



División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**“Utilización de subproductos agroindustriales y de alimentos para la
producción de proteínas y péptidos anfifílicos”**

TESIS

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

I.A. Mary Carmen Martínez Velázquez

Matrícula: 2192802263

DIRECTOR

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Asesores

Dr. Roberto Olayo González

Dr. Humberto Vázquez Torres

Iztapalapa, Ciudad de México, Junio 2021

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”. Agradecimiento al CONACYT por la beca No. 757422 de Maestría otorgada.

Esta tesis se realizó en la Planta Piloto de Procesamiento de Desperdicios Orgánicos (PP10) del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y de la Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación de la Ciudad de México (SECTEI) Proyecto No. SECTEI/196/2019.

Contenido

Índice de Figuras	5
Índice de Tablas	6
Resumen	7
Abstract	9
1. Introducción	11
2. Proteínas anfifílicas: hidrofobinas	12
2.1 Otros microorganismos productores de hidrofobinas	15
2.1.1 Hongos genéticamente modificados para producción de hidrofobinas	16
2.2 Estructura molecular de las hidrofobinas	17
2.3 Funcionalidad	18
3. Enzimas secretadas en conjunto con la producción de hidrofobinas en la descomposición de sustratos poliméricos	21
3.1 Quitinasas	22
3.2 Lipasas	23
3.3 Proteasas	23
4. Péptidos anfifílicos	24
4.1 Microorganismos productores de péptidos	25
4.2 Estructura de los péptidos	26
4.3 Funcionalidad de péptidos	27
4.3.1 Mecanismo de acción de péptidos	28
4.4 Síntesis de péptidos	29
5. Producción y purificación de hidrofobinas y péptidos	30
5.1 Condiciones de cultivo (Temperatura y pH)	31
5.2 Tipo de cultivo (SSF y SmF) y tipo de sustrato	32
5.2.1 Fuentes agroindustriales y productos alimenticios como sustrato para la producción de hidrofobinas y péptidos	34
5.3 Métodos de purificación de péptidos e hidrofobinas	35
6. Aplicaciones	38
6.1 Hidrofobinas	38
6.1.1 Biomateriales	38
6.1.2 Formulaciones farmacéuticas	41
6.1.3 Estabilización de espumas y emulsiones en alimentos	43

6.1.4	“Gushing”	45
6.1.5	Recuperación mejorada de petróleo	46
6.1.6	Biocontrol	48
6.1.7	Productos de cuidado personal	49
6.1.8	Revestimientos de superficies	50
6.2	Péptidos	51
6.2.1	Empaques para la conservación de alimentos	51
6.2.2	Péptidos anticancerígenos	52
	Conclusiones	53
	Perspectivas en biotecnología	54
	Bibliografía	55
	Anexo	68
	Capítulo sometido a Elsevier Ltd <i>Value-Addition in Agri-Food Industry Waste through Enzyme Technology.</i>	68

Índice de Figuras

- Figura 1 Representación de la distribución de residuos de cisteína (negro) en SC3 del basidiomiceto *Schizophyllum commune* y de CU, cerato-ulmin de *Ophiostoma ulmi* (Wessels, 2000) 13
- Figura 2 Comportamiento de las hidrofobinas como agente tensoactivo, reduciendo la tensión superficial logrando el crecimiento de hifas aéreas (Wösten, 2001). 14
- Figura 3 Comparación estructural de acuerdo a las clases de hidrofobina. Estructura DewA de *A. nidulans* a) Se observan las hojas β , rodeada de hélices b) De lado izquierdo se observa la zona sin carga (hidrofóbica) y de lado derecho la zona de carga (hidrofílica) (Morris et al., 2013). Estructura de la HFBII de *T. reesei*, A) se puede observar la estructura de la hoja β central que está formada por dos horquillas β , B) En este modelo se puede observar un parche hidrofóbico (zona verde), el C- terminal y N-terminal se indican en rojo y azul respectivamente (Linder et al., 2005). 17
- Figura 4 Representación del autoensamblaje de hidrofobinas en una superficie A) hidrofóbica que al ser recubierta con la proteína la superficie se vuelve hidrofílica, mientras que en una superficie B) hidrofílica el proceso ocurre inversamente (Wösten & de Vocht, 2000) 19
- Figura 5 Formación de vesículas de hidrofobina I por la técnica de chorro de microfluidos (Hähl et al., 2017) 20
- Figura 6 Representación de las escisiones que realizan las quitinasas dependiendo de su clase en la cadena de quitina (esferas color azul) (Seidl, 2008) 22
- Figura 7 Clases de familias de péptidos de acuerdo a sus estructuras secundarias (Jiang et al., 2021) 27
- Figura 8 Representación esquemática del mecanismo de acción de los péptidos (Zhang et al., 2020) 28
- Figura 9 Esquema de la síntesis de péptidos no ribosomales (Reimer et al., 2018) 30
- Figura 10 Esquema del método de fraccionamiento de espuma para una pre purificación de hidrofobinas (Ketola, 2016) 36
- Figura 11 Clasificación de acuerdo a la pureza de hidrofobinas HFBII (Khalesi et al., 2015) 38
- Figura 12 Inmovilización de un anticuerpo Anti-CD31 en una superficie recubierta con HFBI (Zhang et al., 2011) 40
- Figura 13 Liberación excesiva de espuma, denominado “Gushing”(Khalesi et al., 2015) 45
- Figura 14 Representación de la extracción de petróleo 47

Índice de Tablas

- Tabla 1 Características correspondientes a las clases I y II de hidrofobina 13
- Tabla 2 Péptidos producidos por diferentes microorganismos (Singh & Abraham, 2014) 25
- Tabla 3 Rendimientos (mg L^{-1}) usando distintos tipos de soportes (Kakahi et al., 2019) 33

Resumen

Los microorganismos producen y secretan proteínas y péptidos anfífilos con propiedades tensoactivas con capacidad para ensamblarse en superficies. A los péptidos se les ha atribuido actividad antifúngica y antimicrobiana porque atacan a la membrana celular de bacterias, hongos, plantas, parásitos y células cancerígenas directamente. Las proteínas anfífilas llamadas hidrofobinas pueden ser producidas en su mayoría por hongos filamentosos ascomicetos, basidiomicetos y líquenes, y se han usado cepas recombinantes para aumentar su producción. Las hidrofobinas y los péptidos son pequeñas moléculas de bajo peso molecular, con cantidades de aminoácidos alrededor de 100 y de 10 a 50, respectivamente. La secreción de ambas moléculas está asociada a la formación de hifas aéreas, pues su autoensamblaje reduce la tensión superficial de la interface agua-aire y permite que las hifas puedan romper dicha tensión y, con ello, crecer fuera del agua. Las propiedades de las hidrofobinas provienen de su conformación estructural. En efecto, las hidrofobinas tienen un parche hidrofóbico de residuos alifáticos, además de presentar ocho residuos de cisteína conservados y forman cuatro puentes disulfuro; se clasifican en dos clases I y II considerando sus características hidropáticas y su solubilidad. Ambas clases tienen la capacidad de formar una capa sobre las esporas que proporciona la facilidad de dispersión y protección del hongo frente a factores ambientales, o bien que permite evitar su detección por el sistema inmunológico de los huéspedes. En el caso de las hidrofobinas de clase I, la capa es conformada por el agrupamiento de la proteína en forma de varillas (“rodlets”). Los péptidos están caracterizados por la presencia de aminoácidos polares activos, en su mayoría lisina, arginina e histidina, y en ocasiones las regiones hidrofóbicas pueden unirse a lípidos y las regiones hidrofílicas cargadas positivamente se unen al agua o a otros residuos cargados negativamente; estas características estructurales favorecen su interacción con la membrana celular e inhiben la síntesis de las paredes celulares, pueden interactuar con los componentes de la membrana e interactuar sobre células dianas por algunos mecanismos conocidos comúnmente como “duela de barril”, “poro toroidal”, “alfombra” y “agregado”.

La síntesis de péptidos puede llevarse a cabo de manera ribosomal y no ribosomal, siendo este último el utilizado por hongos y bacterias con la ayuda de una proteasa sintetasa no ribosomal. Durante la producción de hidrofobinas, se pueden encontrar enzimas hidrolíticas que degradan los sustratos poliméricos para la obtención de energía, como las quitinasas,

lipasas y proteasas. Tanto estas enzimas como los péptidos y las hidrofobinas son objeto de gran interés para usarse en diversas industrias. Las hidrofobinas han sido aplicadas en biomateriales, en formulaciones de fármacos hidrofóbicos y formulaciones de cuidado personal, y como agentes tensoactivos para la extracción mejorada de petróleo, y principalmente como agentes emulsionantes y estabilizadores de espumas; mientras que los péptidos han sido utilizados como una nueva alternativa de antibióticos, incluso incorporándose en empaques para la conservación de alimentos y también como alternativas para combatir las células cancerosas. Sus aplicaciones son realmente novedosas. Sin embargo, el proceso de ampliación de la producción de proteínas podría complicarse debido a que las técnicas de transformación para la obtención de estos productos no han logrado abarcar la demanda industrial.

Por otro lado, las industrias que se dedican a la transformación de productos llegan a tener grandes cantidades de desechos o residuos, como cáscaras de frutas y verduras, aceites, maíz, desperdicios de crustáceos, entre muchos otros; los cuales son buenas fuentes de sustrato para ser usados en procesos de fermentación en estado sólido y líquido, lo que llevará a la reducción de los costos de procesamiento y la contaminación ambiental provocada por la gran cantidad de residuos agroindustriales y de alimentos, y sobre todo aumentar los rendimientos de péptidos e hidrofobinas.

Abstract

Microorganisms produce and secrete amphiphilic proteins and peptides with surfactant properties capable of assembling on surfaces. Peptides have been attributed antifungal and antimicrobial activity because they attack the cell membrane of bacteria, fungi, plants, parasites, and cancer cells directly. The amphiphilic proteins called hydrophobins can be produced mostly by filamentous fungi of ascomycetes and basidiomycetes, lichens and recombinant strains have been used to increase their production. Hydrophobins and peptides are small, low molecular weight molecules, with amino acid amounts around 100 and 50, respectively. The secretion of both molecules is associated with the formation of aerial hyphae, where they reduce the surface tension of the medium, due to their self-assembly. Their properties are granted by their structural conformation, hydrophobins have the presence of a hydrophobic patch of aliphatic residues, in addition to presenting eight conserved cysteine residues forming four disulfide bridges, these are classified into two categories; class I and II, considering their hydrophobic characteristics and their solubility. Both classes have the ability to form a layer on the spores that provides ease of dispersal and protection of the fungus against environmental factors, or that allows to avoid its detection by the immune system of the hosts. In the case of class I hydrophobins, the layer is formed by the grouping of the protein in the form of rods ("rodlets"). Peptides are characterized by the presence of active polar amino acids, mostly lysine, arginine, and histidine, sometimes the hydrophobic regions can bind to lipids and the positively charged hydrophilic regions are linked to water or other negatively charged residues, these characteristics in their structure allow them to act on the cell membrane, with the action of inhibiting the synthesis of cell walls, they can interact with the components of the membrane and interact on intracellular targets, understood by some models ("barrel stave", "toroidal pore", "Carpet" and "aggregate") its mode of action.

Peptide synthesis can be carried out ribosomal and non-ribosomal, the latter being used by fungi and bacteria with the help of a non-ribosomal protease synthetase. During the production of hydrophobins, hydrolytic enzymes can be found that degrade polymeric substrates to obtain energy, such as chitinases, lipases, and proteases. These enzymes as well as peptides and hydrophobins are of great interest in the industry. Hydrophobins have been applied in biomaterials, in formulations of hydrophobic drugs and personal care

formulations, surfactants for enhanced oil extraction, and mainly as emulsifying agents and foam stabilizers, while peptides have been used as a new alternative for antibiotics, food preservation packaging and to fight cancer cells. Its applications are really newfangled. However, the process of expanding protein production could be complicated because the transformation techniques to obtain these products have not been able to cover industrial demand.

Industries dedicated to the transformation of products, have large amounts of waste, finding fruit and vegetable rinds, oils, cereal, seafood waste, among many others, which can serve as good sources of substrate used. In solid and liquid state fermentation processes, which leads to reducing processing costs and environmental pollution caused by the large amount of agro-industrial and food waste, and above all increasing the yields of peptides and hydrophobins.

1. Introducción

El uso de sustratos alternativos, como son los desechos industriales, es una estrategia atractiva que puede reducir significativamente los costos de sustratos involucrados en los procesos de fermentación. Destacando, el aprovechamiento de desechos de aceite, almidón, frutas y verduras, desechos de la industria azucarera y de destilería, entre otros (Domínguez et al., 2019). Los sustratos que se utilizan en las fermentaciones para la obtención de enzimas, proteínas o metabolitos secundarios son proporcionadas directa o indirectamente por los desechos agroindustriales como una fuente alta en nutrientes microbianos (Panesar et al., 2015). Además, la utilización de estos desechos traería cambios considerables en la economía y sobre todo una reducción de la contaminación ambiental causada por su descomposición controlada “in situ” (Domínguez et al., 2019).

La mayor parte de los desechos agroindustriales son de naturaleza lignocelulósica y contienen una gran cantidad de polisacáridos como celulosa, hemicelulosa y lignina; también están presentes nutrientes como proteínas, lípidos, pectina y polifenoles, útiles en procesos fermentativos causados por diferentes microorganismos para la producción de enzimas, proteínas y metabolitos secundarios con alta demanda industrial (Ravindran et al., 2018). Algunos microorganismos como las bacterias filamentosas (actinomicetos que incluyen *Streptomyces spp.*) o hongos filamentosos (ascomicetos, basidiomicetos y zigomicetos) pueden tener características similares. Ambos grupos forman estructuras aéreas con la formación de esporas sexuales o asexuales y son capaces de secretar moléculas con actividad tensoactiva que reducen la tensión superficial en un entorno acuoso; lo cual permite que crezcan sus hifas en el aire. Los actinomicetos secretan pequeños péptidos, mientras los hongos liberan proteínas anfífilas conocidas como hidrofobinas, solubles en agua y, en presencia de una interfaz aire-agua, por ejemplo, logran autoensamblarse en una membrana anfipática. Las hidrofobinas pueden actuar en distintos aspectos en el desarrollo de los hongos como en la formación de hifas aéreas, favorecida por su autoensamblaje que permite la ruptura de la interfaz agua-aire reduciendo, con ello, la tensión superficial y logrando que estas proliferen en el medio. Al parecer, los péptidos presentan el mismo mecanismo. Las hidrofobinas también se adhieren fácilmente sobre las superficies hidrófobas, por lo que

representan un factor importante en el proceso infeccioso sobre insectos (Hektor & Scholtmeijer, 2005; Wösten, 2001; Wösten & Willey, 2000).

La propiedad anfifílica de los péptidos y las hidrofobinas los convierte en biotensoactivos/biosurfactantes, cuya estructura está conformada por una parte hidrofóbica y una hidrofílica, de gran interés para usarse en la industria de alimentos, en la recuperación de petróleo, en la industria farmacéutica y en la protección ambiental. Frente a los tensoactivos sintéticos, ofrecen mayores ventajas porque pueden sufrir biodegradación, no tienen toxicidad, presentan biocompatibilidad y biodigestibilidad, además de ser más ecológicos (Chakraborty et al., 2015; Linder et al., 2005). La propiedad anfifílica de los péptidos les confiere actividad antimicrobiana y antifúngica y, por ende, son buenos agentes para el biocontrol de patógenos (Arifiyanto et al., 2020). El uso de estos péptidos sería muy importante para contender con un gran número de bacterias resistentes a los antibióticos convencionales debido al consumo excesivo de estos medicamentos (Singh & Abraham, 2014).

2. Proteínas anfifílicas: hidrofobinas

Las hidrofobinas son proteínas muy pequeñas con un gran número de aminoácidos hidrofóbicos (~100 aminoácidos); comparten cuatro puentes disulfuro y tienen una distribución conservada de ocho residuos de cisteína (Cys), el segundo y el tercero siempre son vecinos, así como el sexto y el séptimo (Figura 1) (Berger & Sallada, 2019; Kallio & Rouvinen, 2011; Linder et al., 2005; Mankel et al., 2002; Wösten & de Vocht, 2000).

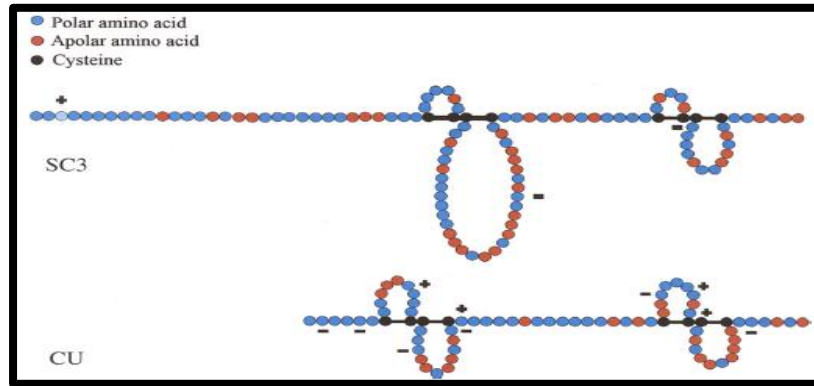


Figura 1 Representación de la distribución de residuos de cisteína (negro) en SC3 del basidiomiceto *Schizophyllum commune* y de CU, cerato-ulmin de *Ophiostoma ulmi* (Wessels, 2000).

La clasificación de las hidrofobinas ha sido muy específica tomando en cuenta sus características hidropáticas y las soluciones apropiadas para solubilizarlas. En la Tabla 1 se desglosa dicha clasificación.

Tabla 1 Características correspondientes a las clases I y II de hidrofobina.

Características	Hidrofobinas Clase I	Hidrofobinas Clase II	Referencia
Hongos que las producen	Ascomycetos y Basidiomicetos	Ascomycetos	(Linder, 2009)
	Presencia de <i>rodlets</i>	No presentan <i>rodlets</i>	(Sevim et al., 2012; Wösten, 2001)
	Pueden glicosilarse	-----	(Wösten & de Vocht, 2000)
Cantidad de aminoácidos	100 – 125	50 - 100	(Hektor & Scholtmeijer, 2005; Wösten, 2001)
Solubilidad	Ácido trifluoroacético y Ácido fórmico	Dodecil sulfato de sodio (SDS) y etanol al 60%	(Askolin et al., 2005; Sevim et al., 2012; Wösten & Scholtmeijer, 2015)

Peso molecular	6.8- 15 kDa	(Paananen et al., 2021)
-----------------------	-------------	-------------------------

La producción de hidrofobinas está relacionado con el desarrollo de los hongos, el crecimiento apical de un hongo presenta estructuras como las hifas aéreas y las esporas; las primeras crecen en un sustrato húmedo, región hidrófila y las esporas transportadas por el aire, se consideran hidrófobas. El cambio en las propiedades superficiales de la pared celular es otorgado por la secreción de hidrofobinas, las cuales actúan como tensoactivos naturales, capaces de disminuir la tensión superficial del medio de crecimiento de los hongos, facilitando la producción de hifas aéreas por el rompimiento de la interfaz agua-aire (Figura 2) (Sunde et al., 2007). Con este hecho, las hidrofobinas son consideradas moléculas anfifílicas, con una alta capacidad de migrar a la interface hidrofóbica-hidrofílica, y son buenas candidatas para encapsular y disolver moléculas hidrofóbicas en medios acuosos (Linder et al., 2005). Autores como Holder & Keyhani (2005) notaron que las hidrofobinas en *Beauveria bassiana*, se encontraban en la pared celular de los conidios y corroboró que hay una mayor presencia de hidrofobinas en conidios aéreos (conidio superficial) que en blastosporas y conidios sumergidos.

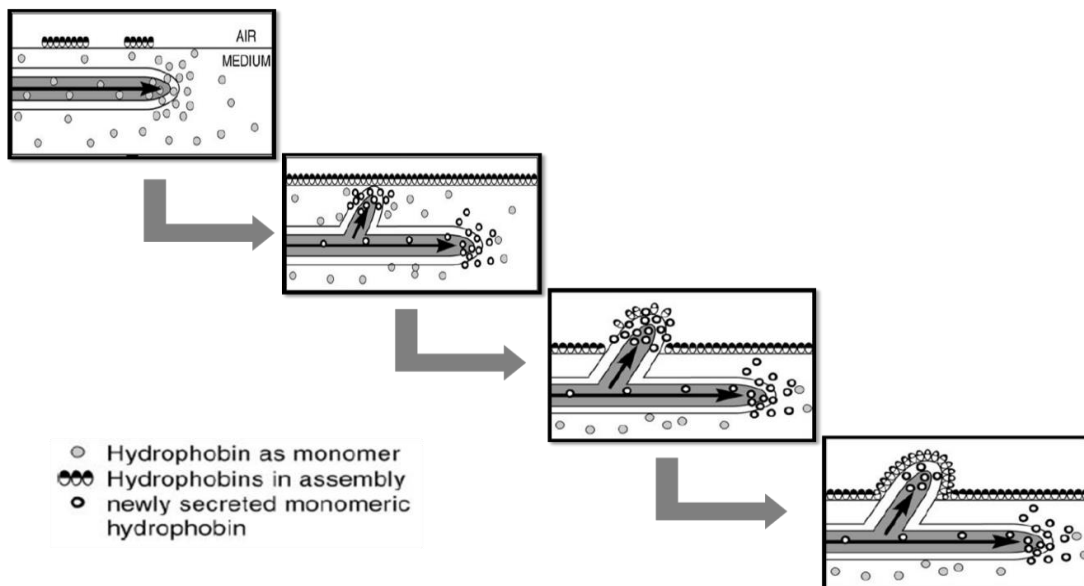


Figura 2 Comportamiento de las hidrofobinas como agente tensoactivo, reduciendo la tensión superficial y favoreciendo el crecimiento de hifas aéreas (Wösten, 2001).

2.1 Otros microorganismos productores de hidrofobinas

En la mayoría de los reportes se menciona que los hongos filamentosos de ascomicetos (especies del género *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium*, y *Neurospora*) y basidiomicetos (especies del género *Schizophyllum*, *Agaricus* y *Pleurotus*) son los principales productores de hidrofobinas, aunque también podrían ser secretadas por los zigomicetos (Kulkarni et al., 2017; Wösten & Willey, 2000). Existen otros agentes productores de hidrofobinas que son los líquenes, pero han sido pocos los reportes sobre estos. Los líquenes son organismos generados por una relación simbiótica entre hongos y algas o cianobacterias, capaces de sobrevivir a cambios drásticos de humedad debido a la presencia de estas proteínas (Ball et al., 2020). Trembley et al. (2002) mencionan que existe la presencia de rodlets en líquenes, atribuidos a la presencia de hidrofobinas; específicamente el basidiocarpo liquenizado de *Dictyonema glabratum* que produce al menos tres hidrofobinas DGH1 de 14 kDa, DGH2 y DGH3 de 6, 8 o 9 kDa. Las hidrofobinas pueden crear una capa hidrofóbica en las hifas que tienen contacto con las algas, manteniendo espacios llenos de gas, a pesar de que el liquen se sature de agua. Esta función es parecida a la de las hidrofobinas de SC4 de *S. commune*, que recubre los canales de gas en los cuerpos fructíferos maximizando el intercambio de gases (Ball et al., 2020).

Los microorganismos recombinantes productores de hidrofobinas han surgido como una manera de mejorar los rendimientos. Levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* no son productores ni secretan hidrofobinas, por lo que no presentan hidrofobicidad, indispensable para mejorar la unión de las células de levadura a las superficies y producir eficientemente etanol. Por lo cual se expresó HFBI en *S. cerevisiae* como un caso de éxito; también se ha expresado HFBII en la levadura, en un proceso de dos escalas de 1.67 L y 10 L, con o sin la adición de antiespumantes. El antiespumante tuvo un efecto positivo sobre los rendimientos, pues causó un aumento hasta 260 mg L⁻¹ y 307.6 mg L⁻¹. Otra de las levaduras que ha servido para los métodos de expresión ha sido *Pichia pastoris*, mediante el uso de la hidrofobina FcHyD5p de clase II de *Fusarium culmorum* bajo el promotor de alcohol oxidasa 1 (AOX1). La espuma generada por medio de *P. pastoris* salvaje fue estable por 2 h, mientras que la espuma producida por la cepa modificada fue estable durante 72 h, pero no se determinaron rendimientos de la hidrofobina (Kulkarni et al., 2017).

2.1.1 Hongos genéticamente modificados para producción de hidrofobinas

Las hidrofobinas se obtienen de fuentes naturales a partir de esporas, micelios de hongos etc., sólo en pequeñas cantidades, del orden de mg, pero se podrían mejorar los rendimientos utilizando técnicas de manipulación genética. La expresión de genes específicos deficientes, que codifican los factores reguladores en el hospedador fúngico, puede aumentar o alterar la producción de proteínas. La invención US 20160108409 A1 (Pakula et al., 2016) describe métodos para modificar hospedadores de hongos filamentosos como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Neurospora*, *Talaromyces*, *Phanerochaete*, *Chrysosporium* y *Penicillium*. En este caso se utilizan genes seleccionados basándose en la expresión de los genes en cultivos desarrollados en distintos sustratos y mediante datos de secuencia de los genes. La sobre expresión de un gen se lleva a cabo introduciendo una copia o copias adicionales de un gen específico en un hongo huésped, o expresando el gen bajo otro promotor, lo que ayuda a aumentar la expresión de ese gen, o se llega a aumentar la actividad del producto génico. Por otro lado, también se puede eliminar o truncar un gen en específico para reducir la expresión del gen (Pakula et al., 2016).

La empresa de Unilever suministra hidrofobinas puras de clase II obtenidas de microorganismos recombinantes en pequeñas cantidades con el fin de seguir investigando sus aplicaciones, mientras que la empresa BASF puede suministrar hidrofobinas de clase I con un grado de pureza del 65% y un peso molecular de 18.8 kDa obtenidas mediante expresión génica de microorganismos recombinantes (Khalesi et al., 2015).

El centro de investigación técnica VTT, de Finlandia, produce hidrofobinas HFBII a partir de *T. reesei*, la cual contiene tres copias adicionales del gen *hfb2*, y es capaz de producir hasta 240 mg L⁻¹ en medios enriquecidos con lactosa. El uso de microorganismos modificados puede tener desventajas tales como efectos ambientales, riesgos en la salud y la aceptabilidad del producto. En contraste, si se utiliza la cepa de *T. reesei* silvestre para producir hidrofobinas se obtiene un rendimiento bajo de 25-30 mg L⁻¹, 8 veces menos de rendimiento que con una cepa modificada (Khalesi et al., 2015).

2.2 Estructura molecular de las hidrofobinas

Una de las técnicas para comprender la estructura y la formación de películas ha sido a través de espectropolarimetría de dicroísmo circular (CD) y espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier. Ambos métodos brindan información acerca de la estructura secundaria de la proteína. Uno de los espectros estudiados ha sido el de SC3 en solución tampón de fosfato, y distingue por su estructura de hoja β ; al agregar trifluoroetanol al 25%, que promueve la formación de estructuras secundarias, cambia el espectro de manera en que las características son similares a una estructura α -helicoidal que ayudan al proceso de ensamblaje. En el caso de algunas hidrofobinas de Clase II (EAS, SC4, ABH3 y CU) se han identificado estructuras de hoja β variables junto con regiones de espiral aleatorias (Sunde et al., 2007).

En las estructuras moleculares de las hidrofobinas se han encontrado similitudes y diferencias que ayudan a entender las diferencias en sus propiedades y visualizar sus aplicaciones en distintas áreas. Comúnmente, la comparación que se ha realizado es entre la hidrofobina de Clase I DewA de *Aspergillus nidulans* y la hidrofobina HFBII de *Trichoderma reesei* (Figura 3).

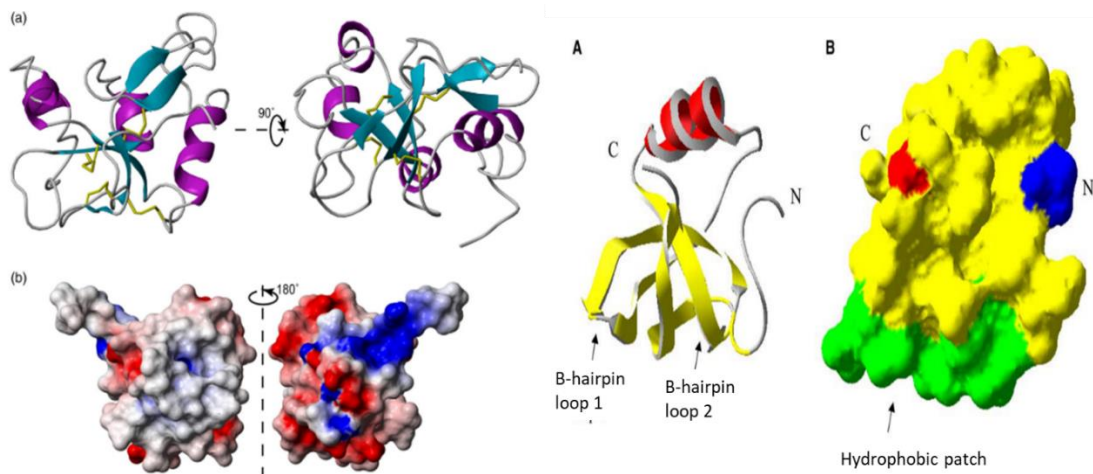


Figura 3 Comparación estructural de acuerdo a las clases de hidrofobina. Estructura DewA de *A. nidulans* a) se observan las hojas β , rodeada de hélices b) De lado izquierdo se observa la zona sin carga (hidrofóbica) y de lado derecho la zona de carga (hidrofílica) (Morris et al., 2013). Estructura de la HFBII de *T. reesei*, A) Se puede observar la estructura de la hoja β central que está formada por dos horquillas β , B) En este modelo se puede observar un parche hidrofóbico (zona verde), el C- terminal y N-terminal se muestran en rojo y en azul respectivamente (Linder et al., 2005).

En las hidrofobinas de ambas clases se encuentra una hoja β de núcleo con similar topología, pero la longitud, flexibilidad y estructura de los bucles (L1, L2 y L3) llega a variar. DewA presenta en su hoja β , 4 hebras β antiparalelas, con dos regiones de horquillas, la primera entre la tercera y cuarta cisteína que contiene dos hélices α corta, y la otra horquilla está presente en la cuarta y quinta cisteína, la cual contiene una hélice α corta y una hoja β pequeña de dos hebras; presenta una estructura “abierta” o también llamada de medio barril. Los bucles L1 y L3 están expuestos y tienen la flexibilidad de someterse a un cambio conformacional en las interfaces, siendo esta característica en particular la razón del por qué las hidrofobinas de clase II no pueden formar varillas. En su estructura se identificó que un lado de la superficie de la proteína se encuentran residuos cargados, dejando el otro lado sin carga, en donde están presentes los parches hidrofóbicos que varían de tamaño (Morris et al., 2013)

Con respecto a la hidrofobina HFBII de *T. reesei*, su estructura central esta compuesta por dos horquillas β ; la primera, se encuentra cerca del N-terminal y la segunda horquilla se encuentra cerca del C-terminal. Ambas horquillas pueden conectarse y entrelazarse para formar una hoja β antiparalela en forma de barril. Entre las dos horquillas β hay una hélice α que está formada por residuos en la parte media de la secuencia primaria. En una estructura terciaria, esta hélice α se puede encontrar fuera de la estructura de barril. La HFBII tiene un parche de residuos alifáticos hidrófobos, que están cerca de las regiones de bucle de las dos horquillas β ; la mitad de estos residuos se encuentra sobre la superficie de la proteína. En el caso de las proteínas solubles los residuos hidrofóbicos forman núcleos hidrofóbicos que ayudan a estabilizar sus estructuras plegadas. La HFBII expone una gran fracción de sus residuos hidrófobos, y el efecto desestabilizador de los residuos expuestos se compensa fuertemente por los enlaces disulfuro, manteniendo así, la estructura tridimensional de la hidrofobina. Los disulfuro forman dos unidades continuas, provocando una reticulación eficiente que estabiliza eficazmente a la proteína en una forma globular (Linder et al., 2005).

2.3 Funcionalidad

La funcionalidad biológica de las hidrofobinas implica la adhesión sobre superficies hidrofóbicas-hidrofílicas porque su estructura se caracteriza por la presencia de un parche

hidrofóbico que está compuesto de residuos alifáticos hidrofóbicos y el resto de su estructura es hidrófila, por lo que son moléculas fuertemente anfifílicas asemejándose a otros tensoactivos por la capacidad de estar en interfaces hidrofóbica-hidrofílica y de alterar la humectabilidad de superficies sólidas. Incluso cuando están presentes en interfaces de agua, las hidrofobinas pueden formar monocapas de apariencia cristalina, que son estables a la alta elasticidad de cizallamiento (Hähle et al., 2017).

Cuando entran en contacto dos capas de hidrofobina ocurre la formación de una bicapa similar a una bicapa lipídica, que, a diferencia de éstas, las bicapas de hidrofobina se pueden formar con un núcleo hidrófilo o hidrófobo, donde su estabilidad puede confirmarse mediante la determinación del ángulo de contacto (θ), el cual se mide con el ángulo que forma una gota de agua sobre la superficie de un sólido, comúnmente el uso de teflón o vidrio. Un ángulo de contacto de $\geq 90^\circ$ se identifica como una superficie no-humectable (hidrofóbica) y un ángulo $< 90^\circ$ es una superficie humectable (hidrofílica) (Figura 4) (Hähle et al., 2017; Rocha-Pino et al., 2015).

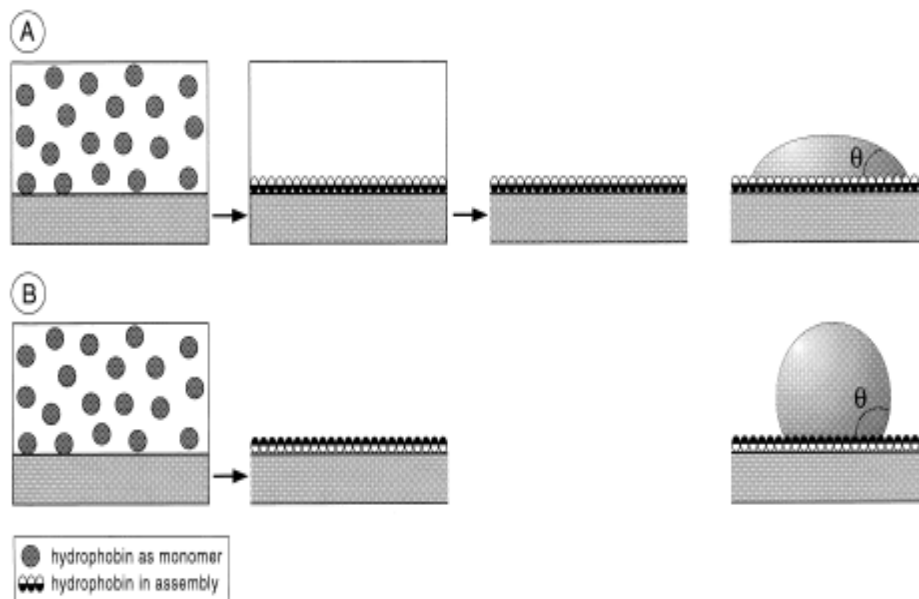


Figura 4 Representación del autoensamblaje de hidrofobinas en una superficie A) hidrofóbica que al ser recubierta con la proteína la superficie se vuelve hidrofílica, mientras que en una superficie B) hidrofílica el proceso ocurre inversamente (Wösten & de Vocht, 2000).

Las hidrofobinas podrían formar vesículas y esto fue probado por Hähl et al. por medio de la técnica de chorro de microfluidos (Figura 5), en la que se deforma una bicapa y se expande como una protuberancia a través de una solución que se inyecta por medio de una jeringa siguiendo los mismos pasos de la formación de vesículas lipídicas: protusión inicial de la membrana, encapsulación de la membrana y separación de la vesícula de la bicapa. En fase aceitosa, éstas presentan diámetros entre 30-60 μm estables durante horas, y en fase acuosa se producen vesículas con diámetros $>100 \mu\text{m}$.

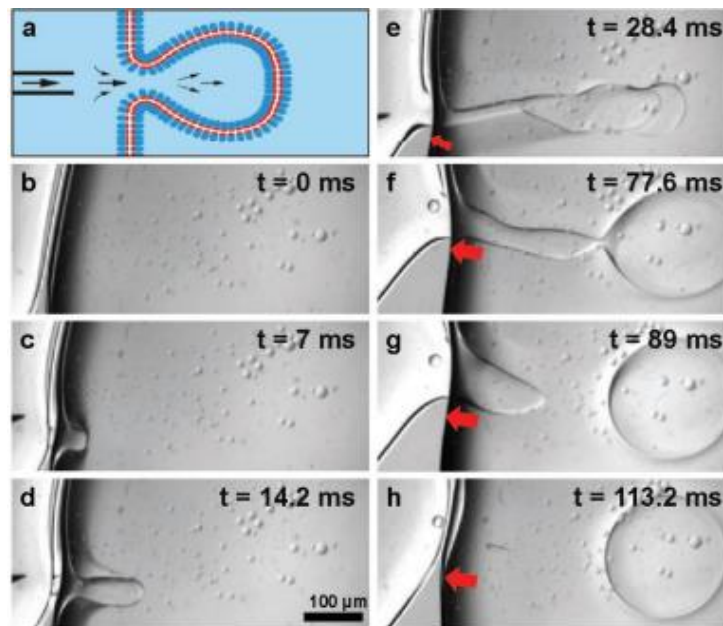


Figura 5 Formación de vesículas de hidrofobina I por la técnica de chorro de microfluidos (Hähl et al., 2017).

Por otro lado, las capas de varilla formadas por hidrofobinas de clase I tienen un papel importante en el enmascaramiento de la inmunogenicidad de las esporas en el aire, ya que, al tener las esporas una capa de hidrofobinas que las recubre, les ayuda a que el sistema inmunológico del huésped no detecte la presencia de esporas, logrando, con ello, el proceso infeccioso fúngico (Bayry et al., 2012).

3. Enzimas secretadas en conjunto con la producción de hidrofobinas en la descomposición de sustratos poliméricos

Cuando las esporas se adhieren a la superficie del huésped y establecen una relación huésped-hongo se empieza la etapa de germinación. Hasta este punto, el hongo inicia la secreción de enzimas hidrolíticas que actúan sobre la cutícula del huésped para degradarla y se van proporcionando los nutrientes al hongo. Por una parte, las enzimas degradan la cutícula, pero también contribuyen en el proceso de penetración por presión mecánica que inicia en el apresorio, que se forma en el tubo germinativo. El tubo germinativo identifica la superficie del insecto para habilitar a la hifa que penetre la cutícula. El apresorio funciona como anclaje de las esporas y ejerce presión para introducirse al insecto internamente en donde el hongo desarrolla sus cuerpos hifales que se van desplazando en su organismo y provocan su muerte (Carrillo & Blanco, 2009),

Entre las enzimas hidrolíticas secretadas por el hongo se encuentran las proteasas, quitinasas, lipasas, quitobiosas, lipooxigenasas, celulasas, entre otras. Dichas enzimas son muy comercializadas en la industria a través de procesos de fermentación considerados procesos de bajo costo. Asimismo, se encuentra una diversidad de cepas fúngicas con interés industrial identificadas como GRAS (Generally Recognized as Safe), algunos ejemplos son *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Acremonium chrysogenum* y *Penicillium chrysogenum* (Erjavec et al., 2012).

Con la acción coordinada de sólo tres enzimas se logra la desintegración completa de la cutícula del huésped. Las lipasas son las primeras en actuar sobre los lípidos, y cuando está degradada la superficie lipídica del huésped, posteriormente, se producen grandes cantidades de proteasas que degradan el material proteínico de la procutícula que cubre la quitina, actuando sobre cadenas peptídicas que se encuentran asociadas a las fibras de quitina para convertirlas en aminoácidos que son utilizables como nutrientes. Y, a su vez, se producen las quitinasas que actúan también sobre las fibras de la quitina (Carrillo & Blanco, 2009).

3.1 Quitinasas

La quitina es uno de los polímeros más abundante en la biosfera junto con la celulosa y la lignina. La quitina es el principal componente de los exoesqueletos de invertebrados y de las paredes celulares de los hongos filamentosos, es considerado un glicosaminoglicano lineal formado por residuos de N-acetil- β -D-glucosamina (GlcNAc) que se unen por enlaces β -1,4. Las quitinasas (EC 3.2.1.14) son enzimas quitinolíticas que catalizan la hidrólisis de los enlaces β -1,4 de la quitina y los quitooligómeros, dando como resultado la liberación de quitooligómeros de cadena corta. Dependiendo de la escisión que presenten las quitinasas, se dividen en endoquitinasas (EC 3.2.1.14) y exoquitinasas (EC 3.2.1.14) (Seidl, 2008; Shubakov & Kucheryavykh, 2004).

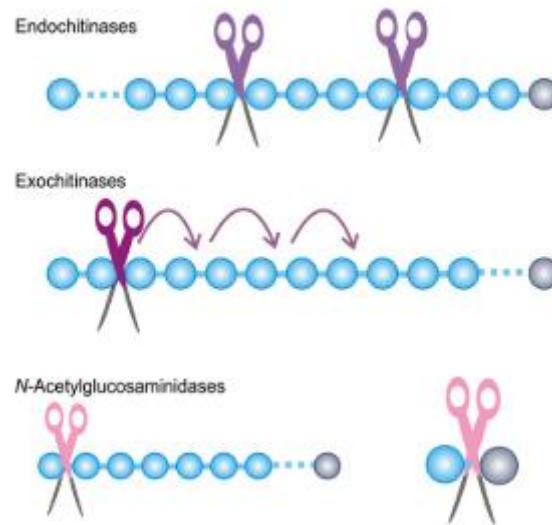


Figura 6 Representación de las escisiones que realizan las quitinasas dependiendo de su clase en la cadena de quitina (esferas color azul) (Seidl, 2008).

Las endoquitinasas degradan la quitina en cualquiera de sus puntos a lo largo de la cadena formando productos de longitud aleatoria de bajo peso molecular de N-acetilglucosamina. Las exoquitinasas dividen desde el extremo de la cadena reductora y liberan quitobiosa y N-acetilglucosamina que son hidrolizadas posteriormente por quitobiosidasas (EC 3.2.1.29) y 1,4- β -N-acetilglucosaminidasas (EC 3.2.1.30), respectivamente (Castañeda Ramírez et al., 2011; Seidl, 2008).

A nivel industrial, las quitinasas son aprovechadas comúnmente como inhibidores y bioplaguicidas, sin descartar su uso para la producción de proteínas unicelulares para piensos animales y de acuicultura, para el aislamiento de protoplastos fúngicos, y para la preparación de quitooligosacáridos bioactivos. Por lo que diversos autores han determinado su producción mediante fermentaciones en estado sólido (SSF) y líquido (SmF) utilizando quitina proveniente de fuentes agroindustriales y del desperdicio de crustáceos (Matsumoto et al., 2004).

3.2 Lipasas

Las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasa, EC 3.1.1.3), actúan sobre los enlaces éster carboxílico, hidrolizando los triglicéridos en diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos y glicerol. Éstas actúan preferentemente en los enlaces éster en la posición sn-1 y sn-3 de la estructura de los triglicéridos, aunque algunas lipasas están activas en la posición sn-2 (Houde et al., 2004). Dentro de sus funcionalidades, las lipasas son consideradas como biocatalizadores en otras reacciones como esterificación, interesterificación, acidólisis, alcoholólisis y aminólisis. Por otro lado, en la producción de combustible biodiésel, la conversión del aceite vegetal en ésteres de metilo u otros alcoholes de cadena corta pueden catalizarse a través de una transesterificación por medio de lipasas en disolvente orgánico, aunque este procedimiento está teniendo problemas al escalarse al nivel industrial. También se han usado en la producción de enatiopura que tiene actividad herbicida y en la síntesis de compuestos de sabor y fragancia como el mentol (Houde et al., 2004; Jaeger & Eggert, 2002).

3.3 Proteasas

Las proteasas (EC 3.4.23.18) están divididas en endoproteasas y exoproteasas. Las endoproteasas rompen los enlaces peptídicos internamente dentro de un polipéptido y las exoproteasas rompen los enlaces peptídicos sólo en el extremo N o C de las cadenas polipeptídicas. Ambas clases trabajan en conjunto, las endoproteasas generan un gran número de extremos libres y las exoproteasas actúan sobre éstos (Monod et al., 2002). También se encuentran las proteasas relacionadas con el pH (ácidas, alcalinas y neutras) o

por su grupo funcional en el sitio activo (aspártico, cisteína, glutámico, serina y treonina)(Chandrasekaran et al., 2016).

Las proteasas pueden contribuir en varias reacciones químicas y bioquímicas en la industria de alimentos, bebidas, fármacos, cosméticos y demás, hidrolizando los enlaces peptídicos de las proteínas y los polipéptidos (Novelli et al., 2016).

4. Péptidos anfifílicos

Los actinomicetos tienen características filamentosas y capacidades antagónicas contra bacterias, levaduras y mohos. Estos pueden producir metabolitos activos que tienen actividad tensoactiva reconocidos como biotensoactivos que, además, tienen actividad antimicrobiana o antifúngica (Arifiyanto et al., 2020). Los péptidos antimicrobianos (AMP) o antifúngicos pueden inhibir o matar a bacterias, hongos, parásitos y células cancerosas por medio de un mecanismo directo hacia la membrana celular, éstos pueden ser producidos tanto por bacterias como hongos, plantas y animales. Los AMP son un grupo de péptidos cortos contienen de 12 a 50 aminoácidos con una longitud media de 28, la mayoría de ellos con una carga neta positiva o carga media neta; éstos son sintetizados ribosómicamente o no ribosómicamente, estos últimos están en hongos y bacterias (Jiang et al., 2021).

Singh & Abraham (2014) hacen mención en su revisión que los péptidos se pueden clasificar en cuatro grupos:

- 1) Péptido catiónico enriquecido con un aminoácido específico: ya sea prolina, arginina, triptófano, fenilalanina y glicina; algunos ejemplos son abaecina, apidaecina e indolicidina.
- 2) Péptido α -helicoidales catiónicos lineales: no tienen residuos de cisteína, por ejemplo, cecropinas, andropina, moricina y melitina.
- 3) Péptido aniónico: son ricos en ácido glutámico y ácido aspártico, por ejemplo, maximina H5 y dermcidina.
- 4) Péptido aniónico y catiónico que tiene cisteína: contiene el enlace disulfuro 1-3, ejemplo, brevininas, protegrinas y defensinas.

Jiang et al. (2021), por su parte, nombran otra clasificación con respecto a su estructura secundaria, la cual se menciona en el apartado 4.2.

4.1 Microorganismos productores de péptidos

Los péptidos son producidos por una diversidad de organismos vivos, desde bacterias hasta plantas y animales, por lo cual sólo se mencionan algunos ejemplos (Singh & Abraham, 2014).

Tabla 2 Péptidos producidos por diferentes microorganismos (Singh & Abraham, 2014).

Péptido	Microorganismo	Características
Abaicina	<i>Apis mellifera L.</i> , abeja.	Es rico en prolina, y puede actuar contra la cepa de <i>Xanthomonas</i> que es resistente a apidaecina.
AcAMP	<i>Aspergillus clavatus</i>	Presenta un tamaño de 6 kDa, es rico en cisteína y es sensible a enzimas proteolíticas. Es termoestable, es usado en enfermedades de plantas, útil para el control biológico.
Proteína antiviral Y3	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	Antiviral contra TMV y antitumoral contra células de cáncer de estómago in vitro.
Apidaecina IA	<i>Apis mellifera L.</i> , abeja.	Es rico en prolina y activo frente a bacterias gram negativas.
Aurein	<i>Litoria aurea</i> , <i>Litoria raniformis</i>	Activo contra virus VIH, hongos, cáncer, bacterias gram-positivas y gram-negativas.
Bactenecina	<i>Bos taurus</i> , neutrófilos bovinos de vaca.	Actúa contra bacterias gram negativas.

Bactericidina B2	<i>Manduca sexta</i> , gusano del tabaco	Induce la síntesis de ARNm dentro de las 5 h posteriores a la inducción, actúa contra células gram positivas, gram negativas y de mamíferos.
Horquilla beta	Tanto vertebrados como invertebrados	Su tamaño es de 2-8 kDa, contienen β -horquilla reticulada por puentes disulfuro.
Brevinin	<i>Rana brevipoda porsa</i> de Japón	Activo contra virus gram-positivos, gram-negativos, y células de mamíferos.
EcAMP 1	<i>Echinochloa crus-galli</i> , semillas	Péptidos en forma de horquilla, dos enlaces S=S, activos contra una variedad de hongos.
Paenibacilina	<i>Paenibacillus polymyxa</i> , bacterias grampositivas	Lantibiótico con grupo acetilo N-terminal, contra bacterias gram-positivas como MRSA, <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Mycobacterium smegmatis</i> , actúa por citólisis.
SAP	<i>Streptomyces sp.</i> cepa AP77	Su tamaño es de 160 kDa, y actúa contra <i>Pythium porphyrae</i> (Woo & Kamei, 2003)

4.2 Estructura de los péptidos

Las estructuras celulares y producción metabólica de hongos y bacterias filamentosas no son lo mismo. Sin embargo, ambos organismos tienen capacidad de producir metabolitos hidrófobos que forman recubrimientos sobre hifas aéreas. En el caso de los hongos, este recubrimiento es considerado como un mosaico de rodlets paralelos y esta relacionado con el autoensamblaje de hidrofobinas, de clase I SC4 y ABH3 de *Agaricus bisporus* (Wösten & Willey, 2000). Mientras que, en el caso de las bacterias Wösten & Willey, (2000) mencionan la aparición de dos péptidos en las hifas aéreas pertenecientes a *Streptomyces coelicolor* y *Streptomyces tendae* uno de ellos es el péptido SapB que está formado por 18 aminoácidos y la estreptofactina que es un octapéptido; ambos están conformados por un resto no proteico que se podría sintetizar de una forma no ribosómica.

Los péptidos, son catiónicos y anfifílicos, debido a la presencia de aminoácidos polares activos (en general lisina, arginina e histidina) en su estructura que está relacionada con el

mecanismo que tienen sobre la lisis de la membrana celular. Los residuos hidrofóbicos se forman por acilación de aminoácidos en la parte de C-terminal, que le otorga la especificidad celular selectiva. Los péptidos antifúngicos tienen regiones hidrofóbicas unidas con lípidos y las regiones hidrofílicas cargadas positivamente, unidas al agua, o residuos cargados negativamente (Zhang et al., 2020).

Incluso los péptidos se pueden clasificar de acuerdo a su estructura secundaria en cuatro familias: hélice α , lámina β , hélice α y lámina β combinadas y no $\alpha\beta$ (Figura 7) (Jiang et al., 2021).

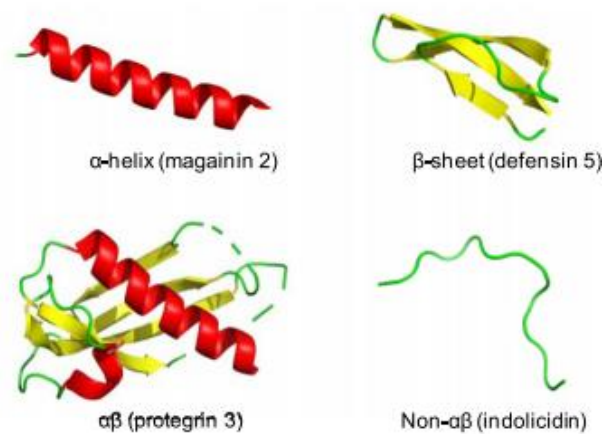


Figura 7 Visualización de las clases de familias de acuerdo a sus estructuras secundarias (Jiang et al., 2021).

4.3 Funcionalidad de péptidos

Debido a su anfifilicidad conferida por su estructura ocupan un papel importante en la disolución de la membrana; los péptidos antifúngicos matan las células fúngicas con el uso de diversos complejos y mecanismos sobre la membrana, y presentan fuertes uniones a la parte anfifílica de la membrana celular, en particular las de células electronegativas (Zhang et al., 2020).

4.3.1 Mecanismo de acción de péptidos

Los péptidos antimicrobianos (AMP) están presentes en diversos microorganismos y se secretan cuando los organismos perciben la presencia de un material extraño y actúan como un sistema inmunológico innato. En el caso de las infecciones fúngicas, pueden actuar péptidos antifúngicos que, debido a su estructura, exhiben propiedades físico-químicas especiales como catiónico y anfifílico, que le otorgan un mecanismo relacionado con la lisis de la membrana celular. Estos mecanismos funcionan de tres distintas maneras: 1) inhiben la síntesis de las paredes celulares de los hongos, que es la primera barrera de la célula, inhibiendo la quitina sintasa y (1-3)- β -D-glucano sintasa; 2) interaccionan con los componentes de la membrana; 3) interactúan sobre dianas intracelulares (mitocondrias y macromoléculas de ácidos nucleicos) (Zhang et al., 2020).

Zhang et al. (2020) mencionan que se han propuesto distintos modelos para entender la acción de los péptidos sobre la membrana denominados como “duela de barril”, “poro toroidal”, “alfombra” y “agregado” (Figura 8).

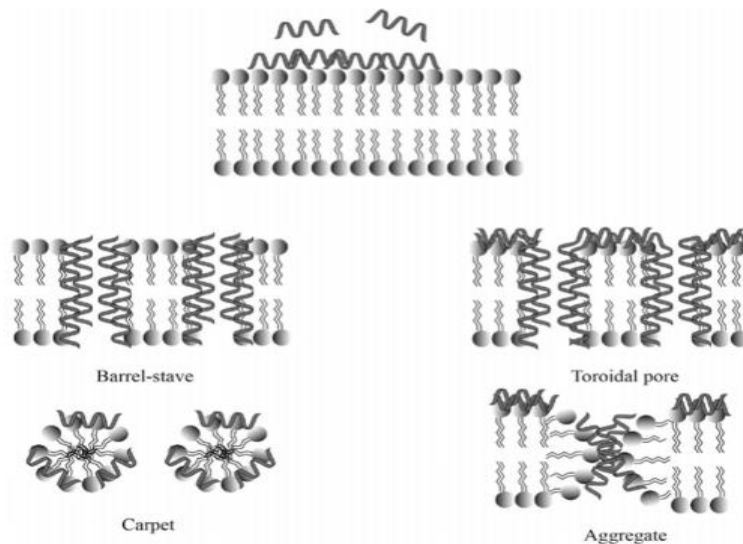


Figura 8 Representación esquemática del mecanismo de acción de los péptidos (Zhang et al., 2020).

En las bacterias gram negativas su membrana externa esta compuesta por un alto porcentaje de lípidos con grupos de cabeza cargados negativamente en la bicapa lipídica; en el caso de las bacterias gram positivas la membrana externa esta ausente, y en su lugar una capa gruesa

de peptidoglicanos con la presencia de ácidos teicoicos cargados negativamente que cubre la membrana interna. Los AMP logran interactuar con las células bacterianas a través de fuertes atracciones electrostáticas, seguida de la inserción de sus dominios hidrofóbicos en la bicapa lipídica para poder romperla (Liu et al., 2021; Saha et al., 2020).

4.4 Síntesis de péptidos

La formación de enlaces peptídicos se lleva a cabo a través del ribosoma, pero para organismos como hongos y bacterias, se lleva a cabo por las enzimas péptido sintetasa no ribosomales (NRPS) (Challis & Naismith, 2004).

Las NRPS forman enlaces amida entre monómeros de aminoácido, mientras que los ribosomas utilizan sus mismos sitios activos para cada aminoácido que es añadido al péptido ribosómico. Los NRPS emplean una unidad denominada “módulo”, que esta conformada por dominios enzimáticos que trabajan en conjunto para ir incorporando los aminoácidos entrantes al péptido en crecimiento. El módulo de elongación básico esta compuesto por un dominio de condensación (C), un dominio de adenilación (A) y un dominio de proteína portadora de peptidilo (PCP). El dominio A selecciona y adenila el aminoácido por incorporar; luego, mediante un enlace tioéster, a un grupo de fofopanteteinilo protésico (PPE) en el dominio PCP, para que este pueda transportar el aminoácido al dominio C, el cual cataliza la formación de enlaces amida entre el aminoácido y el péptido unido al dominio PCP, alargado por un solo residuo. El PCP es responsable de llevar el péptido alargado al módulo corriente abajo, donde pasa y se alarga más en la reacción de condensación. Cuando el PCP ha hecho la donación de su péptido, puede aceptar otro aminoácido del dominio A y ser partícipe del siguiente ciclo de síntesis de la línea de ensamblaje. Los módulos iniciales carecen del dominio C y los módulos terminales contienen un dominio tioesterasa, que libera el péptido por ciclación o hidrólisis (Reimer et al., 2018).

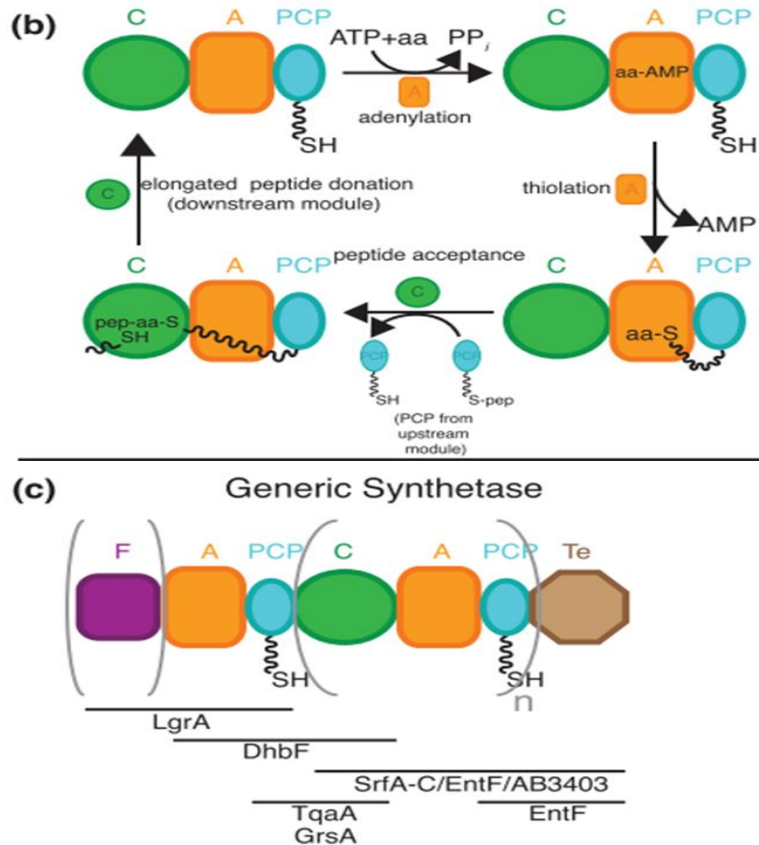


Figura 9 Esquema de la síntesis de péptidos no ribosomales (Reimer et al., 2018).

5. Producción y purificación de hidrofobinas y péptidos

Los microorganismos necesitan desarrollarse por medio del aporte de elementos que se encuentran en su composición química; estos deben de estar accesibles en el medio para que puedan obtener la energía que requieren para sintetizar macromoléculas y conservar los gradientes químicos a través de sus membranas. Por ello, es importante que durante su etapa de crecimiento se regulen factores nutricionales (carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y vitaminas) y factores físicos (pH, temperatura, oxígeno, etc.) (Junco & Rodríguez, 2015).

5.1 Condiciones de cultivo (Temperatura y pH)

Los microorganismos deben contar con temperaturas y pH óptimos. En la mayor proporción de casos el pH con valores de 7 (neutro), se puede tener un buen desarrollo de éstos. Los organismos están clasificados, conforme a su pH, en acidófilos que se desarrollan en rangos de pH 0-5.4, neutrófilos entre pH 5.4 y 8.5, y alcalófilos en pH 7-11.5. Respecto a la temperatura, se clasifican en psicrófilos, mesófilos y termófilos. Los psicrófilos se desarrollan alrededor de los 15 y 20 °C, los mesófilos se desarrollan en un rango de 30 y 37 °C, y el crecimiento de los termófilos es adaptable a temperaturas de 50 y 60 °C (Junco & Rodríguez, 2015).

Kisko et al. (2008) demostraron que las hidrofobinas de clase II HFBI a partir de *T. reesei* son más estables a cambios de temperatura (5- 60°C) y pH (3-9) que HFBI. A lo que podemos sumar las investigaciones de Askolin et al. (2006) que mencionan que las hidrofobinas son difíciles de desnaturalizar, ya que al calentarse el medio a 90 °C no encontraron ningún signo de desnaturalización, aunque podría presentar cambios en su forma de autoensamblarse, pero que este suceso no debe confundirse con la desnaturalización. En otras referencias sólo se ha mencionado que el pH podría alterar la estructura y elasticidad de la película de hidrofobina, en donde se reorientan las moléculas de hidrofobina y afectan la interacción entre las hidrofobinas y en la interfaz aire-agua (Paananen et al., 2021).

Singh & Abraham (2014) mencionan que los péptidos son estables al calor a temperaturas de 100°C, al menos por 5 min. Autores como Ellaiah et al. (2004) evaluaron la influencia de pH y de temperatura para la producción del péptido neomicina en una fermentación en estado sólido, usando una diversidad de sustratos. La fermentación se realizó durante 12 días, y se observó que a pH de 6 hubo una menor producción de neomicina; a medida en que el pH aumentaba, iba incrementándose la producción de neomicina, cuyo óptimo a pH 7.5 dio un rendimiento de 5780 µg g⁻¹. Con respecto a la temperatura, hubo una disminución en el rendimiento de neomicina cuando estaba por encima y por debajo de su temperatura óptima de 30 °C (5760 µg g⁻¹).

5.2 Tipo de cultivo (SSF y SmF) y tipo de sustrato

En la industria y a nivel laboratorio se pueden realizar procesos de fermentación para obtener distintos productos de interés con la utilización de microorganismos que se adaptan a las condiciones proporcionadas por un medio. Este proceso de fermentación puede llevarse a cabo en dos formas, conocidas como fermentación en estado sólido (SSF) y fermentación en estado líquido o sumergido (SmF); ambos tipos de cultivo presentan diferencias y a grandes rasgos se puede decir que SmF tiene ventajas sobre su fácil manejo y la sencilla recuperación de enzimas o proteínas extracelulares. Desafortunadamente los productos están diluidos y los extractos enzimáticos son menos estables que los SSF. Microorganismos como los hongos se han desarrollado más en SSF; la materia prima usada como sustrato es económica y el proceso es manejable, pero llegan a presentar problemas en la esterilización del sustrato, el control de la temperatura y el pH, el mantenimiento de la pureza del cultivo y la duración del proceso (Matsumoto et al., 2004). SSF, imita las condiciones de vida de los hongos silvestres en sus hábitats comunes y puede aumentar significativamente los rendimientos de hidrofobinas en comparación con SmF, debido a que presentan una menor actividad de agua; lo que causa una mayor germinación del hongo y conduce a la formación de conidios más hidrófobos (Kulkarni et al., 2017).

Rocha-Pino et al. (2011) lograron producir hidrofobinas de clase I a partir de *Lecanicillium lecanii* en dos distintos medios de cultivo (sólido y líquido), variando las fuentes de carbono, y observaron que había cambios significativos. Así, dependiendo del medio de cultivo, la cantidad de hidrofobina producida en cultivo sólido con la adición de quitina fue de $627.3 \pm 2 \mu\text{g mL}^{-1}$, 11 veces más que los extraídos en un cultivo líquido ($57.4 \pm 4.7 \mu\text{g mL}^{-1}$). Comparando con el rendimiento en medio sólido cuando se agregó fructosa como fuente de carbono, se obtuvo $612.4 \pm 11.6 \mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que en medio líquido se obtuvo una producción menor de $3.5 \pm 0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$. También se observó que la actividad superficial de las hidrofobinas producidas en los medios sólidos con quitina fue significativamente mayor que cuando se usó fructosa como fuente de carbono. Khalesi et al. (2014) produjeron HFBII a partir de *T. reesei* en SmF con rendimiento de 29.6 mg L^{-1} en 75 h administrando lactosa como fuente de carbono.

En fermentaciones SSF, se han utilizado soportes inertes para aumentar la hidrofobicidad del medio y que el hongo pueda producir mayor cantidad de hidrofobinas; materiales como la espuma de poliuretano (PUF) ha contribuido en mejorar estos rendimientos de 302.07 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de clase I y 123.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de clase II de *L. lecanii* (Rocha-Pino et al., 2015). Kakahi et al. (2019) investigaron otro tipo de soportes para aumentar la producción tomando por soportes el caucho Viton, acero inoxidable, teflón y vidrio, y se obtuvieron los siguientes rendimientos de la Tabla 3.

Tabla 3 Rendimientos (mg L^{-1}) usando distintos tipos de soportes (Kakahi et al., 2019).

Hidrofobina (<i>T. reesei</i>)	Caucho Viton	Acero inoxidable	Teflón	Vidrio
HFBI	45 ^a ± 2.6	34 ^b ± 2.4	35 ^b ± 3.6	36 ^b ± 3.2
HFBI	34 ^a ± 3.1	28 ^b ± 1.8	32 ^a ± 4.3	33 ^a ± 2.7

Se observó que con el Caucho Viton hay un mayor rendimiento para clase I, mientras que para HFBI no hay diferencia significativa con el uso del caucho, teflón y vidrio, por lo que resultan ser buenos materiales para la producción de hidrofobinas clase I.

La epicutícula de los insectos esta compuesta por hidrocarburos alifáticos donde se incluye el n-hexadecano, compuesto interesante para lograr un efecto como sustrato hidrofóbico en cultivo sólido y líquido para la obtención de hidrofobinas, lo que resultó en 1.3 mg PLHYD g de proteína L^{-1} en SSF, pero en SmF no hubo secreción de hidrofobinas (Vigueras et al., 2014).

También se han utilizado este tipo de fermentaciones en líquido y sólido para la obtención de péptidos anfifílicos. Así, autores como Ellaiah et al. (2004) realizaron una fermentación en estado sólido para producir neomicina a partir de *Streptomyces marinensis*, donde se usaron una diversidad de sustratos y se variaron las condiciones de temperatura y pH, y se logró la mayor producción de neomicina usando trigo de rawa con un rendimiento de 4471 $\mu\text{g g}$ de sustrato $^{-1}$.

En otros casos se ha usado la torta de palmiste, subproducto de la industria de la molienda de palma, en una lacto-fermentación con la adición de bacterias ácido lácticas (LAB), y se

obtuvieron 0.519 mg mL^{-1} con un grado de hidrólisis de 43.39% que mide la eficacia de LAB para descomponer las moléculas de la torta de palmiste durante la fermentación. Se ha mencionado que, debido a la naturaleza de los péptidos antimicrobianos, es posible que el uso de biopolímeros aniónicos sean aprovechados como parte de su enriquecimiento para mejorar su actividad antimicrobiana. Por lo cual, los AMP por palmiste logran inhibiciones de hongos de 69-88% con una concentración de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Mohamad et al., 2020; Um et al., 2021).

Como se visualiza en la ejemplificación de los datos mencionados, los tipos de sustrato que son utilizados en los procesos de fermentación impactan significativamente en los resultados que se desean conseguir, ya que los organismos pueden reaccionar de diferente manera frente a distintos tipos de sustrato (Subramaniyam & Vimala, 2012).

5.2.1 Fuentes agroindustriales y productos alimenticios como sustrato para la producción de hidrofobinas y péptidos

Comúnmente, en fermentaciones sólidas se han utilizado como sustratos salvado de trigo, arroz y paja de arroz, heno, desechos de frutas y verduras, pulpa de papel, bagazo, fibra de coco; mientras que en fermentaciones líquidas es común el uso de melaza, medios líquidos, aguas residuales, jugos de frutas y verduras, por dar algunos ejemplos (Subramaniyam & Vimala, 2012). La utilización de desechos agroindustriales puede bajar los costos de producción para la obtención de proteínas o enzimas y, sobre todo, reducir los problemas medioambientales (Domínguez et al., 2019).

El uso de subproductos de cereales como el salvado de trigo y de maíz ha funcionado para la producción conidios de *Trichoderma sp.*, sin tener que adicionar otras fuentes de nitrógeno o de carbono para aumentar la concentración de esporas, y destaca el de trigo porque produjo mayor cantidad de esporas de *T. harzianum* y *T. viride* (Cavalcante et al., 2008).

Los residuos de aceite y grasas son utilizados para piensos de origen animal, pero de alguna forma pueden ser usados como sustratos sólidos, con un buen aprovechamiento para hongos en su bioconversión sustrato-enzima (Krupodorova & Barshteyn, 2015). En algunas investigaciones se ha propuesto utilizar los residuos de aceite de palma, de maíz, cacahuete,

entre otros, y esto ha traído resultados destacables en la producción de ramnolípidos que son usados como biosurfactantes. Con la utilización de 50gL^{-1} de residuos de aceite de mahua, se obtuvo 40 g L^{-1} de ramnolípidos. (Domínguez et al., 2019).

Existen muy pocos informes donde se hayan utilizado residuos industriales para la producción de hidrofobinas; uno de ellos es el de Rocha-Pino et al. (2011) que utilizaron residuos de camarón para la obtención de quitina y así suministrarlo como sustrato en el medio. Kulkarni et al. (2020) reiteran que el salvado de trigo, el bagazo de yuca, el bagazo de caña de azúcar y algunos aceites, pueden producir enzimas lignocelulósicas y biomasa a partir de *Pleurotus ostreatus*. El aceite de sésamo y de coco hacen crecer a este hongo y se logra la purificación parcial de una hidrofobina con rendimientos de biomasa de 3.85 mg g^{-1} y 1.86 mg g^{-1} , respectivamente.

En la producción de péptidos, se ha podido utilizar como sustratos el trigo de rawa (Ellaiah et al., 2004) y la torta de palmiste (Mohamad et al., 2020). Al igual, se ha usado las semillas de kenaf, que tiene un alto contenido en proteínas, pero se utilizan para hacer piensos para animales debido a su mala calidad sensorial. Arulrajah et al. (2020) realizaron una fermentación con *Lactobacillus casei* durante 72 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, con la adición de las semillas de kenaf molidas para la obtención de péptidos FKSP con actividad microbiana del 42.07-77.38% contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa* y *Salmonella typhimurium*.

Se puede usar una diversidad de sustratos con altos niveles de nutrientes para la producción de biocompuestos. El único problema con el uso de estos sustratos es que se deben seleccionar adecuadamente para obtener un equilibrio de los nutrientes necesarios para el crecimiento celular y una acumulación del producto (Cavalcante et al., 2021).

5.3 Métodos de purificación de péptidos e hidrofobinas

En los extractos se puede encontrar una gran cantidad de macromoléculas como ácidos nucleicos, polisacáridos y otras proteínas, por lo que existen diversas técnicas para purificar proteínas con alta pureza. Las moléculas pequeñas pueden ser separadas por medio de diálisis, ultrafiltración y filtración en gel, aunque también existe el método de precipitación

por medio de sales que precipitan otra cantidad de moléculas presentes en el medio que, con ayuda de centrifugación, se acumulan como un “pellet” en la parte inferior del tubo de centrifugación (Ward & Swiatek, 2009).

Generalmente, la extracción de hidrofobinas empieza con el empleo de disolventes como SDS al 2% y TFA o ácido fórmico, dependiendo de la clase que se desea extraer (Viguera et al., 2008). Existen algunos pasos de pre-purificación que pueden mejorar los rendimientos de un producto final en donde se encuentra el fraccionamiento de espuma. Un método de separación donde se implica la formación de burbujas por adsorción, las características anfipáticas de las proteínas con grupos polares y no polares provocan que éstas se adsorban en la interfaz gas-líquido, lo cual facilita la separación y concentración de las proteínas. Este método es de fácil empleo y puede llegar a reducir los costos de operación. Sin embargo, para obtener buenos rendimientos de proteína, se debe tener cuidado con el tipo y la velocidad de flujo de la inyección de gas, la relación entre la altura de la columna y la altura del líquido inicial, el volumen del líquido inicial, entre otros factores (Aksay & Mazza, 2007; Khalesi et al., 2013).

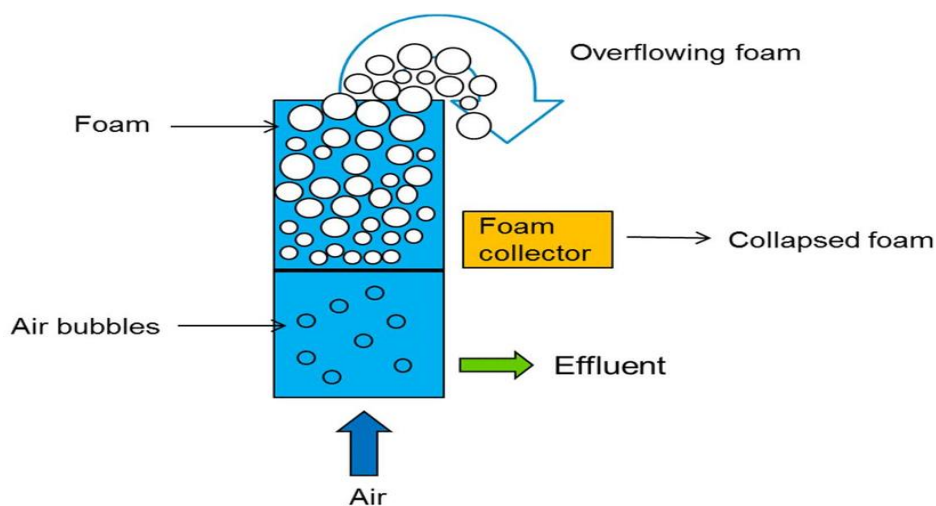


Figura 10 Esquema del método de fraccionamiento de espuma para una pre-purificación de hidrofobinas (Ketola, 2016).

Posteriormente, se continúa con el uso de métodos cromatográficos, en especial la cromatografía líquida de fase inversa, donde se utiliza una fase móvil con gradiente de polaridad para eluir proteínas anfifílicas. Con esta técnica se puede detectar, purificar y cuantificar la hidrofobina en estudio (Linder et al., 2001; Viguera et al., 2008). Los procesos de purificación de péptidos se han recurrido al uso de cromatografía de intercambio iónico, que separa el péptido objetivo según sea su carga, seguido de pasos adicionales de cromatografía de fase inversa de alto rendimiento (HPLC) para completar su purificación. Las fracciones eluidas son analizadas por medio de electroforesis SDS-PAGE para obtener un peso molecular aproximado, seguido de un análisis de aminoácidos que proporciona la secuencia de aminoácidos presentes en el péptido que brindara información sobre su actividad o potencia (Shwaiki et al., 2021).

Con respecto a este tema, algunos autores de estudios sobre purificación de hidrofobinas han mencionado métodos que podrían ayudar a obtener altos grados de pureza. Song et al. (2016) mencionan un nuevo método de purificación por precipitación térmica que resulta fácil de operar a gran escala y que permite altos niveles de recuperación. Ellos utilizaron una fermentación Fed-batch, en la cual el caldo de fermentación, al ajustarse a un pH 7, se sedimentaron solamente las sales inorgánicas; posteriormente, este caldo se calentó a 100 °C, lo que ayudó a precipitar casi toda la HGFI de *P. pastoris*, presente. Después de una liofilización, las muestras fueron tratadas con TFA y acetonitrilo para ser purificadas por HPLC. Con el proceso de precipitación térmica, se obtuvo una recuperación del 82.6%, que fue más alto que con el método de ultrafiltración (15.1%).

Otra consideración del Centro VTT para producir hidrofobina HFII es la utilización de un tensoactivo químico, como el Berol 532, después de la fermentación; cuando se tienen las dos fases separadas, las hidrofobinas están adheridas en la fase del Berol, por lo que se puede recuperar con iso-butanol, y se logra recuperar hasta 80-90%. Su purificación requiere utilizar cromatografía. Las hidrofobinas que llegan a tener una purificación superior del 95% se denominan de grado K (Khalesi et al., 2015; Linder et al., 2001).

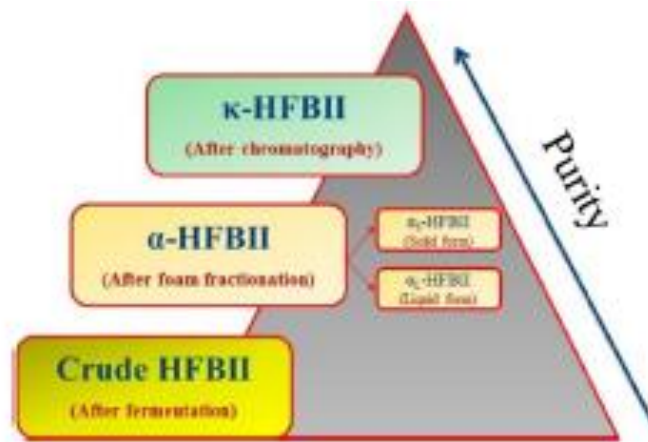


Figura 11 Clasificación de acuerdo a la pureza de hidrofobinas HFBII (Khalesi et al., 2015).

6. Aplicaciones

6.1 Hidrofobinas

Las hidrofobinas son de gran interés en distintas aplicaciones debido a su capacidad de autoensamblarse por ser proteínas anfifílicas. Su ensamblaje puede cambiar las características de la superficie de diferentes materiales, lo cual es utilizable para materiales que no pueden ser buenos para ingeniería de tejidos debido a sus características hidrofóbicas, provocando una mala interacción celular. Como agentes emulsionantes y estabilizantes de espumas en alimentos, puede ayudar a disminuir el uso de tensoactivos sintéticos que es uno de los objetivos de la producción de tensoactivos de origen natural. Las hidrofobinas tienen un gran potencial y lo observaremos en sus distintas aplicaciones (Hektor & Scholtmeijer, 2005).

6.1.1 Biomateriales

Dentro de la ingeniería de tejidos se buscan nuevas alternativas para regenerar y reparar los tejidos dañados. En donde una de sus propuestas ha sido aplicar matrices biodegradables llamadas “andamios biológicos” con estructura porosa que se colocan en el tejido dañado para formar un microambiente apropiado para las células para acelerar la regeneración. Entre los materiales utilizados están las cerámicas, metales y polímeros, siendo estos últimos los

más usados para la liberación controlada de fármacos y son un material común para la elaboración de andamios (Lizarbe, 2007).

Los polímeros se clasifican según su origen en materiales naturales y los sintéticos; los naturales poseen una alta biocompatibilidad, facilitan la adhesión y diferenciación celular debido a que son biológicamente similares a la matriz extracelular (Kumbar et al., 2014) y los de origen sintético reducen al mínimo los riesgos de contaminación causada por la presencia de patógenos, además se pueden manipular fácilmente para lograr liberaciones de principios activos (Lanza et al., 2020). Son más fáciles de procesar que los naturales, presentan mejores propiedades mecánicas y tiempos de degradación. La única desventaja es que su interacción con las células es limitada debido a que son materiales hidrofóbicos (McCullen et al., 2009).

Los polímeros biodegradables como el poli (ácido láctico) (PLA), el poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y la poli (ϵ -caprolactona) (PCL), se ha utilizado significativamente en ingeniería de tejidos, pero su hidrofobicidad limita la interacción celular o incluso la inmovilización de moléculas bioactivas en el material. Dichas limitaciones se han tratado con distintas técnicas para contrarrestar estos problemas mediante tratamientos con plasma, combinaciones físicas o incluso injertos poliméricos. Estos métodos han tenido éxito en la inmovilización de moléculas bioactivas. Sin embargo, estos métodos llegan a debilitar las propiedades mecánicas e inactivan las biomoléculas (Zhang et al., 2011).

El efecto antiincrustante de los recubrimientos de hidrofobina se puede aprovechar en el área de biomateriales, donde se puede reducir la unión no específica de proteínas. Además de modificar su hidrofobicidad de las superficies modificadas, se puede mejorar la adhesión celular. En los implantes médicos es importante contemplar la biocompatibilidad, ya que si ésta es insuficiente se puede rechazar el implante (Hektor & Scholtmeijer, 2005). Scholtmeijer et al. (2002), proponen el primer sistema modelo para mejorar la biocompatibilidad al crecer fibroblastos en teflón recubiertos con hidrofobinas.

Las hidrofobinas de clase I se han utilizado para estimular el crecimiento de células renales y células madre neurales en superficies sólidas de dimetilsiloxano modificado con una inmovilización de colágeno. La superficie de dimetilsiloxano se logra modificar de

hidrofóbica a hidrofílica facilitando la inmovilización del colágeno, ya que este material tiene una buena capacidad de soporte para la adhesión y crecimiento celular (Hou et al., 2008).

Debido a las propiedades que tienen las hidrofobinas como proteínas capaces de cambiar la polaridad de las superficies independientemente de su naturaleza química, Zhang et al. (2011) inmovilizaron un anticuerpo anti-CD31 en una película fibrosa de PCL recubierta de HFBI, a través de interacciones proteína-proteína. Este experimento es una buena oportunidad para poder biofuncionalizar superficies de injerto para fines vasculares. Se observó que hubo cambios drásticos en la humectabilidad de la superficie de PCL recubierta, la PCL nativa presentaba una humectabilidad de $104.2 \pm 1.5^\circ$, después de la modificación se obtuvo una disminución a $60.9 \pm 0.8^\circ$. La región hidrofílica de la HFBI se orienta hacia el exterior e interactúa con el anticuerpo a través de las interacciones proteína-proteína. Esta funcionalización con la proteína no tuvo un efecto negativo en el crecimiento celular, por lo que no se afectaba la citocompatibilidad. Esta metodología es una opción alternativa con buenos resultados para la inmovilización de anticuerpos en superficies hidrófobas, como en este caso la PCL.

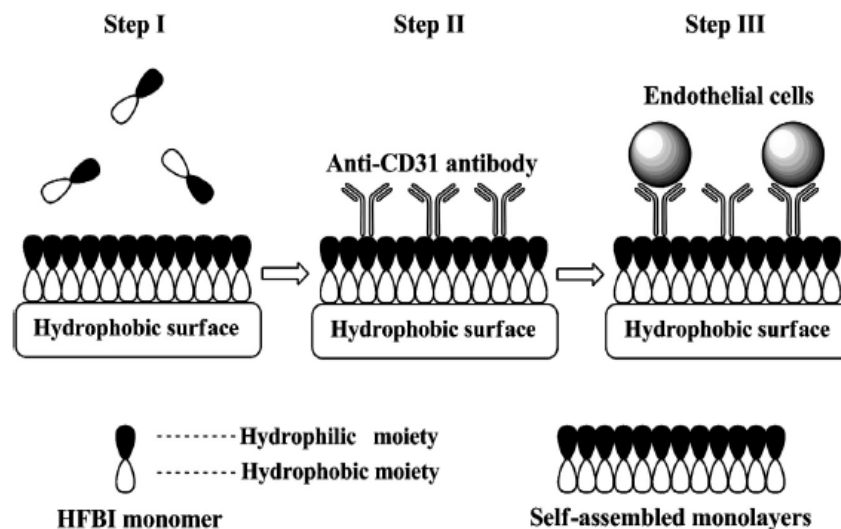


Figura 12 Inmovilización de un anticuerpo Anti-CD31 en una superficie recubierta con HFBI (Zhang et al., 2011).

Otra problemática en los dispositivos médicos es que, gracias a su propiedad hidrofóbica, muchas especies bacterianas pueden adherirse a estos dispositivos, lo que implica que los

dispositivos al estar en contacto directo con los pacientes, sean medios adecuados para la propagación de microorganismos infecciosos. Por lo que la búsqueda de otras opciones que inhiban el crecimiento bacteriano es extremadamente necesaria para mejorar los dispositivos médicos (Wang et al., 2017). Una de las alternativas para atacar esta problemática ha sido incrustar agentes antibacterianos como los antibióticos, al igual que Ruckh et al. (2012) y Jang et al. (2015) han investigado el efecto antimicrobiano en andamios de PCL, que liberan rifampicina y vancomicina, pero debido al abuso y mal uso de los antibióticos, las bacterias se han vuelto ultra resistentes.

Wang et al. (2017) utilizan una HGFI de clase I de *Grifola frondosa* para inmovilizar pediocina PA-1 en fibras de PCL, y así mejorar la capacidad antibacteriana del material. En este estudio se fusionó la pediocina PA-1 y HGFI, en donde la HGFI influyó en la actividad de PA-1 en solución, debido a que la proteína anfifílica se ensambla a oligómeros en solución acuosa; se mencionó que los oligómeros en solución pueden formar un obstáculo estérico impidiendo que el PA-1 se absorba en las bacterias. Las propiedades superficiales de HGFI se conservaron debido al pH de la proteína de fusión. La actividad antibacteriana de la PCL modificada por pH implicaba que la proteína de fusión mejoraba significativamente la resistencia bacteriana. Este descubrimiento puede servir para disminuir significativamente las infecciones sobre los implantes, además de evitar los gastos ocasionados por las segundas cirugías para sustituir los dispositivos infectados.

6.1.2 Formulaciones farmacéuticas

La utilización de agentes nanométricos se ha llevado a cabo para mejorar la administración de fármacos (Torchilin, 2014). La encapsulación de fármacos hidrofóbicos en nanoportadores ha aumentado su estabilidad y los tiempos de circulación en la sangre, incluso se ha podido reducir la toxicidad y la resistencia celular (Liu et al., 2016). Una de las desventajas de esta nueva tecnología, es que existe una baja estabilidad de los complejos fármaco-nanoportador en el medio biológico, ya que llega a ocurrir fugas del fármaco en los fluidos biológicos, comúnmente en el torrente sanguíneo cuando se administran formulaciones que son inyectadas por vía intravenosa (Zhao et al., 2016).

Se ha reportado que los nanoportadores pueden ensamblarse en solución con estructuras más grandes formando suprapartículas, las cuales sirven como contenedores con la finalidad de transportar y liberar controladamente los agentes terapéuticos (Batista et al., 2015; Park et al., 2014).

Para que suceda este ensamblaje, se han utilizado agentes tensoactivos, lípidos, polímeros, o proteínas que tienen la capacidad de autoensamblarse por medio de interacciones no covalentes como puentes de hidrógeno o interacciones de van der Waals. Las Hidrofobinas son efectivas para mejorar la solubilidad de los fármacos hidrófobos, además de su estabilidad. Se ha observado que el efecto estabilizador de los enlaces disulfuro conservados de la hidrofobina de clase II influyen en el mecanismo de liberación de fármacos. Por lo que Maiolo et al. (2017) utilizaron una hidrofobina de clase II para organizar y estabilizar suprapartículas de oro protegido con nanopartículas de dodecanotiol que podrían cargarse con un fármaco hidrofóbico, para mantenerse estables en la sangre hasta que los tejidos puedan absorberlos. Se mencionó que el glutatión citoplasmático reduce los disulfuros permitiendo que las suprapartículas liberen la carga del fármaco directamente en el citoplasma.

Dada la invención WO 2010 060811 (Buthe et al., 2010), se pueden utilizar las hidrofobinas como un excipiente para uso galénico. Cabe señalar que los productos galénicos buscan fármacos que sean de fácil administración y tengan una respuesta terapéutica adecuada. La utilización de una proteína tensoactiva podría ayudar a las características de liberación del fármaco a partir de una forma de aplicación sólida, para otorgarle una resistencia en los ambientes ácidos como el del estómago o ambientes alcalinos como el del intestino. El recubrimiento de las cápsulas con hidrofobinas fue realizado mediante el surgimiento de la cápsula en una solución de alginato al 2% p/v que contenía 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de hidrofobina durante un tiempo de 10 s. Para comprobar el efecto de liberación, las cápsulas fueron expuestas en un medio de HCl que simulaba un ambiente ácido como el del estómago. Mediante este experimento se observó que las cápsulas son más resistentes al jugo gástrico cuando está recubierta con HFB que cuando solo se utiliza un recubrimiento con alginato.

6.1.3 Estabilización de espumas y emulsiones en alimentos

Las moléculas anfifílicas de bajo peso molecular juegan un papel esencial en la estabilidad de emulsiones líquidas en productos como aderezos, salsas, algunas bebidas y emulsiones alcohólicas. Las autoridades alimentarias y sanitarias han buscado la manera en que las industrias limiten el uso de emulsionantes sintéticos, por lo que ha crecido el interés de encontrar fuentes naturales de moléculas anfifílicas (Campos et al., 2013). Las emulsiones y espumas alimentarias son dispersiones coloidales liofóbicas, en donde la fase continua del sistema no necesita humedecer la fase dispersa. En una solución de aceite y agua, cuando el área interfacial aumenta entre la fase continua y dispersa, aumenta la energía libre total del sistema en comparación con la energía libre de dispersión. Una forma de poder manipular las emulsiones es minimizar la tensión interfacial entre las dos fases, lo que puede lograrse con la adición de una molécula anfifílica que actúe como tensoactivo, de tal forma que el segmento hidrofóbico se expone a la fase aceite y su segmento hidrofílico se expone a la fase acuosa (Damodaran, 2005).

Aldred et al. (2007) usa una hidrofobina de clase II para estabilizar una composición aireada fluida en una crema reducida, teniendo en cuenta que la proteína fúngica, en este caso la hidrofobina, podría conferir una buena estabilidad en la desproporción y la coalescencia de la espuma del alimento aireado, ya que la proteína puede influir en su viscoelasticidad en la superficie de las burbujas de aire. La combinación de la hidrofobina de clase II con un agente de límite elástico, como la xantana y la gellana, provoca que el tamaño de las burbujas permanezca constante durante un largo periodo de tiempo, la formación de crema ocurre en baja cantidad en tiempos prolongados de aproximadamente 1000 h, que corresponden a más de un mes.

Las membranas de hidrofobinas tienen una alta elasticidad superficial, debido a que las hidrofobinas tienden a formar espumas muy estables; propiedad más notable de las hidrofobinas de clase II que para los miembros de la clase I. Cox et al. (2009) estudiaron la estabilidad de las espumas y burbujas de HFBII de *T. reesei*, y observando una estabilidad de 4 meses, y hasta de varios años cuando la concentración de la proteína fue baja de aproximadamente 0.1% en peso. La espuma puede proporcionar a los productos propiedades

sensoriales; un excelente ejemplo es el aire en el helado que le otorga la cremosidad característica. Los helados se pueden definir como una mezcla congelada de leche, crema, azúcar, estabilizadores y emulsionantes. Esta mezcla está constituida por una emulsión, una dispersión y una espuma. La dispersión y la emulsión se forman a través de una fase de suero acuoso concentrado por congelación con el contenido de azúcares y materia seca que rodea los cristales de hielo dispersos y los glóbulos de grasa. Los cristales tienen un tamaño aproximado de 1-150 μm de diámetro, mientras que la espuma está formada por burbujas de aire, que están dispersas en la emulsión. El tamaño de los cristales de hielo determina la textura que brinda el producto al consumidor; así, entre más pequeños sean los cristales, el helado presentará una mayor cremosidad, y cuando se tienen cristales de mayor tamaño ($>50 \mu\text{m}$) la textura es granular (Cook & Hartel, 2010).

De esta manera, las características organolépticas del helado dependen de cómo se dispersan los cristales de hielo, la grasa y el aire. Se debe mencionar que la cristalización está conformada por tres etapas: la nucleación, el crecimiento y la recrystalización. La nucleación es la etapa en que nace los cristales, proceso que consiste en la formación espontánea de arreglos microscópicos de moléculas dentro de la mezcla, los cuales son precursores de los cristales. En la segunda etapa, crecimiento, los arreglos aumentan de tamaño y forman los cristales conforme las moléculas de agua son incorporadas a la estructura cristalina. Por último, se da la recrystalización y, dependiendo de la estabilidad de los cristales formados, los cristales pueden cambiar de forma o fusionarse; esta etapa puede darse durante el almacenamiento, por lo que se ha sugerido utilizar “proteínas anticongelantes” (Aldred et al., 2006; Ballesteros & Quiroga, 2016). Al respecto, Aldred et al. (2006) declaran en su patente que la utilización de una hidrofobina de clase II puede reducir el crecimiento de cristales de hielo en los productos congelados, ya que la hidrofobina es capaz de ensamblarse en una superficie aire-líquido y una composición congelada. Con la composición que contiene HFBII se consigue un tamaño de cristal de 40-60 μm de diámetro, mejor controlado que utilizando caseinato de sodio o leche desnatada en polvo, cuyos cristales tienen diámetros de 50-100 μm . Por otro lado, la microestructura se conserva, ya que no se observa un engrosamiento aparente de los cristales de hielo ni de las burbujas de aire durante 1 o 2 semanas de almacenamiento a una temperatura de -10°C .

6.1.4 “Gushing”

Las hidrofobinas han sido relacionadas con la industria cervecera como un efecto negativo, denominado “chorro de cerveza” o “Gushing”. Para poder entenderlo, hay que aclarar que existen dos tipos de chorro en los cuales se involucran diferentes factores: 1) chorro primario, donde se involucran las pequeñas proteínas “hidrofobinas” y 2) el chorro secundario, donde se involucran las partículas de turbidez, iones metálicos, cristales de oxalato de calcio, agentes limpiadores de botellas, exceso de gas, en otros (Postulkova et al., 2016). Deckers et al. (2011) han estudiado este fenómeno y sugieren que estas proteínas forman una película anfipática que se adhiere a la pared de la botella, por lo que puede encapsular el CO₂ en nanoburbujas. Cuando la botella de cerveza se despresuriza al abrirla, la película de hidrofobina alrededor de las nanoburbujas puede llegar a romperse, provocando la liberación de CO₂ en exceso y así provocar la formación de espuma.



Figura 13 Liberación excesiva de espuma, denominado “Gushing” (Khalesi et al., 2015).

La presencia de hidrofobinas está ligada a la infección fúngica del grano de cebada, y cuando la malta es triturada en el mosto, se liberan estas proteínas en la cerveza (Lo et al., 2019). Por lo que se buscan alternativas para contrarrestar el efecto Gushing. Después del malteo se lleva a cabo el proceso de horneado que, dependiendo del tipo de cerveza por elaborar, se emplean las temperaturas adecuadas que además de darle las características organolépticas específicas podría desnaturalizar las hidrofobinas. Sin embargo, Askolin et al. (2006) hace

referencia que las hidrofobinas logran resistir temperaturas de 90 °C sin presentar signos de desnaturalización, lo que sólo deja a las cervezas oscuras donde el tiempo de horneado es de 105-177 °C (Postulkova et al., 2016).

Debido a la fuerte interacción que tienen las hidrofobinas con las moléculas de CO₂, se ha llegado a utilizar concentraciones de 40 µg L⁻¹ de ocimeno, un monoterpeno que logra bloquear la interacción del CO₂ y la hidrofobina, debido a que el ocimeno interactúa preferentemente con el parche hidrofóbico de la hidrofobina, logrando reducir el exceso de espuma, también la adición de 100 µL L⁻¹ de aceites de lúpulo que contiene linalol puede llegar a reducir entre un 50 y 60% el Gushing (Postulkova et al., 2016).

6.1.5 Recuperación mejorada de petróleo

En la industria petrolera se llevan a cabo 3 distintas fases de recuperación de petróleo, como primera fase de extracción la consideraremos como una fase de recuperación primaria en donde sólo se logra recuperar del 12 al 15% del petróleo, sin introducir sustancias al pozo. Cuando la presión dentro del depósito ya no le es suficiente para expulsar el aceite, se inyecta agua, pero sólo se recupera de un 15 a 20% adicional del aceite. Esta segunda operación es conocida como recuperación secundaria de petróleo o inundación de agua. La cantidad restante de aceite (60-70%) forma una fase discontinua, con gotas de aceite atrapadas por fuerzas capilares, que se pueden recoger mediante una tercera fase (recuperación terciaria o mejor conocido como recuperación mejorada de petróleo, EOR) (Blesic et al., 2018). Las microemulsiones (mezclas de hidrocarburos, agua y tensoactivos) son una técnica empleada en la fase terciaria, para tener una mayor extracción debido a que tienen la capacidad de reducir la tensión superficial aceite-agua (Bera & Mandal, 2015).

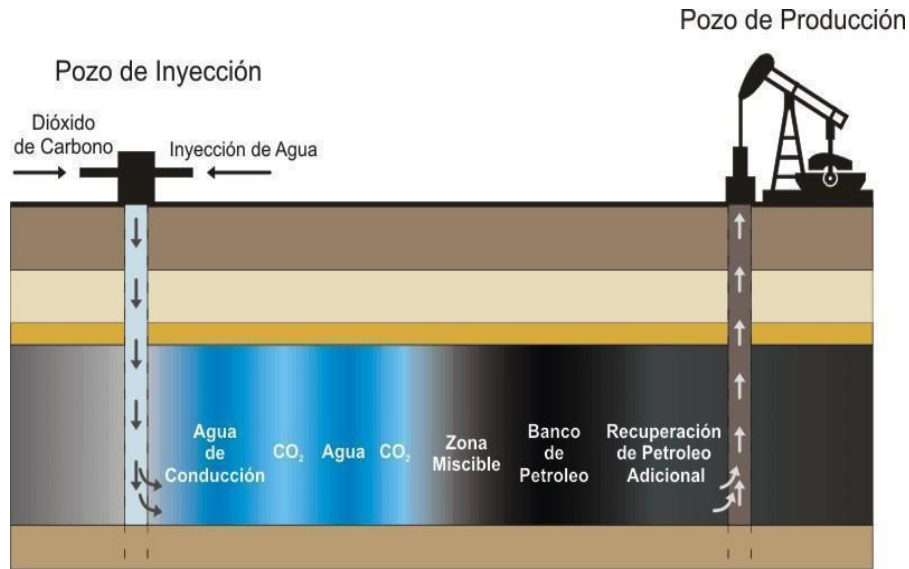


Figura 14 Representación de la extracción de petróleo.

Si se utilizan tensoactivos sintetizados químicamente, tienen un tiempo de degradación más lenta, provocando bioacumulaciones dando lugar a subproductos peligrosos para el medio ambiente. Mientras que los tensoactivos naturales tienen una baja toxicidad, son funcionales aún en condiciones extremas y son biodegradables (De Almeida et al., 2016) por lo que las hidrofobinas resultan ser un buen objetivo de estudio para la recuperación mejorada de petróleo (EOR). Blesic et al. (2018) utilizan una HFBII obtenida a partir de *T. reesei* para estudiar su estabilidad emulsionante en una mezcla de hidrocarburos modelo, que imitan los yacimientos de petróleo reales. Encontrando que HFBII forma una “barrera” de emulsión similar a un gel en la interfaz aceite/agua. La HFBII fue capaz de mantener emulsiones fuertes en aguas de mar sintéticas, y la salinidad del agua no afectaba la estabilidad de la proteína en el medio al compararse con otros tensoactivos, la HFBII presenta resultados favorables.

Debido a que las hidrofobinas tienden a tener una afinidad por las interfaces, pueden llegar a ser adecuadas para revestir superficies, alterando algunas propiedades en las interfaces con la formación de membranas anfipáticas. La patente US 2009 013 1281 A1 (Guzmann et al., 2009) proporciona el uso de una hidrofobina como emulsionante en un lodo de perforación. En dicha invención se menciona que las hidrofobinas mejoran el rendimiento de perforación

en la exploración y desarrollo de yacimientos, y se evita una rápida separación de fases del lodo de perforación y del material transportado.

En la recuperación mejorada de petróleo, las microemulsiones (mezclas de hidrocarburos, agua y tensoactivos) son una técnica empleada en la fase terciaria para tener una mayor extracción, debido a que pueden reducir la tensión superficial en aceite-agua. Los biosurfactantes como los ramnolípidos y los lipopéptidos, o la utilización de microorganismos o enzimas, pueden tener buenos resultados en la recuperación terciaria de petróleo, pero presentan desventajas debido a la hidrofobicidad de los componentes del aceite, la baja actividad de agua y su mala termoestabilidad (Rocha-Pino et al., 2018). Rocha-Pino et al. (2018) produjeron HFB de clase I a partir de *L. lecanii* en una fermentación en estado sólido usando espuma de poliuretano como soporte inerte, a una escala de 8.8 L, para ser aplicadas en EOR. Con esta HFB se logró un 14% de recuperación, similar a otros estudios donde se utilizan ramnolípidos diseñados en *E. coli*.

6.1.6 Biocontrol

Uno de los problemas en la producción agrícola son las enfermedades causadas por hongos patógenos en plantas, hortalizas, cereales, y frutas, lo que genera pérdidas económicas (Juarez et al., 2010). Por ello, se ha utilizado una gran gama de métodos como la aplicación de fungicidas químicos, tratamientos térmicos, entre otros. Sin embargo, la utilización de productos químicos ha traído grandes daños a la salud humana y sobre todo al ambiente, y también se han encontrado hongos resistentes a este tipo de productos. Frente a este problema, el control biológico se ha considerado como una alternativa más adecuada (Manzo et al., 2005). La soja es una leguminosa importante que está expuesta a la infección de la roya causada por el hongo patógeno *Phakopsora*, de la familia *Phacopsoraceae*, por lo que Schultheiss et al. (2015) desarrollaron un método para aumentar la resistencia de la soja frente a patógenos fúngicos, usando una formulación que contiene una hidrofobina para modificar la superficie, de manera que se logre disminuir la infección patogénica.

Las hidrofobinas son capaces de mediar el contacto y la comunicación entre los hongos y su entorno, incluyendo el reconocimiento y la adhesión a la superficie por infectar, sobre todo el desarrollo de estructuras de penetración durante las interacciones patógenas y simbióticas,

por lo que se considera que las hidrofobinas tienen una interacción planta-hongo (Zhang et al., 2019). Los resultados presentados por Schultheiss et al. (2015) muestran que la utilización de las hidrofobinas (Hidrofobina SC3, yaaD- HBII y HFBII (VTT)) en plantas de soja infectadas por roya reduce el área de la hoja enferma en comparación con las plantas control de un 6% - 20% sobre todas las plantas tratadas; los tratamientos realizados ayudan a aumentar la resistencia de la soja contra patógenos fúngicos, particularmente con el uso de la hidrofobina SC3.

6.1.7 Productos de cuidado personal

En la actualidad existe una diversidad de productos de cuidado personal en los cuales están involucrados los cosméticos, fragancias, cremas, entre otros. Dentro de su elaboración se han utilizado una gama de ingredientes ya sean de origen natural como ingredientes botánicos y aceites esenciales (PROMPERU, 2013). Los productos que son destinados como tratamiento para el cuidado del cabello, llegan a tener desventajas; algunos de los ingredientes utilizados en su formulación no son capaces de absorberse fácilmente o no se absorben al 100%, además de que estos productos se llegan a eliminar fácilmente durante el lavado del cabello. La patente US 2003 0217419 A1 (Gabin, 2003) declara que la utilización de las hidrofobinas para tratar distintos tipos de superficies, puede ser benéfica para contrarrestar los problemas de los productos cosméticos ya mencionados. En otro caso la utilización de hidrofobinas como revestimientos en tintes hidrófilos no permanentes para el cabello ha resultado en una mayor intensidad de cabello y un periodo de lavado más largo de teñido, determinando que ocurre una mejor absorción del tinte sobre el cabello (Barg et al., 2011).

Por otro lado, la invención WO 2012 019896 A1 (D'Agostino et al., 2012) proporciona una formulación para el cuidado bucal, basada en una emulsión aceite en agua con la integración de una hidrofobina clase II obtenida de *T. reesei*, la cual ayuda a mejorar la deposición de los componentes de la fase oleosa sobre las superficies de la cavidad bucal como son el esmalte y la dentina de los dientes. En las formulaciones para el cuidado oral se encuentran los ingredientes activos para el tratamiento de caries, sensibilidad dental, erosión dental o gingivitis, pero si estos no son retenidos al contacto con la superficie por tratar durante un tiempo largo, es posible que la eficacia se minimice o no logre su objetivo. En la invención

anterior mencionada que se sometieron placas dentales con una formulación que incluía el 0.15% en peso de la hidrofobina, se evaluó la deposición mediante microscopía confocal fluorescente y estereomicroscopía, y se encontró que, a pesar de ser lavada y cepillada la dentadura, se presentaba aún la formulación con hidrofobina.

6.1.8 Revestimientos de superficies

Algunos materiales de uso común pueden ser revestidos para mejorar su durabilidad y apariencia. La conservación de materiales necesarios en construcción como son la cerámica, la piedra, el bloque de hormigón entre otros, deben de contrarrestar su desgaste ante la humedad y la suciedad. Los repelentes de la suciedad deben impedir o dificultar el ensuciamiento de las superficies o, en su caso, facilitar que se desprenda fácilmente la suciedad de sustancias líquidas o sólidas. Debido a la afinidad que pueden tener las hidrofobinas, son utilizables para revestir superficies. Así, la invención ES 2353904 T3 (Becker et al., 2011) utiliza una proteína de fusión yaad-Xa-dewA-his en una cantidad de 0.01% en peso para observar si ocurre un impedimento de la suciedad en baldosas de cerámica. Sin embargo, lo que se pudo observar es que la adherencia de la suciedad sólo disminuyó y no hubo el impedimento que se buscaba. Además del deterioro por suciedad, puede haber un deterioro por agua en distintos materiales como en piedra; durante varios años se han propuesto distintos tratamientos para disminuir la absorción del agua en este material, como el aumento de la rugosidad de la superficie del sustrato, tratamiento con plasma, utilización de ceras sintéticas o naturales, resinas o incluso nanopartículas de sílice o dióxido de titanio. En este contexto, Winandy et al. (2019) estudiaron otra alternativa para revestir diferentes tipos de piedra (piedra arenisca, piedra caliza y mármol de carrara) usando una hidrofobina de clase I DewA de *A. nidulans* y una hidrofobina de clase II de *T. reesei*. Con sólo la cantidad de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ se puede obtener revestimientos homogéneos en bloques de 5x5x1 cm para realizar mediciones de ángulo de contacto y determinar los tiempos de absorción de agua, y ambas hidrofobinas hicieron que los tres tipos de material tratados aumentaron su hidrofobicidad, aunque se destaca más la eficacia de DewA que la hidrofobina obtenida por *T. reesei*. Los revestimientos con hidrofobinas no disminuyen la permeabilidad al vapor de las muestras, lo que indica que el recubrimiento con estas proteínas no obstruye

los poros de la piedra, y se puede evaporar el agua, lo que disminuirá los daños ocasionados por la acumulación de ésta en los materiales. Sin embargo, Winandy et al. hacen la invitación de seguir investigando en la utilización de las hidrofobinas en conjunto con pequeños péptidos para proporcionar un producto de consolidación.

6.2 Péptidos

6.2.1 Empaques para la conservación de alimentos

Comúnmente, en la industria alimentaria se recurre a métodos de envasado para la conservación de alimentos que son expuestos a factores ambientales que lo deterioran, como es el caso del vapor de agua, el calor, la presión, la oxidación, los rayos ultravioletas y, sobre todo, la contaminación microbiana. Por ello, se ha estudiado los AMP como posibles bioconservantes, ya que se ha informado que los AMP de cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas*, tienen una actividad inhibitoria contra *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Shigella* y *Staphylococcus aureus*. Así, la utilización de AMP podría ayudar a prolongar la vida útil de los alimentos, inhibiendo los patógenos y reducir pérdidas económicas debido al desperdicio y deterioro. Debido a esta problemática, se ha optado por el desarrollo de envasados activos en donde se adiciona uno o varios agentes antimicrobianos al envase, utilizando métodos de encapsulación a través de liposomas, emulsiones, partículas biopoliméricas, nanofibras y nanopelículas (Liu et al., 2021).

Zohri et al. en el 2013, encontraron que las nanopartículas de quitosano cargadas con nisina se pueden utilizar para la conservación de quesos; otros péptidos usados ha sido el pediocin ACH que tienen actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogens*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. El uso de nisina en combinación con otros antimicrobianos como el timol y la lisozima han sido muy eficaces (Rai et al., 2016). Se han llevado a cabo procesos de nanoencapsulación de nisina en lecitina de soja mediante métodos que no necesitan disolventes orgánicos para la formulación de películas biodegradables, en donde la nisina sigue siendo eficaz para controlar los patógenos fúngicos sin modificar las propiedades físico-químicas de la película (Imran et al., 2012).

6.2.2 Péptidos anticancerígenos

El cáncer es una de las enfermedades más agresivas que existen, caracterizada por el crecimiento desregulado de células anormales; por lo que se busca eliminar estas células cancerosas sin afectar los tejidos sanos. Los AMP muestran efectos anticancerígenos al desestabilizar la membrana externa de las células cancerosas o membranas de las mitocondrias en las células. Las células no cancerosas presentan una carga neutra debido a la presencia de fosfolípidos de ion híbrido como la fosfatidilcolina y esfingomiélinas ubicados en el interior de la membrana plasmática, mientras que las células cancerosas, pierden esta membrana, lo que aumenta su carga negativa favoreciendo una mayor interacción con los AMP lo que inducirá la muerte de las células cancerosas a través de dos mecanismos generales como la apoptosis o la necrosis. Por otro lado, debido a que los AMP pueden desestabilizar la membrana externa de las células cancerosas, los péptidos pueden facilitar la acción de fármacos citotóxicos (Boohaker et al., 2012; Nyström & Malmsten, 2018). Asimismo, se ha mencionado que los péptidos tienen éxito en la eliminación de células tumorales tanto in vitro como in vivo y previenen la formación de metástasis. También se han utilizado péptidos que inhiben el crecimiento de carcinomas primarios de próstata y mama después de ser inyectados por vía intratumoral. NRC-03 y NRC-07 son dos péptidos de la familia de pleurocidina AMP que tienen actividad contra células de cáncer de mama, con afinidad disminuida hacia células sanas (Gaspar et al., 2013). El HNP-1 recluta y activa células dendríticas en términos de actividad inmunomoduladora, e inhibe la angiogénesis, que es un proceso necesario para el crecimiento y desarrollo de tumores (Felício et al., 2017).

Conclusiones

Los microorganismos son una fuente de explotación industrial para la obtención de diversos compuestos enzimáticos y proteicos que pueden aplicarse a diversas áreas; los cuales, frente a los compuestos sintéticos que traen problemas de salud, tienen la ventaja de no presentar efectos indeseables sobre el ambiente ni en la salud humana. No obstante, su uso competitivo implica que deben disminuir los costos de los procesos de producción, además de tener un mismo funcionamiento o aún mejor para sus aplicaciones. A pesar de que la industria genera grandes cantidades de desechos y son principales focos de contaminación, no se han establecido condiciones específicas para obtener resultados rentables en la producción de péptidos e hidrofobinas por lo que se sigue trabajando en la identificación del tipo de residuos mejores para su obtención.

Las moléculas anfifílicas tienen un gran potencial debido a sus propiedades interesantes; en particular, las hidrofobinas pueden competir con los tensoactivos sintéticos y estar al mismo nivel de los biosurfactantes que se obtienen por bacterias como los ramnolípidos y los soforolípidos, que son los más utilizados en la industria. Asimismo, los péptidos compiten con otros tipos de antibióticos que en la actualidad se han convertido en un problema por generar resistencia a diversos patógenos; resultado de su consumo excesivo y su uso inadecuado.

Perspectivas en biotecnología

La biotecnología ha sido la herramienta clave para un desarrollo eficiente de varias áreas cuando se tiene en cuenta que cualquier proceso que se lleve a cabo debe ser amigable con el medio ambiente y la salud humana. Sin embargo, los residuos o desechos agroindustriales o de alimentos provocan importantes de contaminación, por lo que conviene buscar alternativas de uso para reducir su acumulación excesiva. Diferentes autores han realizado fermentaciones ya sea en estado sólido o líquido, agregando sustratos de distintos tipos desde cáscaras de semillas o frutas, maíz, cebada, diferentes tipos de aceites de palma, coco, almendras, residuos marinos como cáscaras de camarón y espinas de pescado, residuos de la industria láctea, entre otros. Sin embargo, aún no se han encontrado condiciones favorables para la producción de hidrofobinas y péptidos a escala industrial que permita su disponibilidad en el mercado.

El objetivo de desarrollar procesos donde se utilicen microorganismos es la obtención de subproductos a partir de sustratos de origen natural, que compiten significativamente y consecuentemente desalientan el uso de compuestos sintéticos y así evitar sus repercusiones nocivas para la salud. Investigaciones recientes han demostrado que tanto los péptidos como las hidrofobinas cumplen funciones similares a muchos productos sintéticos en las áreas de medicina, en el envasado de conservación de alimentos, en formulaciones para emulsiones, en la industria del petróleo, etc. Por ello, debemos seguir trabajando continuamente para establecer las condiciones necesarias para la producción de estos biocompuestos. Esta tarea implica estudiar los diferentes factores que intervienen en sus procesos productivos, desde la concentración inicial de sustrato, los tratamientos previos requeridos que favorezcan ser consumidos más rápidamente por el microorganismo, o si el uso de sustratos mixtos puede mejorar los rendimientos, optimizar las condiciones de pH y temperatura, el tipo de fermentación líquida o sólida que mejor se aplica en cada caso, la morfología más conveniente de los soportes inertes que ayudan al desarrollo del microorganismo, aunque no aportan nutrientes. Finalmente, tan importante como todas las condiciones establecidas anteriormente es la rentabilidad que favorece su uso industrial intensivo.

Bibliografía

Aksay, S., & Mazza, G. (2007). Optimization of protein recovery by foam separation using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 79(2), 598–606. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.02.024>

Aldred, D. L., Berry, M. J., Cebula, D. J., Golding, M. D., Golding, S., Keenan, R. D., Malone, M. E., & Twigg, S. (2006). *US 2006 0024419 A1*.

Aldred, D. L., Cox, A. R., & Stoyanov, S. (2007). *US 2007 011 6848 A1*.

Arifiyanto, A., Surtiningsih, T., Ni'matuzahroh, Fatimah, Agustina, D., & Alami, N. H. (2020). Antimicrobial activity of biosurfactants produced by actinomycetes isolated from rhizosphere of Sidoarjo mud region. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24, 101513. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101513>

Arulrajah, B., Muhialdin, B. J., Zarei, M., Hasan, H., & Saari, N. (2020). Lacto-fermented Kenaf (*Hibiscus cannabinus L.*) seed protein as a source of bioactive peptides and their applications as natural preservatives. *Food Control*, 110, 106969. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106969>

Askolin, S., Linder, M., Scholtmeijer, K., Tenkanen, M., Penttilä, M., de Vocht, M. L., & Wösten, H. A. B. (2006). Interaction and comparison of a class I hydrophobin from *Schizophyllum commune* and class II Hydrophobins *Trichoderma reesei*. *Biomacromolecules*, 7(4), 1295–1301. <https://doi.org/10.1021/bm050676s>

Askolin, S., Penttilä, M. E., Wosten, H. A. B., & Nakari-Setälä, T. (2005). The *Trichoderma reesei* hydrophobin genes hfb1 and hfb2 have diverse functions in fungal development. *FEMS Microbiology Letters*, 253(2), 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.047>

Ball, S. R., Kwan, A. H., & Sunde, M. (2020). Hydrophobin rodlets on the fungal cell wall. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 425, 29–51. https://doi.org/10.1007/82_2019_186

Ballesteros Martínez, M. A., & Quiroga Villarraga, I. V. (2016). Modelamiento y simulación en CFD de la transferencia de momento y calor en los dos sistemas de refrigeración de una

- máquina de soft serve ice cream. 40. <http://hdl.handle.net/1992/18838>
- Barg, H., Subkowski, T., Karos, M., & Bollschweiler, C. (2011). *US 2011 0192416 A1*. <https://patents.google.com/patent/US20110192416>
- Batista, C. A. S., Larson, R. G., & Kotov, N. A. (2015). Nonadditivity of nanoparticle interactions. *Science*, *350*(6257). <https://doi.org/10.1126/science.1242477>
- Bayry, J., Aïmanianda, V., Iñ Aki Guijarro, J., Sunde, M., & Latgé, J.-P. (2012). Hydrophobins-Unique Fungal Proteins. *PLoS Pathogens*, *8*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002700>
- Becker, H., Karos, M., Subkowski, T., Bollschweiler, C., Lemaire, H.-G., & Baus, U. (2011). *ES 2 353 904 T3*.
- Bera, A., & Mandal, A. (2015). Microemulsions: a novel approach to enhanced oil recovery: a review. *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology*, *5*(3), 255–268. <https://doi.org/10.1007/s13202-014-0139-5>
- Berger, B. W., & Sallada, N. D. (2019). Hydrophobins: Multifunctional biosurfactants for interface engineering. *Journal of Biological Engineering*, *13*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13036-018-0136-1>
- Blesic, M., D'Ichiarante, V., Milani, R., Linder, M., & Metrangolo, P. (2018). Evaluating the potential of natural surfactants in the petroleum industry: The case of hydrophobins. *Pure and Applied Chemistry*, *90*(2), 305–314. <https://doi.org/10.1515/pac-2017-0703>
- Buthe, A., Hafner, A., Kaufmann, F., & Gabor, E. (2010). *WO2010060811*.
- Campos, J. M., Montenegro Stamford, T. L., Sarubbo, L. A., de Luna, J. M., Rufino, R. D., & Banat, I. M. (2013). Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnology Progress*, *29*(5), 1097–1108. <https://doi.org/10.1002/btpr.1796>
- Carrillo-Rayas, M. T., & Blanco-Labra, A. (2009). Potencial y Algunos de los Mecanismos de Acción de los Hongos Entomopatógenos para el Control de Insectos Plaga. *Acta Universitaria*, *19*(2), 40–49. <https://doi.org/10.15174/au.2009.102>
- Castañeda Ramírez, C., De la Fuente Salcido, N. M., Pacheco Cano, R. D., Ortiz-Rodríguez,

- T., & Barboza Corona, J. E. (2011). Potencial de los quito-oligosacáridos generados de quitina y quitosana. *Acta Universitaria*, 21(3), 14–23. <https://doi.org/10.15174/au.2011.16>
- Cavalcante, R. S., Lima, H. L. S., Pinto, G. A. S., Gava, C. A. T., & Rodrigues, S. (2008). Effect of moisture on *trichoderma* conidia production on corn and wheat bran by solid state fermentation. *Food and Bioprocess Technology*, 1(1), 100–104. <https://doi.org/10.1007/s11947-007-0034-x>
- Chakraborty, S., Ghosh, M., Chakraborti, S., Jana, S., Sen, K. K., Kokare, C., & Zhang, L. (2015). Biosurfactant produced from Actinomycetes nocardopsis A17: Characterization and its biological evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 405–412. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.04.068>
- Challis, G. L., & Naismith, J. H. (2004). Structural aspects of non-ribosomal peptide biosynthesis. *Current Opinion in Structural Biology*, 14(6), 748–756. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.10.005>
- Chandrasekaran, M., Thangavelu, B., Chun Chul, S., & Sathiyabama, M. (2016). Proteases from phytopathogenic fungi and their importance in phytopathogenicity. *J Gen Plant Pathol*, 82, 233–239. <https://doi.org/10.1007/s10327-016-0672-9>
- Cook, K. L. K., & Hartel, R. W. (2010). Mechanisms of ice crystallization in ice cream production. *Food Science and Food Safety*, 9(2), 213–222. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00101.x>
- Cox, A. R., Aldred, D. L., & Russell, A. B. (2009). Exceptional stability of food foams using class II hydrophobin HFBII. *Food Hydrocolloids*, 23(2), 366–376. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.03.001>
- D'Agostino, M., Hedges, N., & Nandi, A. (2012). *WO 2012 019896 A1*.
- Damodaran, S. (2005). Protein stabilization of emulsions and foams. *Journal of Food Science*, 70(3). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07150.x>
- De Almeida, D. G., Soares Da Silva, R. de C. F., Luna, J. M., Rufino, R. D., Santos, V. A., Banat, I. M., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: Promising molecules for petroleum biotechnology advances. *Frontiers in Microbiology*, 7(OCT), 1–14.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01718>

Deckers, S. M., Lorgouilloux, Y., Gebruers, K., Baggerman, G., Verachtert, H., Neven, H., Michiels, C., Derdelinckx, G., Delcour, J. A., & Martens, J. (2011). Dynamic light scattering (DLS) as a tool to detect CO₂-hydrophobin structures and study the primary gushing potential of beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 69(3), 144–149. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2011-0524-01>

Domínguez, Á., Martínez, M. Á., & López, V. E. (2019). Advances on research in the use of agro-industrial waste in biosurfactant production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(10), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2729-3>

Ellaiah, P., Srinivasulu, B., & Adinarayana, K. (2004). Optimisation studies on neomycin production by a mutant strain of *Streptomyces marinensis* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 39(5), 529–534. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00059-6](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00059-6)

Erjavec, J., Kos, J., Ravnikar, M., Dreo, T., & Sabotič, J. (2012). Proteins of higher fungi - from forest to application. *Trends in Biotechnology*, 30(5), 259–273. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.01.004>

Felício, M. R., Silva, O. N., Gonçalves, S., Santos, N. C., & Franco, O. L. (2017). Peptides with dual antimicrobial and anticancer activities. *Frontiers in Chemistry*, 5(Feb), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00005>

Gabin, V. (2003). *US 2003 0217419 A1*.

Gaspar, D., Veiga, A. S., Castanho, M. A. R. B., Franco, O. L., & Martins, A. M. A. (2013). From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00294>

Guzmann, M., Liu, Y., & Ulf, B. (2009). *US 2009 0131281 A1*.

Hähl, H., Vargas, J. N., Griffio, A., Laaksonen, P., Szilvay, G., Lienemann, M., Jacobs, K., Seemann, R., & Fleury, J. B. (2017). Pure Protein Bilayers and Vesicles from Native Fungal Hydrophobins. *Advanced Materials*, 29(1). <https://doi.org/10.1002/adma.201602888>

Hektor, H. J., & Scholtmeijer, K. (2005). Hydrophobins: Proteins with potential. *Current*

Opinion in Biotechnology, 16(4), 434–439. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.05.004>

Holder, D. J., & Keyhani, N. O. (2005). Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (*Cordyceps*) *bassiana* to Substrata. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5260–5266. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5260-5266.2005>

Hou, S., Yang, K., Qin, M., Feng, X. Z., Guan, L., Yang, Y., & Wang, C. (2008). Patterning of cells on functionalized poly(dimethylsiloxane) surface prepared by hydrophobin and collagen modification. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(4), 912–916. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.07.045>

Houde, A., Kademi, A., & Leblanc, D. (2004). Lipases and Their Industrial Applications. In *Applied Biochemistry and Biotechnology* (Vol. 118).

Imran, M., Revol-Junelles, A. M., René, N., Jamshidian, M., Akhtar, M. J., Arab-Tehrany, E., Jacquot, M., & Desobry, S. (2012). Microstructure and physico-chemical evaluation of nano-emulsion-based antimicrobial peptides embedded in bioactive packaging films. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 407–419. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.04.010>

Jaeger, K. E., & Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 390–397. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00341-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00341-5)

Jang, C. H., Cho, Y. B., Jang, Y. S., Kim, M. S., & Kim, G. H. (2015). Antibacterial effect of electrospun polycaprolactone/polyethylene oxide/vancomycin nanofiber mat for prevention of periprosthetic infection and biofilm formation. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 79(8), 1299–1305. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2015.05.037>

Jiang, Y., Chen, Y., Song, Z., Tan, Z., & Cheng, J. (2021). Recent advances in design of antimicrobial peptides and polypeptides toward clinical translation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 170, 261–280. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.12.016>

Juarez, G. P., Sosa, M. E., & Lopez, A. (2010). Hongos Fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. In *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* (Vol. 4, pp. 14–23).

Junco Diaz, R. de los A., & Rodríguez Pérez, C. M. (2015). *Cultivo y crecimiento de los*

microorganismos. January 2001, 45–54.

Kakahi, F. B., Ly, S., Tarayre, C., Deschaume, O., Bartic, C., Wagner, P., Compère, P., Derdelinckx, G., Blecker, C., & Delvigne, F. (2019). *Modulation of fungal biofilm physiology and secondary product formation based on physico-chemical surface properties*. 42, 1935–1946. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02187-6>

Kallio, J. M., & Rouvinen, J. (2011). Amphiphilic nanotubes in the crystal structure of a biosurfactant protein hydrophobin HFBII. *Chemical Communications*, 47(35), 9843–9845. <https://doi.org/10.1039/c1cc13139g>

Ketola, A. (2016). *Determination of surfactants in industrial waters of paper- and board mills*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.36735.41124>

Khalesi, M., Gebruers, K., & Derdelinckx, G. (2015). Recent Advances in Fungal Hydrophobin Towards Using in Industry. *Protein Journal*, 34(4), 243–255. <https://doi.org/10.1007/s10930-015-9621-2>

Khalesi, M., Venken, T., Deckers, S., Winterburn, J., Shokribousjein, Z., Gebruers, K., Verachtert, H., Delcour, J., Martin, P., & Derdelinckx, G. (2013). A novel method for hydrophobin extraction using CO₂ foam fractionation system. *Industrial Crops and Products*, 43(1), 372–377. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.048>

Khalesi, M., Zune, Q., Telek, S., Riveros-Galan, D., Verachtert, H., Toye, D., Gebruers, K., Derdelinckx, G., & Delvigne, F. (2014). Fungal biofilm reactor improves the productivity of hydrophobin HFBII. *Biochemical Engineering Journal*, 88, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.05.001>

Kisko, K., Szilvay, G. R., Vainio, U., Linder, M. B., & Serimaa, R. (2008). Interactions of hydrophobin proteins in solution studied by small-angle X-ray scattering. *Biophysical Journal*, 94(1), 198–206. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.112359>

Krupodorova, T. A., & Barshteyn, V. Y. (2015). Alternative substrates for higher mushrooms mycelia cultivation Alternative substrates for higher mushrooms mycelia cultivation. *J. BioSci. Biotechnol.*, 4(3)(December), 339–347.

Kulkarni, S., Nene, S., & Joshi, K. (2017). Production of Hydrophobins from fungi. *Process*

- Biochemistry*, 61(January), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.06.012>
- Kumbar, S. G., Laurencin, C. T., & Deng, M. (2014). *Natural and synthetic biomedical Polymers* (1st Editio).
- Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J. P., & Atala, A. (2020). *Principles of Tissue Engineering* (P. Academica (ed.)). Andre Gerhard Wolff.
- Linder, M. B. (2009). Hydrophobins: Proteins that self assemble at interfaces. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 14(5), 356–363. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.04.001>
- Linder, M., Selber, K., Nakari-Setälä, T., Qiao, M., Kula, M. R., & Penttilä, M. (2001). The hydrophobins HFBI and HFBII from *Trichoderma reesei* showing efficient interactions with nonionic surfactants in aqueous two-phase systems. *Biomacromolecules*, 2(2), 511–517. <https://doi.org/10.1021/bm0001493>
- Linder, Markus, Szilvay, G. R., Nakari-Setälä, T., & Penttilä, M. E. (2005). Hydrophobins: The protein-amphiphiles of filamentous fungi. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 29, Issue 5, pp. 877–896). <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.01.004>
- Liu, X., Situ, A., Kang, Y., Villabroza, K. R., Liao, Y., Chang, C. H., Donahue, T., Nel, A. E., & Meng, H. (2016). Irinotecan Delivery by Lipid-Coated Mesoporous Silica Nanoparticles Shows Improved Efficacy and Safety over Liposomes for Pancreatic Cancer. *ACS Nano*, 10(2), 2702–2715. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b07781>
- Liu, Y., Sameen, D. E., Ahmed, S., Dai, J., & Qin, W. (2021). Antimicrobial peptides and their application in food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 112, 471–483. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.019>
- Lizarbe, M. A. (2007). Sustititivos de tejidos: de los biomateriales a la ingeniería tisular. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat.* (Esp), 101, 227–249. <https://doi.org/10.1155/2016/5615124>
- Lo, V., I-Chun Lai, J., & Sunde, M. (2019). Fungal Hydrophobins and Their Self-Assembly into Functional Nanomaterials. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1174, 161–185. https://doi.org/10.1007/978-981-13-9791-2_5

Maiolo, D., Pigliacelli, C., Sánchez Moreno, P., Violatto, M. B., Talamini, L., Tirota, I., Piccirillo, R., Zucchetti, M., Morosi, L., Frapolli, R., Candiani, G., Bigini, P., Metrangolo, P., & Baldelli Bombelli, F. (2017). Bioreducible Hydrophobin-Stabilized Supraparticles for Selective Intracellular Release. *ACS Nano*, *11*(9), 9413–9423. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b04979>

Mankel, A., Krause, K., & Kothe, E. (2002). Identification of a hydrophobin gene that is developmentally regulated in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma terreum*. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(3), 1408–1413. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1408-1413.2002>

Manzo Sánchez, G., Canché Canto, B., & James Kay, A. (2005). *Hongos patógenos: enemigos versátiles.* 71–75. https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/56_3/hongos.pdf

Matsumoto, Y., Saucedo-Castañeda, G., Revah, S., & Shirai, K. (2004). Production of β -N-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. *Process Biochemistry*, *39*(6), 665–671. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00140-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00140-7)

McCullen, S. D., Ramaswamy, S., Clarke, L. I., & Gorga, R. E. (2009). Nanofibrous composites for tissue engineering applications. *Nanomedicine and Nanobiotechnology*, *1*(4), 369–390. <https://doi.org/10.1002/wnan.39>

Mohamad Asri, N., Muhiyaldin, B. J., Zarei, M., & Saari, N. (2020). Low molecular weight peptides generated from palm kernel cake via solid state lacto-fermentation extend the shelf life of bread. *Lwt*, *134*(June), 110206. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110206>

Morris, V. K., Kwan, A. H., & Sunde, M. (2013). Analysis of the structure and conformational states of DewA gives insight into the assembly of the fungal hydrophobins. *Journal of Molecular Biology*, *425*(2), 244–256. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.10.021>

Novelli, P. K., Barros, M. M., & Fleuri, L. F. (2016). Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. *Food Chemistry*, *198*, 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.089>

- Paananen, A., Weich, S., Szilvay, G. R., Leitner, M., Tappura, K., & Ebner, A. (2021). Quantifying biomolecular hydrophobicity: Single molecule force spectroscopy of class II hydrophobins. *Journal of Biological Chemistry*, 100728. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100728>
- Pakula, T., Saloheimo, M., Hakkinen, M., Westerholm- Parvinen, A., Penttilä, M., & Vitikainen, E. (2016). *US 2016 0108409 A1*.
- Panesar, R., Kaur, S., & Panesar, P. S. (2015). Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: A review. *Current Opinion in Food Science*, 1(1), 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.12.002>
- Park, J. Il, Nguyen, T. D., De Queirós Silveira, G., Bahng, J. H., Srivastava, S., Zhao, G., Sun, K., Zhang, P., Glotzer, S. C., & Kotov, N. A. (2014). Terminal supraparticle assemblies from similarly charged protein molecules and nanoparticles. *Nature Communications*, 5(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms4593>
- Postulkova, M., Riveros-Galan, D., Cordova-Agiular, K., Zitkova, K., Verachtert, H., Derdelinckx, G., Dostalek, P., Ruzicka, M. C., & Branyik, T. (2016). Technological possibilities to prevent and suppress primary gushing of beer. *Trends in Food Science and Technology*, 49, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.12.006>
- PROMPERU. (2013). Estudio del mercado estadounidense para el sector de productos naturales cosméticos y de cuidado personal.
- Rai, M., Pandit, R., Gaikwad, S., & Kövics, G. (2016). Antimicrobial peptides as natural bio-preservative to enhance the shelf-life of food. *Journal of Food Science and Technology*, 53(9), 3381–3394. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2318-5>
- Ravindran, R., Hassan, S. S., Williams, G. A., & Jaiswal, A. K. (2018). A Review on Bioconversion of Agro-Industrial Wastes to Industrially Important Enzymes. *Bioengineering*, 5, 93. <https://doi.org/10.3390/bioengineering5040093>
- Reimer, J. M., Haque, A. S., Tarry, M. J., & Schmeing, T. M. (2018). Piecing together nonribosomal peptide synthesis. *Current Opinion in Structural Biology*, 49, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.01.011>

- Rocha-Pino, Z., Ramos-López, J. I., Gimeno, M., Barragán-Aroche, F., Durán-Valencia, C., López-Ramírez, S., & Shirai, K. (2018). Enhanced oil recovery by hydrophobins from *Lecanicillium lecanii*. *Fuel*, 224(January), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.03.058>
- Rocha-Pino, Z., Viguera, G., Sepúlveda-Sánchez, J. D., Hernández-Guerrero, M., Campos-Terán, J., Fernández, F. J., & Shirai, K. (2015). The hydrophobicity of the support in solid state culture affected the production of hydrophobins from *Lecanicillium lecanii*. *Process Biochemistry*, 50(1), 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.10.021>
- Rocha-Pino, Z., Viguera, G., & Shirai, K. (2011). Production and activities of chitinases and hydrophobins from *Lecanicillium lecanii*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34(6), 681–686. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0517-z>
- Ruckh, T. T., Oldinski, R. A., Carroll, D. A., Mikhova, K., Bryers, J. D., & Popat, K. C. (2012). Antimicrobial effects of nanofiber poly(caprolactone) tissue scaffolds releasing rifampicin. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23(6), 1411–1420. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4609-3>
- Saha, A., Nir, S., & Reches, M. (2020). Amphiphilic Peptide with Dual Functionality Resists Biofouling. *Langmuir*, 36(15), 4201–4206. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b03997>
- Scholtmeijer, K., Janssen, M. I., Gerssen, B., De Vocht, M. L., Van Leeuwen, B. M., Van Kooten, T. G., Wösten, H. A. B., & Wessels, J. G. H. (2002). Surface modifications created by using engineered hydrophobins. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3), 1367–1373. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1367-1373.2002>
- Schultheiss, H., Flachmann, R., Subkowski, T., & Bollschweiler, C. (2015). *US 2015 0074842 A1*.
- Seidl, V. (2008). Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews*, 22(1), 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2008.03.002>
- Sevim, A., Donzelli, B. G. G., Wu, D., Demirbag, Z., Gibson, D. M., & Turgeon, B. G. (2012). Hydrophobin genes of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium brunneum*, are differentially expressed and corresponding mutants are decreased in virulence. *Current*

Genetics, 58(2), 79–92. <https://doi.org/10.1007/s00294-012-0366-6>

Shubakov, A. A., & Kucheryavykh, P. S. (2004). Chitinolytic activity of filamentous fungi. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40(5), 445–447. <https://doi.org/10.1023/B:ABIM.0000040665.98210.97>

Shwaiki, L. N., Lynch, K. M., & Arendt, E. K. (2021). Future of antimicrobial peptides derived from plants in food application – A focus on synthetic peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 112(April), 312–324. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.010>

Singh, N., & Abraham, J. (2014). Ribosomally synthesized peptides from natural sources. *The Journal of Antibiotics*, 67, 277–289. <https://doi.org/10.1038/ja.2013.138>

Song, D., Gao, Z., Zhao, L., Wang, X., Xu, H., Bai, Y., Zhang, X., Linder, M. B., Feng, H., & Qiao, M. (2016). High-yield fermentation and a novel heat-precipitation purification method for hydrophobin HGFI from *Grifola frondosa* in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 128, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2016.07.014>

Subramaniam, R., & Vimala, R. (2012). Solid State and Submerged Fermentation for the Production of Bioactive Substances: a Comparative Study. 3(3), 480–486.

Sunde, M., Kwan, A. H. Y., Templeton, M. D., Beever, R. E., & Mackay, J. P. (2007). Structural analysis of hydrophobins. *Micron*, 39(7), 773–784. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2007.08.003>

Torchilin, V. P. (2014). Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(11), 813–827. <https://doi.org/10.1038/nrd4333>

Trembley, M. L., Ringli, C., & Honegger, R. (2002). Hydrophobins DGH1, DGH2, and DGH3 in the lichen-forming basidiomycete *Dictyonema glabratum*. *Fungal Genetics and Biology*, 35(3), 247–259. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2001.1325>

Um, J., Manguy, J., Anes, J., Jacquier, J. C., Hurley, D., Dillon, E. T., Wynne, K., Fanning, S., O’Sullivan, M., & Shields, D. C. (2021). Enriching antimicrobial peptides from milk hydrolysates using pectin/alginate food-gels. *Food Chemistry*, 352(February). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129220>

Vigueras, G., Shirai, K., Hernández-Guerrero, M., Morales, M., & Revah, S. (2014). Growth of the fungus *Paecilomyces lilacinus* with n-hexadecane in submerged and solid-state cultures and recovery of hydrophobin proteins. *Process Biochemistry*, *49*(10), 1606–1611. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.06.015>

Vigueras, G., Shirai, K., Martins, D., Franco, T. T., Fleuri, L. F., & Revah, S. (2008). Toluene gas phase biofiltration by *Paecilomyces lilacinus* and isolation and identification of a hydrophobin protein produced thereof. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *80*(1), 147–154. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1490-6>

Wang, X., Mao, J., Chen, Y., Song, D., Gao, Z., Zhang, X., Bai, Y., Saris, P. E. J., Feng, H., Xu, H., & Qiao, M. (2017). Design of antibacterial biointerfaces by surface modification of poly (ϵ -caprolactone) with fusion protein containing hydrophobin and PA-1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *151*, 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.12.019>

Ward, W., & Swiatek, G. (2009). Protein Purification. *Current Analytical Chemistry*, *5*, 85–105. <https://doi.org/10.4324/9780203967621-11>

Wessels, J. G. H. (2000). Hydrophobins, unique fungal proteins. *Mycologist*, *14*(4), 153–159. [https://doi.org/10.1016/S0269-915X\(00\)80030-0](https://doi.org/10.1016/S0269-915X(00)80030-0)

Winandy, L., Schlebusch, O., & Fischer, R. (2019). Fungal hydrophobins render stones impermeable for water but keep them permeable for vapor. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42705-w>

Woo, J. H., & Kamei, Y. (2003). Antifungal mechanism of an anti-Pythium protein (SAP) from the marine bacterium *Streptomyces sp.* strain AP77 is specific for *Pythium porphyrae*, a causative agent of red rot disease in *Porphyra spp.* *Applied Microbiology and Biotechnology*, *62*(4), 407–413. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1235-5>

Wösten, H. A. B. (2001). Hydrophobins: Multipurpose proteins. *Annual Review of Microbiology*, *55*, 625–646. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.625>

Wösten, H. A. B., & de Vocht, M. L. (2000). Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1469*, 79–86. <http://ageconsearch.umn.edu/bitstream/61868/2/AAEA Bento Ho Poe Taber ff.pdf>

Wösten, H. A. B., & Scholtmeijer, K. (2015). Applications of hydrophobins: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(4), 1587–1597. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6319-x>

Wösten, H. A. B., & Willey, J. M. (2000). Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow into the air. *Microbiology*, 146(4), 767–773. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-4-767>

Zhang, D., Lu, Y., Chen, H., Wu, C., Zhang, H., Chen, L., & Chen, X. (2020). Antifungal peptides produced by actinomycetes and their biological activities against plant diseases. *Journal of Antibiotics*, 73(5), 265–282. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0287-4>

Zhang, H., Ji, S., Guo, R., Zhou, C., Wang, Y., Fan, H., & Liu, Z. (2019). Hydrophobin HFBII-4 from *Trichoderma asperellum* induces antifungal resistance in poplar. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(3), 603–612. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00083-5>

Zhang, M., Wang, Z., Wang, Z., Feng, S., Xu, H., Zhao, Q., Wang, S., Fang, J., Qiao, M., & Kong, D. (2011). Immobilization of anti-CD31 antibody on electrospun poly(ϵ -caprolactone) scaffolds through hydrophobins for specific adhesion of endothelial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(1), 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.042>

Zhao, L., Ma, S., Pan, Y., Zhang, Q., Wang, K., Song, D., Wang, X., Feng, G., Liu, R., Xu, H., Zhang, J., Qiao, M., & Kong, D. (2016). Functional Modification of Fibrous PCL Scaffolds with Fusion Protein VEGF-HGFI Enhanced Cellularization and Vascularization. *Advanced Healthcare Materials*, 5(18), 2376–2385. <https://doi.org/10.1002/adhm.201600226>

Anexo

Capítulo sometido a Elsevier Ltd *Value-Addition in Agri-Food Industry Waste through Enzyme Technology*.

Utilization of Agro-Industrial and Food By-Products for the Production of Amphiphilic Proteins and Peptides

Mary Carmen Martínez¹, Roberto Olayo², Humberto Vázquez², Makoto Anraku³ and K. Shirai¹

¹Biotechnology Department. Laboratory of Biopolymers and Pilot Plant of Bioprocessing of Agro-Industrial and Food By-Products. Autonomous Metropolitan University. Mexico City, Mexico. E-mail address: martinez9045@hotmail.com (MCM).

*Corresponding author: smk@xanum.uam.mx (KS)

²Physics Department. Autonomous Metropolitan University. Mexico City, Mexico.

E-mail addresses: oagr@xanum.uam.mx (RO); hvto@xanum.uam.mx (HV)

³Sojo University, Japan Department of Physical Pharmaceuticals, Faculty of Pharmaceutical Sciences. E.-mail address: anraku@ph.sojo-u.ac.jp (MA)

Abstract:

Microorganisms produce and secrete amphiphilic proteins and peptides with surface-active properties and abilities to assemble onto surfaces. These molecules can be synthesized and linked to lipids or release alone, such as hydrophobins. These proteins have been used in food, materials, and environmental applications as biosurfactants, foam, and emulsion stabilizers. Along with their production, a large number of enzymes are excreted breaking down polymeric substrates to simpler compounds that serve also as nutrients, such as chitinases, lignin-degrading enzymes. The production of these proteins has been carried out utilizing several carbon sources added to the culture media, which includes agro-industrial and food by-products intending to reduce cost for large-scale production. In this chapter, properties of microbial surfactants, culture conditions, and utilization of by-products for their production, and their applications are reviewed.

Key Words: Hydrophobin, Amphiphilic Protein, Surface Modification, Agro-Industrial, Food By-Products, Purification

1. Introduction

Agribusiness is dedicated to the transformation of products from agriculture, livestock, fishing and forestry that manage to be a driving force for the socioeconomic system. Industrial products include fruits, vegetables, tubers, pods, seeds, roots, leaves, flours, oils, salads, among others, so the excess of waste that affects the environment increasing pollution, problems of health and a deterioration in ecosystems¹. It has been estimated that each year there is a loss or waste of 1.3 million tons of edible food intended for human consumption. Among the countries with high amounts of waste are Europe and North America with 280-300 Kg per capita annually².

The use of alternative substrates, such as industrial waste, is an interesting strategy that can significantly lower the costs of the raw materials involved in the processes to obtain various compounds. In addition, the use of these wastes would bring considerable changes in the economy and above all a reduction in environmental pollution. However, the physical-chemical characterization of industrial waste should be considered to be properly used as nutrients in fermentative processes for the production of enzymes, proteins and secondary metabolites produced by different microorganisms^{1,3,4}

Some microorganisms such as filamentous bacteria (actinomycetes including *Streptomyces spp.*) Or filamentous fungi (ascomycetes, basidiomycetes, and zygomycetes) may have similar characteristics. Both groups form aerial structures with the formation of sexual or asexual spores. In both cases, they are capable of secreting molecules with surfactant activity that reduce surface tension in an aqueous environment, allowing their hyphae to grow in air. Actinomycetes secrete small peptides, while fungi release amphiphilic proteins known as hydrophobins that manage to be in a soluble state and in the presence of an air-water interface, for example, they manage to self-assemble in an amphipathic membrane. Hydrophobins can act in different aspects in the development of fungi, such as in their formation of aerial hyphae, where their self-assembly allows the water-air interface to be broken, reducing surface tension and allowing them to proliferate in the medium, although it has been pointed out that peptides exhibit the same mechanism. Hydrophobins also manage to be an important factor for adhesion on the hydrophobic surface in the infectious process in insects⁵⁻⁷.

The ability of peptides and hydrophobins to reduce surface tension converts them into biosurfactants, which are named amphiphilic molecules. Their structure is made up of hydrophobic and hydrophilic parts. These molecules have great interest in the food industry, oil recovery, medicine, and environmental protection, having a greater advantage over synthetic surfactants with respect to their degradation, toxicity, biocompatibility, biodegradability, and for being more ecological^{8,9}. The amphiphilic property of peptides gives them antimicrobial and anti-fungal activity, being good biocontrol agents of pathogens¹⁰. They are produced by a large number of bacteria resistant to conventional antibiotics due to excessive consumption of these drugs¹¹.

2. Hydrophobins

Hydrophobins are characterized by having a large number of hydrophobic amino acids (~100 amino acids); they share four disulfide bridges, which have the function of maintaining the stability of the protein in its amphipathic tertiary structure that imparts surfactant activity to it. They present a conserved distribution of eight cysteine residues (Cys) that allow it to maintain the tertiary structure of the protein even after it exposes the hydrophilic or the hydrophobic part^{9,12-15}.

Hydrophobins are classified according to their hydrophobic characteristics and their solubility as you can see in table 1:

Table 1 Characteristics corresponding to class I y II hydrophobins

Hydrophobins	Characteristics	References
Class I	<p>Their ensembles can be readily dissociated into trifluoroacetic acid (TFA) and formic acid.</p> <p>Due to their rigidity, they can behave as small macromolecular rodlets that form stable 10 nm thick films at the hydrophilic and hydrophobic interfaces, consisting of sets of monolayers with fibrillar substructures. They can resist decomposing at high temperatures (100 °C), are insoluble in water, and can be glycosylated.</p>	5,15,16
Class II	<p>They form easily dissociable assemblies in the presence of surfactants such as sodium dodecyl sulfate (SDS) and in 60% ethanol. This class of proteins does not conform to small rods (rodlets) and only contains 50 to 100 amino acid residues.</p>	6,17,18

The secretion of hydrophobins is related to the development of fungi, during the formation of structures such as aerial hyphae and spores; the former grow in humid substrate a hydrophilic region and the spores carried by the air are considered hydrophobic. The change in the surface properties of the cell wall is granted by the secretion of hydrophobins, which act as natural surfactants, capable of reducing the surface tension of the growth medium of fungi, causing the production of aerial hyphae by breaking the water-air interface¹⁹.

Hydrophobins have the ability to migrate to hydrophobic-hydrophilic interfaces and are good candidates to encapsulate and dissolve hydrophobic molecules in aqueous media⁹.

2.1 Hydrophobin-producing microorganisms

In most reports, it is mentioned that the filamentous fungi of ascomycetes (species of the genus *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium*, and *Neurospora*) and basidiomycetes (species of the genus *Schizophyllum*, *Agaricus* and *Pleurotus*) are the main producers of hydrophobins, although they could also be secreted by zygomycetes^{7,20}. Few reports mention that lichens also produce hydrophobins. Lichens are organisms generated by a symbiotic relationship between fungi and algae or cyanobacteria, capable of surviving drastic changes in humidity due to the presence of these proteins²¹. Trembley et al.²² mention that there is the presence of rodlets in lichens, which are attributed by hydrophobins, specifically the lichenized basidiocarp of *Dyctionema glabratum* produces at least three hydrophobins DGH1 of 14 kDa, DGH2, and DGH3 of 6, 8, or 9 kDa.

Other important microorganisms are recombinants, which have emerged as a way to improve hydrophobin yields. Yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae* are not producers or secrete hydrophobin, so they do not present hydrophobicity, which is essential to improve the binding of yeast cells to surfaces and efficiently produce ethanol. For this reason, HFBI was expressed in *S. cerevisiae*, being a successful case; HFBI has also been expressed in yeast, in a process of two scales of 1.67 L and 10 L, with or without the addition of defoamer. Defoamer had a positive effect that increased the yields to 260 mg L⁻¹ and 307.6 mg L⁻¹. Another of the yeasts that have served for the expression methods has been *Pichia pastoris* using the hydrophobin FcHyD5p class II of *Fusarium culmorum* under the promoter of alcohol oxidase 1 (AOX1). Obtaining foam by means of wild *P. pastoris* is stable for 2 h, while the foam produced by the modified strain was stable for 72 h, but hydrophobin yields were not determined²⁰.

2.2. Molecular structure of hydrophobins

Through the in vitro study of the two classes of hydrophobins, similarities and differences have been found that help to understand their properties and visualize their applications in different areas. Both classes present a core β sheet with a similar topology, but the length, flexibility, and structure of the loops may be different from each other²³.

2.2.1 Class I

The molecular structure of one of the class I hydrophobins that was first known was DewA from *Aspergillus nidulans*; in its β sheet, it presents 4 antiparallel β strands, with two hairpin regions, the first between the third and fourth cysteine that contains two short α -helices, and the other hairpin is present in the fourth and fifth cysteine, which contains a short helix α and a small two-stranded β sheet. Its structure is "open", called a half barrel. The L1 and L3 loops are exposed and have the flexibility to change their conformational state at the interfaces. It

was identified that charged residues are found on one side of the protein surface, leaving the other uncharged side where hydrophobic patches that vary in size are present²³.

2.2.2 Class II

The molecular structure of class II hydrophobins has been studied in HFBII from *Trichoderma reesei*. The central structure is composed of two β hairpins; the first being near the N-terminal, and the second one, near the C-terminal. Both hairpins can be connected and intertwined to form a barrel-shaped antiparallel β sheet. Between the junction of these two β -hairpins is an α -helix that is made up of residues in the middle of the primary sequence. In a tertiary structure, this α helix can be found outside the barrel structure. HFBII has a patch of hydrophobic aliphatic residues, which are close to the loop regions of the two β -hairpins, and half of these are on the surface of the protein. In soluble proteins such as class II, hydrophobic residues form nuclei that help stabilize their folded structures. HFBII exposes a large fraction of its hydrophobic residues, which can destabilize the three-dimensional structure, but this event is compensated by disulfide bonds. Disulfide bonds form two continuous units, forming efficient crosslinking that effectively stabilizes the protein in a globular form⁹.

2.3 Functionality

Biological functionality implies adhesion on hydrophobic-hydrophilic surfaces because its structure contains a hydrophobic patch composed of hydrophobic aliphatic residues, while the rest are hydrophilic in nature. Therefore, they are strongly amphiphilic molecules, similar to other surfactants due to the ability to locate in hydrophobic-hydrophilic interfaces and, on solid surfaces, thus altering their wettability. Even when present at water interfaces, hydrophobins can form crystalline-looking monolayers, which are stable at high shear elasticity²⁴. When two layers of hydrophobins are in contact, it could be that they form stable double layers similar to a lipid bilayer, which unlike these, can form hydrophobins bilayers with a hydrophilic or hydrophobic core, whose stability can be confirmed by measuring the angle contact^{24,25}.

3. Hydrolytic enzymes are secreted together with hydrophobins

Due to their amphiphilic nature, hydrophobin allows to induces infection towards a host so that the fungus adheres to its hydrophobic surface, and then comes to synthesize hydrolytic enzymes that destroy or alter the components of its membranes formed by lipids and proteins. The production of enzymes influences the degradation of polymeric substrates as sources of nutrients, such as cellulose and starch, which then degraded into small molecules before being absorbed as a source of energy²⁶. With the coordinated action of only three enzymes, complete disintegration of the host's cuticle is achieved. Lipases are the first to act on lipids, after the lipid surface is degraded, large amounts of proteases are produced and degrade the proteinic material of the procuticle that covers the chitin. When there are chitin fibers, aminopeptidases and exopeptidases act on the chitin fibers to convert them into amino acids, which can be used as nutrients. And in turn, the produced chitinases act on chitin fibers²⁷.

3.1 Chitinases

Chitinases (EC 3.2.2.14) have molecular weights of 20-90 kDa, are extracellular enzymes that degrade the host cuticle like insects and are responsible for the hydrolysis of molecular substrates to nutrients of smaller molecules necessary for the development of the fungus during its infective process. The enzymes catalyze the hydrolysis of the β -1,4 bonds of chitin and convert it to chitin oligomers, resulting in the release of short-chain chitin oligomers having functions such as inducing action and anti-tumoral activity. Chitinases are divided into 1) endochitinases (EC 3.2.1.14) that randomly break the internal links of the chain, 2) exochitinases (EC 3.2.1.14) referred to as Chitobiase, which release diacetylchitobiose, cleave the dimer of N-acetylglucosamine, and 3) β -N-acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.52) responsible for the hydrolysis of chitobiose, chitotriose or chitotetraose^{28,29}. Chitinases are commonly used in anti-fungal formulations for plants and as biopesticides²⁸⁻³⁰.

3.2 Lipases

Lipases (triacylglycerol acylhydrolase, EC 3.1.1.3), act on carboxylic ester bonds, hydrolyzing triglycerides into diglycerides, monoglycerides, fatty acids, and glycerol. These enzymes act preferentially on the ester bonds at the sn-1 and sn-3 position of the triglyceride structure³¹. Within their functionalities, lipases are considered as biocatalysts in other reactions such as esterification, inter-esterification, acidolysis, alcoholysis, and aminolysis. On the other hand, in the production of biodiesel fuel, the conversion of vegetable oil to methyl esters or other short-chain alcohols can be catalyzed through trans-esterification by means of lipases in an organic solvent, although this process is having problems when carried out at the industrial level. They have also been used in the production of enantiopure that has herbicidal activity and in the synthesis of flavor and fragrance compounds such as menthol^{31,32}.

3.3 Proteases

Proteases (EC 3.4.23.18) are divided into endoproteases and exoproteases. Endoproteases break peptide bonds internally within a polypeptide and exoproteases break peptide bonds only at the N or C end of polypeptide chains. Both classes work together, the endoproteases are responsible for producing the greatest number of free ends so that the exoproteases can act³³. Proteases related to pH (acidic, alkaline, and neutral) or by their functional group in the active site (aspartic, cysteine, glutamic, serine and threonine) are also found³⁴.

4. Amphiphilic peptides

One of the peptide producers is actinomycetes, which have filamentous characteristics and antagonistic capacities against bacteria, yeasts, and molds. These can produce active metabolites that have surfactant activity recognized as biosurfactants that also have antimicrobial or antifungal activity¹⁰. Antimicrobial (AMP) or antifungal peptides can inhibit or kill bacteria, fungi, parasites, and cancer cells through a direct mechanism towards the cell membrane, these can be produced by bacteria as well as fungi, plants, and animals. AMPs

They are a group of short peptides containing 12 to 50 amino acids with an average length of 28, the majority having a positive net charge or net average charge, these are synthesized ribosomally or non-ribosomally, the latter being in fungi and bacteria³⁵.

4.1 Peptide-producing microorganisms

Peptides are produced by a diversity of living organisms, from bacteria to plants and animals¹¹, for which only a few examples are mentioned as you can see in table 2.

Table 2 Peptides produced by different microorganisms

Peptide	Microorganism	Characteristics	Reference
SAP	<i>Streptomyces sp. cepa AP77</i>	Its size is 160 kDa, and it acts against <i>Pythium porphyrae</i>	36
Sapecin	<i>Sarcophaga peregrina</i> , Insect	Interacts with the membrane through basic and hydrophobic residues, acting through pore mechanisms.	37
HNP-1	Human defensins	They block the uptake of thymidine, uridine, and leucine in <i>Escherichia coli</i> . In addition to inhibiting the synthesis of periplasmic β -galactosidase.	11,37
hBD-1 to -4	Human defensins	They are produced by mucosa and epithelial cells. Its antimicrobial activity is characterized by increasing salt concentrations. They are susceptible to gram positive and gram negative bacteria.	38
Histatins	Human	They are rich in histidine and are active against the yeast <i>Candida albicans</i>	38
Gramicidin	<i>Bacillus brevis</i>	It has activity against highly positive bacteria. It is composed of a heterogeneous mixture of six N-formylated polypeptides.	39
Thionins	Plants	Rich in arginine, lysine and cysteine residues. Its toxic against bacteria, fungi and yeast.	40

4.2 Peptide structure

Peptides, due to their structure, have been given the property of being cationic and amphiphilic, due to the presence of active polar amino acids (in general lysine, arginine, and histidine), which is related to the mechanism they have on the lysis of cellular membrane. Hydrophobic residues are formed by the acylation of amino acids in the C-terminal part, which gives them selective cell specificity. Antifungal peptides have lipid-bound hydrophobic regions and positively charged hydrophilic regions bound to water or negatively charged residues⁴¹. Peptides are classified according to their secondary structure into four families: α -helix, β -sheet, α -helix, and β -sheet combined and not $\alpha\beta$ ³⁵.

4.3 Peptide functionality

Due to their amphiphilic character arising from their structure, they play an important role in membrane dissolution. Antifungal peptides kill fungal cells with the use of various, complex mechanisms on the membrane. They form strong bonds to the amphiphilic part of the membrane cell, particularly on electronegative cells⁴¹.

4.3.1 Mechanism of action of peptides

Antimicrobial peptides (AMP) are present in various microorganisms and are secreted when the organisms perceive the presence of a foreign material acting as an innate immune system. In the case of fungal infections, antifungal peptides can act which, due to their structure, give it special physical-chemical properties such as cationic and amphiphilic, which give it a mechanism related to the lysis of the cell membrane. These mechanisms work in three different ways: 1) they inhibit the synthesis of fungal cell walls, which is the first barrier of the cell, inhibiting chitin synthase, and (1-3)- β -D-glucan synthase 2) they interact with membrane components 3) they interact on intracellular targets (mitochondria and nucleic acid macromolecules)⁴¹.

Zhang et al.⁴¹ mention that different models have been proposed to understand the action of peptides on the membrane called "barrel stave", "toroidal pore", "carpet" and "aggregate".

4.4 Peptide synthesis

The formation of peptide bonds is carried out through the ribosome, but for organisms such as fungi and bacteria, it is carried out by non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) enzymes⁴². NRPS synthesizes by forming amide bonds between aminoacyl monomers, while ribosomes use their same active sites for each amino acid that is added to the ribosomal peptide. NRPS use a unit called a "modulus", which is made up of enzymatic domains that work together to incorporate the incoming amino acids to the growing peptide. The basic elongation modulus is composed of a condensation domain (C), an adenylation domain (A), and a domain of peptidyl carrier protein (PCP). Domain A selects and adenylates the amino acid to be incorporated, then through a thioester bond to a prosthetic phosphopantethenyl group (PPE) in the PCP domain, so that it can transport the amino acid to domain C, which catalyzes the formation of amide bonds between the amino acid and the peptide attached to

the PCP domain, the peptide being elongated by a single residue. The PCP is responsible for bringing the elongated peptide to the downstream module, where it passes and elongates further in the condensation reaction. After the PCP has donated its peptide, it can accept another amino acid from domain A and participate in the next synthesis cycle of the assembly line. The initial modules lack the C domain and the terminal modules contain a thioesterase domain, which releases the peptide by cyclization or hydrolysis⁴³.

5. Production and purification of hydrophobins and peptides

Microorganisms need to develop through the contribution of elements found in their chemical composition, these must be accessible in the medium so that they can obtain the energy they require to synthesize macromolecules and preserve the chemical gradients through their membranes. For this reason, it is important that nutritional factors (carbon, nitrogen, sulfur, phosphorus, and vitamins) and physical factors (pH, temperature, oxygen, humidity, hydrostatic pressure, etc.) are regulated during their growth stage⁴⁴.

5.1 Culture conditions (temperature and pH)

The development of microorganisms requires optimum temperatures and pH, and in most cases, the optimum pH is neutral (pH 7). Depending on the pH in which the microorganisms develop, they are classified as acidophilic, which develops in the pH range of 0-5.4, neutrophils at pH 5.4 and 8.5, and alkalophilic at pH 7-11.5. Regarding the temperature, they are classified into psychrophiles, mesophiles, and thermophiles. Psychrophiles develop around 15 and 20 °C, mesophiles develop in a range of 30 and 37 °C, and the growth of thermophiles is adaptable to temperatures of 50 and 60 °C⁴⁴. Furthermore, Kisko et al.⁴⁵ demonstrated that HFBI class II hydrophobins from *T. reesei* are more stable to changes in temperature (5-60 °C) and pH (3-9) than HFBI. In turn, Askolin et al.⁴⁶ found that hydrophobins are difficult to denature, since, when the medium was heated to 90 °C, they did not find any sign of denaturation. In other references it has only been mentioned that the pH could alter the structure and elasticity of the hydrophobin film, resulting in a reorientation of the hydrophobin molecules, which affected the interaction between hydrophobins and the air-water interface⁴⁷. Singh and Abraham¹¹ mentioned that peptides are thermostable at temperatures of 100 °C for at least 5 min.

Regarding the effect of pH, authors such as Ellaiah et al.⁴⁴ evaluated the influence of pH and temperature for obtaining of the neomycin peptide in solid-state fermentation, using a variety of substrates. The fermentation was carried out for 12 days, and it was observed that at pH 6, there was less neomycin production, and, as the pH increased, the neomycin production increased, finding an optimum of pH 7.5 with a yield of 5780 µg g⁻¹. With respect to temperature, there was a decrease in the neomycin yield when it was higher or lower than its optimum temperature of 30 °C (5760 µg g⁻¹).

5.2 Type of culture (SSF and SmF) and type of substrate

In industry and at the laboratory level, fermentation processes can be carried out to obtain products of interest using microorganisms that adapt to the conditions provided by a medium. This fermentation process can be carried out in two ways known as solid-state fermentation (SSF) and liquid or submerged state fermentation (SmF), both types of culture present differences and, broadly speaking, it can be said that SmF has advantages for its easy handling and simple recovery of enzymes or extracellular proteins. Unfortunately, the products are dilute and the enzyme extracts are less stable than those obtained in SSF. Thus, microorganisms such as fungi have developed more in SSF, since the raw material used as a substrate is inexpensive and the process is manageable. However, they do present problems in the sterilization of the substrate, the control of the temperature and the pH, the maintenance of the purity of the culture, and the duration of the process⁴⁹. In turn, Rocha-Pino et al.²⁸ achieved to produce class I hydrophobins from *Lecanicillium lecanii* in two different culture media (solid and liquid), varying the carbon sources and observed that there were significant changes. Thus, depending on the culture medium, the amount of hydrophobin produced in solid culture with the addition of chitin was $627.3 \pm 2 \mu\text{g mL}^{-1}$, which was 11 times more than those extracted in liquid culture ($57.4 \pm 4.7 \mu\text{g mL}^{-1}$). It worthy of mention that when fructose was added as a carbon source, it was obtained $612.4 \pm 11.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ in the solid medium, which was significantly higher than $3.5 \pm 0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ obtained.

In SSF fermentations, inert supports have been used to increase the hydrophobicity of the medium so that the fungus can produce a greater amount of hydrophobins. Thus, materials such as polyurethane foam (PUF) have contributed to improving these yields, and $302.07 \mu\text{g mL}^{-1}$ of class I and $123.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ of class II were obtained by using *L. lecanii*²⁵. On the other hand, Kakahi et al.⁵⁰ investigated other types of supports to increase production, such as Viton rubber, stainless steel, Teflon, and glass, obtaining a higher performance for class I, while for HFBII there was no significant difference in rubber, teflon, and glass, which turn out to be good materials for the production of hydrophobins.

These types of fermentation in liquid and solid have also been used to obtain amphiphilic peptides. Authors such as Ellaiyah et al.⁴⁸ carried out a solid-state fermentation to produce neomycin from *Streptomyces marinensis* through the use of a variety of substrates, varying the temperature and pH conditions; the highest production of neomycin was achieved in raw wheat with a yield of $4471 \mu\text{g g}^{-1}$ of the substrate. With the use of palm kernel cake, considered as a by-product of the palm milling industry, in a lacto-fermentation with the addition of lactic acid bacteria (LAB), 0.519 mg mL^{-1} were obtained with a degree of hydrolysis of 43.39%. Palm kernel AMPs achieve 69-88% fungal inhibitions with a concentration of $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ^{51,52}. As can be seen in the cited examples, the types of substrate used in the fermentation processes significantly influence the desired results, since organisms can react differently with distinct types of substrate⁵³.

5.2 Agro-industrial sources and food products as a substrate for the production of hydrophobins and peptides

Different authors have recommended the use of agro-industrial waste and food products as sources of nutrients for the growth of microorganisms to obtain enzymes, proteins, and peptides. Seafood processing industries produce large amounts of by-products such as heads, tails, skins, scales, and so on. Chitin is the second most abundant polysaccharide after cellulose, and it is present in the walls of fungi, algae, insects, and mollusk exoskeletons; it is a biocompatible, biodegradable compound with various biological properties and is non-toxic. Chitin is obtained from chemical or biological processing and has been used as a substrate for the production of hydrophobins and chitinases^{28,54,55}. During fermentation, the peptides produced are released by hydrolysis of proteins or produced by microorganisms associated with fermentation. By-products and waste can cause environmental problems, such as wastes derived from the high consumption of spiny corvina, a species of fish in canned goods in the East. The use of these by-products in fermentation results in a peptide with antifungal properties, which has been used in a minimum concentration of 6.57 mg mL⁻¹ as a fungicide against *Pestalotiopsis sp.*⁵⁶.

Another notable case has been the use of palm, corn, and peanut oil residues, among others, as the best carbon sources for the production of rhamnolipid that can be used as biosurfactants. With the use of 50 gL⁻¹ of mahua oil residues, a production of 40 gL⁻¹ of rhamnolipids was achieved³. Kulkarni et al.⁵⁷ mention that with the addition of agroindustrial by-products in the culture media for fungi, lignocellulosic enzymes and biomass are obtained, from *Pleurotus ostreatus* by using some sources such as wheat bran, cassava bagasse, bagasse of sugar cane, and some oils. However, as there were not many reports on obtaining amphiphilic proteins in which they had used agro-industrial waste, they were given the task of using sesame and coconut oil residues to grow *P. ostreatus* and produce proteins such as hydrophobins. They could only partially characterize these proteins, so they referred to them as hydrophobin-like proteins. With sesame oil, they achieved a biomass yield of 3.85 mg g⁻¹ higher than with coconut oil of 1.86 mg g⁻¹.

In the production of peptides, rawa wheat has been used as substrates⁴⁸ and palm kernel cake⁵¹. Likewise, kenaf seeds have been used, which are high in protein but are used to make animal feed due to their poor sensory quality⁵⁸. Arulrajah et al.⁵⁸ carried out a fermentation with *Lactobacillus casei* for 72 h at 37 ° C, with the addition of ground kenaf seeds to obtain FKSP peptides, whose yield was 42.07-77.38% and tested its microbial activity on *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa* and *Salmonella typhimurium*

5.3 Peptide and hydrophobin purification methods

It is common for there to be more than one active substance present in an extract, therefore several purification steps must be performed to isolate the protein of interest in high purity. Among the most common methods of purification of protein are chromatographic methods in combination with dialysis, ultrafiltration, and ultracentrifugation⁵⁹.

At present, there are a variety of methods used for the purification of proteins, but according to the characteristics of the hydrophobins, in various protocols it has been used 2% SDS and

trifluoroacetic acid or formic acid as a base for the extraction, depending on the of the hydrophobin class to be extracted⁶⁰. There are also some pre-purification steps that improve the yields of a final product where the foam fraction is found, a separation method that involves the formation of bubbles by adsorption: the amphipathic character of proteins with polar and non-polar groups causes them to be adsorbed in the gas-liquid interface, so the foam can separate and concentrate the proteins. This method is easy to use so it can reduce operating costs. However, to obtain good protein yields, care must be taken with the type and flow rate of the gas injection, the relationship between the height of the column and the initial height of the liquid, as well as the initial volume of the liquid, among other factors^{61,62}. As a final step to obtaining amphiphilic proteins, chromatography, especially reverse-phase liquid chromatography, has been used as a purification method, where a mobile phase with a polarity gradient is used to elute amphiphilic proteins. This technique is capable of detecting, purifying, and quantifying the hydrophobin under study^{60,63}.

For the AMP purification processes, the use of ion-exchange chromatography has been used that separates the target peptide through its load, followed by additional steps of high-performance reverse phase chromatography (HPLC) to complete its purification, the fractions eluted with analyzed by means of SDS-PAGE electrophoresis to obtain an approximate molecular weight followed by an amino acid analysis that provides the amino acid sequence present in the peptide that will provide information on its activity or potency².

6. Application

6.1 Hydrophobins

6.1.1 Foams y emulsions

Low molecular weight amphiphilic molecules play an essential role in the stability of liquid emulsions in products such as dressings, sauces, some beverages, and alcoholic emulsions. Food and health authorities have sought a way for industries to limit the use of synthetic emulsifiers, so interest has grown to find natural sources of amphiphilic molecules⁶⁴.

Food emulsions and foams are lyophobic colloidal dispersions, where the continuous phase of the system does not need to wet the dispersed phase. In an oil and water solution, when the interfacial area increases between the continuous and dispersed phase, the total free energy of the system increase compared with the free energy of dispersion. One way of being able to manipulate the emulsions is to minimize the interfacial tension between the two phases, which can be achieved with the addition of an amphiphilic molecule that acts as a surfactant, in such a way that the hydrophobic segment is exposed to the oil phase and its hydrophilic segment is exposed to the aqueous phase⁶⁵.

Aldred et al.⁶⁶ used a class II hydrophobin to stabilize a fluid aerated composition in a reduced cream, taking into account that the fungal protein, in this case, hydrophobin, could confer good stability in the disproportion and coalescence of the food foam aerated, as protein can influence its viscoelasticity on the surface of air bubbles. The combination of class II

hydrophobin with an elastic limiting agent, such as xanthan and gellan gums, causes the size of the bubbles to remain constant for a long period of time. Indeed, creaming occurs in low amounts in prolonged times of approximately 1000 h, which corresponds to more than a month. To this report are added the contributions of Cox et al.⁶⁷ who studied the stability of the HFBII foams and bubbles of *T. reesei*, observing stability of 4 months, and the stability of up to several years when the concentration is low of approximately 0.1% by weight.

On the other hand, foam can provide products with sensory properties, a good example is ice cream, which can be defined as a frozen mixture of milk, cream, sugar, stabilizers, and emulsifiers. This mixture consists of an emulsion, a dispersion, and a foam. The dispersion and the emulsion are formed through a phase of concentrated aqueous whey by freezing with the content of sugars and dry matter surrounding the dispersed ice crystals and the fat globules. The crystals are approximately 1-150 μm in diameter, while the foam is made up of air pockets, which are dispersed in the emulsion. The size of the ice crystals determines the texture that the product provides to the consumer; thus, the smaller the crystals, the more creamy the ice cream is, and when there are larger crystals ($> 50 \mu\text{m}$) the texture is granular⁶⁸. Thus, the organoleptic characteristics of ice cream will depend on how ice crystals, fat, and air are dispersed^{69,70}. Aldred et al.,⁶⁹ state in their patent that the use of a class II hydrophobin can inhibit the growth of ice crystals in frozen products since hydrophobin is capable of assembling on an air-liquid surface and a frozen composition. With the composition containing HFBII, a crystal size of 40-60 μm in diameter is achieved, better controlled than using sodium caseinate or skimmed milk powder, resulting in crystals with a diameter of 50-100 μm . On the other hand, the microstructure is preserved, since no apparent thickening of the ice crystals or air bubbles is observed during 1 or 2 weeks of storage at a temperature of $-10 \text{ }^\circ\text{C}$.

6.1.2 “Gushing” effect

One of the industries with high production levels, the brewing industry, has been associated with hydrophobins with fungal infections in barley grain and, when the malt is crushed in the wort, these proteins are released in the beer. Hydrophobins that spontaneously interact with calcium oxalate, present in beer, induce the formation of larger oxalate crystals, which release more CO_2 and cause excessive foam formation, which is referred to as “Gushing”⁷¹. Deckers et al.⁷² have studied this phenomenon and suggest that these proteins form an amphipathic film that adheres to the wall of the bottle, thus being able to encapsulate CO_2 in nanobubbles. When the beer bottle is depressurized when it is opened, the hydrophobin film around the nanobubbles can break, causing the release of excess CO_2 and thus causing the formation of foam, which causes great economic losses due to the loss of product⁷¹. This attraction that hydrophobins have for CO_2 is due to their hydrophobic patch. For this reason, one of the ways to counteract this effect is by adding ocimene, a monoterpene that blocks the interaction of CO_2 and hydrophobin, because ocimene preferentially interacts with the hydrophobic patch of hydrophobin, reducing the excess foam⁷³.

6.1.3 Other applications

Although amphiphilic proteins have been widely applied, they have had diverse results in different areas, not only in food but in general as emulsifiers and stabilizers as you can see in table 3.

Table 3 Applications of hydrophobins in different biotechnological areas

Area	Application	Hydrofobin	Reference
Petroleum	Use of a hydrophobin in the tertiary phase of enhanced petroleum recovery (EOR) to increase the extraction percentages compared to other natural surfactants (rhamnolipids and lipopeptides).	HFB I from <i>Lecanicillium lecanii</i>	74
Personal care products	Addition of a hydrophobin in formulation for oral care, to improve the deposition of the components of the oily phase on the surfaces of the oral cavity such as enamel and dentin of the teeth.	HFB II from <i>Trichoderma reesei</i> .	75
Fungicides	Fungicides Development of a treatment for pathogenic infections, managing to increase resistance to fungal pathogens in plants.	Hydrophobin SC3, yaaD- HBII and HFBII (VTT).	76
Medical devices	Immobilization of an anti-CDD31 antibody on a PCL film coated with HFBI, decreasing the wettability from $104 \pm 1.5^\circ$ to $60.9 \pm 0.8^\circ$, helping cell growth.	HFBI	77
Drug formulation	Organize and stabilize gold supra-particles protected with dodecanethiol nanoparticles loaded with a hydrophobic drug.	HFBII from <i>Trichoderma reesei</i>	78

Construction materials	Use of hydrophobins as surface coatings to prevent their deterioration due to humidity and dirt in materials such as ceramic tiles and stone (sandstone, limestone, and Carrara marble).	Dirt: yaad-Xa-dewA-his fusion protein. Humidity: DewA from <i>Aspergillus nidulans</i> and HFBII from <i>Trichoderma reesei</i> .	79,80
------------------------	--	--	-------

6.2 Peptides

6.2.1 Peptides in the food industry

Commonly in the food industry, packaging methods are used for the preservation of food that is exposed to environmental factors that deteriorate it, such as water vapor, heat, pressure, oxidation, ultraviolet rays, and especially microbial contamination. Therefore, AMP has been studied as possible preservatives, since it has been reported that AMP produced by *Bacillus* and *Pseudomonas* strains have inhibitory activity against *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Shigella*, and *Staphylococcus aureus*. So the use of AMP could help extend the shelf life of foods by inhibiting pathogens, thus reducing the economic losses associated with their waste. Due to this problem, the development of active packaging has been chosen where one or more antimicrobial agents are added to the packaging by encapsulation methods through liposomes, emulsions, biopolymeric particles, nanofibers, and nano-films⁸¹.

6.2.2 Anticancer peptides

Cancer is one of the most aggressive diseases that exist, characterized by the uncontrolled growth of abnormal cells. So it seeks to eliminate these cancer cells without affecting healthy tissues. Peptides show anticancer effects by destabilizing the outer membrane of cancer cells or mitochondrial membranes in cells. Non-cancer cells have a neutral charge due to the presence of zwitterionic phospholipids such as phosphatidylcholine and sphingomyelin located inside the plasma membrane, while cancer cells lose this membrane, which increases their negative charge and facilitates a greater interaction with AMPs, inducing cancer cell death through two general mechanisms such as apoptosis or necrosis. On the other hand, because AMPs can destabilize the outer membrane of cancer cells, peptides can facilitate the action of cytotoxic drugs^{82,83}.

Conclusions

Microorganisms are a source of industrial exploitation for obtaining various enzymatic and protein compounds that can be applied to control pests, insects, bacteria, among others, in various areas. Its advantage is that being obtained from natural sources, its use does not harm the environment or the health of people and animals. Its ability to substitute the use of synthetic compounds must become competitive in production costs and efficiency compared to synthetics. The production of microorganisms through the use of substrates from agro-industrial sources or food by-products as carbon sources, could reduce the costs of the processes. Despite the fact that the industry generates large amounts of waste and they are the main sources of contamination, specific conditions have not been established to obtain profitable results in the production of peptides and hydrophobins, so work continues to identify which residues are the best for its obtaining.

The properties of amphiphilic molecules have great potential to compete with the use of synthetic surfactants and to be at the same level of competitiveness as the biosurfactants obtained by bacteria such as rhamnolipids and sophorolipids, which are the most used in the industry, but the processes of their production generate low yields and are difficult to purify.

Antimicrobial peptides are a great tool to inhibit attacks by microorganisms that break down food and to use them as anticancer agents, due to their amphiphilic structure. Consequently, research continues to develop processes to enrich waste to improve the inhibitory action of different bacterial and fungal strains. Likewise, research is continuing to identify the mechanisms that contribute to improving the efficacy of treatments using some cytotoxic drugs against cancer cells.

References

1. Mejías N., Orozco E., Galáan H. Aprovechamiento de los residuos agroindustriales y su contribución al desarrollo sostenible de México. *Rev Ciencias Ambient y Recur Nat.* 2016;2(6):27–41.
2. Shwaiki L.N., Lynch K.M., Arendt E.K. Future of antimicrobial peptides derived from plants in food application – A focus on synthetic peptides. *Trends in Food Science Technol.* 2021;112:312–24. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.010>
3. Domínguez Á., Martínez M.Á., López V.E. Advances on research in the use of agro-industrial waste in biosurfactant production. *World J Microbiol Biotechnol.* 2019;35(10):1–18. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2729-3>
4. Ravindran R, Hassan S.S., Williams G.A., Jaiswal A.K. A Review on Bioconversion of Agro-Industrial Wastes to Industrially Important Enzymes. *Bioengineering.* 2018;5:93. DOI:10.3390/bioengineering5040093
5. Hektor H.J., Scholtmeijer K. Hydrophobins: Proteins with potential. *Curr Opin*

- Biotechnol. 2005;16(4):434–9. DOI: 10.1016/j.copbio.2005.05.004
6. Wösten H.A.B. Hydrophobins: Multipurpose proteins. *Annu Rev Microbiol.* 2001;55:625–46. DOI: 10.1146/annurev.micro.55.1.625
 7. Wösten H.A.B., Willey J.M. Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow into the air. *Microbiology.* 2000;146(4):767–73. DOI: 10.1099/00221287-146-4-767
 8. Chakraborty S., Ghosh M., Chakraborti S., Jana S., Sen K.K., Kokare C., et al. Biosurfactant produced from Actinomycetes *nocardiopsis* A17: Characterization and its biological evaluation. *Int J Biol Macromol.* 2015;79:405–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.04.068>
 9. Linder M., Szilvay G.R., Nakari-Setälä T., Penttilä M.E. Hydrophobins: The protein-amphiphiles of filamentous fungi., *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 29, 2005;877–96. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.01.004>
 10. Arifiyanto A., Surtiningsih T., Ni'matuzahroh, Fatimah, Agustina D., Alami N.H. Antimicrobial activity of biosurfactants produced by actinomycetes isolated from rhizosphere of Sidoarjo mud region. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2020 Mar 1;24:101513. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101513
 11. Singh N., Abraham J. Ribosomally synthesized peptides from natural sources. *J Antibiot (Tokyo).* 2014;67:277–89. DOI: 10.1038/ja.2013.138
 12. Berger B.W., Sallada N.D. Hydrophobins: Multifunctional biosurfactants for interface engineering. *J Biol Eng.* 2019;13(1):1–8. DOI: 10.1186/s13036-018-0136-1
 13. Kallio J.M., Rouvinen J. Amphiphilic nanotubes in the crystal structure of a biosurfactant protein hydrophobin HFBII. *Chem Commun.* 2011;47(35):9843–5. DOI: 10.1039/c1cc13139g
 14. Mankel A., Krause K., Kothe E. Identification of a hydrophobin gene that is developmentally regulated in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma terreum*. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(3):1408–13. DOI: 10.1128/AEM.68.3.1408–1413.2002
 15. Wösten H.A.B., de Vocht M.L. Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochim Biophys.* 2000;1469:79–86. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(00\)00002-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00002-2)
 16. Wösten H.A.B., Scholtmeijer K. Applications of hydrophobins: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99(4):1587–97. DOI: 10.1007/s00253-014-6319-x
 17. Askolin S., Penttilä M.E., Wosten H.A.B, Nakari-Setälä T. The *Trichoderma reesei* hydrophobin genes hfb1 and hfb2 have diverse functions in fungal development. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;253(2):281–8. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.09.047

18. Sevim A., Donzelli B.G.G., Wu D., Demirbag Z., Gibson D.M., Turgeon B.G. Hydrophobin genes of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium brunneum*, are differentially expressed and corresponding mutants are decreased in virulence. *Curr Genet.* 2012;58(2):79–92. DOI: 10.1007/s00294-012-0366-6
19. Sunde M., Kwan A.H.Y., Templeton M.D., Beever R.E., Mackay J.P. Structural analysis of hydrophobins. *Micron.* 2007;39(7):773–84. DOI: 10.1016/j.micron.2007.08.003
20. Kulkarni S., Nene S., Joshi K. Production of Hydrophobins from fungi. *Process Biochem.* 2017;61(January):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.06.012>
21. Ball S.R., Kwan A.H., Sunde M. Hydrophobin rodlets on the fungal cell wall. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2019;425:29–51. DOI: 10.1007/82_2019_186
22. Trembley M.L., Ringli C., Honegger R. Hydrophobins DGH1, DGH2, and DGH3 in the lichen-forming basidiomycete *Dictyonema glabratum*. *Fungal Genet Biol.* 2002;35(3):247–59. DOI: 10.1006/fgbi.2001.1325
23. Morris V.K., Kwan A.H., Sunde M. Analysis of the structure and conformational states of DewA gives insight into the assembly of the fungal hydrophobins. *J Mol Biol.* 2013;425(2):244–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2012.10.021>
24. Hähl H., Vargas J.N., Griffo A., Laaksonen P., Szilvay G., Lienemann M., et al. Pure Protein Bilayers and Vesicles from Native Fungal Hydrophobins. *Adv Mater.* 2017;29(1). DOI: 10.1002/adma.201602888
25. Rocha-Pino Z., Viguera G., Sepúlveda-Sánchez J.D., Hernández-Guerrero M., Campos-Terán J., Fernández F.J., et al. The hydrophobicity of the support in solid state culture affected the production of hydrophobins from *Lecanicillium lecanii*. *Process Biochem.* 2015;50(1):14–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.10.021>
26. Wösten HAB. Filamentous fungi for the production of enzymes, chemicals and materials. *Curr Opin Biotechnol.* 2019;59:65–70. DOI: 10.1016/j.copbio.2019.02.010
27. Carrillo-Rayas M.T., Blanco-Labra A. Potencial y Algunos de los Mecanismos de Acción de los Hongos Entomopatógenos para el Control de Insectos Plaga. *Acta Univ.* 2009;19(2):40–9. DOI: 10.15174/au.2009.102
28. Rocha-Pino Z., Viguera G., Shirai K. Production and activities of chitinases and hydrophobins from *Lecanicillium lecanii*. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2011;34(6):681–6. DOI: 10.1007/s00449-011-0517-z
29. Seidl V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biol Rev.* 2008;22(1):36–42. DOI: 10.1016/j.fbr.2008.03.002

30. Hamid R., Khan M.A., Ahmad M., Ahmad M.M., Abdin M.Z., Musarrat J., et al. Chitinases: An update. *J Pharm Bioallied Sci.* 2013;5(1):21–9. DOI: 10.4103/0975-7406.106559
31. Houde A., Kademi A., Leblanc D. *Lipases and Their Industrial Applications*. Vol. 118, *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2004. Available from: <https://doi.org/10.1385/ABAB:118:1-3:155>
32. Jaeger K.E., Eggert T. Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol.* 2002;13(4):390–7. DOI: 10.1016/S0958-1669(02)00341-5
33. Monod M., Capoccia S., L chenne B., Zaugg C., Holdom M., Jousson O. Secreted proteases from pathogenic fungi. *Int J Med Microbiol.* 2002;292(5–6):405–19. DOI: 10.1078/1438-4221-00223
34. Chandrasekaran M., Thangavelu B., Chun Chul S., Sathiyabama M. Proteases from phytopathogenic fungi and their importance in phytopathogenicity. *J Gen Plant Pathol.* 2016;82:233–9. DOI: 10.1007/s10327-016-0672-9
35. Jiang Y., Chen Y., Song Z., Tan Z., Cheng J. Recent advances in design of antimicrobial peptides and polypeptides toward clinical translation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021;170:261–80. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.12.016>
36. Woo J.H., Kamei Y. Antifungal mechanism of an anti-*Pythium* protein (SAP) from the marine bacterium *Streptomyces sp.* strain AP77 is specific for *Pythium porphyrae*, a causative agent of red rot disease in *Porphyra spp.* *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003;62(4):407–13. DOI: 10.1007/s00253-003-1235-5
37. Brogden K.A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Vol. 3, *Nature Reviews Microbiology*. 2005. p. 238–50. DOI: 10.1038/nrmicro1098
38. Wiesner J., Vilcinskas A. Antimicrobial peptides: The ancient arm of the human immune system. *Virulence.* 2010;1(5):440–64. DOI: 10.4161/viru.1.5.12983
39. Nakatsuji T., Gallo R.L. Antimicrobial peptides: Old molecules with new ideas. *Journall Investig Dermatology.* 2012;132(3 PART 2):887–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2011.387>
40. Nawrot R., Barylski J., Nowicki G., Broniarczyk J., Buchwald W., Go dzicka-J zefiak A. Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiol (Praha).* 2014;59(3):181–96. DOI: 10.1007/s12223-013-0280-4
41. Zhang D., Lu Y., Chen H., Wu C., Zhang H., Chen L., et al. Antifungal peptides produced by actinomycetes and their biological activities against plant diseases. *J Antibiot (Tokyo).* 2020;73(5):265–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41429-020-0287-4>

42. Challis G.L., Naismith J.H. Structural aspects of non-ribosomal peptide biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol.* 2004;14(6):748–56. DOI: 10.1016/j.sbi.2004.10.005
43. Reimer J.M., Haque A.S., Tarry M.J., Schmeing T.M. Piecing together nonribosomal peptide synthesis. *Curr Opin Struct Biol.* 2018;49:104–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2018.01.011>
44. Junco Diaz R de los A., Rodríguez Pérez C.M. Cultivo y crecimiento de los microorganismos. 2001:45–54.
45. Kisko K., Szilvay G.R., Vainio U., Linder M.B., Serimaa R. Interactions of hydrophobin proteins in solution studied by small-angle X-ray scattering. *Biophys J.* 2008;94(1):198–206. DOI: 10.1529/biophysj.107.112359
46. Askolin S., Linder M., Scholtmeijer K., Tenkanen M., Penttilä M., de Vocht M.L., et al. Interaction and comparison of a class I hydrophobin from *Schizophyllum commune* and class II Hydrophobins *Trichoderma reesei*. *Biomacromolecules.* 2006;7(4):1295–301. DOI: 10.1021/bm050676s
47. Paananen A., Weich S., Szilvay G.R., Leitner M., Tappura K., Ebner A. Quantifying biomolecular hydrophobicity: Single molecule force spectroscopy of class II hydrophobins. *J Biol Chem.* 2021;100728. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100728
48. Ellaiyah P., Srinivasulu B., Adinarayana K. Optimisation studies on neomycin production by a mutant strain of *Streptomyces marinensis* in solid state fermentation. *Process Biochem.* 2004;39(5):529–34. DOI: 10.1016/S0032-9592(02)00059-6
49. Matsumoto Y., Saucedo-Castañeda G., Revah S., Shirai K. Production of β -N-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. *Process Biochem.* 2004;39(6):665–71. DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00140-7
50. Kakahi F.B., Ly S., Tarayre C., Deschaume O., Bartic C., Wagner P., et al. Modulation of fungal biofilm physiology and secondary product formation based on physico-chemical surface properties. 2019;42:1935–46. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02187-6>
51. Mohamad Asri N., Muhialdin B.J., Zarei M., Saari N. Low molecular weight peptides generated from palm kernel cake via solid state lacto-fermentation extend the shelf life of bread. *Lwt.* 2020;134:110206. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110206>
52. Um J., Manguy J., Anes J., Jacquier J.C., Hurley D., Dillon E.T., et al. Enriching antimicrobial peptides from milk hydrolysates using pectin/alginate food-gels. *Food Chem.* 2021;352. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.129220
53. Subramaniyam R., Vimala R. Solid State and Submerged Fermentation for the Production of Bioactive Substances : a Comparative Study. 2012;3(3):480–6. _

54. Cavalcante B., Scapini T., Camargo A.F., Ulrich A., Bonatto C., Dalastra C., et al. Orange peels and shrimp shell used in a fermentation process to produce an aqueous extract with bioherbicide potential to weed control. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2021;32. DOI: 10.1016/j.bcab.2021.101947
55. Hamed I., Özogul F., Regenstein J.M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitoooligosaccharides): A review. *Trends Food Science & Technology.* 2016;48:40–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.007>
56. Song R., Shi Q., Gningue A., Wei R-bian, Luo H-yu. Purification and identification of a novel peptide derived from by-products fermentation of spiny head croaker (*Collichthys lucidus*) with antifungal effects on phytopathogens. *Process Biochem.* 2017;62:184–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.07.024>
57. Kulkarni S.S., Nene S.N., Joshi K.S. A comparative study of production of hydrophobin like proteins (HYD-LPs) in submerged liquid and solid state fermentation from white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2020;23:101440. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101440>
58. Arulrajah B., Muhiyaldin B.J., Zarei M., Hasan H., Saari N. Lacto-fermented Kenaf (*Hibiscus cannabinus L.*) seed protein as a source of bioactive peptides and their applications as natural preservatives. *Food Control.* 2020;110:106969. DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.106969
59. Erjavec J., Kos J., Ravnikar M., Dreo T., Sabotič J. Proteins of higher fungi - from forest to application. *Trends Biotechnol.* 2012;30(5):259–73. DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.01.004
60. Viguera G., Shirai K., Martins D., Franco T.T., Fleuri L.F., Revah S. Toluene gas phase biofiltration by *Paecilomyces lilacinus* and isolation and identification of a hydrophobin protein produced thereof. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;80(1):147–54. DOI: 10.1007/s00253-008-1490-6
61. Aksay S., Mazza G. Optimization of protein recovery by foam separation using response surface methodology. *J Food Eng.* 2007;79(2):598–606. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2006.02.024
62. Khalesi M., Venken T., Deckers S., Winterburn J., Shokribousjein Z., Gebruers K., et al. A novel method for hydrophobin extraction using CO₂ foam fractionation system. *Ind Crops Prod.* 2013;43(1):372–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.048>
63. Linder M., Selber K., Nakari-Setälä T., Qiao M., Kula M.R., Penttilä M. The hydrophobins HFBI and HFBI from *Trichoderma reesei* showing efficient interactions with nonionic surfactants in aqueous two-phase systems. *Biomacromolecules.* 2001;2(2):511–7. DOI: 10.1021/bm0001493

64. Campos J.M., Montenegro Stamford T.L., Sarubbo L.A., de Luna J.M., Rufino R.D., Banat I.M. Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnol Prog.* 2013;29(5):1097–108. DOI: 10.1002/btpr.1796
65. Damodaran S. Protein stabilization of emulsions and foams. *J Food Sci.* 2005;70(3). DOI: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb07150.x
66. Aldred D.L., Cox A.R., Stoyanov S. US 2007 011 6848 A1. 2007.
67. Cox A.R., Aldred D.L., Russell A.B. Exceptional stability of food foams using class II hydrophobin HFBII. *Food Hydrocoll.* 2009;23(2):366–76. DOI:10.1016/j.foodhyd.2008.03.001
68. Cook K.L.K., Hartel R.W. Mechanisms of ice crystallization in ice cream production. *Food Sci Food Saf.* 2010;9(2):213–22. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2009.00101.x
69. Aldred D.L., Berry M.J., Cebula D.J., Golding M.D., Golding S., Keenan R.D., et al. US 2006 0024419 A1. 2006.
70. Ballesteros Martínez M.A., Quiroga Villarraga I.V. Modelamiento y simulación en CFD de la transferencia de momento y calor en los dos sistemas de refrigeración de una máquina de soft serve ice cream. 2016;40. Available from: <http://hdl.handle.net/1992/18838>
71. Lo V., I-Chun Lai J., Sunde M. Fungal Hydrophobins and Their Self-Assembly into Functional Nanomaterials. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1174:161–85. DOI: 10.1007/978-981-13-9791-2_5
72. Deckers S.M., Lorgouilloux Y., Gebruers K., Baggerman G., Verachtert H., Neven H., et al. Dynamic light scattering (DLS) as a tool to detect CO₂- hydrophobin structures and study the primary gushing potential of beer. *J Am Soc Brew Chem.* 2011;69(3):144–9. DOI: 10.1094/ASBCJ-2011-0524-01
73. Postulkova M., Riveros-Galan D., Cordova-Agiular K., Zitkova K., Verachtert H., Derdelinckx G., et al. Technological possibilities to prevent and suppress primary gushing of beer. *Trends Food Sci Technol.* 2016;49:64–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2015.12.006>
74. Rocha-Pino Z., Ramos-López J.I., Gimeno M., Barragán-Aroche F., Durán-Valencia C., López-Ramírez S., et al. Enhanced oil recovery by hydrophobins from *Lecanicillium lecanii*. *Fuel.* 2018;224:10–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.03.058>
75. D'Agostino M., Hedges N., Nandi A. WO 2012 019896 A1. Vol. 1. 2012. p. 2–9.
76. Schultheiss H., Flachmann R., Subkowski T., Bollschweiler C. US 2015 0074842 A1. Vol. 1. 2015. p. 0–4.

77. Zhang M., Wang Z., Wang Z., Feng S., Xu H., Zhao Q., et al. Immobilization of anti-CD31 antibody on electrospun poly(ϵ -caprolactone) scaffolds through hydrophobins for specific adhesion of endothelial cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2011;85(1):32–9. Available from:<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.042>
78. Maiolo D., Pigliacelli C., Sánchez Moreno P., Violatto M.B., Talamini L., Tirota I., et al. Bioreducible Hydrophobin-Stabilized Supraparticles for Selective Intracellular Release. *ACS Nano*. 2017;11(9):9413–23. DOI: 10.1021/acsnano.7b04979
79. Becker H., Karos M., Subkowski T., Bollschweiler C., Lemaire H-G., Baus U. ES 2 353 904 T3. 2011. p. 1–36.
80. Winandy L., Schlebusch O., Fischer R. Fungal hydrophobins render stones impermeable for water but keep them permeable for vapor. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–8. DOI: 10.1038/s41598-019-42705-w
81. Liu Y., Sameen D.E., Ahmed S., Dai J., Qin W. Antimicrobial peptides and their application in food packaging. *Trends Food Sci Technol*. 2021;112:471–83. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.019>.
82. Boohaker R.J., Lee M.W., Vishnubhotla P., Perez J.M., Khaled A.R. The Use of Therapeutic Peptides to Target and to Kill Cancer Cells. *Curr Med Chem*. 2012;19(22):3794–804. DOI: 10.2174/092986712801661004.
83. Nyström L., Malmsten M. Membrane interactions and cell selectivity of amphiphilic anticancer peptides. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 2018;38:1–17. DOI:10.1016/j.cocis.2018.06.009



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00296

Matrícula: 2182802283

Utilización de subproductos agroindustriales y de alimentos para la producción de proteínas y péptidos anfifílicos



Con base en la Legislación Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 15:00 horas del día 16 del mes de junio del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. ROBERTO OLAYO GONZÁLEZ
DR. FERNANDO RIVERA CABRERA
DRA. ZAIZY ROCHA PINO
DR. HUMBERTO VÁZQUEZ TORRES

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

DE: MARY CARMEN MARTÍNEZ VELÁZQUEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

MARY CARMEN MARTÍNEZ VELÁZQUEZ
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. ROBERTO OLAYO GONZÁLEZ

VOCAL

DR. FERNANDO RIVERA CABRERA

VOCAL

DRA. ZAIZY ROCHA PINO

SECRETARIO

DR. HUMBERTO VÁZQUEZ TORRES