



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

TESIS

"Biodegradación de di(2-etilhexil) ftalato por *Fusarium culmorum* crecido en fermentación sólida y líquida "

Para obtener el grado de
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
M. en Biotecnología y M. de R.N Brenda Hernández Sánchez

Director:
Dr. Gustavo Viniegra González

Codirectora:
Dra. María del Carmen Sánchez Hernández

Asesor:
Dr. Francisco Javier Figueroa Martínez

Ciudad de México a 23, de marzo del 2026.

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Sistema Nacional de Posgrado (SNP, antes Programa Nacional de Posgrados de Calidad o PNPC) del SECIHTI, con la referencia 001466”

Ciudad de México a 23 de marzo del 2026.

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**" Biodegradación de di(2-etilhexil) ftalato por *Fusarium culmorum* crecido en
fermentación sólida y líquida "**

que presentó

M. en Biotecnología y M. de R.N Brenda Hernández Sánchez

Comité Tutorial:

Director: Dr. Gustavo Viniegra González

Co-Directora: Dra. María del Carmen Sánchez Hernández

Asesor: Dr. Francisco Figueroa Martínez

Jurado:

Presidente: Octavio Loera Corral

Secretario: Francisco Javier Figueroa Martínez

Vocal: Ericka Santacruz Juárez

Vocal: María Dolores Castañeda Antonio

Agradecimientos

Agradezco a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por otorgarme la beca doctoral No. 817035. Su apoyo hizo posible llevar a cabo esta investigación y avanzar en este proyecto que se convierte en una contribución científica significativa para mi área de estudio.

A la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), por la formación recibida y por ser un espacio que impulsó mi crecimiento académico y personal.

Al Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx), por abrirme sus puertas, facilitarme sus instalaciones y apoyarme en momentos clave del trabajo experimental.

A la Dra. Carmen Sánchez, le expreso mi más profundo agradecimiento por compartir sus conocimientos, su tiempo y su visión científica. Pero, especialmente, gracias por inspirarme y mostrarme que la investigación puede vivirse con pasión, amor, curiosidad y disciplina. Sembró en mí una semillita que ha seguido creciendo a lo largo de este camino. Además, agradezco profundamente, su calidad humana cercanía y disposición para apoyar incluso en los momentos más retadores. Su ejemplo como científica y como persona han marcado mi formación.

Al Dr. Gustavo Viniegra González, le agradezco con enorme afecto y respeto su generosidad y compromiso. A pesar de ser un profesor emérito y tener una larga trayectoria, siempre estuvo dispuesto a brindarme su tiempo, ofrecerme clases adicionales y orientarme con una paciencia infinita, siempre con humildad, sabiduría y ánimo inquebrantable. Su apoyo constante, sus palabras de confianza y su manera tan humana de enseñar, me ayudaron a superar momentos de duda y a crecer académica y personalmente.

Al Dr. Francisco Figueroa Martínez, gracias por su apoyo firme y siempre oportuno. Aprecio sinceramente el tiempo que dedicó para resolver mis dudas, orientarme y compartir sus conocimientos. Le agradezco infinitamente sus palabras de ánimo, que en varias ocasiones hicieron una diferencia real.

Agradezco a la Dra. Ericka Santacruz Juárez, de la Universidad Politécnica de Tlaxcala (UPTx), por su valiosa contribución en la propuesta de las rutas de degradación abordadas en el presente trabajo.

A los Dres. Dolores Castañeda Antonio y Roberto Portillo Reyes, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), por su apoyo en la realización y análisis de los estudios de cromatografía.

Al Dr. Manuel González Pérez, de la Universidad Tecnológica de Tecamachalco, por su destacada contribución en el análisis químico cuántico desarrollado en la presente investigación.

A la Lic. Violeta Luna Caballero gracias, por su amabilidad, confianza y disposición durante toda esta etapa. Siempre estuvo atenta para orientarme en trámites y procesos, y lo hizo con paciencia y una calidad humana que valoro profundamente. Me apoyó de manera genuina y siempre con buena actitud, lo cual hizo este camino más ligero.

Agradecimientos a título personal

A Dios por ser mi guía y mi fortaleza en cada etapa. Gracias por sostenerme en los momentos de dificultad, por iluminar mis decisiones y por poner en mi vida a las personas correctas en el momento preciso. Todo lo que soy y lo que he logrado ha sido por tu gracia y tus infinitas bendiciones.

A mi familia, por su amor, paciencia y confianza incondicional a lo largo de este camino. Por ser mi sostén en los días difíciles y mi alegría en cada logro alcanzado. A mis padres, por enseñarme con su ejemplo el valor del esfuerzo y la constancia. Especialmente a mi mamá, por su amor infinito, sus palabras de aliento y por creer siempre en mí.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a quienes colaboraron en las prácticas experimentales (Esteban, Jaime, Luis, Teresa, Jafet, Gabriela, Jared y Marisol). Gracias por su tiempo, sus habilidades y su entusiasmo. Pero, sobre todo, gracias por hacerme sentir acompañada y por brindarme su amistad.

Resumen

El di(2-etilhexil) ftalato (DEHF) es el plastificante más empleado a nivel mundial y es considerado como un contaminante prioritario debido a su persistencia, toxicidad y capacidad para alterar el sistema endocrino de los mamíferos. Su presencia en el ecosistema representa riesgos ambientales y de salud pública. Además, posee una estructura química compleja y de difícil degradación. Por ello, es crucial explorar alternativas biotecnológicas eficientes para su degradación.

En este estudio se evaluó la capacidad de *Fusarium culmorum* para degradar 3 g/L de DEHF, empleándolo como única fuente de carbono, en fermentación en medio sólido (FMS) y fermentación en medio líquido (FML) durante 13 días. El objetivo fue comparar en ambos sistemas de fermentación; el crecimiento del organismo, el contenido de proteína, la actividad de esterasas, los perfiles enzimáticos de esterasas mediante zimografía, y proponer las rutas de degradación con base a los compuestos de degradación detectados por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas.

Fusarium culmorum produjo mayor cantidad de biomasa ($X_{\max} = 0.99$ g/L) y actividad enzimática ($E_{\max} = 6007.5$ U/L) en FML que en FMS. Sin embargo, *F. culmorum* presentó un mayor número de bandas con actividad de esterasas en FMS. En ambos sistemas, la degradación inició con la desesterificación del DEHF, generando mono(2-etilhexil) ftalato (MEHF) y 2-ethylhexanol, seguida de un rearrreglo molecular del MEHF a dibutil ftalato. Sin embargo, solo en FML se detectó la síntesis de ácidos grasos (ácido oleico, ácido láurico, ácido palmítico y ácido palmitoleico), indicativo de la posible producción de biosurfactantes que aumentan la disponibilidad del sustrato mediante la formación de micelas.

Los resultados demuestran que *F. culmorum* utiliza altas concentraciones de DEHF como única fuente de carbono y energía en ambos sistemas de fermentación. Las rutas propuestas sugieren que los pasos iniciales de degradación son comunes para ambos sistemas, pero que la FML puede involucrar mecanismos adicionales asociados a la producción de biosurfactantes. Estos hallazgos aportan evidencia novedosa sobre la degradación de DEHF por *F. culmorum* y ofrecen

bases para el diseño de estrategias biotecnológicas de biorremediación en sitios contaminados por este plastificante.

Abstract

Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is the most widely used plasticizer worldwide and is considered a priority pollutant due to its persistence, toxicity and ability to disrupt the endocrine system of mammals. Its presence in the ecosystem poses environmental and public health risks. In addition, it has a complex chemical structure and is difficult to degrade. Therefore, it is crucial to explore efficient biotechnological alternatives for its degradation.

This study evaluated the ability of *Fusarium culmorum* to degrade 3 g/L of DEHP as the sole carbon source under solid-state fermentation (SSF) and liquid-state fermentation (SmF) for 13 days. The aim of the study was to compare both fermentation systems in terms of. Growth of the organism, protein content, esterase activity, esterase enzymatic profiles by zymography, and propose the degradation pathways of DEHP based on the degradation compounds detected by gas chromatography coupled to mass spectrometry were determined.

Fusarium culmorum showed greater biomass ($X_{\max} = 0.99$ g/L) and enzymatic activity ($E_{\max} = 6007.5$ U/L) in SmF than in SSF. However, *F. culmorum* exhibited higher number of bands with esterase activity in SSF than in SmF. The DEHP degradation process began with deesterification, generating mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) and 2-ethylhexanol, and a molecular rearrangement of MEHP to form dibutyl phthalate in both fermentation systems. However, in FmL *F. culmorum* synthesized fatty acids (i.e., oleic, lauric, palmitic, and palmitoleic acids) detected, indicative of the possible production of biosurfactants that increase substrate availability through the formation of micelles.

These results show that *F. culmorum* uses high concentrations of DEHP as the sole source of carbon and energy in both systems. The proposed pathways suggest that the initial steps of degradation are common to both systems, but mechanisms associated to biosurfactants production may be involved in the FmL system. These findings provide novel evidence on the degradation of DEHP by *F. culmorum* and offer a basis for the design of biotechnological bioremediation strategies at sites contaminated by this plasticizer.

Índice general

1. Introducción	5
2. Antecedentes	11
2.1 Aspectos generales del género <i>Fusarium</i>	12
2.1.1 Generalidades del género <i>Fusarium</i>	12
2.1.2 <i>Fusarium culmorum</i>	12
2.1.3 Potencial biotecnológico de <i>Fusarium</i>	13
2.2 Aspectos generales de DEHF	14
2.3 Enzimas esterasas	15
2.3.1 Clasificación y estructura	15
2.3.2 Mecanismo catalítico	16
2.3.3 Aplicaciones generales de las esterasas y biorremediación	17
2.4 Principales rutas de degradación de ftalatos	19
3. Justificación	22
4. Hipótesis	24
5. Objetivos	27
5.1 Objetivo General	28
5.2 Objetivos específicos	28
6. Materiales y Métodos	28
6.1 Microorganismo y obtención del inóculo	30
6.2 Fermentación en medio líquido	31
6.3 Fermentación en medio sólido	32
6.4 Determinación del contenido de proteína	33
6.5 Ensayo cromogénico para la determinación de actividad esterasas	34
6.6 Parámetros de crecimiento y rendimientos enzimáticos	35
6.7 Zimografía	36
6.8 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)	37
6.9 Determinación del porcentaje de biodegradación de DEHF	40
6.10 Simulación de química cuántica	40
6.11 Análisis estadístico	41
7. Resultados	42

7.1 Producción de biomasa	43
7.1.1 Fermentación en medio sólido.....	43
7.1.2 Fermentación en medio líquido	44
7.2 Contenido de proteína.....	45
7.2.1 Fermentación en medio sólido.....	45
7.2.2 Fermentación en medio líquido	46
7.3 Actividad volumétrica de esterasas.....	47
7.3.1 Fermentación en medio sólido.....	47
7.3.2 Fermentación en medio líquido	48
7.4 Actividad específica de esterasas.....	49
7.4.1 Fermentación en medio sólido.....	49
7.4.2 Fermentación en medio líquido	50
7.5 Parámetros cinéticos de crecimiento y rendimientos enzimáticos	50
7.6 Perfil enzimático por zimografía.....	52
7.6.1 Fermentación en medio sólido.....	52
7.6.2 Fermentación en medio líquido	54
7.7 Producción enzimática y de biomasa.....	56
7.8 Identificación de intermediarios de degradación y propuesta de rutas de degradación	59
7.8.1 Fermentación en medio sólido.....	59
7.8.2 Fermentación en medio líquido	62
8 . Discusión.....	65
8.1 Crecimiento y producción de biomasa	66
8.4 Zimografía.....	70
8.5 Producción enzimática y biomasa.....	72
8.6 Rutas metabólicas.....	73
8.7. Biodegradación de DEHF	75
9 . Conclusiones.....	77
10. Perspectivas	79
11. Lista bibliográfica	81
12. Anexos.....	99
13. Productos derivados de la Tesis	101

Fig. 1. Cepa y esporas de <i>F. culmorum</i> cultivadas en medio agar V8-CaCO ₃	13
Fig. 2. Estructura molecular de di(2-etilhexil) ftalato (DEHF)	15
Fig. 3. Esquema ilustrativo de la conformación estructural típica del plegamiento α/β -hidrolasa	16
Fig. 4. Representación esquemática del ciclo catalítico de una esterasa	17
Fig. 5. Esquema representativo del proceso de degradación de ftalatos mediante hidrólisis	19
Fig. 6. Esquema representativo del proceso de degradación de ftalatos mediante biodegradación	20
Fig. 7. Ruta de degradación de DEHF	20
Fig. 8. Diagrama de la metodología general empleada en el desarrollo del proyecto	29
Fig. 9. Producción de esporas de <i>F. culmorum</i> en medio agar y jugo V8	30
Fig. 10. Crecimiento de <i>F. culmorum</i> en fermentación en medio líquido (FML)	31
Fig. 11. Preparación del soporte y cultivo en FMS	33
Fig. 12. Cuantificación de proteínas mediante el ensayo colorimétrico de Bradford	34
Fig. 13. Ensayo de actividad de esterasas en sobrenadantes de cultivos de <i>F. culmorum</i>	35
Fig. 14. Zimografía para la detección de actividades enzimáticas	37
Fig. 15. Preparación y análisis de muestras mediante cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MS).....	39
Fig. 16. Biomasa seca producida por <i>F. culmorum</i> en medio adicionado con DEHF (□) y glucosa (○) en FMS	43
Fig. 17. Biomasa seca producida por <i>F. culmorum</i> en medio adicionado con DEHF (□) o glucosa (○) en FML	44
Fig. 18. Contenido de proteína soluble de <i>F. culmorum</i> en medio adicionado con DEHF (□) o glucosa (○) en FMS	45
Fig. 19. Contenido de proteína soluble de <i>F. culmorum</i> en medio adicionado con DEHF (□) o glucosa (○) en FML	46
Fig. 20. Actividad volumétrica de esterasas producida por <i>F. culmorum</i> en medio suplementado con DEHF (□) o glucosa (○) en FMS	47
Fig. 21. Actividad volumétrica de esterasas producida por <i>F. culmorum</i> en medio suplementado con DEHF (□) o glucosa (○) en FML.....	48
Fig. 22. Actividad específica de esterasas de <i>F. culmorum</i> en medios suplementados con DEHF (□) y glucosa (○) en FMS	49

Fig. 23. Actividad específica de esterasas de <i>F. culmorum</i> en medios suplementados con DEHF (□) y glucosa (○) en FML	50
Fig. 24. Zimograma de esterasas de <i>F. culmorum</i> en medio adicionado con DEHF crecido en FMS	52
Fig. 25. Zimograma de esterasas de <i>F. culmorum</i> en medio control crecido en FMS	53
Fig. 26. Zimograma de esterasas de <i>F. culmorum</i> en medio adicionado con DEHF crecido en FML	54
Fig. 27. Zimograma de esterasas de <i>F. culmorum</i> en medio control crecido en FML	55
Fig. 28. Relación entre la concentración de biomasa (Xcal) y la actividad de esterasas (P) en medio accionado con DEHF en FMS	56
Fig. 29. Relación entre la concentración de biomasa (Xcal) y la actividad de esterasas (P) en medio accionado con glucosa en FMS	57
Fig. 30. Relación entre la concentración de biomasa (Xcal) y la actividad de esterasas (P) de <i>F. culmorum</i> en medio accionado con DEHF en FML	58
Fig. 31. Relación entre la concentración de biomasa (Xcal) y la actividad de esterasas (P) en medio accionado con glucosa en FML	59
Fig. 32. Propuesta de la ruta de degradación de DEHF por <i>F. culmorum</i> en FMS... ..	61
Fig. 33. Propuesta de la ruta de degradación de DEHF por <i>F. culmorum</i> en FML.....	64
Fig. 34. Cinética de degradación de DEHF por <i>F. culmorum</i> en FMS	100

Índice de tablas

Tabla 1. Parámetros de crecimiento y rendimiento de esterasas de <i>F. culmorum</i> cultivado en medios adicionados con DEHF y medios control (glucosa).....	51
--	----

1. Introducción

Los ésteres de ácido ftálico, comúnmente denominados ftalatos, son sustancias químicas lipofílicas empleadas a gran escala como aditivos plásticos (plastificantes), cuya función principal es mejorar la flexibilidad, extensibilidad y durabilidad de los productos plásticos (Sánchez, 2021; Benjamín et al., 2015). Los plastificantes son los aditivos que se usan en mayor proporción (entre 10 y 70% p/p) en la elaboración de los plásticos (Galloway *et al.*, 2019; Hahladakis *et al.*, 2018; Groh *et al.*, 2019). Existen diversos tipos de plastificantes, sin embargo, en 2023, los ftalatos representaron alrededor del 59 % del mercado mundial de plastificantes (Merket.us 2024; GlobeNewswire, 2025). Los ftalatos son ampliamente utilizados en productos como: cosméticos, fragancias, pesticidas, productos de policloruro de vinilo (PVC), cables, tubería, pinturas, pisos de vinilo, etc. (Huang et al., 2013).

Particularmente, el di(2-etilhexil) ftalato (DEHF) representa el mayor volumen de producción y uso a nivel industrial ya que se utiliza en la elaboración de productos de PVC, caucho, celulosa y estireno, para la elaboración de productos como dispositivos médicos, lubricantes, aceites industriales, adhesivos, equipos eléctricos, electrónicos, empaques de alimentos y bebidas, etc. (Ren et al., 2017; Gilbert y Patrick, 2017; Sánchez, 2021).

El DEHF tiene una gran importancia en la industria de los plásticos, gracias a las características que aporta a los productos finales. Sin embargo, dicho compuesto ha sido clasificado como un contaminante prioritario por la agencia de protección ambiental de Estados Unidos (EPA) y por el centro de monitoreo ambiental de China (Yang *et al.* 2018), debido a su amplia distribución y a los riesgos que representa para la salud y el medio ambiente.

A diferencia de otros aditivos plásticos, los ftalatos no están unidos covalentemente a la matriz plástica, lo que facilita su migración y liberación, bajo ciertas condiciones, como aumento de temperatura, desgaste, etc. Este proceso favorece su desprendimiento y provoca su dispersión en el entorno y contribuye con la contaminación del agua, el suelo, la biota e incluso el aire (Hahladakis *et al.*, 2018). Los ftalatos se han reportado como contaminantes ambientales que causan preocupación por sus posibles efectos tóxicos y por su capacidad para alterar el sistema endocrino en organismos expuestos (Schaffert et al., 2022). En los seres humanos, las principales vías de exposición incluyen la adsorción dérmica, inhalación, la ingesta o la exposición intravenosa (Hauser y Calafat., 2005). Dichas exposiciones se han asociado con

efectos adversos en el hígado, los riñones, el cerebro, los pulmones y el sistema reproductivo tanto en humanos como en otros mamíferos (Brassea-Pérez et al., 2022). En particular, la exposición a DEHF se ha vinculado con la aparición de cáncer de hígado, toxicidad testicular, anovulación, y alteraciones en el crecimiento fetal, entre otros efectos (Hauser y Calafat., 2005).

Dado que la exposición humana está directamente relacionada con la contaminación ambiental, resulta fundamental conocer la distribución del DEHF en diferentes ecosistemas. En el medio ambiente, diversos estudios han reportado su presencia; por ejemplo, en sedimentos de zonas industriales donde se manufactura, se han detectado concentraciones de 7.5 a 2045 mg/Kg (Green Facts, 2008). En el aire urbano europeo se han registrado niveles de hasta 1439 ng/m³ (Guerranti et al., 2019). En México, la presencia de ftalatos ha sido documentada en el Valle del Mezquital, donde DEHF se ha identificado como uno de los principales contaminantes en todos los canales de agua residuales y en fuentes de agua subterránea, alcanzando concentraciones máximas de 62.26 µg/L (Lesser et al., 2018).

En alimentos se ha reportado que en agua embotellada se han encontrado concentraciones de 0.016 a 75 µg/L (Vázquez et al., 2017). También se ha identificado en productos agrícolas, como pimientos cultivados en invernaderos recubiertos con películas plásticas, con concentraciones de 44.51 a 66.15 µg/kg (Li et al., 2020). Además, se ha reportado que el consumo de alimentos ultra procesados durante el embarazo se asocia con mayor exposición a ftalatos (específicamente de DEHF) (Baker et al., 2024). Una vez ingeridos, se estima que aproximadamente el 70 % pueden metabolizarse y excretarse mediante, el sudor, la orina y las heces (Brassea-Pérez et al., 2022), y en el caso de los diésteres tienden a hidrolizarse a monoésteres (Heindel y Powell, 1992).

No obstante, los ftalatos liberados al medio ambiente muestran una notable persistencia. Si bien pueden degradarse mediante procesos abióticos como la fotodegradación, ésta ocurre a una velocidad limitada (Benjamín et al., 2015). En condiciones abióticas, el DEHF puede persistir hasta alrededor de 2000 años; mientras que en presencia de microorganismos y en entornos aerobios la degradación puede ser en días o semanas (Boll et al., 2020); EPA 2024). En este contexto, la evidencia científica indica que los microorganismos desempeñan un papel esencial en la degradación ambiental de ftalatos bajo múltiples condiciones (Liang et al., 2008). En

consecuencia, la biodegradación representa una de las alternativas más eficientes y económicas para la eliminación de contaminantes ambientales, debido a la notable capacidad de los microorganismos para adaptarse a condiciones adversas y persistir en ambientes extremos (Gao y Wen, 2016; Panigrahy et al., 2022; Bala et al., 2022; Sánchez, 2024). Esta capacidad se ve reforzada por la producción de enzimas que transforman contaminantes estructuralmente complejos, así como la excreción de surfactantes naturales (biosurfactantes), los cuales son compuestos que facilitan la adhesión de los microorganismos a sustratos hidrófobos y mejorar la eficiencia en la degradación de organocontaminantes, al incrementar su biodisponibilidad para su absorción y metabolismo (Sánchez, 2020). Se ha reportado que algunos microorganismos producen mayores cantidades de biosurfactantes en presencia de sustratos hidrofóbicos; sin embargo, estos compuestos también pueden sintetizarse cuando crecen sobre sustratos hidrofílicos (Gautam and Tyagi, 2006; Sánchez, 2020).

Los biosurfactantes son sustancias tensoactivas compuestas por regiones hidrofílicas e hidrofóbicas, lo que les permite interactuar en las interfases y reducir la tensión superficial (Santos et al., 2016). La región hidrofílica puede presentar carga eléctrica negativa, positiva o neutra. La mayoría de los biosurfactantes son neutros o aniónicos; sin embargo, aquellos que tienen grupos amina pueden comportarse como catiónicos. El componente hidrofóbico suele estar constituido por ácidos grasos de cadena larga, mientras que la región hidrofílica puede incluir carbohidratos, aminoácidos, péptidos cíclicos, ácidos carboxílicos, fosfatos o alcoholes. En general, la masa molecular de los biosurfactantes microbianos (principalmente los producidos por bacterias) varía entre 500 y 1500 Da (Mulligan, 2007).

En el caso de hongos ascomicetos y basidiomicetos se han descrito las hidrofobinas, que son proteínas que incluyen ocho residuos de cisteína formando cuatro puentes disulfuro en una posición conservada. Estas proteínas se ensamblan en capas anfipáticas en las interfaces hidrofóbicas-hidrofílicas y tienen pesos moleculares que oscilan entre 7000 y 36500 Da (Wu et al., 2017; Sánchez, 2020).

Por otro lado, en algunas especies pertenecientes a los órdenes Saccharomycetales y Ustilaginales se ha reportado la producción de glicolípidos como soforolípidos, lípidos de celobiosa y lípidos de mannosileritritol (Günther et al., 2017). Estas moléculas desempeñan un

papel importante en la interacción entre el microorganismo y el contaminante, especialmente en la transformación de compuestos hidrofóbicos.

A pesar de la eficiencia de la degradación microbiana, es necesario analizar las rutas de degradación para asegurar que los productos generados no representen riesgos de toxicidad (Wackett, 2014). La mayor parte de estudios que evalúan la degradación de DEHF por diversos microorganismos (principalmente bacterias y hongos) se han realizado en fermentación líquida (Li et al., 2018; Singh et al., 2021; González-Márquez et al., 2019).

A pesar del creciente número de estudios sobre la degradación bacteriana de DEHF, existen pocos trabajos que evalúen la capacidad de los hongos como *F. culmorum*, bajo condiciones de fermentación sólida y líquida. Por ello, resulta relevante analizar el desarrollo del microorganismo en ambos sistemas para comprender cómo el tipo de cultivo influye en la producción enzimática y la eficiencia de degradación.

En este contexto, la fermentación en medio líquido (FML), también conocida como fermentación sumergida (SmF), consiste en el cultivo de microorganismos en medios líquidos que aportan los nutrientes necesarios para su crecimiento y el metabolismo (Amobonye et al., 2023). En este sistema, el sustrato se mantiene disuelto o suspendido en el medio de cultivo, lo que favorece la disponibilidad de nutrientes.

Por otra parte, la fermentación en medio sólido (FMS) consiste en el cultivo de microorganismos sobre un soporte sólido inerte o lignocelulósico con elevada porosidad y humedad limitada, de modo que el agua disponible se encuentra principalmente adsorbida al sustrato y distribuida en una microcapa líquida en contacto con la interfase área y el sustrato. Bajo estas condiciones, los hongos filamentosos constituyen los biocatalizadores más eficientes, debido a su modo de crecimiento micelial, su adaptación a bajas cantidades de agua y su tolerancia a gradientes osmóticos elevados, lo que los convierte en la microflora más predominante y adecuada para este tipo de procesos (Chen, 2013).

Las principales ventajas de la FMS radican en la adecuada adaptación fisiológica del microorganismo al sustrato lignocelulósico o inerte y la baja incidencia de contaminación bacteriana debido a la baja actividad de agua en el sistema. Además, este sistema permite la

acumulación de enzimas extracelulares en títulos más concentrados (Singh et al., 2021; Navarro-Pineda et al., 2016).

A escala industrial, la FML presenta varias ventajas frente a la FMS porque permite operarse en condiciones controladas, facilita la recuperación del producto y asegura una mayor reproducibilidad. Además, los parámetros como el pH, temperatura, agitación, aireación, y la formación de espuma pueden controlarse con precisión para optimizar el crecimiento microbiano y mejorar los rendimientos. En particular, la temperatura es más fácil de controlar lo cual es importante ya que este factor determina la síntesis enzimática, influye en la velocidad de crecimiento, la concentración del oxígeno disuelto y afecta la calidad del producto. Por otra parte, la morfología fúngica depende de factores como la velocidad de agitación, el pH, la transferencia de masa y las pequeñas partículas presentes en el medio (Singh et al., 2021).

La FML ha sido el sistema más utilizado para estudiar la degradación microbiana de ftalatos, incluyendo compuestos como dibutil ftalato (DBF), dimetil ftalato (DMF), dietil ftalato (DEF), butil bencil ftalato (BBF), di(2-etilhexil) ftalato (DEHF), y otros ésteres de ftalato. En este tipo de cultivo se han evaluado numerosas bacterias y consorcios, entre ellos *Paracoccus kondratievae*, *Bacillus velezensis* SYBC H47, *Variovorax paradoxus* T4 (AY878410), *Arthrobacter* sp., *Halomonas* sp., *Microbacterium* sp., *Gordonia* sp., y *Pseudomonas* sp., así como algunos hongos como *Fusarium culmorum* Fc1-CICBUAT, *Pleurotus*., y *Ascocoryne* sp.

2. Antecedentes

2.1 Aspectos generales del género *Fusarium*

2.1.1 Generalidades del género *Fusarium*

Los hongos del género *Fusarium* se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo y plantas (Tapia y Amaro, 2014). Este género es un grupo cosmopolita de hongos que destaca por incluir numerosas especies fitopatógenas, productoras de diversos metabolitos secundarios y en algunos casos ciertas especies son agentes de micosis en seres humanos (Suga y Hyakumachi, 2004). En general, las colonias del género *Fusarium* suelen presentar tonalidades blancas, rosada, violetas o anaranjadas, con una textura algodonosa, incluyen hifas septadas y pueden presentar macroconidios multiseptados, microconidios ovales o elipsoidales y clamidosporas resistentes (Leslie y Summerell, 2006).

2.1.2 *Fusarium culmorum*

Dentro de este género, *Fusarium culmorum* (*F. culmorum*) es una especie que tiene relevancia agrícola y ecológica. Taxonómicamente, pertenece a la familia Hypocreaceae, orden Hypocreales, clase Sordariomycetes, phylum Ascomycota, reino Fungi. Presenta una reproducción sexual o asexual; sin embargo, en condiciones naturales y de laboratorio predomina la reproducción asexual mediante la formación de conidios (Leslie y Summerell, 2006; Kuhar et al., 2013; Dube, 2015). Morfológicamente, *F. culmorum* se caracteriza por presentar una apariencia algodonosa (Fig. 1A) y macroconidios curvados de color anaranjado casi marrón, paredes gruesas, y ápices romos. Generalmente poseen cinco septos, aunque pueden observarse variantes con tres a ocho septos (Fig. 1B). Las clamidosporas miden aproximadamente 10-14 x 9-12 μm (Sempere et al., 2004).

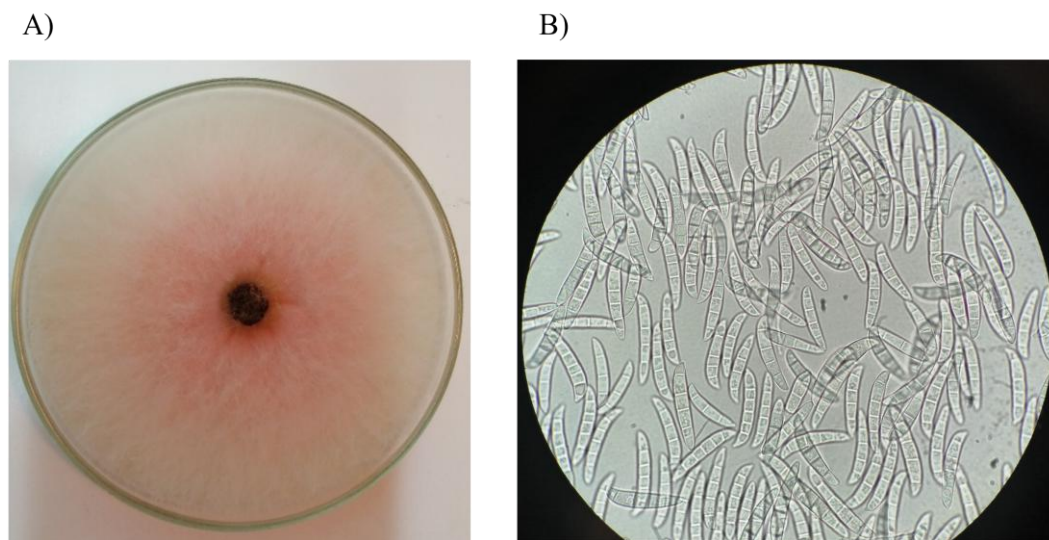


Fig. 1. A) Cepa de *Fusarium culmorum* cultivada en medio sólido de agar extracto de malta (EMA) (Hernández- Sánchez et al., 2020). Esporas de *F. culmorum* cultivadas en medio agar V8-CaCO₃, observadas con microscopía óptica empleando un objetivo de 40 X.

2.1.3 Potencial biotecnológico de *Fusarium*

El género *Fusarium* ha adquirido interés biotecnológico debido a su capacidad para biodegradar compuestos contaminantes persistentes en el medio ambiente. Entre las especies reportadas se encuentran *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. oxysporum*, asociadas con la degradación de hidrocarburos (Al-Otibi et al., 2023); *F. solani* implicada en la mitigación de hexano (Arriaga et al., 2006) y especies como *F. oxysporum* y *F. graminearum* involucradas en la degradación de colorantes sintéticos (Le et al., 2023; Yucel, 2018; Cervantes-González et al., 2020).

De manera particular, *Fusarium culmorum* ha sido reportado como una especie de interés gracias a su capacidad para la degradación de plastificantes como DEHF y otros ftalatos (Ahuactzin-Pérez et al., 2016; González Márquez et al.: 2019). Otro ejemplo relevante es *Fusarium solani* una especie productora de cutinasas altamente versátiles, capaces de catalizar

reacciones tanto de síntesis de polímeros como la degradación de bioplásticos como la poli ϵ -caprolactona, según las condiciones del medio de reacción (Li et al., 2017).

Además, cepas como *Fusarium sp.* ZH-H2 han mostrado la capacidad de secretar enzimas oxidativas como lignina peroxidasa, lacasas, manganeso peroxidasa que permiten degradación de compuestos contaminantes recalcitrantes, tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Zhang et al., 2020).

En general, la capacidad de los hongos para degradar una amplia variedad de sustratos se puede atribuir a su modo de crecimiento apical, que les permite penetrar y colonizar diversos sustratos, algunos con estructuras complejas. La red interconectada de sus hifas favorece el transporte de nutrientes y, a través de ellas, los hongos secretan enzimas y biosurfactantes que facilitan los procesos solubilización y degradación de compuestos en algunos casos xenobióticos (Sánchez, 2024).

2.2 Aspectos generales de DEHF

Los ésteres de ácido ftálico comúnmente denominados ftalatos, son compuestos orgánicos obtenidos mediante la reacción química entre un alcohol y un anhídrido ftálico. Existen una gran variedad de ftalatos; sin embargo, entre los más utilizados se encuentran el dibutil ftalato (DBF), bencilbutil ftalato (BBF) y di(2-etilhexil) ftalato (DEHF), siendo este último el de mayor producción a nivel mundial (Ren et al., 2017; Gilbert y Patrick, 2017).

El DEHF es un compuesto orgánico que se utiliza principalmente en la elaboración de productos de PVC. Tiene varios nombres sinónimos, donde destaca: bis(2-etilhexil) ftalato, di-(2-etilhexil) ftalato, dietilhexil ftalato y dioctil ftalato (DOF o DOP). Molecularmente, está constituido por un anillo bencénico enlazado a dos cadenas alquílicas ramificadas de ocho átomos de carbono mediante enlaces éster (Fig. 2). La fórmula condensada es $C_{24}H_{38}O_4$ y su peso molecular es de 390.56 g/mol. DEHF es lipofílico por lo cual no se puede mezclar con el agua, pero, es bastante soluble en removedores de pintura, gasolina y aceites; además, no se evapora con facilidad, (IDESA, 2017; Rowdhwal y Chen, 2018).

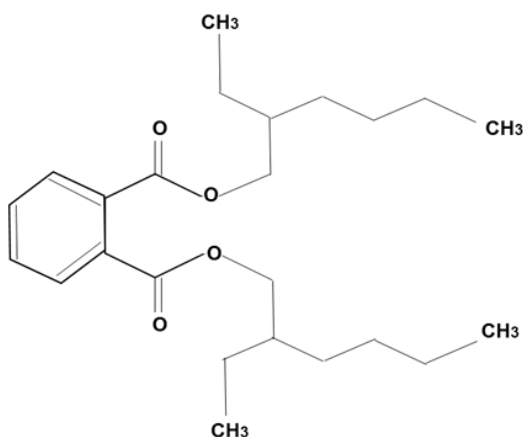


Fig. 2. Estructura molecular de di(2-etilhexil) ftalato (DEHF). Imagen tomada de Pubchem (2023).

2.3 Enzimas esterasas

2.3.1 Clasificación y estructura

Las esterasas son enzimas capaces de hidrolizar enlaces éster, generando como productos un alcohol y un ácido carboxílico mediante la incorporación de una molécula de agua. Existe una gran variedad de esterasas, cada variante difiere por su estructura, especificidad y funciones bioquímicas y biológicas (Shabbir et al., 2022).

Las esterasas pertenecen a la subclase de hidrolasas y se clasifican con el número EC. 3.1.1.x, donde x, corresponde al sustrato. Las esterasas “verdaderas” (EC 3.1.1.13, carboxil éster hidrolasas) actúan preferentemente sobre ésteres solubles y sustratos de cadena corta o mediana. Muchas de ellas forman parte de la superfamilia α/β -hidrolasa, la cual se caracteriza por un orden definido de hélices α y láminas β (Fig. 3). La triada catalítica de las esterasas está conformada por los aminoácidos Serina (Ser), Ácido Aspártico (Asp) e Histidina (His) (Bornscheuer, 2002).

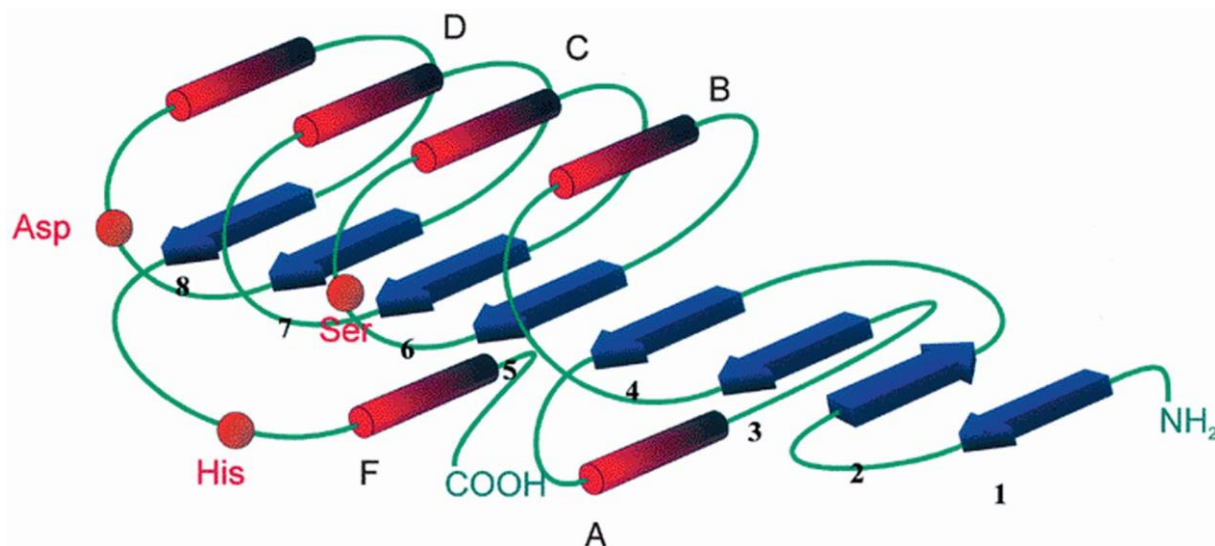


Fig. 3. Esquema ilustrativo de la conformación estructural típica del plegamiento α/β -hidrolasa, donde las láminas β (1–8) se muestran como flechas azules, las hélices α (A–F) como cilindros rojos y la tríada catalítica se indican con círculos naranjas. Adaptado de Bornscheuer (2002).

2.3.2 Mecanismo catalítico

El mecanismo catalítico de esterasas, tanto para hidrólisis como para la formación de ésteres (Fig. 4) comienza cuando el sustrato se une a la serina del sitio activo, dando lugar a un intermediario tetraédrico que es estabilizado por la histidina y el ácido aspártico de la triada catalítica. Posteriormente, el alcohol proveniente del éster carboxílico es liberado y se forma el complejo acil-enzimático. Después, un nucleófilo (agua en caso de hidrólisis o alcohol/éster en el caso de (trans) esterificación) ataca al complejo acil-enzima, generando un segundo intermediario tetraédrico. Finalmente, la descomposición de este intermediario libera el producto (un ácido o un éster) y se restablece la enzima en su forma libre (Bornscheuer, 2002).

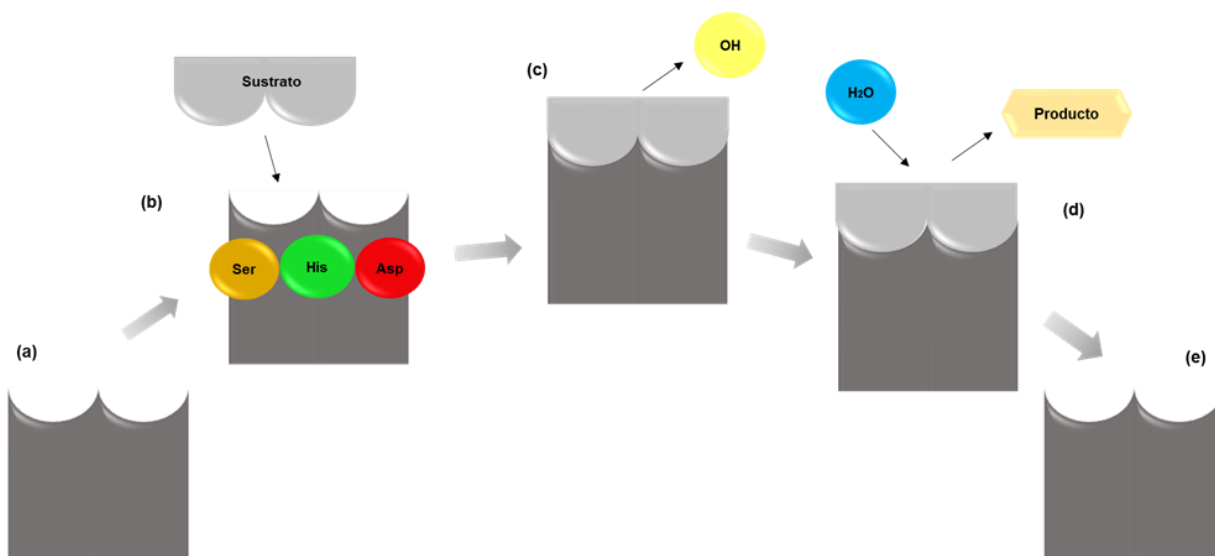


Fig. 4. Representación esquemática del ciclo catalítico de una esterasa. Enzima esterasa en el inicio del ciclo catalítico (a). Unión del sustrato a la serina formando el tetraédrico intermediario, estabilizado por His y Asp (b). Liberación del alcohol y formación de complejo enzimático (c). Ataque del nucleófilo y generación de producto (d). Enzima esterasa libre (e).

2.3.3 Aplicaciones generales de las esterasas y biorremediación

Las esterasas microbianas tienen múltiples aplicaciones biotecnológicas, en sectores como la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica y textil, gracias a su capacidad para catalizar tanto reacciones de síntesis (esterificación/transesterificación) como de hidrólisis con alta especificidad y selectividad (Panda y Gowrishankar, 2005). En la industria alimentaria, por ejemplo, se emplean para generar ésteres responsables del sabor y aroma como es el caso de los compuestos frutales presentes en vino, quesos y jugos (Raveendran et al., 2018; Liu et al., 2013).

En el sector farmacéutico, las esterasas se emplean para el diseño y aplicación de profármacos basados en enlaces éster, para el tratamiento de infecciones microbianas resistentes a antibióticos (Larsen et al., 2019).

Asimismo, se ha reportado el uso de esterasas asociadas a la degradación de carbohidratos, como las esterasas xilanolíticas, las cuales actúan sobre la hemicelulosa vegetal (xilano), contribuyendo con la descomposición de la pared celular vegetal para liberar algunos componentes de interés industrial como azúcares fermentables, para la producción de bioetanol o mejoramiento de fibras vegetales (Puchart y Biely et al., 2023).

En biorremediación, las esterasas desempeñan un papel fundamental al catalizar la hidrólisis inicial de contaminantes hidrofóbicos y persistentes, permitiendo su transformación a compuestos más polares y menos tóxicos que pueden ser metabolizados posteriormente mediante rutas metabólicas microbianas (Huang et al., 2013). Las esterasas se han reportado en la degradación de plastificantes, ésteres de ftalatos, plaguicidas y herbicidas, donde actúan rompiendo los enlaces éster que son altamente resistentes a procesos abióticos (Bhatt et al., 2021; Casida, 2017). Las esterasas de origen microbiano han mostrado alta eficiencia para la degradación de DEF, DBF, DMF y DEHF, facilitando la despolimerización y posteriormente la mineralización (Li et al., 2018).

2.4 Principales rutas de degradación de ftalatos

Los principales procesos de degradación de los ftalatos son la biodegradación, la fotólisis y la hidrólisis. Huang et al. (2013) describen la hidrólisis como una de las principales vías de degradación abiótica de sustancias xenobióticas, que consiste en formar un monoéster de alcohol y en la segunda se genera el ácido ftálico y un segundo alcohol (Fig. 5).

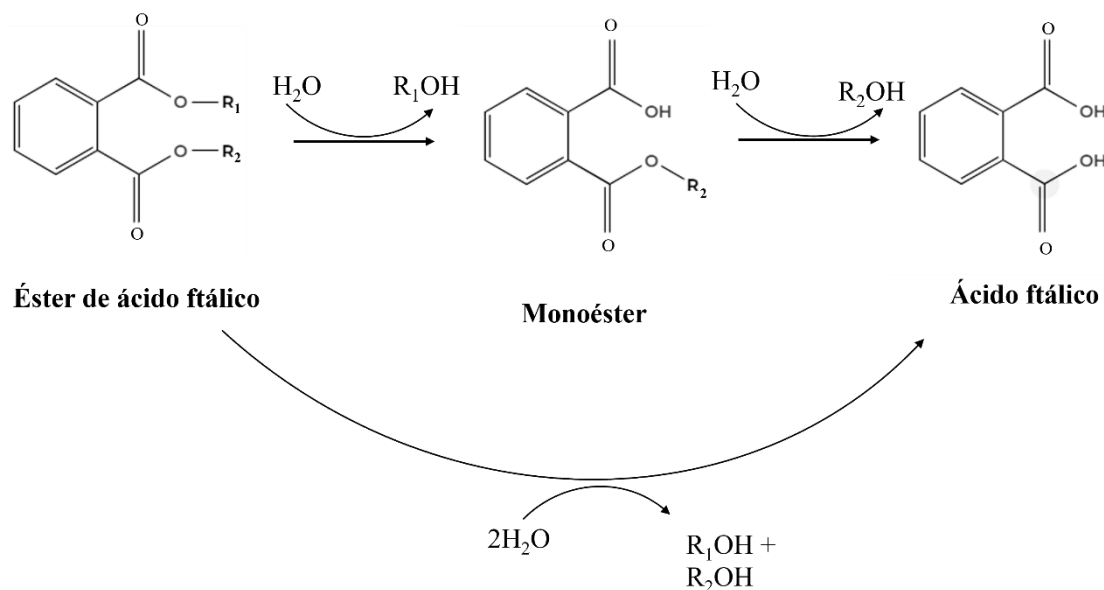


Fig. 5. Esquema representativo del proceso de degradación de ftalatos mediante hidrólisis. Traducido al español a partir de Huang et al. (2013).

Algunos autores describen que la biodegradación de los ftalatos ocurre a través de una serie de transformaciones sucesivas en las que los ésteres de ftalato se convierten primero en monoésteres, luego en ácido ftálico y finalmente en compuestos inorgánicos como CO_2 y/o CH_4 (Fig. 6). En condiciones aerobias el ácido ftálico se oxida por hidroxilación y descarboxilación, generando ácido protocatecuico, el cual posteriormente es mineralizado a CO_2 mediante la ruptura de orto o meta del anillo aromático (Fig. 7). Mientras que, en condiciones anaeróbicas, el ácido ftálico es convertido por descarboxilación en ácido benzoico, que a su vez se descompone a través de la saturación del anillo aromático para producir hidrógeno, CO_2 y acetato. Por otro lado, se ha reportado que las cadenas de ftalatos cortas como, dimetil ftalato (DMF), dietil ftalato (DEF), dibutil ftalato (DBF), etc., son más fáciles de degradar y

mineralizar, que las cadenas largas como, dihexil ftalato (DHF) y DEHF (Huang et al., 2013; Xu et al., 2017).

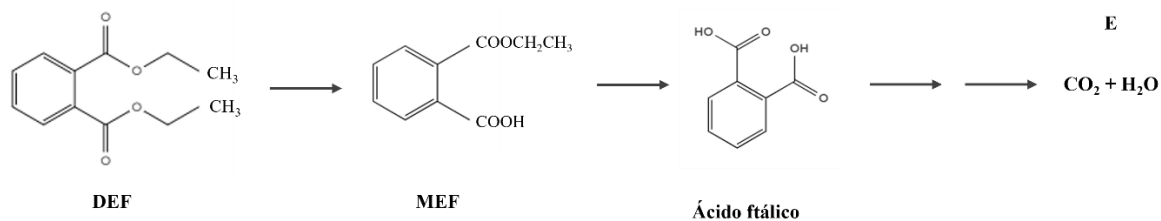


Fig. 6. Esquema representativo del proceso de degradación de ftalatos mediante biodegradación. Traducido al español a partir de Patil y Jena (2019).

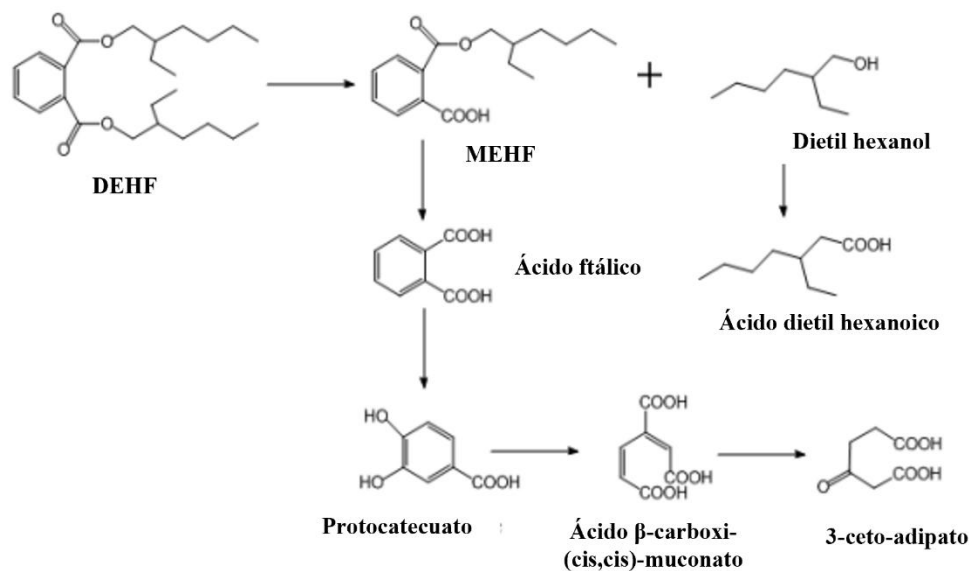


Fig. 7. Ruta de degradación de DEHF por *Acinetobacter* sp. Traducido al español a partir de Xu et al. (2017).

Ahuactzin-Pérez et al. (2016) estudiaron la degradación de DEHP (1000 mg/L) por *F. culmorum* en un medio suplementado con glucosa y extracto de levadura en fermentación líquida, y encontraron que DEHF es degradado a monoetilhexil ftalato, generando butanediol como compuesto final de la degradación. En este estudio, la ruta de degradación de DEHF fue propuesta empleando un modelado químico cuántico, mismo que está basado en la predicción

del flujo de electrones (i.e. cálculo del coeficiente de transferencia electrónica o ETC) de los compuestos detectados empleando GC-MS. En este análisis se calcularon los parámetros cuánticos E_{HOMO} y E_{LUMO} , mismos que permitieron evaluar la banda prohibida (band gap) y el ETC de los compuestos detectados (intermediarios de la degradación de DEHP). Un ETC mayor indica que los electrones requieren más energía para superar la banda prohibida (band gap), lo que indica que se requiere de una enzima para catalizar esta reacción (reacción que va de una sustancia con un ETC mayor a una sustancia con un ETC menor) (Odunola and Semire, 2007; González-Pérez et al., 2014). Si el ETC es menor los electrones se mueven más rápidamente, lo que indica que la sustancia es más estable y tiene una probabilidad más baja de reaccionar (González-Pérez et al., 2014; Ahuactzin-Pérez et al., 2016).

3. Justificación

La contaminación ambiental por ftalatos, especialmente por di(2-etilhexil) ftalato (DEHF), representa un riesgo para la salud humana y los ecosistemas debido a su toxicidad. Por lo que resulta prioritario desarrollar alternativas sustentables para su remoción. La biodegradación mediada por microorganismos es una opción prometedora, y *F. culmorum* ha mostrado un alto potencial debido a su amplia capacidad enzimática. En particular, se ha demostrado que este hongo es capaz de degradar distintos ftalatos, como di(2-etilhexil) ftalato y dibutil ftalato, en sistemas de fermentación en medio líquido, incluso a altas concentraciones del compuesto contaminante.

Por otro lado, se sabe que la fermentación en medio sólido provee un ambiente más cercano al natural para los hongos filamentosos, y este tipo de cultivo incrementa la producción de enzimas hidrolíticas. Sin embargo, la información disponible acerca de las diferencias entre la biodegradación de DEHF por *F. culmorum* en fermentación en medio líquido y sólido no ha sido explorada.

En este contexto, resulta pertinente caracterizar comparativamente ambos sistemas, considerando parámetros de crecimiento, perfiles enzimáticos y rutas metabólicas de degradación, con el fin de generar conocimiento fundamental que sustente el diseño de procesos biotecnológicos avanzados orientados a la biorremediación de ambientes contaminados con ftalatos.

4. Hipótesis

La cepa (Fc1-CICBUAT) de *Fusarium culmorum* degrada el plastificante DEHF mediante la producción de esterasas. El crecimiento, perfil enzimático de esterasas y las rutas de degradación serán diferentes en ambos sistemas de fermentación, sólida y líquida. Estas diferencias aportaran evidencia experimental útil para el diseño y mejora de estrategias para la biorremediación de ftalatos.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Comparar la degradación de di(2-etilhexil) ftalato (DEHF) por *Fusarium culmorum* en sistemas de fermentación sólido y líquido, mediante el análisis del crecimiento, la actividad de esterasas, los perfiles de zimografía y la identificación de compuestos intermediarios de degradación, con el fin de determinar el sistema de cultivo que favorezca la degradación de DEHF.

5.2 Objetivos específicos

- Comparar el crecimiento de *Fusarium culmorum* en fermentación sólida (FMS) y líquida (FML) en presencia de DEHF como única fuente de carbono.
- Evaluar la actividad de esterasas producida por *F. culmorum* en ambos sistemas de fermentación, analizando la actividad volumétrica y específica.
- Caracterizar los perfiles de isoenzimas involucradas en la degradación de DEHF mediante zimografía para la FMS y la FML.
- Identificar los compuestos intermediarios de degradación generados durante la fermentación, mediante GC-MS, y proponer la ruta de degradación de DEHF para cada sistema de fermentación.

6. Materiales y Métodos

En la figura 8 se muestra un esquema de la metodología general empleada. El diagrama incluye el crecimiento del microorganismo en dos sistemas de cultivo: fermentación en medio sólido (FMS), utilizando espuma de poliuretano (PUF) como soporte inerte, y fermentación en medio líquido (FML). En ambos sistemas se empleó DEHF como única fuente de carbono y se evaluaron la actividad enzimática, se realizó análisis zimográfico y la identificación de compuestos intermediarios de degradación. Los resultados obtenidos permitieron proponer las rutas de degradación y comparar ambos sistemas de fermentación.

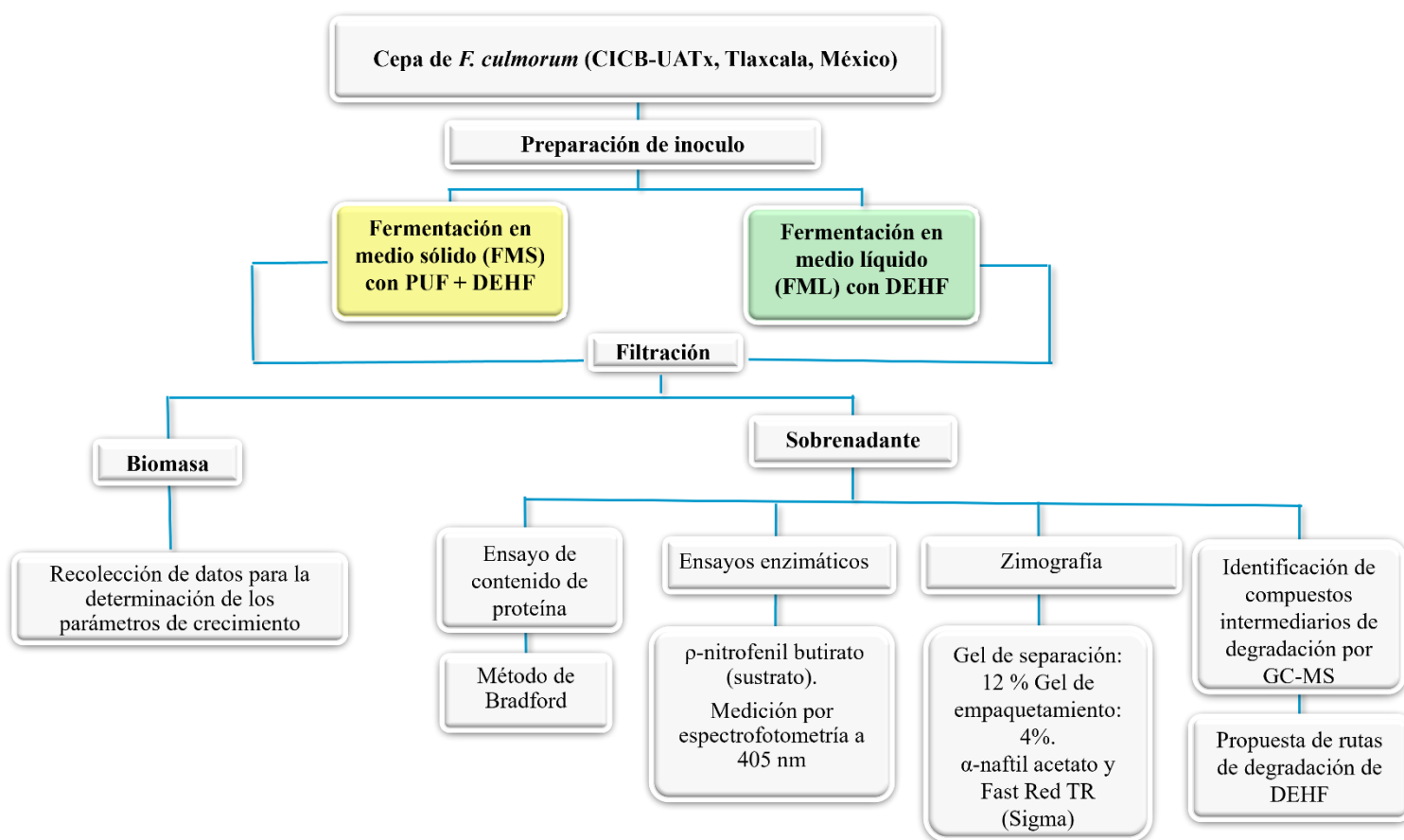


Fig. 8. Diagrama de la metodología general empleada en el desarrollo del proyecto.

6.1 Microorganismo y obtención del inóculo

Las esporas de *F. culmorum* Fc1-CICBUAT empleadas en este estudio se obtuvieron a partir de una cepa conservada en la colección de microorganismos del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx). La cepa fue aislada de un sitio contaminado por compuestos plastificantes (Aguilar- Alvarado et al., 2015). La producción de esporas se llevó a cabo mediante el cultivo del hongo en medio sólido de agar y jugo V8 suplementado con CaCO_3 a 25 °C durante 5 días. Posteriormente, las esporas obtenidas se resembraron en el mismo medio de cultivo y se incubaron nuevamente a 25 °C durante 7 días (Fig. 9), con el propósito de incrementar la cantidad de esporas. La recolección de esporas se realizó con una solución estéril de Tween 80 al 0.01% (v/v). El conteo de esporas se llevó a cabo utilizando una cámara Neubauer (Marienfeld, Alemania) y un microscopio óptico (OLYMPUS BX40, Japón) equipado con un objetivo de 40x. Finalmente, la suspensión de esporas que se empleó en los experimentos se ajustó a una concentración de 1×10^7 esporas/ mL (González-Márquez et al., 2019).



Fig. 9. Producción de esporas de *F. culmorum* en medio sólido de agar y jugo V8 suplementado con CaCO_3 , incubado durante 7 días a 25 °C.

6.2 Fermentación en medio líquido

La fermentación en medio líquido se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 125 mL, cada uno con 50 mL de medio de cultivo ajustado a un pH inicial de 6.5. La inoculación se realizó con una suspensión de esporas a una concentración de 1×10^7 esporas/mL. Los cultivos se incubaron en una incubadora orbital (INO 650V-7, Prendo) a 120 rpm durante 312 h (Fig. 10). Se recolectaron muestras por triplicado cada 12 h, utilizando matraces independientes para cada tiempo de incubación. La biomasa del microorganismo se separó mediante filtración con papel filtro y el sobrenadante se almacenó para análisis posteriores.

El medio de cultivo contenía la siguiente composición (en g/L): DEHF (Sigma; pureza $\geq 99.5\%$) como única fuente de carbono, 3.0; $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, 1.17; K_2HPO_4 , 0.64; $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.02; KCl, 0.24; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.24; CaCl_2 , 0.5 y 300 $\mu\text{L/L}$ Tween 80.

Como medio control se utilizó glucosa (Merck, México) como única fuente de carbono (10.0 g/L), y la composición fue la siguiente (en g/L): $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, 2.2; K_2HPO_4 , 1.2; $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.01; KCl, 0.4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.46; CaCl_2 , 0.5 y Tween 80, 300 $\mu\text{L/L}$.

En ambos casos, la relación carbono/nitrógeno (C/N) se ajustó a 10.

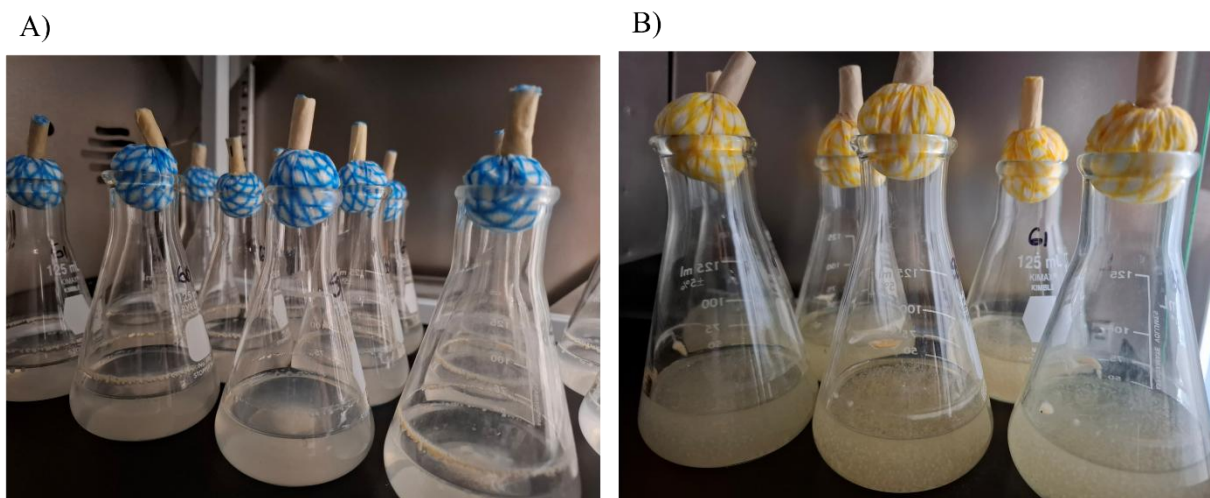


Fig. 10. Crecimiento de *F. culmorum* en fermentación en medio líquido (FML). A) Medio suplementado con DEHF como única fuente de carbono. B) Medio control con glucosa como fuente de carbono.

6.3 Fermentación en medio sólido

La fermentación en medio sólido se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL cada uno con 24 mL de medio de cultivo ajustado a un pH inicial de 6.5 y 1 g de espuma de poliuretano tratada (PUF, por sus siglas en inglés), con una densidad de $14 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$. La PUF fue previamente cortada en cubos de 0.5 cm y tratada con soluciones de HCl y NaOH al 1 N durante 24 horas cada una (Fig. 11A), para eliminar impurezas superficiales. Posteriormente, la PUF fue lavada repetidamente con agua destilada para remover el exceso de reactivos y se secó en un horno (AR-290D) a 40°C durante 48 h.

El medio de cultivo empleado tuvo la siguiente composición (en g/L): DEHF (sigma con 99 % de grado de pureza) como fuente de carbono, 3.0; $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, 1.172; K_2HPO_4 , 0.64; $\text{FeSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 0.02; KCl, 0.24; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.24; $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, 0.5 y Tween 80, 300 $\mu\text{L/L}$. Luego de la esterilización por autoclave, el medio de cultivo fue sonificado con un procesador ultrasónico (GEX 130) con el fin de asegurar la homogenización de los compuestos hidrófobos y la adecuada dispersión de las sales sedimentadas. Finalmente, el medio de cultivo se ajustó a un pH de 6.5.

Como control, se utilizó un medio con la siguiente composición (en g/L): glucosa (Merck, México) como fuente de carbono, 10.0; $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, 2.2; K_2HPO_4 , 1.2; $\text{FeSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 0.01; KCl, 0.4; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.46; $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5; Tween 80, 300 $\mu\text{L/L}$.

El medio de cultivo se inoculó con suspensión de esporas a una concentración de 1×10^7 esporas/mL. Los matraces se incubaron en una estufa de cultivo (Lúmina IBT-330) a 25°C durante 312 h. Se tomaron muestras por triplicado cada 12 h, utilizando matraces independientes para cada tiempo de incubación. (Fig. 11B).

El material sólido del sistema (PUF con biomasa adherida) se separó del extracto líquido mediante filtración y se secó a 60°C durante 48 h, hasta alcanzar peso constante. La biomasa se cuantificó por diferencia de peso (Canavati-Alatorre et al., 2016; Conde-Ávila et al., 2023; Ahuactzin-Pérez et al., 2016).

La relación carbono/nitrógeno (C/N) se ajustó a 10.

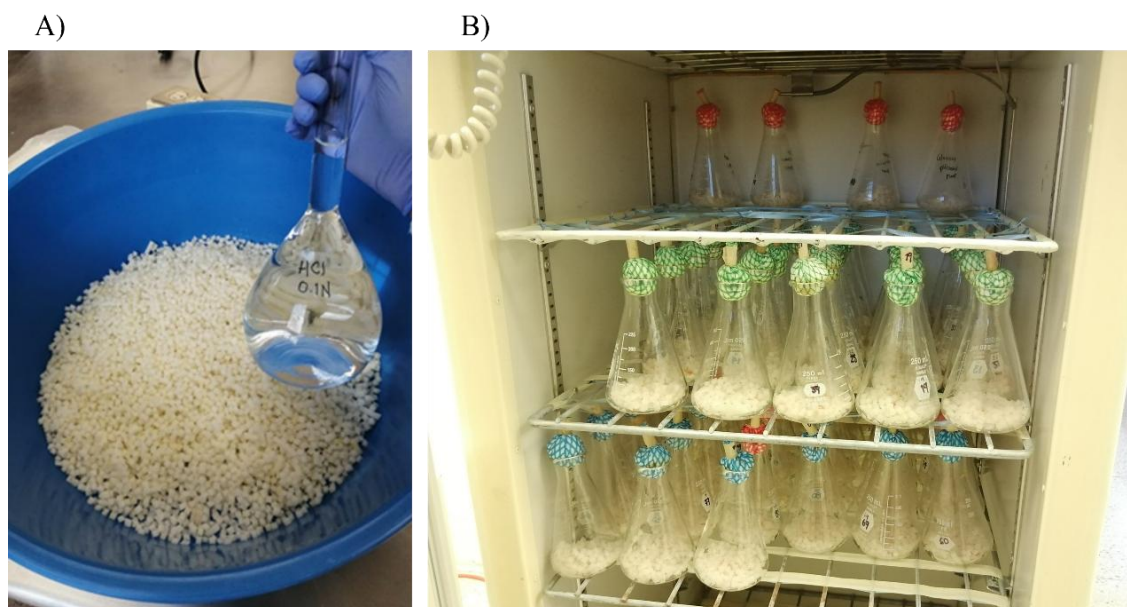


Fig. 11. Preparación del soporte y cultivo en FMS. A) Pretratamiento de la PUF. B) Matrices con medio de cultivo e inóculo incubados a 25° C durante 312 h.

6.4 Determinación del contenido de proteína

El contenido de proteína en las muestras se realizó de acuerdo con el método descrito por Bradford (1976). Para cada muestra experimental, se preparó mezcla de reacción compuesta por 100 μ L de sobrenadante, 200 μ L de reactivo de Bradford (Bio-Rad) y 700 μ L de agua destilada (Fig. 12). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, se midió el cambio en la absorbancia a 595 nm utilizando un espectrofotómetro (S-2150, Dayton, NJ, EUA).

La concentración de proteína en cada muestra se determinó mediante la interpolación en una curva estándar elaborada con soluciones de albumina sérica bovina (BSA) a concentraciones conocidas (0-10 μ g/mL), cuyas absorbancias también fueron medidas a 595 nm.



Fig. 12. Cuantificación de proteínas mediante el ensayo colorimétrico de Bradford.

6.5 Ensayo cromogénico para la determinación de actividad esterasas

La evaluación de la actividad de enzimas esterasas se realizó siguiendo la metodología descrita por Ferrer-Parra et al. (2018), con modificaciones. Para cada muestra, la mezcla de reacción contenía 100 μ L del sobrenadante y con 900 μ L de sustrato (Fig. 13). Las muestras con alta intensidad de color fueron diluidas con agua destilada, para asegurar que las mediciones de absorbancia se mantuvieran dentro del rango lineal del equipo.

La solución de sustrato se elaboró con 1.76 % de *p*-nitrofenil butirato disuelto en buffer de fosfatos (pH 7.5), 1.11 % de acetonitrilo, 11.1 % de agua destilada y 0.04 % de Tritón X-100. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 5 minutos y la reacción se detuvo mediante inmersión en un baño con agua fría. Posteriormente, se midieron los cambios en la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro (S-2150, Dayton, NJ, EUA), utilizando como referencia un blanco preparado en ausencia de sobrenadante.

Una unidad de actividad de esterasa (U) se definió como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μg de *p*-nitrofenol de la molécula de *p*-nitrofenil butirato por minuto, a 37 °C y pH 7.5.

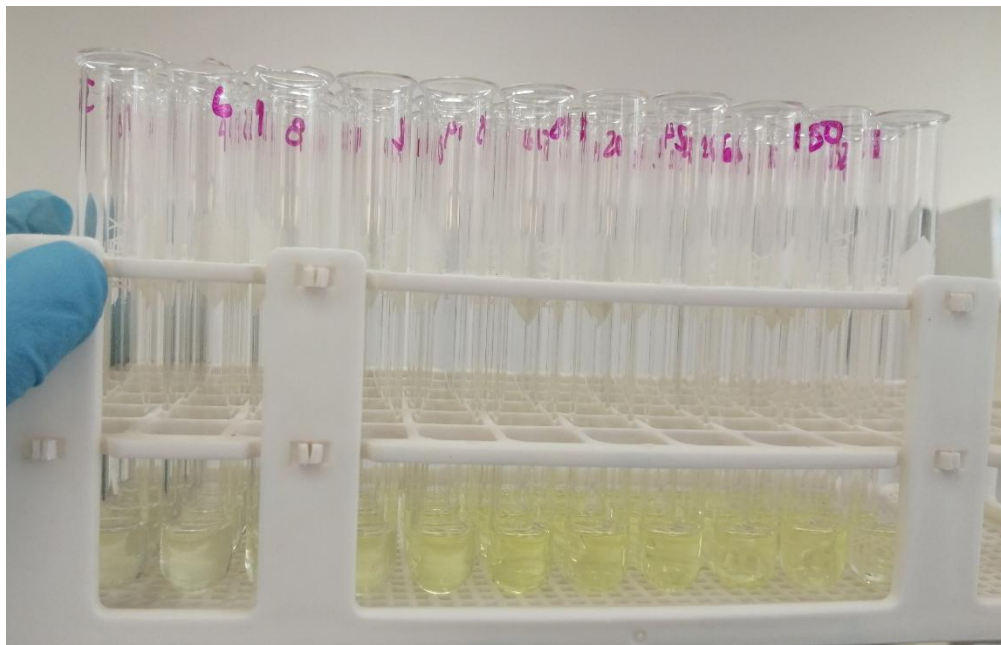


Fig. 13. Ensayo de actividad de esterasas en sobrenadantes de cultivos de *F. culmorum*. Los tubos muestran el cambio en la coloración como indicativo de la actividad enzimática.

6.6 Parámetros de crecimiento y rendimientos enzimáticos

La biomasa seca de *F. culmorum* (X) se determinó por diferencia de peso y se expresó en g/L. El crecimiento se modeló mediante la ecuación logística, a partir de la cual se calculó la tasa específica de crecimiento (μ ; expresada en h^{-1}). La biomasa máxima (X_{max}) corresponde a la mayor cantidad de biomasa máxima producida durante la fermentación y se expresó esa en g/L. Así mismo, se estimaron el rendimiento de la enzima con respecto a la biomasa producida ($Y_{E/X}$), la productividad enzimática (P), la tasa específica de formación de la enzima (q_P) y la actividad enzimática máxima (E_{max}). Todos los parámetros se calcularon de acuerdo con la metodología descrita por Ahuactzin-Pérez et al. (2016).

6.7 Zimografía

La detección de actividad de esterasas se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) según el protocolo descrito por Leammli (1970), con modificaciones. La metodología utilizada fue adaptada por Ferrer-Parra *et al.*, (2018) y se describe a continuación de forma general. Se emplearon geles de poliacrilamida al 12 % para el gel de separación y 4 % para el gel de empaquetamiento. En cada pocillo del gel se cargaron 20 μ L de muestra. Las muestras se obtuvieron a partir de 1 mL de sobrenadante, el cual fue concentrado por centrifugación mediante la recuperación de la fracción insoluble, el sobrenadante fue descartado y el material sedimentado fue resuspendido en 15 μ L de agua destilada y mezclado con 10 μ L de buffer de carga. La electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis Mini Protean® Tetra Cell (BIO-RAD) a un voltaje de 110 V (Fig. 14A).

Una vez finalizada la corrida, los geles se incubaron a 25 °C en una solución con sustrato, que contenía 3 mM de α -naftil acetato, 1 mM de Fast Red TR (Sigma) y 100 mM de buffer de fosfatos a pH de 7.5, según el protocolo descrito por Karpushova *et al.*, (2005). Finalmente, los geles fueron escaneados en el fotodocumentador Gel Doc EZ Imager (BIO-RAD) y las imágenes obtenidas se analizaron con el software Imagen Lab program, versión 6.0.0 (BIO-RAD) (Fig. 14B).

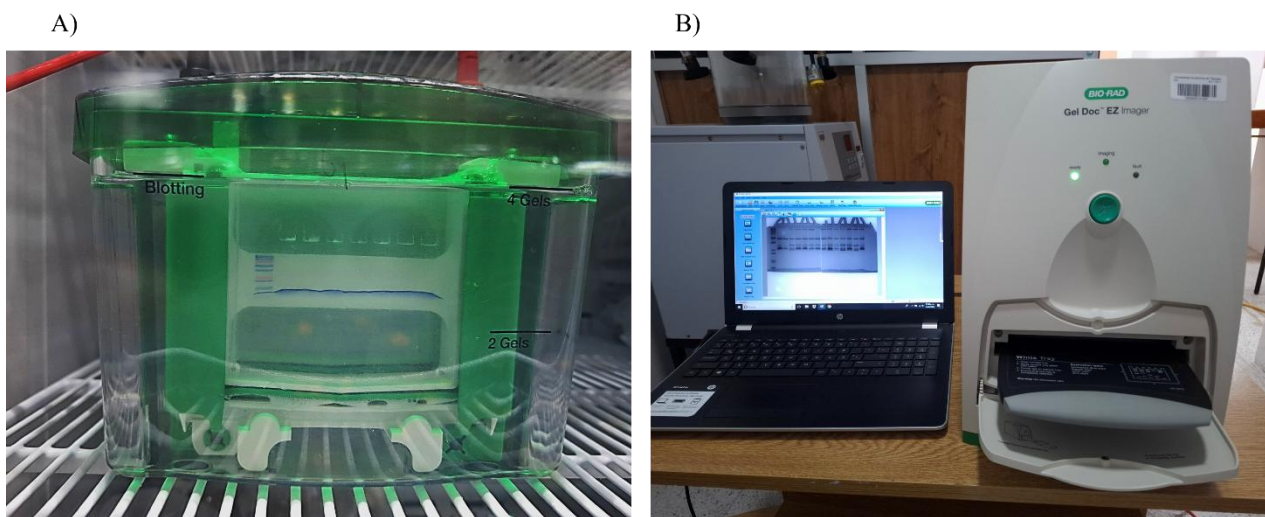


Fig. 14. Zimografía para la detección de actividades enzimáticas. Electroforesis en geles de poliacrilamida en cámara de electroforesis vertical. B) Visualización de bandas con actividad de esterasa en el fotodocumentador Gel Doc EZ Imager (BIO-RAD).

6.8 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

La identificación de los compuestos orgánicos volátiles (COVs) presentes en el sobrenadante de los medios de cultivo suplementados con DEHF se llevó a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS). Se utilizó un cromatógrafo de gases (7890A, Agilent Technologies) acoplado a un espectrómetro de masas (MSD 5975C VL) equipado con un detector cuadrupolo y una columna capilar (Zebron ZB-50). En la fig. 15A se muestra el equipo utilizado para el análisis.

El procedimiento de extracción de las muestras varió de acuerdo con el tipo de fermentación. En el caso de la FMS se empleó extracción líquido-líquido con tres solventes (diclorometano, cloroformo o hexano), con el objetivo de detectar el máximo número de productos de biodegradación de DEHF, siguiendo el método EPA 3510c (<https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/3510c.pdf>). Para la extracción con diclorometano o cloroformo se mezclaron 5 mL del sobrenadante con 5 mL de solvente, posteriormente, se decantó y se filtró con sulfato de sodio anhidro para asegurar que la muestra estuviera libre de humedad (Fig.15B). Para la extracción con hexano se preparó una mezcla 1:1

(v/v) con el sobrenadante y el solvente, para posteriormente analizar la fase orgánica de la muestra.

En el caso de la FML, la extracción se realizó mediante el mismo principio extracción líquido-líquido con solventes orgánicos (hexano y cloroformo), también basado en el método EPA 3510c. Para ello, se emplearon 13 mL de sobrenadante y se transfirieron a un embudo de decantación de 50 mL, donde se adicionaron 5 mL de solvente. Seguido a la separación de las fases se recuperó la fase orgánica y se repitió el procedimiento de extracción para maximizar la recuperación. El extracto se filtró a través de sulfato de sodio anhidrido para eliminar residuos de humedad antes del análisis. Para todos los casos se utilizó aproximadamente 1 mL de muestra en el análisis (Fig. 15C).

La identificación de los compuestos se realizó siguiendo el método EPA 8270D (<https://19january2017snapshot.epa.gov/sites/production/files/201507/documents/epa8270d.pdf>), con modificaciones descritas por González-Márquez et al. (2019) y Mejía-Morales et al. (2020). Se utilizó el software de análisis de datos GC-MS (Agilent Technologies) para procesar los datos; para la identificación de compuestos, se empleó la biblioteca de espectros de masas NIST 08. Los resultados se presentan como porcentaje del área total del cromatograma. Los análisis de GC-MS fueron realizados en el Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, donde se encuentran instalados los equipos utilizados.

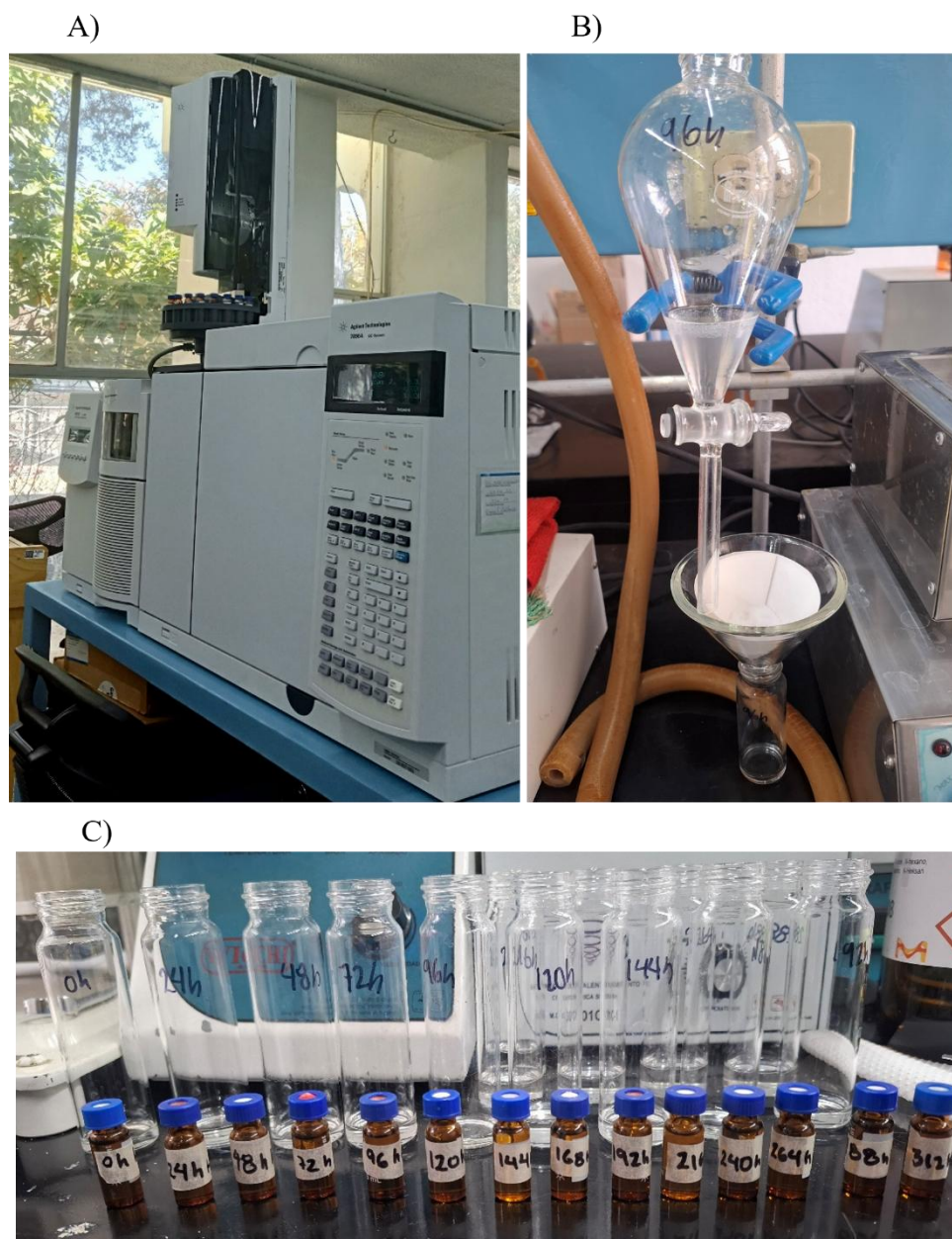


Fig. 15. Preparación y análisis de muestras mediante cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MS). A) Cromatógrafo de gases modelo 7890A (Agilent Technologies) acoplado a un espectrómetro de masas MSD 5975C VL. B) Proceso de extracción y separación de fases orgánica/ acuosa mediante decantación, seguido de filtración. C) Viales con extractos orgánicos de diferentes tiempos de fermentación, listos para el análisis en GC-MS.

6.9 Determinación del porcentaje de biodegradación de DEHF

El porcentaje de degradación de DEHF se evaluó midiendo la desaparición del DEHF del sobrenadante del medio de cultivo durante la fermentación.

La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\% BDt = \frac{C_f}{C_o} \times 100$$

Donde:

Cf= Concentración del DEHF al final de la fermentación (312 h).

Co= Concentración inicial del DEHF suministrada al medio de cultivo.

6.10 Simulación de química cuántica

La ruta de degradación de DEHF por *F. culmorum* crecido en medio líquido fue propuesta mediante estudios de química cuántica realizados en la Universidad Tecnológica de Tecamachalco, Puebla, empleando una estación computacional de trabajo (ST500DM002 IDB14SCSI.6.1.7600.16385). Se empleó el algoritmo Polak-Ribiere para optimizar la geometría molecular tridimensional utilizando el simulador molecular Hyper Chem (HC) 10 para Windows (Hyper Chem Hypercube, MultiON para Windows, número de serie 12-800-1501800080, Ciudad de México, México).

La energía libre de Gibbs de formación obtenida por química cuántica (ΔG_{fq}) se estimó a partir de soluciones aproximadas de la ecuación de Shrödinger electrónica (Ec.1), empleando simulaciones de química cuántica. Los parámetros clave se establecieron con forme a lo reportado previamente (Kraner et al., 2015; Pan et al., 2015; Fu et al., 2022; Huang et al., 2022).

$$\Delta G_{fq} = \sum \Delta G_{ce} - \sum \Delta G_{am} \quad \text{Eq. 1}$$

Donde:

ΔG_{fq} = Energía de enlace libre de Gibbs calculada mediante simulaciones químicas cuánticas y expresada en kcal/mol.

$\sum \Delta G_{ce}$ = La suma de todas las energías de enlace atómico de los elementos que constituyen la molécula.

$\sum \Delta G_{am}$ = La suma de todos los enlaces en la molécula ensamblada.

ce = Elementos químicos.

am = Molécula ensamblada.

6.11 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistical Analysis System (SAS® Free software Trials). Los datos se evaluaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba post hoc de Tukey, considerando un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Los datos utilizados para el análisis se obtuvieron de tres muestras independientes.

7. Resultados

7.1 Producción de biomasa

7.1.1 Fermentación en medio sólido

En la fig. 16 se muestra la biomasa producida por *F. culmorum* durante 312 h de cultivo en FMS adicionado con DEHF o glucosa. En ambos tratamientos se observó un incremento progresivo de la biomasa durante las primeras horas de cultivo, seguido por una estabilización que marcó el inicio en la fase estacionaria.

En el medio adicionado con DEHF, *F. culmorum* mostró una fase exponencial que duró hasta aproximadamente las 120 h, alcanzando una $X_{\max}$ cercana a 0.6 g/L. Posteriormente, la biomasa se mantuvo constante hasta las 312 h. En el medio control *F. culmorum* alcanzó la fase estacionaria aproximadamente a las 84 h con una $X_{\max}$ de 1.1 g/L. A partir de ese tiempo, los valores de biomasa se mantuvieron relativamente estables.

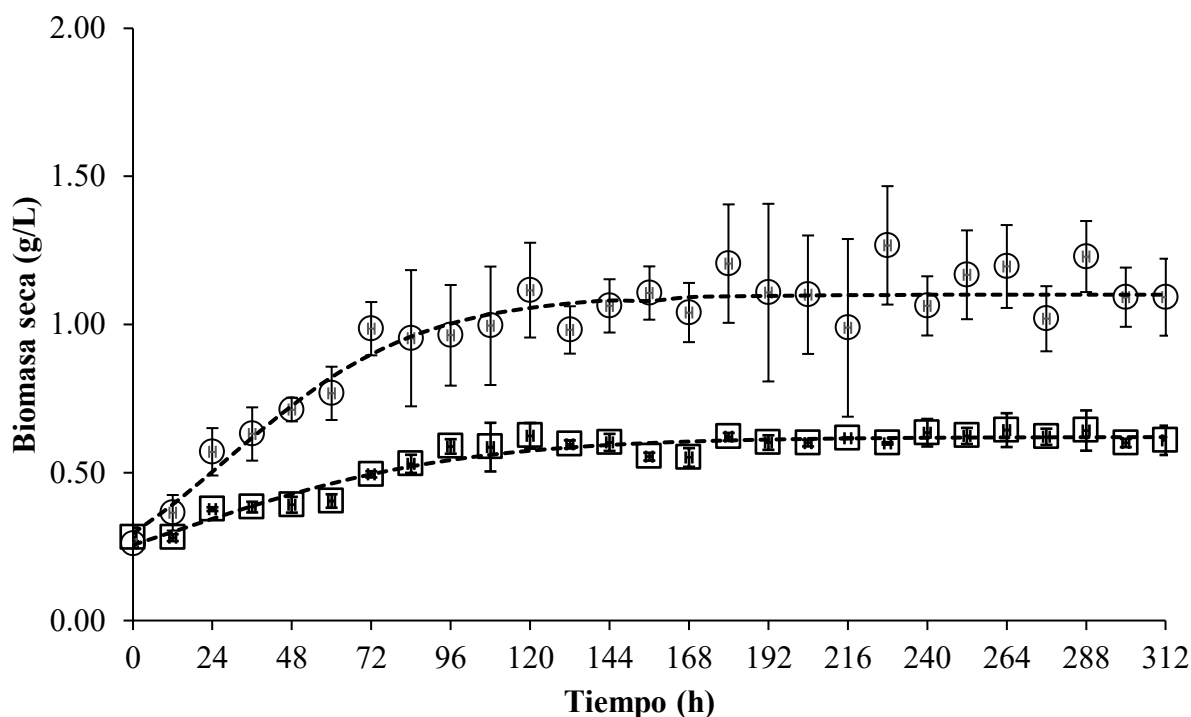


Fig. 16. Biomasa seca producida por *F. culmorum* en medio adicionado con DEHF (□) y glucosa (○) en FMS.

7.1.2 Fermentación en medio líquido

La producción de biomasa seca producida por *F. culmorum* en FML se muestra en la Fig. 17. Se observó que el microorganismo alcanzó la fase estacionaria a las 144 h en el medio control y a las 132 h en el medio adicionado con DEHF. La biomasa máxima ($X_{\max}$) obtenida fue de 1.73 y para el control de 0.99 g/L en el medio suplementado con DEHF. La tasa específica de crecimiento en el medio control fue de 0.032 h^{-1} y en el medio adicionado con DEHF fue de 0.02 h^{-1} (Tabla 1).

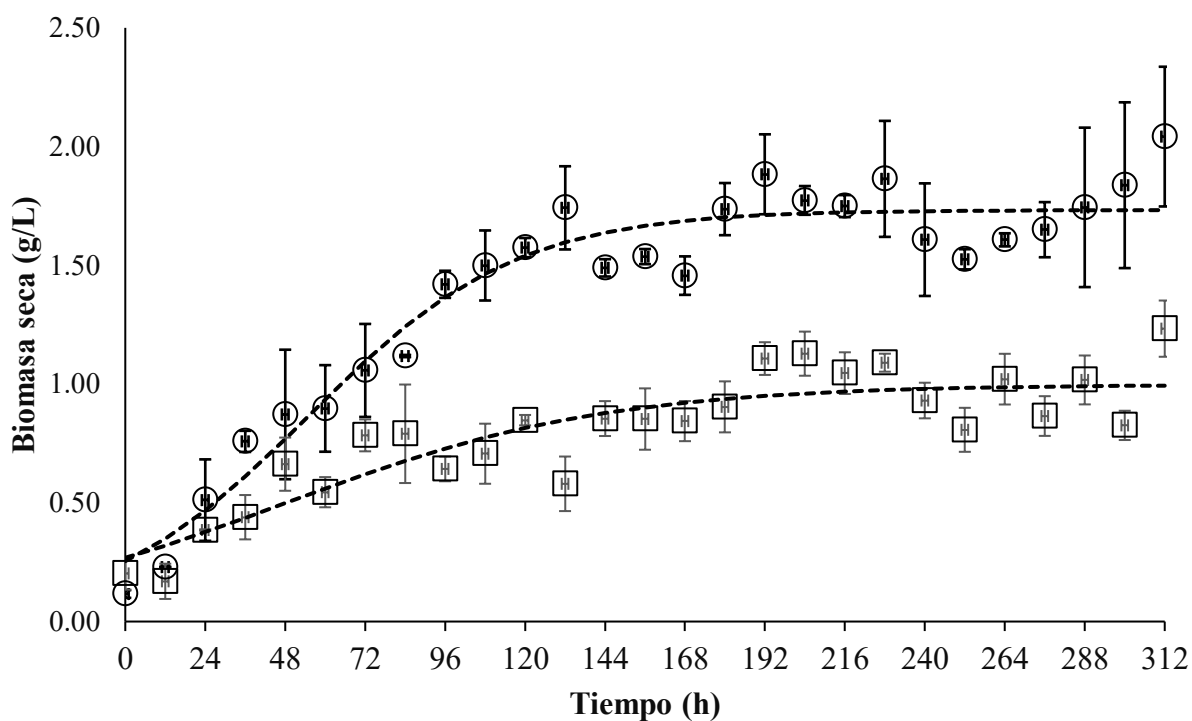


Fig. 17. Biomasa seca producida por *F. culmorum* en medio adicionado con DEHF (□) o glucosa (○) en FML.

7.2 Contenido de proteína

7.2.1 Fermentación en medio sólido

La producción de proteína fue mayor en los cultivos adicionados con glucosa (Fig. 18). En presencia de DEHF la producción de proteína por *F. culmorum* mostró un incremento a las 180 h y mantuvo un nivel de producción bajo y constante en el resto de la fermentación. La mayor producción de proteínas fue a las 276 h con una concentración de 0.0017 mg/mL. En los medios control se observó un aumento del contenido de proteína después de las 60 h y a la 216 h se observó el valor más alto que fue de 0.0196 mg/mL.

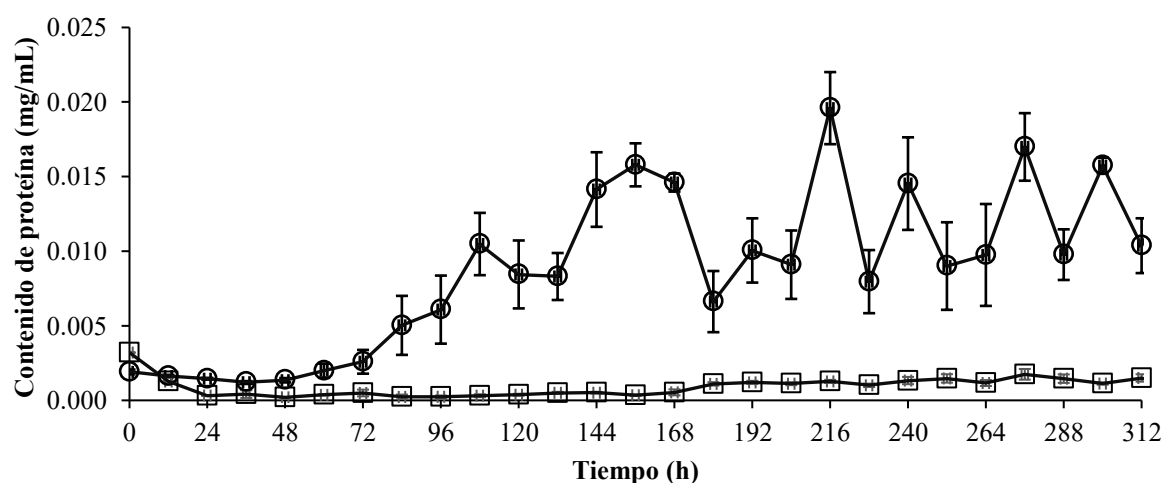


Fig. 18. Contenido de proteína soluble de *F. culmorum* en medio adicionado con DEHF (□) o glucosa (○) en FMS.

7.2.2 Fermentación en medio líquido

El contenido de proteína de *F. culmorum* con DEHF y glucosa se observa en la Fig. 19. De las 0 a las 120 h se observan valores más altos en los medios adicionados con DEHF que en los medios con glucosa. La cantidad más alta fue de 0.035 mg de proteína/ mL a las 12 h. Posteriormente se observaron valores de aproximadamente 0.008 mg de proteína/ mL. En los medios con glucosa el valor máximo (0.031 mg de proteína/ mL) se observó a las 216 h.

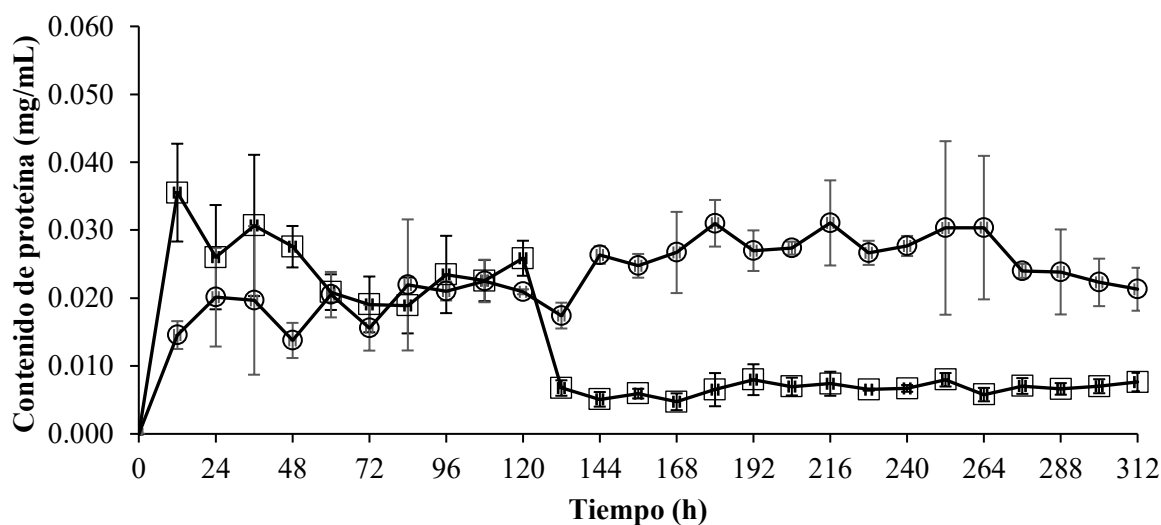


Fig. 19. Contenido de proteína soluble de *F. culmorum* en medio adicionado con DEHF (□) o glucosa (○) en FML.

7.3 Actividad volumétrica de esterasas

7.3.1 Fermentación en medio sólido

En la Fig. 20 se muestra la actividad volumétrica de esterasas. En los medios adicionados con DEHF se observó un incremento de la actividad enzimática después de las 60 h, alcanzando el primer incremento notable a las 72 y 96 h. Posteriormente, la actividad presentó variaciones a lo largo de la fermentación, registrando el valor máximo de 1288.9 U/L a las 192 h. En los medios adicionados con glucosa la actividad de esterasas se mantuvo baja y estable, alcanzando un valor máximo de 443.21 U/L a las 168 h.

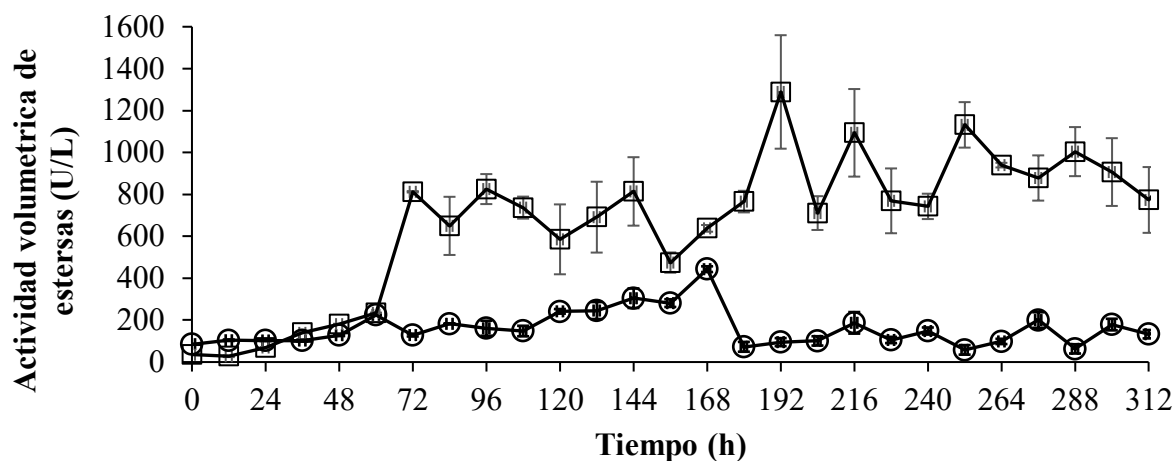


Fig. 20. Actividad volumétrica de esterasas producida por *F. culmorum* en medio suplementado con DEHF (□) o glucosa (○) en FMS.

7.3.2 Fermentación en medio líquido

La actividad volumétrica de esterasa de *F. culmorum* cultivada en medios suplementados con DEHF o glucosa se muestra en la Fig. 21. Este hongo presentó una actividad volumétrica de esterasa mucho mayor en el medio suplementado con DEHF que en el medio control. La $E_{\max}$ fue de aproximadamente 6007.5 U/L y 95.7 U/L para los cultivos en medios suplementados con DEHF y glucosa, respectivamente, lo que demuestra que la actividad volumétrica de esterasa fue 63 veces mayor en el medio suplementado con DEHF que en los cultivos control.

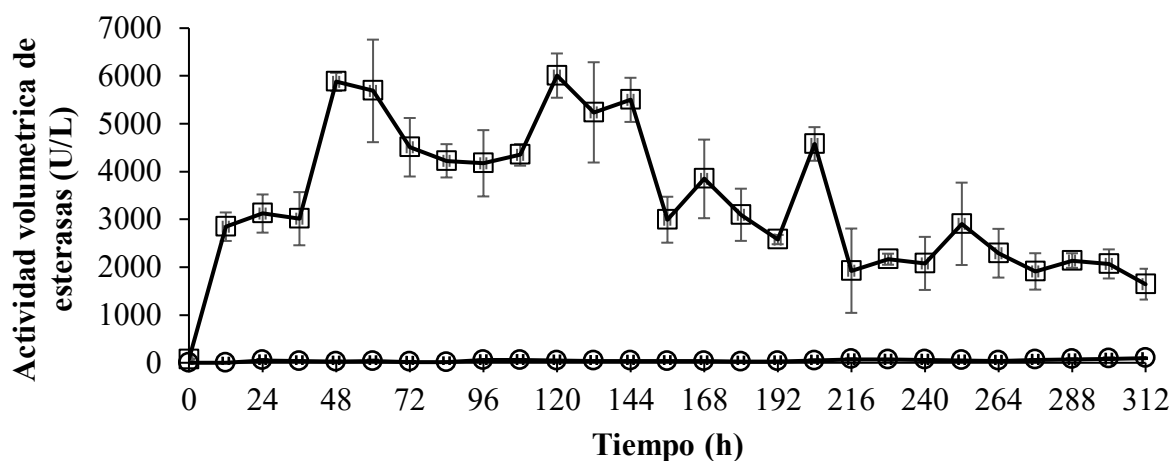


Fig. 21. Actividad volumétrica de esterasas producida por *F. culmorum* en medio suplementado con DEHF (□) o glucosa (○) en FML.

7.4 Actividad específica de esterasas

7.4.1 Fermentación en medio sólido

La Fig. 22 muestra el comportamiento de la actividad específica de esterasas. En los medios adicionados con DEHF se observó un incremento progresivo a partir de las 48 h, alcanzando el valor máximo de aproximadamente 3975.24 U/mg de proteína a las 84 h. Posteriormente, la actividad específica disminuyó de forma gradual y se mantuvo con fluctuaciones moderadas hasta el final del experimento. En contraste, en los medios control la actividad específica permaneció baja durante todo el periodo de incubación, sin cambios significativos.

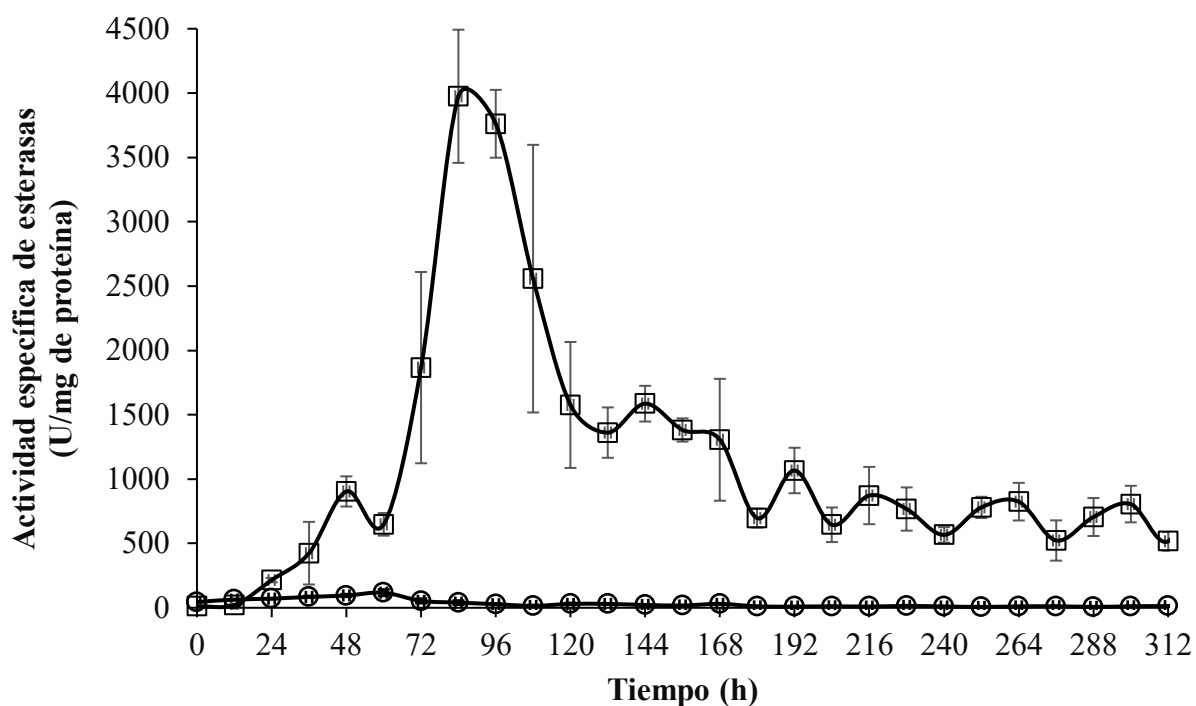


Fig. 22. Actividad específica de esterasas de *F. culmorum* en medios suplementados con DEHF (□) y glucosa (○) en FMS.

7.4.2 Fermentación en medio líquido

En los cultivos suplementados con DEHF, la actividad esterasa específica más alta aumentó durante la fase exponencial de crecimiento, alcanzando su nivel máximo (1126.3 U/mg de proteína) a las 144 h, momento en el que se inició la fase estacionaria de crecimiento (Fig. 23).

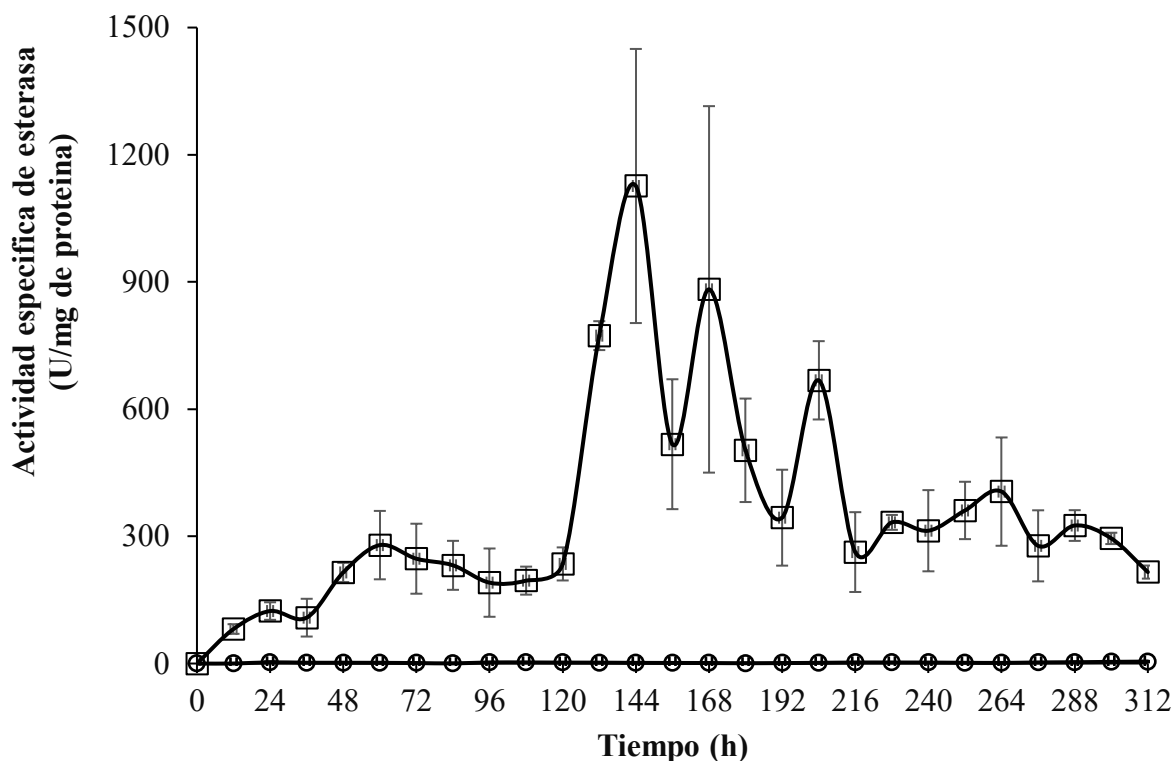


Fig. 23. Actividad específica de esterasas de *F. culmorum* en medios suplementados con DEHF (□) y glucosa (○) en FML.

7.5 Parámetros cinéticos de crecimiento y rendimientos enzimáticos

En la Tabla 1 se observan los parámetros de crecimiento y actividad enzimática de *F. culmorum* cultivado en FMS y FML con DEHF o glucosa como fuente de carbono. Las mayores tasas específicas de crecimiento (μ) y $X_{\max}$ se observaron en los medios control, particularmente en FML con una μ de 0.032 h^{-1} ; 1.73 g/L . En contraste, los cultivos adicionados con DEHF

mostraron menores valores de crecimiento, aunque presentaron una mayor actividad de esterasas. El tratamiento en FML con DEHF alcanzó los valores máximos de actividad enzimática ($E_{\max}$ de 6007.5 U/L) productividad enzimática (P) 50.06 y tasa específica de producción enzimática (q_p) de 122.68 U/gX*h, en comparación con los demás tratamientos.

Tabla 1. Parámetros de crecimiento y rendimiento de esterasas de *F. culmorum* cultivado en medios adicionados con DEHF y medios control (glucosa).

	FMS		FML	
	DEHF	Glucosa	DEHF	Glucosa
Parámetros de crecimiento				
μ (h^{-1})	0.024 ^b	0.033 ^a	0.02 ^b	0.032 ^a
	± 0.004	± 0.003	± 0.004	± 0.003
$X_{\max}$ (g/L)	0.62 ^d	1.12 ^b	0.99 ^c	1.73 ^a
	± 0.02	± 0.07	± 0.02	± 0.07
Parámetros de esterasas				
$E_{\max}$ (U/L)	1288.91 ^b	443.21 ^c	6007.5 ^a	95.7 ^c
	± 270.8	± 13.63	± 463.0	± 5.5
$Y_{E/X}$ (U/gX)	2078.9 ^b	363.28 ^c	5980.4 ^a	55.2 ^c
	± 424.9	± 11.72	± 372.4	± 2.3
P (U/L*h)	6.7 ^b	2.63 ^{b,c}	50.06 ^a	0.31 ^{b,c}
	± 1.41	± 0.08	± 3.8	± 0.01
q_p (U/gX*h)	49.84 ^b	11.98 ^c	122.68 ^a	1.78 ^c
	± 7.5	± 2.69	± 23.8	± 0.2

Los valores se expresan como media $\pm$ DE ($n = 3$). Las medias en una fila sin un superíndice común difieren ($P < 0,05$), según se analizó mediante ANOVA de una vía y la prueba de Tukey. μ , tasa de crecimiento específico; $X_{\max}$, biomasa máxima; $E_{\max}$, actividad enzimática máxima; $Y_{E/X}$, rendimiento enzimático; P, productividad enzimática; q_p , tasa específica de producción enzimática.

7.6 Perfil enzimático por zimografía

7.6.1 Fermentación en medio sólido

La figura 24 muestra el zimograma obtenido del medio de cultivo suplementado con DEHF durante el crecimiento de *F. culmorum* en FMS. A partir de las 72 h y hasta la fase final de la fermentación se detectaron de manera consistente tres bandas con pesos moleculares de aproximadamente 24.6, 31.2 y 39.5 kDa. A partir de las 60 h de la fermentación se detectaron bandas de baja intensidad con pesos moleculares de aproximadamente 31.2 y 34.2 kDa. Una banda con peso molecular de 42.8 kDa permaneció detectable entre las 108 h y hasta las 288 h de fermentación. A lo largo de la fermentación se observaron cuatro bandas con mayor peso molecular (62.1, 74.5, 134.4 y 214.5 kDa).

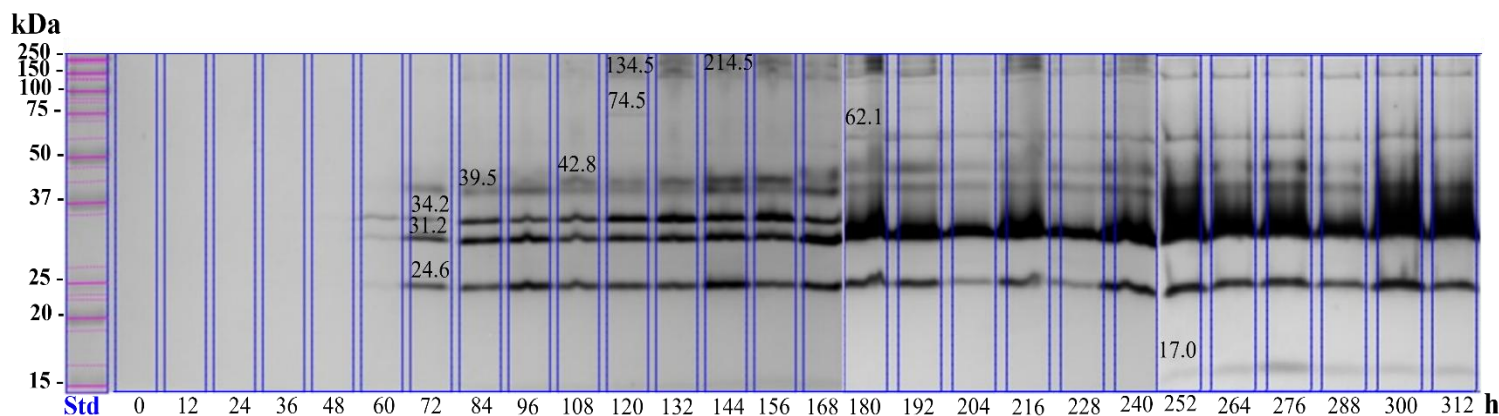


Fig. 24. Zimograma de esterases de *F. culmorum* en medio adicionado con DEHF crecido en FMS. Las bandas corresponden a la actividad de esterases. La migración de los patrones de masa molecular (kDa) se muestran en el carril de referencia (Std).

En los medios control (Fig. 25), se identificaron seis bandas con actividad de esterasa. Se detectó una banda con un peso molecular de aproximadamente 36.8 kDa entre las 48 y las 168 h de fermentación. Se observó una banda con un peso molecular de 46.6 kDa desde la 48 h hasta el final de la fermentación, mientras que una banda de mayor peso molecular, cercana a 78.7 kDa, se registró desde las 36 h y hasta el final de la fermentación, con excepción del tiempo correspondiente a las 216 h. Después de las 60 h de fermentación se observaron otras bandas de alto peso molecular de aproximadamente 100 y 144.8 kDa y se detectó una banda tenue de aproximadamente 54.7 kDa después de 120 h y en otros tiempos de fermentación.

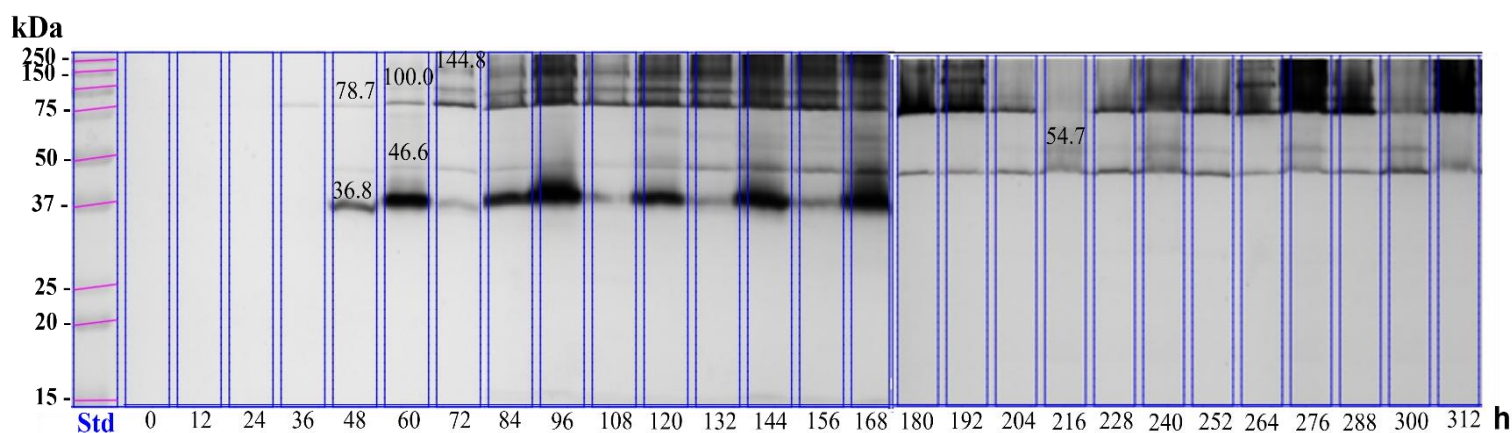


Fig. 25. Zimograma de esterasas de *F. culmorum* en medio control crecido en FMS. Las bandas corresponden a la actividad de esterasas. La migración de los patrones de masa molecular (kDa) se muestran en el carril de referencia (Std).

7.6.2 Fermentación en medio líquido

En la figura 26 se muestra el zimograma obtenido cuando *F. culmorum* creció en un medio adicionado con DEHF en FML. Se detectaron 5 bandas de proteínas con actividad de esterasas. Una banda de aproximadamente 47.9 kDa fue detectable desde las 12 h y se mantuvo hasta el final de la fermentación. A partir de las 60 h y hasta la conclusión de la fermentación se identificaron dos bandas adicionales con pesos moleculares de 28.4 y 34.5 kDa. Así mismo, una banda con actividad de esterasa de aproximadamente 84.0 kDa que mostró una tinción tenue persistió desde las 60 h hasta las 156 h. Finalmente, una banda de aproximadamente 178.32 kDa se observó desde las 180 h hasta el final de la fermentación con excepción del tiempo correspondiente a las 228 h.

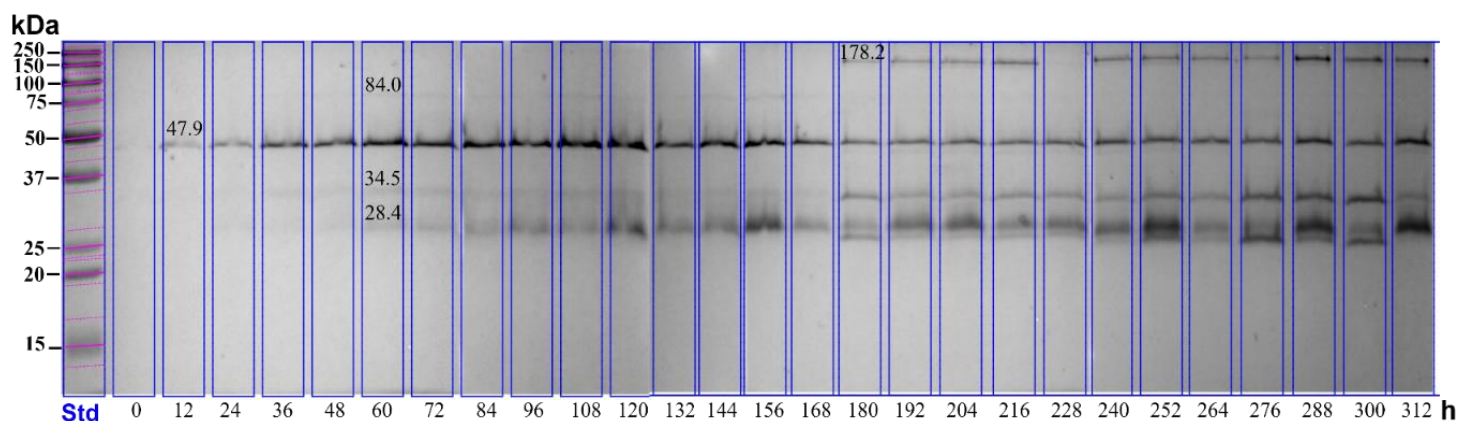


Fig. 26. Zimograma de esterasas de *F. culmorum* en medio adicionado con DEHF crecido en FML. Las bandas corresponden a la actividad de esterasas. La migración de los patrones de masa molecular (kDa) se muestran en el carril de referencia (Std).

El zimograma del medio control en FML (Fig. 27) mostró la presencia de dos bandas con actividad de esterasas. La primera banda observada fue detectable desde las 12 h y persistió durante toda la fermentación. El peso molecular aproximado de la banda fue de 33.0 kDa. Esta banda se detectó con mayor claridad a las 276, 300 y 312 h. La segunda banda se detectó de manera tenue a partir de las 48 h, incrementando su intensidad en las 228, 276, 300 y 312 h de fermentación. El peso molecular estimado de dicha banda fue de aproximadamente 49.5 kDa.

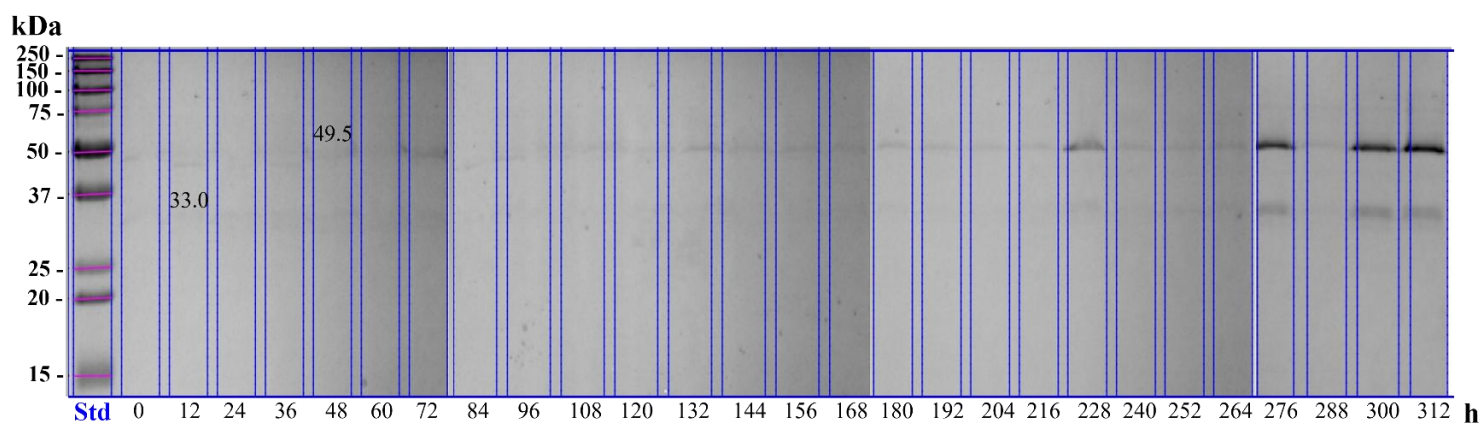


Fig. 27. Zimograma de esterasas de *F. culmorum* en medio control crecido en FML. Las bandas corresponden a la actividad de esterasas. La migración de los patrones de masa molecular (kDa) se muestran en el carril de referencia (Std).

7.7 Producción enzimática y de biomasa

Con el fin de evaluar la relación entre el crecimiento fúngico y la producción de esterasas durante la degradación del DEHF, se analizó la relación entre la concentración de biomasa (Xcal) y la actividad enzimática (P) en ambos sistemas de cultivo.

En la fig. 28, se muestra la gráfica que describe al comportamiento de *F. culmorum* en el medio adicionado con DEHF en FMS. En ella se observa un patrón convexo, donde la producción enzimática aumentó gradualmente durante el crecimiento activo y se intensificó al aproximarse la fase estacionaria. Este comportamiento sugiere que la síntesis de esterasas está asociada al metabolismo secundario, en el cual el *F. culmorum* responde a la presencia de una fuente de carbono no convencional. Este comportamiento, coincide con la mayor intensidad de bandas observada en la zimografía correspondiente (Fig. 24), donde se detectaron bandas con actividad en las etapas finales de la fermentación.

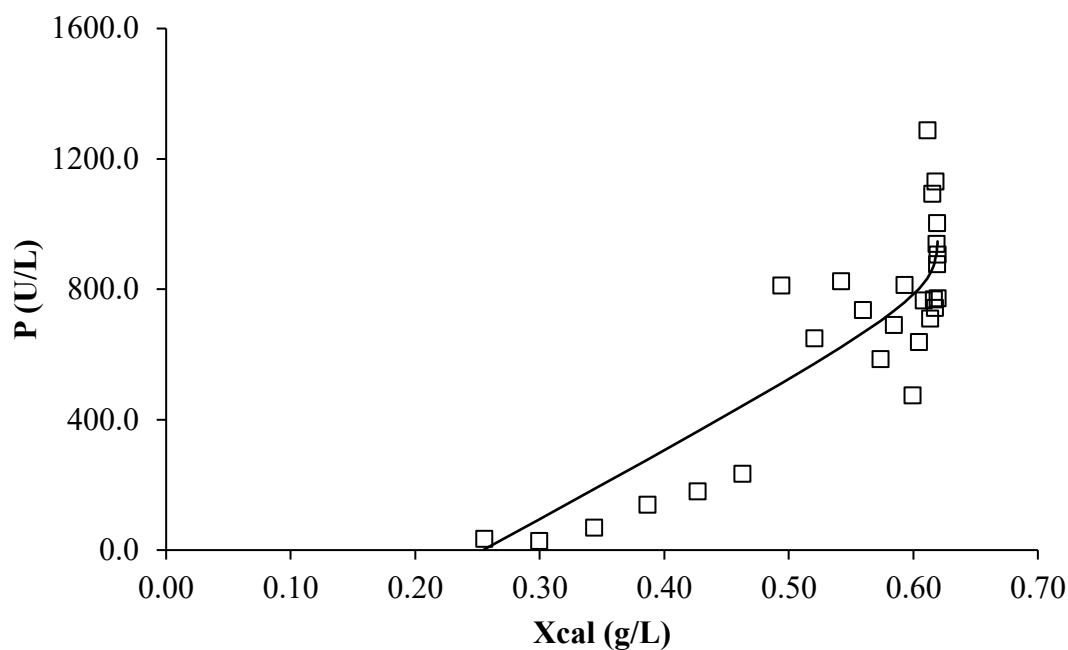


Fig. 28. Relación entre la concentración de biomasa (Xcal) y la actividad de esterasas (P) en medio accionado con DEHF en FMS.

En la Fig. 29, se observa la relación entre la biomasa y actividad de *F. culmorum*. En la gráfica se presenta un patrón lineal, indicando que la producción de esterases fue directamente proporcional al aumento de biomasa y no se detectaron evidencias de degradación o acumulación tardía de enzima. Este comportamiento corresponde a una producción primaria asociada al crecimiento fúngico y sugiere que, en presencia de una fuente de carbono de fácil asimilación, el metabolismo de *F. culmorum* se orienta a la síntesis de proteínas generales más que a la inducción de enzimas específicas de degradación.

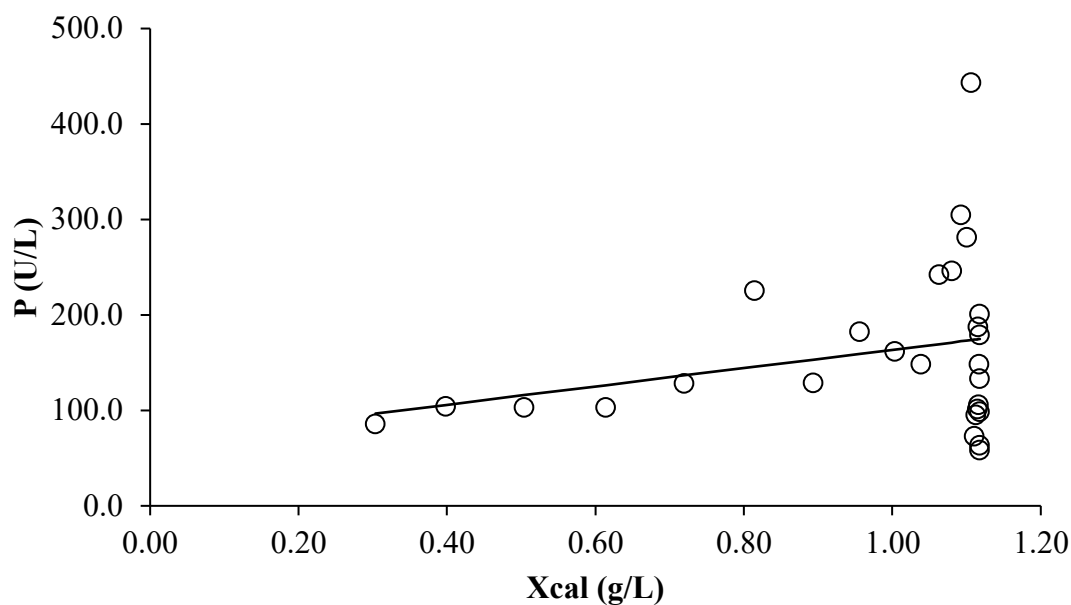


Fig. 29. Relación entre la concentración de biomasa (Xcal) y la actividad de esterases (P) en medio adicionado con glucosa en FMS.

En FML con DEHF (Fig. 30) se observó una tendencia cóncava, caracterizada por una producción inicial de esterazas durante el crecimiento, seguida de una disminución de actividad específica. Este comportamiento puede asociarse a la destrucción o reutilización de enzimas extracelulares. La forma cóncava de la curva coincide con la menor intensidad de bandas en el zimograma (Fig. 26), lo que sugiere que la estabilidad enzimática es baja en FML.

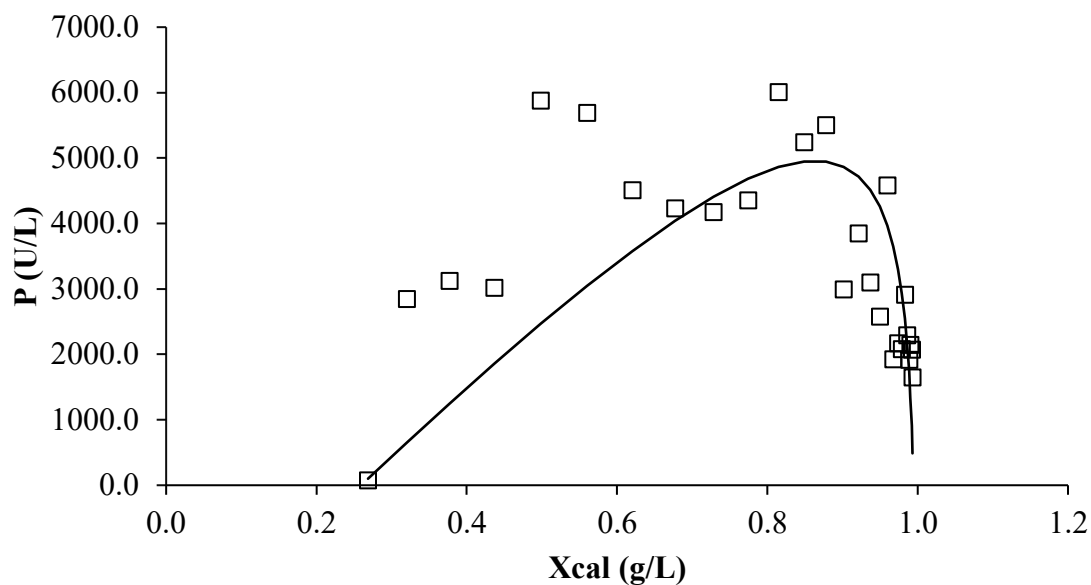


Fig. 30. Relación entre la concentración de biomasa (Xcal) y la actividad de esterazas (P) de *F. culmorum* en medio accionado con DEHF en FML.

En la Fig. 31, se observa una tendencia lineal al graficar los datos, menor al que se observó en FMS. Esto podrían indicar que la actividad enzimática está estrechamente ligada al crecimiento, pero con una productividad de enzimas, más baja debido a las condiciones del cultivo

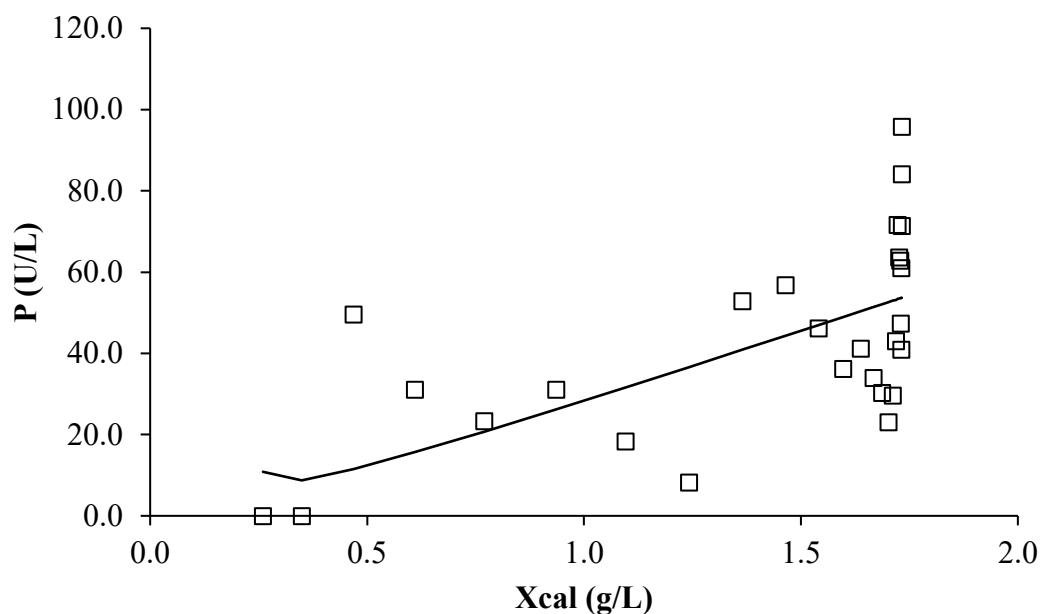


Fig. 31. Relación entre la concentración de biomasa (Xcal) y la actividad de esterases (P) en medio accionado con glucosa en FML.

7.8 Identificación de intermediarios de degradación y propuesta de rutas de degradación

7.8.1 Fermentación en medio sólido

La Fig. 32, muestra la propuesta de una ruta hipotética para la degradación de DEHF por *F. culmorum* cultivado en FMS durante 312 h. Ésta vía se construyó a partir de la identificación de intermediarios metabólicos derivados del DEHF, los cuales fueron analizados mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

La ruta de biodegradación de DEHF se plantea con una reacción inicial de desesterificación en la cual el DEHF se metaboliza a MEHF y 2-etilhexan-1-ol (1). A partir de este intermediario, se describen dos posibles rutas alternativas de biodegradación: la desesterificación de DEHF (a) y su reordenamiento intermolecular (b).

En el primer caso la desesterificación del MEHF conduce a la formación de ácido ftálico y 2-etilhexan-1-ol, como resultado de la entrada de una molécula de agua (2). El Ácido ftálico sufre una descarboxilación, liberando CO₂ y dando origen al ácido benzoico (3). El ácido benzoico se une a otra molécula de ácido benzoico para formar anhídrido benzoico, liberando una molécula de agua (4).

El anhídrido benzoico sufre una reducción, generando benzoato de bencilo (5), que forma ácido benzoico y bencilmetanol por hidrólisis (6). El bencilmetanol forma tolueno mediante la reacción de deshidratación, que es reversible (7). Tras una serie de reacciones de oxidación sucesivas, el bencilmetanol forma acetil-CoA y succinil-CoA (8), que entran en el ciclo de Krebs (9). Por otro lado, el 2-etilhexan-1-ol se hidroliza a 2-hexanol y etanol (10). El 2-hexanol se oxida a 2-hexanona (11), que forma 4-hexen-2-ona mediante una reacción de reducción (12). La 4-hexen-2-ona se reduce a 3,5-hexen-2-ona (13). Este último compuesto se hidroliza a 3,5-hexen-2-ol (14), que se oxida para formar 5-hidroxihexano-2-,4-diona (15). La 5-hidroxihexano-2,4-diona se escinde por la esterasa para formar ácido acético (16), que posteriormente entra al ciclo de Krebs (17). El etanol se oxida a acetaldehído, que posteriormente se transforma mediante una reacción de oxidación en ácido acético (18), que posteriormente entra en el ciclo de Krebs (19).

En el segundo caso, el MEHF sufre una reorganización intermolecular (b) para formar dibutil ftalato (20), que a su vez se somete a un proceso de desesterificación para formar MBF y butan-1-ol (21). El MBF se descompone en ácido ftálico y butan-1-ol (22). El ácido ftálico se metaboliza como se describió previamente (2). El butan-1-ol se oxida a butiraldehído (23), que posteriormente se reduce a buten-2-enal (24). El buten-2-enal se oxida a ácido but-2-enoico (25), que posteriormente se oxida a ácido 3-oxobutanoico (26). El ácido 3-oxobutanoico forma entonces dos moléculas de ácido acético por oxidación (27), que entran en el ciclo de Krebs (28).

7.8.2 Fermentación en medio líquido

La fig. 33, muestra la propuesta de la ruta degradación de DEHF por *F. culmorum* en FML. Los compuestos identificados por GC-MS muestran la capacidad de *F. culmorum* para degradar DEHF y generar diversos ácidos grasos y otras moléculas que pueden servir como precursores en la síntesis de biosurfactantes naturales (por ejemplo: lípidos de trehalosa y soforolípidos). Se sugiere que la ruta metabólica de degradación de DEHF comienza a través de dos posibles vías alternas: puede ocurrir una desesterificación en la que una molécula de agua hidroliza los enlaces éster formando mono (2-etilhexil) ftalato y 2-etilhexan-1-ol (1), y/o una transposición intermolecular para formar dibutil ftalato (2), que puede someterse a hidrólisis para formar ácido ftálico y butanol (3), los cuales pueden ingresar al ciclo de Krebs. El mono (2-etilhexil) ftalato puede hidrolizarse para formar 2-etilhexan-1-ol (1) y ácido ftálico, este último puede ingresar al ciclo de Krebs. El 2-etilhexan-1-ol sufre oxidación por la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa y la aldehído deshidrogenasa para formar ácido 2-etilhexanoico (6). Este último compuesto entra en β -oxidación mediante CoA y ATP, generando ADP, PPi y 2-etilhexanoil-CoA (7). Este último también entra en β -oxidación para formar ácido butírico y acetil-CoA (8). El ácido butírico sufre β -oxidación y luego puede entrar en el ciclo de Krebs (9) o participar en la síntesis de biosurfactantes (10). Por otro lado, el acetil-CoA puede entrar en el ciclo de Krebs (11) o reaccionar con CO₂ y ATP para transformarse en malonil-CoA, ADP y PPi (12). Este paso es crucial en la síntesis de ácidos grasos en la que actúa la enzima sintasa de ácidos grasos, generando ácido dodecanoico (13) y ácido hexadecanoico (14), los cuales pueden incorporarse a la síntesis natural de biosurfactantes (15 y 16, respectivamente) o sufrir β -oxidación y eventualmente entrar en el ciclo de Krebs (17 y 18, respectivamente). El ácido hexadecanoico también puede transformarse en ácido esteárico y ácido cis-9-hexadecanoico (19). El ácido esteárico puede transformarse en ácido oleico (20), el cual sufre oxidación para eventualmente entrar en el ciclo de Krebs (21). El ácido esteárico también puede generar ácido cis-13-octadecenoico (22) y/o puede transformarse en biosurfactantes (23). El ácido cis-13-octadecenoico puede eventualmente entrar en el ciclo de Krebs (24). Mientras que el ácido cis-9-hexadecenoico puede experimentar β -oxidación (25) y/o incorporarse en la síntesis de biosurfactantes (26), el éster dipropílico 2-etilhexílico del ácido fosfórico, el éster tris(2-etilhexílico) del ácido fosfórico y el fosfato de tributilo pueden transformarse en biosurfactantes

(27, 28 y 29, respectivamente). El éster dipropílico 2-etilhexílico del ácido fosfórico puede hidrolizarse para formar ácido propiónico (30), que puede entrar en el ciclo de Krebs (31). El éster dipropílico de ácido fosfórico 2-etilhexílico y el éster tris(2-etilhexílico) de ácido fosfórico también pueden hidrolizarse para formar ácido 2-etilhexanoico (32 y 33, respectivamente), que se incorporan a la vía a través del paso 7. Como alternativa, el fosfato de tributilo puede hidrolizarse para formar butanol (34), que ingresa al ciclo de Krebs a través del paso 4b.

Los valores de $\Delta G_{f,q}$ indican que algunos compuestos intermediarios presentan una alta estabilidad y podrían estar involucrados en la síntesis de biosurfactantes (por ejemplo., trehalolípidos y soforolípidos). Entre los más estables, con los valores negativos más altos, se encuentra el éster tris (2-etilhexil) fosfato derivado del ácido fosfórico (- 7403.7451 kcal/mol), el ácido oleico (- 5127.2150 kcal/mol), el ácido cis-13- octadecenoico (- 5257.4012 kcal/mol), así como los ácidos palmítico (- 4696.8512 kcal/mol) y palmitoleico (- 4696.8512 kcal/mol), además del éster dipropil 2-etilhexílico del ácido fosfórico (- 4601.8131 kcal/mol). En contraste, algunos productos de degradación mostraron ser menos estables como el butanol (- 1612.4578 kcal/mol), el ácido propiónico (- 1611.9714 kcal/mol), el ácido ftálico (- 2064.0050 kcal/mol), y el 2-ethylhexan-1-ol (- 2452.2336 kcal/mol).

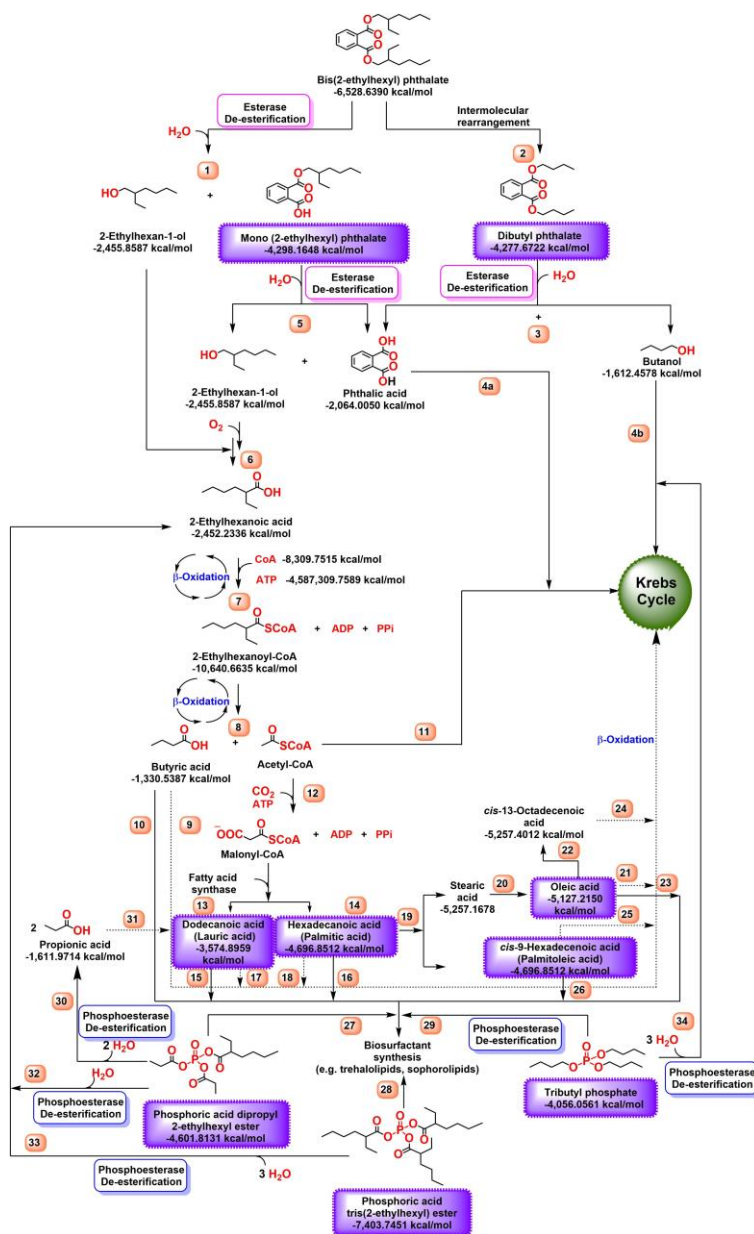


Fig. 33. Propuesta de la ruta de degradación de DEHF por *F. culmorum* en FML. Los recuadros morados indican los compuestos detectados mediante GC-MS; los recuadros anaranjados representan las etapas de reacción; y los recuadros rosa y azul señalan la participación de esterasas. Los valores de $\Delta G_{\text{f}}^{\circ}$ (kcal/mol), calculados mediante modelamiento químico cuántico, se indican en la ruta; los valores más negativos indican mayor estabilidad del compuesto.

8. Discusión

8.1 Crecimiento y producción de biomasa

El crecimiento de *F. culmorum* en los diferentes medios de cultivo mostró la influencia del sistema de fermentación y la fuente de carbono en la producción de biomasa y la tasa específica de crecimiento. En FML, la tasa específica de crecimiento fue 1.6 veces mayor en el medio control (0.032 h^{-1}) que en el medio adicionado con DEHF (0.020 h^{-1}). Mientras que la $X_{\max}$ alcanzó valores de 1.73 g/L y 0.99 g/L, siendo 1.7 veces mayor en el medio control que en el adicionado con DEHF. De igual manera en FMS, el valor de $X_{\max}$ y μ fueron mayores en el medio control. Este comportamiento por el microorganismo refleja que la presencia de DEHF en el medio de cultivo influye en su crecimiento, probablemente por su toxicidad o baja disponibilidad en el medio de cultivo. Sin embargo, el crecimiento de *F. culmorum* en presencia de una concentración de 3 g/L de DEHF, demuestra su capacidad de adaptación metabólica y potencial para utilizarlo como sustrato.

En general, los valores de los parámetros de crecimiento obtenidos en FMS y FML, fueron comparables, aunque en FML se registraron valores ligeramente más altos tanto de $X_{\max}$ como de μ . Ahuactzin-Pérez et al. (2016) reportaron una μ cuatro veces mayor (0.08 h^{-1}) cuando *F. culmorum* creció en un sistema de FML en presencia de 1 g/L de DEHF y glucosa como cosustrato, lo cual sugiere que la presencia de una fuente de carbono fácilmente asimilable favorece la actividad metabólica y el crecimiento del microorganismo. De igual manera, González-Márquez et al. (2019, 2020) confirmaron que *F. culmorum* es capaz de crecer en medios adicionados con DEHF como única fuente de carbono, aunque con tasas de crecimiento menores con respecto a los medios control.

Estudios relacionados con la biodegradación de ftalatos por *F. culmorum* han reportado comportamientos de crecimiento comparables bajo distintas condiciones de cultivo. En el presente trabajo se decidió contrastar los resultados reportados por González-Márquez et al. (2019, 2020), ya que, aunque las condiciones experimentales no son estrictamente equivalentes, dichos estudios contribuyen la referencia más cercana disponible al emplear el mismo microorganismo, el mismo sustrato (DEHF) y un sistema de fermentación similar. En estos estudios reportaron que *F. culmorum* crecido en FML con 1.5 g/L de DEHF y $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ tuvo un valor de $X_{\max}$ similar de 1.08 g/L, mientras que en medio adicionado con 1g/L de DEHF y

NaNO₃ la X_{max} fue de 0.37 g/L Con lo anterior se sugiere que la concentración de ftalato y nitrógeno determina la producción de biomasa.

Por otra parte, Pradeep y Benjamin (2012) evaluaron la capacidad de *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium subglutinans* y *Penicillium funiculosum* para la degradación de DEHF físicamente unido a bolsas de almacenamiento de sangre (Bsb) de PVC bajo condiciones de fermentación líquida estática y reportaron una biomasa de 0.15 a 0.35 g/g de Bsb. De igual manera, analizaron la biodegradación de DEHF presente en bolsas de orina y sangre por *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus nidulans* y *Aspergillus niger* y reportaron que *R. nigricans* produjo la mayor biomasa (alrededor de 2 g) en bolsas de orina, mientras que *A. nidulans* alcanzó una biomasa de alrededor de 1.5 g en bolsas de sangre (Ali et al., 2023).

Por otra parte, se ha demostrado que la FML promueve un crecimiento más homogéneo y una mayor producción de biomasa en distintos géneros fúngicos. Por ejemplo, Téllez-Téllez et al. (2008), reportaron que *Pleurotus ostreatus* produjo mayor biomasa (5.6 g/L) en FML que en FMS (4.5 g/L), atribuido a una mejor transferencia de oxígeno y nutrientes en la FML.

Sin embargo, no se han reportado curvas de crecimiento de otros microorganismos en medios suplementados con DEHF como única fuente de carbono, excepto *F. culmorum*.

En conjunto, estos resultados indican que la producción de biomasa depende del sistema de fermentación, la concentración de DEHF y la composición del medio, siendo en este estudio el medio líquido el más favorable para la acumulación de biomasa.

8.2 Contenido total de proteína

El contenido total de proteína de *F. culmorum* mostró fluctuaciones considerables según el tipo de medio y la fuente de carbono utilizada. En términos generales, los cultivos adicionados con DEHF evidenciaron una menor producción de proteína soluble en ambos sistemas, lo que podría deberse a que el plastificante no es una fuente de carbono fácil de metabolizar. Por lo tanto, *F. culmorum* probablemente dirige parte de su metabolismo hacia la producción de enzimas específicas de degradación de DEHF, como esterasas o lipasas, cuya síntesis no representa un incremento significativo en el contenido de proteínas solubles (Huang et al., 2019; Sun et al., 2022).

En FML se observó que *F. culmorum* presentó un contenido de proteína en el medio ligeramente superior en el medio adicionado con DEHF respecto al medio control durante las primeras 48 h. Entre las 60 y 120 h, ambos tratamientos mostraron valores similares; sin embargo, a partir de las 120 y hasta el término de la fermentación, el contenido de proteína fue mayor en el medio control. El valor máximo observado fue de 0.031 mg/mL a las 180 y 216 h, mientras que en el medio adicionado con DEHF fue de 0.0036 mg/mL a las 12 h, el cual disminuyó considerablemente (entre 0.005 y 0.008 mg/mL) entre las 132 y las 312 h de fermentación.

En FMS, *F. culmorum* alcanzó un contenido de proteína máximo de 0.0196 mg/mL en medio con glucosa y 0.0017 mg/mL en un medio con DEHF. Estos resultados demostraron que la producción de proteína fue once veces mayor en presencia de glucosa, sin embargo, durante la FML se observó un incremento en el contenido de proteína en el medio adicionado con DEHF, lo que sugiere una respuesta metabólica específica del hongo frente al compuesto.

González-Márquez et al. (2019) reportaron que la proteína de *F. culmorum* excretada en el medio en FML fue de aproximadamente 0.001 mg/mL en cultivos suplementados con DEHF y 0.017 mg/mL en medios con glucosa, lo que coincide con la tendencia observada en el presente estudio. Por su parte, Hernández-Sánchez et al. (2024b) evaluaron el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el contenido de proteína en el medio y la actividad de esterasas durante la biodegradación de DEHF (1.5 g/L) por *F. culmorum* en FML, y reportaron que el mayor contenido de proteína (aproximadamente 0.043 mg/mL) se observó cuando se utilizó urea como fuente de nitrógeno.

Hasta la fecha, los estudios de biodegradación de DEHF que emplean *F. culmorum* son los únicos en los que se ha medido el contenido de proteína en el medio de cultivo durante este proceso, lo que refuerza su importancia como un microorganismo de referencia para estudiar los mecanismos de adaptación metabólica frente a plastificantes.

8.3 Actividad enzimática, específica y volumétrica

La producción de esterasas por *F. culmorum* presentó variaciones significativas entre los sistemas de fermentación y las fuentes de carbono empleadas. En ambos sistemas, la actividad volumétrica de esterasas fue superior en los medios suplementados con DEHF en comparación con los medios adicionados con glucosa, lo que sugiere una posible inducción enzimática asociada a la presencia del plastificante. Este comportamiento coincide con lo reportado para *F. culmorum* cultivado en medios con DEHF, donde la adición de este compuesto estimuló la síntesis de esterasas implicadas en la hidrólisis de los enlaces éster del ftalato (Hernández-Sánchez et al., 2024a; González-Márquez et al., 2019).

La actividad volumétrica máxima ($E_{\max}$), obtenida cuando se empleó DEHF fue 4.6 veces mayor en FML que en FMS, alcanzando un valor de 6007.5 U/L. De igual manera, los parámetros de productividad ($P= 50.06$ U/L*h), rendimiento enzimático (5980.4 U/gX) y la tasa específica de producción enzimática ($q_p=122.68$ U/gX*h), también fueron significativamente más altos en FML. Estas diferencias podrían estar relacionadas con mayores requerimientos asociados a la síntesis de enzimas y con una respuesta adaptativa del hongo en FML, donde la disponibilidad de DEHF como fuente de carbono es limitada y el acceso al sustrato hidrófobo requiere una mayor producción de enzimas extracelulares (te Biesebeke et al 2002).

Aunque en FMS, la actividad de esterasas fue menor, al compararse con otros microorganismos *F. culmorum* presentó una actividad volumétrica de esterasas extracelulares aproximadamente 55 veces superior (1288.91 U/L) a la actividad volumétrica de esterasas intracelulares (23.2 U/L) reportada para la cepa SP1 de *Acronobacter denitrificans* cultivada en un medio suplementada con aproximadamente 2 g/L de DEHF en FML (Pradeed et al., 2015). Este resultado sugiere que, aunque las esterasas intracelulares y extracelulares interviene en la biodegradación de ftalatos, las esterasas extracelulares predominan en cantidad y relevancia, para la degradación de DEHF (Sánchez, 2021).

En cuanto a la actividad específica, los resultados mostraron diferencias notables entre ambos sistemas evaluados, particularmente en los medios adicionados con DEHF. Cuando *F. culmorum*

creció en FMS, la actividad específica fue aproximadamente 3.5 veces mayor que la registrada en FML. En FMS se observó una actividad específica máxima de 3975.2 U/mg de proteína a las 84 h de cultivo, mientras que en FML se observó un valor de 1126.3 U/mg de proteína. Sin embargo, en ambos sistemas de cultivo los medios suplementados con DEHF mostraron valores superiores a los controles, lo que sugiere una inducción enzimática específica asociada a la presencia de DEHF.

Por otra parte, *F. culmorum* crecido en FMS con 3 g/L de DEHF mostró una actividad específica aproximadamente ocho veces mayor (3975.2 U/mg de proteína) que la observada en FML con 1 g/L de DEHF (483.4 U/ mg de proteína) (González-Márquez et al., 2019), y alrededor de 5.6 veces superior a la reportada para *Bacillus mojavensis* B1811, que presentó una actividad específica cercana a 700 U/mg de proteína en FML suplementado con 1 g/L de DEHF (Zhang et al., 2018). Estas comparaciones evidencian el potencial enzimático superior de *F. culmorum* frente a otras especies microbianas en la degradación de ftalatos.

8.4 Zimografía

Los zimogramas obtenidos permiten evaluar cualitativamente la actividad de las esterasas producidas por *F. culmorum* en función del medio de cultivo y de la presencia de DEHF. En los cuatro perfiles enzimáticos se observa que la expresión de las esterasas es muy variable y dependiente de la interacción entre la composición del medio de cultivo y la disponibilidad del ftalato.

En FMS suplementado con DEHF se detectó la presencia de múltiples isoenzimas de esterasas con distintos pesos moleculares de aproximadamente 17.0, 24.6, 31.2, 34.2, 39.5, 42.8, 62.1, 74.5, 134.5 y 214.5 kDa, capaces de hidrolizar el DEHF. En contraste, en FML se observaron menos bandas, correspondientes a isoenzimas con pesos moleculares cercanos a 28.4, 34.5, 47.9 84.0 y 178.2 kDa. Cabe destacar que *F. culmorum* produjo una isoenzima de esterasa con un peso molecular similar de alrededor 34 kDa en ambos medios de cultivo, lo que sugiere que esta forma enzimática podría expresarse de manera independientemente de la composición del medio de cultivo.

Estudios realizados con *F. culmorum* en condiciones de FML y diferentes concentraciones de DEHF muestran patrones similares. Por ejemplo, González-Márquez et al., (2019), reportaron la presencia de ocho isoenzimas de esterasa con pesos moleculares de aproximadamente 25.7, 29.5, 31.8, 45.9, 66.6, 97.6, 144.5 y 202.9 kDa, cuando se empleó 1 g/L de DEHF. De igual manera, Hernández-Sánchez et al., (2024b), reportaron la presencia de bandas con actividad de esterasa de pesos moleculares de alrededor de 26.9, 33.5, 45.5 y 75.9 kDa en medios adicionados con 1.5 g/L de DEHF. Estos hallazgos apoyan la idea de que la expresión de esterases es *F. culmorum* es altamente dependiente de las condiciones ambientales y de la disponibilidad del compuesto.

De manera complementaria, en otros microorganismos también se han identificado enzimas con pesos moleculares diversos asociados a la degradación de ftalatos. Por ejemplo, *Gordonia* sp. YC-JH1 degradó DEHF (0.1 g/L) en FML y produjo una esterasa monomérica con un peso molecular de 50 kDa (Fan et al., 2018). De igual manera, en la degradación de 1.5 g/L de DEHF por *Gordonia* sp. P8219 generó una hidrolasa homodimérica de 32.16 kDa en condiciones de FML (Nishioka et al., 2006). Además, Yan et al. (2021) reportaron una carboxilestera obtenida de una biblioteca metagenómica de suelo, con un peso molecular predicho de 32 kDa, la cual mostró actividad catalítica sobre DEHF. Ding et al. (2015) describieron una esterasa de *Bacillus* sp., con estructura monomérica y un peso molecular aproximado de 53,76 kDa, asociada a la degradación de ftalato de diisobutilo. Asimismo, Wu et al. En 2019, reportaron una feruloil esterasa de 38.8 kDa obtenida de una biblioteca metagenómica, la cual mostró actividad frente a diverso ftalato de cadena corta. Recientemente, Mu et al. (2024) reportaron una esterasa de *Bacillus velezensis*, con un peso molecular cercano a 55.14 kDa, que participa en la hidrólisis de ftalato de diisobutilo.

En FML se observó una banda de alto peso molecular (aprox. 178.2 kDa), la cual podría estar integrada por monómeros de isoenzimas de esterases de bajo peso molecular (por ejemplo, un hexámero de una proteína de aproximadamente 28.4 kDa por subunidad). Este tipo de organización oligomérica ha sido reportada previamente en otros organismos. Huang et al. (2019) describieron la degradación de DEHF por una esterasa recombinante hexamérica (GoEst15) de *Gordonia* sp., con un peso molecular cercano a 370 kDa, conformada por

subunidades de 58 kDa. De igual manera, *Fusarium* sp., presentó un complejo enzimático (DMT-5-3) capaz de producir ftalato esterasas con pesos moleculares de 84 kDa (dímero de 42 kDa) y 76 kDa (dímero de 38 kDa), inducidas por tereftalato de dimetilo e isoftalato de dimetilo como sustratos, respectivamente (Luo et al., 2012; Luo et al., 2015).

En conjunto, los resultados obtenidos indican que la expresión de esterasas por *F. culmorum* no sólo depende de la disponibilidad del sustrato, sino también de las condiciones nutricionales y del tipo de cultivo. Esta variabilidad sugiere la existencia de mecanismos regulatorios sensibles tanto a la composición del medio como a la presencia del ftalato.

En términos generales, se aprecia que cuando el hongo dispone de una fuente carbono de fácil asimilación, la síntesis de enzimas degradativas tiende a inhibirse. Por el contrario, en presencia de compuestos complejos o recalcitrantes como los ftalatos se favorece la producción de enzimas específicas, ya que éstos actúan como inductores (Patil y jena 2019).

8.5 Producción enzimática y biomasa

La relación entre el producto (enzimas) y la biomasa producida por *F. culmorum*, presenta una respuesta metabólica diferencial ante la presencia de DEHF y el sistema de fermentación. En la FMS, la relación convexa entre biomasa y actividad de esterasas, junto con el incremento de bandas con actividad de esterasas al final de la fermentación, indica la activación del metabolismo secundario inducido por DEHF y por las condiciones heterogéneas del sistema de fermentación en medio sólido (Barrios-González, 2012). En contraste con la FML, la relación entre la biomasa y la actividad mostró un patrón cóncavo, reflejando una producción de enzimas transitoria seguida de degradación, atribuible a la homogeneidad del sistema y una posible degradación proteica o reutilización de enzimas (te Biesebeke et al., 2002; Viniegra-González et al., 2003). Estos comportamientos junto con la repuesta lineal observada en los medios adicionados con glucosa, confirman que el tipo de fermentación y la fuente de carbono determinan no solo la cantidad, sino la naturaleza del metabolismo enzimático de *F. culmorum*, siendo la FMS el sistema más favorable para la inducción y persistencia de enzimas degradativas específicas frente a DEHF, aun si la actividad inicial es menor que en FML.

8.6 Rutas metabólicas

Los resultados obtenidos en esta investigación aportan evidencia sólida de que *F. culmorum* posee la capacidad excepcional para transformar y mineralizar el DEHF mediante rutas metabólicas complejas y altamente flexibles (Liang et al., 2008). La identificación de metabolitos mediante GC-MS permitió proponer las dos principales rutas de degradación del compuesto. Se sugiere que la degradación por *F. culmorum* depende estrechamente del sistema de fermentación (FMS o FML) y de la disponibilidad del plastificante. Los resultados, demuestran que la biodegradación de DEHF no es un proceso lineal, sino un conjunto de reacciones que muestran la capacidad metabólica del hongo frente a un compuesto xenobiótico recalcitrante (Ahuactzin-Pérez et al., 2018).

Los resultados de esta investigación confirman que la etapa inicial en la degradación del DEHF consiste en la ruptura de los enlaces éster, generando MEHF y 2- etilhexanol en ambos sistemas de fermentación. Este comportamiento evidencia la acción de enzimas esterasas, cuya presencia fue corroborada por los perfiles obtenidos en los zimogramas. La hidrólisis del DEHF constituye un punto de bifurcación metabólica que define el flujo hacia una u otra vía metabólica.

Asimismo, la degradación del MEHF conduce a la formación de ácido ftálico, un compuesto intermediario ampliamente reconocido y reportado durante la degradación de ftalatos por diversos microorganismos y también en procesos de degradación abióticos (Huang et al., 2013). De igual manera, en este estudio se detectaron compuestos clave como ácido benzoico, CO₂, ácido acético y ácido-oxobutanoico, todos ellos previamente reportados como intermediarios en la degradación de ftalatos (Liang et al., 2008; Ahuactzin-Pérez et al., 2016; 2018; Li et al., 2018; Zhang et al., 2018; González-Márquez et al., 2019; Lamraoui et al., 2020; Zhang et al., 2020; Wang et al., 2021; Ren et al., 2021; Ren et al., 2023).

La presencia de estos intermediarios confirma que *F. culmorum* no solo es capaz de abrir el anillo aromático de algunos compuestos, sino también de canalizar los productos hacia rutas catabólicas centrales del metabolismo energético (Carstens et al., 2020). Finalmente, la detección de CO₂ en la FMS, es una evidencia directa de la completa mineralización de DEHF (un resultado poco documentado en hongos degradadores de ftalatos).

Los resultados obtenidos en ambas fermentaciones muestran diferencias significativas en el tipo y la abundancia de los compuestos intermediarios, lo que sugiere que el sistema de cultivo define la accesibilidad del sustrato, la disponibilidad del oxígeno y agua, y la expresión de las enzimas degradativas (Viniegra-González et al. 2003).

La diversidad metabólica de *F. culmorum* evidencia su capacidad para tratar compuestos xenobióticos recalcitrantes. En conjunto, el estudio destaca el potencial biotecnológico de *F. culmorum* para la degradación de ftalatos de cadena larga.

En este contexto, la detección de compuestos intermediarios asociados a rutas de biosíntesis de biosurfactantes durante la FML sugiere que *F. culmorum* podría estar activando mecanismos de respuesta frente al DEHF, posiblemente para mejorar su accesibilidad al sustrato hidrofóbico. Este comportamiento es consistente con lo reportado en otros microorganismos, los cuales incrementan la síntesis de surfactantes cuando crecen en presencia de sustratos hidrofóbicos, aunque también pueden generarlos al desarrollarse en sustratos hidrofílicos o comerciales (Gautam and Tyagi, 2006; Sánchez, 2020). Por ejemplo; *Pseudomonas aeruginosa* DG2a y *Stenotrophomonas* sp., produjeron ramnolipidos cuando crecieron en presencia de ácido oleico y aceite de oliva, respectivamente (Pepi et al., 2013; Patel and Patel, 2020). Asimismo, *P. aeruginosa* R4 and *Trichoderma citrinoviride* sintetizaron un glucolípido y un lipopéptido, respectivamente, cuando crecieron en medios suplementados con glucosa añadida (Ahmadi et al., 2021; Piegza et al., 2021). En hongos, como *Fusarium fujikuroi* y *Cutaneotrichosporon mucoide*s se ha reportado la producción de trehalolípidos y soforolípidos (Loureiro-Dos Reis et al., 2018, Marcelino et al., 2019).

Diversos estudios han demostrado que la producción de biosurfactantes puede ocurrir durante la biodegradación de compuestos orgánicos hidrofóbicos (Sánchez, 2020). Por ejemplo, *Bacillus* spp., ha sido reportado como un productor de biosurfactantes en presencia de petróleo crudo y antraceno (Thirumurugan et al., 2023). Asimismo, Chaturvedi et al. (2024) encontraron que el hongo *Hypocrea lixii* mejoró la degradación del bisfenol A y el triclosán debido a la producción de un biosurfactante.

En conjunto, estos hallazgos respaldan que la síntesis de biosurfactantes constituye un mecanismo común mediante el cual diversos microorganismos incrementan la disponibilidad de sustratos hidrofóbicos y potencian su degradación. La presencia de precursores de biosurfactantes durante la FML sugiere que *F. culmorum* podría emplear estrategias similares para facilitar la transformación del DEHF, lo que refuerza su relevancia como un organismo con potencial para la biorremediación de ftalatos de alta hidrofobicidad.

8.7. Biodegradación de DEHF

En FMS *F. culmorum* fue capaz de degradar el 96.9 % de DEHF (con una concentración inicial de 3 g/L) en 312 h (Anexo 1). Existen otros estudios con el mismo microorganismo, pero empleando diferentes concentraciones de DEHF. Por ejemplo, González-Márquez et al. (2019) evaluaron el crecimiento de *F. culmorum* y la degradación de 1 g/L de DEHF como única fuente de carbono en FML y reportaron que este hongo degradó el 92 % del compuesto en 36 h y el 99.6 % en 144 h de fermentación. Asimismo, Ahuactzin-Pérez et al. (2016) cultivaron *F. culmorum* en presencia de 1 g/L de DEHF y glucosa como cosustrato en FML, observando que el 95 % del DEHF se degradó en 60 h y se metabolizó completamente a las 156 h.

Diversos estudios han demostrado que una amplia variedad de microorganismos, tanto hongos como bacterias, poseen la capacidad de degradar ftalatos en condiciones de FML. Por ejemplo, Puranik et al. (2023) reportaron que a las 360 h de cultivo, *Aspergillus flavus* mineralizó el 99.34 % del ftalato de dibutilo cuando se empleó concentración de 0.1 g/L. De manera similar, hongos de podredumbre blanca *Peniophora lycii* y *Trametes hirsuta* lograron degradar el 99 % y 99.2 % de DEHF (1 g/L), respectivamente, después de 240 h de incubación (Savinova et al., 2022; Savinova et al., 2023). Asimismo, el hongo comestible *Pleurotus ostreatus* degradó el 99.3 % y el 98.4 % de DEHF (0.5 y 1 g/L, respectivamente) en un medio suplementado con glucosa tras 504 h de cultivo (Ahuactzin-Pérez et al., 2018).

Las bacterias también muestran una notable capacidad degradativa, aunque con una variabilidad considerable según la especie y la concentración del ftalato. Por ejemplo, *Enterobacter* sp. YC-IL1 degradó el 48 % y el 31 % del DEHF (0.5 y 1 g/L, respectivamente) en 168 h de incubación

(Lamraoui et al. 2020), mientras que, *Rhodococcus* sp. LW-XY12 alcanzó una degradación del 96.9 % de 0.5 g/L de DEHF en solo 32 h (Song et al., 2022). Otras bacterias con alta eficiencia son *Achromobacter* sp. RX que eliminó más del 96 % de DEHF (0.3 g/L) en 96 h de incubación (Wang et al., 2021) y *Ochrobactrum anthropi* cepa L1-W que degradó el 98.7 % de DEHF (0.2 g/L) en 72 h (Nshimiyimana et al., 2020). Además, *Mycolicibacterium phocaicum* RL-HY01 degradó completamente 0.05 g/L de DEHF en 48 h (Ren et al., 2021).

En conjunto, estos estudios muestran que distintos microorganismos pueden degradar eficientemente una amplia gama de concentraciones de DEHF en lapsos de tiempo variables, dependiendo de su metabolismo y de las condiciones de cultivo. En comparación, *F. culmorum* destaca por su capacidad para tolerar y eliminar concentraciones altas de DEHF. Como se observó en este estudio, *F. culmorum* creció en FMS con 3 g/L de DEHF, como única fuente de carbono y energía, sin presentar inhibición el crecimiento y fue capaz de degradarlo en un periodo relativamente corto.

9. Conclusiones

- *Fusarium culmorum* demostró una capacidad sobresaliente para degradar DEHF, empleándolo como única fuente de carbono y energía en ambos sistemas de fermentación, lo que confirma su potencial metabólico para la degradación de ftalatos.

- En FML se obtuvieron mayores niveles de biomasa y actividad volumétrica de esterasas, además de la síntesis de ácidos grasos asociados a la producción de biosurfactantes que podrían a aumentar la biodisponibilidad del DEHF.
- En FMS se observó un perfil enzimático distinto al de la FML, evidenciando la expresión de distintas isoenzimas involucradas en la degradación del DEHF.
- En ambos sistemas de fermentación, la degradación se inició con la desesterificación del DEHF a MEHF y 2-ethylhexanol, seguido del rearrreglo a dibutil ftalato, indicando pasos iniciales comunes en ambas condiciones de cultivo.
- Debido a que *F. culmorum* degrada el DEHF tanto en FML como en FMS, se perfila como un agente biotecnológico con potencial para ser aplicado en estrategias de biorremediación en sitios contaminados tanto en medios acuosos como en medios no acuosos.

10. Perspectivas

Se proponen dos metas para trabajos futuros:

- Identificación y caracterización enzimática. Aislar , purificar y caracterizar las esterasas implicadas en la degradación del DEHF, con el fin de determinar su especificidad y posibles aplicaciones industriales o ambientales.
- Ensayos en condiciones ambientales reales. Evaluar la eficiencia de *F. culmorum* en la degradación de ftalatos en el suelo, lixiviados o aguas residuales, para determinar su aplicación en sistemas de biorremediación a escala piloto.

11. Lista bibliográfica

- Aguilar-Alvarado Y., Báez-Sánchez M.R., Martínez-Carrera D.C., Ahuactzin-Pérez M., Cuamatzi-Muñoz M. & Sánchez C. 2015. Micelial growth and enzymatic activities of fungi isolated from recycled paper wastes grown in di(2-ethyl hexil) phthalate. Polish Journal of Environmental Studies. 24(5): 1897-1902. <https://doi.org/10.15244/pjoes/58808>.
- Ahmadi, M., Niazi, F., Jaafarzadeh, N., Ghafari, S., Jorfi, S., 2021. Characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain R4 and its application for remediation pyrene-contaminated soils. Journal of Environmental Health Science and Engineering. 19 (1): 445-456. <https://10.1007/s40201-021-00617-w>.
- Ahuactzin-Pérez M., Tlécuitl-Beristain S., García-Dávila J., González-Pérez M., Gutiérrez-Ruiz M.C. & Sánchez C. 2016. Degradation of di(2-ethyl hexyl) phthalate by *Fusarium culmorum*: kinetics, enzymatic activities and biodegradation pathway based on quantum chemical modeling. Science of the Total Environment. 566-567: 1186-1193. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.169>.
- Ahuactzin-Pérez, M., Tlécuitl-Beristain, S., García-Dávila, J., Santacruz-Juárez, E., González-Pérez, M., Gutiérrez-Ruiz, M.C., Sánchez, C., 2018. Mineralization of high concentrations of the endocrine disruptor dibutyl phthalate by *Fusarium culmorum*. 3 Biotech. 8 (1): 42-51. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-1065-2>.
- Ali E.A.M., Abdel-Rahman T.M.A., Ali D.M.I., Gamal A.S.H. 2023. Fungal bioremediation of the plasticizer hazardous compound di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in urine and blood bags. Iranian Journal of Science. 47: 673-68. <https://doi.org/10.1007/s40995-023-01466-y>.
- Al-Otibi F., Al-Zahrani R. M., Marraiki N. 2023. Biodegradation of selected hydrocarbons by *Fusarium* species isolated from contaminated soil samples in Riyadh, Saudi Arabia. Journal of Fungi. 9(2): 216. <https://doi.org/10.3390/jof9020216>.
- Amobonye A., Lalung J., Awasthi M.K, Pillai S. 2023. Fungal mycelium as leather alternative: A sustainable biogenic material for the fashion industry. Sustainable Materials and Technologies. 38: e00724. <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2023.e00724>.

- Arriaga S., Muñoz R., Hernández S., Guieysse B., Revah S. 2006. Gaseous hexane biodegradation by *Fusarium solani* in two liquid phase packed-bed and stirred-tank bioreactors. *Environmental Science & Technology*. 40(7): 2390-2395. <https://doi.org/10.1021/es051512m>.
- Baker B.H., Melough M.M., Paquette A.G, Barrett d E.S., Day D.B., Kannan K., Nguyen R.H.N., Bush N.R., LeWinn K.Z., Carroll K.N., Swan S.H., Zhao Q., Sathyanarayana S. 2024. Ultra-processed and fast food consumption, exposure to phthalates during pregnancy, and socioeconomic disparities in phthalate exposures. *Environment International*. 183: 108427. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108427>.
- Bala S., Garg D., Thirumalesh B.V., Sharma M., Sridhar K., Inbaraj B.S., Tripathi M. 2022. Recent strategies for bioremediation of emerging pollutants: a review for a green and sustainable environment. *Toxics*. 10(8): 484. <https://doi.org/10.3390/toxics10080484>.
- Barrios-González J. 2012. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry*. 47(2): 175-185. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.11.016>.
- Benjamin S., Pradeep S., Josh M.S., Kumar S., Masai E.A. 2015. A monograph on the remediation of hazardous phthalates. *Journal of Hazardous Materials*. 298: 58-72. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.05.004>.
- Bhatt P., Zhou X., Huang Y., g Zhang W., Chen S. 2021. Characterization of the role of esterases in the biodegradation of organophosphate, carbamate, and pyrethroid pesticides. *Journal of Hazardous Materials*. 411: 125026. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.125026>.
- Boll M., Geiger R., Junghare M., Schink B. 2020. Microbial degradation of phthalates: biochemistry and environmental implications. *Environmental Microbiology Reports*. 12(1): 3-15. 10.1111/1758-2229.12787. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12787>.

Bornscheuer U.T. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. FEMS Microbiology Reviews 26: 73-81. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00599.x>.

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.

Brassea-Pérez F., Rodríguez M., López J. 2022. Oxidative stress induced by phthalates in mammals: State of the art and potential biomarkers. Environmental Research. 112636. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112636>.

Canavati-Alatorre M.S, Águila I., Barraza-Soltero I.K., Castellón E., Correa-Barrón A.L., Sánchez-López E., Conde-Avila V., González-Marquez A., Méndez-Iturbide D., Ruvalcaba D., Carmen Sánchez. 2016. Growth and cutinase activity of *Fusarium culmorum* grown in solid-state fermentation. Mexican Journal of Biotechnology. 1(2):8-19. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2016.1.2.8>.

Carstens L., Cowan A.D. Seiwert B., Schlosser D. 2020. Biotransformation of phthalate plasticizers and bisphenol a by marine-derived, freshwater, and terrestrial fungi. Frontiers in Microbiology. 11: 317. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00317>.

Casida J.E. 2017. Organophosphorus Xenobiotic Toxicology. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 57:309-327. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-104926>.

Cervantes-González E., Díaz-DeLeón F.M., García-Mena J. 2020. Biodegradation by two *Fusarium strains* as a strategy for eliminating a residual complex from an adsorption process. Biomedical Journal of Scientific & Technical Research. 24 (1):18006-18012. <http://dx.doi.org/10.26717/BJSTR.2020.24.004005>.

Chaturvedi M., Kaur N., Rahman P.K.S.M., Sharma S. 2024. Solubilization and enhanced degradation of benzene phenolic derivatives – bisphenol A / triclosan using a biosurfactant

producing white rot fungus *Hypocrea lixii* S5 with plant growth promoting traits. *Frontiers in Microbiology*. 15: 1433745. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1433745>.

Chen H. 2013. Introduction. In: modern solid state fermentation. Springer, Dordrecht. 1-21. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6043-1_1.

Conde-Ávila V., Loera-Corral O., Díaz R., Sánchez C. 2023. C Cutinolytic esterases are induced by growth of the fungus *Trichoderma harzianum* on glyceryl monostearate in solid-state fermentation. *Bioresources*. 18(4): 8515-8527. <https://doi.org/10.15376/biores.18.4.8515-8527>.

Ding J., Wang C., Xie Z., Li J., Yang Y., Mu Y., Tang X., Xu B., Zhou J., Huang Z., 2015. Properties of a newly identified esterase from *Bacillus* sp. K91 and its novel function in diisobutyl phthalate degradation. *PLOS ONE*. 10(3): e0119216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119216>.

Dube H.C. 2015. An introduction to Fungi. 4th Ed. Scientific Publisher. India. Pp. 32.

EPA. 2024. Draft Physical Chemistry, Fate, and Transport Assessment for Diethylhexyl Phthalate (DEHP). <https://www.epa.gov/system/files/documents/2025-01/dehp-.draft-physical-chemistry-and-fate-assessment-.public-release-.hero-.dec-2024.pdf>.

Fan S., Wang J., Yan Y., Wang J., Jia Y. 2018. Excellent degradation performance of a versatile phthalic acid esters-degrading bacterium and catalytic mechanism of monoalkyl phthalate hydrolase. *International Journal of Molecular Sciences*. 19: 2803. <https://doi.org/10.3390/ijms19092803>.

Ferrer-Parra L., López-Nicolás D.I., Martínez-Catillo R., Montiel-Cina J.P., Morales-Hernández A.R., Ocaña-Romo E., González-Márquez A., Portillo-Ojeda M., Sánchez-Sánchez D.F. & Sánchez C. 2018. Partial characterization of esterases from *Fusarium culmorum* grown in media supplemented with di(2-ethyl hexyl phthalate) in solid-state and submerged fermentation. *Mexican Journal of Biotechnology*. 3(1): 82-94. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.1>.

Fu, H., Chen, H., Blazhynska, M., Goulard Coderc de Lacam, E., Szczepaniak, F., Pavlova, A., Shao, X., Gumbart, J.C., Dehez, F., Roux, B., Cai, W., Chipot, C., 2022. Accurate determination of protein: ligand standard binding free energies from molecular dynamics simulations. *Nat. Protoc.* 17 (4), 1114–1141. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00676-1>.

Galloway T.S., Lee B.P., Buric I., Steele A.M., Kocur A.L., George-Pandeth A. & Harries L.W. 2019. *Plastics and the Environment*. Royal Society of Chemistry. London, UK. 131.

Gao D.W., Wen Z.D. 2016. Phthalate esters in the environment: a critical review of their occurrence, biodegradation, and removal during wastewater treatment processes. *Science of the Total Environment*. 15(541): 986-1001. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.148>.

Gautam K.K., Tyagi V.K., 2006. Microbial biosurfactants: a review. *Journal of Oleo Science*. 55(4): 55-166. <https://doi.org/10.5650/jos.55.155>.

Gilbert M., Patrick S. 2017. *Brydson's Plastics Materials*. Butterworth Heinemann. Oxford, UK. 329-388.

GlobeNewswire. 2025. Plasticizers market projected to reach USD 28.05 billion by 2032, rising demand in flexible PVC and construction sectors accelerates global growth. Revisado 02 de septiembre de 2025. <https://www.globenewswire.com/news-release/2025/05/06/3075219/0/en/Plasticizers-Market-Projected-to-Reach-USD-28-05-Billion-by-2032-Rising-Demand-in-Flexible-PVC-and-Construction-Sectors-Accelerates-Global-Growth.html>

González-Márquez A., Loera-Corral O., Santacruz-Juárez E., Télcuítl-Beristain S., García-Dávila J., Viniegra-González G. & Sánchez Carmen. 2019. Biodegradation patterns of the endocrine disrupting pollutant di(2-ethyl hexyl) phthalate by *Fusarium culmorum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 170: 293-299. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.140>.

González-Márquez A., Loera-Corral O., Viniegra-González G., Sánchez C. 2020. Induction of esterase activity during the degradation of high concentrations of the contaminant di(2-

ethylhexyl) phthalate by *Fusarium culmorum* under liquid fermentation conditions. 3 Biotech. 10 (11): 488. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02476-y>.

González-Pérez M., García-Barrera F.A., Méndez-Díaz J.F., González-Torres M., López-Oglesby J.M., 2014. Theoretical calculation of electron transfer coefficient for predicting the flow of electrons by PM3, using 20 amino acids and nicotine. Eur. Sci. J. 10 (1), 42–49.

Green Facts. 2008. Facts on Health and the Environment. <http://www.greenfacts.org/en/dehp-diethylhexyl-phthalate/1-2/3>. Bruselas, Bélgica. (Consultado noviembre 20, 2024).

Groh K.J., Backhaus T., Carney-Almroth B., Geueke B., Inostroza P.A., Lennquist A., Leslie H.A., Maffini M., Slunge D., Trasande L., Warhurst A.M. & Muncke J. 2019. Overview of known plastic packaging-associated chemicals and their hazards. Science of the Total Environment. 651: 3253-3268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.015>.

Guerranti C., Martellini T., Fortunati A., Scodellini R. & Cincinelli A. 2019. Environmental pollution from plasticiser compounds: Do we know enough about atmospheric levels and their contribution to human exposure in Europe? Current Opinion in Environmental Science & Health. 8: 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2018.10.004>.

Günther M. 2017. Fungal glycolipids as biosurfactants. Current Biotechnology. 5: 1-13.

Hahladakis J.N., Velis C.A., Weber R., Lacovidou E. & Purnell P. 2018. An overview of chemical additives present in plastics: migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. Journal of Hazardous Materials. 344: 179-199. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.10.014>.

Hauser R., Calafat A.M. 2005. Phthalates and human health. Occupational and Environmental Medicine. 62: 806–818. <https://doi.org/10.1136/oem.2004.017590>.

Heindel J., Powell C.J. 1992. Phthalate ester effects on rat Sertoli cell function in vitro: effects of phthalate side chain and age of animal. Toxicology and Applied Pharmacology. 115(1): 116-23. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(92\)90374-2](https://doi.org/10.1016/0041-008x(92)90374-2).

Hernández-Sánchez B., Santacruz-Juárez E., Díaz R., Sánchez-Martínez J.A., Sánchez C., 2024b. Diversification of nitrogen sources to enhance the esterase activity during the degradation of the endocrine disruptor di(2-ethylhexyl) phthalate by *Fusarium culmorum*. Mexican Journal of Biotechnology. 9(4): 30-51. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2024.9.4.30>.

Hernández-Sánchez B., Santacruz-Juárez E., Díaz-Godínez R., Sánchez C. 2020. Efecto de la fuente de nitrógeno en el crecimiento y actividad de esterases de *Fusarium culmorum* en presencia de di(2 etilhexil) ftalato en fermentación líquida (Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Tlaxcala) Repositorio UATx.

Hernández-Sánchez B., Santacruz-Juárez E., Figueroa-Martínez F., Castañeda-Antonio D., Portillo-Reyes R., Viniegra-González G., Sánchez C., 2024a. A novel and efficient strategy for the biodegradation of di(2-ethylhexyl) phthalate by *Fusarium culmorum*. Applied Microbiology and Biotechnology. 108(1): 94. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12961-y>.

Huang H., Zhang X.Y., Chen T.L., Zhao Y.L., Xu D.S., Bai Y.P. 2019. Biodegradation of Structurally Diverse Phthalate Esters by a newly identified esterase with catalytic activity toward di(2-ethylhexyl) phthalate. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 67(31): 8548-8558. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02655>.

Huang H., Zhang X.Y., Chen T.L., Zhao Y.L., Xu D.S., Bai Y.P. 2019. Biodegradation of Structurally Diverse Phthalate Esters by a Newly Identified Esterase with Catalytic Activity toward Di(2-ethylhexyl) Phthalate. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 67, 31, 8548–8558. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02655>.

Huang J., Nkrumah P.N., Li Y., Appiah-Sefah G. 2013. Chemical behavior of phthalates under abiotic conditions in landfills. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. 224:39-52. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5882-1_2.

Huang, C., Lin, W., Zheng, Y., Zhao, X., Ragauskas, A., Meng, X., 2022. Evaluating the mechanism of milk protein as an efficient lignin blocker for boosting the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. Green Chem. 24 (13), 5263–5279. <https://doi.org/10.1039/D2GC01160C>.

IDESA petroquímica. 2017. Safety data sheet, acc. To NOM-018-STPS-2015 and NMX-R-019-SFCI-2011. México. Pp. 1-13.

Karpushova A., Brummer F., Barth S., Lange S., Schmid R. D. 2005. Cloning recombinant expression and biochemical characterization of novel esterases from *Bacillus* sp. Associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. Applied Microbiology and Biotechnology. 67: 59-69. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1780-6>.

Kraner, S., Scholz, R., Plasser, F., Koerner, C., Leo, K., 2015. Exciton size and binding energy limitations in one-dimensional organic materials. J. Chem. Phys. 143 (24), 244905. <https://doi.org/10.1063/1.4938527>.

Kuhar F., Castiglia V. & Papinutti L. 2013. Reino fungi: morfologías y estructuras de los hongos. Revista Boletín Biológica. 7(28): 11-18.

Lamraoui I, Eltoukhy A, Wang J, Lamraoui M, Ahmed A, Jia Y, Lu T, Yan Y (2020) Biodegradation of di(2-ethylhexyl) phthalate by a novel Enterobacter spp. strain YC-IL1 isolated from polluted soil, Mila, Algeria. International Journal of Environmental Research and Public Health. 17(20): 7501. <https://doi.org/10.3390/ijerph17207501>.

Larsen E.L., Johnson R.J. 2019. Microbial esterases and ester prodrugs: An unlikely marriage for combating antibiotic resistance. Drug Development Research. 80(1): 33-47. <https://doi.org/10.1002/ddr.21468>.

Le T.K.T., Trinh T.P.T., My-Le N.T., Nguyen D.C., Chien W.O., Parque S.M., Tran T.L., Hoang T.Q., Kuan S.K., Espectáculo P.L., Nguyen D.H. 2023. Microbial biodegradation of recalcitrant synthetic dyes from textile-enriched wastewater by *Fusarium oxysporum*. Chemosphere. 325:138392. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138392>.

Leamml U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

Leslie J.F., Summerell B.A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing. New Jersey, United States. Pp. 158.

- Lesser L.E., Mora A., Moreau C., Mahlknecht J., Hernández-Antonio A., Ramírez A.I., Barrios- Piña H. 2018. Survey of 218 organic contaminants in groundwater derived from the world's largest untreated wastewater irrigation system: Mezquital Valley, Mexico. *Chemosphere*.198: 510-521. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.154>.
- Li F., Liu Y., Wang D., Zhang C., Yang Z., Lu S., Wang Y. 2018. Biodegradation of di-(2-ethylhexyl) phthalate by a halotolerant consortium LF. *PLoS One*. 13(10): e0204324. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204324>.
- Li F.P., Chen Y.C., Yuan X.L., Zhang M., Chai Y.J., Shan S.D. 2017. Application and comparison in biosynthesis and biodegradation by *Fusarium solani* and *Aspergillus fumigatus* cutinases. *International Journal of Biological Macromolecules*. 104 (Pt A): 1238-1245. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.118>.
- Li Y., Yan H., Li X., Ge J., Cheng J., Yu X. 2020. Presence, distribution and risk assessment of phthalic acid esters (PAEs) in suburban plastic film pepper-growing greenhouses with different service life. *Ecotoxicology and Environmental safety*. 196:110551. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110551>.
- Liang D.W., Zhang T., Fang H.H.P., He J. 2008. Phthalates biodegradation in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 80:183-198. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1548-5>.
- Liu Y., Xu, H., Yan Q., Yang S., Duan X. y Jiang Z. 2013. Biochemical characterization of a first fungal esterase from *Rhizomucor miehei* showing high efficiency of ester synthesis. *Plos One*. 8(10): 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077856>.
- Loureiro-Dos Reis, C.B., Morandini, L.M.B., Bevilacqua, C.B., Bublit, F., Ugalde, G., Mazutti, M.A., Jacques, R.J.S., 2018. First report of the production of a potent biosurfactant with α,β -trehalose by *Fusarium fujikuroi* under optimized conditions of submerged fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 49(1): 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.04.004>.

- Luo Z.H., Ding J.F., Xu W., Zheng T.L., Zhong T.H., 2015. Purification and characterization of an intracellular esterase from a marine *Fusarium* fungal species showing phthalate diesterase activity. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 97: 7-12. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.10.006>.
- Luo Z.H., Wu Y.R., Chow R.K.K., Luo J.J., Gu J.D., Vrijmoed L.L.P. 2012. Purification and characterization of an intracellular esterase from a *Fusarium* species capable of degrading dimethyl terephthalate. *Process Biochemistry*. 47(5): 687-693. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.015>.
- Marcelino P.R.F., Peres G.F.D., Terán-Hilares R., Pagnocca F.C., Rosa, C.A., Lacerda T.M., dos Santos J.C., da Silva S.S. 2019. Biosurfactants production by yeasts using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate as new sustainable alternative for lignocellulosic biorefineries. *Industrial Crops and Products*. 129: 212–223. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.001>.
- Marcket.us. 2024. Global plasticizers market size, share, trends and forecast 2023-2032. Revisado 02 de septiembre de 2025. <https://market.us/report/global-plasticizers-market/#>.
- Mejía-Morales C., Hernández-Aldana F., Cortés-Hernández D.M, Rivera-Tapia J.A., Castañeda-Antonio D., Bonilla N., 2020. Assessment of Biological and Persistent Organic Compounds in Hospital Wastewater After Advanced Oxidation Process UV/H₂O₂/O₃. *Water, Air, & Soil Pollution*. 231(2): 89. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11270-020-4463-8>.
- Mu B., Sadowski P., Te'o J. Patel B., Pathiraja N., Dudley, K. 2024. Identification and characterisation of moderately thermostable diisobutyl phthalate degrading esterase from a Great Artesian Basin *Bacillus velezensis* NP05. *Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands)*. 42(2): e00840. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2024.e00840>.
- Mulligan C.N., 2007. Rhamnolipid biosurfactants: solubility and environmental issues. in: Letcher, T. M. (ed), *Thermodynamics, Solubility and Environmental Issues*. Elsevier, Rotterdam, pp. 279-298.

- Navarro-Pineda F.S., Baz-Rodríguez S.A., Handler R., Sacramento-Rivero J.C. 2016. Advances on the processing of *Jatropha curcas* towards a whole-crop biorefinery. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 54: 247-269. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.009>.
- Nishioka T., Iwata M., Imaoka T., Mutoh M., Egashira Y., Nishiyama T., Shin T., Fujii T. 2006. A mono-2-ethylhexyl phthalate hydrolase from a *Gordonia* sp. that is able to dissimilate di-2-ethylhexyl phthalate. Applied and Environmental Microbiology. 72(4): 2394-2399. <https://doi.org/10.1128/aem.72.4.2394-2399.2006>.
- Nshimiyimana J.B., Khadka S., Zou P., Adhikari S., Proshad R., Thapa A., Xiong L. 2020. Study on biodegradation kinetics of di-2-ethylhexyl phthalate by newly isolated halotolerant *Ochrobactrum anthropi* strain L1-W. BMC research notes. 13(1): 252. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-05096-0>.
- Odunola, O.A., Semire, B., 2007. Conformational analysis (semi empirical PM3) and electronic properties of functionalized oligo(hexylpyrroles). J. Chem. 4, 363–371. <https://doi.org/10.1155/2007/617568>.
- Panda T. Gowrishankar B.S. 2005. Production and applications of esterases. Applied Microbiology Biotechnology. 67: 160-169. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1840-y>.
- Panigrahy N., Priyadarshini A., Sahoo M.M., Verma A.K., Daverey A., Sahoo N.K. 2022. A comprehensive review on eco-toxicity and biodegradation of phenolics: recent progress and future outlook. Environmental Technology & Innovation. 27: 102423. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102423>.
- Patel K., Patel M. 2020. Improving bioremediation process of petroleum wastewater using biosurfactants producing *Stenotrophomonas* sp. S1VKR-26 and assessment of phytotoxicity. Bioresource Technology. 5: 123861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123861>.
- Patel K., Patel M. 2020. Improving bioremediation process of petroleum wastewater using biosurfactants producing *Stenotrophomonas* sp. S1VKR-26 and assessment of

phytotoxicity. Bioresour. Technol. 315, 123861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123861>.

Patil S.S y Jena H.M. 2019. Biodegradation of diethyl phthalate from synthetic wastewater in a batch operated internal loop airlift bioreactor. International Biodeterioration & Biodegradation. 143: 104728. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104728>.

Pepi M., Focardi S., Lobianco A., Angelini D.L., Borghini F., Focardi S.E., 2013. Degradation of fatty acids and production of biosurfactant as an added value, by a bacterial strain *Pseudomonas aeruginosa* DG2a isolated from aquaculture wastewaters. Water, Air, & Soil Pollution. 224(11): 1772. <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-013-1772-1>.

Piegza M., Pietrzykowska J., Trojan-Piegza J., Łaba W. 2021. Biosurfactants from *Trichoderma filamentous* fungi- A preliminary study. Biomolecules. 11(4): 519. <https://doi.org/10.3390/biom11040519>.

Pradeep S., Benjamin S. 2012. Mycelial fungi completely remediate di(2-ethylhexyl) phthalate, the hazardous plasticizer in PVC blood storage bag. Journal of Hazardous Materials. 235-236: 69-77. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.06.064>.

Pradeep S., Josh M.S., Hareesh E.S., Kumar S., Benjamin S. 2015. *Achromobacter denitrificans* strain SP1 produces an intracellular esterase upon utilizing di(2-ethylhexyl) phthalate. International Biodeterioration & Biodegradation. 105: 160-167. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.09.007>.

Puchart V., Biely P. 2023. Microbial xylanolytic carbohydrate esterases. Essays in Biochemistry. 67(3): 479-491. <https://doi.org/10.1042/ebc20220129>.

Puranik S., Shukla L., Kundu A., Kamil D., Paul S., Venkadasamy G., Salim R., Singh S.K., Kumar D., Kumar A. 2023. Exploring potent fungal isolates from sanitary landfill soil for in vitro degradation of dibutyl phthalate. Journal of Fungi. 9(1): 125. <https://doi.org/10.3390/jof9010125>.

Raveendran S., Parameswaran B., Ummalyma S.B., Abraham A., Mathew A.K., Madhavan A., Sharrel Rebello S., Pandey A. 2018. Applications of Microbial Enzymes in Food

Industry. Food Technology & Biotechnology. 56(1): 16-30.
<https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491>.

Ren L, Lin Z, Liu H, Hu H (2017) Bacteria-mediated phthalic acid esters degradation and related molecular mechanisms. Applied Microbiology and Biotechnology. 102(3): 1085-1096. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8687-5>.

Ren L., Lin Z., Liu H. & Hu H. 2017. Bacteria-mediated phthalic acid esters degradation and related molecular mechanisms. Applied Microbiology and Biotechnology. 102(3): 1085-1096. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8687-5>.

Ren L., Wang G., Huang Y., Guo J., Li C., Jia Y., Chen S., Zhou J.L., Hu H. 2021. Phthalic acid esters degradation by a novel marine bacterial strain *Mycolicibacterium phocaicum* RL-HY01: characterization, metabolic pathway and bioaugmentation. Science of the Total Environment. 791:148303. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148303>.

Ren L., Weng L., Chen D., Hu H., Jia Y., Zhou J.L. 2023. Bioremediation of PAEs-contaminated saline soil: the application of a marine bacterial strain isolated from mangrove sediment. Marine Pollution Bulletin. 192: 115071. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115071>.

Rowdhwal S.S.S., Chen J. 2018. Toxic Effects of Di-2-ethylhexyl Phthalate: An Overview. BioMed Research International. 2018: 1750368. <https://doi.org/10.1155/2018/1750368>.

Sánchez C. 2021. Microbial capability for the degradation of chemical additives present in petroleum-based plastic products: A review on current status and perspectives. Journal of Hazardous Materials. 402: 123534. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123534>.

Sánchez C. 2024. *Fusarium* as a promising fungal genus with potential application in bioremediation for pollutants mitigation: A review. Biotechnology Advances. 77: 2024. 108476. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108476>.

Sánchez C., 2022. A review of the role of biosurfactants in the biodegradation of hydrophobic organopollutants: production, mode of action, biosynthesis and applications.

World Journal of Microbiology & Biotechnology. 38(11): 216.
<https://doi.org/10.1007/s11274-022-03401-6>.

Sánchez, C. 2020. Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: An overview of macro- and microplastics biodegradation. *Biotechnology Advances*. 40: 107501. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107501>.

Santos D., Rufino R., Luna J., Santos, V., Sarubbo L. 2016. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *International Journal of Molecular Sciences*. 17(3): 401. <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>.

Savinova O.S., Shabaev A.V., Fedorova T.V. 2023. Biodegradation of phthalic acid esters by the white-rot fungus *Peniophora lycii*. *Microbiology*. 92: 427–433. <https://doi.org/10.1134/S0026261723600222>.

Savinova O.S., Shabaev A.V., Glazunova O.A., Eremin S.A., Fedorova T.V. 2022. Biodestruction of phthalic acid esters by white rot fungi. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 58: 598-612. <https://doi.org/10.1134/S0003683822050143>.

Schaffert A., Karkossa I., Ueberham E., Schlichting R., Walter K., Arnold J., Blüher M., Heiker J.T., Lehmann J., Wabitsch M., Escher B.I., von Bergen M., Schubert K. 2022. Di-(2-ethylhexyl) phthalate substitutes accelerate human adipogenesis through PPAR γ activation and cause oxidative stress and impaired metabolic homeostasis in mature adipocytes. *Environment International*. 164: 107279. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107279>.

Sempere F., García F., Santamarina M.P. 2004. Caracterización morfológica y cultural de *Fusarium culmorum* (W.G.Smith) Sacc. *Phytoma*. 162: 101-105.

Shabbir A., Haider K., Rehman K., Hamid-Akash M.S. Chen S. 2022. Chapter 1 - Biochemical activation and functions of drug-metabolizing enzymes. Academic Press. 1-27. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95120-3.00021-X>.

- Singh A., Bajar S., Devi A., Pant D. 2021. An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. *Bioresource Technology Reports*. 14: 100652. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100652>.
- Song X., Zhang Z., Dai Y., Cun D., Cui B., Wang Y., Fan Y., Tang H., Qiu L., Wang F., Qiu D., Liang W. 2022. Biodegradation of phthalate acid esters by a versatile PAE-degrading strain *Rhodococcus* sp. LW-XY12 and associated genomic analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 170: 105399. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2022.105399>.
- Suga H., Hyakumachi M. 2004. Genomics of Phytopathogenic *Fusarium*. *Applied Mycology and Biotechnology*. 4: 161-189. [https://doi.org/10.1016/S1874-5334\(04\)80009-1](https://doi.org/10.1016/S1874-5334(04)80009-1).
- Sun J., Zhu H., Yang X.D., Zheng Y., Tianchi S., Xu H., Meng J., Zhang A. 2022. Carboxylesterase and lipase-catalyzed degradation of phthalate esters in soil and water: Congener structure selectivity and specificity. *Environmental Technology & Innovation*. 28: 102571. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102571>.
- Tapia C., Amaro J. 2014. Género *Fusarium*. *Revista Chilena de Infectología*. 31(1): 85-86.
- te Biesebeke R., Ruijter G., Rahardjo Y.S.P., Hoogschagen M.J., Heerikhuisen M., Levin A., van Driel K.G.A., Schutyser M.A.I., Dijksterhuis J., Zhu Y., Weber F.J., de Vos W.M., van den Hondel K.A. M.J. J., Rinzema A., Punt P.J. 2002. *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations: progress report on a multi-disciplinary project free. *FEMS Yeast Research*. 2(2): 245-248. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00089.x>.
- Téllez-Téllez M., Fernández F.J., Montiel-González A.M., Sánchez C., Díaz-Godínez G. 2008. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 81(4) :675-679. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1628-6>.
- Thirumurugan D., Kokila D., Balaji T., Rajamohan R., AlSalhi M.S., Devanesan S., Rajasekar R., Parthipan P. 2023. Impact of biosurfactant produced by *Bacillus* spp. on

biodegradation efficiency of crude oil and anthracene. *Chemosphere*. 344, 140340. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140340>.

Vázquez-Francisca M., Gutiérrez-Tolentino R., Pérez-González J.J., Escobar-Medina A.C., Rivera-Martínez J.G., Vega-León S. Presencia de ftalatos en agua embotellada comercializada en la Ciudad de México y su migración durante el almacenamiento a diferentes temperaturas. *Tecnología y Ciencias del Agua*. 3(5): 91-103. <https://doi.org/10.24850/j-tyca-2017-05-06>.

Viniegra-González G., Favela-Torres E., Aguilar C.N., de Romero-Gomez S.J., Díaz-Godínez G., Augur C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*. 13(2–3): 157–167. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00128-6](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00128-6).

Wackett, L.P. 2014. The Metabolic Pathways of Biodegradation. In: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (eds) *The Prokaryotes*. Pp. 383-393. https://doi.org/10.1007/978-3-642-31331-8_76.

Wang P., Gao J., Zhao Y., Zhang M., Zhou S. 2021. Biodegradability of di-(2-ethylhexyl) phthalate by a newly isolated bacterium *Achromobacter* sp. RX. *Science of the Total Environment*. 755(Pt 1): 142476. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142476>.

Wu S., Nan F., Jiang J., Qiu J., Zhang Y., Qiao B., Li S., Xin Z. 2019. Molecular cloning, expression and characterization of a novel feruloyl esterase from a soil metagenomic library with phthalate-degrading activity. *Biotechnology Letters*. 41(8-9): 995-1006. <https://doi.org/10.1007/s10529-019-02693-3>.

Wu Y., Li J., Yang H., Shin H.J. 2017. Fungal and mushroom hydrophobins: A review. *Journal of Mushrooms* 15(1): 1-7. <https://doi.org/10.14480/JM.2017.15.1.1>.

Xu J., Li X., Lu Q., de Toledo R.A., Shim H. 2017. Degradation of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) by indigenous isolate *Acinetobacter* sp. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 117(7): 205-214. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.01.004>.

Yan Z., Ding L., Zou D., Qiu J., Shao Y., Sun S., Li L., Xin Z., 2021. Characterization of a novel carboxylesterase with catalytic activity toward di(2-ethylhexyl) phthalate from a soil metagenomic library. *Science of the Total Environment*. 785: 147260. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147260>.

Yang T., Ren L., Jia Y., Fan S., Wang J., Nahurira R., Wang H., Yan Y. & Wang Y. 2018. Biodegradation of di-(2-ethylhexyl) phthalate by *Rhodococcus ruber* YC-YT1 in contaminated water and soil. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 15(5): 964- 984. <https://doi.org/10.3390/ijerph15050964>.

Yucel T.T. 2018. Investigation of some parameters affecting methyl orange removal by *Fusarium acuminatum*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 61: e18160237. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2018160237>.

Zhang H, Lin Z, Liu B, Wang G, Weng L, Zhou J, Hu H, He H, Huang Y, Chen J, Ruth N, Li C, Ren L (2020) Bioremediation of di- (2-ethylhexyl) phthalate contaminated red soil by *Gordonia terrae* RL-JC02: characterization, metabolic pathway and kinetics. *Science of the Total Environment*. 733: 139138. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139138>.

Zhang J., Zhang C., Zhu Y., Li J., Li X. 2018. Biodegradation of seven phthalate esters by *Bacillus mojavensis* B1811. *International Biodeterioration & Biodegradation*.132: 200-207. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.04.006>.

Zhang X., Wang X., Li C, Zhang L., Ning G.H., Shi W., Zhang X., Yang Z. 2020. Ligninolytic enzyme involved in removal of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Fusarium* strain ZH-H2. *Environmental Science and Pollution Research International*. 27(34): 42969-42978. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10192-6>.

12. Anexos

Anexo 1.

La Fig. 34, representa la degradación de DEHF durante la fermentación en medio sólido. La grafica indica que el DEHF se degradó lentamente al inicio de la fermentación. Posteriormente, entre las 72 h y las 228 h, se observó una degradación de aproximadamente el 80 % del compuesto. Finalmente, hacia las 312 h, la concentración de DEHF, descendió a valores cercanos a cero, indicando casi la completa degradación del compuesto.

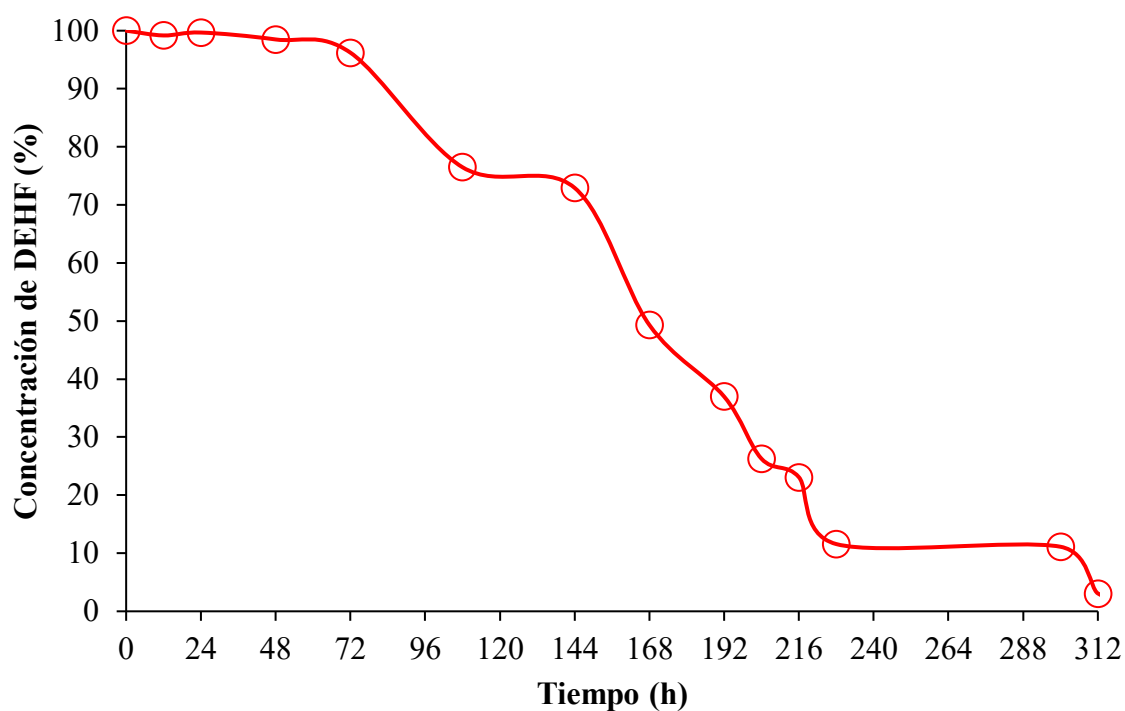


Fig. 34. Cinética de degradación de DEHF por *F. culmorum* en FMS.

13. Productos derivados de la Tesis

13.1. Publicaciones

Hernández-Sánchez B., Santacruz-Juárez E., Figueroa-Martínez F., Castañeda-Antonio D., Portillo-Reyes R., Viniegra-González G., Sánchez C., 2024a. A novel and efficient strategy for the biodegradation of di(2-ethylhexyl) phthalate by *Fusarium culmorum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 108(1): 94. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12961-y>.

Hernández- Sánchez B., Santacruz-Juárez E., Figueroa-Martínez F., González-Pérez M., González-Márquez A., Dolores Castañeda-Antonio D., Portillo-Reyes R., Viniegra-González G., Sánchez C. 2026. Enzyme and biosurfactant production as strategy for bis(2-ethylhexyl) phthalate degradation by *Fusarium culmorum*: Metabolic pathway proposal using quantum chemical investigation. **Fungal Biology**. 130: 101719. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2026.101719>.

13.2 Congresos

Hernández-Sánchez B., Santacruz-Juárez E., Figueroa-Martínez F., Castañeda-Antonio D., Portillo-Reyes R., Viniegra-González G., Sánchez C., 2025. Biodegradación de di(2-etilhexil) ftalato por *Fusarium culmorum*. XII Congreso Internacional de Biociencia y Biotecnología y VI Encuentro de estudiantes y egresados del posgrado del CICB-UATx. Tlaxcala, Mexico. **Tercer lugar en modalidad de presentación oral.**

Hernández-Sánchez B., Santacruz-Juárez E., Figueroa-Martínez F., Viniegra-González G., Sánchez C. 2024. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de CaCl_2 en el crecimiento y la actividad de esterasas de *F. culmorum* en medios adicionados con di (2-etil hexil) ftalato. XI Congreso Internacional de Biotecnología SOCIBI y V Encuentro de estudiantes del posgrado del CICB-UATx. Tlaxcala, Mexico.

Hernández-Sánchez B., Santacruz-Juárez E., Figueroa-Martínez F., Castañeda-Antonio D., Portillo-Reyes R., Viniegra-González G., Sánchez C. 2023. Biodegradación del compuesto plastificante di (2-etil hexil) ftalato. 14° Congreso internacional de investigación UVM. Jalisco, México.

Hernández-Sánchez B., Santacruz-Juárez E., Figueroa-Martínez F., Castañeda-Antonio D., Portillo-Reyes R., Viniegra-González G., Sánchez C. 2023. Biodegradación del plastificante di(2-etilhexil) ftalato por *F. culmorum* en fermentación en estado sólido. X Congreso Internacional de Biotecnología SOCIBI y IV encuentro de estudiantes y egresados del posgrado del CICB-UATx. Tlaxcala, México.

Hernández-Sánchez B., Figueroa-Martínez F., Viniegra-González G., Sánchez C. 2022. Evaluación del crecimiento y la producción de esterases de *Fusarium culmorum* en un medio adicionado con di(2-etilhexil) ftalato en fermentación en estado sólido. IX Congreso Internacional de Biotecnología SOCIBI y III Encuentro de estudiantes y egresados del posgrado del CICB UATx. Tlaxcala, México.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00903

Matrícula: 2221800962

Biodegradación de di
(2-etilhexil) ftalato por
Fusarium culmorum crecido en
fermentación sólida y
líquida.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas
del día 23 del mes de marzo del año 2026 en la Unidad
Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los
suscritos miembros del jurado:

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL
DRA. ERICKA SANTACRUZ JUAREZ
DRA. MARIA DOLORES CASTAÑEDA ANTONIO
DR. FRANCISCO JAVIER FIGUEROA MARTINEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de
Secretario el último, se reunieron a la presentación de la
Disertación Pública cuya denominación aparece al margen,
para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

DE: BRENDA HERNANDEZ SANCHEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV 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.

REVISÓ

MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS



DRA. EDITH ARENAS RÍOS

PRESIDENTE



DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

VOCAL



DRA. ERICKA SANTACRUZ JUAREZ

VOCAL



DRA. MARIA DOLORES CASTAÑEDA ANTONIO

SECRETARIO



DR. FRANCISCO JAVIER FIGUEROA
MARTINEZ