

# Producción de enzimas fúngicas M6P21 a partir de residuos de piña (*Ananas Comosus*) y maracuyá (*Passiflora Edulis*): Aprovechamiento biotecnológico para la valorización de subproductos agroindustriales

## Production of fungal enzymes from M6P21 using pineapple (*Ananas comosus*) and passion fruit (*Passiflora edulis*) waste: Biotechnological utilization for the valorization of agro-industrial by products

**Mauren C. Osorio Díaz\***, **Luis E. Oviedo Zumaqué\*\***, **Licet V. Durango Castilla\*\*\***

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n1.117486

### RESUMEN

Este estudio evaluó la actividad pectinolítica de las enzimas producidas por el aislado *Aspergillus niger* M6P21 (P. Michel, 1729), utilizando albedo de piña, albedo de maracuyá y una combinación de ambos como únicas fuentes de carbono, con pectina comercial como control. El aislado M6P21 fue obtenido de un cultivo de piña en el distrito Sarandelo de Lorica, Córdoba, Colombia. La producción enzimática se evaluó en cuatro tratamientos: albedo de piña, albedo de maracuyá, su mezcla y pectina comercial. La actividad pectinolítica se monitoreó durante tres días, y los resultados se expresaron como concentración de azúcares reductores. Los hallazgos demostraron una actividad enzimática notable: 0,2816 g/L para el albedo de piña, 0,2740 g/L para el albedo de maracuyá, 0,3923 g/L para la mezcla de sustratos y 0,3046 g/L para la pectina comercial. El análisis estadístico mediante ANOVA arrojó un valor - *p* - de 0,9383, lo que indica que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. Estos resultados resaltan el potencial de *Aspergillus niger* M6P21 para la producción de pectinas a partir de subproductos agroindustriales, ofreciendo un enfoque biotecnológico sostenible para la valorización de residuos frutales en las industrias alimentaria y biotecnológica.

**Palabras claves:** Enzimas fúngicas, *Ananas comosus*, *Passiflora edulis*, *Aspergillus niger*, Azúcares.

### ABSTRACT

This study evaluated the pectinolytic activity of enzymes produced by the *Aspergillus niger* M6P21 isolate (P. Michel, 1729), using pineapple albedo, passion fruit albedo, and a combination of both as sole carbon sources, with commercial pectin serving as the control. The M6P21 isolate was isolated from a pineapple crop in the Sarandelo district of Lorica, Córdoba, Colombia. Enzyme production was assessed across four treatments: pineapple albedo, passion fruit albedo, their mixture, and commercial pectin. Pectinolytic activity was monitored over three days, with results expressed as reducing sugar concentration. The findings demonstrated notable enzymatic activity: 0.2816 g/L for pineap-

\* Docente asistente, Facultad de ciencias básicas, Grupo de investigación GRUBIODEQ del programa de biología y química, Universidad de Córdoba. <https://orcid.org/0000-0002-4355-7824>

\*\* Docente titular, Facultad de ciencias básicas, Grupo de investigación GRUBIODEQ del programa de biología y química, Universidad de Córdoba. <https://orcid.org/0000-0002-7797-1580>

\*\*\* Docente asistente, Facultad de Ingeniería, Laboratorio de Biorprocesos y Fermentaciones, Grupo de investigación GIPPAL del programa de Ingeniería de Alimentos, Universidad de Córdoba. <https://orcid.org/0009-0000-5696-2549>

ple albedo, 0.2740 g/L for passion fruit albedo, 0.3923 g/L for the mixed substrates, and 0.3046 g/L for commercial pectin. Statistical analysis using ANOVA yielded a *p*-value of 0.9383, indicating no significant differences among the treatments. These results highlight the potential of *Aspergillus niger* M6P21 for pectinase production from agro-industrial by-products, offering a sustainable biotechnological approach for the valorization of fruit waste in the food and biotechnology industries.

**Keywords:** Fungal enzymes, *Ananas comosus*, *Passiflora edulis*, *Aspergillus niger*, Reducing sugars.

**Recibido:** noviembre 7 de 2024 **Aprobado:** abril 22 de 2025

## INTRODUCCIÓN

En Córdoba la comercialización de jugos constituye un factor importante en el ámbito económico, desde el año 2022 se siembran aproximadamente 225 hectáreas de Piña (*Ananas comosus*) conformando el 2% de productores de piña a nivel nacional (Granado & Aguilón, 2019; Ajayi et al., 2022; Agronet, 2024b). En el caso del consumo maracuyá (*Passiflora edulis*) la siembra fue de 1.024 hectáreas aproximadamente para el 2022 (Agronet, 2024a), estas frutas son comercializadas por sus propiedades nutricionales lo que lleva a la alta demanda de la producción por pequeños agricultores.

La pectina es un polisacárido con estructura compleja que hace parte de la pared vegetal de los frutos y plantas, por su alta complejidad la degradación de esta estructura depende de enzimas producidas por microorganismos filamentosos (Satapathy et al., 2020; Neves Junior et al., 2021). Está constituido de unidades repetitivas de residuos ácido galactopiranosilurónico y unidades de galactosa, arabinosa, xilosa y fructosa (Ciriminna et al., 2022; Zhong et al., 2021).

Las enzimas son herramientas biotecnológicas muy valiosas en la elaboración de alimentos (C. Li et al., 2020; Boukid et al., 2023), particularmente las pectinasas se emplean en la industria alimenticia para aumentar la eficiencia de procesos extractivos, estabilización de productos y mejoramiento del sabor. Su producción a bajo costo, de hongos filamentosos utilizando sustratos agroindustriales afines con el microorganismo, como este caso sustratos ricos en pectina Sharma et al., (2022). Estas son producidas principalmente por microorganismos donde se encuentran bacterias, levaduras y hongos filamentosos, hoy en día esta enzima juega un papel importante en las actividades metabólicas de casi todos los organismos vivos (Abdullahi et al., 2021; Lozano & López, 2001).

El microorganismo más empleado en la industria para la producción de enzimas es *Aspergillus niger*, gracias a su capacidad de secretar hasta un 70% de enzimas extracelulares, permitiéndole metabolizar diversas fuentes de

carbono (Sharma & Vimal, 2023). En este contexto, se ha planteado el uso de enzimas producidas por hongos del género *Aspergillus* en análisis cualitativos de jugos naturales de baja concentración, con el propósito de evaluar su potencial clarificante (Kirimura & Yoshioka, 2019; Garcia et al., 2023). Este hongo es fácil de manejar debido a su crecimiento rápido y a su capacidad de fermentar cualquier materia prima (Viayaraghavan et al., 2019; Mohammadi et al., 2023) y también ofrece rendimientos constantes cuando es utilizado (Chergui et al., 2021; Abarca, 2000; Weng et al., 2024).

Esta investigación se realizó con el objetivo de determinar la actividad enzimática mediante el método DNS (ácido 3,5- dinitrosalicílico) para un análisis la producción enzimática del hongo *Aspergillus niger* M6P21 nativa de cultivos de frutas de piña, la cual fue sometida a diversos tratamientos, empleando como sustratos modificados el albedo de piña y maracuyá. La tecnología de enzimas fúngicas y especialmente las pectinolíticas es utilizada para mejorar la calidad de productos alimenticios ya que estas preservan las características tanto nutricionales y organolépticas de los mismos. Por lo que se planteó la siguiente hipótesis.

La utilización de residuos de piña (*Ananas comosus*) y maracuyá (*Passiflora edulis*) como sustratos en cultivos del hongo M6P21 de *Aspergillus niger* actuará como fuente de carbono, favoreciendo la actividad enzimática y promoviendo la producción de azúcares reductores.

## MATERIALES Y METODOS

Se tomaron muestras y aislados directamente de cultivos representativos de piña y maracuyá localizados en el corregimiento Sarandelo - Lorica (9.110743° N, -75.828322° O) y el municipio de Purísima - Córdoba (9.282834° N, -75.767724° O). Durante el muestreo en Sarandelo (abril de 2021), se registró una temperatura promedio de 30 °C y una humedad relativa del 75 %. En Purísima (mayo de 2021), las condiciones fueron de aproximadamente 32 °C y 80 % de humedad relativa.

Los experimentos *in vitro* se realizaron en las instalacio-

nes del laboratorio de investigación de Biotecnología (GRUBIODEQ), en la Universidad de Córdoba, ubicado en Montería (8.792482° N, -75.862677° O), donde se llevaron a cabo los procedimientos de aislamiento y evaluación enzimática. Las muestras fueron recolectadas con guantes, bolsas estériles y transportadas en una cava térmica hasta el laboratorio. Se implementaron medidas de bioseguridad para evitar contaminación cruzada. Todo el material e instrumentos empleados fueron previamente desinfectados o esterilizados.

#### **Caracterización del aislado *Aspergillus M6P21* asociado a los cultivos de frutos de piña y maracuyá**

**Aislamiento de hongos del género *Aspergillus*.** Se prepararon trampas con contenido de frutos fisiológicamente maduros de piña y maracuyá; en un recipiente con un contenido de 10 g aproximadamente de residuos humedecidos con solución de sales Czapek, cada trampa fue ubicada dentro del cultivo de piña y maracuyá durante 1 hora aproximadamente (Ver Anexo 1).

Las trampas que fueron expuestas en los cultivos frutales se les proporcionó una incubación a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  de 3 a 8 días para inducir crecimiento de los hongos. Luego de esto, desde el día 3 y hasta el día 8 se hicieron observaciones y aislamiento de microorganismos, estos fueron creciendo en la superficie de la cascara de cada fruta. Al obtener el crecimiento, fueron sembrados en Agar Czapek modificado (Figura 1) a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  por 8 días; en el

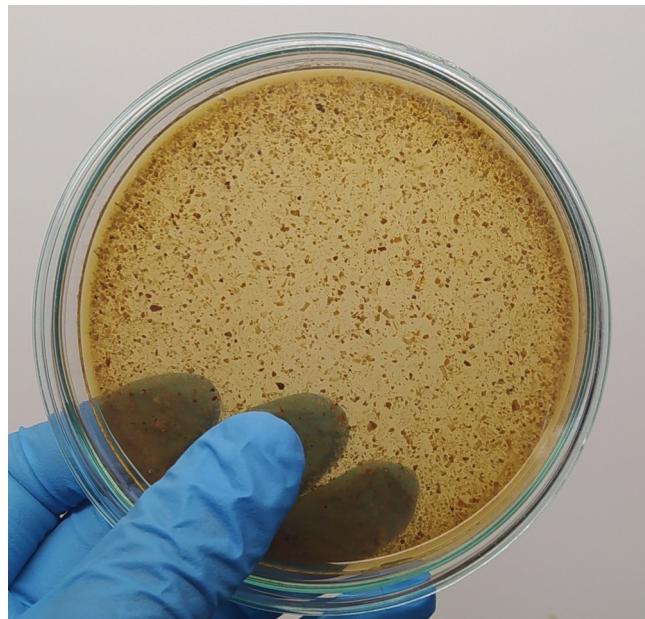


Figura 1. Czapek modificado. Medio de cultivo preparado de manera artesanal, donde se utilizan las sales del medio Czapek y en lugar de usar sacarosa, se reemplaza por residuo de piña o maracuyá en la proporción indicada para preparar el medio de cultivo.

caso de que los microorganismos no se encontraran puro se realizaban repicas hasta obtenerlos puros para después identificarlos por sus características morfológicas Arauz Cavallini (1998). Para la caracterización molecular, se aisló ADN genómico puro a partir de conidias del cultivo fúngico (M6P21). La calidad del ADN extraído fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,0 %. La región del espaciador interno transcrita (ITS) fue amplificada mediante PCR utilizando cebadores universales específicos para esta región. El amplicón obtenido fue secuenciado, y la secuencia resultante se analizó mediante la herramienta BLAST en la base de datos GenBank del NCBI, con el fin de establecer su identidad molecular del hongo *Aspergillus niger* Wagh et al., (2022). Cada aislado se sembró sobre medios de cultivo agar Czapek modificado con albedo de piña y albedo de maracuyá respectivamente como única fuente de carbono. Se llevó a cabo: siembra en placas, dilución, y siembra directa, para identificar sus características morfológicas (Q. Li et al., 2020; Madigan et al., 2003).

#### **Determinación la actividad pectinolítica de hongos seleccionados utilizando sus extractos enzimáticos en albedo: piña, maracuyá, piña/maracuyá y pectina comercial**

**Preparación de inóculos.** La preparación de inóculos partió de la recolección de esporas del hongo aislada seleccionada, los cuales presentaron mayor capacidad de crecimientos en medio de agar Sabouraud (hasta la esporulación), con 10 mL de solución salina (NaCl 0.85% + Twen 20 al 0.1%) y se realizó un conteo de esporas por el método de dilución seriada usando cámara de Neubauer, para obtener las concentraciones de conidias por mL Osorio & Cando (2017).

**Introducción a la producción de enzimas.** En este proceso, se utilizó la técnica de fermentación sumergida al 10% de sustrato modificado de Oviedo y Ramos en el 2013 Ramos Galeano (2013). Se realizó un conteo de esporas y estas soluciones se inocularon en un volumen de 25 mL de medio líquido modificado Czapek al 2 % de piña, maracuyá, piña/ maracuyá y de pectina cítrica comercial al 2% a un pH 5.6 con 0.5 mL de suspensión de esporas e incubados por un periodo de 3 días (24, 48, 72) a 150 rpm a  $30^\circ\text{C}$  respectivamente Osorio & Cando (2017).

**Ensayo poligalacturonasa.** El extracto obtenido de la fermentación sumergida se empleó para evaluar la actividad enzimática del hongo. Para cada prueba, se utilizó un buffer citrato-fosfato (pH 5.6) en un medio estéril con pectina, el cual fue incubado a  $35^\circ\text{C}$  durante 1 hora.

#### **Análisis de la actividad enzimática por método DNS (ácido 3,5- dinitrosalicílico) de los azúcares reductores.**

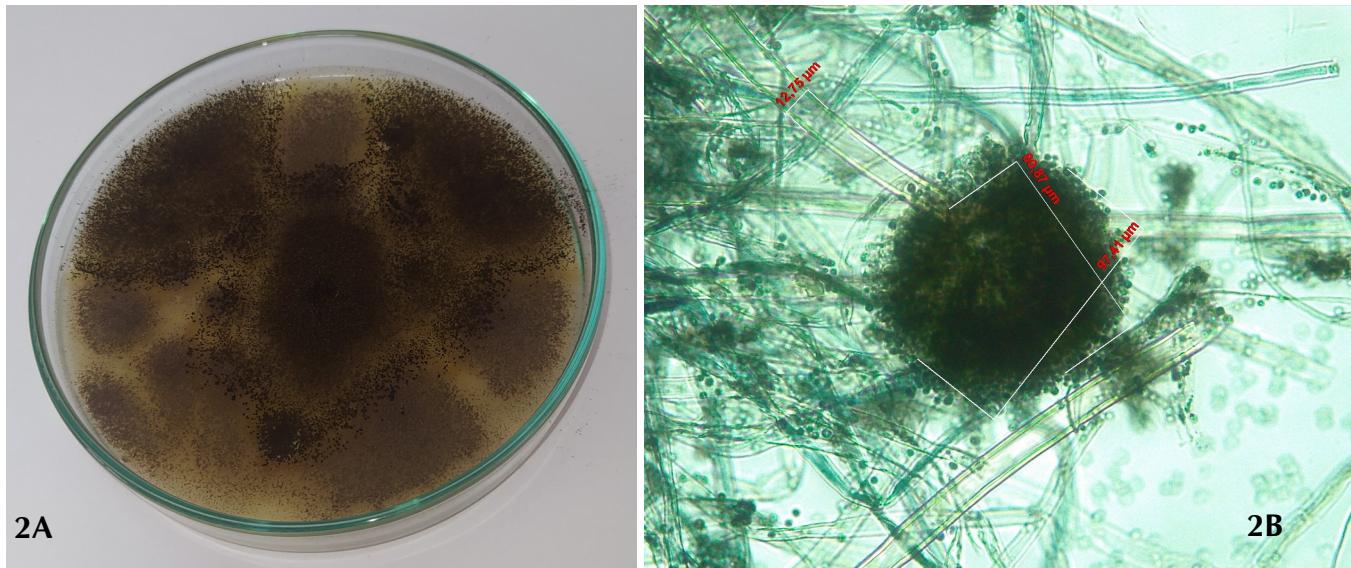


Figura 2. Características macroscópicas y microscópicas de la aislado M6P21. (2A): características macroscópicas de la aislado M6P21; (2B): características microscópicas de la aislado M6P21.

En tubos de cristal de 20 mL, se tomaron alícuotas homogéneas (0,5mL) de cada extracto incubado en buffer con pectina y se aplica el reactivo DNS (ácido 3,5- dinitrosalicílico). Luego, los tubos se colocaron en baño de maría a 100°C por 5 minutos. Se dejaron enfriar en baño de hielo por 15 minutos y se le añadieron 5 mL de agua destilada. Luego se agitaron para homogenizar y se les tomo lectura a 540 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. Estos resultados se compararon con una curva patrón del reactivo DNS (ácido 3,5- dinitrosalicílico) con un estándar de glucosa monohidratado ( $C_6H_{12}O_6 * H_2O$ ) para obtener las concentraciones en g/L de azúcares reductores Miller (1959).

## DISEÑO EXPERIMENTAL

Se llevó a cabo un análisis de datos con un diseño completamente aleatorio (DCA), con 4 repeticiones. Los datos experimentales obtenidos se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey, por el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurión XVI.I, con un margen de significancia de 0.05, seleccionando de esta forma el mejor tratamiento para la producción enzimas pectinolíticas en cada tratamiento aplicado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Caracterización del aislado M6P21de hongos *Aspergillus niger* con propiedades pectinolíticas.** Para la caracterización del aislado de los cultivos de piña y maracuyá, se tuvo en cuenta los aspectos de las colonias y el análisis de la morfología microscópica, especialmente en la cabeza que contiene las esporas muy características

de este género. Se realizó una preselección de 6 aislados con las características tanto macroscópicas como microscópicas del género *Aspergillus*, mediante la medida del halo de crecimiento sobre medio de cultivo de pectina comercial al 2%, utilizando como indicador revelador rojo Congo, con un halo de crecimiento de 3,6 mm mayor que los otros aislados (Ver Anexo 2). En la Figura 2 se puede observar las características macroscópicas y microscópicas del aislado M6P21. Se observa la abundancia de esporas de color negro oscuro, en algunas cabezas dispersas, en la imagen se logra observar la formación de una vesícula esférica globosa, hifas tabicadas, conidióforos largos y lisos.

Para corroborar los resultados del aislamiento de hongos nativos como *Aspergillus niger* con características y condiciones similares a las de este trabajo se comparó con trabajos recientes como en trabajo realizado por Saif et al.(2021), que lograron aislar varias especies fúngicas directamente de las frutas de piña y se lograron encontrar 15 especies del género *Aspergillus* siendo el género más dominante de estos aislamientos, los cuales fueron sembrados en medio de agar patata dextrosa (PDA) lo que sería caso contrario a este trabajo donde los medios de crecimiento era a base de cascara de frutas. En cuanto al estudio de la morfología se realizó una metodología similar mediante técnica microscópica y macroscópica, cabe resaltar que las frutas desde el momento que se encuentran en el cultivo hasta el punto de maduración están expuestas al crecimiento de hongos, debido a que son la principal fuente de alimentos de hongos del género *Aspergillus* Eboigbe & Omoregbe (2020).

Por otro lado, Cavalieri de Alencar Guimarães et al. (2022), lograron aislar una cepa de *Aspergillus* para producción de enzimas pectinolíticas y utilizan como fuente de carbono residuos de maracuyá en solución salina para producir enzimas pectinolíticas, son resultados muy similares a los de este trabajo porque también se utilizan residuos de maracuyá para el aislamiento y purificación de los hongos nativos para realizar ensayos de producción de enzimas pectinolíticas. Así mismo Mahmoodi et al., (2017) obtienen aislados de la cascara de naranja del género *Aspergillus niger* de tipo salvaje, para producción de enzimas pectinolíticas aplicables en zumo de naranja, son resultados que al ser comparados con los resultados obtenidos son muy parecidos. Sin embargo, el género *Aspergillus* es un hongo común que se encuentra en el medio ambiente, desde cualquier fuente de alimento en descomposición y más que todo en las especies frutales en su proceso de maduración o putrefacción, por lo que Krusong et al.(2019), logran obtener *Aspergillus* de un pan contaminado sin conservante, de una especie no frutal. *Aspergillus niger* es el hongo más común del género porque se encuentra en el medio ambiente, es utilizado en potencia para aspectos ambientales y alimenticios Nosalj et al., (2021).

Para la identificación del aislado M6P21, se realizó un estudio molecular mediante PCR convencional, obteniendo una secuencia correspondiente al género *Aspergillus*. El hongo, aislada de cultivos de piña, presentó fragmentos de ADN que coincidieron en tamaño y secuencia con especies del género *Aspergillus*, lo que sugiere una posible relación con nuevas funciones o adaptaciones propias de *Aspergillus niger* en su ambiente de origen.

El análisis molecular se basó en la amplificación del gen del espaciador interno transcrita (ITS), incluyendo el gen 5.8S del ARN ribosomal, lo que permitió una identificación precisa del aislado. Posteriormente, la secuencia fue comparada en la base de datos GenBank del NCBI mediante la herramienta BLAST, identificando alta similitud con especies del género *Aspergillus* (Ver Anexo 3).

Una vez confirmada la identidad, la nueva secuencia fue registrada en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) bajo el código GRUBIODEQ M6P21. En dicha base de datos, se encuentra disponible el fragmento de anotación genética correspondiente al gen 5.8S del ARN ribosomal, con una longitud de 101 pares de bases.

El fragmento ITS (Internal Transcribed Spacer) es una región no codificante del ADN ribosomal ampliamente utilizada como marcador molecular en la identificación de hongos, debido a su alta variabilidad entre especies.

En este estudio, el aislado M6P21 fue identificado mediante la secuenciación del fragmento ITS, lo que permitió su clasificación dentro del género *Aspergillus*. Este marcador, aunque útil con fines taxonómicos, no proporciona información directa sobre la funcionalidad genética del aislado. Por ejemplo, se ha documentado que hongos filamentosos como los del género *Aspergillus* pueden expresar genes asociados a enzimas de la familia CAZy en presencia de pectina, incluyendo miembros de las proteínas CH28 y MAPK, implicadas en la degradación de sustratos y en la respuesta al estrés Baltussen et al., (2020). Desde el enfoque biotecnológico, esta información podría usarse para inducir la producción de enzimas específicas. Sin embargo, el fragmento ITS no confirma la expresión funcional de genes. Se requieren estudios adicionales como transcriptómica o expresión génica.

#### Determinación de la capacidad pectinolítica hongo seleccionado utilizando sus extractos enzimáticos en albedo de piña, maracuyá, piña/ maracuyá y pectina comercial

El aislado M6P21 previamente aislada de cultivo de piña fue sembrada en medio de cultivo Czapek modificado con albedo de piña como única fuente de carbono para conocer la cantidad de conidias por mL, la concentración del hongo fue de 5,30E+07 conidias /mL y fue evaluada en sustrato de albedos de: piña, maracuyá, Mezcla de ambos y pectina comercial 2%.

A continuación, se presentan los valores de azúcares reductores obtenidos en los tratamientos antes mencionados, utilizando el método DNS (ácido 3,5- dinitrosalicílico) como método indirecto para determinar la actividad pectinolítica de los hongos. El primer tratamiento es el de albedo de piña, el segundo es el tratamiento de albedo de maracuyá, como tercer tratamiento la mezcla de albedo de piña/ maracuyá y cuarto tratamiento pectina comercial, durante un monitoreo de tres días, dando como resultado la cuantificación de la actividad enzimática de M6P21.

Acerca de los resultados obtenidos en el tratamiento 1 (Piña) se pueden observar en la Tabla 1 que la producción de enzimas expresadas en concentraciones de azúcares reductores, donde el aislado M6P21 obtiene la mayor producción enzimas a las 72 horas con una concentración de 0,2816 g/L.

Con respecto a los resultados obtenidos del tratamiento 2 (Maracuyá) también se pueden observar que el aislado M6P21 obtiene la mayor concentración de azúcares reductores de 0,2740 g/L, para este tratamiento, este

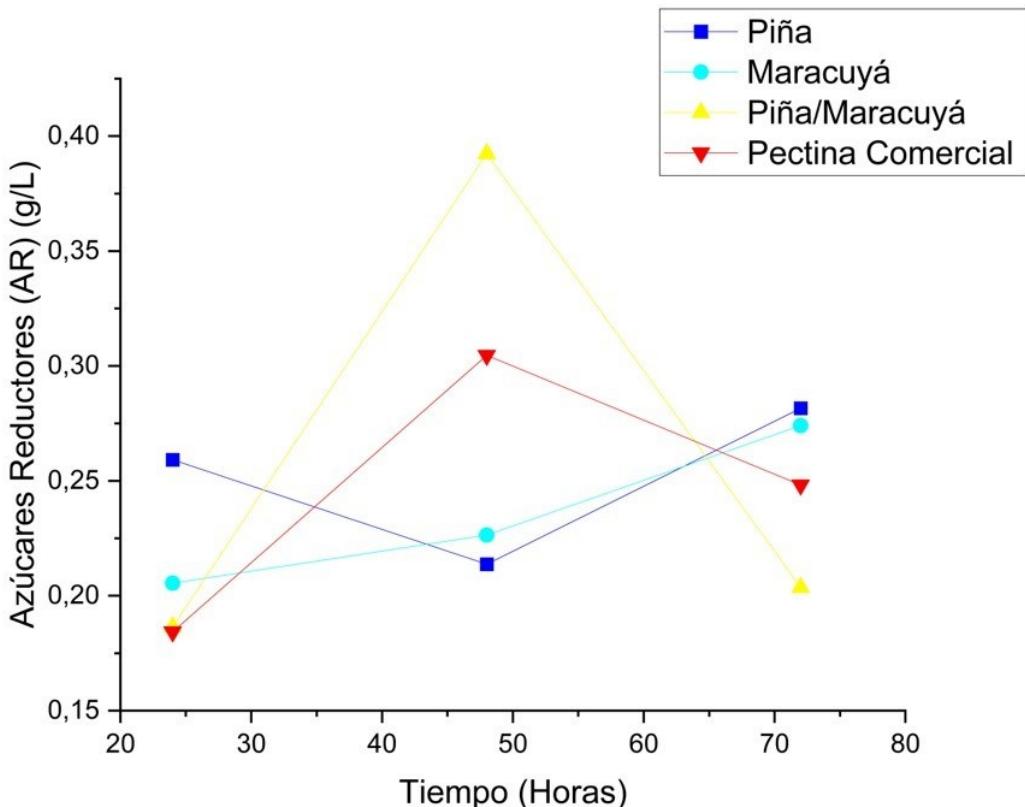


Figura 3. Concentración de azúcares reductores. Tratamientos de residuos de piña, maracuyá, piña/maracuyá y pectina comercial.

Tabla 1. Tratamientos de piña, Maracuyá, piña/Maracuyá y Pectina comercial

HONGO	tiempos	Piña	Maracuyá	Piña/ Maracuyá	Pectina comercial
NATIVO		Azucares Reductores (AR) g/L			
M6P21	24	0,2592 ± 0,021 <sup>a</sup>	0,2055 ± 0,022 <sup>a</sup>	0,1865 ± 0,033 <sup>a</sup>	0,1843 ± 0,030 <sup>a</sup>
	48	0,2028 ± 0,021 <sup>a</sup>	0,1949 ± 0,409 <sup>a</sup>	0,2045 ± 0,021 <sup>a</sup>	0,2468 ± 0,021 <sup>a</sup>
	50	0,2137 ± 0,022 <sup>a</sup>	0,2264 ± 0,041 <sup>a</sup>	0,3923 ± 0,077 <sup>a</sup>	0,3046 ± 0,029 <sup>a</sup>
	72	0,2411 ± 0,044 <sup>a</sup>	0,2119 ± 0,030 <sup>a</sup>	0,2036 ± 0,029 <sup>a</sup>	0,2482 ± 0,016 <sup>a</sup>
		<b>0,2816 ± 0,031<sup>a</sup></b>	<b>0,2740 ± 0,089<sup>a</sup></b>	<b>0,181 ± 0,033<sup>a</sup></b>	<b>0,2064 ± 0,021<sup>a</sup></b>

a: no presentan diferencias significativas entre sí ( $p > 0,05$ ), según la prueba de comparación múltiple.

valor se presentó al tiempo de 72 horas para la mayor producción enzimas fúngicas.

Por un lado, en la misma tabla se puede observar el rendimiento de la producción de enzimas fúngicas del tratamiento tres (mezcla: piña/maracuyá), donde el aislado

M6P21 presenta una concentración de 0,3923 g/L a las 48 horas. De forma semejante el tratamiento cuatro (pectina comercial) el aislado M6P21 obtiene un valor de 0,3046 g/L, teniendo en cuenta lo anterior, para el ultimo tratamiento estos aislados de *Aspergillus niger* presentaron afinidad con pectina comercial donde la actividad

enzimática fue mayor que los demás tratamientos (Ver Figura 3). El hongo M6P21, tras ser sometido a distintos tratamientos con diversas fuentes de carbono y pectina comercial, mostró producción enzimática, evidenciando su especificidad y capacidad adaptativa para la degradación de polímeros, especialmente para el tratamiento con albedo de piña/maracuyá (0,3923 g/L a las 48 horas), que fue superior al comercial en el mismo tiempo (0,3046 g/L a las 48 horas).

Entre los tratamientos evaluados (Ver tabla 1), el albedo de piña destacó como el más prometedor, con la media más alta (0,239691). El análisis estadístico ANOVA ( $P$ -valor 0,9383) confirmó la ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos, lo que indica la estabilidad del proceso enzimático y su afinidad por fuentes naturales de pectina (Ver anexo 4). Este resultado fue respaldado por la prueba de Tukey, que ubicó a todos los tratamientos (maracuyá, P/M, PC y piña) en el mismo grupo homogéneo. Por lo tanto, estos hallazgos reflejan la adaptabilidad del hongo y su alto desempeño en la producción de enzimas pectinolíticas en albedo de piña y maracuyá. Además, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la media de M6P21 y los distintos niveles de tratamiento, con un nivel de significancia del 5%.

De los resultados obtenidos en cada tratamiento se puede comparar con los resultados de Sandri & da Silveira (2018) que lograron la obtención de enzimas pectinasas, donde la producción se vio reflejada en un pico máximo a las 72 horas, similar a los tratamientos de Piña y Maracuyá. Para los tratamientos de Piña/ Maracuyá y pectina comercial, la producción de enzimas se da a las 48 horas, como lo reporta un el trabajo reciente de Cavalieri de Alencar Guimarães et al. (2022), que lograron mayor concentración de azúcares reductores de la enzima (PGAj) de *A. niger* a las 48 horas, también utilizaron como única fuente de carbono cascara de maracuyá en solución salina. Se logró obtener actividad enzimática en tiempos similares a los reportados en el estudio en el que se emplearon tratamientos con piña y maracuyá para la obtención de enzimas.

Se logró obtener actividad enzimática en tiempos comparables a los reportados en un estudio previo, en el cual se obtuvo la producción de enzimas utilizando tratamientos con piña y maracuyá.

Adedeji & Ezekiel (2019) logró obtener enzimas poligalacturonasas de medios de cultivos modificados de cascarras de plátano y naranja, con texturas diferentes, unos fueron procesados (en polvo) otros sin procesamiento, realizando una inoculación de esporas *Aspergillus*

*awamori* a las 120 horas, con un pH ligeramente ácido, diferente a este trabajo que usó menores tiempos (72 horas). Este estudio también evaluó la actividad enzimática mediante el método DNS (ácido 3,5- dinitrosalicílico) como método indirecto expresada en azúcares reductores. De hecho, Vaz et al. (2021) miden la actividad enzimática mediante el método DNS (ácido 3,5- dinitrosalicílico), logrando obtener una producción afectiva de azúcares reductores a una concentración de 0,196 g/L, por debajo de los resultados obtenidos en este trabajo.

De lo anterior, la producción de enzimas está influenciada directamente desde la fuente de carbono, los valores de pH, las condiciones de humedad del medio, aireación y temperatura, la exposición a la luz es un factor que también afecta el crecimiento y metabolismo de los hongos filamentosos, y esto resulta conveniente para algunos microorganismos que se adaptan mejor que otros, es por esto que algunos presentaron valores de actividad enzimática mayor como el hongo M6P21 que logró presentar buen rendimiento en los diferentes tratamientos a los cuales fue sometido durante un monitoreo de 3 días.

Con el objetivo de demostrar la capacidad de los aislados para producir enzimas, se realizó este proceso a menor escala, cuyos resultados se presentan en las tablas 3 a 6. De igual forma, este tipo de ensayos puede ser escalado, logrando una producción de enzimas superior al 70% bajo condiciones controladas (Grebechova & Prieto contreras, 2006; Adedayo et al., 2021).

Las enzimas se utilizan en la industria de alimentos, sumándole a esto Dumorné et al. (2017), afirma que el proceso industrial necesita biocatalizadores que sean capaces de adaptar a diversas condiciones como pH, Temperatura, aireación y humedad y demás parámetros importantes para la producción de estas. De ello, resulta decir que a día de hoy la necesidad de las herramientas biotecnologías resulta provechoso y con ello es aumento del interés de aplicar enzimas pectinolíticas como estrategia para el área alimenticia, medio ambiente y otros ámbitos en lo que estas tengan la capacidad de adaptarse Shet et al., (2022).

## CONCLUSIONES

Los residuos piña y maracuyá son sustratos que tienen propiedades de fuente de carbono por medio de la degradación fúngica para la producción de enzimas fúngicas, utilizando condiciones de fermentación sumergida dándole un valor agregado a estos residuos. El cultivo de piña / maracuyá fue el mejor para la producción de enzimas pectinolíticas, dependiendo de un aislado fúngico M6P21, del medio de cultivo y de las condiciones de

agitación. Para determinar la actividad de las enzimas y su producción optima, se recomienda realizar estudios adicionales para las enzimas y la utilización de diferentes residuos agroindustriales. Se recomienda que las enzimas sean identificadas para realizar estudio a escala de biorreactores y conocer sus características relacionadas en cuanto a la actividad y aplicación. Estos resultados pueden ser aplicables en el área de alimentos, medio ambiente y farmacéutica.

## REFERENCIAS

- Abarca, M. L. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol*, 17(1), S79–S84.
- Abdullahi, N., Atiku, M. K., & Umar, N. B. (2021). The roles of enzyme in food processing - an overview. *Revista de ciencias FUDMA*, 5(1), 157–164. <https://doi.org/10.33003/fjs-2021-0501-549>
- Adedeji, O. E., & Ezekiel, O. O. (2019). Pretreatment of selected peels for polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* CICC 2040: Purification and application in mango juice extraction. *Bioresource Technology Reports*, 7, 100306. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100306>
- Agronet. (2024a). Estadísticas home: Comparativo de área, producción, rendimiento y participación departamental por cultivo de maracuyá. <https://www.agronet.gov.co> (Consultado el 1 de noviembre de 2024)
- Agronet. (2024b). Estadísticas home: Comparativo de área, producción, rendimiento y participación departamental por cultivo de piña. <https://www.agronet.gov.co> (Consultado el 1 de noviembre de 2024)
- Ajayi, A. M., Coker, A. I., Oyebajo, O. T., Adebanjo, I. M., & Ademowo, O. G. (2022). *Ananas comosus* (L) Merrill (pineapple) fruit peel extract demonstrates antimarial, anti-nociceptive and anti-inflammatory activities in experimental models. *Journal of Ethnopharmacology*, 282, 114576. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114576>
- Arauz Cavallini, L. F. (1998). Fitopatología: un enfoque agroecológico. In Editorial de Costa Rica.
- Baltussen, T. J. H., Zoll, J., Verweij, P. E., & Melchers, W. J. G. (2020). Molecular Mechanisms of Conidial Germination in *Aspergillus* spp. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(1), e00049-19. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00049-19>
- Benoit, I., Coutinho, P. M., Schols, H. A., Gerlach, J. P., Henrissat, B., & de Vries, R. P. (2012). Degradation of different pectins by fungi: correlations and contrasts between the pectinolytic enzyme sets identified in genomes and the growth on pectins of different origin. *BMC Genomics*, 13(1), 321. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-321>
- Cavalieri de Alencar Guimarães, N., Glienke, N. N., Silva Galeano, R. M., Ruller, R., Zanoelo, F. F., Masui, D. C., & Giannesi, G. C. (2022). Polygalacturonase from *Aspergillus japonicus* (PGAj): Enzyme production using low-cost carbon source, biochemical properties and application in clarification of fruit juices. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 39 (August 2021), 102233. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102233>
- Chergui, D., Akretche-Kelfat, S., Lamoudi, L., Al-Rshaidat, M., Boudjelal, F., & Ait-Amar, H. (2021). Optimization of citric acid production by *Aspergillus niger* using two downgraded Algerian date varieties. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12), 7134–7141. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.013>
- Ciriminna, R., Fidalgo, A., Scurria, A., Ilharco, L. M., & Pagliaro, M. (2022). Pectin: New science and forthcoming applications of the most valued hydrocolloid. *Food Hydrocolloids*, 127, 107483. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107483>
- Dumorné, K., Córdova, D. C., Astorga-Eló, M., & Renganathan, P. (2017). Extremozymes: A potential source for industrial applications. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(4), 649–659. <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11006>
- Eboigbe, L., & Omorogbe, M. O. (2021). Genetic variability and vegetative compatibility in *Aspergillus niger* isolated from various food substances in Benin City Nigeria. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 24(12), 2161–2165. <https://doi.org/10.4314/jasem.v24i12.23>
- Garcia-Quinto, E., Aranda-Cañada, R., García-García, P., & Fernández-Lorente, G. (2023). Use of Potential Immobilized Enzymes for the Modification of Liquid Foods in the Food Industry. *Processes*, 11(6), 1840. <https://doi.org/10.3390/pr11061840>
- Granado, W., & Aguillón, D. (2019). Cadena de la Piña. [Informe técnico]. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.
- Grebechova, R., & Prieto contreras, L. (2006). Biosíntesis de las enzimas pectolíticas a partir de hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus foetidus* para aplicación en industria de alimentos. *Revista de Investigación Universidad La Salle*, 6(1657–6772), 153–162.
- Kirimura, K., & Yoshioka, I. (2019). Citric Acid. *Comprehensive Biotechnology*, 3, 158–165. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00157-9>
- Krusong, W., Pothimon, R., & Vichitraka, A. (2019). Inhibitory impact of vapor-phase ethanol on conidia

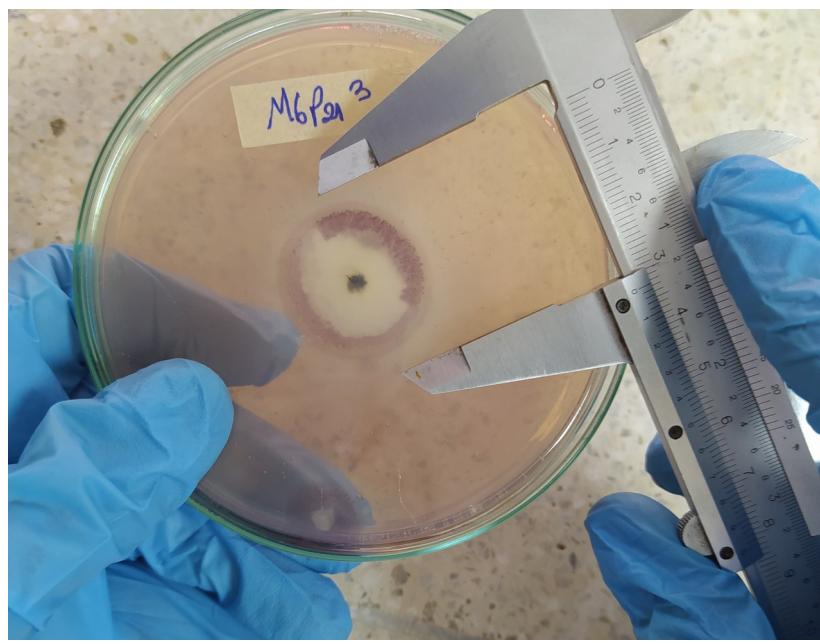
- germination and mycelial growth of *Aspergillus fumigatus* on bread. *Food Control*, 95, 165–169. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.08.010>
- Lozano, A., & López, E. (2001). Endopoligalacturonasa y pectinesterasa de *Aspergillus Niger*. Endopolygalacturonase and pectinesterase from *Aspergillus niger*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2, 85–91.
- Madigan, M. T., Parker, J., & Martinko, J. M. (2003). Microbiología: Biología de los microorganismos (J. M. Martinko, Ed., 10<sup>a</sup> ed.). Pearson Educación.
- Mahmoodi, M., Najafpour, G. D., & Mohammadi, M. (2017). Production of pectinases for quality apple juice through fermentation of orange pomace. *Journal of Food Science and Technology*, 54:12, 54(12), 4123 –4128. <https://doi.org/10.1007/S13197-017-2829-8>
- Marzo, C., Díaz, A. B., Caro, I., & Blandino, A. (2019). Valorization of agro-industrial wastes to produce hydrolytic enzymes by fungal solid-state fermentation. *Waste Management and Research*, 37(2), 149–156. <https://doi.org/10.1177/0734242X18798699>
- MinAgricultura. (2020). Cadena de Pasifloras. Indicadores e instrumentos. Primer trimestre 2020. [https://sioc.minagricultura.gov.co/Pasifloras/Documentos/2018-09-30\\_Cifras\\_Sectoriales.pdf](https://sioc.minagricultura.gov.co/Pasifloras/Documentos/2018-09-30_Cifras_Sectoriales.pdf)
- Mohammadi, Z. B., Zhang, F., Kharazmi, M. S., & Jafari, S. M. (2023). Nano-biocatalysts for food applications; immobilized enzymes within different nanostructures. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(32), 11351–11369. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2092719>
- Neves Junior, A., Mansoldo, F. R. P., Godoy, M. G., Firpo, R. M., Cedrola, S. M. L., & Vermelho, A. B. (2021). Production of an endo-polygalacturonase from *Fusarium proliferatum* isolated from agro-industrial waste. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 38, 102199. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102199>
- Nosalj, S., Šimonovičová, A., & Vojtková, H. (2021). Enzyme production by soilborne fungal strains of *Aspergillus niger* isolated from different localities affected by mining. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 900(1), 012027. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/900/1/012027>
- Osorio, M., & Cando, Y. (2017). Actividad pectinolítica del hongo *Aspergillus* sp aislados a partir de residuos de maracuya (*Passiflora edulis*). [Tesis Pregrado no publicada]. Universidad de Cordoba.
- Ramos Galeano, R. A. (2013). Evaluación de la capacidad pectinolítica de hongos del género *Aspergillus* sp. Aislados de plantas de pomelo (*Citrus grandis*) En el municipio de Moñitos – Cordoba. [Tesis de maestría no publicada]. Universidad de cordoba.
- Saif, F. A., Yaseen, S. A., Alameen, A. S., Mane, S. B., & Undre, P. B. (2021). Identification and characterization of *Aspergillus* species of fruit rot fungi using microscopy, FT-IR, Raman and UV-Vis spectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 246, 119010. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119010>
- Sandri, I. G., & da Silveira, M. M. (2018). Production and application of pectinases from *Aspergillus niger* obtained in solid state cultivation. *Beverages*, 4(3), 48. <https://doi.org/10.3390/beverages4030048>
- Satapathy, S., Rout, J. R., Kerry, R. G., Thatoi, H., & Sahoo, S. L. (2020). Biochemical Prospects of Various Microbial Pectinase and Pectin: An Approachable Concept in Pharmaceutical Bioprocessing. *Frontiers in Nutrition*, 7, 117. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00117>
- Sharma, G., & Vimal, A. (2023). Industrial Processing of Commercially Significant Enzymes. *Recent Innovations in Chemical Engineering*, 16(1), 3–15. <https://doi.org/10.2174/2405520416666230301112734>
- Sharma, V., Tsai, M. L., Nargotra, P., Chen, C. W., Kuo, C. H., Sun, P. P., & Dong, C. Di. (2022). Agro-Industrial Food Waste as a Low-Cost Substrate for Sustainable Production of Industrial Enzymes: A Critical Review. *Catalysts*, 12(11), 1373. <https://doi.org/10.3390/catal12111373>
- Shet, A. R., Muhsinah, A. Bin, Alsayari, A., Achappa, S., Desai, S. V., Mahnashi, M. H., Muddapur, U. M., Shaikh, I. A., Mannasaheb, B. A., & Khan, A. A. (2022). Media Optimization by Response Surface Methodology for the Enhanced Production of Acidic Extracellular Pectinase by the Indigenously Isolated Novel Strain *Aspergillus cervinus* ARS2 Using Solid-State Fermentation. *Fermentation*, 8(10), 485. <https://doi.org/10.3390/fermentation8100485>
- Vaz, R. P., Vici, A. C., Teixeira de Moraes Polizeli, M. de L., Magalhães, P. O., & Filho, E. X. F. (2021). Immobilization studies of a pectinase produced by *Aspergillus terreus*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 68(1), 197–208. <https://doi.org/10.1002/bab.2004>
- Wagh, V., Patel, H., Patel, N., Vamkudoth, K. R., & Ajmera, S. (2022). Pectinase Production by *Aspergillus niger* and its Applications in Fruit Juice Clarification. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 16(4), 2724–2737. <https://doi.org/10.22207/JPAM.16.4.43>

## ANEXOS



Anexos 1. Recolección de muestras

A: trampa con contenido de piña en un cultivo de piña; B: trampa con contenido de maracuyá en cultivo de maracuyá.



Anexo 2. Media del halo de crecimiento para la selección de aislados del género Aspergillus sp.

## Alignments

Aspergillus niveus strain PQJ-1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence  
Sequence ID: [gi|2178227092|OM269036.1](#) Length: 603 Number of Matches: 1  
Range 1: 303 to 403

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
175 bits(193)	1e-39()	98/101(97%)	0/101(0%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 1		AGTGAATCATCGAGTCCTTGAAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCT	60		
Sbjct 303		AGTGAATCATCGAGTCCTTGAAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCT	362		
Query 61		GTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGKKGYT	101		
Sbjct 363		GTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGKKGYT	403		

Penicillium italicum isolate MTCHT137 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence  
Sequence ID: [gi|2178135673|OM267705.1](#) Length: 600 Number of Matches: 1  
Range 1: 260 to 360

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
175 bits(193)	1e-39()	98/101(97%)	0/101(0%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 1		AGTGAATCATCGAGTCCTTGAAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCT	60		
Sbjct 260		AGTGAATCATCGAGTCCTTGAAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCT	319		
Query 61		GTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGKKGYT	101		
Sbjct 320		GTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGKKGYT	360		

Penicillium digitatum isolate MTCHT135 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence  
Sequence ID: [gi|2178135670|OM267702.1](#) Length: 490 Number of Matches: 1  
Range 1: 274 to 374

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
175 bits(193)	1e-39()	98/101(97%)	0/101(0%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 1		AGTGAATCATCGAGTCCTTGAAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCT	60		
Sbjct 274		AGTGAATCATCGAGTCCTTGAAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCT	333		
Query 61		GTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGKKGYT	101		
Sbjct 334		GTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGKKGYT	374		

Aspergillus awamori isolate Manjari Medika (MM1) small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence  
Sequence ID: [gi|2178105909|OM265281.1](#) Length: 635 Number of Matches: 1  
Range 1: 335 to 435

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
175 bits(193)	1e-39()	98/101(97%)	0/101(0%)	Plus/Plus	

Anexo 3. Aspergillus sp. isolate GRUBIODEQ M6P21 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence.

Features:

Query 1	AGTGAATCATCGAGTCCTTGAAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCT	68
Sbjct 335	AGTGAATCATCGAGTCCTTGAAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCT	394
Query 61	GTCGGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCGGCTTGKKGKGYT	101
Sbjct 395	GTCGGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCGGCTTGKKGKGYT	435

Penicillium crustosum strain CIMO 19TL618 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

Sequence ID: **gi|2177707194|OM258237.1** Length: 339 Number of Matches: 1  
Range 1: 188 to 288

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
175 bits(193)	1e-39()	98/101(97%)	0/101(0%)	Plus/Plus	

Features:

Query 1	AGTGAATCATCGAGTCCTTGAAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCT	68
Sbjct 188	AGTGAATCATCGAGTCCTTGAAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCT	247
Query 61	GTCGGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCGGCTTGKKGKGYT	101
Sbjct 248	GTCGGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCGGCTTGKKGKGYT	288

BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine



[Support center](#) [Mailing list](#) [YouTube](#)



[National Library Of Medicine](#)



[National Institutes Of Health](#)



[U.S. Department of Health & Human Services](#)



[USA.gov](#)

**NCBI**

[National Center for Biotechnology Information](#), [U.S. National Library of Medicine](#) 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA  
[Policies and Guidelines](#) | [Contact](#)

## COVID-19 Information

[Public health information \(CDC\)](#)

[Research information \(NIH\)](#)

[SARS-CoV-2 data \(NCBI\)](#)

[Prevention and treatment information \(HHS\)](#)

[Español](#)

Continuación Anexo 3. Aspergillus sp. isolate GRUBIODEQ M6P21 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence.

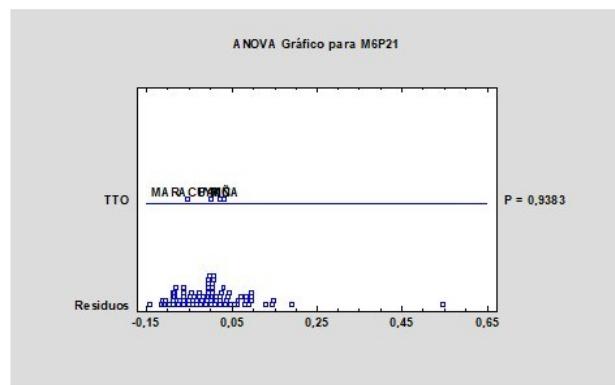


Tabla ANOVA para M6P21 por TTO

Fuente	Suma de Cuadrados	G.I.	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,00358634	3	0,00119545	0,14	0,9383
Intra grupos	0,668231	76	0,00879251		
Total (Corr.)	0,671817	79			

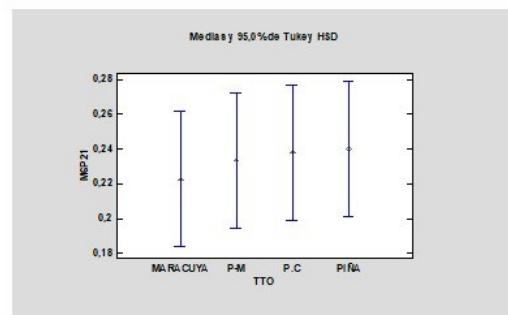


Tabla de Medias para M6P21 por TTO con intervalos de confianza del 95,0%

TTO	Casos	Media	Error Est. (agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior
MARACUYA	20	0,222542	0,0209672	0,183597	0,261487
P-M	20	0,233579	0,0209672	0,194633	0,272524
P.C	20	0,238072	0,0209672	0,199127	0,277018
PIÑA	20	0,239691	0,0209672	0,200746	0,278636
Total	80	0,233471			

Pruebas de Múltiple Rangos para M6P21 por TTO

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

TTO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
MARACUYA	20	0,222542	X
P-M	20	0,233579	X
P.C	20	0,238072	X
PIÑA	20	0,239691	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
MARACUYA - P-M	-0,0110365	0,0778904	
MARACUYA - P.C	-0,0155305	0,0778904	
MARACUYA - PIÑA	-0,017149	0,0778904	
P-M - P.C	-0,004494	0,0778904	
P-M - PIÑA	-0,0061125	0,0778904	
P.C - PIÑA	-0,0016185	0,0778904	

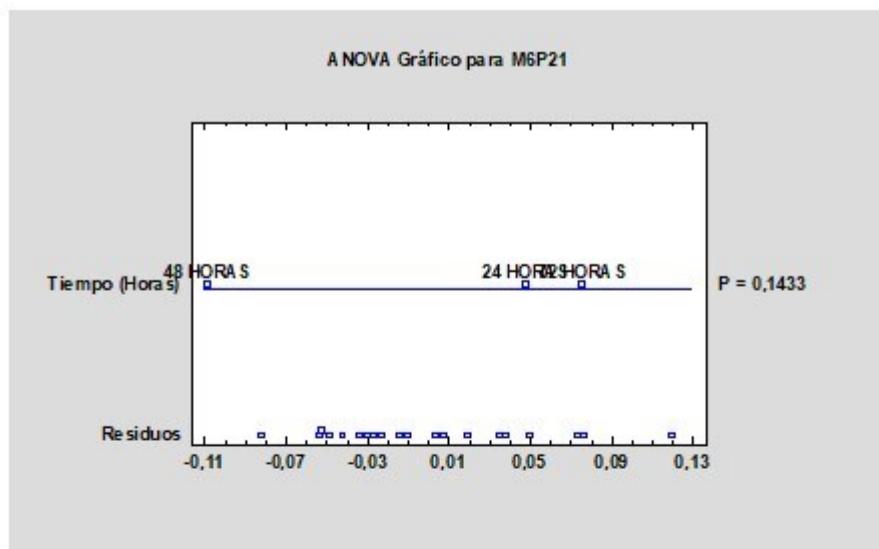
\* indica una diferencia significativa.

intervalos de confianza del 95,0%

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
MARACUYA - P-M	3,525	19,3872	
MARACUYA - P.C	-4,075	19,3872	
MARACUYA - PIÑA	-6,25	19,3872	
P-M - P.C	-7,6	19,3872	
P-M - PIÑA	-9,775	19,3872	
P.C - PIÑA	-2,175	19,3872	

\* indica una diferencia significativa.

Anexo 4. Análisis estadístico de la actividad pectinolítica M6P21 por Tiempo (tratamiento 1, T1).



Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0131791	2	0,00658955	2,18	0,1433
Intra grupos	0,0513307	17	0,00301945		
Total (Corr.)	0,0645097	19			

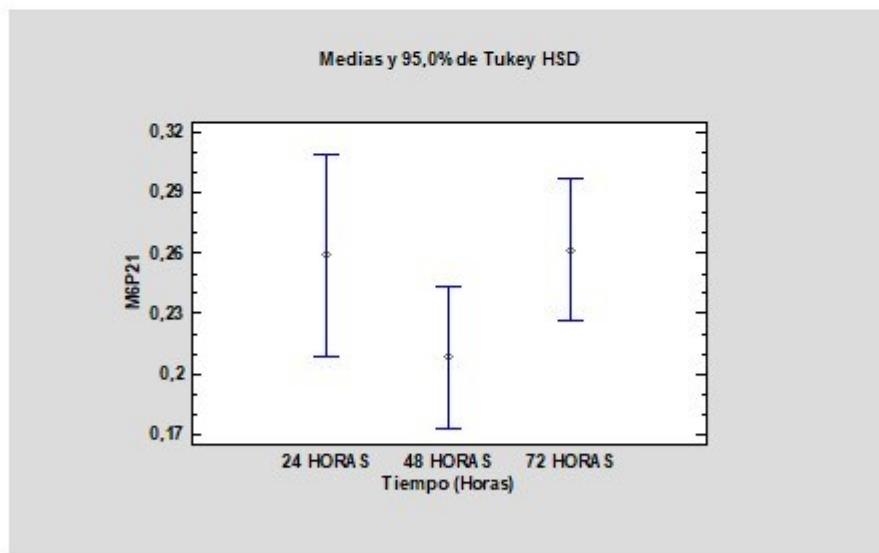


Tabla de Medias para M6P21 por Tiempo (Horas) con intervalos de confianza del 95,0%

Tiempo (Horas)	Casos	Media	Error Est. ( $s_{\text{agrupada}}$ )	Límite Inferior	Límite Superior
24 HORAS	4	0,259153	0,0274748	0,209288	0,309017
48 HORAS	8	0,208267	0,0194276	0,173008	0,243527
72 HORAS	8	0,261384	0,0194276	0,226125	0,296643
Total	20	0,239691			

Los casos serían las repeticiones en cada tiempo

Anexo 4 A. Análisis estadístico de la actividad pectinolítica M6P21 por Tiempo (tratamiento 1, T1)