

# EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS CRUDOS DE EXOPOLISACÁRIDOS OBTENIDOS POR FERMENTACIÓN DE DOS HONGOS ENDÓFITOS

## EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT CAPACITY OF CRUDE EXTRACTS OF EXOPOLYSACCHARIDES OBTAINED BY FERMENTATION OF TWO ENDOPHYTIC FUNGI

Carolina Mahecha\* Jefferson Maldonado\*\* y Nelson H. Caicedo\*\*\*

---

### RESUMEN

Los hongos endófitos han sido descritos como potenciales productores de metabolitos bioactivos, entre los que se encuentran los exopolisacáridos (EPS), compuestos naturales con capacidad antioxidante. La generación de EPS por parte de especies de hongos endófitos depende no sólo de su potencial genético, sino también de las condiciones de cultivo, estrategias de fermentación y composición del medio. En este orden de ideas, el presente estudio se encargó de analizar la producción de EPS a partir de la fermentación de los hongos *D. endophytica* y *F. oxysporum*, pertenecientes al banco de cepas del departamento de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Icesi. Para esto, se evaluó el efecto de la sacarosa y maltosa, como fuentes de carbono con la adición del  $[Mg^{2+}]$  como inductor, en los rendimientos de formación de extractos crudos ricos en EPS, para, posteriormente, determinar la capacidad antioxidante de los mismos usando el método de inactivación del radical DPPH. A partir del análisis de los resultados, se determinó que la sacarosa como fuente de carbono y el inductor  $[Mg^{2+}]$ , beneficiaron la generación de EPS por *F. oxysporum* y su capacidad antioxidante, alcanzando valores de 137,7 mg EPS producidos y 57,9 % de inactivación del radical DPPH. Por otro lado, para la cepa *D. endophytica* fue necesario cambiar el medio de cultivo, utilizando sólo glucosa como sustrato y alternando la adición de  $[Mg^{2+}]$ . Como

---

\* Estudiante de Ingeniería Bioquímica, Universidad Icesi, Cali, Colombia. carito.mahechap@gmail.com

\*\* Estudiante de Ingeniería Bioquímica, Universidad Icesi, Cali, Colombia. jeffermu@hotmail.com

\*\*\* Dr. MSc. Ing. Facultad de Ingeniería, Universidad Icesi, Cali, Colombia. nhcaicedo@icesi.edu.co

resultado, se obtuvo que no hay un efecto significativo del inductor en la producción de EPS ni en la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos, por parte de este hongo. Con relación a lo anterior, se sugiere la realización de un estudio más amplio a cerca del efecto de diversos cofactores en la producción de extractos crudos con actividad antioxidante a partir de la fermentación del hongo *Diaporthe endophytica*.

### **Palabras claves**

Fermentación, fuente de carbono, inductor, hongo endófito, antioxidantes

### **ABSTRACT**

Endophytic fungi have been described as potential producers of bioactive metabolites, among which are exopolysaccharides (EPS), natural compounds with antioxidant capacity. The generation of EPS by endophytic fungal species depends not only on their genetic potential, but also on the culture conditions, fermentation strategies and medium composition. In this order of ideas, the present study analyzed the production of EPS from the fermentation of the fungi *D. endophytica* and *F. oxysporum*, belonging to the strain bank of the Biochemical Engineering Department of the Universidad Icesi. For this purpose, the effect of sucrose and maltose, as carbon sources with the addition of  $[Mg^{2+}]$  as inductor, on the formation yields of crude extracts rich in EPS was evaluated, to subsequently determine their antioxidant capacity using the DPPH radical inactivation method. From the analysis of the results, it was determined that sucrose as a carbon source and the inducer  $[Mg^{2+}]$  benefited the generation of EPS by *F. oxysporum* and its antioxidant capacity, reaching values of 137.7 mg EPS produced and 57.9 % inactivation of the DPPH radical. On the other hand, for the *D. endophytica* strain it was necessary to change the culture medium, using only glucose as substrate and alternating the addition of  $[Mg^{2+}]$ . As a result, it was obtained that there is no significant effect of the inductor on the production of EPS nor on the antioxidant capacity of the extracts obtained by this fungus. In relation to the above, it is suggested that a broader study be carried

out on the effect of different cofactors on the production of crude extracts with antioxidant activity from the fermentation of the fungus *Diaporthe endophytica*.

### **Key words**

Fermentation, carbon source, inducer, endophytic fungus, antioxidants

## **INTRODUCCIÓN**

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son formas parcialmente reducidas o excitadas del oxígeno atmosférico, por ejemplo,  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\bullet}$ ,  $^1O_2$  (Mittler, 2017a). A menudo, funcionan en las células como moléculas de señalización, pero también se consideran subproductos tóxicos inevitables del metabolismo aeróbico y el metabolismo de ácidos grasos. En las células existen diferentes mecanismos antioxidantes para la eliminación de dichos radicales libres; los cuales suceden constantemente para evitar algunos posibles efectos tóxicos, tales como la oxidación y el daño del ADN, el ARN, las proteínas y las membranas. Cuando se presenta un desequilibrio entre la cantidad de radicales libres y compuestos antioxidantes, ocasiona un fenómeno conocido como estrés oxidativo (Chaisuwan, Jantanasakulwong, & Wangtueai, 2020), el cual está asociado a una gran cantidad de afectaciones, enfermedades o procesos degenerativos como: cáncer, arterosclerosis, catarata senil, insuficiencia renal aguda, diabetes mellitus e hipertensión arterial; o relaciones indirectas con afecciones como la formación de tejido adiposo (adipogénesis).

Los agentes antioxidantes son compuestos que tienen la capacidad de disminuir el efecto que causan a corto y largo plazo los radicales libres y, se plantean por lo tanto como una prevención idónea ante el desarrollo de distintas enfermedades. Sin embargo, la mayoría de los antioxidantes utilizados son sintetizados químicamente y se han reportado como sospechosos responsables de daño hepático y carcinogénesis (Yan, 2016). Por ejemplo, el BHT (Hidroxitolueno butilado) y BHA (Hidroxisol butilado) exhiben propiedades antioxidantes deseadas por ser estable durante las condiciones de procesamiento; pero se consideran

carcinogénicos e inductores tóxicos. Todo lo anterior, ha reducido la demanda de estos a pesar de ser baratos (Andrew & Jayaraman, 2020).

Por otro lado, estos compuestos deben cumplir unos requisitos para su uso como ser térmicamente estables, biodegradables, compatibles, no tóxicos y eficaces incluso en baja concentración, con el fin de ser utilizados en una aplicación específica (Andrew & Jayaraman, 2020). En este orden de ideas, los exopolisacáridos (EPS) derivados de diversas fuentes microbianas, especialmente las que existen en condiciones extremas y regiones no marinas, son admisibles en todos los aspectos de elegibilidad, descritos anteriormente, para ser un compuesto antioxidante transitable (Andrew & Jayaraman, 2020).

Con referencia a lo anterior, estudios previos realizados en la Universidad Icesi en Cali, Colombia, demostraron que la cepa *Fusarium oxysporum* (ET-01) sintetizó exopolisacáridos con actividad antioxidante (Caicedo et al., 2019) y, a una baja tasa de transferencia de oxígeno se favoreció la formación de EPS por fermentación de esta cepa en cultivo sumergido (Henaó y Caicedo, 2019). También, se ha estudiado el efecto de inductores en la producción de EPS por el hongo *F. oxysporum*, encontrando que la actividad antioxidante de los extractos obtenidos se beneficia por la adición de  $[Mg^{2+}]$  a una concentración 2mM en la fermentación (Giraldo & Gil, 2020). Por otra parte, se ha demostrado que los polisacáridos fúngicos presentan capacidad antitumoral, inmunológica, antiinflamatoria y antioxidante y en este sentido, se ha extendido su estudio para descubrir nuevas propiedades relevantes. Tal es el caso de lo logrado por (Charria, Espinosa, Zapata, Méndez, Caicedo y Caicedo, 2021) en su investigación en la Universidad Icesi, donde los extractos crudos provenientes de *D. endophytica* mostraron potencial actividad antimicrobiana; aumentando el interés por el estudio de las capacidades que puedan poseer estos extractos.

En efecto, tomando en consideración el potencial mostrado por los extractos generados por *D. endophytica* y *F. oxysporum* en la universidad Icesi y la importancia de la formulación del medio dentro de la síntesis de exopolisacáridos

bioactivos; el objetivo de la presente investigación fue analizar la producción de extractos crudos EPS con capacidad antioxidante a partir de la fermentación de estos dos hongos endófitos. Para lo anterior, el estudio se enfocó en la evaluación del efecto de la fuente de carbono en combinación con el inductor  $[Mg^{2+}]$  a la concentración de 2mM.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Microorganismos**

Dos cepas nativas de hongos endófitos *Diaporthe endophytica* (ET-028) y *Fusarium oxysporum* (ET-01), del cepario del departamento de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Icesi, fueron empleadas para este estudio. Las cepas se encontraban previamente conservadas en el cepario de hongos del departamento de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Icesi en solución de glicerol al 20% (v/v) y una temperatura de -20°C.

### **Cultivo de las cepas fúngicas para producción de exopolisacáridos**

El proceso de desarrollo de inóculo inició con la incubación de las cepas *Fusarium oxysporum* y *Diaporthe endophytica* en cajas de Petri que contenían medio papa dextrosa (PDA, Merck®) a 32°C, pH 6.0 y 6.3, respectivamente, durante 7 días. Pasado este tiempo, dado que a las condiciones mencionadas la cepa *Fusarium oxysporum* produce esporas, estas fueron separadas y añadidas a una solución Tween 80 al 0,05% (v/v) y se determinó una concentración de inóculo de  $1,6 \times 10^4$  esporas/mL (Giraldo & Gil, 2020). Mientras que, para la cepa *Diaporthe endophytica*, de los filamentos formados fueron tomados 12 discos (7 mm de diámetro) de agar con micelio. Ambas cepas fueron inoculadas en Erlenmeyers de 250 mL con 150 mL de medio de cultivo YMG (pH: 6.3). Seguidamente se incubaron durante 72 h en un shaker a  $29 \pm 1^\circ\text{C}$  y 90 rpm. Al finalizar, se recuperó la biomasa del medio

exhausto mediante centrifugación a condiciones de 4°C y 9000 rpm para el hongo *F. oxysporum* y 4°C con 500 rpm para *D. endophytica*. Obteniendo así el inóculo para las posteriores fermentaciones.

### **Fermentación de los hongos endófitos: *F. oxysporum* y *D. endophytica***

La fermentación, para cada hongo, fue llevada a cabo en reactores (MINIBio-Applikon ®) de 500 mL, empleando un 60% del volumen total y con una duración del proceso fermentativo de 7 días. Para lograr evaluar el efecto de la fuente de carbono, cada hongo fue cultivado en cuatro fermentaciones: Dos con sacarosa y dos con maltosa. Teniendo en todos los casos las mismas composiciones para el medio de cultivo: 13,55 g/L de fuente de carbono, 1,07 g/L de urea, disuelto en buffer fosfato (0,2 M, pH 6,0) y suplementado con una solución basal de sulfatos heptahidratados de hierro, manganeso y zinc, cada uno a una concentración de 6 mg/L, tiamina a 0,5 mg/L, CaCl<sub>2</sub> a 0,3 g/L, EDTA a 0,3M. Por último, se agregó sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O) a 2mM como inductor, sólo a una de las fermentaciones por cada fuente de carbono evaluada. Cabe resaltar que, para el uso de maltosa como fuente de carbono, se añadió una mayor cantidad de sustrato debido a que sólo se disponía del sustrato en su forma monohidratada y para el desarrollo correcto de la fermentación era necesario mantener constante la relación C/N (11,4).

En todas las fermentaciones, se mantuvieron las condiciones de temperatura (29°C), pH (6), aireación (1vvm) y agitación (40 rpm) constantes mediante el sistema de control automático incorporado en el software de los equipos. La regulación del pH se hizo mediante ácido fosfórico al 5% (v/v) y carbonato de sodio al 5% (v/v) (Giraldo & Gil, 2020).

## **Estimación de biomasa y azúcares reductores durante las fermentaciones**

De las fermentaciones descritas anteriormente fueron tomadas muestras de 1,5 mL en intervalos de 24h y llevadas a centrifugación. El sobrenadante de cada muestra se sometió a un proceso de biotransformación de la sacarosa en glucosa y fructosa, mediado por la enzima invertasa. Para esto, se preparó una solución de invertasa a 16 mg/mL en un balón aforado de 5 mL. De esta solución se tomaron 250  $\mu$ L para poner a reaccionar con 500  $\mu$ L de la muestra de la fermentación en tubos de ensayo, durante 5 minutos a 55°C. Posteriormente, en otro tubo de ensayo se adicionó 250  $\mu$ L del reactivo DNS y 250  $\mu$ L de la muestra ya hidrolizada por la invertasa, calentando en baño maría por 5 min a 96°C. Seguidamente, se dispusieron las muestras en baño de hielo durante 5 minutos y se agregó 2,5 mL de agua destilada para detener la reacción. Finalmente, todas las muestras, se analizaron de acuerdo con el método DNS descrito por (ICIDCA, 2006). Por otro lado, la cuantificación de biomasa fue llevada a cabo por medio de las medidas de peso seco. En este sentido, el pellet obtenido en la centrifugación fue reconstituido en agua tipo II hasta el volumen inicial de muestra, agitado en vortéx y llevado nuevamente a centrifugación, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Luego de este proceso, se obtuvo un pellet lavado el cual fue dispuesto en cajas Petri de vidrio, previamente pesadas, luego de ser re-suspendido en agua tipo II. Finalmente, la muestra en caja Petri fue puesta en un horno (BINDER® Model FED 56) a 135 °C durante una hora y pasado este tiempo, se pesaron los recipientes para, posteriormente, calcular la cantidad de biomasa (Giraldo & Gil, 2020).

## **Recuperación de extractos crudos ricos en EPS**

El mosto de cada fermentación se filtró con un filtro de papel #4 con una porosidad de 5-11  $\mu$ m. El sobrenadante obtenido se llevó a filtración al vacío, empleando filtros de papel cualitativo P5 (Sartorius™ 5-10  $\mu$ m). Posteriormente, los volúmenes filtrados se sometieron a roto evaporación (Rotavapor® R-100 buchi), manteniendo

la temperatura en 45 °C, la agitación en 140 rpm y la presión de 45 mbar, hasta obtener un volumen entre 20 a 25 ml. Luego, el concentrado se precipitó con etanol al 96% (v/v), manteniendo una relación 1:2 (concentrado: etanol), llevando esta mezcla a centrifugación de nuevo a 9000 rpm, por 15 min a 4°C. El pellet fue resuspendido en 25 ml de agua tipo II y dializado empleando una membrana (Snake Skin de 3500 kDa (MWCO)) y agua tipo II como eluyente, bajo agitación continua durante 72 horas. Por último, las muestras dializadas, se congelaron a -40°C y fueron llevadas a un liofilizador (FDU-1110 · 2110 EYELA®) por 8 horas (Giraldo & Gil, 2020).

### **Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos crudos de EPS**

La capacidad antioxidante de los extractos fue medida siguiendo el método espectrofotométrico de DPPH (2,2-Difenil-1-Picril Hidrazilo). El cual consiste en colocar en contacto dicho radical libre con un compuesto de interés y medir los cambios en la absorbancia, puesto que, si se tratase con una especie antioxidante, se tendrá una disminución en la absorbancia en el tiempo, debido a la disminución de la concentración de radicales libres (Nakagawa et al., 2021).

Para la realización del método, se prepararon soluciones de extracto de EPS liofilizado empleando una solución acuosa de metanol al 25% (v/v), partiendo de una concentración madre de extracto de 1 mg/mL. Estas soluciones, previo a la medición fueron sometidos a un baño de ultrasonido (Ultrasonicador Lab Scientific) por 30 minutos. También, se preparó la solución correspondiente al reactivo DPPH a una concentración de 100 µM aforado con metanol grado HPLC. Seguidamente, se utilizó un microplato (hermo Scientific™ Nunc™ MicroWell™) de 96 pozos, donde se dispusieron 50µL de la solución de extracto de EPS y 100µL de la solución de DPPH; los puntos blancos correspondieron a: 100µL de solución metanol 25% (v/v) y 50µL de extracto de EPS; mientras que el control negativo tuvo: 100µL del reactivo DPPH y 50µL del solvente metanol al 25% (v/v).

Finalmente, se realizaron las lecturas de absorbancia en un lector de platos a 515 nm (Varioskan LUX Multimode Microplate Reader de Thermo Scientific), para una cinética de reacción de 30 minutos con lecturas cada 5 minutos. Y, se determinó la actividad antioxidante de la muestra, utilizando el porcentaje de captación de radicales libres, el cual fue calculado mediante la ecuación:

$$\% \text{Captación de RL} = \left( 1 - \left( \frac{A2 - A3}{A1} \right) \right) * 100$$

*Ecuación 1. Porcentaje de inactivación de radicales libres*

Donde:

A1 = Absorbancia del control

A2 = Absorbancia de la muestra

A3 = Absorbancia del blanco

### **Determinación de la capacidad antioxidante del ácido gálico**

El ácido gálico fue utilizado como referente frente al comportamiento que se observa comúnmente en el avance de la reacción de barrido de radicales por antioxidantes sintéticos, más no en torno al valor del porcentaje máximo de inactivación alcanzado. La capacidad antioxidante fue medida siguiendo el protocolo anteriormente descrito para el método de inactivación de DPPH. Teniendo en cuenta, como punto de referencia la concentración de 2,6 µg/mL correspondiente al IC<sub>50</sub> para el ácido, es decir, la proporción requerida para reducir al 50% la cantidad de radicales iniciales según el estudio realizado por (Brighente et al., 2007). En primer lugar, se preparó una solución madre de ácido gálico, diluyendo 20 mg de ácido en 5 mL de metanol al 25% (v/v), obteniendo así una concentración de 4 mg/mL (4000µg/mL). Luego, fue realizada una dilución 1/100 de la solución madre, para obtener una concentración final de 40µg/mL en un volumen de 10mL. Volumen

del cuál, se determinó, debe tomarse un volumen de 7  $\mu\text{L}$  para ser adicionados en cada pozo para lograr una concentración final de 2,6  $\mu\text{g/mL}$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **tabla 1** se muestran los cuatros montajes experimentales realizados con la cepa *Fusarium oxysporum*, donde se evaluó el efecto de las dos fuentes de carbono y la presencia del inductor propuestos en la metodología. Así, con el fin de realizar una comparación adecuada de los ensayos, se registran los datos de biomasa producida, consumo de la fuente de carbono, producción y rendimiento de los extractos de EPS obtenidos.

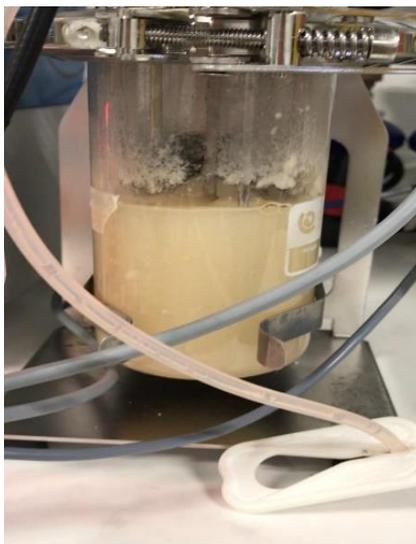
Ensayo	Fuente de carbono	Inductor	$\Delta$ Biomasa (g)	$\Delta$ Sustrato	EPS producidos (mg)	Rendimiento $Y_{p/s}$ (g/g)
1	Sacarosa	-	0,992	3,96	137	0,034
2	Sacarosa	$\text{Mg}^{2+}$	1,732	4,04	137,7	0,034
3	Maltosa	-	0,801	4,23	66,6	0,016
4	Maltosa	$\text{Mg}^{2+}$	0,736	4,23	34,2	0,008

Tabla 1 Resultados fermentación *F. oxysporum*

### Crecimiento de biomasa para *Fusarium oxysporum*

Durante las fermentaciones, se observó una forma de crecimiento homogéneo del hongo en cada biorreactor y se dio en forma de pequeñas partículas de color blancuzco (**ilustración 1**). Hacia el final de la fermentación se notó un cambio tanto en la coloración, como en la viscosidad del medio, lo cual puede deberse al crecimiento del hongo o a la producción de metabolitos. Como se ilustra en la **tabla1**, los reactores con sacarosa como sustrato, teniendo en cuenta que la cantidad inicial de sustrato fue de 4,065 g, tienen un consumo mayor al 97% para la fuente de carbono. Así mismo, se observa un mayor crecimiento fúngico en el reactor que contenía el inductor [ $\text{Mg}^{2+}$ ]. En principio, este resultado contradice lo

reportado por (Giraldo & Gil, 2020), dado que, en sus resultados la adición de  $[Mg^{2+}]$  no influía sobre la cantidad de biomasa producida, no obstante, debe tenerse en cuenta que en dicha investigación no se realizó un ensayo sin inductor, para comparar el crecimiento logrado en las fermentaciones.



*Ilustración 1. Características físicas de la fermentación del hongo *F. oxysporum**

En los experimentos de maltosa, se observa un consumo del sustrato similar para ambos experimentos la cual corresponde a 4,23 g, que es de igual forma un consumo casi completo de la fuente de carbono. Así mismo, se da un crecimiento similar para los ensayos con y sin inductor, lo que conlleva a su vez, a una menor generación de EPS, por lo que el efecto del inductor no afectó significativamente el desempeño de la maltosa como sustrato.

### **Recuperación de extractos de EPS y rendimientos de la Cepa *Fusarium oxysporum***

A partir de la información presentada en la **tabla 1**, se tiene que en los experimentos con sacarosa se obtuvo una cantidad final de extractos de 137 y 137,7 mg para los reactores sin inductor y con inductor  $[Mg^{2+}]$  respectivamente. Así mismo, se obtuvieron rendimientos g/g muy similares donde para el reactor, sin inductor se

llegó a un valor de 0,0337 y para el reactor con  $[Mg^{2+}]$  un rendimiento de 0,0339. En comparación con lo reportado por (Giraldo & Gil, 2020), donde se logró recuperar 179 mg, se observa una menor producción global de exopolisacáridos. Por otro lado, los experimentos tres y cuatro cuya fuente de carbono era maltosa, se observó una disminución en la concentración final de EPS, así como del rendimiento en comparación con sacarosa, obteniendo para el experimento sin inductor 34,2 mg y 66,6 mg para el experimento con  $[Mg^{2+}]$ .

La **ilustración 2**, obtenida a través del tratamiento estadístico de los datos haciendo uso del software Minitab 19, corrobora la información presentada anteriormente. Puesto que, la gráfica de interacción muestra que la generación de EPS en la fermentación con sacarosa como sustrato es independiente de la adición de  $[Mg^{2+}]$ . En cambio, al ser maltosa, la presencia del inductor tiene un efecto significativo y disminuye los rendimientos logrados. De manera que, puede afirmarse que para la producción de EPS mediante el cultivo de *F. oxysporum* es conveniente utilizar sacarosa como fuente de carbono.

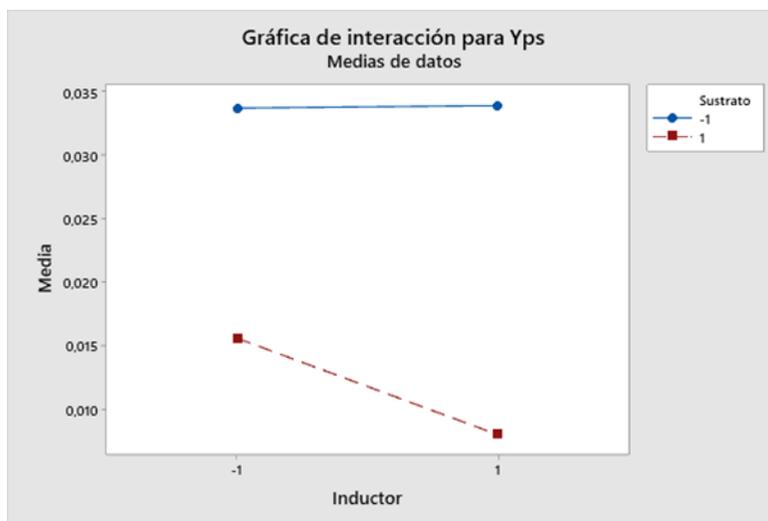


Ilustración 2. Gráfica de interacción entre los factores del diseño experimental. Para el inductor, el nivel -1: ausencia y 1: presencia. Para el sustrato, el nivel -1 corresponda a sacarosa y el nivel 1 para maltosa.

### **Crecimiento de biomasa para *Diaporthe endophytica***

Para el hongo *D. endophytica*, el crecimiento se dio en forma de pellets esféricos que no se distribuyen de manera uniforme dentro del reactor, lo que conlleva a que no sea posible dar seguimiento a la biomasa formada en el tiempo. Las fermentaciones iniciales planteadas para este hongo se llevaron a cabo con maltosa y sacarosa como fuente de carbono y  $[Mg^{2+}]$  como inductor, siguiendo con el diseño de experimentos planteado en conjunto con la cepa *F. oxysporum*.

Una vez iniciadas las fermentaciones, se monitoreó constantemente por medio de los controles automatizados de los reactores Applikon ®. A los cuatro días de proceso, se observó que no se habían dado cambios en variables críticas como el  $O_2$  disuelto, pH y temperatura, por lo cual, se asumió que posiblemente el hongo no asimilaba la maltosa como fuente de carbono y decidió añadirse glucosa en baja proporción para tratar de mantener casi por completo la relación C/N en 11,4. Posteriormente, fue también realizado el mismo procedimiento para el reactor con sacarosa como sustrato, agregando 10 mL de glucosa. En el día 8 de fermentación, contrario a lo esperado, no hubo crecimiento ni cambios en el reactor, por lo cual se agregó 10 mL de una solución de extracto de malta a cada fermentador, como fuente de nitrógeno. Pasados tres días, al no evidenciar ningún factor de crecimiento se dio por terminada la fermentación. Teniendo en cuenta que, además, de investigaciones previas, se conoce que el hongo, *Diaporthe endophytica* crece en azúcares complejos, sin embargo, no hay registros para la fuente de nitrógeno utilizada (urea).

En la búsqueda de información, con el objetivo de lograr plantear una nueva fermentación, adecuada para el hongo y la producción de exopolisacáridos por parte de este, se encontró que los EPS producidos por hongos endófitos son altamente influenciados por los componentes del medio y las condiciones de cultivo. Generalmente, el factor que influye mayoritariamente sobre la producción es la fuente de carbono que tienen efectos en la represión catabólica y el metabolismo secundario. En segundo lugar, la fuente de nitrógeno aporta al crecimiento, síntesis

de proteínas, enzimas y ácidos nucleicos, por lo que debe también ser tenida en cuenta. Con todo lo anterior, siguiendo la revisión bibliográfica realizada por (Liu et al., 2017), la glucosa como sustrato y el extracto de levadura son los compuestos que brindan mejor desempeño en la síntesis de EPS.

Por estas razones, fue escogido el medio YMG para una nueva fermentación de *Diaporthe*, teniendo en cuenta que la composición convencional de este medio fue recalculada para mantener la relación C/N (11,4) establecida para el desarrollo de las fermentaciones. Así pues, se montaron dos fermentaciones (ensayo cinco y ensayo seis), en presencia y ausencia de inductor  $[Mg^{2+}]$ , respectivamente.

Al finalizar los siete días de fermentación, la cantidad final de biomasa obtenida fue de 3,37 y 3,30 g, para los ensayos con presencia y ausencia de  $[Mg^{2+}]$ , respectivamente. Cabe mencionar que, esta cantidad de biomasa obtenida es ampliamente superior a la lograda en los ensayos de *F. oxysporum*.

### **Recuperación de extractos de EPS de la cepa *Diaporthe endophytica***

Hacia los últimos días de fermentación, el medio de cultivo se tornó de un tono rojizo, lo cual se tomó como un indicador de la presencia de metabolitos producidos por el hongo en el biorreactor, como nuestros polisacáridos de interés. Una vez separados del caldo de fermentación y realizado el proceso Downstream, lograron recuperarse 53,8 mg para ensayo cinco y 64,7 mg para el ensayo seis. En comparación, estas cantidades son menores a las obtenidas por *F. oxysporum* en sacarosa, pero concuerdan con los valores obtenidos para las fermentaciones en maltosa. De modo que, las fermentaciones pueden haber tenido desempeños parecidos, donde el uso de  $[Mg^{2+}]$  como inductor no tuvo un efecto significativo en los resultados, teniendo en cuenta que la desviación estándar para los EPS producidos por *D. endophytica* es de 7,70%.

## Actividad antioxidante de los extractos de EPS obtenidos

Para el ensayo uno, se obtuvo un porcentaje de inactivación final del 29,99%, mientras que en el ensayo dos presenta un mayor porcentaje de inactivación llegando a 57,97% para una cinética de 30 minutos de reacción, porcentaje similar al reportado por (Giraldo & Gil, 2020). Puede afirmarse que la inclusión del inductor para la fermentación con sacarosa beneficia ampliamente la capacidad antioxidante de los EPS obtenidos, ya que, se observa un incremento del 28%.

Los ensayos tres y cuatro, evidenciaron un porcentaje de inactivación final menor en comparación a los logrados con sacarosa, siendo los valores 22,57% y 18,29%, respectivamente. En este sentido, las fermentaciones con maltosa evidencian un bajo efecto para inductor  $[Mg^{2+}]$ , que incluso podría tomarse como negativo, ya que, la inactivación de radicales libres es menor en 4,28 puntos porcentuales para el ensayo con  $[Mg^{2+}]$  añadido. Por otro lado, en comparación con lo obtenido por (Muñoz, Caicedo, & Dávalos, 2019) se observa que los EPS tienen un porcentaje de inactivación similar cuando se usa la misma relación C/N (11,4), obteniendo una inactivación del 24,05% para la corrida sin magnesio.

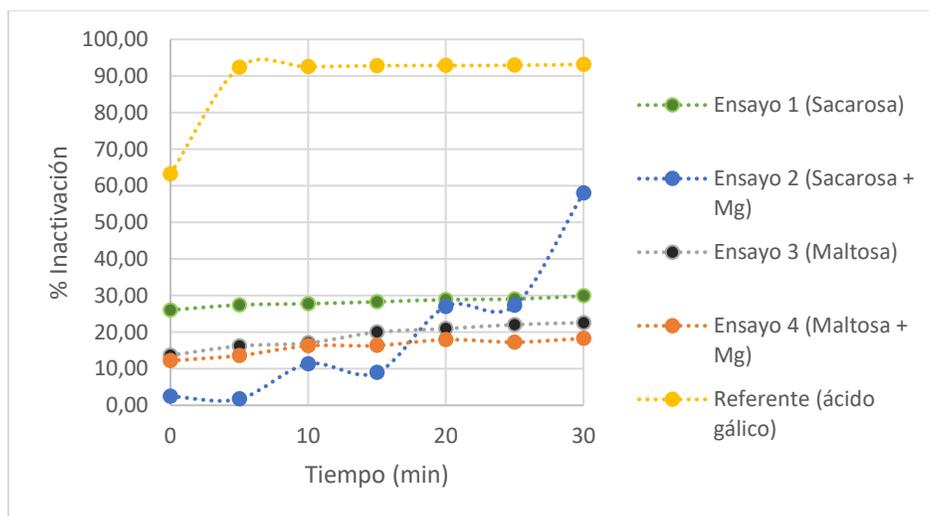
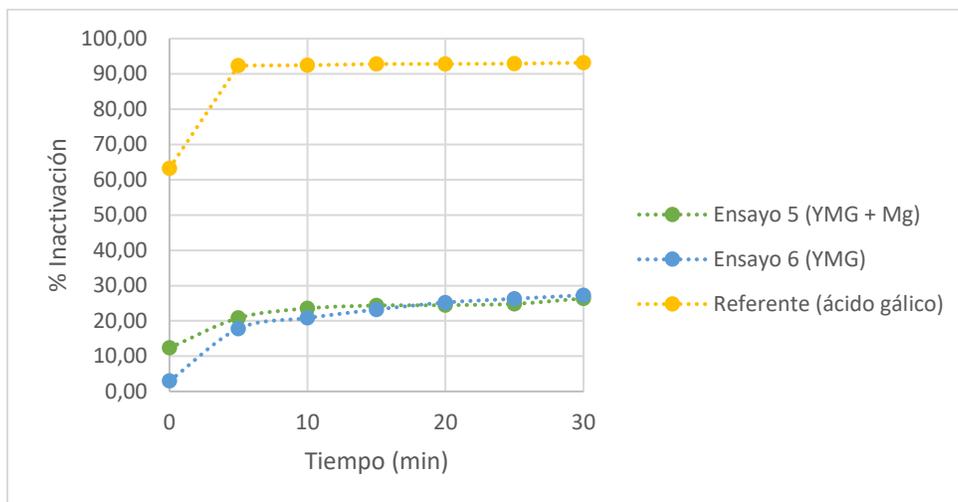


Ilustración 3. Avance del % de inactivación del radical DPPH por acción de los extractos crudos provenientes del cultivo de la cepa ET-01 *F. oxysporum* en distintos medios de cultivo: sacarosa, sacarosa +  $Mg^{2+}$ , maltosa, y maltosa +  $Mg^{2+}$ . Actividad de barrido de radicales DPPH del compuesto ácido gálico  $[2,6 \mu g/mL]$  como antioxidante de referencia.

La **ilustración 3**, muestra el avance de la reacción entre las muestras antioxidantes y el radical libre DPPH. Se observa que el ácido gálico reacciona rápidamente con los radicales presentes en el medio, logrando su valor máximo en tan sólo cinco minutos y en adelante, no hay cambios considerables. Con relación a los ensayos uno, tres y cuatro, se observa una tendencia general bajo la cual se da un crecimiento cuasi lineal hasta alcanzar un valor máximo a los 30 minutos de reacción. Por tanto, es posible afirmar que los EPS generados por el hongo tienen una interacción lenta con los radicales disponibles dentro del DPPH y, por consiguiente, su desempeño aumenta en el tiempo hasta estabilizarse cerca de su valor máximo de inactivación. En cuanto al ensayo dos, el avance de reacción deja de ser lineal y se observa como la reducción de la cantidad de radicales libres es beneficiada a medida que avanza la reacción, sobre todo después de los 15 minutos, podría pensarse que un mayor tiempo de reacción permitiría lograr valores más altos para la inactivación y además, el efecto positivo del inductor  $[Mg^{2+}]$  puede deberse a que dota a los polisacáridos de una mayor capacidad de interacción ante las moléculas del radical DPPH en el sistema final. Por último, cabe mencionar que para esta muestra fue necesario prolongar el tiempo de sonicación a una hora, debido a que, se observaron aglomeraciones insolubles de color blanco. Sin embargo, no fue posible lograr una mezcla completamente homogénea. Por ende, pudieron presentarse interferencias en las mediciones del método.

Por otro lado, las muestras obtenidas luego de la liofilización de los ensayos cinco y seis, fueron también dejadas por una hora en sonicación para lograr la solubilización completa de los extractos. Una vez formadas las soluciones homogéneas, fueron realizadas las mediciones del método DPPH.



*Ilustración 4 La actividad de barrido de radicales DPPH del extracto crudo obtenido de la cepa *D. endophytica* cultivada en dos diferentes medios: YMG con presencia de Inductor  $Mg^{2+}$  y YMG sin presencia del inductor. Cinética de inactivación del ácido gálico como compuesto antioxidante de referencia.*

La **ilustración 4**, muestra el avance de la reacción entre las muestras antioxidantes cinco, seis y el radical libre DPPH. A diferencia de las muestras provenientes de los ensayos en *F. oxysporum*, los extractos obtenidos de la cepa *D. endophytica* muestran una tendencia que se asemeja a la ofrecida por el ácido gálico. Se evidencia que, en los primeros minutos de reacción, la inactivación crece rápidamente y se va estabilizando hacia los cinco minutos de medición. Esto podría deberse a una mejor interacción entre la molécula antioxidante y el radical DPPH, lo cual conlleva también a presumir que existe una mayor cercanía entre los radicales libres de las moléculas reaccionantes. Una vez se alcanza el punto de inflexión, hacia los cinco minutos de reacción, la tendencia se mantiene con un leve crecimiento lineal que tiende hacia el máximo valor de inactivación para la muestra. Para el ensayo cinco el máximo alcanzado es de 26,37% mientras que, el ensayo seis logró 27,29%, dado que los valores difieren tan sólo en 0,92%, no es notorio el efecto del inductor, al igual que sucedió con la fermentación en maltosa de *F. oxysporum*. No obstante, si se observa que existe un desarrollo correcto de los exopolisacáridos al utilizar en la fermentación glucosa y extracto de levadura como

fuentes principales para el crecimiento, logrando incluso recrear el comportamiento característico de los antioxidantes sintéticos.

## **CONCLUSIONES**

Este trabajo muestra la importancia de la fuente de carbono en la producción y capacidad antioxidante de extractos de exopolisacáridos por parte de la cepa *Fusarium oxysporum*, debido a que los resultados sugieren que el uso de sacarosa como sustrato en las fermentaciones benefició la cantidad de mg de EPS obtenidos y su porcentaje de inactivación de radicales. En cuanto al inductor  $[Mg^{2+}]$ , la presencia de este no tuvo influencia en la cantidad de extractos recuperados, pero sí en el porcentaje máximo de inactivación de radicales DPPH, lo cual concuerda con resultados reportados en trabajos previos con dicha cepa. También, se observó un crecimiento positivo de la cepa *Diaporthe endophytica* en un medio selectivo modificado, sin embargo, no se encontró un efecto significativo sobre la producción de biomasa, extracto de EPS o potencial capacidad antioxidante de los mismos, con la adición del inductor  $[Mg^{2+}]$ . A pesar de esto, se sugiere seguir estudiando esta cepa, con la evaluación de diferentes medios de cultivo, teniendo en cuenta la relación C/N y la posible presencia de otros inductores.

Por último, pese a los resultados obtenidos con maltosa y glucosa, como fuente de carbono, en ambas cepas, no se descarta el uso de estos sustratos para investigaciones futuras alrededor de la actividad antioxidante, en vista del comportamiento presentado por todos los extractos evaluados frente al avance en el porcentaje de inactivación de radicales enmarcado por el antioxidante sintético de referencia (ácido gálico).

## **Agradecimientos**

Se desea agradecer la ayuda técnica de los asistentes de laboratorio del departamento de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Icesi.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Mittler, R. (2017a). ROS Are Good. Trends in plant science, 22(1), 2.

<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>

Chaisuwan, Jantanasakulwong, & Wangtueai. (2020). Microbial exopolysaccharides for immune enhancement: Fermentation, modifications, and bioactivities. Food

Bioscience, 35, 2. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100564>

Yan, M. (2016). Extracellular polysaccharide with novel structure and antioxidant property produced by the deep-sea fungus *Aspergillus versicolor* N2bc.

Carbohydrate Polymers, 272. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.04.040>

Nakagawa, S., Ohmura, R., Toshima, S., Park, H., Narasako, Y., Hirano, T., Otani, M., & Kunitake, H. (2021). Changes in polyphenols, anthocyanins, and DPPH radical-scavenging activities in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) during tuber growth. *Scientia Horticulturae*, 284, 110100.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110100>

Andrew, M., & Jayaraman, G. (2020). Structural features of microbial exopolysaccharides in relation to their antioxidant activity. *Carbohydrate Research*, 487, 107881. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.107881>

Caicedo, N. H., Davalos, A. F., Puente, P. A., Rodríguez, A. Y., & Caicedo, P. A. (2019). Antioxidant activity of exo-metabolites produced by *Fusarium oxysporum*: An endophytic fungus isolated from leaves of *Otoba gracilipes*. *Microbiology Open*, 8(10). <https://doi.org/10.1002/mbo3.903>

Henao y Caiceo, M. N. (2019). Influencia de la transferencia de oxígeno sobre la producción de exopolisacáridos con potencial antioxidante de *Fusarium oxysporum* en un biorreactor de tanque agitado (Tesis de pregrado). Universidad Icesi

Giraldo, V., & Gil, A. (2020). Evaluación de inductores en la producción de exopolisacáridos y en la actividad antioxidante de extractos crudos obtenidos a partir del cultivo de *Fusarium oxysporum* (ET-01) (Tesis de pregrado). Universidad Icesi

Charria, Espinosa, Zapata, Méndez, Caicedo y Caicedo, E. M. A. M. J. N. (2021). Evaluation of the Antibacterial Activity of Crude Extracts obtained from Cultivation of

Native Endophytic Fungi belonging to a Tropical Montane Rainforest in Colombia. Frontiers. Published.

Brighente, I., Dias, M., Verdi, L., & Pizzolatti, M. (2007). Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian Species. *Pharmaceutical Biology*, 45(2), 156–161. <https://doi.org/10.1080/13880200601113131>

Liu, J., Wang, X., Pu, H., Liu, S., Kan, J., & Jin, C. (2017). Recent advances in endophytic exopolysaccharides: Production, structural characterization, physiological role, and biological activity. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1113–1124. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.084>

Muñoz, J. C., Caicedo, N. H., & Dávalos, A. F. (2019). Caracterización preliminar de extractos crudos ricos en exopolisacáridos partir de *Fusarium oxysporum* y evaluación de su actividad antioxidante (Tesis de pregrado). Universidad Icesi

Puente, P., Caicedo, N. H. (2017). evaluación de la actividad antioxidante de extractos crudos de hongos endófitos asociados a ecosistemas tropicales del valle del cauca (Tesis de pregrado). Universidad Icesi

Yuan y Zhang, J. Z. (2008). Antioxidant effects and cytotoxicity of three purified polysaccharides from *Ligusticum chuanxiong Hort.* *Carbohydrate Polymers*, 822. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.04.040>

Freitas, F., Torres, C. A., & Reis, M. A. (2017). Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. *Bioresource Technology*, 245, 1674–1683. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.092>

Rana, S., & Upadhyay, L. S. B. (2020). Microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types, and their commercial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 157, 577–583. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.084>

Elvira Sánchez-Fernández, R., Lorena Sánchez-Ortiz, B., Monserrat Sandoval-Espinosa, Y. K., Ulloa-Benítez, L., Armendáriz-Guillén, B., Claudia García-Méndez, M., & Lydia Macías-Rubalcava, M. (2013b). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP*, 16(2), 132–146. [https://doi.org/10.1016/s1405-888x\(13\)72084-9](https://doi.org/10.1016/s1405-888x(13)72084-9)

Guo, S., Mao, W., Li, Y., Gu, Q., Chen, Y., Zhao, C., Li, N., Wang, C., Guo, T., & Liu, X. (2013). Preparation, structural characterization, and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide produced by the fungus *Oidiodendron truncatum* GW. *Process Biochemistry*, 48(3), 539–544. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.01.014>

