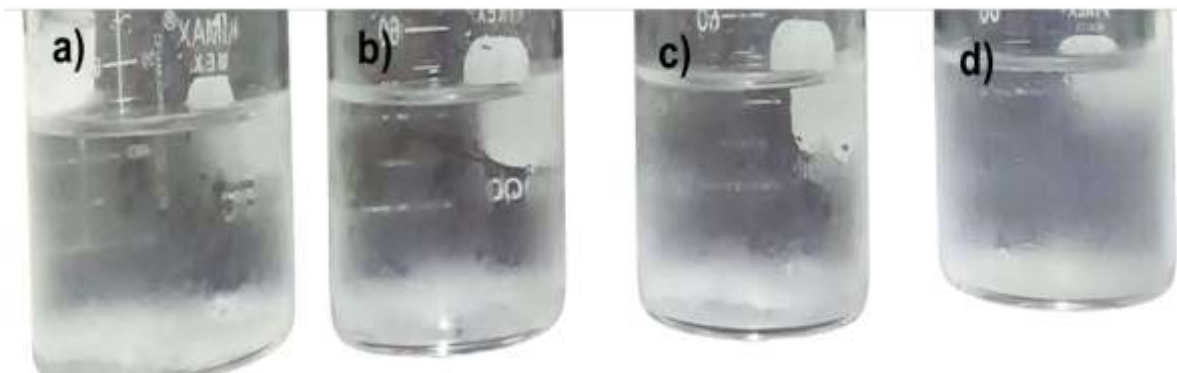


Figura 11. Prueba de gelificación iónica del polisacárido de la cepa FB2 a una concentración del 7% (a y b) y 5 % (c y d) en solución de CaCl₂ al 4%

Brummer *et al.*, 2014 reportan la obtención de β -Glucanos de diferente peso molecular a partir de la avena, los cuales presentan propiedades gelficantes al ser analizados por la técnica de reometría de tensión controlada. En su investigación observaron que las mezclas de los β -Glucanos de alto y bajo peso molecular a diferentes proporciones (0:100, 25:75, 50:50, 75:25, 100:0), al ser diluidos en soluciones al 3, 4 y 5 % de un tampón de fosfato de 20 mM/1 mM NaN₃ (azida de sodio) pH 7.0 y mantenerlos con agitación constante a 90 °C durante 3 horas, se originan geles más duros y elásticos con la mezcla de 50:50 de glucanos de alto peso y bajo peso molecular, respectivamente. Mientras que las mezclas de 100:0

(glucano de alto peso molecular : glucano de bajo peso molecular) no gelificaron, demostrando una fuerte relación entre el peso molecular y la calidad del gel formado, debido a que la disminución de la masa molar y el aumento en la concentración en la mezcla hace que la gelificación se acelere.

Funami *et al.*, 2009, utilizó diferentes muestras de alginato que variaban en su contenido de manuronato y guluronato a la misma concentración de 0.5% (p/v), con una concentración de 15 mM de glucano-d-lactona y diferentes concentraciones de CaCO₃, reportando que las muestras ricas en guluronato eran más elásticas al mezclarse con soluciones a una concentración de 15mM de CaCO₃, mientras las soluciones de alginato ricas en manuronato mostraba ensamblajes moleculares en forma de red que aumentaban la elasticidad al ser mezclados con soluciones a 3.75mM de CaCO₃ pero la calidad de este disminuía, concluyendo que la calidad de los geles de guluronato son mejores a concentraciones altas de Ca²⁺ y bajas de CaCO₃, y que los alginatos ricos en manuronato tienen mejores características gelificantes en concentraciones altas de CaCO₃ y bajas de Ca²⁺.

Reportes para la goma xantana producida por *Xanthomonas campestris* denotan que al ser un polisacárido que posee menos polidispersidad que otros polisacáridos, se hidrata más rápido con agua fría sin formar aglomerados (Nieto *et al.*, 2013), gelificando solo al ser combinada con otras gomas (como la goma garrofín) y después de ser calentada la solución a 40 °C por 18h y posteriormente enfriada a 5 °C (Fujiwara *et al.*, 2000). Lo anterior indica que para que la goma xantana pueda gelificar es necesario mezclar con otros polisacáridos, controlar la proporción de la mezcla de las gomas, así como, la relación de manosa y galactosa que estas tengan, lo cual se verá reflejado en la temperatura de gelificación (Nieto *et al.*, 2015) En base a las características de gelificación encontradas para el polisacárido obtenido de la cepa Rim101 (**Cuadro 6**), se abre la posibilidad de continuar haciendo pruebas para encontrar y controlar los diferentes parámetros que permitan mejorar las propiedades gelificantes del polisacárido, pudiendo ser algunas opciones fraccionar el polisacárido para obtener cadenas de diferentes pesos moleculares, probar algún otro tipo de sal que favorezca la unión de las moléculas que conforman la cadena del polímero, combinarlo con algún otro polisacárido o

incluso probar el polisacárido a diferentes temperaturas de calentamiento y enfriamiento.

4.4. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

Basado en los resultados correspondientes al análisis de FT-IR realizado al polisacárido producido por la cepa Rim101 (**Figura 12**) se observaron 2 picos entre las longitudes 3500 a 2500 cm^{-1} , a los 3295 cm^{-1} y 2927 cm^{-1} con un 86.71% y 88.45% de transmitancia respectivamente, correspondiente a los enlaces C-H (Khan *et al.*, 2018; León, 2021; Murphy *et al.*, 2018). Otra intensidad relevante se registró en el rango de 1200 a 1400 cm^{-1} , en específico a los 1372 cm^{-1} con 71.7% de transmitancia correspondiente a los anillos de glucosa en (Eyigor *et al.*, 2018), el encontrado a los 1574 cm^{-1} con 84.52 % de transmitancia probablemente sea de grupos fenólicos de antioxidantes de los β -glucanos (León, 2021).

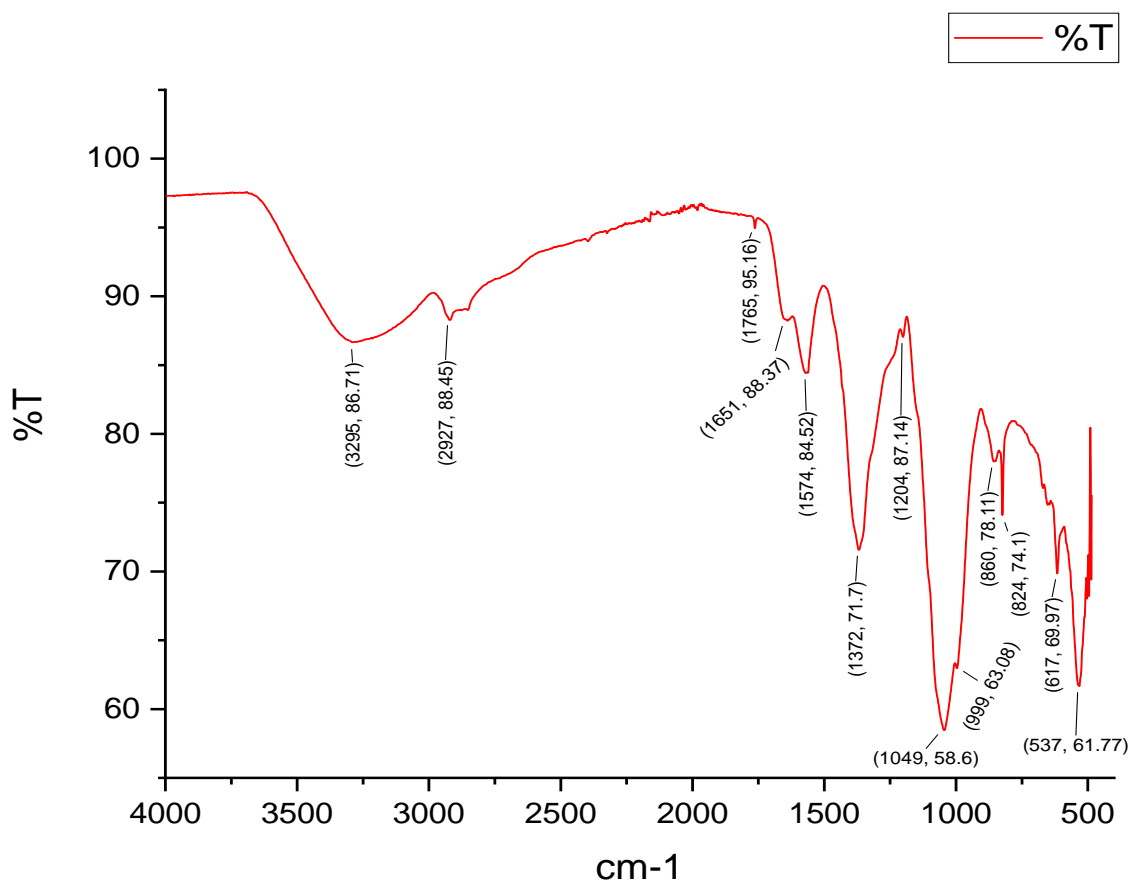


Figura 112. Espectro infrarrojo del exopolisacárido sintetizado por la cepa Rim101.

Los espectros en la región de 1200-800 cm^{-1} proveen información que permite definir características distintivas entre polisacáridos (región huella) como lo reporta Mikkelsen *et al.*, 2010, quien analizó el espectro FT-IR de un polisacárido de avena observando la presencia de enlaces β -glucosídicos a 890 cm^{-1} .

En la región de 850 a 890 cm^{-1} correspondiente a la configuración anomérica β de anillos de D-glucosa ya que los átomos de la cadena macromolecular vibran debido al acoplamiento de tramos CC y CO en este caso encontrando este punto a los 824 cm^{-1} con 74.1 % de transmitancia (Limberger *et al.*, 2014; Mikkelsen *et al.*, 2010), el punto de transmitancia más bajo (58.6%) se registró a los 1049 cm^{-1} dentro del rango de 1150 a 1000 cm^{-1} que corresponde a las diferencia en forma física del β -glucano, dato que coincide con lo registrado por otros autores, como León, 2021, quien lo registró a 1025 cm^{-1} para un β -glucano extraído de *Pleurotus ostreatus*, y a 1015 cm^{-1} una banda registrada en el espectrograma del β -glucano extraído de *Lentinus edodes* (Murphy *et al.*, 2020), mientras Eyigor *et al.*, 2018 reportaron la misma banda en varias muestras de un polisacárido producido por una levadura en un rango de 1000 a 1150 cm^{-1} , encontrando que estos se deben a los enlaces C-O-C correspondiente a los anillos de glucosa y enlaces β en cadenas glucosídicas.

En la región de 950 a 750 cm^{-1} se encuentran huellas correspondientes a enlaces anoméricos de β -glucanos (Diaz *et al.*, 2022) encontrándolo en este caso a los 824 cm^{-1} con 74.1% de transmitancia.

El espectro del polisacárido producida por la cepa FB2 (**Figura 13**) muestran la presencia de bandas a las mismas longitudes de transmitancia que en el espectro observado para el polisacárido producido por la cepa RIM101 (**Figura 12**), siendo la principal diferencia la que se presenta en los porcentajes de transmitancia que son más bajos en el espectro del polisacárido de la cepa Rim101 (alrededor de 0.2%).

Se deduce que los exopolisacárido obtenidos a partir de las cepas de *U. maydis* (Rim101 y FB2) son β -D-glucanos al observar principalmente 3 puntos de transmitancia más característicos, el más alto alrededor de los 824 cm^{-1} de los enlaces β en cadenas glucosídicas presente en ambos polisacáridos, el segundo

esta a los 1372 cm^{-1} y 1375 cm^{-1} (para Rim101 y FB2, respectivamente) que pertenece a los anillos de glucosa y el tercero en los 1574 cm^{-1} y 1570 cm^{-1} (para Rim101 y FB2, respectivamente) correspondiente a los grupos fenólicos de los antioxidantes de los β -glucanos.

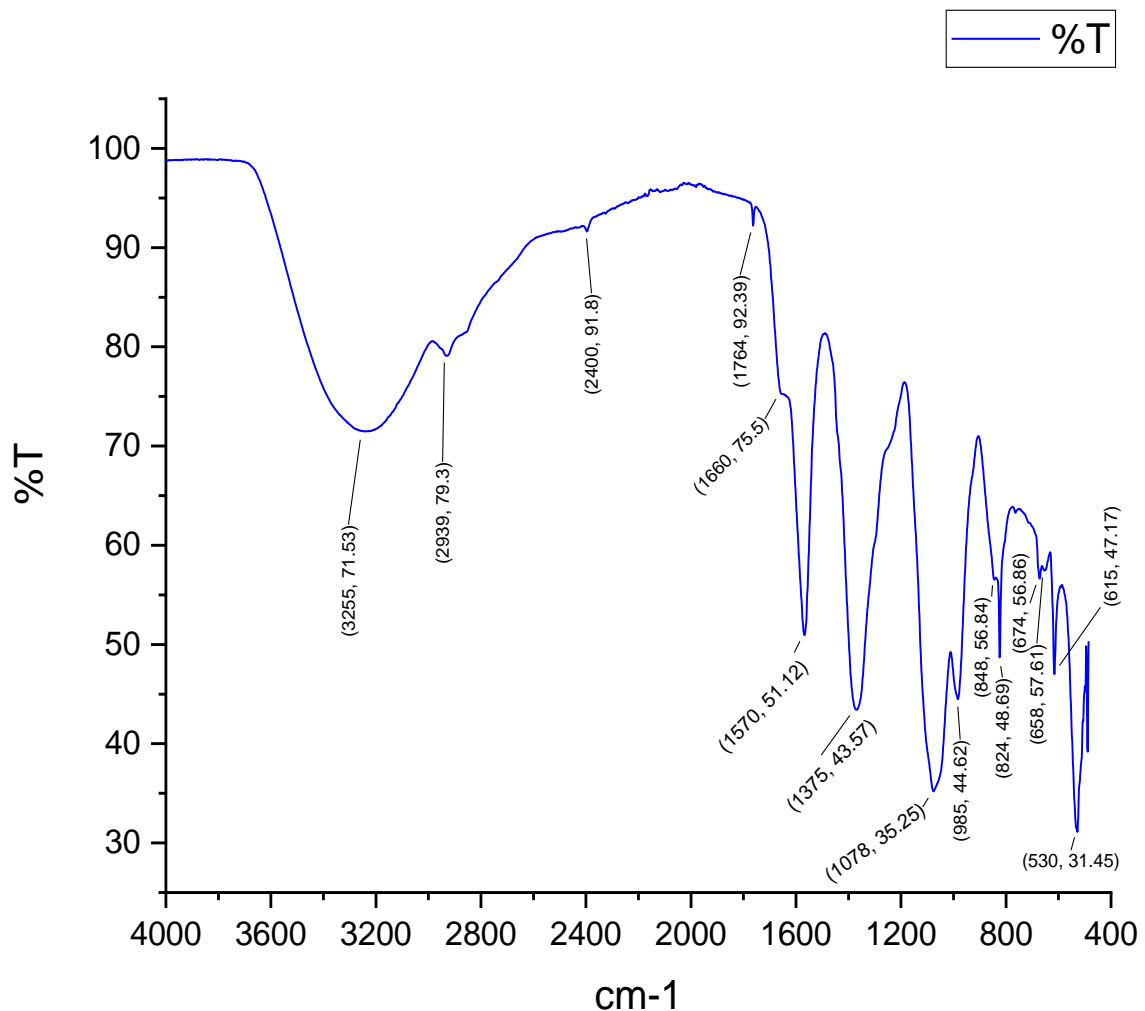


Figura 12. Espectro infrarrojo del exopolisacárido sintetizado por la cepa FB2.

De acuerdo con lo anterior se deduce que los polisacáridos sintetizados por ambas cepas de *U. maydis* pertenecen a los polímeros del tipo β -glucanos, lo que permite pensar que presenten una posible actividad biológica ya observada en otras

moléculas de este tipo obtenidas de diferentes fuentes, las cuales presentan múltiples usos en distintas industrias y campos de investigación.

Dentro de los reportes referentes a las actividades biológicas de este tipo de polisacáridos β -glucanos, Wanke *et al.*, 2020 demostraron que múltiples especies vegetales muestran respuestas inmunitarias al ser expuestas a diferentes tipos de β -D-glucanos, encontrando que algunas especies se adaptan mejor a los β -(1,3)-glucanos de estructura corta y otras adaptándose mejor a los de estructura larga lo que indica que en especies vegetales hay múltiples receptores de β -D-glucanos y estos actúan dependiendo su grado de polimerización, lo cual da pie a proponer a futuro un estudio de la actividad elicitora del polisacárido en una especie vegetal modelo.

Por otro lado, Waldmiiller *et al.*, 1992 demostraron que los β -D-glucanos, en especial los de tipo (1-3) ligados a (1-6) β -ramificado actuaron inhibiendo el crecimiento de *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea* en cultivos *in vitro*. Es por ello, que en el presente trabajo se pensó determinar la actividad antimicrobiana por ser una de las pruebas de actividad biológicas que pudiera presentarse en los polisacáridos β -glucanos.

4.5. Actividad antimicrobiana

Se verificó mediante la observación de la presencia de turbidez en cada una de las muestras con los diferentes tratamientos la existencia de la proliferación de *Escherichia coli*, encontrándose que ninguno de los polisacáridos producidos por las cepas Rim101 y FB2 a las diferentes concentraciones evaluadas logró inhibir el crecimiento de la bacteria (**Figura 14**).

Sin embargo, hay múltiples reportes de literatura que indican que los polisacáridos juegan un papel importante en la síntesis de materiales que inhiben el crecimiento microbiano, como lo reporta Garza, 2019 al utilizar un exopolisacárido producido por *Rhodotorula mucilaginosa* en la síntesis de nanopartículas de Cu(II), Ni(II) y Zn(II), debido su capacidad para la coordinación de iones y en combinación de un agente

reductor y alguna sal precursora, las cuales se probaron contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, demostrándose que las nanopartículas de NiO son capaces de inhibir el crecimiento de la bacteria gram positiva a partir de una concentración de 3 mg/mL, mientras que la bacteria gram negativa fue inhibida a partir de concentraciones de 2 mg/mL, resaltando la ventaja de la producción de compuestos menos contaminantes capaces de inhibir el crecimiento de bacterias resistentes a antibióticos.

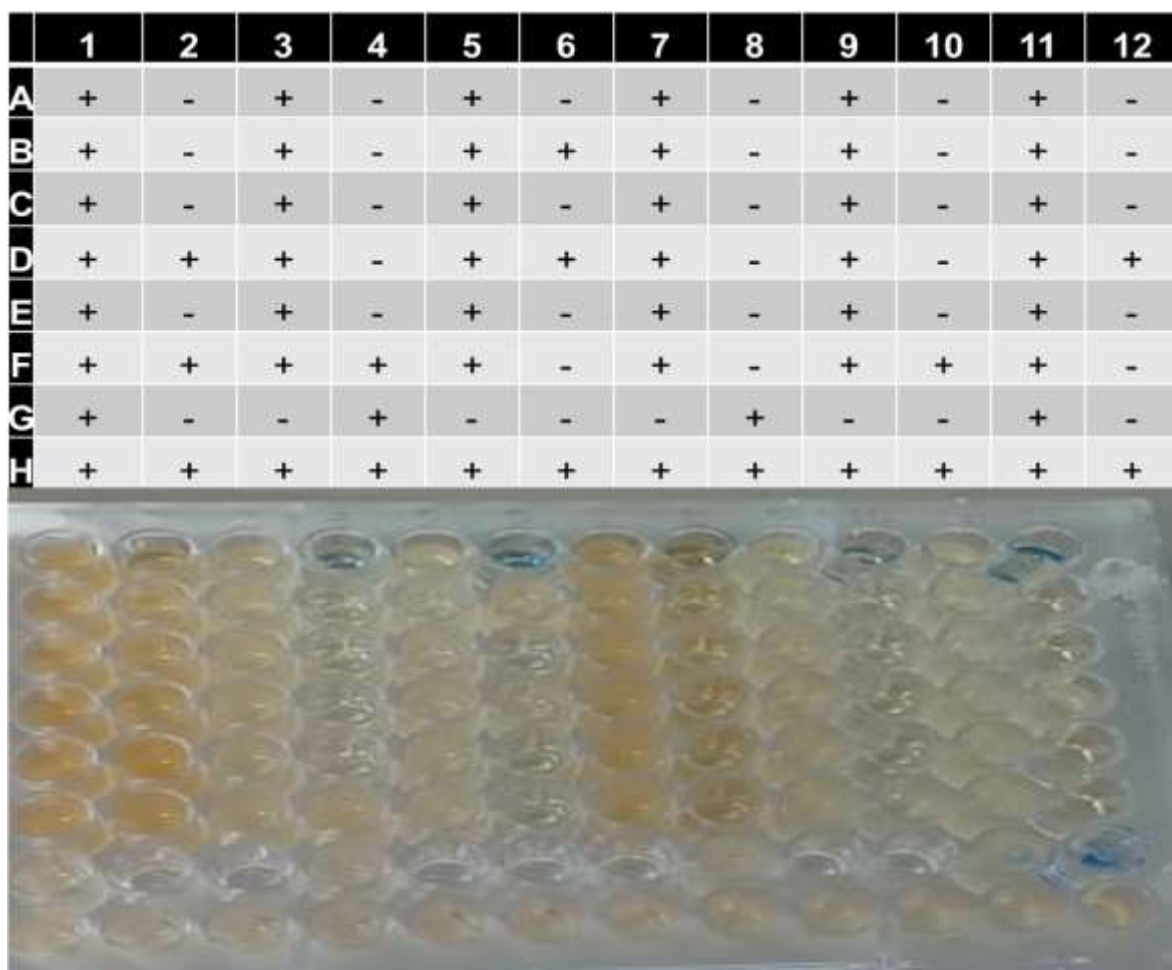


Figura 14. Evaluación del Efecto Antimicrobiano de los polisacáridos sintetizados por *Ustilago maydis* (cepa Rim101 y FB2) por de la Inhibición de Crecimiento de *E.coli* en Placa.

Por otro lado, Valle *et al.*, 2006 reportaron un polisacárido producido en un biofilm de *Escherichia coli* capaz de inhibir el crecimiento de múltiples tipos de bacterias, entre ellas *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas*

aeruginosa durante pruebas in vitro observándose actividad antimicrobiana significativa sobre organismos gram positivos y gram negativos.

No *et al.*, 2002 utilizó quitosanos con diferentes pesos moleculares (1671, 1106, 746, 470, 224 y 28 kDa) y oligómeros de quitosano (22, 10, 7, 4, 2 y 1 kDa) procedentes de cascara de camarón y caparazones de cangrejo los cuales fueron probados para inhibir el crecimiento de bacterias gram positivas (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus bulgaricus*) y gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*) utilizando concentraciones del 0.1% en placas de 1 ml con medio Muller Hinton e incubándolos a 37 °C durante 48 horas, encontrando que en general el quitosano tiene actividad inhibitoria, y que esta depende del peso molecular y el tipo de bacteria, ya que ambos factores afectan directamente en la inhibición del microorganismo, observándose un mayor efecto en bacterias gram negativas (*E. coli* y *P. fluorescens*) con el quitosano de 746 kDa de peso molecular, mientras que otros quitosanos con pesos moleculares de 1106, 224 y 28 kDa tuvieron poca o ninguna actividad inhibitoria. No *et al.*, 2002 reportaron las soluciones a concentraciones de 0.1 % como la concentración mínima inhibitoria del polisacárido.

Por todo lo anterior, aunque en las pruebas realizadas no se mostró actividad antimicrobiana, algunos reportes nos abren las puertas a derivartizar el polisacárido, fraccionarlo o utilizarlo como base para la síntesis de productos con bioactivos con actividad antimicrobiana o considerar probar su actividad contra otra variedad de organismos.

V. CONCLUSIONES

Se logró obtener mediante fermentación en medio mínimo un polisacárido con un rendimiento de 6.801 g/L (p/v) producido por la cepa Rim101 de *Ustilago maydis*, mismo rendimiento que fue obtenido para el polisacárido sintetizado por la cepa FB2, sin embargo, posterior a los análisis fisicoquímicos se observaron diferencias entre ambos polímeros.

La caracterización por calorimetría diferencial de barrido (DSC) muestra las temperaturas de fusión a 98.29 °C y a 139.09 °C y un tercero cambio exotérmico referente a la temperatura de cristalización a 181.11 °C, al haber un segundo calentamiento se presentó un pico endotérmico a 220.71 °C a 193.89 °C teniendo mayor estabilidad térmica. Registrándose en un segundo calentamiento nuevamente dos picos endotérmicos a los 117.50 °C y 220.71 °C.

Conocer la temperatura a la cual ocurre las transiciones moleculares referentes al punto de fusión, cristalización, gelificación y degradación de los polisacáridos nos permite establecer la temperatura de almacenamiento de estos polímeros o de los productos que lo contengan como ingrediente activo sin que este sufra cambios físicos o estructurales o determinar la temperatura máxima a la cual se puede someter el polímero sin presentar desnaturalización estructural, y por consiguiente pérdida de las propiedades o características fisicoquímicas o de actividad biológica de la molécula, así como, la temperatura a la cual puede ser sometido el producto en procesos de calentamiento o esterilización al utilizarse en productos alimenticios, farmacológicos, u otros.

La espectrofotometría FT-IR permitió observar bandas (picos) en regiones que se caracterizan por la presencia de grupos funcionales pertenecientes a los polisacáridos, entre ellos, las bandas observadas para los enlaces β de las cadenas glucosídicas de los polisacáridos, las bandas a longitudes donde hay presencia de anillos de glucosa, y bandas correspondientes a la presencia de grupos fenólicos de los antioxidantes de los β -glucanos, así como, a presencia de picos en la región correspondiente al acoplamiento de grupos CC y CO.

La prueba de gelificación iónica en frío destaca la formación de agregados que van aumentando de tamaño y estabilidad conforme se aumenta la concentración del polisacárido y la presencia de iones calcio, obteniéndose con las concentraciones más altas la formación de pequeñas masas gelificadas.

No se observó inhibición del crecimiento de la bacteria gram negativa *Escherichia coli* a las concentraciones del polisacárido evaluadas.

VI.

PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados obtenidos y a la revisión de literatura se propone en un futuro las siguientes recomendaciones para continuar con el trabajo de investigación:

- Según con lo reportado por autores como Alvarado y Romero, 2013, Fujiwara *et al.*, 2000 y Nieto *et al.*, 2015, es posible evaluar la fermentación modificando el pH y tiempo de incubación con miras de aumentar los rendimientos obtenidos de los polisacáridos.
- Los resultados de la prueba de gelificación nos permiten proponer evaluar concentraciones más altas del polisacárido para repetir la prueba y observar si la calidad del gel formado mejora, o incluso utilizar una mezcla de otros polisacáridos o un catión diferente al calcio para enlazar las cadenas del polímero y conseguir un gel con mejores características.
- Con base en los reportes de No *et al.*, 2002 y con los resultados obtenidos en la prueba antimicrobiana que no presenta inhibición de *E. coli* se propone derivatizar el polisacárido o fraccionarlo en cadenas más pequeñas para verificar el efecto del peso molecular sobre la actividad antimicrobiana, o bien, utilizarlo como base para la síntesis de productos con bioactivos con actividad antimicrobiana o considerar probar su actividad contra otra variedad de organismos.
- De acuerdo con, Wanke *et al.*, 2020 se propone realizar un estudio de la actividad elicitora del polisacárido en una especie vegetal modelo debido a que algunos polisacáridos de origen fúngico presentan este tipo de actividad frente al sistema de defensa de las plantas.

VII.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar, L., Gastón, C., Llopiz, J. y Jérez, A. (2005). Estudio de termoestabilidad de goma xantano por análisis térmico y viscosimetría. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 39(3), 52-57. <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223120688009.pdf>.
2. Ajao, V., Brunung, H., Rijnaarts, H. y Temmink, H. (2018). Natural flocculants from fresh and saline wastewater: Comparative properties and flocculation performances. Chemical Engineering Journal, 349, 622-632. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.05.123>.
3. Albornoz, V. (2022). Actividad anticancerígena y antioxidante in vitro de polisacáridos ácidos obtenidos desde hongos pertenecientes a la familia Hymenochaetaceae asociados a bosque nativo de Chile [Tesis Doctoral, Universidad de Concepción]. Repositorio Bibliotecas UAdeC. <http://repositorio.udec.cl/jspui/handle/11594/9940>.
4. Allen, E., Brown, J., Drake, M. y Daubert, C. (2003). Sensory and mechanical aspects of cheese texture. International Dairy Journal, 13(8), 585-591. DOI: [10.1016/S0958-6946\(03\)00094-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00094-3).
5. Alvarado, C. y Romero, F. (2013). Producción y caracterización de la goma xantana por diferentes cepas de *Xanthomonas campestris* aislados de fuentes naturales en cultivo sumergido. Revista INGENIERÍA UC, 20(1), 34-41. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=70732640005>.
6. Amjres, H., Béjar, V., Quesada, E., Abrini, J. y Llamas, L. (2010). Aplicaciones del exopolisacárido producido por la cepa HK30 de *Halomonas nitroreducens* en la industria farmacéutica. ARS Pharmaceutica, 51(3), 255-266. <http://hdl.handle.net/10481/26428>.
7. Aréchiga, E. y Ruiz, J. (2005). The RIM101/pacC Homologue from the Basidiomycete *Ustilago maydis* Is Functional in Multiple pH-Sensitive

- Phenomena. Eukaryotic cell, 4(6): 999-1008. DOI: [10.1128/EC.4.6.999-1008.2005](https://doi.org/10.1128/EC.4.6.999-1008.2005)
8. Avila, C. (2021). Producción y recuperación de exopolisacáridos de *Neochloris oleoabundans* mediante fermentación extractiva con agentes termosensibles [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León]. Repositorio académico digital. <http://eprints.uanl.mx/23404/>.
 9. Badui, S. (2006). Química de los alimentos. Pearson educación. <https://fcen.uncuyo.edu.ar/upload/libro-badui200626571.pdf>.
 10. Becerra, J., Valdivia, B., Aguilar, C., Martínez, J., Contreras, J. y Cuellar, C. (2011). Quitosán fúngico: fuentes y propiedades. Acta Química Mexicana, 3(5), 24-32. https://www.academia.edu/29051623/Quitosan_fungico_fuentes_y_propiedades.
 11. Brummer, Y., Defelice, C., Wu, Y., Kwong, M., Wood, P. y Tosh, S. (2014). Textural and rheological properties of oat beta-glucan gels with varying molecular weight composition. Journal Agricultural and Food Chemistry, 62, 3160-3167. DOI: [10.1021/jf405131d](https://doi.org/10.1021/jf405131d).
 12. Carmona, S. (2019). Identificación de un aislamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici y respuesta fisiológica en tomate durante la infección frente a dos elicitors fúngicos [Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio institucional. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/69660>
 13. Castañeda, A., González, L., Granados, M. y Chávez, U. (2019). Goma Guar: Un Aliado en la Industria Alimentaria. Padi, 7(14), 107-111. DOI: [10.29057/icbi.v7i14.4988](https://doi.org/10.29057/icbi.v7i14.4988)
 14. Castilla, J. (2019). Producción de exopolisacáridos (ESP) de *Leuconostoc* spp. de tибicos de caña de azúcar en cultivo líquido [tesis de maestría, Colegio de postgraduados]. Colpos Digital. <http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/handle/10521/4428>.
 15. Cervantes, J., Silva, G., Pliego, R., Guevara, L. y Ruiz, J. (2020). The UMAG_00031 gene from *Ustilago maydis* encodes a putative membrane

- protein involved in pH control and morphogenesis. Archives of Microbiology, 202, 2221–2232. DOI: [10.1007/s00203-020-01936-6](https://doi.org/10.1007/s00203-020-01936-6).
16. Chang, R. (2002). Bioactive Polysaccharides from Traditional Chinese Medicine Herbs as Anticancer Adjuvants. The Journal of Alternative and Complementary Medicine, 8(5), 559-565. DOI: [10.1089/107555302320825066](https://doi.org/10.1089/107555302320825066).
 17. Colachagua, D., Florentino, W. (2014). Obtención de dextrano a diferentes concentraciones de residuos de la guanábana (*Annona muricata*) [Tesis de Licenciatura, Universidad nacional del centro del Perú]. <https://repositorio.uncp.edu.pe/handle/20.500.12894/1940>
 18. Coqueiro, D. y Di Piero, R. (2011). Atividade de quitosanas com diferentes pesos moleculares sobre *Alternaria solani*. Comunicação Científica, Arq. Inst. Biol. 78 (3), 459-463. DOI: [10.1590/1808-1657v78p4592011](https://doi.org/10.1590/1808-1657v78p4592011).
 19. De la Cruz, M. y Quezada, M. (2020). Bioprospección de bacterias ácido lácticas productoras de biofloculante aisladas de jugo de caña residual. UCV-Scientia, 12(2), 121-135. DOI: [10.18050/ucvs.v.12i2.2606](https://doi.org/10.18050/ucvs.v.12i2.2606).
 20. De Souza, N., Bartz, J., da Rosa, E., Diaz, P., Vieira, W., Hörnke, G. Guerra, A. (2015). Functional, thermal and rheological properties of oat β -glucan modified by acetylation. Food Chemistry, 178,243-250. DOI: [10.1016/j.foodchem.2015.01.079](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.079).
 21. Decheco, A. (2015). Aplicación de una enzima alfa Amilasa fungal a la harina integral de Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) para la elaboración de una bebida natural energética y vitamínica [Universidad le cordon blue]. Repositorio ULCB. <https://repositorio.ulcb.edu.pe/handle/ULCB/27>.
 22. Del Campo, V. (2016). Actividad antiviral de polisacáridos extraídos de plantas [Trabajo Final de Grado, Universidad complutense]. E-prints Complutense. <https://eprints.ucm.es/49225/>.
 23. Eygor, A., Bahadori, F., Yenigun, V. y Eroglu, M. (2018). Beta-Glucan based temperature responsive hydrogels for 5-ASA delivery. Carbohydrate Polymers, 1-37. DOI: [10.1016/j.carbpol.2018.08.053](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.053).

24. Fernández, N. (2021). Evaluación de la actividad antioxidante de polisacáridos y extracto total provenientes de cultivos in vitro de *Ganoderma australe* [Tesis de Licenciatura, Universidad de Concepción]. Repositorio Dspace. <http://repositorio.udec.cl/xmlui/handle/11594/9285>.
25. Fierro, J. (2014). Extracción, caracterización y gelificación de arabinoxilanos de residuos de la producción de bioetanol de maíz: Efecto del tiempo de extracción en las características reológicas y microestructurales de los geles [Tesis de Licenciatura, Universidad de Sonora]. Repositorio UNISON. <http://www.repositorioinstitucional.uson.mx/handle/20.500.12984/970>.
26. Figueroa, F., Abdala, R., Pérez, C., Casas, V., Nesic, A., Tapia, C., Duran, C., Valdez, O., Parra, C., Bravo, G., Soto, L., Becerra, J., y Cabrera, G. (2022). Sulfated Polysaccharide Extracted from the Green Algae *Codium bernabei*: Physicochemical Characterization and Antioxidant, Anticoagulant and Antitumor Activity. *Marine Drug*, 20(7), 1-18. DOI: <https://doi.org/10.3390/md20070458>
27. Fonseca, C., León, C. y Ruiz, J. (2012). The regulation of different metabolic pathways through the Pal/Rim pathway in *Ustilago maydis*. *FEMS Yeast Research*, 12(5), 1-10. DOI: [10.1111/j.1567-1364.2012.00805.x](https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2012.00805.x)
28. Franco, E., Ruiz, J. y Aréchiga, E. (2014). Transcriptomic analysis of the role of Rim101/PacC in the adaptation of *Ustilago maydis* to an alkaline environment. *Microbiology*, 160(9), 1985-1998. DOI: [10.1099/mic.0.076216-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.076216-0).
29. García, M., Quintero, R, y López, A. (2004). *Biología alimentaria*. Limusa, 653.
30. Garza, J. (2019). Uso del exopolisacárido de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L como agente estabilizador en la síntesis de nanopartículas metálicas para la obtención de compuestos híbridos con actividad antimicrobiana y antibiofilm [Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Nuevo León]. Repositorio Académico Digital. <http://eprints.uanl.mx/19201/>.

31. Goycoolea, F., Remuñan, C. y Alonso, M. (2009). Nanopartículas a base de polisacáridos quitosano. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia, 103-131. <https://core.ac.uk/download/pdf/230316129.pdf>.
32. Hernández, H., Águila, E., Flores, O., Viveros, E. y Ramos, E. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y Vacío*, 22(3), 57-60. <https://www.scielo.org.mx/pdf/sv/v22n3/v22n3a12.pdf>
33. Hidalgo, M. (2012). Formación y caracterización de geles formados por caseinato de sodio y polisacáridos: propiedades fisicoquímicas, reológicas y estructurales [Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Rosario]. Red de Repositorios Latinoamericanos. <http://hdl.handle.net/2133/10307>.
34. Höhne, G., Hemminger, W. y Flammersheim, H. (2003). Differential scanning calorimetry. Springer, (2 ed., vol. 10, pp. 298). DOI: [10.1007/978-3-662-06710-9](https://doi.org/10.1007/978-3-662-06710-9).
35. Jacobs, M. (2014). Análisis estructural y bioquímico de la proteína de membrana externa GumB de *Xanthomonas campestris*, y su participación en la síntesis del exopolisacárido xantano [Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires]. Biblioteca Digital FECEN-UVBA. https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/collection/tesis/document/tesis_n5591_Jacobs.
36. Jiménez, M. (2016). Análisis de la diversidad genética de *Ustilago maydis* en la República Mexicana [Tesis Doctoral, Instituto Politécnico Nacional]. Repositorio dspace. <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/24606>.
37. Juárez, M., Ruiloba, S., Chávez, G., Hernández, C. y Villa, L. (2011) Huitlacoche (corn smut), caused by the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*, as a functional food. *Revista Iberoamericana de Micología*, 28(2), 69-73. DOI: [10.1016/j.riam.2011.01.001](https://doi.org/10.1016/j.riam.2011.01.001).
38. Kadokura, K., Sakamoto, Y., Saito, K., Ikegami T., Hirano, T., Hakamata, W., Oku, T. y Nishio, T. (2007). Production of a recombinant chitin oligosaccharide deacetylase from *Vibrio parahaemolyticus* in the culture

- medium of *Escherichia coli* cells. Biotechnology Letters, 29, 1209–1215. DOI: [10.1007/s10529-007-9386-6](https://doi.org/10.1007/s10529-007-9386-6).
39. Karababa, E. y Coşkuner, Y. (2013). Physical properties of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.): an industrial gum yielding crop. Industrial Crops and Products, 42, 440-446. DOI: [10.1016/j.indcrop.2012.05.006](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.006).
40. Khan, S., Khan, S., Khan, L., Farooq, A., Akhtar, K. y Asiri, A. (2018). Fourier transform infrared spectroscopy: fundamentals and application in functional groups and nanomaterials characterization. Sharma, S. (eds) Handbook of Materials Characterization, 317-344. DOI: [10.1007/978-3-319-92955-2_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-92955-2_9).
41. Lamb T.M., Mitchell A.P. (2003). The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes NRG1 and SMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 23:677-686. DOI: [10.1128/MCB.23.2.677-686.2003](https://doi.org/10.1128/MCB.23.2.677-686.2003)
42. Larrosa, V. (2014). Efectos de los hidrocoloides en las características fisicoquímicas y reológicas de pastas libres de gluten aptas para individuos celíacos [Tesis Doctoral, Universidad Nacional de la Plata]. Repositorio Institucional de la UNLP. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/35442>.
43. León, L. (2021). Caracterización fisicoquímica y funcional de β-glucanos extraídos a partir de *Pleurotus ostreatus* [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Chapingo]. Repositorio Chapingo. <https://repositorio.chapingo.edu.mx/items/d470752f-4cff-4d6e-bfe4-006cd287737c>.
44. Limberger, V., de Francisco, A., Chan, A., Oro, T., Ogliari, P. y Barreto, P. (2014). Barley β-glucans extraction and partial characterization. Food Chemistry, 154, 84-89. DOI: [10.1016/j.foodchem.2013.12.104](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.104).
45. Liu, X., Wang, L., Zhang, C., Wang, H., Zhang, X., Li, Y., Yang, Z. y Song, B. (2015). Structure characterization and antitumor activity of a polysaccharide from the alkaline extract of king oyster mushroom. Carbohydrate Polymers, 118, 101-106, DOI: [10.1016/j.carbpol.2014.10.058](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.058).

46. López, D. y Sabogal, O. (2018). Gomas empleadas en la industria de alimentos. *Revista de Investigaciones Carmenta*, 1(1), 43-48. <https://repositorio.sena.edu.co/handle/11404/6763>.
47. López, X., Arboleda, C. y Segura, F. (2015). Producción de polisacáridos a partir de *Ganoderma* sp., aislado en la región andina. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 44-54. DOI: [10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.47060](https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.47060).
48. Mamani, P., Ruiz, R. y Veiga, M. (2011). Pectina: Usos farmacéuticos y aplicaciones terapéuticas. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 1, 82-97. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4098440>.
49. Mármol, Z., Páez, G., Rincón, M., Araujo, K., Aiello, C., Chandler, C., y Gutiérrez, E. (2011). Quitina y quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU*. 1, 53-58. https://www.researchgate.net/publication/235431334_Quitina_y_Quitosano_polimeros_amigables_Una_revision_de_sus_aplicaciones.
50. McKee, T. y McKee, J. (2003). *Bioquímica: la base molecular de la vida*. (3ª ed) McGraw - Hill Interamericana. https://www.academia.edu/22368181/LA_BASE_MOLECULAR_DE_LA_VIDA_Tercera_edici%C3%B3n.
51. Mikkelsen, M., Jespersen, B., Moller, B., Lærke, H., Larsen, F. y Engelsen, S. (2010). Comparative spectroscopic and rheological studies on crude and purified soluble. *Food Research International*, 43(10), 2417-2424. DOI: [10.1016/j.foodres.2010.09.016](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.016).
52. Monar, P., Lagla, G. y López, S. (2019). *Ustilago maydis* como posible bioindicador de cultivos saludables de *Zea mays*. *Boletín Micológico*, 34(2), 73-80. DOI: [10.22370/bolmicol.2019.34.2.1983](https://doi.org/10.22370/bolmicol.2019.34.2.1983).
53. Morales, A., Niño, G., Carvajal, E., Gardea, A., Torres, P., López, Y., Rascón, A. y Lizardi, M. (2013). Los arabinosilanos ferulados de cereales. Una revisión de sus características fisicoquímicas y capacidad gelificante. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 36(4), 439-446. DOI: <https://doi.org/10.35196/rfm.2013.4.439>.

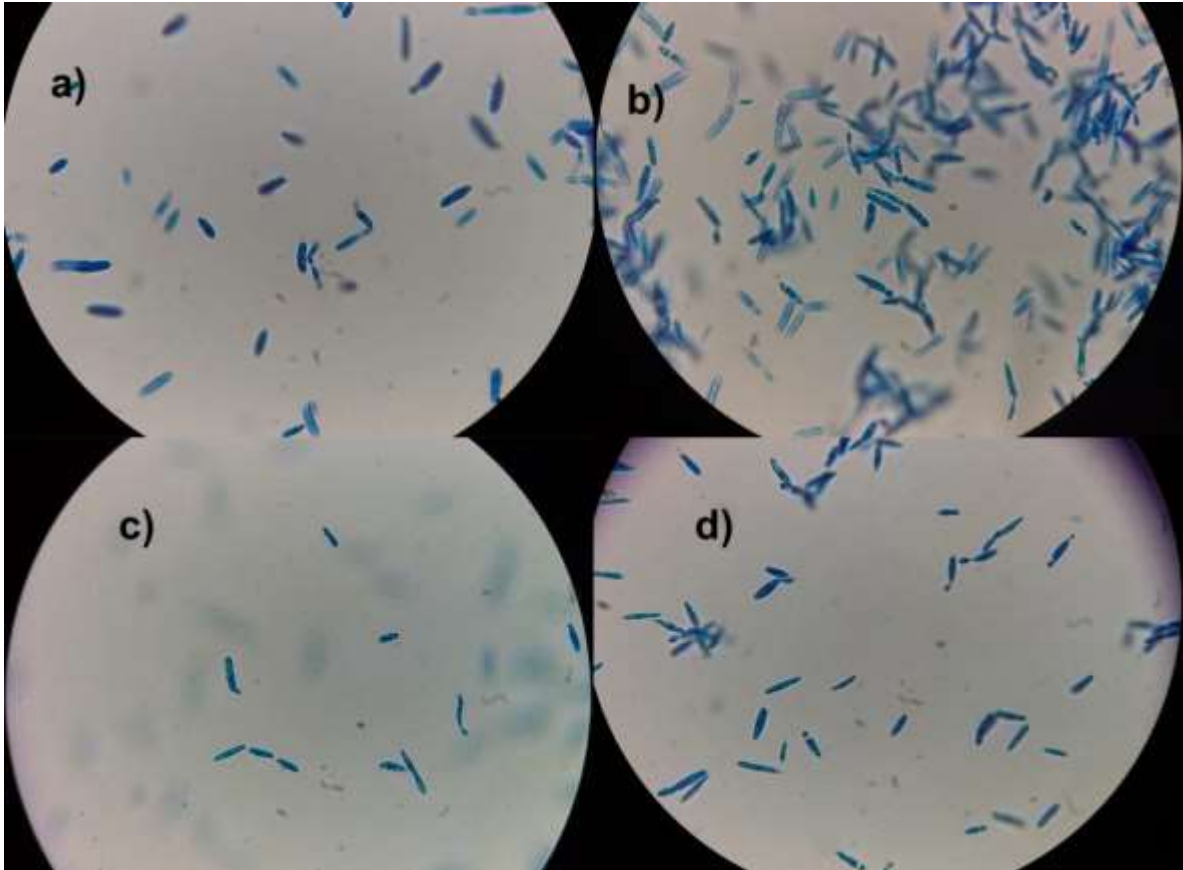
54. Murphy, E., Masterson, C., Rezoagli, E., O'Toole, D., Major, I., Stack, G., Lynch, M., Laffey, J. y Rowan, N. (2020). β -Glucan extracts from the same edible shiitake mushroom *Lentinus edodes* produce differential in-vitro immunomodulatory and pulmonary cytoprotective effects - Implications for coronavirus disease (COVID-19) immunotherapies. *Science of the Total Environment*, 732(), 1-10. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2020.139330](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139330).
55. Nieto, M., Santacruz, I. y Moreno, R. (2014). Consolidación de materiales cerámicos por gelificación de polisacáridos. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 34(1), 2-27.
<http://ve.scielo.org/pdf/rlmm/v34n1/art02.pdf>
56. No, H., Park, N., Lee, S. y Mayers, S. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1), 65-72. DOI: [10.1016/s0168-1605\(01\)00717-6](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00717-6)
57. Ospina, K. (2016). Estudio de la interacción de hidrocoloides empleados en alimentos y su efecto en las propiedades reológicas y de textura sensorial e instrumental [Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio Institucional de la Universidad Nacional de Colombia.
<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/59273>.
58. Parra, H. (2021). Importancia terapéutica y estabilizantes-edulcorantes en la tecnología del yogur, Tunja: Editorial Uptc, 114.
<https://repositorio.uptc.edu.co/bitstream/001/3875/1/2949.pdf>.
59. Pasquel, A. (2001). Gomas: una aproximación a la industria de alimentos, *Revista Amazónica de Investigación*, 1(1), 1-8.
https://www.researchgate.net/publication/268046977_Gomas_Una_aproximacion_a_la_industria_de_alimentos
60. Peso, P., Frontela, C., Gonzáles, C., Ros, Gaspar., Martínez, C. (2012). Polisacáridos de algas como ingredientes funcionales en acuicultura marina: alginato, carragenato y ulvano. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 47(3), 373-381. DOI: [10.4067/S0718-19572012000300001](https://doi.org/10.4067/S0718-19572012000300001).

61. Rodríguez, E., Sandoval, A., Ayala, A. (2003). Hidrocoloides naturales de origen vegetal. Investigaciones recientes y aplicaciones en la industria de alimentos. *Tecnura*, 7(13), 4-13. DOI: [10.14483/22487638.6179](https://doi.org/10.14483/22487638.6179).
62. Salazar, B., (2021). Hidrogel nanocompuesto electroconductor basado en goma gellan como sistema estímulo-respuesta para aplicaciones biomédicas [Tesis de Maestría, Universidad de Sonora]. Repositorio Institucional de la Universidad de Sonora.
<https://investigadores.unison.mx/es/studentTheses/hidrogel-nanocompuesto-electroconductor-basado-en-goma-gellan-com>.
63. Sánchez, L. (2010). Caracterización y aplicación de recubrimientos antimicrobianos a base de polisacáridos y aceites esenciales. [Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia]. Repositorio UPV. DOI: [10.4995/Thesis/10251/9103](https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/9103).
64. Sánchez, L. (2019). Obtención de quitosanas con peso molecular y grado de acetilación controlados [Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Perú]. Repositorio PUCP. <http://hdl.handle.net/20.500.12404/15676>.
65. Siccha, A. y Lock, O. (1992). Hidrocoloides. *Revista de Química*, 6(2), 171-180.
<https://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/download/4578/4616>.
66. Smelcerovic, A., Knezevic, Z. y Petronijevic, Z. (2008). Microbial polysaccharides and their derivatives as current and prospective pharmaceuticals. *Current Pharmaceutical Design*, 14(29), 3168-3195. DOI: [10.2174/138161208786404254](https://doi.org/10.2174/138161208786404254)
67. Stanley, N. (2006). Agars. En Stephen, A., Phillips, G. y Williams, P. (Ed.), *Food Polysaccharides and Their Applications*, (2ª ed, pp. 217-238). Taylor & Francis group. DOI: <https://doi.org/10.1201/9781420015164>.
68. Trejo, E. (2011). Obtención y evaluación biológica de polisacáridos a partir del cultivo líquido de micelio de *Pleurotus* spp [Tesis de Licenciatura, Instituto Politécnico Nacional]. Repositorio Dspace.
<http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/23991>.

69. Valle, J., Da Re, S., Henry, N., Fontaine, T., Balestrino, D., Latour, P. y Ghigo, J. (2006). Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. PNAS, 103(33), 12558-12563. DOI: [10.1073/pnas.0605399103](https://doi.org/10.1073/pnas.0605399103).
70. Villada, H., Acosta, H., Velasco, R. (2007). BIOPOLÍMEROS NATURALES USADOS EN EMPAQUES. Temas Agrarios, 12(2), 5-13, <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5002436>.
71. Waldmiiller, T., Cosio, E., Grisebach, H. y Ebel, J. (1992). Release of highly elicitor-active glucans by germinating zoospores of *Phytophthora megasperma* f. sp. glycinea. Planta, 188(4), 498-505. <https://www.jstor.org/stable/23382321>.
72. Wanke, A., Rovenich, H., Schwanke, F., Velte, S., Becker, S., Hehemann, J., Wawra, S. y Zuccaro, A. (2020). Plant species-specific recognition of long and short b-1,3- linked glucans is mediated by different receptor systems. The Plant Journal, 102(6), 1142-1156. DOI: [10.1111/tpj.14688](https://doi.org/10.1111/tpj.14688).
73. Yoshida, T., Takahashi, M., Hatakeyama, T. y Hatakeyama, H. (1998). Annealing induced gelation of xanthan/water systems. Polyme, 39(5), 1119-1122. DOI: [10.1016/S0032-3861\(97\)00266-8](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(97)00266-8).
74. Zhang, R. y Edgar, K. (2014). Properties, chemistry, and applications of the bioactive polysaccharide curdlan. Biomacromolecules, 15(4), 1079-1096. DOI: [10.1021/bm500038g](https://doi.org/10.1021/bm500038g).

ANEXOS

Anexo 1. Frotis de células de *Ustilago maydis* observadas bajo el objetivo de 100X. Cepa Rim101 a 48 (a) y 72 (b) horas de activación y cepa FB2 a 48 (c) y 72 (d) horas de activación (pág. 18).



Anexo 2. Datos obtenidos en el conteo en Cámara de Neubauer (pág. 20).

Cepa	Repetición	Número de células/ recuadro					Promedio
		1	2	3	4	5	
FB2	1	0	3	1	2	0	1.2
	2	0	4	3	1	3	2.2
	3	2	2	1	2	2	1.8
Rim101	1	1	1	3	4	0	1.8
	2	2	1	1	2	1	1.4
	3	2	3	1	0	2	1.6

Anexo 3. Datos obtenidos del conteo celular para el inoculo inicial de la fermentación (pág. 21).

Cepa	Repetición	Conteo de células		Fermentación
		Promedio de células	Células lavadas por ml	ml requeridos
FB2	1	1.2	1,200,000	4.2
	2	2.2	2,200,000	2.3
	3	1.8	1,800,000	2.8
Rim101	1	1.8	1,800,000	2.8
	2	1.4	1,400,000	3.6
	3	1.6	1,600,000	3.1

Anexo 4. Distribución de tratamientos en microplaca para la evaluación de actividad antimicrobiana de los polisacáridos producidos por las cepas Rim101 y FB2 de *Ustilago maydis* (pág. 26).

	Rim101						FB2					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	T1(R1)	T2(R1)	T3(R1)	T4(R1)	T5(R1)	T6(R1)	T7(R1)	T8(R1)	T9(R1)	T10(R1)	T11(R1)	T12(R1)
B	T1(R2)	T2(R2)	T3(R2)	T4(R2)	T5(R2)	T6(R2)	T7(R2)	T8(R2)	T9(R2)	T10(R2)	T11(R2)	T12(R2)
C	T1(R3)	T2(R3)	T3(R3)	T4(R3)	T5(R3)	T6(R3)	T7(R3)	T8(R3)	T9(R3)	T10(R3)	T11(R3)	T12(R3)
D	T1(R4)	T2(R4)	T3(R4)	T4(R4)	T5(R4)	T6(R4)	T7(R4)	T8(R4)	T9(R4)	T10(R4)	T11(R4)	T12(R4)
E	T1(R5)	T2(R5)	T3(R5)	T4(R5)	T5(R5)	T6(R5)	T7(R5)	T8(R5)	T9(R5)	T10(R5)	T11(R5)	T12(R5)
F	T1(R6)	T2(R6)	T3(R6)	T4(R6)	T5(R6)	T6(R6)	T7(R6)	T8(R6)	T9(R6)	T10(R6)	T11(R6)	T12(R6)
G	T13(R1)	T13(R2)	T13(R3)	T13(R4)	T13(R5)	T13(R6)	T13(R7)	T13(R8)	T13(R9)	T13(R10)	T13(R11)	T13(R12)
H	T14(R1)	T14(R2)	T14(R3)	T14(R4)	T14(R5)	T14(R6)	T14(R7)	T14(R8)	T14(R9)	T14(R10)	T14(R11)	T14(R12)

Testigo

T. Tratamiento, R. repetición

Anexo 5. Formación de aglomerados en la prueba de gelificación de las soluciones de polisacáridos al 20 % (Rim101 (a) y FB2 (b)) en CaCl_2 al 7% (pág. 36).

