

Metabolitos producidos por el hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii*

✉ Eulalia Gómez Santiesteban, Rosa M Álvarez Fontela, Reynaldo Fraga Vidal, Irene Reyes Fernández, Joel Hernández Barrios, Teresita Lemes Rodríguez, Ana N San Juan Rodríguez

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA-CUBA-10)
Vía Blanca 804 y Carretera Central, PO Box 4026, Ciudad de La Habana, Cuba
Fax: (537) 338236; E-mail: cuba10@quivican.esihabana.cu

RESUMEN

En el presente trabajo se muestra la caracterización química de un producto obtenido a partir de los efluentes de la fermentación del hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii*. Los experimentos se llevaron a cabo en un fermentador de 500 litros utilizando un medio compuesto por miel final de caña y fosfato dibásico de amonio. Los sobrenadantes obtenidos por centrifugación fueron concentrados en un evaporador al vacío y secados en un secador por aspersion en presencia de sulfato de amonio (10%). El producto obtenido tiene una humedad de 5% y una actividad proteolítica de 3.32 mg/g, siendo estable en el tiempo hasta 1 año a temperatura ambiente. Los resultados mostraron que a partir de la hora 16 de fermentación los caldos libres de células presentan actividad proteolítica, lipolítica y antimicrobiana, incrementándose el diámetro del halo de hidrólisis e inhibición respectivamente a medida que transcurre el tiempo de fermentación. La caracterización química del producto por electroforesis en geles de poliacrilamida mostró que las enzimas proteolíticas se encuentran en un rango de 43 a 68 kDa, así como otros compuestos polipeptídicos con propiedades antibióticas y un amplio perfil de ácidos fenólicos.

Palabras claves: metabolitos, *Verticillium lecanii*, proteasas

Biotecnología Aplicada 2004;21:92-95

ABSTRACT

Metabolites produced by the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. The present paper shows the chemical characterization of a product obtained from the fermentation residues of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. Experiments were carried out using a 500 L fermentor with a simple medium composed of sugar cane molasses and di-ammonium phosphate. The supernatants obtained by centrifugation were concentrated in a vacuum evaporator and dried in a spray dryer with 10% ammonium sulphate. The dry powder obtained had 5% humidity with a proteolytic activity of 3.32 mg/g, it was stable for time up to 1 year at room temperature. The results showed that after 16 hours of fermentation the cell-free broths showed proteolytic, lipolytic and antimicrobial activity and the development of degradation or inhibition zones were higher when the fermentation time was increased. Chemical characterization of the product by SDS-PAGE showed that the proteolytic enzymes were in a range of 43 to 68 kDa. On the other hand, other polypeptidic compounds with antibiotic activities and a wide spectrum of phenolic acids were in the dry powder obtained from this fungus.

Key words: metabolites, *Verticillium lecanii*, proteases

Introducción

Los estudios realizados de los efluentes de la fermentación en cultivo líquido del hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii*, han demostrado la producción de enzimas con actividad amilolítica, quitinolítica, lipolítica, proteolítica, corroborándose esta última mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes [1, 2].

Por otro lado, otros autores han reportado que este hongo segrega una sustancia dañina a los huevos de nemátodos del género *Meloidogyne*, por lo que presenta potencialidades promisorias para su empleo como controlador de nemátodos [3-8].

Den Belder (1994) y Bonants (1995) reportaron la purificación y caracterización de las proteasas extracelulares de los filtrados del hongo *P. lilacinus* crecido en diferentes medios, encontraron que tienen una proteasa con una masa molecular de 33.5 kDa, un pH óptimo de 10.3, una temperatura óptima de 60 °C y un punto isoeléctrico por encima de 10.2, demostraron además que las mismas estaban involucradas en el ataque de este hongo a los huevos de los nemátodos. El

análisis de secuencia de aminoácidos mostró que son altamente homólogas a las proteasas subtilisinas, las cuales son proteasas tipo serina, y demostraron que degradan la cubierta de los huevos de los nemátodos y que por tanto tienen actividad nematocida [9, 10]. Resultados similares obtuvimos nosotros empleando un crudo enzimático en polvo a partir de los efluentes del hongo *Verticillium lecanii* [6].

Varios autores han reportado la presencia de sustancias antibióticas de naturaleza peptídica en los efluentes de diferentes hongos; los mismos mostraron por análisis de HPLC y RMN que el *P. lilacinus* excreta en condiciones alcalinas una sustancia tóxica denominada Paecilotoxina [11, 12]. De igual manera, López-Llorca (1993) reporta la producción de antibióticos en diferentes especies del género *Verticillium* [3]. Soman (2001) plantea el aislamiento de cinco nuevos compuestos fenólicos obtenidos de la fermentación sólida de *V. lecanii*, siendo el componente mayoritario el Vertilecanin A efectivo contra *Helicoverpa zea* [13].

1. Saksirirat W, Hoppe HH. Secretion of Extracellular Enzymes by *Verticillium psalliotae* Treschow and *Verticillium lecanii* (Zeium) viegas during growth on ureospores of the Soybean Rust Fungus (*Phakopsora pachirhizi* syb.) in liquid cultures. *J. Phytopathology* 1991;131: 161-73.

2. Shimizu S, Tsuchitani Y, Matsumoto T. Production of an extracellular protease by *B. bassiana* in the haemolymph of the silkworm, *Bombyx Mori*. *Letters in Applied Microbiology* 1993;16:291-4.

3. López-Llorca M, Boag B. Biological properties of a red pigment produced by the nematophagous fungus *Verticillium sucha-lasporium*. *Nematol. Medit.* 1993; 21:143-9.

4. López-Llorca M, Carbonel T. Characterization of Spanish strains of *Verticillium lecanii*. *Rev Iberoam. Micol.* 1999;16: 136-42.

El objetivo del presente trabajo ha sido la caracterización química de un producto obtenido a partir de los efluentes de la producción del hongo *Verticillium lecanii* en cultivo sumergido.

Materiales y métodos

Microorganismo

Para las experiencias se empleó el hongo *Verticillium lecanii*, número de colección 3166, suministrado por el Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales de Agricultura Tropical (Cuba), mantenido en cuñas de agar-papa-dextrosa a una temperatura de 28 °C.

Producción del hongo a escala piloto

Las experiencias se realizaron en un fermentador de 500 L de capacidad (200 L de volumen efectivo), empleando un medio compuesto por miel final de caña 3.0% y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.8%. Las condiciones de operación fueron: 30 °C, 0.5 v.v.m y agitación variable (170 al inicio y 220 rpm después del segundo incremento), y una densidad de inóculo del 10% obtenida en un fermentador de 25 litros (20 L de volumen efectivo). Se empleó un sistema lote incrementado, con dos adiciones de miel a concentración de 2.5%. Para este estudio se evaluaron los resultados de 5 fermentaciones.

Producción del producto en polvo

La biomasa fue separada por centrifugación y los efluentes fueron concentrados en un evaporador al vacío a una temperatura entre 45 y 55 °C. Al concentrado se le añadió sulfato de amonio a la concentración de 10% y se secó en un secador por aspersión a una temperatura de entrada de 120 °C y de salida de 70 °C.

El formulado fue envasado en sobres de nailon y almacenados a temperatura ambiente (30 °C). La estabilidad del producto se determinó a los siguientes tiempos: 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 meses, tomando en cada caso dos sobres sellados y realizándose los siguientes análisis: actividad proteolítica y masa seca gravimétrica.

Análisis microbiológicos a los efluentes de las fermentaciones

Actividad proteolítica

Para la determinación se utilizó el método del disco de papel (7 mm de diámetro). Los caldos libres de células fueron añadidos a placas Petri conteniendo agar nutritivo y gelatina, a los +2 días de edad se reveló la presencia de actividad enzimática [1].

Actividad lipolítica

Para la determinación se utilizó el método del disco de papel (7 mm de diámetro). Los caldos libres de células fueron añadidos a placas Petri conteniendo agar-papa-dextrosa y Tween 20, a los +2 días de edad se reveló la presencia de actividad enzimática [1].

Actividad antimicrobiana

Para la determinación se utilizó el método del disco de papel (7 mm de diámetro), con el *Bacillus subtilis* (Ehrenber) Cohn B/23-45-9. ATCC 6633, como

organismo de prueba. Los caldos libres de células (5 mL) se extraen con 2.5 mL de acetato de etilo, a las 24 horas se reveló la presencia de actividad por la aparición de un halo de inhibición [12].

Determinaciones analíticas realizadas al producto seco en polvo

Actividad proteolítica

Se determinó por el método de Anson modificado, donde la unidad de actividad se define como la cantidad de enzima necesaria para producir en un minuto a 37 °C, 1 μmol de tirosina, siendo expresada en $\mu\text{mol}/\text{mL}$ [14].

Electroforesis en geles de poli(acrilamida) y zimograma

Para el análisis electroforético de las muestras se empleó el producto en polvo de *V. lecanii* y *P. fumosorroseus* (control+) al 20%, resuspendidas en buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 6.8; dializadas contra 5 L del propio buffer durante 24 horas. La separación de las proteínas fue llevada a cabo en un sistema de geles discontinuos conteniendo acrilamida al 15% y 0.1% de SDS [15].

Los pesos moleculares fueron determinados con proteínas estándares de referencia (SIGMA). Los zimogramas fueron determinados bajo las mismas condiciones, con la excepción de que el gel contenía gelatina al 0.1%. La actividad proteolítica fue determinada *in situ* por medio de una tinción negativa con amido negro 0.1% en metanol-ácido acético-agua.

Para las determinaciones de ácidos orgánicos y fenólicos se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), equipo KNAUER con detector UV de longitud de onda variable con inyección de 20 μL , columna Hypersil 5 ODS a flujo de 6 mL/min, detector UV 210 nm para ácidos orgánicos y 280 nm para los fenoles [16, 17].

Masa seca gravimétrica (MSG)

Se pesa 0.5 g de polvo en una cápsula previamente tarada y se lleva a peso constante en una estufa a 105 °C.

Resultados y discusión

Para determinar la producción de enzimas extracelulares se analizaron desde el punto de vista microbiológico las muestras obtenidas de tres corridas experimentales. Como puede observarse en la Tabla 1 y Figura 1, los caldos libres de células del hongo muestran actividades a partir de la hora 16 de fermentación, apreciándose una zona clara de inhibición alrededor del disco de papel, lo cual es indicativo de la producción de enzimas proteolíticas y lipolíticas; siendo el diámetro de halo de hidrólisis mayor a medida que transcurre el tiempo de fermentación. Es importante aclarar que mediante el empleo de miel final de caña como medio de cultivo del microorganismo, no se excretan al medio enzimas quitinolíticas. Resultados similares fueron obtenidos por Gómez y cols. (1995), empleando el hongo *Paecilomyces lilacinus*. Varios autores han reportado que estas enzimas proteolíticas están involucradas en el ataque a los huevos de los nemátodos [5-8, 18, 19].

5. Meyer S. Evaluation of *Verticillium lecanii* strains applied in root drenches for suppression of *Meloidogyne incognita* on tomato. Journal of the Helminthological Society of Washington; 1998;65:82-6.

6. Gómez E, Álvarez RM, San Juan AN, Zayas MA, Hernández Y, Lemes T, Croche G, Cruz X. Nematicida a partir del hongo *Verticillium lecanii*. Revista Terralia, Madrid, España; 2001;24:30-1.

7. Den Belder E, Bonants PJ, Fitters PF, Waalwijk C. New alkaline serine protease of *Paecilomyces lilacinus*. Patent WO 94/25579. 1994 Nov 10.

8. Bonants PJ, Fitters PF, Thijs H, Den Belder E, Waalwijk C, Henfling JW. A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. Microbiology 1995;141:775-84.

9. Gómez E, Álvarez RM, Cuadras R, Diaz AO, Pérez I. Actividad nematocida y antimicrobiana de los filtrados del hongo *Paecilomyces lilacinus*. Avances en Biotecnología Moderna 1995;1:11-43.

10. Mikami Y, Yazama K, Fukushima K, Arai T, Udagama S, Samson RA. Paecilotoxin production in clinical or terrestrial isolates of *Paecilomyces lilacinus* strains. Mycopathologia 1989;108:195-9.

11. Isogai A, Nakayama I, Takayama S, Kusai A, Susuki A. Structural Elucidation of Minor Components of Peptidyl Antibiotic P168s (leucocinostatins) by Tandem Mass Spectrometry-Biosci. Biotech. Biochem. 1992;57(7):1079-85.

12. Sato M, Okamoto K, Beppu T. Enhanced production of Antibiotics by *Paecilomyces lilacinus* under alkaline condition associated with morphological change. Agric. Biol. Chem. 1990;55(2):555-62.

13. Soman AG, Gloer JB, Angawi RF, Wicklow DT, Dowd PF. Verticillanins: new phenolicolonic acid analogues from *Verticillium lecanii*. J. Nat. Prod. 2001; 64(2):189-92.

14. Keay L. Production and isolation of microbial protease. Enzyme engineering. Mac. Nillan. 1973;NY:63.

15. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature 1970;227:680-5.

16. Zayas O, Redondo D. Determinación por HPLC de ácidos orgánicos. Revista CNIC 1995;26(72):143.

17. Redondo D, Romero N. Método sencillo de separación y determinación cuantitativa de fenoles mediante una técnica de HPLC. Revista ICIDCA 1999; 33(3).

18. Moñuzca A, Varón F. Identificación y evaluación de algunos organismos fúngicos como posibles agentes biocontroladores de *Meloidogyne* spp. Fitopatología Colombiana 2001; (1):33.

19. Olivares-Bernabue C, López-Llorca LV. Hongos oviparásitos de nemátodos fito-patógenos en suelos españoles. Rev Iberoam Micol. 2002;19:104-10.

Tabla 1. Variación en el tiempo de los valores promedios de la actividad proteolítica, lipolítica y antimicrobiana de los caldos libres de células de tres fermentaciones

Tiempo (h)	Actividad proteolítica (mm) X media *D.S		Actividad lipolítica (mm) X media *D.S		Actividad antimicrobiana (mm) X media *D.S	
H-0	0		0		0	
H-8	0		0		0	
H-12	0		0		0	
H-16	8	0.30	10	1.0	8	1.0
H-20	12.6	0.60	10.8	0.8	14	1.0
H-24	14.4	0.40	11.6	0.55	13.6	0.30
H-32	16.6	0.45	13.6	0.70	14.2	0.40
H-40	17.6	0.0	15.0	0.0	14	0.06
H-48	17.6	0.6	14.4	0.6	13.8	0.43

*D.S=Desviación estándar

Por otro lado, el análisis de actividad antimicrobiana mostró la presencia de compuestos antibióticos en estos efluentes; produciéndose una zona clara de inhibición del crecimiento del microorganismo de prueba. Diversos autores han reportado la producción de sustancias antibióticas a partir de hongos del género *Verticillium sp* denominados Verticilinas [20, 21]. Otros autores plantean la producción de pigmentos rojos por hongos de este mismo género, los cuales han sido caracterizados por cromatografía y espectro de masa, así como por análisis biológico, y evidencian la presencia de compuestos micotóxicos con una fuerte acción antimicótica frente a hongos y bacterias [3, 22].

El producto en polvo obtenido a partir de los efluentes de este hongo presentó las siguientes características: humedad: 4-6%, actividad proteolítica: 3.32 mg/g y es estable a temperatura ambiente durante 1 año (Figura 2); aspecto importante en el almacenamiento del producto. La caracterización del mismo en geles de poliacrilamida mostró que las proteínas extracelulares se encuentran en el rango de 43 a 68 kDa, y el análisis en presencia de gelatina corroboró que las mismas son enzimas proteolíticas como se muestra en el zimograma (Figura 3). Estos resultados son similares a lo reportado por Saksirirat (1991) [1], en la producción de los hongos *V. lecanii* y *V. psalliotae* en medio Czapek-Dox modificado empleando tiempos de fermentación de 7 y 14 días, donde se producen varias enzimas extracelulares (proteasas, lipasas, amilasas y quitinasas), y las proteasas se encuentran en el rango de 45 a 92 kDa.

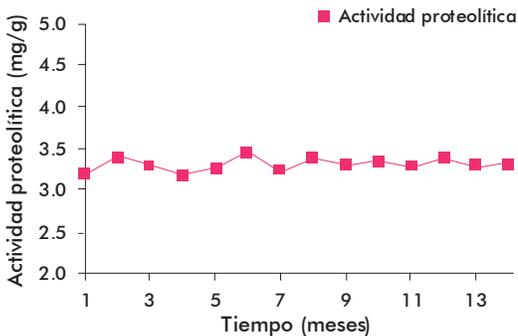


Figura 2. Estabilidad en el tiempo del producto seco en polvo

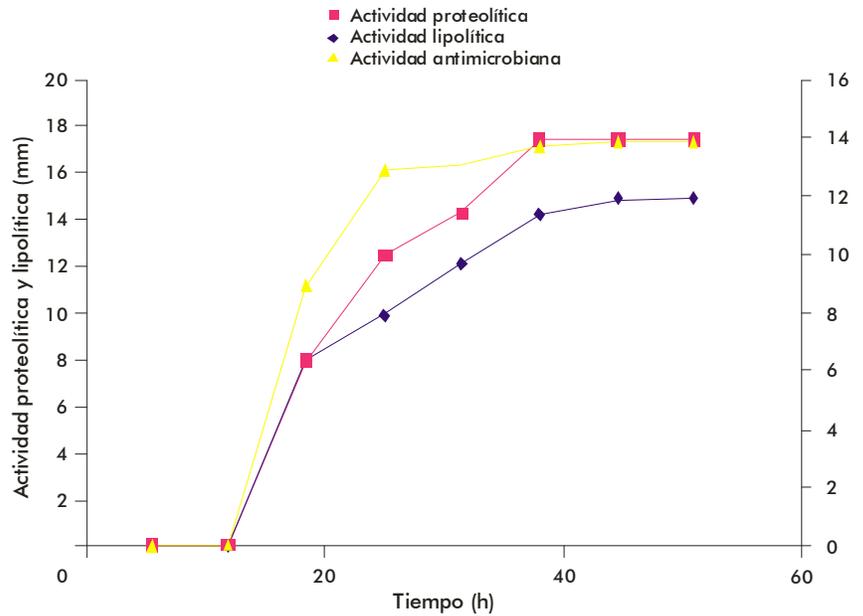


Figura 1. Comportamiento de las actividades proteolítica, lipolítica y antimicrobiana durante la fermentación.

Por otro lado, el producto mostró un amplio perfil de ácidos fenólicos como se observa en la Tabla 2, siendo el compuesto mayoritario el ácido p-hidroxibenzoico, el cual tiene una gran aplicación en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria [23].

20. Minato H. Verticillin A a new antibiotic from *Verticillium sp.* Chem. Comm 1971:44-5.

21. Minato H. Studies on the metabolites of *Verticillium sp.*: structures of verticillins A, B and C. Chem. Comm 1973:1819-25.

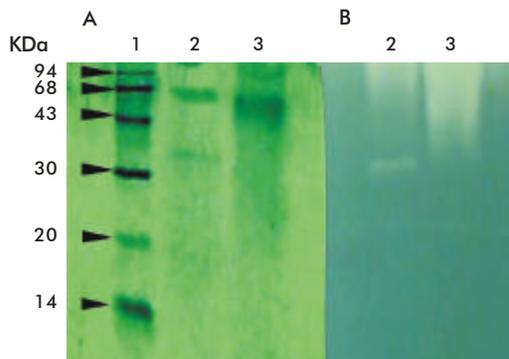


Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (A) y Zimograma (B). (A) Marcador de peso molecular (Línea 1), Proteínas extracelulares de *P. fumosoroseus* (Línea 2 control+), *Verticillium lecanii* (Línea 3). (B) Proteasas extracelulares de *P. fumosoroseus* (Línea 2 control+), *Verticillium lecanii* (Línea 3).

Tabla 2. Composición de ácidos orgánicos y fenólicos del producto seco en polvo

Ácidos orgánicos			
Ácido glicólico		8.1580 mg/mL	
Ácido cítrico		0.2909 mg/mL	
Ácidos fenólicos			
Ác. Gálico	0.842 mg/mL	Furfural	0.006 mg/mL
Ald. Protocateico	0.303 mg/mL	Ác. P-H benz	2.632 mg/mL
Ác. Vainillinico	0.791	Ác. Siringico	0.75 mg/mL
Ác. P-Coumárico	0.153 mg/mL	Ác. Ferúlico	0.249 mg/mL

Conclusiones

Mediante la utilización de un medio simple compuesto por miel de caña como fuente de carbono y fosfato de amonio como fuente de nitrógeno, el hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii* crecido en cultivo sumergido produce metabolitos, entre los cuales se encuentran las proteasas, lipasas y antibióticos.

El producto en polvo obtenido a partir de los efluentes tiene una actividad proteolítica de 3.32 mg/g, una humedad entre 4-6% y es estable a temperatura ambiente hasta 1 año. Por otro lado, la caracterización química del mismo por electroforesis en geles de poliacrilamida mostró que las enzimas proteolíticas se encuentran en el rango de 43 a 68 kDa.

22. Vieira HS, Takahashi JA, Boaventura MA. Novel derivatives of ent-17,19-dihydroxy-16 β H-kaurane obtained by biotransformation with *Verticillium lecanii*. J Agric Food Chem. 2002;19,50(13):3704-7.

23. Larrahondo JE, Preston TR. Control químico de la inversión de jugos de caña de azúcar para la alimentación animal. Livestock Research for Rural Development 1989;1:1.

Recibido en enero de 2003. Aprobado en marzo de 2004.