

Comportamiento de *Malassezia furfur* en medios de cultivo con base en los exudados gomosos de *Spondias dulcis* y *Spondias mombin*. Producción de lipasa extracelular

Growth of Malassezia furfur in Media With Spondias dulcis and Spondias mombin Gum Exudates. Production of Extracellular Lipase

**Mesa C., Luz Mila¹; Urdaneta, Octoban¹;
Rodríguez de Valero, Sofía¹;
Fernández, Viluzca³; León de Pinto, Gladys²;
Villalobos, Rafael⁴**

¹Cátedra de Micología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. ²Centro de Investigaciones en Química de los Productos Naturales, Facultad de Humanidades y Educación, Universidad del Zulia. ³Laboratorio de Alimentos, Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia.

⁴Cátedra de Medicina Tropical, Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia.

E-mail: luzmila.mesa@gmail.com

Resumen

El desarrollo de las levaduras del género *Malassezia* requiere condiciones especiales, estos hongos que producen afecciones en la piel, son generalmente cultivados en el medio Dixon. Se ensayaron los exudados gomosos de *Spondias dulcis* y *Spondias mombin* como sustratos para *Malassezia furfur*. Se evaluó también la producción de lipasa. Se determinó la cinética de crecimiento a un determinado intervalo de tiempo (0-168h), y a diferente concentración (0,5; 1%) y pH (4,5; 6,0). La biomasa obtenida para la levadura probada demostró que los sustratos preparados con los exudados gomosos son adecuados para su desarrollo. La mayor actividad de lipasa extracelular se observó al tiempo inicial de estudio (18h) en ambos sustratos, en las condiciones usadas: concen-

tración (0,5 y 1%) y pH (4,5 y 6,0). Estas especies botánicas, ampliamente localizadas en Venezuela, especialmente en los Estados Zulia y Falcón, producen abundante goma. Este hecho, y los resultados obtenidos podrían ser útiles en la obtención de un nuevo sustrato, que pueda competir con el medio Dixon para el aislamiento y la caracterización de especies de *Malassezia*, y para la producción de lipasa.

Palabras clave: *Malassezia furfur*, exudados gomosos, medios de cultivo, producción de lipasa.

Abstract

The development of genus *Malassezia* yeasts requires special conditions. This fungus, which produces skin diseases, is generally cultivated in the Dixon medium. Gum exudates from *Spondias dulcis* and *Spondias mombin* were tested as substrates for *Malassezia furfur*. Lipase production was also evaluated. The growth kinetic was determined for a given time range (0-168h) at different concentrations (0.5; 1%) and pH levels (4.5; 6.0). The biomass obtained for the tested yeast showed that substrates prepared with *S. dulcis* and *S. mombin* gum exudates are suitable for its development. The highest extracellular lipase activity was observed at 18h on both substrates at given concentrations (0.5; 1%) and pH (4.5; 6.0). These botanical species, widely located in Venezuela, especially in the States of Zulia and Falcon, yield abundant gum. Findings may be useful for obtaining new substrates that could compete with the Dixon medium for isolation and characterization of *Malassezia* species and for lipase production.

Key words: *Malassezia furfur*, gum exudates, substrates, lipase production.

Introducción

Los exudados gomosos, gomas naturales, hidrocoloides, heteropolisacáridos ácidos, son excretados por árboles en respuesta a una estimulación adecuada: traumatismos en el tallo, remoción de ramas, presencia de insectos, bacterias u hongos. Se ha reportado la capacidad de producir gomas de varias especies botánicas diseminadas en Venezuela (1, 2).

El crecimiento eficiente de hongos filamentosos se ha observado en medios con base en los exudados gomosos de *Acacia glomerosa*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Laguncularia racemosa* (3, 4, 5). Estos hallazgos justifican la evaluación del comportamiento de levaduras en otras gomas.

Las levaduras del género *Malassezia*, parte de la flora normal de la piel, bajo ciertas

condiciones pueden causar diversas afecciones como dermatitis seborreica, pitiriasis versicolor, foliculitis (6).

El género *Malassezia* comprende las especies *M. furfur*, *M. slooffiae*, *M. obtusa*, *M. sympodialis*, *M. gloosa*, *M. restricta*, *M. pachydermatis*, *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. nana*, *M. yamatoensis* (7). Estas especies, a excepción de *M. pachydermatis*, se caracterizan por ser lipofílicas, requieren de ácidos grasos de cadenas largas (ácido oleico y mirístico) para el crecimiento, los cuales son indispensables para la formación de estructuras morfológicas de estas levaduras (8). La dependencia de una fuente externa de ácidos grasos se atribuye a la incapacidad de sintetizar dichos ácidos.

El medio Dixon es usado específicamente para el cultivo de *Malassezia*. La preparación de este medio requiere de varios

reactivos importados (Extracto de Malta, Peptona, Bilis de Buey, Glicerol, Ácido oleico y Tween 40), por lo tanto, es un medio muy costoso.

Spondias dulcis y *Spondias mombin*, especies botánicas localizadas en Venezuela, producen una goma de color marrón claro, muy soluble en agua (9). La goma está constituida por carbohidratos, material proteínaceo y ácidos grasos. Se ha comprobado que el polisacárido, aislado de la goma de *S. dulcis* y de *S. mombin* tiene una estructura muy compleja. La composición química mostró la presencia de galactosa, arabinosa, manosa, ramnosa, ácido glucurónico y su derivado ácido 4-O metil glucurónico (9, 10, 11). Estudio preliminar (12) demostró las bondades de la goma de *S. dulcis* para el crecimiento de dos especies del género *Malassezia*, debido a que esta goma tiene ácidos grasos en su composición.

Las lipasas son enzimas que actúan en interfase grasa-agua para catalizar la hidrólisis de triglicéridos en ácidos grasos mono-, di- y triacilglicerol y glicerol. Estas enzimas se usan en la industria láctea, petrolera, farmacéutica, en la producción de surfactantes (13). Las lipasas de origen microbiano presentan un gran potencial en aplicaciones industriales debido a su estabilidad, selectividad y amplia especificidad de sustrato (14). Diversos géneros de hongos filamentosas y levaduras como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Candida*, *Trichosporon*, *Yarrowia*, *Kluyveromyces*, han sido reportados como productores de lipasa (15, 16, 17, 18).

Este trabajo reporta el estudio del crecimiento de *M. furfu* en un medio novedoso con base en el exudado gomoso de *Spondias dulcis* y *Spondias mombin* y la producción de lipasa extracelular en medios de cultivo con base en estas gomas.

Materiales y Métodos

Origen de las muestras

La gomas de *Spondias dulcis* y *Spondias mombin*, colectadas en época no lluviosa (Enero-Marzo, 2007), fueron suministradas por el Centro de Investigaciones en Química de los Productos Naturales, Facultad de Humanidades y Educación. La cepa de *Malassezia furfur* (MMA-16cc) fue obtenida de piel sana de niño y se conservó en el medio Dixon a 32°C.

Preparación del medio de cultivo

Los exudados gomosos de *Spondias dulcis* y *Spondias mombin*, crudos y pulverizados, se disolvieron en agua destilada (1% y 0,5% p/v) con agitación constante. Se filtró por gasa y se le adicionó peptona (0,6% p/v), extracto de malta (3,6% p/v) y Tween 40 (1% v/v) Se tomaron alícuotas del medio (pH 6,0) y se ajustaron a pH 4,5. Estos reactivos se disolvieron en agua destilada (hasta completar 1000mL). La esterilización de los medios se realizó en autoclave (15 lb,15 min).

Preparación del inóculo

La cepa de *M. furfur* se cultivó en el medio Dixon Agar en tubos de ensayo (32°C, 5 días), se añadió agua destilada estéril (10 mL). El líquido se decantó en una fiola estéril (solución stock). El conteo de las esporas, en una cámara de Neubauer, permitió la preparación de la solución del inóculo (1×10^6 cel/mL).

Cinética de crecimiento: Se inoculaban, por duplicado, alícuotas (2,5 mL) de la solución del inóculo preparado (1×10^6 cel/mL) en matraces que contenían el medio con base en la goma de *Spondias dulcis* y de *Spondias mombin* (25 mL). Se ensayaron diferentes condiciones experimentales (pH 4,5 y 6,0; concentración de la goma 1 y 0,5%). Los cultivos se incubaron (28°C) con agitación cons-

tante (200 rpm). La determinación de la biomasa se hizo por la técnica convencional (19).

Determinación de la actividad enzimática de la lipasa extracelular

Producción de la lipasa: Se inocularon alícuotas (10 mL) de la suspensión del inóculo preparado (1×10^6) en Matraces (500mL) que contenían el medio con base en la goma de *S. dulcis* y *S. mombin* (1%, 100mL) en las condiciones experimentales seleccionadas (pH 4,5 y 6,0; 32°C y 250 rpm). Los cultivos se incubaron por tiempos definidos (18, 24, 36, 48, 60 y 72 h).

Extracción de la lipasa extracelular

Se tomó una muestra de cada medio fermentado (10mL) y se centrifugó (3.000g, 4°C, 10 min). El sobrenadante se separó para determinar la actividad enzimática.

Determinación de la actividad enzimática

La actividad de la lipasa se determinó según la metodología reportada previamente (20). Se usó como sustrato p-nitrofenil palmitato (pNPP) 16,5 mM disuelto en 10mL de 2-propanol, pH 8,0 y sonicado por 6 minutos (Solución A). También se usó el Buffer Tris-HCL (50 mM) y Triton X100 0,4% p/v, pH 8,0 (Solución B).

La muestra (0,3mL), extracto libre de células, se le adicionó la mezcla de reacción (2,7 mL) preparada antes del ensayo con 9mL de la solución B y 1 mL de la solución A e incubó (37°C, 10 min). La cantidad de p-nitrofenol liberado se midió a 410 nm en un espectrofotómetro uv-visible (Cary 50 Conc Varian). Se preparó una curva patrón, con base en p-nitrofenol. Una unidad de lipasa es equivalente a la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de p-nitrofenol del reactivo (pNPP), bajo las condiciones experi-

mentales usadas en la determinación. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Análisis estadístico

Los datos de la biomasa (crecimiento) obtenida en los medios de cultivo ensayados, fue analizado mediante Anova del programa SPSS Versión 10,0 y del programa Statistix Versión 8,0.

Resultados

El diseño de los experimentos para evaluar el crecimiento de *Malassezia furfur* se hizo tomando en consideración las condiciones ensayadas previamente. El medio con base en la goma de *S. dulcis* a la concentración de 0,5% mostró un mayor crecimiento de la levadura a pH 6,0 hasta las 96 horas de incubación, obteniéndose la mayor cantidad de biomasa a las 48 h (10,67 mg/mL). El medio con base en la goma de *S. mombin* (0,5%) mostró una mayor biomasa a pH 4,5 hasta las 48 horas, con la cantidad máxima a las 18h (11,03 mg/mL) y a partir de las 72 horas en pH 6,0 se produjo la mayor biomasa, con un máximo a las 96h (14,57 mg/mL) (Fig. 1). La prueba de Duncan mostró que los valores promedios son significativamente diferentes ($p < 0,05$) y que el crecimiento de la levadura en las gomas a una concentración de 0,5% sólo depende del pH. La prueba post hoc de Tuckey demostró que el mayor crecimiento se obtuvo en la goma de *S. mombin* a pH 6,0.

El experimento efectuado con una mayor concentración de goma (1%) mostró el crecimiento de la levadura *M. furfur* en los pH ensayados; en la goma de *S. dulcis* la mayor biomasa se produjo a pH 4,5 con el máximo a las 72 horas (14,80 mg/mL); a pH 6,0, también a las 72 h se produjo la mayor cantidad de biomasa (12,09 mg/mL). Así mismo, *S. mombin* mostró también mayor biomasa a

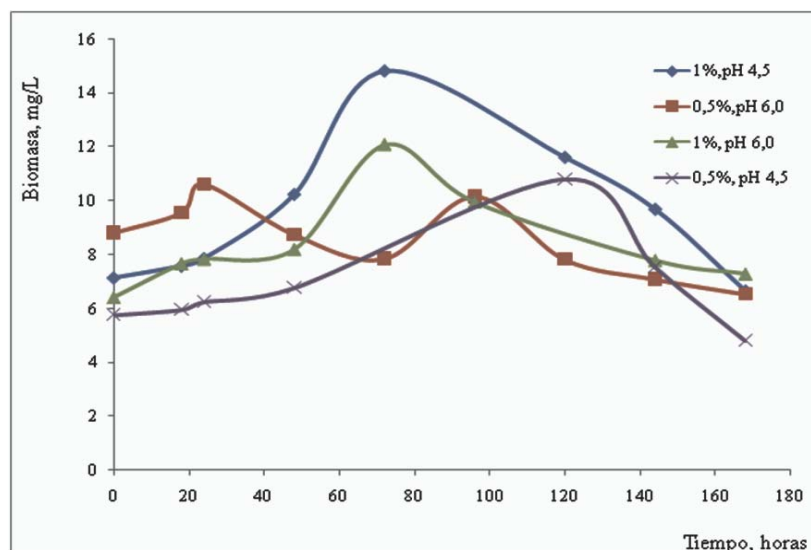


Gráfico 1. Cinética de crecimiento de *M. furfur* en *S. dulcis*.

pH 4,5 hasta las 72 horas con la máxima cantidad a las 24h (11,30 mg/mL). La mayor biomasa se produjo a pH 6,0 después de las 72h, con un máximo a las 144h (12,78 mg/mL). La prueba post hoc de Tuckey demostró que la diferencia de medias es significativa al nivel 0,05% y el mayor crecimiento se obtuvo con el medio con base en la goma de *S. dulcis* a pH 4,5.

La actividad enzimática de la lipasa extracelular, se observó, inicialmente a las 18h después de la interacción hongo-sustrato, con la mayor actividad en este tiempo para ambos sustratos (*S. dulcis* y *S.mombin*), a los pH evaluados (4,5 y 6,0): 602,76; 772,23; 586,66 y 756,41 $\mu\text{mol/mL}$ respectivamente (Tabla 1). La prueba de Tukey mostró que la diferencia de las medias es significativa al nivel 0,05%; la actividad de la lipasa extracelular en los sustratos usados no depende del pH sino del tiempo; la mayor actividad enzimática se observó a las 18h ($p < 0,05\%$).

Discusión

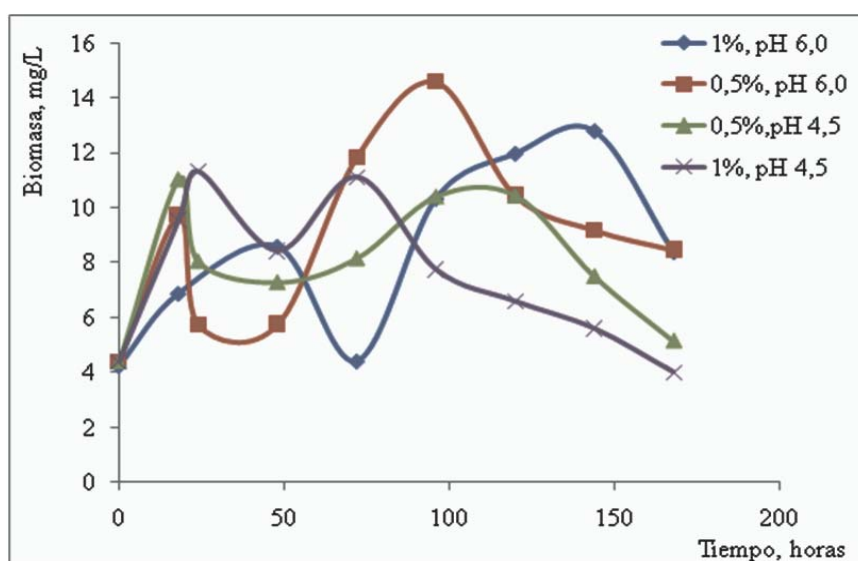
Los valores de biomasa obtenidos para *M. furfur* en el sustrato con base en la goma

de *S. dulcis* y *S.mombin* a una concentración de 0,5 y 1%, demostraron que el medio ensayado aporta los nutrientes necesarios para el crecimiento de la levadura (Figs. 1 y 2). Estos resultados son similares a los reportados previamente (12) donde se observó la mayor biomasa para *S. dulcis* a las 72 horas, a pH 4,0. Es importante destacar que a los pH 4,5 y 6,0 el crecimiento observado de *M. furfur* mostró que el sustrato ensayado con base en las gomas a las concentraciones usadas, trabaja eficientemente en las condiciones mencionadas. El crecimiento de la especie *M. furfur*, sugiere que aprovecho como fuente de carbono algunos de los monosacáridos (galactosa, arabinosa, ramnosa, ácidos urónicos) constituyentes del polisacárido presentes en la goma de *S. dulcis* y *S. mombin* (9, 11). Los residuos constituyentes de las ramificaciones estructurales (10, 11) tienen una mayor probabilidad de participar en el proceso enzimático necesario para el aprovechamiento de los monosacáridos como fuente de energía.

La goma de *S. dulcis* contiene también diferentes ácidos grasos: saturados (Palmítico), monoinsaturados (Oleico) y poliinsaturados (Linoleico) (12). La presencia de estos

Tabla 1 Actividad de lipasa extracelular de *Malassezia furfur* en sustrato con base en la goma de *Spondias dulcis* y *Spondias mombin*.

| Gomas | pH | Tiempo, h | | | | | |
|------------------|-----|-------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 18 | 24 | 36 | 48 | 60 | 72 |
| | | Actividad, $\mu\text{mol/mL}$ | | | | | |
| <i>S. dulcis</i> | 4,5 | 602,76 | 253,0 | 260,13 | 191,13 | 154,40 | 289,43 |
| | 6,0 | 586,66 | 247,84 | 242,02 | 179,50 | 145,02 | 274,89 |
| <i>S. mombin</i> | 4,5 | 772,32 | 310,39 | 273,54 | 316,74 | 273,70 | 339,68 |
| | 6,0 | 756,41 | 297,96 | 358,26 | 313,23 | 257,47 | 366,77 |

**Gráfico 2.** Cinética de crecimiento de *M. furfur* en *S. mombin*.

ácidos grasos en el medio es probablemente un factor coadyuvante para la fácil asimilación de los carbohidratos en el crecimiento de la levadura.

La alta actividad de la lipasa, a nivel extracelular, observada a las 18h de la interacción hongo-sustrato, para las dos gomas, *S. dulcis* y *S. mombin* y a los pH evaluados 4,5 y 6,0 (602,76; 772,23; 586,66 y 756,41 $\mu\text{mol/mL}$, respectivamente) es comparable a la observada para la levadura *Yarrowia lipolytica* en la fase de desarrollo (6-38h) en un sustrato que contenía 0,5% de aceite de oliva (17). En todas las condiciones estudiadas a las 72 h se observó un incremento de la actividad de

la lipasa respecto del tiempo anterior, este incremento, podría deberse a la disminución de los ácidos grasos del sustrato por el desarrollo de la levadura, tal como ha sido reportado para el moho *Penicillium sp* (22). La fácil producción y obtención de las gomas de *S. dulcis* y *S. mombin*, especies botánicas localizadas en Venezuela, la fácil preparación del medio de cultivo y el rápido crecimiento de la levadura estudiada demuestran las bondades de estos sustratos para la caracterización de *M. furfur*. y para la producción de lipasa.

Los factores discutidos anteriormente evidencian que el medio de cultivo con base en la goma de *S. dulcis* y de *S. mombin* puede

competir con el medio Dixon para el aislamiento y caracterización de *M. furfur*. Es importante ensayar el crecimiento de otras especies de *Malassezia*, así como de otras levaduras, en las gomas del género *Spondias*.

Agradecimiento

Los autores expresan su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humánico de la Universidad del Zulia (CONDES) por el soporte financiero del Proyecto CC-0870-08 "Interacción de *Malassezia furfur* con las gomas de *Spondias dulcis* y *Spondias mombin*". Al Laboratorio de Alimentos, Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias Zulia, por facilitar su infraestructura para la determinación enzimática.

Referencias Bibliográficas

- (1) Clamens C, León de Pinto G, Rincón F, Vera A. Exudados gomosos de plantas localizadas en Maracaibo, Venezuela. Rev Facult Agronomía, La Plata 1998; 103: 119-125.
- (2) Clamens C, Rincón F, Vera A, Sanabria L, León de Pinto G. Species widely disseminated in Venezuela which produce gum exudates. Food Hydrocol 2000; 14: 253-257.
- (3) Mesa L, Rodríguez S, Romero M, Semprúm G, León de Pinto G. Exudados gomosos de *Acacia glomerosa* y *Enterolobium cyclocarpum* : sustrato para el cultivo de hongos. Kasmera 2000; 28:149-161.
- (4) Graterol E, Mesa L, Rodríguez- Valero S, Ortega J, Ávila D, León de Pinto G. Comportamiento de *Aspergillus niger* ATCC 11414 en la goma de *Acacia glomerosa*. Aislamiento y caracterización de dos oligosacáridos. Afinidad 2005; 62:302-306.
- (5) Mesa L, León de Pinto G. Exudado gomoso de *Laguncularia recemosa* (mangle blanco) como medio de cultivo para hongos. Invest Clin 1993; 34:85-89.
- (6) Gupta A K, Batra R, Bluhm R, Boekhout T, Dawson TL Jr. Skin diseases associated with *Malassezia* species. J Am Acad Dermatol 2004; 51:785-98.
- (7) Ashbee H R. Update on the genus *Malassezia*. Med Mycol 2007; 45: 287-303
- (8) Carrillo M A, Brio. S S, .Género *Malassezia*. Estado de su situación como patógeno. Activ Dermatol. 2004; 40:321-329.
- (9) León de Pinto G, Martínez M, Sanabria L, Rincón F, Vera A, Beltrán O, et al. The composition of two *Spondias* gum exudate. Food Hydrocol 2003; 14: 259- 263.
- (10) Martínez. M, León de Pinto G, Sanabria L, Beltrán O, Igartuburu J M, Bahsas A. Structural features of an arabinogalactan gum exudates *Spondias dulcis* (Anacardiaceae). Carbohydr Res 2003; 338: 619-624.
- (11) León de Pinto G, Martínez M, Beltrán O, Rincón F, Igartuburu JM, Rodríguez L. Structural investigation of the polysaccharide of *Spondias mombin* gum. Carbohydr Polym 2000; 43:105-112.
- (12) Mesa L, Díaz M, Ocampo P, Rodríguez de Valero S, Larrazabal M, Guerra P, León de Pinto G. Comparación del crecimiento de *Malasszia furfur* y *Malassezia slooffiae* en los medios del exudado gomoso de *Spondias dulcis* y Dixon. Kasmera 2008; 36: 45-52.
- (13) Abbas H, Hiol A, Deyris V, Comeau L. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor sp* strain isolated from palm fruit. Enzyme Microbi Tech 2002; 31: 968-975.
- (14) Jaeger K E, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, Van Heuvel M, Misset O. Bacterial lipases. FEMS Microbiol Rev 1994; 15: 29-63.
- (15) Mareck A, Bednarski W. Some factors affecting lipase production by yeasts and filamentous fungi. Biotechnol Lett 1996; 18: 1155-1160.
- (16) Deive FJ, Costas M & Longo MA. Production of a thermostable extacellular lipase by *Kluyveromyces marxianus*. Biotechnol Lett 2003; 25: 1403-1406.
- (17) Fickers P, Ongena M, Destain J, Weekers F, Thonart P. Production and Down-stream processing of an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica*. Enzyme Microb Tech 2006; 38: 756-759.

- (18) Dominguez P, Sánchez J, Alcántara A, Valero F & Sinisterra J. Rational strategy for the production of a new crude lipases from *Candida rugosa*. *Biotechnol Lett* 2005; 27: 499-503.
- (19) Pirt S J. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications. London (UK); 1975.
- (20) Kordel M, Hofmann B, Schomburg D, Schmid R. Extracellular lipase of *Pseudomonas sp* strain ATCC 21808, purification, characterization, Crystallization and preliminary X-ray diffraction data. *J Bacteriol* 1991; 173: 4836-4841.
- (21) Wolski E, Rigo E, Di Luccio M, de Oliveira D and Treichei H. Production and partial characterization of lipases from a newly isolated *Penicillium sp* using experimental design. *Lett Appl Microbiol* 2009; 49:60-66.