

## Cinética de crecimiento de *Fusarium oxysporum* cultivado en diferentes niveles de glucosa y pectina

### Kinetic growth of *Fusarium oxysporum* cultured on different glucose and pectin levels

Gabriela Macías de la Cerda<sup>1</sup>, Fabiola Veana<sup>1</sup>, Juan Carlos Contreras Esquivel<sup>1</sup>, Cristóbal Noé Aguilar<sup>1</sup>, Raúl Rodríguez Herrera<sup>1\*</sup>

Macías de la Cerda, G., Veana, F., Contreras Esquivel, J. C., Aguilar, C. N., Rodríguez Herrera, R. Cinética de crecimiento de *Fusarium oxysporum* cultivado en diferentes niveles de glucosa y pectina. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. Número 67: 33-37, enero-abril 2016.

#### RESUMEN

La pectina y enzimas pécticas son esenciales en la industria alimentaria, principalmente en la industria del jugo, confitería y panadería. Diversas especies de hongos son capaces de producir pectinasas con la finalidad de degradar la pectina para sobrevivir y crecer. En el presente estudio se evaluó la velocidad de invasión de *Fusarium oxysporum*. La glucosa, pectina e hidrolizados de pectina (con diferentes grados de depolimerización) se emplearon como sustratos. Los resultados obtenidos sugieren que las bajas concentraciones de sustrato promueven una mayor velocidad de invasión de hongos, mientras que, en virtud de las altas concentraciones de sustrato, esta es menor. El control del fenómeno de represión catabólica a través de la definición de las concentraciones de ambos sustratos es esencial para la producción de pectinasas bajo fermentaciones de estado sólido y el incremento de aplicaciones biotecnológicas de estas enzimas.

**Palabras clave:** depolimerización, *F. oxysporum*, glucosa, enzimas pécticas, pectina, velocidad de invasión.

**Keywords:** depolymerization, *F. oxysporum*, glucose, pectic enzymes, pectin, invasion rate.

Recibido: 1 de agosto de 2014, aceptado: 4 de septiembre de 2015

<sup>1</sup> Departamento de Investigación en Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila.

\* Autor para correspondencia: raul.rodriguez@uadec.edu.mx

#### ABSTRACT

Pectin and pectic enzymes are essential in the food industry, mainly in the juice industry, confectionary and bakery. Diverse fungal species are able to produce pectinases in order to degrade pectin for surviving and growth. In the present study, radial growth rate of *Fusarium oxysporum* was evaluated. Glucose, pectin and pectin hydrolysates (with different degrees of depolymerization) were employed as substrates. Obtained results suggest that low substrate concentrations promoted a higher invasion rate, whereas, under high substrate concentrations it was lower. Control of the phenomenon of catabolic repression through definition of initial concentrations of both substrates, is essential for pectinases production under solid state fermentations and to increase biotechnology applications of these enzymes.

#### INTRODUCCIÓN

La pectina es una amplia mezcla de sustancias pécticas cuyo principal componente es el ácido poligalacturónico y están involucradas en la textura y maduración de los frutos, en el crecimiento e interacciones entre la planta huésped y sus patógenos (Sánchez Aldana Villarruel et al., 2011; Rangel Rodríguez et al., 2014). Una amplia variedad de enzimas pécticas catalizan la degradación de polisacáridos pécticos a través de reacciones de depolimerización (hidrolasas y liasas) y esterificación (esterasas) (Kant et al., 2014). La aplicación de las

enzimas pécticas se lleva a cabo en las industrias farmacéutica, textil y alimentaria. En esta última las enzimas pécticas se utilizan en la clarificación, filtración y eliminación de partículas para evitar la turbidez en los zumos de frutas, bebidas frutales y vino. Además, la pectina se utiliza como un agente gelificante, espesante, emulsionante y estabilizador en el proceso de obtención de mermeladas y jaleas (Arellano Barragán et al., 2014).

La mayoría de las preparaciones de enzimas pécticas se producen por fuentes fúngicas. Existen reportes de síntesis de pectinasas como endo y exopoligalacturonasa, poligalacturonasa y pectinesterasa por *Fusarium oxysporum* y *F. verticillioides* (Niture et al., 2008; Wu et al., 2008, Andre Leroux et al., 2009; Benedetti et al., 2013).

Actualmente, la fermentación en estado sólido ha mostrado mejores rendimientos enzimáticos e incluso la revalorización de residuos agroindustriales (Martins et al., 2011). Por esta razón, es necesario conocer la velocidad de crecimiento radial y longitudinal como un método para evaluar la capacidad de los hongos de invadir y adaptarse a los nutrientes del sustrato, como estudio previo de este tipo de fermentación (Gutiérrez Sánchez et al., 1999).

A través del análisis del crecimiento microbiano, Monod (1949) estableció una ecuación, donde es posible conocer la tasa específica de crecimiento y afinidad por el sustrato. Solo existe el reporte de la velocidad de crecimiento radial de *F. oxysporum* sobre medio de sales minerales adicionado con glucosa (10 g/l) (Suárez Segundo et al., 2013). Considerando la variedad de aplicaciones de las enzimas pécticas, este documento describe la influencia de la concentración de sustrato (glucosa y pectina) y el efecto del grado de depolimerización de pectina sobre la capacidad invasiva de *F. oxysporum*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismo

La cepa de *F. oxysporum* se aisló de una planta de chile (*Capsicum annuum* L.) y fue proporcionada por el Centro Internacional de Servicios Fitosanitarios, S. A. de C. V. (CISEF, Saltillo, Coahuila, México). El hongo *F. oxysporum* se cultivó en medio PDA durante cinco a siete días a 30 °C. A continuación, las esporas se cosecharon con Tween 80 0.1% y se realizó un conteo en la cámara de Neubauer.

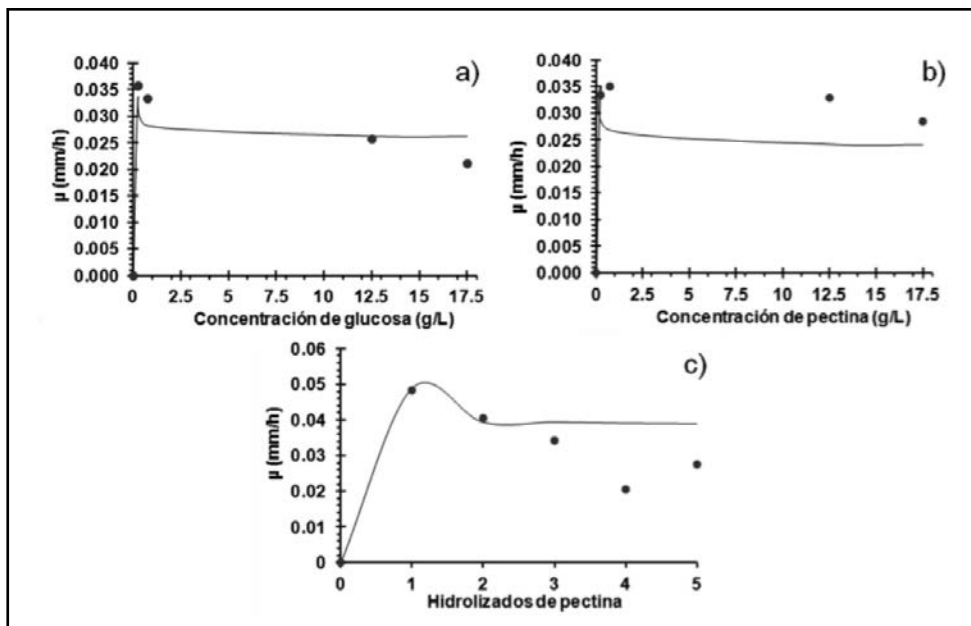
### Medios de cultivo

Se empleó el medio de cultivo como describen Di Prieto y Roncero (1996). La glucosa, pectina y la pectina depolimerizada (hidrolizados de pectina) se utilizaron como fuente de carbono. Los hidrolizados de pectina fueron proporcionados por Coyote Foods Biopolymers and Biotechnology, S. de R. L., cuyo tratamiento se realizó a altas temperaturas y baja presión (autoclave) y se identificaron como P1, P2, P3, P4 y P5 con 0 (control), 5, 10, 20 y 30 min de esterilización en autoclave, respectivamente. A dichos hidrolizados de pectina se les determinaron las concentraciones de azúcares reductores por el método de Somogy-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1952). Se utilizó el medio de cultivo descrito previamente (Di Pietro y Roncero 1996), solo se sustituyó la fuente de carbono por los sustratos antes mencionados. Las cajas Petri con las diferentes variaciones del medio de cultivo fueron inoculadas con 10  $\mu$ l de la suspensión de esporas ( $2 \times 10^7$  esporas/ml). El inóculo se colocó en el centro de las cajas Petri, sobre un pozo hecho previamente. Las cajas Petri se incubaron a 30 °C durante 72 h. El crecimiento radial se monitoreó cada 12 h.

### Análisis estadístico

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial  $2^4$ . Se evaluaron dos factores: sustrato con dos niveles (glucosa y pectina) y concentración con cuatro niveles (0.25, 0.75, 12.5 y 17.5 g/l). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Cuando fue necesario las medias de los tratamientos se compararon utilizando la prueba de rango múltiple de Tukey con una significancia al 0.05%.

Los valores de velocidad de invasión se obtuvieron como la pendiente de la ecuación lineal que se obtiene al graficar el crecimiento radial en función del tiempo y fue definida como  $\mu$ . Se obtuvo el tiempo de duplicación, el cual expresa el tiempo necesario para duplicar 1 mm de crecimiento aparente de micelio. Por último, se realizó un modelo matemático mediante una ecuación que describe una curva de saturación tomando como base la ecuación de Monod (1949) con la herramienta Solver (Microsoft Excel 2007). Finalmente, los datos se evaluaron por medio de un análisis de varianza (ANOVA) para el diseño experimental propuesto en el software SAS ®.



**Figura 1.** Velocidad de invasión de *F. oxysporum* sobre diferentes concentraciones de glucosa (a), pectina (b) e hidrolizados de pectina (c). Las líneas indican los valores teóricos y los puntos los datos experimentales.

**RESULTADOS**

La mayor diferencia de crecimiento de *F. oxysporum* se observó sobre la glucosa y la pectina con concentración de 0.75 g/l (13 mm y 13.7 mm de diámetro, respectivamente). Sin embargo, la velocidad de invasión máxima alcanzada por el hongo fue 0.0358 y 0.035 mm/h mediante la glucosa 0.25 g/l y la pectina 0.75 g/l, respectivamente. Por otro lado, el modelo matemático generó valores de  $\mu$  de 0.0334 y 0.0347 mm/h utilizando la glucosa (Figura 1a) y pectina (Figura 1b) a una concentración de 0.25 g/l, en donde las diferencias son mínimas en comparación con los datos experimentales.

El contenido de azúcares reductores determinados en los hidrolizados de pectina (P1 a P5) fueron los siguientes: 0.513, 3.66, 3.52, 4.52 y 5,22 g/l. El mayor

crecimiento fúngico observado (10.375 mm) se presentó usando el hidrolizado P3 como sustrato. Por otro lado, el comportamiento de  $\mu$  es diferente, el valor más alto  $\mu$  se mostró usando los hidrolizados P1 (0.0483 mm/h) y P2 (0.0405 mm/h) (Figura 1c).

De otra manera, el tiempo de duplicación (Tabla 1) fluctúa entre 19.72 y 33.56 h usando concentraciones de glucosa de 0.25 y 17.5 g/l, respectivamente. Los valores que se obtuvieron usando pectina a 0.25 y 17.5 g/l fueron 20.81 y 24.72 h. Finalmente, en los hidrolizados de pectina se observaron valores en el rango de 15.73-26.62 h.

**DISCUSIÓN**

En el presente estudio se observó que el microorganismo tiene la capacidad de degradar bajas

**Tabla 1.** Efecto de los diferentes sustratos sobre el tiempo de duplicación del crecimiento de *F. oxysporum*

Concentración g/l	Tiempo de duplicación (h)			
	Glucosa	Pectina	Hidrolizados de pectina	
-	-	-	P1	15.73 ± 6.24
0.25	19.72 ± 3.14	20.81 ± 1.43	P2	17.16 ± 1.15
0.75	21.85 ± 5.71	20.01 ± 2.53	P3	20.91 ± 4.53
12.5	27.01 ± 2.11	21.10 ± 1.11	P4	34.08 ± 3.79
17.5	34.56 ± 8.86	24.72 ± 3.91	P5	26.6 2± 6.92

concentraciones de sustrato a una alta velocidad; mientras que el incremento del sustrato inhibe la síntesis microbiana de muchas enzimas que requieren de un inductor, fenómeno conocido como represión catabólica (Viniestra González y Favela Torres, 2006). El modelo matemático de saturación mostró valores similares comparados con los valores experimentales, debido a que la concentración de sustrato es mayor que el valor de  $K_s$  (Izquierdo et al., 2004).

Según lo estudiado por los autores del presente documento, existe poca información sobre la velocidad de invasión de *F. oxysporum*. Suárez Segundo et al. (2013) reportaron un valor de 90 mm/día, creciendo en cultivo de sales minerales, adicionado con glucosa (10 g/l) e incubando a 25 °C. Sin embargo, Orzúa et al. (2009) estudió el efecto de las concentraciones de glucosa añadida a los residuos agroindustriales sobre el crecimiento de *Aspergillus niger* Aa-20. Las concentraciones de glucosa fueron 12.5, 25, 50 y 100 g/l. El incremento en la adición de glucosa fue desfavorable, debido a que anteriormente Orzúa (2003) demostró que sin la adición de glucosa, el microorganismo crece más rápido y con mayor extensión sobre medio sólido. En este caso se concluyó que la glucosa inhibe el crecimiento de *A. niger* Aa-20.

De los hidrolizados de pectina, el marcado como P1 (control) registró el valor más alto  $\mu$ , lo cual se puede atribuir a que en la depolimerización de pectina se pueden liberar moléculas de ácido galacturónico (Mejía Giraldo et al., 2007), lo cuales provocan una represión catabólica cuando se utiliza P2, cuyo contenido de azúcares reductores es más alto comparado con el hidrolizado P1 (Orzúa, 2003). Los valores P1 y P2 se ajustaron al modelo matemático y de acuerdo con la prueba de Tukey, no hay diferencias significativas entre estos sustratos. En los tres experimentos se presentan valores bajos de  $K_s$ , que indican una alta afinidad de *F. oxysporum* por el sustrato.

Por último se evaluó el tiempo de duplicación. Este parámetro indica la velocidad con la que un microorganismo crece, pero con relación inversa. Si se incrementa el tiempo de duplicación, el valor



**Figura 2.** Crecimiento fúngico de *F. oxysporum*. Imagen tomada de <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/f9/K7725-1-sm.jpg/250px-K7725-1-sm.jpg>

de  $\mu$  se reduce (Larcher et al., 2008). Esta relación es claramente observable: en bajas concentraciones de glucosa, pectina e hidrolizados de pectina, menor tiempo de duplicación y valores altos de  $\mu$ .

## CONCLUSIONES

A través del desarrollo del presente estudio se puede concluir que las altas concentraciones de sustrato (glucosa o pectina) y alto grado de depolimerización de pectina influyen negativamente sobre la velocidad de invasión de *F. oxysporum*, por lo que la concentración de 0.25 g/l de glucosa y pectina es favorable y podría ser usada en fermentación en estado sólido. Este nivel de concentración se traduce en el ahorro de costos para la producción de enzimas péclicas bajo dicho sistema de fermentación.

### Agradecimientos

El presente estudio fue financiado por la Universidad Autónoma de Coahuila. G. M. C y F. V. H. desean agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México por el apoyo económico para la realización de sus estudios de posgrado.

## LITERATURA CITADA

- BARRAGÁN, J. C. A. et al. Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad y estabilidad de pectinasas producidas por *Bacillus* spp. *Revista de Investigación Científica (REBIOL)*, 34(1): 33-41, 2014.
  - DI PIETRO, A. y RONCERO, M. I. G. Purification and characterization of an exo-polygalacturonase from the tomato vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *FEMS Microbiology Letters*, 145(2): 295-299, 1996.
  - GUTIÉRREZ SÁNCHEZ, G. et al. Comparación de dos métodos para la selección de cepas para su uso en fermentación en medio sólido: Crecimiento radial y longitudinal. *Memorias VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*, p. 104, 1999.
  - IZQUIERDO, J. F. et al. *Cinética de las reacciones químicas. Metodología Series: 16*. Barcelona, España: Edicions Universitat de Barcelona, p. 288, 2004.
  - LARCHER, L. I. et al. Simulación de crecimiento de microorganismos bajo distintas condiciones de movilidad. *Mecánica Computacional*, XXVII, 3381-3395, 2008.
  - MEJÍA GIRALDO, L. F. et al. Aprovechamiento del residuo agroindustrial del mango común (*Mangifera indica* L.) en la obtención de azúcares fermentables. *Ingeniería y Ciencia*, 3(6): 41-62, 2007.
  - NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 153, 375-380, 1944.
  - NITURE, S. K. et al. Inactivation of polygalacturonase and pectate lyase produced by pH tolerant fungus *Fusarium moniliforme* NCIM 1276 in a liquid medium and in the host tissue. *Microbiological Research*, 163(1): 51-62, 2008.
  - ORZÚA, G. *Aprovechamiento de residuos agroindustriales como soporte de crecimiento fúngico para la fermentación en medio sólido*. Tesis de licenciatura. Saltillo, Coahuila, México: Universidad Autónoma de Coahuila, 2003.
  - SÁNCHEZ ALDANA VILLARRUEL, D. et al. Moléculas pécticas: extracción y su potencial aplicación como empaque. *Tecnociencia*, V(2): 76-82, 2011.
  - SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, 195(1): 19-23, 1952.
  - SUÁREZ-SEGUNDO, J. L. et al. Growth of colonies and hyphal ultrastructure of filamentous fungi grown on dibutyl phthalate and di (2-ethylhexyl) phthalate. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(3): 499-504, 2013.
  - VINIEGRA GONZÁLEZ, G. y FAVELA TORRES, E. Why Solid State Fermentation Seems to be Resistant to Catabolite Repression? *Food Technology and Biotechnology*, 44(3): 397-406, 2006.
- De páginas electrónicas**
- ANDRE LEROUX, G. et al. Endopolygalacturonases reveal molecular features for processivity pattern and tolerance towards acetylated pectin. *Biochimica et. Biophysica Acta*, 1794(1): 5-13, 2009. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.09.004.
  - BENEDETTI, M. et al. A single amino-acid substitution allows endo-polygalacturonase of *Fusarium verticillioides* to acquire recognition by PGP2 from *Phaseolus vulgaris*. *PLoS ONE*, 8(11): e80610, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0080610.
  - KANT, S. et al. Purification and physicochemical properties of polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 3323. *Protein Expression and Purification*, 87(1): 11-16, 2014. doi: 10.1016/j.pep.2012.09.014.
  - MARTINS, S. et al. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, 29(3): 365-373, 2011. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.01.008.
  - MONOD, J. The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, 3, 371-394, 1949. doi:10.1146/annurev.mi.03.100149.002103.
  - ORZÚA, M. C. et al. Exploitation of agro industrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products*, 30(1): 24-27, 2009. doi: 10.1016/j.indcrop.2009.02.001.
  - RANGEL RODRÍGUEZ, A. M. et al. Immobilization of Pectinesterase in Genipin-Crosslinked Chitosan Membrane for Low Methoxyl Pectin Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(8): 2941-2950, 2014. doi: 10.1007/s12010-014-1238-y.
  - WU, H. S. et al. Cinnamic acid inhibits growth but stimulates production of pathogenesis factors by in vitro cultures of *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4): 1316-1321, 2008. doi: 10.1021/jf0726482.