

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA  $\alpha$ -L-ARABINOFURANOSIDASA,  $\beta$ -XILOSIDASA y ENDO- $\beta$ -1,4-XILANASA DE DOS RAZAS DE *Colletotrichum lindemuthianum* (PATÓGENA Y NO PATÓGENA) CON DIFERENTES SUSTRATOS NATURALES.**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIADA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

AUTOR

KARLA MORELIA DÍAZ TAPIA

ASESORA:

DRA. MARÍA GUADALUPE ZAVALA PARAMO

CO-ASESORA:

DRA. MARÍA GUADALUPE VILLA RIVERA

Morelia, Michoacán, febrero de 2018

<b>Resumen</b>	3
<b>Abstract</b>	4
<b>1. Introducción</b>	5
<b>2. Antecedentes</b>	7
2.1 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	7
2.1.1 Patotipos	7
2.1.2 Estrategia de nutrición/infección de <i>C.lindemuthianum</i>	7
2.1.3 Fase biotrófica	8
2.1.4 Fase necrotrófica	8
2.2 Pared celular	9
2.2.1 Composición química	10
2.2.1.1 Celulosa	10
2.2.1.2 Hemicelulosas	11
2.2.1.3 Pectina	12
2.2.1.4 Lignina	12
2.2.1.5 Proteínas	13
2.3.1 Degradación enzimática de Arabinosilanos	13
2.5.1 $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas	14
2.5.2 Endo- $\beta$ -1,4-xilanasas	16
2.5.3 B-xilosidasas	18
2.6 Aplicaciones biotecnológicas	19
<b>3. Justificación</b>	21
<b>4. Objetivos</b>	22

Objetivo general	22
Objetivos específicos	22
<b>5. Materiales y métodos</b>	<b>23</b>
5.1 Material biológico	23
5.2 Medios de cultivo	23
5.3 Cinéticas de crecimiento y actividad enzimática	24
5.4 Ensayos de actividad enzimática	25
5.5 Cuantificación de proteína	26
5.6 Análisis estadístico	26
<b>6. Resultados</b>	<b>27</b>
6.1 Crecimiento en placa de <i>C. lindemuthianum</i> en PDA, lirio acuático, ejote, y bagazo de caña.	27
6.2 Biomasa micelial obtenida utilizando diferentes fuentes de carbono	29
6.2.1 Peso húmedo	29
6.2.2 Peso seco	32
6.3 Inducción de actividad extracelular $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas	34
6.4 Inducción de actividad extracelular $\beta$ -xilosidasas	37
6.5 Inducción de actividad extracelular endo- $\beta$ -1,4-xilanasas	40
<b>7. Discusión</b>	<b>43</b>
<b>8. Conclusión</b>	<b>50</b>
<b>9. Literatura citada</b>	<b>51</b>

## RESUMEN

*Colletotrichum lindemuthianum* es un hongo fitopatógeno que provoca antracnosis en la planta del frijol (*Phaseolus vulgaris*). Las hemicelulasas son parte del sistema de degradación de pared celular vegetal del hongo, siendo las endo- $\beta$ -1,4-xilanasa (XYL),  $\beta$ -xilosidasas (XYLO) y  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (ABF) las hemicelulasas más importantes. En el presente trabajo se evaluó en primera instancia el crecimiento micelial en placa de la raza 0 y 1472 de *C. lindemuthianum* en medios de cultivo alternativos preparados con ejote molido, lirio acuático molido y bagazo de caña, y se comparó con medio PDA. Por otra parte, se midió la producción de biomasa y la inducción de actividad endoxilanasa,  $\beta$ -xilosidasa y  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa en Medio Mathur suplementado con glucosa, xilana, lirio acuático molido y bagazo de caña como fuente de carbono en ambas razas de *C. lindemuthianum*. Nuestros resultados mostraron que en medio ejote-agar y lirio-agar el crecimiento de *C. lindemuthianum* fue ligeramente más rápido comparado con medio PDA; en cambio, el medio caña-agar retrasó el crecimiento del hongo. Adicionalmente, la mayor producción de biomasa micelial en medio Mathur (peso húmedo y peso seco) se obtuvo cuando se utilizó xilana y lirio acuático molido como fuente de carbono, siendo la raza 0 de *C. lindemuthianum* la que presentó los mayores valores de biomasa. Por otro lado, al evaluar la inducción de actividad extracelular XYL, XYLO y ABF en medio suplementado con glucosa, se obtuvieron niveles bajos de actividad específica congruentes con el fenómeno de represión catabólica. Los valores de actividad XYL y ABF fueron mayores en cultivos que contenían lirio acuático como fuente de carbono durante los primeros días de inducción, lo que sugiere una actividad coordinada de ambas enzimas en la degradación de hemicelulosa. En ambos casos, la raza 0 presentó niveles más altos de actividad que la raza 1472. La xilana fue el mejor sustrato para la inducción de la actividad XYLO para ambas razas, sin embargo, los valores más altos de actividad se detectaron en el día 5 y 6 para la raza 0 y en el día 11-14 para la raza 1472. En conclusión, la producción de biomasa de *C. lindemuthianum* es mayor cuando se utilizan sustratos complejos como fuente de carbono, adicionalmente, cuando se utiliza lirio acuático se obtiene la mayor producción de enzimas hemicelulolíticas.

Palabras clave: *C. lindemuthianum*, Hemibiotrófico, endo- $\beta$ -(1,4)-xilanasas,  $\beta$ -xilosidasas y  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas.

## ABSTRACT

*Colletotrichum lindemuthianum* is a phytopathogen fungi that causes antrachnose disease on common bean (*Phaseolus vulgaris*). Hemicellulases are important component of its plant cell wall degradation system; endo- $\beta$ -1,4-endoxylanases (XYL),  $\beta$ -xylosidases and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases are the main hemicellulases. In this work, plate mycelial growth of *C. lindemuthianum* races 0 and 1472 was evaluated in alternative solid culture media prepared with ground bean, milled aquatic lily and sugarcane bagasse and compared with PDA media. On the other hand, biomass production and XYL, XYLO and ABF extracellular induction was measured in both races of *C. lindemuthianum* using Mathur culture supplemented with glucose, xylan, water hyacinth and sugarcane bagasse as carbon source. Our results showed that in been-agar and hyacinth-agar the growth of the fungi was slightly faster than PDA. However; sugarcane-agar delayed the growth of *C. lindemuthianum*. Additionally, the best biomass production (wet and dry weight) was observed in xylan and water hyacinth supplemented cultures, where race 0 of *C. lindemuthianum* showed the highest values. Otherwise, agree with catabolic repression phenomenon in cultures supplemented with glucose, lower levels of extracellular XYL, XYLO and ABF production were observed. Specific XYL and ABF activity were highest in cultures supplemented with water hyacinth during first days of growth, this suggest a coordinated activity of both enzymes in hemicellulose hydrolysis. Interestingly, specific activity values of XYL and ABF were highest in race 0 than race 1472. Xylan was the best inductor of XYLO production in both races, nevertheless, highest levels of XYLO production was detected at days 5-6 in race 0 and days 11-14 in race 1472.

In conclusion, mycelia biomass production of *C. lindemuthianum* is highest when complex substrates are used as carbon source. Additionally, water hyacinth is the best inductor of hemicellulolytic enzymes production.

## 1.- INTRODUCCION

*C. lindemuthianum* es un hongo fitopatogéno que provoca antracnosis en la planta del frijol (*P. vulgaris*) (O'Connell et al. 1985). *C. lindemuthianum* presenta una gran diversidad de patotipos, de los cuales 56 han sido localizados en México (Sánchez et al. 2009). De estos patotipos, nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en el estudio de la raza 1472 (raza patógena) y de la raza 0 (raza no patógena).

*C. lindemuthianum* es un hongo hemibiotrófico que durante su fase necrotrófica secreta un conjunto de enzimas que degradan la pared celular del hospedero (Münch 2008). Los polisacáridos que constituyen la pared celular vegetal son celulosa, hemicelulosa y pectina (Burton 2010). Las hemicelulosas son un grupo heterogéneo de carbohidratos y se clasifican como xiloglucanos, xilanos, mananos, glucomanos y  $\beta$ -glucanos con enlaces mixtos. Los arabinoxilanos (AXs) son los más abundantes en la naturaleza y uno de los principales componentes de las materias primas que se investigan como fuentes de biocombustibles (Lagaert et al. 2014). Los AXs están formados por una cadena lineal de xilosas unidas por enlaces glicosídicos  $\beta$ -(1,4), a la cual se unen residuos de arabinosas mediante enlaces glicosídicos  $\alpha$ -(1,3) o (1,2) o ambos, aunque también puede estar sustituido con glucosa o galactosa y estar esterificados con ácidos ferúlicos, diferúlicos y p-cumáricos en posición C(O)-5 de la arabinosa (Scheller & Ulvskov 2010).

Se han descrito tres enzimas esenciales implicadas en la hidrólisis de AXs; las xilanasas (EC 3.2.1.8) de la familia GH11 degradan preferentemente regiones no sustituidas, mientras que las de la familia GH10 prefieren regiones sustituidas (Vardakou et al. 2004). Las  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55) hidrolizan la arabinosa de la cadena principal y actúan sinérgicamente con las endoxilanasas y  $\beta$ -xilosidasas (Conejo-Saucedo et al. 2011). Las  $\beta$ -xilosidasas (EC 3.2.1.37), liberan los residuos de xilosa del extremo no reductor de xilooligosacáridos de un modo exoactivo. Las  $\beta$ -xilosidasas y las endoxilanasas actúan en sinergia, ya que las endoxilanasas generan extremos reductores para las  $\beta$ -xilosidasas, y las  $\beta$ -xilosidasas eliminan los productos finales que inhiben la acción de las endoxilanasas. Recientemente se reportaron exo-oligoxilanasas que liberan el último residuo de xilosa en el extremo reductor de la cadena de xilana (Lagaert et al. 2014). Estas enzimas tienen aplicaciones biotecnológicas importantes en la industria de la panificación, fabricación de alimentos, pre-blanqueo del papel, industria del vino, clarificación de jugos de frutas y producción de biocombustibles (Numan & Bhosle 2006; Juturu & Wu 2012; Kousar et al. 2013).

Hasta el momento se ha evaluado la inducción de la actividad enzimática de algunas enzimas hidrolíticas en *C. lindemuthianum* utilizando fuentes de carbono comerciales y pared celular de *P.*

*vulgaris* (Acosta-Rodríguez 2005; Hernández-Silva 2007; Conejo-Saucedo 2016). Sin embargo, es importante evaluar su inducción con otros sustratos naturales y más complejos.

En el presente trabajo se reporta la producción de biomasa micelial de *C. lindemuthianum* (raza 0 y 1472) así como la inducción de actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa,  $\beta$ -1,4-xilosidasa y endo- $\beta$ -1,4-xilanasas en presencia de glucosa, xilana, lirio acuático y bagazo de caña.

## 2. - ANTECEDENTES

### 2.1 *Colletotrichum lindemuthianum*

*C. lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara, es un hongo fitopatógeno, hemibiotrófico intracelular que pertenece al phylum de los ascomicetes. Este hongo es económicamente importante ya que causa antracnosis en la planta del frijol (*P. vulgaris* L.) (O'Connell et al. 1985).

#### 2.1.1 Patotipos de *C. lindemuthianum*

*C. lindemuthianum* muestra una gran diversidad de patotipos o razas. Diferentes cepas de este hongo infectan diferencialmente un grupo de cultivares de una misma especie hospedera, en este caso la planta del frijol. Se ha utilizado un conjunto de 12 cultivares diferenciales de *P. vulgaris* (cuatro de origen andino y ocho de origen mesoamericano) para, en base a su interacción, hacer la determinación de patotipos. Si algún aislado es incapaz de establecer una interacción compatible con los diferenciales, se le ha designado como patotipo 0 (Rodríguez-Guerra et al. 2006).

Se han reportado más de 100 patotipos de *C. lindemuthianum*, de los cuales 56 están presentes en México y están distribuidos en los estados de Chihuahua, Durango, Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Puebla, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas (González-Chavira et al. 2004; Rodríguez-Guerra et al. 2006; Sanchez et al. 2009).

En México se obtuvieron 30 aislados de la raza 0, provenientes de Durango, Jalisco, Michoacán, México, Tlaxcala y Morelos. Por otra parte, La raza 1472 fue de las razas más virulentas encontradas en México, infectando cuatro de los 12 cultivares diferenciales. La raza 1472 se aisló de los estados de Zacatecas, Hidalgo y México (González-Chavira et al. 2004; Rodríguez-Guerra et al. 2006).

#### 2.1.2 Estrategia de nutrición/infección de *C. lindemuthianum*

*C. lindemuthianum* es un hongo hemibiotrófico, lo cual le da la habilidad para obtener nutrientes tanto de células vivas como células muertas. Durante el proceso de nutrición/infección, *C. lindemuthianum* combina una fase biotrófica corta, en la cual la célula huésped permanece viva seguida por una segunda fase necrotrófica que es altamente destructiva para el tejido huésped (Wijesundera et al. 1989; Münch 2008). El proceso de infección inicia cuando una espóra se adhiere a la superficie del hospedero para después germinar y formar un tubo germinal corto dando como resultado un apresorio melanizado. En seguida, se desarrolla una hifa de penetración sobre la base del apresorio, transformando la presión de

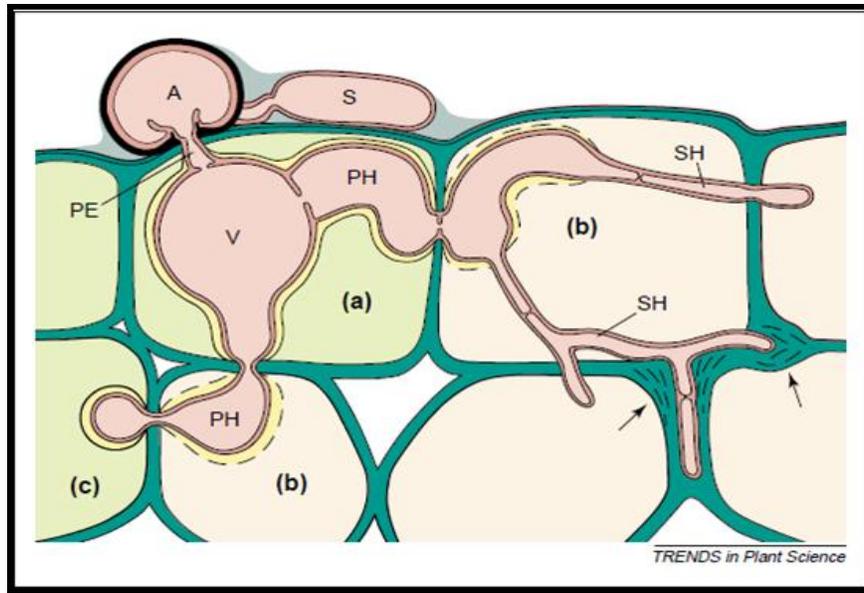
turgencia en fuerza mecánica para perforar la cutícula del hospedero (Fig. 1) (Knogge 1998; Mendgen & Hahn 2002).

### 2.1.3 Fase biotrófica

Después de la penetración en la célula huésped se establece la fase biotrófica, en donde se forma una vesícula de infección sin producir modificaciones de la membrana plasmática de la planta como se ilustra en la figura 1. *C. lindemuthianum* enmascara las hifas invasoras y suprime la defensa del hospedero por medio de una matriz interfacial que separa la pared celular del patógeno de la membrana plasmática de la planta (Perfect 1999; Münch 2008). Posteriormente, el hongo se dispersa a las células próximas produciendo hifas primarias que se invaginan sin penetrar la membrana celular, para finalizar la fase biotrófica gran parte del tejido vegetal debe estar colonizado (Perfect 2001). La nutrición durante la fase biotrófica depende de que la célula huésped este viva y este coordinada por un sistema de transferencia de nutrientes tales como hexosas y aminoácidos de la célula huésped viva hacia el patógeno (Mendgen & Hahn 2002).

### 2.1.4 Fase necrotrófica

La fase necrotrófica inicia después de 48 o 72 horas (dependiendo de las condiciones ambientales) de la germinación de la spora (Perfect 1999). Las hifas del hongo se convierten en hifas secundarias o hifas necrotróficas como se muestra en la figura 1, que son de diámetro menor y se ramifican dentro del tejido vegetal (Perfect 2001). La degradación de la pared celular vegetal es producida por una amplia gama de enzimas hidrolíticas secretadas por el hongo. Para *C. lindemuthianum* se han reportado poligalacturonasas, pectinasas,  $\beta$ -glucosidasas,  $\beta$ -xilosidasas,  $\alpha$ -glucosidasas, mananasas (Anderson 1978), celulasas (Acosta-Rodríguez 2005), xilanasas (Conejo-Saucedo 2016), pectin liasas (Hernández-Silva 2007; Lara-Márquez 2011a), pectato liasas (Cnossen-Fassoni 2013) y endopoligalacturonasas (Centis 1997; Hugouvieux 1997; Dumas 1999; Herbert 2004), las cuales le proporcionan la fuente de carbono necesaria para su crecimiento y reproducción (Ashton 1984; Perfect 2001; Münch 2008).



**Figura 1.** Infección hemibiotrófica por *Colletotrichum lindemuthianum*. S=espora, A=apresorio melonizado, PE=hifa de penetración, (a)=fase biotrófica, V=vesícula, PH=hifas primarias,(b)=fase necrotrófica, SH= hifas secundarias. Tomado de (Mendgen & Hahn 2002).

## 2.2 Pared celular

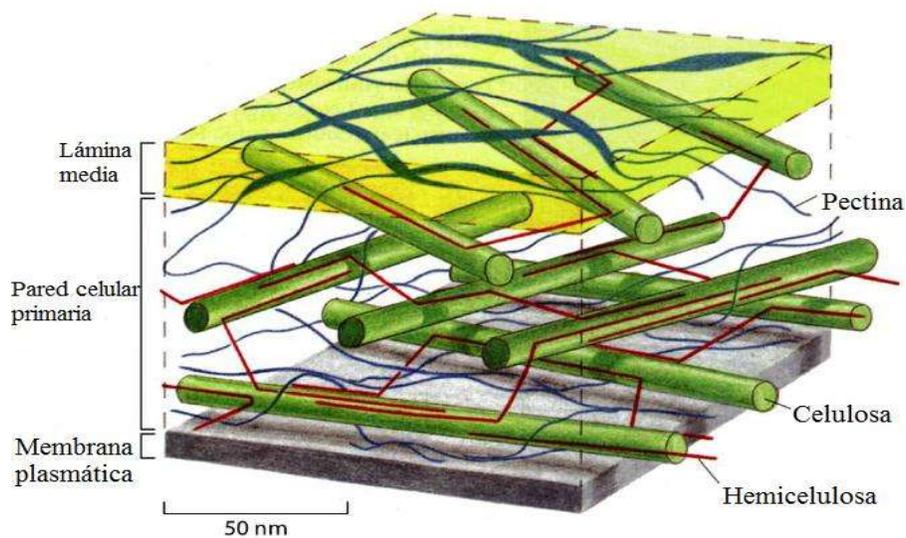
Las paredes celulares vegetales son clave para el crecimiento de las plantas, la diferenciación celular, la comunicación intercelular y es la barrera de protección contra microorganismos (Cosgrove 2005; Keegstra 2010); debido a su porosidad, permiten que el agua y otras moléculas pequeñas se difundan a través de la misma (Burton 2010). Su estructura es muy compleja y variable (Valenciaga 2004), dependiendo del tiempo de formación y composición química la pared celular puede dividirse en pared celular primaria y pared celular secundaria, las cuales son separadas por una lámina media (Fig. 2) (Chen 2014).

La pared celular primaria es un tejido extracelular, fuerte pero flexible que se deposita mientras la célula se está expandiendo (Fry 1988; Cosgrove 2005). La función de una pared celular primaria es proporcionar soporte estructural y mecánico, mantener y determinar la morfología celular, soportar la presión de turgencia en las células, controlar la velocidad y dar dirección al crecimiento celular; promover la morfogénesis de las plantas, regular la difusión del material en la lámina media, reserva de carbohidratos, resistencia a patógenos y a la deshidratación; así como activar la interacción entre las moléculas señal y las células (Chen 2014). La pared celular secundaria comienza a formarse cuando las células dejan de crecer y el área superficial de la pared celular primaria ya no aumenta y proporciona

resistencia y rigidez a la célula (Zhang 2015). Existe una capa intercelular llamada laminilla media, que se compone principalmente de coloides amorfos con una gran hidrofobicidad y ayuda a la unión de la pared celular primaria con la secundaria (Chen 2014).

### 2.2.1 Composición química de la pared celular

Las paredes celulares primarias están compuestas principalmente de celulosa, hemicelulosa, pectina, glicoproteínas estructurales, proteínas (expansinas) y algunos iones como el calcio (Albersheim 1994; Chen 2014); mientras que una pared secundaria está formada además de celulosa y hemicelulosa, de lignina (Fig. 2) (Valenciaga 2004).



**Figura 2.** Modelo de la estructura de la pared celular primaria. Tomado de Scheller & Ulvskov 2010.

#### 2.2.1.1 Celulosa

La celulosa forma la primera red microfibrilar en la pared primaria y secundaria (Caffall 2009). Constituye aproximadamente el 40-50% de todo el material vegetal (Zhang 2015), determina el armazón de la pared celular y es el polisacárido principal de las paredes celulares vegetales. Es una macromolécula lineal de unidades de glucosa, unidas por enlaces (1,4)-glicosídicos y además son capaces de formar complejos microfibrilares no covalentes (Lerouxel 2006; Burton 2010; Chen 2014).

### 2.2.1.2 Hemicelulosas

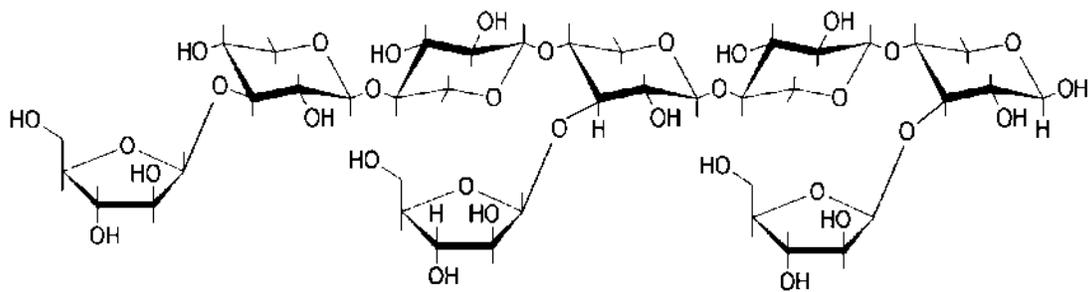
Las hemicelulosas representan aproximadamente el 20-35% de la biomasa lignocelulósica (Saha 2003). Las hemicelulosas son heteropolisacaridos altamente ramificadas en sus cadenas de xilosa o en cadenas de manosa y glucosa con galactosa, arabinosa y ramificaciones de ácido acético o ácido glucurónico (Conejo-Saucedo 2011). Las hemicelulosas se enlazan a las microfibrillas de celulosa y forman enlaces covalentes con la lignina, contribuyendo a la resistencia de la pared celular (Valenciaga 2004). La función principal de las hemicelulosas es participar en la construcción de la estructura de la pared celular y regular el proceso de crecimiento celular (Chen 2014).

En el 2010, Henrik Vibe Scheller y Peter Ulvskov definieron cuatro componentes principales las hemicelulosas: xiloglucano, xilanos, mananos y glucomananos.

La xilana es el principal polisacárido no celulósico en las paredes celulares primarias, constituyendo aproximadamente el 20% de la pared (Scheller & Ulvskov 2010). Comprende una cadena lineal de  $\beta$ -(1,4)-D-xilopiranosas y cadenas derivadas de ácido 4-oximetilglucurónico. Debido a que la xilana suele estar asociada con varios residuos de arabinosa u otros monosacáridos unidos a la cadena principal, se puede presentar como xiloglucanos (XG), arabinoxilanos (AX), glucuronoarabinoxilanos (GAX), glucuronoxilano (GX) y mananos (Caffall 2009; Scheller & Ulvskov 2010; Chen 2014).

El Xiloglucano (XG) es un componente de las hemicelulosas en las paredes celulares primarias (Scheller & Ulvskov 2010). La cadena principal de xiloglucano es similar a la de la celulosa y está compuesta por D-glucopiranosas con ramificaciones de xilosa unidas con enlaces  $\beta$ -(1,4). El XG también puede tener fucosa y arabinosa (Cosgrove 2005; Chen 2014).

Los arabinoxilanos (AXs) (Fig. 3), son un grupo heterogéneo de polisacáridos de la pared celular, presentes en los granos de cereales como endospermo amiláceo (harina) y capas externas de granos de cereales (Ebringerová 2006; Magdalena de Jesús 2014). Los AXs son de las hemicelulosas más abundantes en la tierra y constituyen uno de los componentes principales de las materias primas que se investigan como fuentes de biocombustible (Lagaert et al. 2014). Su estructura está formada por una cadena lineal de unidades de xilosa unidas por enlaces  $\beta$ -(1,4) glicosídicos, a la cual se unen residuos de arabinosa, glucosa, galactosa, ácido glucurónico, ácido ferúlico, ácido acético, entre otros, mediante enlaces glicosídicos  $\alpha$ -(1,3),  $\alpha$ -(1,2) o ambos. (Morales et al. 2013; Magdalena de Jesús 2014).



**Figura 3.** Estructura de Arabinoxilano (AX).

Dependiendo sus ramificaciones, los mananos se clasifican en glucomananos y galactomananos. Los glucomananos se encuentran principalmente en maderas duras, su cadena principal está constituida con residuos de  $\beta$ -1,4-D-manosa unidos a  $\beta$ -1,4-glucosa. Los galactomananos, por otro lado; se encuentran en maderas blandas y se componen de residuos de  $\beta$ -1,4-D-manosa unidos a residuos de  $\alpha$ -1,6-D-galactosa o residuos  $\beta$ -1,4-D-glucosa (Conejo-Saucedo 2011; Chen 2014). Los mananos han sido muy estudiados como compuestos de almacenamiento de semillas, aunque se encuentran en cantidades variables en las paredes celulares (Scheller & Ulvskov 2010).

#### 2.2.1.3 Pectina

La pectina es uno de los componentes de la pared celular primaria de las plantas, es el principal constituyente de la lámina media y también se encuentra en células en división y en áreas de contacto entre células que tienen una pared celular secundaria (Lara-Márquez 2011a). La pectina lleva a cabo una función importante en la resistencia mecánica, la porosidad, la adhesión y la rigidez de la pared celular (Burton 2010). Las pectinas se caracterizan por ser un grupo heterogéneo de polisacáridos ricos en ácido galacturónico que conforman hasta un 35% de la pared celular primaria de las dicotiledóneas y de las monocotiledóneas. Las pectinas se clasifican en homogalacturonanos (HGs), ramnogalacturonanos I (RGIs) y ramnogalacturonanos II (RGIIs) y en algunas especies particulares también se pueden encontrar xilogalacturonanos y apiogalacturonanos (Salazar Iribe 2013).

#### 2.2.1.4 Lignina

La lignina es un polímero polifenólico con una red tridimensional, que está compuesta básicamente por unidades de fenilpropano unidas entre sí por el acoplamiento irregular de C-C y C-O. Constituye el principal polímero natural junto con la celulosa y es responsable de la rigidez de la planta, la resistencia

de tejidos vasculares, conducción de solutos, agua y sales minerales necesarias para la supervivencia de la planta, además de la protección contra fenómenos oxidativos y ataques de parásitos. Los tres monómeros principales que forman la lignina son el alcohol cumarílico, el alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico (Valenciaga 2004; Chen 2014).

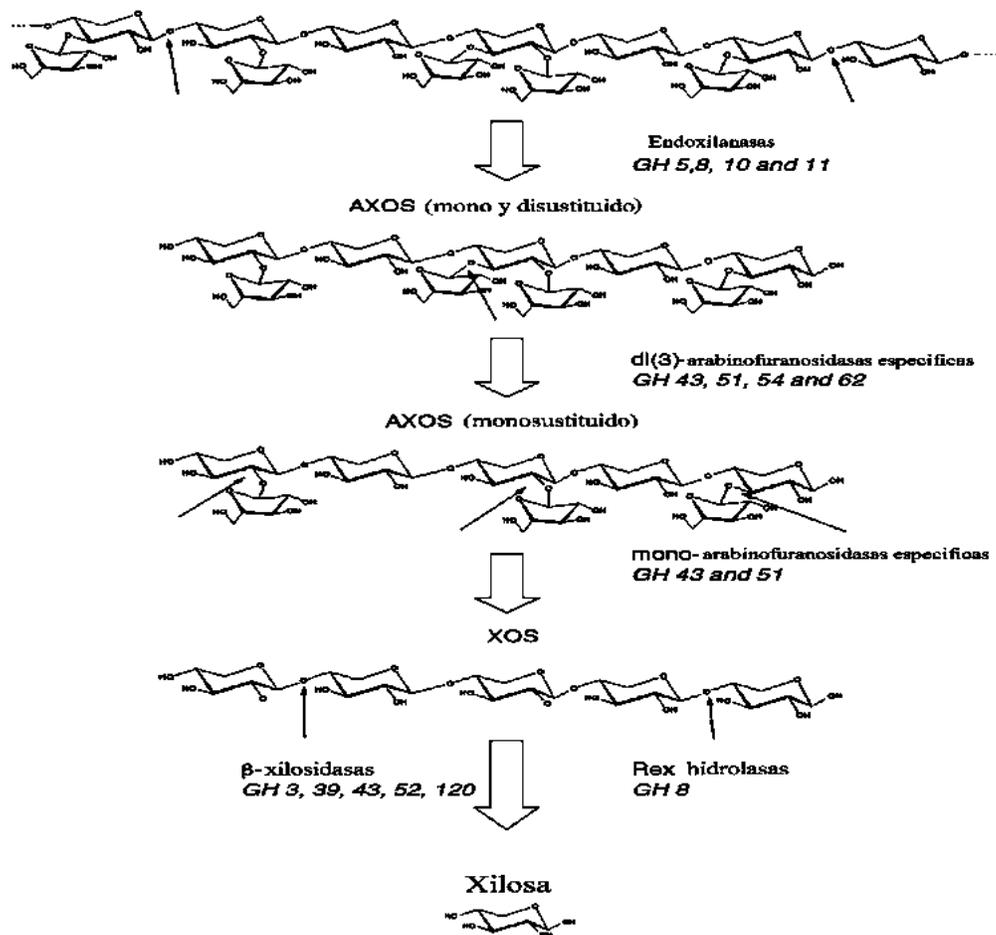
#### 2.2.1.5 Proteínas

Las proteínas de la pared celular (CWP) son componentes esenciales de las paredes de las células vegetales implicadas en las modificaciones de los componentes de la pared celular, la estructura, la señalización y las interacciones con las proteínas de la membrana plasmática en la superficie celular (Jamet et al. 2006). Las proteínas estructurales de la pared constituyen 2-10% del peso seco de la pared y comprenden una variedad de proteínas asociadas a la pared. Las proteínas arabinogalactano (AGPs), las proteínas ricas en prolina (PRPs), las proteínas ricas en glicina (GRPs), las extensinas. Son proteínas que integran a la pared celular y podrían ayudar al reforzamiento estructural de la pared y actuar en vías reguladoras (Caffall 2009).

#### 2.3.1 Degradación enzimática de arabinosilanos (AX)

La degradación de las hemicelulosas por parte de hongos patógenos, impone varios desafíos. Dado que es un polímero insoluble y asociado con celulosa y lignina además de un polímero de alto peso molecular con estructura variable, se requiere de una acción coordinada de enzimas hidrolíticas para su degradación (Kousar et al. 2013). Las enzimas que degradan la hemicelulosa pueden dividirse en enzimas principales que hidrolizan la cadena central y enzimas accesorias que hidrolizan las ramificaciones que pueden presentar impedimentos estéricos para las enzimas despolimerizantes (Dyk & Pletschke 2012).

La cadena principal de AX es degradada por glicosil hidrolasas (GH) que son capaces de hidrolizar los enlaces glicosídicos presentes en AX, GX y arabinoglucuronoxilano arabinosilooligosacáridos (AXOS) (Magdalena de Jesús 2014). Dentro de este conjunto de enzimas se encuentran la endo- $\beta$ -1,4-xilanasa (EC 3.2.1.8),  $\beta$ -xilosidasa (EC 3.2.1.37) y  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55), feruloil estereasa (EC 3.1.1.73) y/o acetil xilanoestereasa (EC 3.1.1.72) (Fig. 4) (Rasmussen et al. 2012).



**Figura 4.** Esquema de la degradación de arabinoxilanos (AX) Tomado de Lagaert et al. 2014.

### 2.5.1 $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (ABF)

La  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa ( $\alpha$ -L-arabinofuranosida arabinofuranohidrolasa, EC 3.2.1.55, AF) es una enzima de tipo exo, es considerada una enzima accesoria que participa en la liberación de residuos L-arabinofuranosyl (Saha 2000). Estas enzimas actúan sinérgicamente con las endoxilanasas (Lagaert et al. 2014). Las ABFs catalizan específicamente la hidrólisis de residuos terminales no reductores ( $\alpha$ -L-1,2), ( $\alpha$ -L-1,3) y ( $\alpha$ -L-1,5) de diferentes oligosacáridos y polisacáridos. Hay una gran variedad de ABFs clasificadas dentro de las familias 3, 43, 51, 54 y 62 de las Glicosil Hidrolasas (GH) (<http://www.cazy.org/>). Algunas características importantes de las ABFs caracterizadas se resumen en la Tabla 1. Dentro de la familia GH3, existen varias enzimas bifuncionales degradadoras de AX. Todas las hidrolasas GH3 AX de microorganismos muestran exclusivamente actividad xilosidasa sobre sustratos

tales como xiloligosacáridos (XOS), xilana y AX (Lagaert et al. 2014). Existe muy poca información acerca de la estructura tridimensional de las ABFs en bases de datos de proteínas, sin embargo las enzimas GH3 tienen una topología barril TIM ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> en el extremo N-terminal, unido con un dominio  $\beta$ -sándwich ( $\alpha/\beta$ ). Las enzimas de la familia GH43 tienen un dominio catalítico con una topología que consta de un dominio catalítico  $\alpha$ -hélice. Se cuenta con algunas estructuras de ABF cristalizadas: CAB13699 de *Bacillus subtilis*, cluster A2, y CAL81199 de *Humicola insolence*, cluster C1 (Numan & Bhosle 2006; Lagaert et al. 2014). Se ha reportado ensayos de actividad enzimática de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa en cebada como sustrato natural (Lee et al. 2003).

Por otra parte, la familia GH51 es exclusivamente de arabinofuranosidasas, se han cristalizado a partir de *Bifidobacterium longum* (AAO84266), *Clostridium thermocellum* (ZP\_00503782), *Geobacillus stearothermophilus* (AAD45520) y *Thermobacillus xylanilyticus* (CAA76421). Su estructura tridimensional cuenta con un dominio catalítico con topología de barril TIM con un N-terminal ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, seguido de un dominio  $\beta$ -sándwich; cuya función es desconocida (Lagaert et al. 2014). Se han realizado estudios donde se determinó la estructura cristalizada de la ABF de *Thermotoga marítima* (Imura et al. 2012). En la familia GH54 existen 22 enzimas caracterizadas, son proteínas fúngicas muy conservadas y muestran exclusivamente actividad arabinofuranosidasa sobre sustratos naturales. En 2004 se cristalizó una ABF de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 (AkAbf54), de la familia GH54, la cual es una proteína monomérica organizada en dos dominios, un dominio catalítico C-terminal con una topología de  $\beta$ -sandwich, unido a un dominio con una topología de  $\beta$ -trébol con tres subdominios ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) (Miyanaga et al. 2004; Miyanaga et al. 2006).

La familia GH62 es una pequeña familia donde las enzimas son de origen bacteriano o de eucariotas, que comprende exclusivamente arabinofuranosidasas. Las ABFs de la GH62 actúan específicamente en AXOS y AX. Se determinaron las especificidades de sustrato de las enzimas GH62 para las sustituciones específicas de arabinosa en AXOS Y AX para ACE85320 de *C. japonicus*, CAM07245 de *Penicillium capsulatum* y BAG71682 de *Penicillium chrysogenum*, las cuales son capaces de separar arabinosa monosustituída pero no xilosa disustituída en AX o AXOS (Lagaert et al. 2014). Se cuenta con dos ABFs cristalizadas de la GH62, la primera del basidiomicete *Ustilago maydis* (UmAbf62A) y la segunda del ascomicete *Podospora anserina* (PaAbf62A) (Siguier et al. 2014).

Se ha evaluado la actividad extracelular ABF en hongos así como su función específica en la degradación de AX, por ejemplo: la participación de dos  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa de *A. kawachii*

(AkAbfA y AkAbfB) en la degradación de AX y en la fabricación de shoshu. Se realizaron ensayos de actividad enzimática para observar el efecto de diferentes fuentes de carbono como L-arabitol, L-arabinosa, salvado de trigo, hojuelas de avena, xilosa y glucosa, sobre la producción de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidas de *A. kawachii* IFO4308 (Koseki et al. 2003).

#### 2.5.2 Endo- $\beta$ -1,4-xilanasa (XYL)

Las endoxilanasas son producidas por microorganismos como hongos y bacterias (Polizeli et al. 2005). Estas enzimas son responsables de la despolimerización de la xilana en la pared celular vegetal (Collins et al. 2005). La endo- $\beta$ -1,4-xilanasa (EC. 3.2.1.8) es una enzima capaz de hidrolizar los enlaces  $\beta$ -1,4 glicosídicos en la cadena principal de xilana, liberando xilo-oligómeros (Conejo-Saucedo 2011). Las endo- $\beta$ -1,4-xilanasas se encuentran en las familias GH 5, 7, 8, 10, 11, 26 y 43 (<http://www.cazy.org/>). La tabla 1 presenta algunas características de estas enzimas. Las enzimas de la familia GH10 son enzimas organizadas estructuralmente por un dominio de unión a celulosa y un dominio catalítico conectados por un péptido de unión, adoptando una topología de barril TIM ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>. Por otra parte, las endo- $\beta$ -1,4-xilanasas de la familia GH11 presentan una topología  $\beta$ -jellyroll (Juturu & Wu 2012), y debido a su tamaño relativamente pequeño, pueden pasar a través de los poros de la red de hemicelulosa y llevar a cabo una hidrólisis eficiente. Estas enzimas se consideran exclusivamente activas en sustratos que contienen D-xilosa (Collins et al. 2005)

Tabla 1. Características de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas ( $\alpha$ -L-ABF), endo- $\beta$ -1,4-xilanasa (endo-XYL) y  $\beta$ -xilosidasas ( $\beta$ -XYLO) (Lagaert et al. 2014).

Enzima	Familia	Organismos donde se ha localizado	Sustrato	Grado de polimerización requerido	Sustitución	Mecanismo	Residuos catalíticos	Bifuncional
Arabinofuranosidasas (ABF) EC.3.2.1.55	GH3	Bacterias, plantas y hongos	pNP-Xyl, pNP-Ara, pNP-Glu	2-5	ND	Retención	Glu y Asp	SI
	GH43	Bacterias, hongos y plantas	pNP o MUF	ND	Disustituida	Inversión	Asp, Glu, Asp167, Tyr166	SI
	GH51	Hongos, bacterias y plantas	pNP, MUF	ND	Monosustituida y disustituida	Retención	Glu175, Glu294, Trp99	SI
	GH54	Bacterias y hongos	pNP-Xyl, pNP-Ara	2-3	disustituida	Retención	Glu221, Asp297, Asp219,	SI
	GH62	Bacterias	pNP-Ara↓	ND	Monosustituido	Inversión	Glu y Asp	NO
Xilanasas (XYL) EC.3.2.1.8		Bacterias, hongos	pNP	3	ND	Inversión	Glu70, Asp263 y Asp128	NO
	GH8	Bacterias, hongos	ND	ND	ND	Retención	Glu405, Glu131, Glu237	ND
	GH11	Bacterias y hongos	ND	ND	ND	Retención	Glu178, Glu86	NO
Xilosidasas (XYLO) EC.3.2.1.37	GH3	Bacterias, plantas y hongos	pNP-Xyl, pNP-Ara, pNP-Glu	2-5	ND	Retención	Glu y Asp	SI
	GH39	Mamíferos y bacterias	pNP-Xyl	2-3	ND	Retención	Glu277, Glu160, Glu165	NO
	GH43	Hongos, bacterias y plantas	pNP o MUF unidos a monosacáridos	2-6	Disustituido	Inversión	Asp15, Glu187, Asp	SI
	GH52	Bacterias	pNP-Xyl	4-5	ND	Retención	Glu337, Glu413	NO
	GH30	Bacterias	pNP-Xyl, pNP-Glu	ND	ND	Retención	Glu y Glu	SI
	GH116	Bacterias	pNP-Glu, pNP-Xyl	ND	ND	Retención	Glu y Asp	SI
	GH120	Bacterias	ND	2-3	ND	Retención	Asp382 y Glu405	NO

ND = No determinado, pNP = p-Nitrofenil, pNP-Ara=p-Nitrofenil-arabinosido, pNP-Xyl=p-Nitrofenilxilosido, pNP-Glu=p-Nitrofenil- glucósido, MUF=metilumbeliferil.

Durante la hidrólisis enzimática, no todos los enlaces glicosídicos son accesibles para una sola enzima, además la accesibilidad cambia durante la hidrólisis. En un grupo de enzimas, cada una tiene una función específica lo que conlleva a un proceso de hidrólisis eficiente, el cual podría ser utilizado como una estrategia del microorganismo para degradar componentes de la pared celular vegetal, este es el caso de las xilanasas donde podemos distinguir dos clases de actividades: (a) Las endoxilanasas que no degradan sustratos ramificados con arabinosas, estas enzimas no actúan sobre puntos de ramificaciones con residuos arabinosyl, son capaces de liberar xilo-oligosacáridos más grandes que la xilobiosa pero no pueden actuar sobre xilotriosa y xilobiosa, (b) Las endoxilanasas que hidrolizan sustratos ramificados con arabinosa, estas enzimas actúan sobre la cadena principal de xilana en puntos con ramificaciones y liberan principalmente arabinosa, xilobiosa y xilosa, y también actúan sobre puntos con ramificaciones que inician con una arabinosa produciendo xilo-oligosacáridos, (c) Las exo- $\beta$ -1,4-D-xilanasa, estas

enzimas actúan en la eliminación de las unidades de xilosa del extremo no reductor de la cadena principal del xilano. (Juturu & Wu 2012).

Debido a la importancia de las xilanasas en la despolimerización de las hemicelulosas, se cuenta con varias proteínas cristalizadas a partir de hongos y bacterias (<http://www.cazy.org/>). Las endo- $\beta$ -1,4-xilanasas tienen un peso molecular de 7-60 kDa y generalmente son más activas a pH 3.5-6.0 y temperatura de 40-60°C (Milagres et al. 2005).

Se ha reportado el crecimiento del hongo anaerobio *Neocallimastix sp.* en presencia de paja de trigo, celulosa y xilana donde se observaron niveles altos de actividad xilanasas y niveles bajos de actividad celulasas. Adicionalmente, se determinó la actividad XYL en el mismo hongo utilizando glucosa, xilosa o celobiosa como fuente de carbono; las actividades de xilanasas detectadas durante el crecimiento de *Neocallimastix sp.* en medios que contenían glucosa, xilosa o celobiosa sugirieron que la producción enzimática era constitutiva (Lowe et al. 1987). En el 2001, se estudió una endoxilanasas (1-4- $\beta$ -D-xilana xilano-hidrolasa, EC. 3.2.1.8) por fermentación de *Rhizopus oryzae*, donde se utilizaron diferentes fuentes de carbono que contenían xilana, trigo, bagazo de algodón, cascara de avellana, maíz, hojuelas de avena, productos de desecho lignocelulósicos de bajo costo (Bakir et al. 2001). En el 2007, se reportó el uso potencial de algunos residuos agropecuarios y se usaron como fuentes de carbono bagazo de caña, aserrín y salvado de trigo para la producción de xilanasas por la cepa ANL301 de *A. niger*. En cultivos con salvado de trigo se obtuvo el nivel más alto de actividad xilanasas, concluyendo que el uso de agro-residuos en la producción de enzimas tales como las xilanasas disminuirá su costo de producción y al mismo tiempo reducirá la contaminación ambiental debida a estos desechos (Okaför et al. 2007). Por último, se determinó que la xilanasas secretada por el patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* se induce en presencia de pared celular de tallo y raíz de clavel (Martínez et al. 2012).

### 2.5.3 $\beta$ - xilosidasas (XYLO)

Las  $\beta$ -xilosidasas son enzimas hidrolíticas que desempeñan un papel importante en la degradación del xilano, actuando sobre xilobiosa y xilo-oligosacáridos desde el extremo no reductor (Knob et al. 2010). Estas enzimas hidrolizan preferentemente a enlaces  $\beta$ -1,4-xilopiranosas (Herrmann et al. 1997). Las  $\beta$ -xilosidasas han sido purificadas y caracterizadas bioquímicamente de muchos géneros bacterianos y fúngicos. De acuerdo a su secuencia de aminoácidos, las XYLO se han clasificado dentro de las familias de GH3, 39, 43, 52, 30, 116 y 120 (<http://www.cazy.org/>); algunas características importantes de estas

proteínas se resumen en la tabla 1. Las  $\beta$ -xilosidasas de la GH39 de *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* y *Clostridium stercorarium* (AAA27369 y AAA23063) presentan actividad limitada sobre xilobiosa y actividad alta sobre xilotriosa. (Lagaert et al. 2014).

La mayoría de las  $\beta$ -xilosidasas de hongos pertenecen a la familia GH43, una característica estructural común de las XYLO de la familia GH43 es un dominio de cinco hélices con topología  $\beta$ -propeller que comprende de un ácido catalítico y una base catalítica. Estas enzimas son activas en un amplio rango de pH que va de 2.0 a 9.5 y temperaturas desde 30 hasta a 80°C, teniendo una mayor actividad a 60°C. (Juturu & Wu 2012; Kousar et al. 2013).

En 2004 se reportó una producción muy alta de  $\beta$ -xilosidasa en el hongo *Scytalidium thermophilum* cuando se creció en cultivos con xilana como fuente de carbono (Zanoelo et al. 2004). Tres años más tarde se identificaron nuevas actividades de enzimas degradadoras de xilana en *Aspergillus* spp. Pero se enfocó en las cepas que producen actividad  $\beta$ -xilosidasa (Pedersen et al. 2007).

## 2.6 Aplicaciones biotecnológicas de las hemicelulasas

La biomasa lignocelulósica (celulosa, hemicelulosa y lignina) posee un amplio potencial en diversos campos, por ejemplo en la producción de químicos y biocombustibles (Ebringerová 2006; Isikgor & Becer 2015). Particularmente la utilización de residuos lignocelulósicos producidos en la silvicultura, producción de celulosa y papel y la agricultura se está volviendo cada vez más interesante (Conejo-Saucedo 2011). Las hemicelulosas han sido utilizadas también en la producción de geles, películas, revestimientos, adhesivos y aditivos gelificantes, estabilizantes y mejoradores de la viscosidad en alimentos y farmacia, así como en otras ramas industriales (Ebringerová 2006).

La importancia de las enzimas degradadoras de lignocelulosa está bien definida debido a su papel en muchos procesos industriales y biotecnológicos. Esto dio como resultado el restablecimiento de una nueva era para la utilización eficiente de los materiales de residuos agrícolas baratos.

Por lo anterior, las hemicelulasas poseen un potencial biotecnológico muy importante, en la industria de la pulpa y el papel por ejemplo, el concepto de blanqueo asistido por enzimas se basó en la realización de la hidrólisis limitada de hemicelulosas en pulpas, principalmente xilanasas, aumentando la extracción de lignina de las pastas kraft (Suurnäkki et al. 1997). Adicionalmente, las endo- $\beta$ -1,4-xilanasas se

utilizan en procesos de sacarificación de xilana a xilosa, licuefacción de mucílago de café, fabricación de masa en panadería, recuperación de aceites de minas subterráneas, extracción de pigmentos y aceites vegetales, así como la producción de ensilado (Juturu & Wu 2012).

Por otro lado, al ser las  $\beta$ -xilosidasas enzimas clave en el sistema xilanolítico, también se han utilizado biotecnológicamente en procesos como la maceración de verduras, preparación de productos horneados y pigmentos de alto contenido de fibras, condimentos, extractos de aceites vegetales y almidón, industrias para detergente, así como la producción de polisacáridos farmacológicamente activos para ser utilizados como agentes antimicrobianos o antioxidantes (Knob et al. 2010).

Gracias a su papel desramificante y su acción coordinada y sinérgica con XYLOs y XYLs en la degradación de hemicelulosa, las ABFs se han utilizado en diversos procesos agroindustriales que incluyen a producción de compuestos medicinales, el mejoramiento de los sabores del vino, aumento de la calidad del pan, el tratamiento de la pulpa del papel, la clarificación del jugo de frutas, la producción de bioetanol y la síntesis de oligosacáridos (Numan & Bhosle 2006).

### 3. JUSTIFICACION

*C. lindemuthianum* es un hongo fitopatógeno que afecta cultivos de frijol (*P. vulgaris*), posee la peculiaridad de presentar una gran diversidad patotípica (Rodríguez-Guerra et al. 2006). Durante el proceso de nutrición/infección de *C. lindemuthianum* se produce un conjunto de enzimas que actúan colectivamente para la degradación de la pared celular vegetal (Perfect 2001), las cuales son cruciales para el establecimiento de la infección y que adicionalmente poseen un potencial biotecnológico muy importante.

Dentro nuestro grupo de trabajo se han realizado aportaciones importantes respecto al análisis y caracterización de algunos genes codificantes de enzimas líticas (Acosta-Rodríguez 2005; Lara-Márquez 2011b; Villa-Rivera 2016; Conejo-Saucedo 2016; Conejo-saucedo 2017), así mismo, se ha avanzado en la medición de algunas actividades enzimáticas: celulasa (Acosta-Rodríguez 2005), pectin liasa (Lara-Márquez 2011a), xilanasas (Conejo-Saucedo 2016) y  $\beta$ -xilosidasas (Conejo Saucedo 2011), utilizando como inductores fuentes de carbono comerciales y pared celular purificada de *P. vulgaris*. Con el objetivo de corroborar y ampliar la información obtenida de investigaciones anteriores, resulta importante analizar la actividad enzimática de las hemicelulasas endo- $\beta$ -1,4-xilanasas,  $\beta$ -xilosidasa y  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa en *C. lindemuthianum* utilizando ahora fuentes de carbono naturales más complejas y poder contrastar con fuentes de carbono comerciales ya probadas como la xilana, para de esta manera evaluar a *C. lindemuthianum* como un buen candidato para la degradación y procesamiento de sustratos complejos. Por lo anterior, se seleccionó como inductores de la actividad enzimática al lirio acuático y bagazo de caña. El lirio acuático representa un problema ambiental debido a que su excesivo crecimiento provoca la contaminación de ríos, lagos y lagunas (Hernández 2015). El bagazo de caña tiene antecedentes en donde se utilizó como fuente de carbono para observar el efecto de las enzimas hemicelulolíticas con hongos (Goldbeck et al. 2016).

Por lo tanto, el presente trabajo aportará información importante que posteriormente pueda tener una aplicación biotecnológica como alternativa en la eliminación de residuos naturales contaminantes.

Adicionalmente, la evaluación del crecimiento en placa de *C. lindemuthianum* utilizando este tipo de sustratos, aportará información para una futura implementación de medios de cultivo alternativos para hongos a bajo costo y que además conserve las cepas en óptimas condiciones.

## **4. OBJETIVOS:**

### **4.1. Objetivo general:**

Analizar la actividad extracelular de la  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa,  $\beta$ -xilosidasa y endo- $\beta$ -1,4-xilanasa producida por *Colletotrichum lindemuthianum* raza 0 y 1472 utilizando diferentes sustratos complejos.

### **4.2 Objetivos específicos:**

1. Evaluar la producción de biomasa micelial en placa de *C. lindemuthianum* (raza 0 y 1472) con lirio acuático, bagazo de caña y ejote.
2. Determinar la biomasa micelial *C. lindemuthianum* (raza 0 y 1472) en cultivos suplementados con glucosa, xilana, lirio acuático y bagazo de caña.
3. Evaluar la actividad enzimática de la  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa,  $\beta$ -xilosidasa y endo- $\beta$ -1,4-xilanasa inducida con glucosa, xilana, lirio acuático y bagazo de caña.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Material biológico**

Se utilizaron dos razas del hongo fitopatógeno *Colletotrichum lindemuthianum*, la raza 0 o no patógena y la raza 1472 o patógena pertenecientes al cepario del Laboratorio de Estudios en Enzimas Líticas de Pared celular Vegetal del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB), de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

### **5.2 Medios de cultivo**

#### **5.2.1 Medio Papa-Dextrosa-Agar**

El micelio de *C. lindemuthianum* se mantuvo en medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA), de acuerdo a French y Hebert (1982), el cual se preparó de la siguiente manera: se utilizaron 250 gramos de papas frescas de aspecto saludable cortadas en cubos pequeños, se cocieron en un matraz Erlenmeyer de 1 litro con 500 ml de agua destilada ( $H_2O_d$ ), se filtró con gasa y se agregaron 15 gramos de dextrosa y 20 gramos de agar bacteriológico previamente disueltos en 100 ml de  $H_2O_d$ . Por último se aforó a un litro y se esterilizó en un matraz Erlenmeyer de dos litros en olla de presión (Presto modelo 79291 (2L) por 15 minutos a 15 libras de presión. Finalmente el medio se distribuyó en cajas de Petri (100 x 20 mm) con 25 ml cada una.

#### **5.2.2 Medio Lirio-Agar**

Para las placas de Lirio-Agar se agregó lirio acuático seco y molido previamente al 2.5% y 20 g de agar bacteriológico en un litro de  $H_2O_d$ , se agitó suavemente y después se esterilizó en olla de presión. Se distribuyó en cajas de Petri (100 x 20 mm) con 25 ml cada caja.

#### **5.2.3 Medio Ejote-Agar**

Se agregaron 250 g de ejotes frescos, cocidos y molidos en licuadora y 20 g de agar bacteriológico a un litro de  $H_2O_d$ . Se realizó una esterilización en olla de presión y se distribuyó en cajas de Petri con 25 ml en cada caja.

#### **5.2.4 Medio Mathur modificado**

El medio mínimo de Mathur modificado se preparó agregando 2.5 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 2.72 g de  $KH_2PO_4$ , 5.28 g de ácido L-glutámico y glucosa (BD, Bioxon), xilana de abedul (SIGMA), lirio acuático

(seco y molido) y bagazo de caña (molido en licuadora) al 2.5% como fuente de carbono en un litro de H<sub>2</sub>O destilada desionizada. Se ajustó el pH a 5.2 con NaOH 10 N (Potenciómetro: ORION 3 STAR pH Benchstop, Thermo scientific) y se aforó a un litro con agua desionizada. Finalmente se esterilizó en una olla de presión.

### 5.3 Cinéticas de crecimiento y actividad enzimática

#### 5.3.1 Crecimiento en placa

Para evaluar el crecimiento en placa, se inoculó 1 pieza de 5 mm de diámetro tomada de la periferia de micelio de *C. lindemuthianum* raza 1472 y 0 crecido en PDA, cada condición por duplicado. Se incubaron a temperatura ambiente y se midió el crecimiento cada 24 horas.

#### 5.3.2 Inducción de actividad enzimática

Se inocularon 4 piezas de 5 mm de diámetro tomadas de la periferia del micelio de *C. lindemuthianum* raza 0 y 1472 (crecidos en PDA a temperatura ambiente durante 13 días), en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 25 ml de medio Mathur suplementado con glucosa, xilana, lirio acuático y bagazo de caña como fuente de carbono. Se mantuvieron en agitación constante (125 rpm) en una incubadora orbital (Thermo scientific modelo 4353) a 18 °C. Se determinó el peso húmedo, seco y la actividad enzimática cada 24 h por 12 días, posterior a los 12 días, se realizaron las mediciones cada 48 horas (14 y 16 días). Cada condición se evaluó por duplicado.

#### 5.3.3 Obtención de biomasa micelial

Para separar el medio extracelular de la biomasa micelial, se filtró el medio de cultivo a través de una unidad de filtración (Nalgene, Código 300-4050) empleando papel filtro Whatman (3 mm) acoplada a una bomba de vacío, el sobrenadante se mantuvo en hielo y posteriormente se utilizó para determinar la actividad enzimática y la concentración de proteína.

El peso húmedo del micelio se determinó pesando el papel filtro con el micelio y se le restó el peso de un papel filtro húmedo y el peso inicial de los 4 inóculos. Posteriormente, se trasladó a una mufla (LAB-LINE instrumentos inc.) donde se dejó durante 20 horas; transcurrido este tiempo, se determinó peso seco.

## 5.4 Ensayos de actividad enzimática

Con el objetivo de eliminar contaminantes que pudieran interferir con la determinación de actividad enzimática, el medio extracelular libre de células fue sometido a filtración por columna de Bio-Gel P-6 de 10 ml equilibrada y eluída con acetato de sodio 50 mM, pH 5.0. Una vez descartado el volumen de exclusión, se colectaron cuatro fracciones de 1.5 ml y se mantuvieron en hielo.

### 5.4.1 Ensayo de actividad $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (ABF)

La reacción estándar para la determinación de actividad ABF contenía: 40  $\mu$ l de buffer de acetato de sodio 50 mM pH 5.0, 50  $\mu$ l de extracto filtrado por columna y 5  $\mu$ M de 4MU- arabinofuranósido (4MU-abf) en un volumen total de 100  $\mu$ l. Se incubó a 50°C por 45 minutos y la reacción se detuvo agregando 1 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.5 M en NaOH 0.1 N, pH 10.4 (solución STOP), se centrifugaron las reacciones a 13000 rpm por 2 minutos y se transfirieron 200  $\mu$ l de la reacción a una microplaca oscura. Se determinó la fluorescencia a una  $\lambda$  de excitación de 350 nm y una emisión de 440 nm en un equipo Varioskan flash (Thermo Scientific).

### 5.4.2 Ensayo de actividad $\beta$ -xilosidasa (XYLO)

Para la determinación de actividad XYLO, se prepararon reacciones que contenían: 43.75  $\mu$ l de buffer de acetato de sodio 50 mM pH 5.0, 50  $\mu$ l de extracto filtrado y 25  $\mu$ M de 4MU-xilopiranosido (4MU-Xyp) en un volumen total de 100  $\mu$ l. Se incubó a 50°C por 60 minutos y se detuvo la reacción agregando 1 ml de solución STOP, se centrifugaron las reacciones a 13000 rpm por 2 minutos y se transfirieron 200  $\mu$ l de la reacción a una microplaca oscura. Finalmente se determinó la fluorescencia bajo las mismas condiciones descritas para la ABF.

La actividad enzimática ABF y XYLO se expresó como nM de 4MU liberados/minuto/ $\mu$ g de proteína.

### 5.4.3 Ensayo de actividad endo- $\beta$ -1,4-xilanasa (XYL)

Para evaluar la actividad XYL se prepararon reacciones que contenían: 40  $\mu$ l de buffer de acetato de sodio 50 mM pH 5.0, 50  $\mu$ l de medio extracelular filtrado y 2.8 mg de azul brillante de Remazol con xilana (RBB-xylan) en un volumen final de 100  $\mu$ l. Se incubó a 30°C durante 30 minutos y se detuvo la reacción agregando 200  $\mu$ l de etanol al 96%. Se transfirieron 200 ml de la reacción a una microplaca transparente y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.

La actividad XYL se expresó como mg/min/ $\mu$ g de proteína.

### **5.5 Cuantificación de proteína**

Para la determinación de proteína en cada muestra filtrada se utilizó el método de Bradford. En una microplaca transparente se mezclaron 150  $\mu$ l de extracto filtrado y 150  $\mu$ l de Coomassie Reagent (Bradford, Thermo Scientific), se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a una  $\lambda$  595nm en un equipo VariosKan flash (Thermo Scientific).

### **5.6 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se llevó a cabo con un análisis de los datos obtenidos en cada una de las pruebas realizadas tanto en el crecimiento de placa, el peso húmedo y peso seco, también se realizó en los datos obtenidos en las actividades enzimáticas de ABF, XIL y XILO. Se utilizó la prueba t para medias de dos muestras emparejadas con  $P < 0.05$  en Excel.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Crecimiento en placa de *Colletotrichum lindemuthianum* en PDA, lirio acuático, ejote y bagazo de caña.

Se evaluó el crecimiento en placa de ambas razas de *C. lindemuthianum* en medio preparado con lirio acuático molido, ejote molido y bagazo de caña al 2.5% mezclados con agar bacteriológico y se comparó con el crecimiento en PDA (medio donde se mantienen de manera rutinaria las cepas de *C. lindemuthianum*).

En medio PDA (Fig. 5A), se observó un crecimiento gradual y constante en la raza 1472, alcanzando el máximo crecimiento hacia el día 20 con un valor de 8 cm de diámetro, el crecimiento de la raza 0 fue similar al de la raza 1472 los primeros 10 días, pero a partir del día 11 la raza no patógena presentó un crecimiento significativamente mayor, alcanzando su máximo crecimiento el día 19. En placas de Ejote-Agar (Fig. 5B), ambas razas mostraron el mismo patrón de crecimiento, aunque en el día 6 el crecimiento de la raza 0 disminuyó un poco, no se observó diferencia estadística significativa en los valores de crecimiento entre razas. A diferencia del crecimiento en PDA, donde la placa se llenó a los 19 o 20 días, en placas Ejote-Agar se observó el máximo crecimiento en el día 17. En placas de Lirio-Agar (Fig. 5C), se detectó un crecimiento continuo en ambas razas. Sin embargo; la raza 1472 presentó un crecimiento significativamente mayor a partir del día 5, alcanzando su máximo crecimiento el día 17, mientras que la raza 0 alcanzó su crecimiento máximo el día 19. Por último, se procedió a preparar placas de bagazo de caña-agar, sin embargo; no se observó crecimiento de *C. lindemuthianum*, por lo que se suplementaron con 0.5 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 2.72 g de  $KH_2PO_4$ , 5.28 g de ácido L-glutámico y bagazo de caña. En placas de bagazo de caña-agar suplementado (Fig. 5D), se observó que en la raza 1472 el crecimiento fue continuo pero lento, incrementando a partir del día 8. Sin embargo, el crecimiento se detuvo al llegar al día 16, alcanzó un valor máximo de 6.1 cm de diámetro. Por otro lado, el crecimiento de la raza 0 fue continuo y más rápido que la raza patógena, fue posible detectar el crecimiento máximo el día 15 con un valor de 6.4 cm de diámetro. A pesar de esto, no se observó diferencia estadística en el crecimiento entre ambas razas.

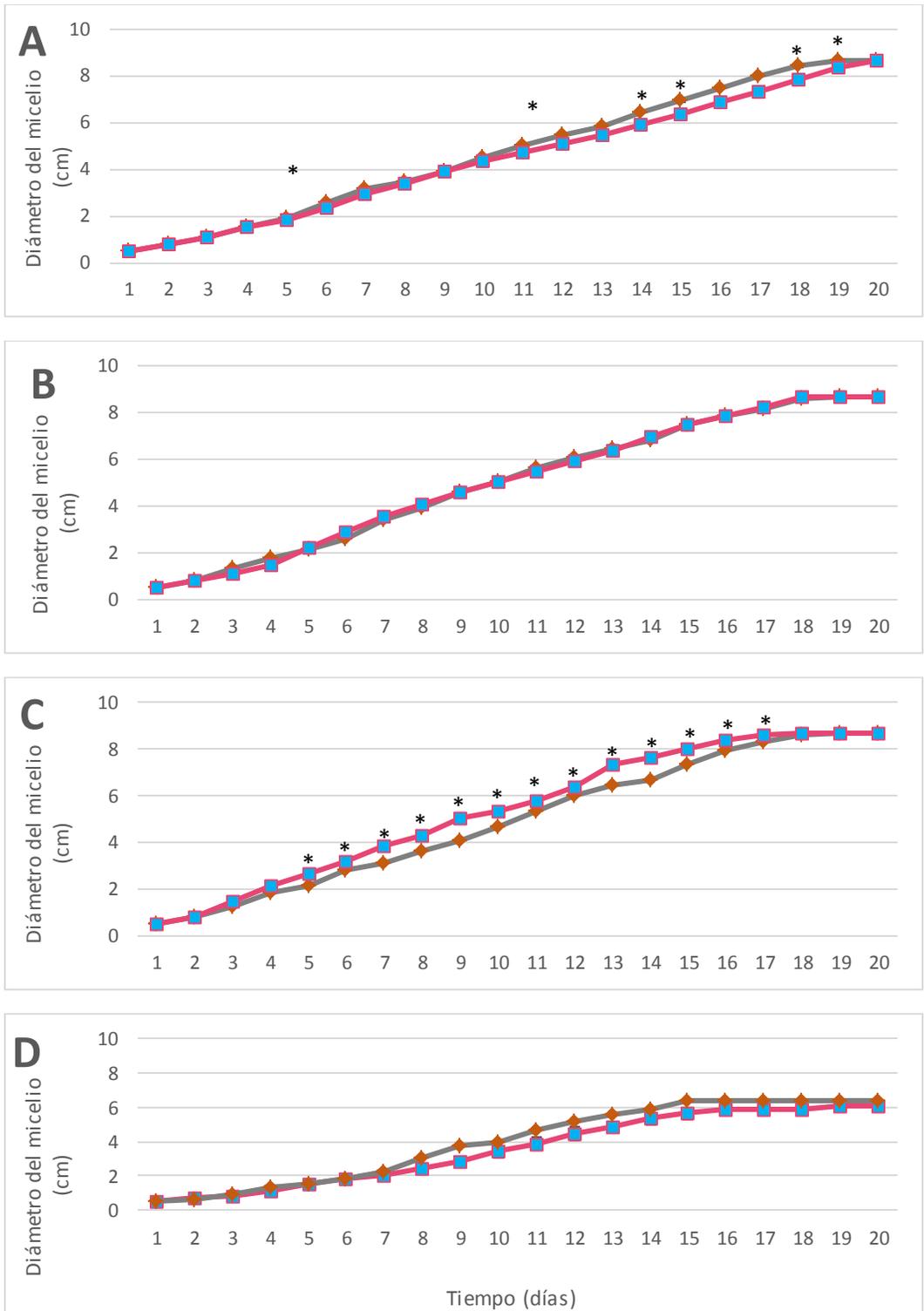


Figura 5. Crecimiento en placa de la raza 0 (  $\blacklozenge$  ) y la raza 1472 (  $\blacksquare$  ) de *C. lindemuthianum* en diferentes sustratos naturales. Agar Papa-Dextrosa (A), Ejote-Agar (B), Lirio acuático- Agar (C), bagazo de caña agar suplementado (D). El símbolo “\*” indica la diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre razas.

## **6.2 Biomasa micelial obtenida utilizando diferentes fuentes de carbono**

### **6.2.1 Peso húmedo**

Los resultados obtenidos de peso húmedo en cultivos de medio Mathur suplementado con glucosa, xilana, lirio acuático y bagazo de caña se presentan en la Fig. 6.

La biomasa micelial obtenida en cultivos donde se utilizó glucosa como fuente de carbono (Fig. 6A), presentó un crecimiento gradual conforme transcurre el tiempo de incubación, para la raza 1472 el mínimo de peso húmedo fue de 107.17 mg en el día uno y un valor máximo de 601.6 mg en el día 14, por otro lado, en la raza 0 el valor mínimo fue de 72.1 mg en el día uno y un valor máximo de 729.63 mg en el día 14. A pesar de que el crecimiento máximo de la raza 0 es mayor que el de la raza 1472, no se observó diferencia estadística significativa entre razas, excepto para los días 3, 4, 7 y 8.

La Fig. 6B muestra los valores de peso húmedo obtenidos en cultivos suplementados con xilana. Es posible observar que el crecimiento en la raza 1472 fue gradual y constante durante los primeros 5 días de incubación, se detectó un ligero incremento del peso húmedo a partir del día 6 alcanzando el valor máximo el día 12 (1784.9 mg). Para la raza 0, se observó un crecimiento constante los primeros 6 días, con un aumento importante en los valores de crecimiento a partir del día 7. El valor máximo de biomasa se detectó en el día 10 (2242.45 mg), disminuyendo gradualmente a partir del día 11.

Los valores de peso húmedo obtenidos en cultivos donde se utilizó lirio acuático como fuente de carbono (Fig. 6C), fueron similares los primeros 3 días de crecimiento para ambas razas. Para la raza 1472 se observó un incremento gradual en los valores de biomasa a partir del día 5 de incubación, obteniendo los niveles máximos de crecimiento el séptimo y octavo día con valores de 1677.65 mg y 1787.4 mg de peso húmedo respectivamente. Es posible observar una disminución de biomasa micelial a partir del día 9 y hasta el término de la cinética de crecimiento. En la raza 0, se detectaron claramente dos picos de crecimiento máximo (día 5 y 11 de incubación). Fue posible detectar un aumento drástico en los valores de peso húmedo el día 5 de incubación (3045.05 mg), los cuales descendieron gradualmente del día 6 a 9, con un nuevo incremento en el día 10, alcanzando el segundo pico de crecimiento el día 11 (1907.5 mg), los valores disminuyeron para los días 12 y 14 mostrando un nuevo incremento en la biomasa el día 16.

En la Fig 6D, que corresponde a los valores de peso húmedo en cultivos donde se utilizó bagazo de caña como fuente de carbono, se observó un patrón de crecimiento similar para ambas razas durante los

primeros 5 días un crecimiento, en el día 6 la raza 0 mostró un ligero incremento en el crecimiento comparado con la raza 1472. El punto máximo de peso húmedo para la raza 1472 tuvo un valor de 248.1 mg en el día 11 de incubación. Para la raza 0, el punto máximo de crecimiento se observó el día 12 con un valor de 161.3 mg de peso húmedo.

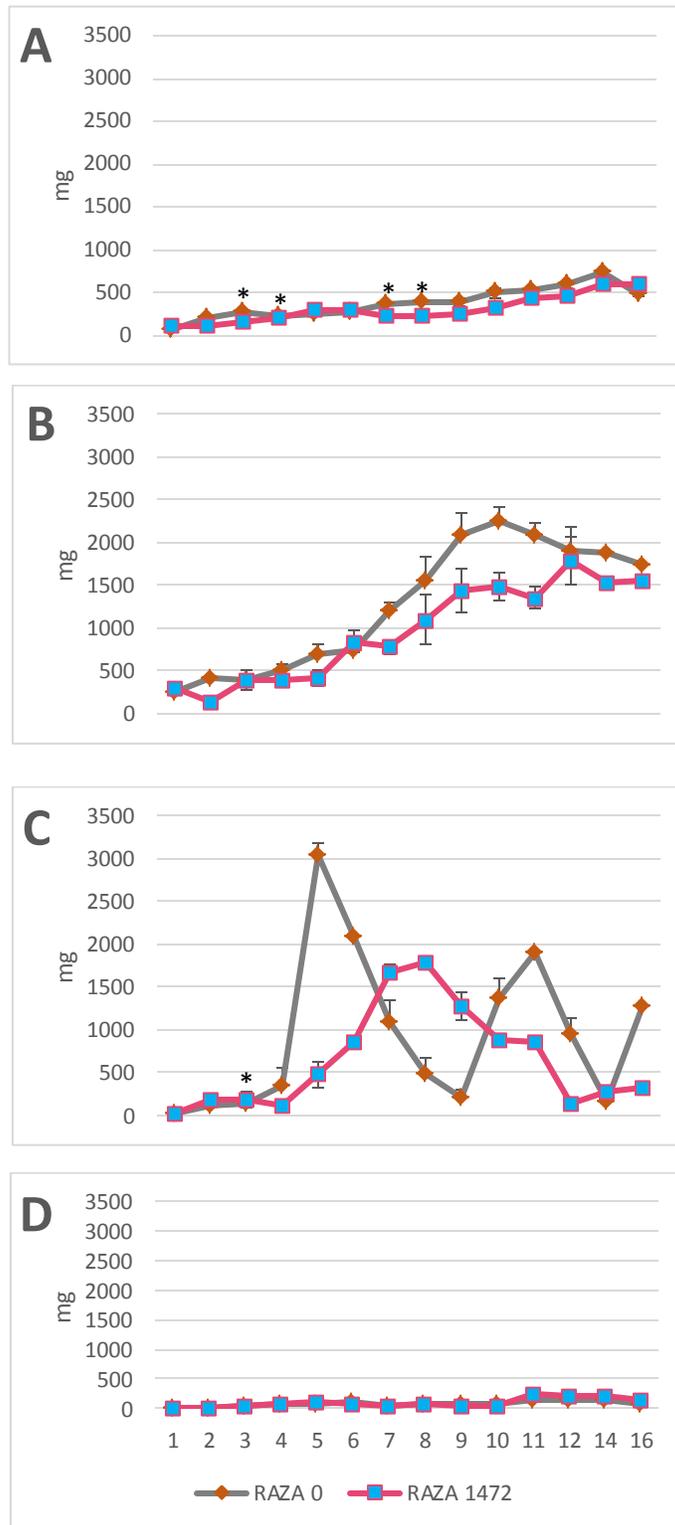


Figura 6. Biomasa micelial de la raza 0 (◆) y la raza 1472 (■) de *C. lindemuthianum* en medio mínimo Mathur modificado, suplementado con diferentes fuentes de carbono como: glucosa (A), xilana (B), lirio acuático (C) y bagazo de caña (D). El crecimiento esta expresado en mg de peso húmedo. Las barras muestran la media de los valores de crecimiento por duplicado ± la desviación estándar. El símbolo “\*” indica la diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre ambas razas.

### 6.2.2 Peso seco

En la gráfica 7, se observan los resultados obtenidos de biomasa micelial expresada en mg de peso seco. El patrón de crecimiento de *C. lindemuthianum* en medio suplementado con glucosa (Fig. 7A) fue muy similar al patrón observado con el peso húmedo. La raza 0 mostró valores significativamente mayores en los días 4, 6, 8 y 16, mientras que la raza 1472 tuvo un crecimiento significativamente mayor el día 11. En la raza patógena, el punto máximo de crecimiento fue en el día 14 con 67.7, mientras que para la raza no patógena fue de 59.05 mg. De la misma forma, los valores de peso seco obtenidos en cultivos con xilana como fuente de carbono mostraron el mismo patrón que los valores de peso húmedo (Fig 7B). Para la raza 0 de *C. lindemuthianum* se detectaron valores significativamente mayores que la raza 1472 los días 1, 5, 8 y 11 con un punto de máximo de crecimiento de 208 mg en el día 11. Para la raza patógena, el valor de peso seco máximo fue de 178.6 mg de peso seco en el día 12.

Los valores de peso seco de micelio crecido en cultivos suplementados con lirio acuático (Fig. 7C), mostraron un aumento gradual y constante de biomasa al transcurrir los días de incubación en ambas razas. Aunque en la gráfica es posible observar que la raza no patógena presenta valores mayores de biomasa que la raza patógena, solo se observó diferencia estadística significativa el día 11. Los valores más altos de peso seco se detectaron en los días 10 y 11, en la raza 1472 el valor más alto fue de 60.9 mg y en la raza 0 el valor máximo fue de 65.1 mg. Por último, la figura 7D muestra los valores de biomasa producida en micelio crecido en cultivos con bagazo de caña como fuente de carbono. Se observó que ambas razas mostraron un crecimiento similar, sin embargo; la raza 0 presentó valores significativamente mayores que la raza 1472 para los días 2, 3, 4, 5 y 16 de inducción.

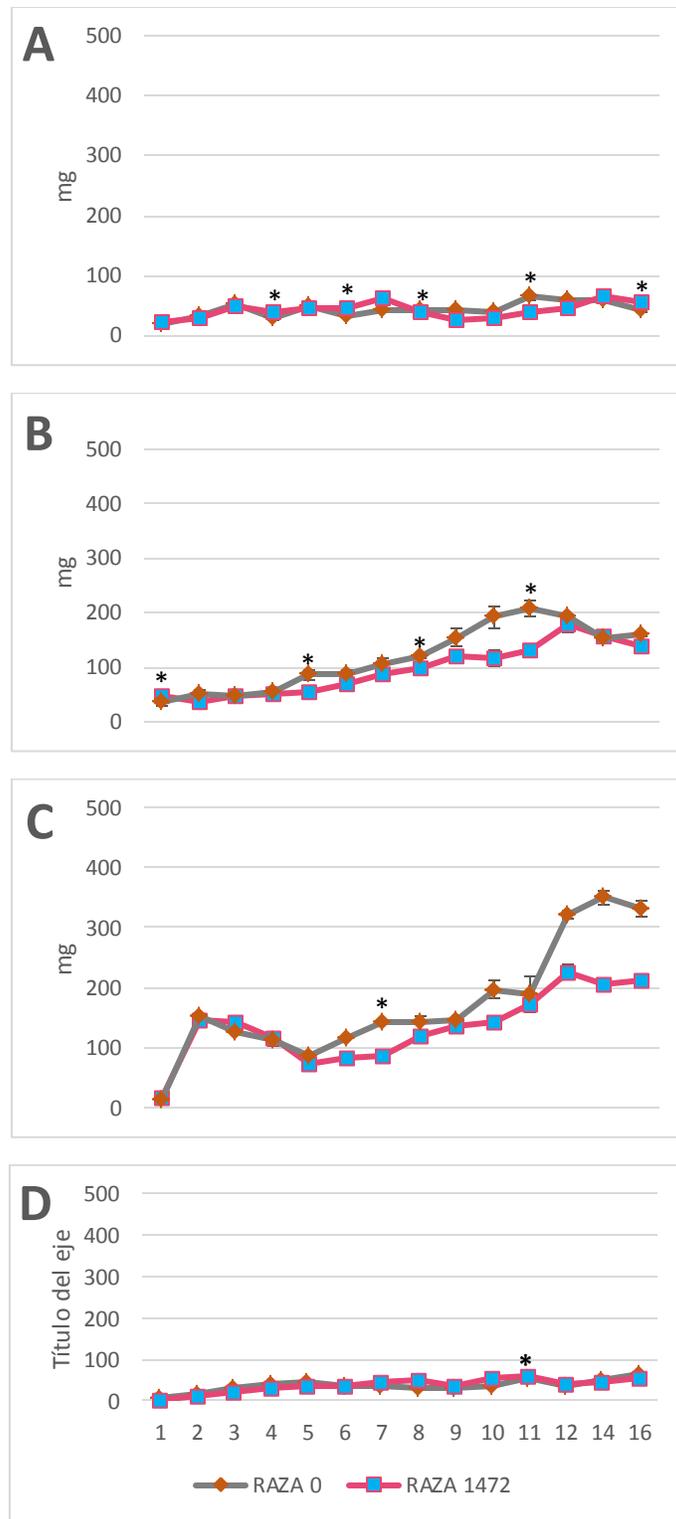


Figura 7. Biomasa micelial de la raza 0 (◆) y la raza 1472 (◻) de *C. lindemuthianum* en medio mínimo Mathur modificado, suplementado con diferentes fuentes de carbono como: glucosa (A), xilana (B), lirio acuático (C) y bagazo de caña (D). El crecimiento esta expresado en mg de peso seco. Las barras muestran la media de los valores de crecimiento por duplicado  $\pm$  la desviación estándar. El símbolo “\*” indica la diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre ambas razas.

### 6.3 Inducción de actividad extracelular $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa

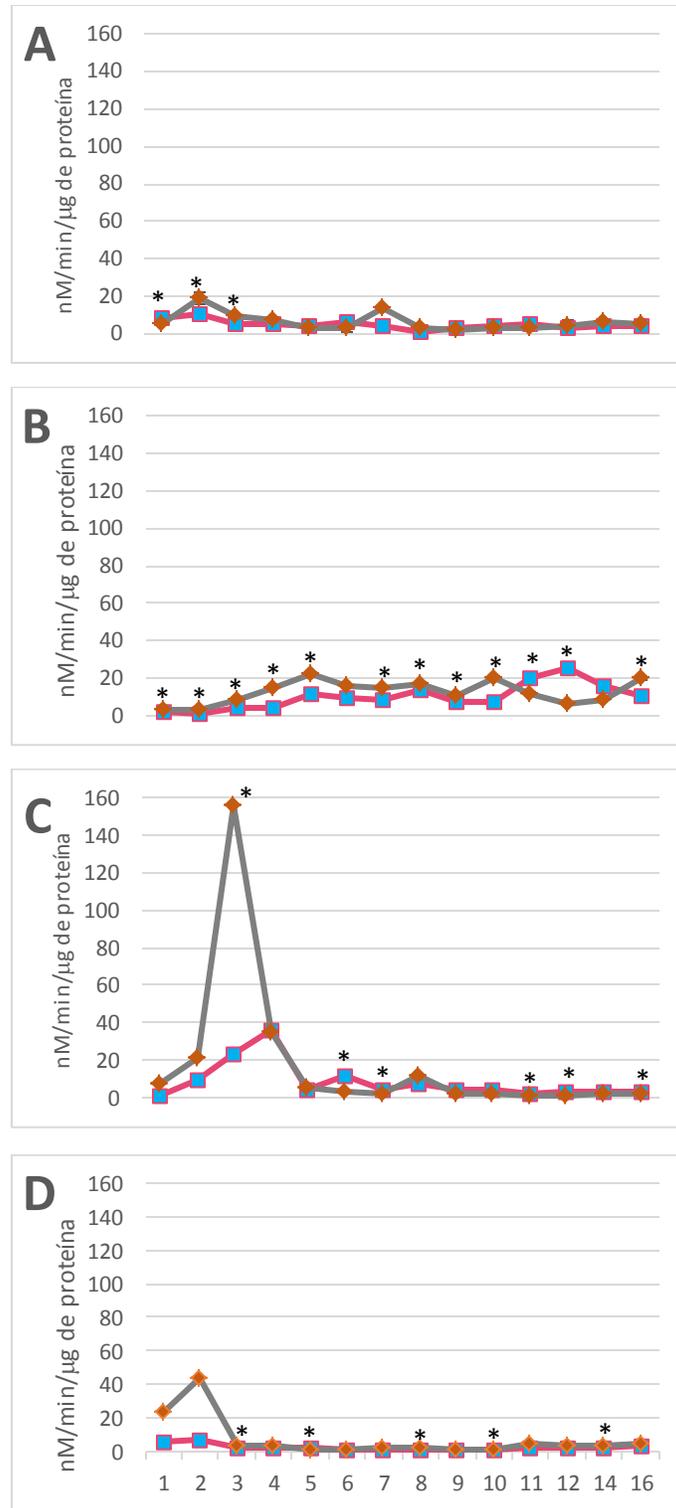
Se determinó la actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa en cultivos de medio Mathur suplementados con glucosa, xilana, lirio molido y bagazo de caña (Fig. 8).

Cuando se utilizó glucosa como fuente de carbono, se observaron los niveles más bajos de actividad enzimática comparados con los valores obtenidos con las otras fuentes de carbono. La producción ABF fue significativamente mayor en la raza no patógena los primeros tres días de incubación. A partir del día 4 no se observó diferencia estadística significativa en la actividad enzimática de ambas razas. El valor máximo de la actividad específica para la raza 1472 fue de 9.9981 nM/min/ $\mu$ g de proteína el segundo día de inducción y el valor mínimo fue de 1.4927 nM/min/ $\mu$ g de proteína en el día 12. Por otra parte, para la raza 0 se detectaron dos picos de actividad ABF en los días 2 y 7 de crecimiento; el valor máximo de actividad fue de 18.8252 nM/min/ $\mu$ g de proteína en el segundo día de inducción y el valor mínimo detectado fue de 1.7076 nM/min/ $\mu$ g de proteína para el día 9.

En cultivos suplementados con xilana (Fig. 8B), la actividad específica de la  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa en la raza 1472 mostró un aumento gradual y a partir del día 10 se observó un incremento hasta alcanzar el punto máximo de producción ABF el día 12 (25.5996 nM/min/ $\mu$ g de proteína) con una disminución de la actividad enzimática los días 14 y 16. Para la raza 0, la actividad específica mostró un aumento gradual durante los primeros cinco días de inducción, con un valor mínimo de 3.0646 nM/min/ $\mu$ g de proteína el segundo día y un valor máximo de 22.5823 nM/min/ $\mu$ g de proteína el día 5. Fue posible detectar un segundo pico de actividad el día 10 de incubación con un valor de 19.7601 nM/min/ $\mu$ g y una posterior disminución los siguientes días.

Por otra parte, al utilizar lirio acuático molido como fuente de carbono (Fig. 8C), se detectó un incremento gradual de actividad ABF para la raza patógena en los primeros cuatro días de inducción, con un valor máximo para el día 4 de 46.3200 nM/min/ $\mu$ g de proteína. Aunque fue posible observar un aumento leve en la producción ABF el día 6 de crecimiento, durante los días posteriores la actividad específica se mantuvo constante. Interesantemente, la producción ABF en la raza no patógena de *C. lindemthianum* mostró un pico muy alto el día 3 de inducción, alcanzando un valor de 156.0790 nM/min/ $\mu$ g de proteína, siendo esta la actividad específica más alta observada en todos los tratamientos evaluados para este trabajo. A partir del cuarto día se observó un descenso drástico de producción ABF con niveles constantes los días posteriores de crecimiento.

Por último, al crecer ambas razas de *C. lindemuthianun* en cultivos suplementados con bagazo de caña, fue posible detectar inducción de actividad ABF solo los primeros tres días de incubación tanto para la raza 1472 como para la raza 0 con valores máximos de 6.8964 nM/min/ $\mu$ g y 43.4179 nM/min/ $\mu$ g respectivamente. A partir del día cuatro, los valores obtenidos de actividad específica fueron muy similares a los obtenidos en cultivos con glucosa como fuente de carbono.



**Figura 8.** Actividad enzimática de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa por la raza 0 (◆) y la raza 147 (■) de *C. lindemuthianum* inducidas en diferentes fuentes de carbono. La actividad específica está expresada como nM/min/ $\mu$ g de proteína producida en glucosa (A), xilana (B), lirio acuático (C) y bagazo de caña (D). Las barras muestran la media de los valores de crecimiento por duplicado  $\pm$  la desviación estándar. El símbolo \* indica la diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre ambas razas.

#### 6.4 Inducción de actividad extracelular $\beta$ -xilosidasa

Se determinó la actividad extracelular  $\beta$ -xilosidasa en la raza patógena y no patógena de *C. lindemuthianum* en cultivos suplementados con glucosa, xilana, lirio acuático molido y bagazo de caña (Fig. 9).

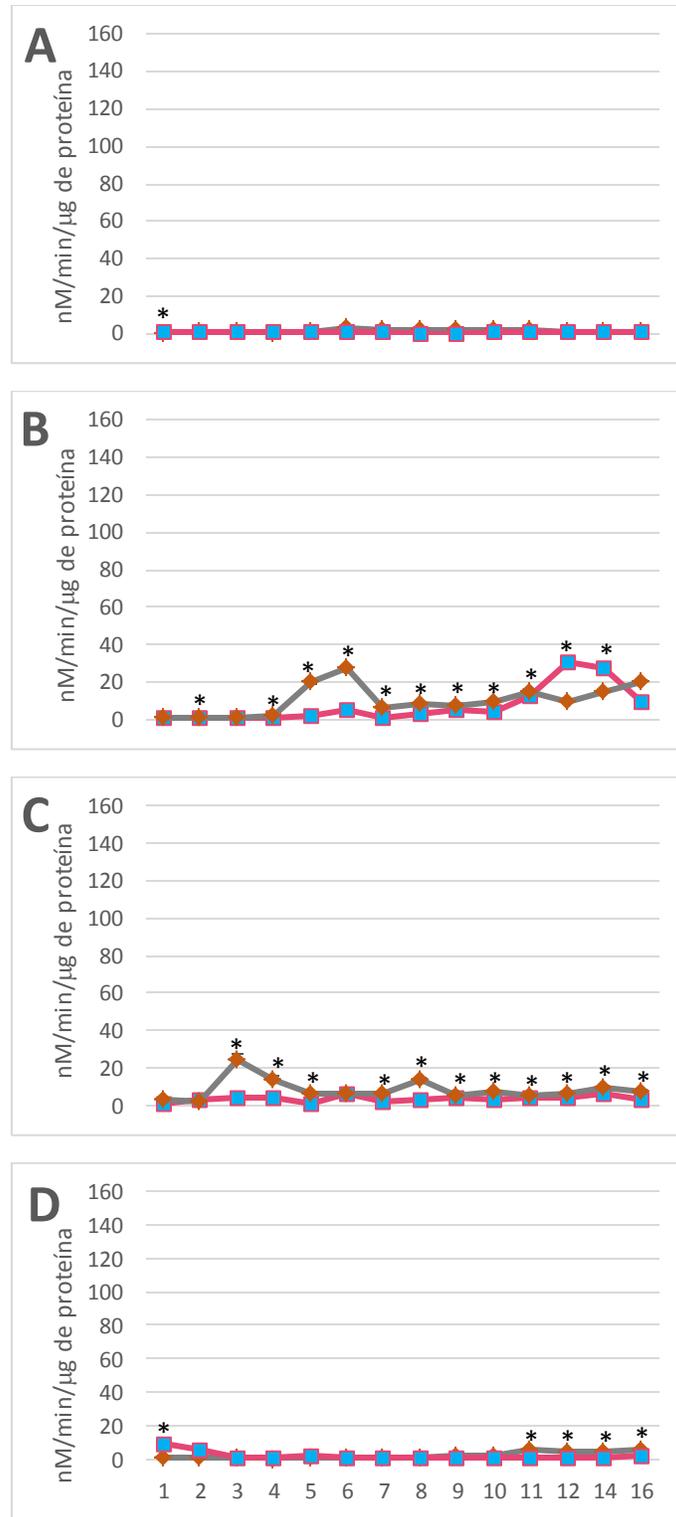
En cultivos suplementados con glucosa (Fig. 9A), se observaron niveles muy bajos de actividad  $\beta$ -xilosidasa en ambas razas del hongo. En la raza 1472 el valor máximo de actividad específica obtenido fue de 1.6342 nM/min/ $\mu$ g de proteína en el primer día de inducción y el valor mínimo obtenido fue de 0.3612 nM/min/ $\mu$ g de proteína en el día 8 de incubación. En la raza 0, la actividad específica máxima fue de 2.4982 nM/min/ $\mu$ g de proteína en el día 8 de inducción y un valor mínimo fue de 0.3836 nM/min/ $\mu$ g de proteína en el día 4 de crecimiento.

Cuando se utilizó xilana como fuente de carbono (Fig. 9B), se observó un aumento en la actividad específica hasta el día 12 y 14 de inducción con un valor máximo de 30.3134 nM/min/ $\mu$ g de proteína y un valor mínimo obtenido de 0.7267 nM/min/ $\mu$ g de proteína en el primer día. Por otro lado, la raza 0 presentó actividad XYLO baja durante los primeros días de inducción incrementando después del quinto día de incubación. Se detectó un pico máximo de actividad de 27.3761 nM/min/ $\mu$ g de proteína el día 6. A partir del día 7 y hasta el 11, la producción XILO de la raza no patógena fue significativamente mayor que la de la raza patógena.

Al utilizar lirio acuático molido como única fuente de carbono (Fig. 9C), se detectaron niveles muy bajos de actividad específica XYLO en los primeros días de crecimiento para ambas razas. En la raza 1472 de *C. lindemuthianum*, se detectaron niveles de actividad enzimática ligeramente superiores a los obtenidos en cultivos adicionados con glucosa. La actividad específica mostró un ligero aumento el día 6 y 14 de inducción, con un valor máximo de 6.7159 nM/min/ $\mu$ g de proteína en el día 14 y un valor mínimo el día 5 de incubación de 1.0153 nM/min/ $\mu$ g de proteína. La raza 0 presentó un incremento en la producción de XYLO el tercer día de crecimiento alcanzando un valor máximo de 24.6188 nM/min/ $\mu$ g de proteína disminuyendo gradualmente el cuarto y quinto día. Adicionalmente, fue posible observar un ligero aumento en la actividad XYLO el día 8 de inducción con un valor de 14.1027 nM/min/ $\mu$ g.

Cabe señalar que los niveles de actividad extracelular  $\beta$ -xilosidasa fueron significativamente mayores en la raza no patógena que los observados en la raza patógena para la mayoría de los días evaluados.

Finalmente, en cultivos adicionados con bagazo de caña (Fig. 9D), se detectaron niveles muy bajos de actividad específica para ambas razas. Los valores detectados fueron ligeramente superiores a los observados con glucosa. En la raza 1472 se obtuvo un valor máximo de 9.6859 nM/min/ $\mu$ g de proteína el primer día de inducción y un valor mínimo de 0.3032 nM/min/ $\mu$ g de proteína en el día 14. Por otra parte, la raza 0 mostró niveles estadísticamente mayores de actividad enzimática que la raza 1472 los días 11, 12, 14 y 16 de incubación, presentando un aumento ligero de actividad XYLO el día 16 con un valor de 5.0513 nM/min/ $\mu$ g de proteína.



**Figura 9.** Actividad enzimática de  $\beta$ -Xilosidasa por la raza 0 (◆) y la raza 1472 (■) de *C. lindemuthianum* inducidas en diferentes fuentes de carbono. La actividad específica esta expresada como nM/min/ $\mu$ g de proteína producida en glucosa (A), xilana (B), lirio acuático (C) y bagazo de caña (D). Las barras muestran la media de los valores de crecimiento por duplicado  $\pm$  la desviación estándar. El símbolo “\*” indica la diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre ambas razas.

## 6.5 Inducción de actividad extracelular endo- $\beta$ -1,4-xilanasa.

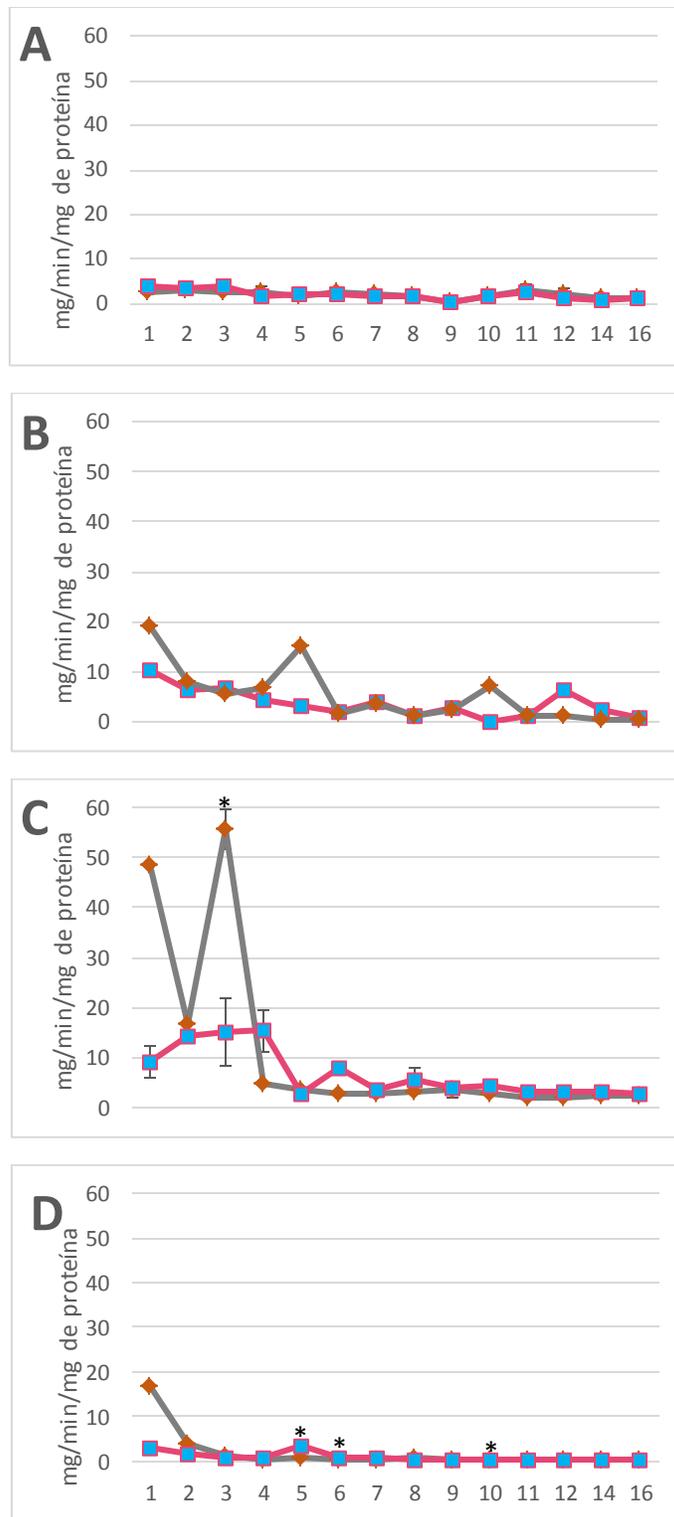
Finalmente, se evaluó la actividad endo- $\beta$ -1,4-xilanasa en ambas razas de *C. lindemuthianum* bajo las condiciones de inducción descritas anteriormente (Fig. 10).

En cultivos de medio Mathur suplementados con glucosa, se observaron niveles basales de actividad endo- $\beta$ -1,4-xilanasa para ambas razas (Fig. 10A). No hubo diferencia estadística significativa entre los valores de actividad XYL de la raza patógena y no patógena. Los niveles máximos de actividad específica fueron 4.0804 mg/min/ $\mu$ g de proteína y 3.1630 mg/min/ $\mu$ g de proteína para la raza patógena y no patógena respectivamente.

Cuando se utilizó xilana como fuente de carbono (Fig. 10B), la raza 1472 mostró producción de XYL desde el primer día de inducción con un valor de 10.4473 mg/min/ $\mu$ g de proteína. Los días posteriores de incubación los niveles de actividad disminuyeron y solo el día 7 se detectó un ligero incremento de la actividad específica (4.1379 nM/min/ $\mu$ g). El día 10 de inducción se detectó el nivel más bajo de actividad XYL con un valor de 0.0489 mg/min/ $\mu$ g de proteína. De la misma forma, la raza 0 presentó actividad específica XYL desde el primer día de inducción (19.1687 mg/min/ $\mu$ g de proteína). Durante los días posteriores de crecimiento, se observó un pico de inducción el día 5 con un valor de 15.1541 nM/min/ $\mu$ g. Un ligero incremento de actividad XYL se detectó el día 10 de inducción. No se observó diferencia estadística significativa en los niveles de actividad XYL de la raza patógena y no patógena de *C. lindemuthianum* en este tratamiento.

En la figura 10C se muestran los resultados de la inducción de XYL en cultivos suplementados con lirio acuático. Se observaron altos niveles de actividad específica los primeros 4 días de inducción en la raza 1472 con un valor máximo de 29.3218 mg/min/ $\mu$ g de proteína el día 2 significativamente mayor que los niveles de actividad de la raza 0. Una drástica disminución de la actividad XYL se observó el quinto día de crecimiento (2.7499 mg/min/ $\mu$ g de proteína) y un ligero incremento se observó para el día 6 (7.9339 nM/min/ $\mu$ g). De la misma forma, la raza 0 presentó actividad específica alta desde el primer día de inducción (66.7932 mg/min/ $\mu$ g de proteína) y mostro otro pico alto el día 3 con un valor de 55.6886 mg/min/ $\mu$ g de proteína. Se observó una disminución drástica a partir del día 4 de crecimiento manteniendo niveles bajos de actividad los días posteriores de incubación alcanzando un valor mínimo de 2.0229 mg/min/ $\mu$ g de proteína el día 12 de inducción.

En cultivos con bagazo de caña (Fig. 10D) se observaron niveles muy bajos de actividad para ambas razas. La raza patógena presentó niveles significativamente mayores que la raza no patógena los días 5 y 6 de inducción. El valor máximo de actividad fue 3.3061 mg/min/ $\mu$ g de proteína en el quinto día de crecimiento. En la raza 0 se mostró un valor alto de actividad específica en el primer día de inducción (16.7093 mg/min/ $\mu$ g de proteína) disminuyendo drásticamente a partir del segundo día con niveles muy bajos de actividad XYL alcanzando el valor mínimo de 0.1495 mg/min/ $\mu$ g de proteína.



**Figura 10.** Actividad enzimática de endo- $\beta$ -1,4-xilanas por la raza 0 (◆) y la raza 1472 (■) de *C. lindemuthianum* inducidas en diferentes fuentes de carbono. La actividad específica está expresada como mg/min/ $\mu$ g de proteína producida en glucosa (A), xilana (B), lirio acuático (C) y bagazo de caña (D). Las barras muestran la media de los valores de crecimiento por duplicado  $\pm$  la desviación estándar. El símbolo “\*” indica la diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre ambas razas.

## 7. DISCUSIÓN

*C. lindemuthianum* es un hongo fitopatógeno que causa antracnosis en plantas de frijol (*P. vulgaris*) (O'Connell et al. 1985). Durante su proceso de infección, *C. lindemuthianum* secreta un conjunto de carbohidratasa que degradan la pared celular vegetal, tales como las  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas, las endo- $\beta$ -1,4-xilanasas y las  $\beta$ -xilosidasas, las cuales actúan sinérgicamente en la hidrólisis de arabinoxilanos, componentes importantes de la hemicelulosa (Saha 2003; Münch 2008; Scheller & Ulvskov 2010).

### 7.1 Crecimiento en placa y biomasa micelial de la raza 1472 y la raza 0 de *C. lindemuthianum* en cultivos suplementados con diferentes fuentes de carbono.

Con el objetivo de determinar las condiciones óptimas de crecimiento de nuestro modelo de estudio *C. lindemuthianum*, se evaluaron medios de cultivo diferentes a PDA (medio de cultivo donde se mantienen de manera rutinaria las cepas) utilizando sustratos complejos naturales; xilana, ejote molido, lirio acuático molido y bagazo de caña molido en medios de cultivo sólido. El ejote es utilizado de manera rutinaria en nuestro laboratorio para dar mantenimiento y reactivar el crecimiento de *C. lindemuthianum*, debido a que el hongo pierde capacidad de crecimiento si se le cultiva por largo periodo en PDA. Sin embargo, previo a este estudio no se había realizado la caracterización de crecimiento en ambas razas del hongo. El lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) es una de las plantas acuáticas más invasivas a nivel mundial, conocida por su efecto ecológico y socioeconómico (Villamagna 2010). Sin embargo, en la última década se han buscado varias alternativas para su aprovechamiento y consecuente disminución en cuerpos de agua. Gracias a su alta capacidad de bioabsorción, ha sido utilizado ampliamente como una técnica eficiente y económica de fitoremediación en ríos y lagos contaminados por la industria textil o que presentan cantidades muy altas de metales como cromo y cobre (Priya & Selvan 2017; Sarkar et al. 2017).

Por otra parte, el bagazo de caña es un residuo agro-industrial con un potencial biotecnológico muy importante. Se ha utilizado como sustrato para el crecimiento de un gran número de microorganismos como bacterias, levaduras y hongos principalmente (Pandey\_2000). Por lo anterior, nos pareció interesante probar al ejote, lirio acuático y el bagazo de caña como sustratos para el crecimiento de *C. lindemuthianum*

Al comparar el crecimiento en placa de ambas razas de *C. lindemuthianum* en los diferentes sustratos, fue posible observar un crecimiento ligeramente más rápido en placas con ejote molido y lirio molido que en placas de PDA. Si bien en la figura 5 es posible observar que en estos tres medios de cultivo se tuvo un valor máximo de 8.7 cm, en el día 20, si observamos el crecimiento en el día 16 de incubación por ejemplo, el crecimiento micelial en PDA fue de 6.9 cm y 7.5 cm para la raza patógena y no patógena respectivamente, mientras que en placas con ejote y lirio ambas razas ya superaban los 8 cm de diámetro para el mismo día. Un efecto contrario se observó cuando se utilizó bagazo de caña como sustrato en medio sólido, cuando se preparó el medio de cultivo mezclando el bagazo de caña molido con agua y agar (como fue el caso del ejote y lirio molido) no hubo crecimiento micelial, por lo que se procedió a agregar a la mezcla anterior una fuente de nitrógeno (ácido L-glutámico) y sales (sulfato de magnesio y fosfato de potasio monobásico). Gracias a esta modificación, fue posible observar un crecimiento lento de ambas razas del hongo, ya que para el 20 únicamente se alcanzó 6.1 cm de diámetro para la raza 1472 y 6.4 cm de diámetro para la raza 0. Estos resultados nos sugieren que mientras el ejote molido y el lirio molido son capaces de promover el crecimiento del hongo sin sales o nitrógeno adicional, el bagazo de caña no es un buen sustrato para el crecimiento del mismo, pues requirió la adición de una fuente de nitrógeno y sales.

De manera interesante, no se observó diferencia estadística en el crecimiento de las cepas en medios que contenían ejote molido y bagazo de caña, no así en cultivos con lirio molido donde la raza patógena creció significativamente más rápido que la raza no patógena (Fig. 5C).

Por lo anterior podemos recomendar la utilización de sustratos naturales como el ejote molido y el lirio molido para el cultivo de *C. lindemuthianum*, ya que a diferencia del medio PDA no requiere la adición de dextrosa, haciéndolos más económicos. Adicionalmente, hemos observado que al estar en contacto con sustratos naturales, el hongo se observa más saludable en comparación con cultivos de PDA, lo que nos sugiere que son una buena alternativa para mantener las cepas en óptimas condiciones.

Por otra parte, se evaluó la producción de biomasa micelial de ambas razas de *C. lindemuthianum* en medio mínimo Mathur suplemento el con glucosa, xilana, lirio acuático molido y bagazo de caña molido. Fue posible observar que en cultivos suplementados con glucosa y xilana, el patrón de crecimiento expresado como peso húmedo y peso seco fue muy similar. Interesantemente, el micelio crecido en cultivos con xilana presentó valores muy superiores de crecimiento en comparación con los valores de crecimiento en glucosa. Se ha reportado que hongos que interactúan con plantas que poseen

paredes celulares ricas en hemicelulosa con alto contenido de arabinosilanos, crecen mejor en medios de cultivo con xilana y arabinano como fuente de carbono, que en cultivos suplementados con glucosa, ya que están mejor adaptados para la utilización de estos sustratos (Battaglia et al. 2013), este puede ser el caso también de *C. lindemuthianum*.

En medios suplementados con lirio acuático, la biomasa micelial expresada en mg de peso húmedo mostró un patrón de crecimiento incongruente, ya que la biomasa parecía disminuir al transcurrir los días de incubación. Debido a la dificultad para separar el lirio acuático molido de la biomasa micelial después de la filtración, se determinó el valor de peso total (micelio+lirio). Para obtener el valor neto de la biomasa micelial, se preparó previamente un cultivo con lirio molido sin inóculo, el peso húmedo del lirio acuático se determinó después de filtrar bajo las mismas condiciones y este valor se le restó al peso total obtenido en cada día de incubación. Se realizó el mismo procedimiento para el peso seco. Sin embargo, al transcurrir los días de incubación, hubo un cambio importante en la consistencia del lirio acuático, debido a que éste estaba siendo degradado, lo que tuvo como consecuencia una disminución en el peso húmedo neto. Por lo anterior, los valores de peso seco de micelio crecido con lirio acuático son más confiables.

Los valores de peso seco indican que la cantidad de biomasa micelial producida por la raza 0 en comparación con la raza 1472 fue mayor, así mismo, estos valores de biomasa obtenidos son los más altos en comparación con la biomasa producida en cultivos con los otros sustratos evaluados. Estos experimentos son congruentes con los resultados obtenidos para el crecimiento en placa, lo que corrobora que el lirio acuático es un sustrato que promueve el crecimiento de *C. lindemuthianum*.

La determinación de peso húmedo y peso seco de micelio crecido en medios suplementados con bagazo de caña se realizó de la misma manera que el micelio crecido con lirio acuático (descrito anteriormente). Es posible observar que el patrón de crecimiento es muy similar para el peso húmedo y seco, donde la producción de biomasa micelial es muy lenta los primeros días de incubación, es a partir del día 11 que se observó un incremento paulatino en el crecimiento del hongo. No se observó diferencia estadística significativa en los valores de crecimiento entre la raza patógena y no patógena de *C. lindemuthianum*. Es importante señalar que los valores de crecimiento obtenidos cuando se utilizó bagazo de caña como sustrato fueron mucho menores que aquellos observados en cultivos suplementados con xilana y lirio acuático. Estos resultados son congruentes al analizar la producción de biomasa de *C. lindemuthianum* raza 1472 en cultivos suplementados con celulosa, donde se obtuvo un máximo de 2.5 mg de peso

húmedo (Acosta-Rodríguez 2005) en comparación con el valor máximo de crecimiento del mismo hongo en presencia de xilana (aproximadamente 600 mg) (Conejo-Saucedo 2016). Se ha reportado que el bagazo de caña es un sustrato rico en celulosa (hasta 50%) (Pandey et al. 2000), lo que podría explicar los valores bajos de crecimiento en comparación con la xilana y el lirio acuático. Lo anterior sugiere que la fuente de carbono es un factor importante para el crecimiento de *C. lindemuthianum* corroborando es un hongo mejor adaptado para la degradación de paredes celulares ricas en hemicelulosa, y que a diferencia de otros hongos, el bagazo de caña no es un buen sustrato para el crecimiento del mismo.

## **7.2 Actividad enzimática de $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas, endo- $\beta$ -1,4-xilanasas y $\beta$ -xilosidasas.**

Se ha reportado que *C. lindemuthianum* secreta enzimas capaces de degradar pectina, xilana y celulosa además de exoglicosidasas ( $\beta$ -xilosidasas y  $\beta$ -glucosidasas), en cultivos suplementados con paredes celulares vegetales (Anderson 1978). Adicionalmente, se ha demostrado que secreta al medio endopoligalacturonasa,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa y dos pectin liasas (Wijesundera et al. 1989). Por otra parte, se reportó la actividad celulasa en la raza 1472 de *C. lindemuthianum* inducida con diferentes fuentes de carbono (Acosta-Rodríguez 2005) y se ha comparado la producción extracelular de pectin liasa 2 (PNL2) y xilanasas (XYL) en las razas patógena y no patógena de *C. lindemuthianaum* en cultivos suplementados con diferentes sustratos (Hernández-Silva 2007; Conejo-Saucedo 2016). Sin embargo, con excepción de paredes celulares de *P. vulgaris*, en la mayoría de los trabajos se han utilizado sólo sustratos comerciales para la inducción de actividad enzimática, por lo que es importante evaluar fuentes de carbono naturales como inductores de actividad enzimática. En el presente trabajo se llevó a cabo la determinación de actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa,  $\beta$ -xilosidasa y endo- $\beta$ -1,4-xilanasas en la raza patógena y no patógena de *C. lindemuthianaum*, y adicionalmente se comparó la producción de las mismas utilizando sustratos comerciales (glucosa y xilana) y sustratos naturales (lirio acuático molido y bagazo de caña).

Cuando se utilizó glucosa como fuente de carbono se observaron niveles muy bajos de actividad ABF, XYLO y XYL en ambas razas del hongo. Estos resultados son congruentes con los valores bajos de actividad reportados para otras enzimas de *C. lindemuthianaum* (celulasa, pectin liasa y celulasa) (Acosta-Rodríguez 2005; Hernández-Silva 2007; Conejo-Saucedo 2016). Estos niveles bajos de actividad enzimática en cultivos suplementados con glucosa se deben al proceso de represión catabólica, un mecanismo importante para suprimir la producción de enzimas degradadoras de la pared celular vegetal durante el crecimiento de hongos en fuentes de carbono como la glucosa y la xilosa (Amore

2013). Por lo tanto, la actividad enzimática detectada en cultivos suplementados con glucosa, se le considera actividad basal, es decir, la producción de enzimas necesaria para que en el momento en que se cambie la fuente de carbono, el hongo pueda comenzar a degradar un nuevo sustrato (Tani 2014). Particularmente, se ha reportado que en hongos como *Aspergillus kawachii* y *Penicillium chrysogenum*, la expresión de genes que codifican ABFs es reprimida en presencia de glucosa o sacarosa (Koseki et al. 2003; Sakamoto 2013).

En cultivos suplementados con xilana, se detectó un notable incremento en la producción extracelular ABF, XYLO y XYL. Este polisacárido es uno de los principales componentes de la hemicelulosa (Scheller & Ulvskov 2010), se ha reportado que la degradación completa de xilana requiere la acción coordinada de una batería de enzimas que degradan todos sus componentes de manera coordinada (Conejo-Saucedo et al. 2011). Endo- $\beta$ -1,4-xilanasas,  $\beta$ -xilodisasas y  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas actúan sinérgicamente en la hidrólisis completa de arabinoxilanos (Lagaert et al. 2014), por lo anterior, no es extraño que este sustrato complejo induzca la producción de estas tres enzimas.

En la raza 1472, los mayores niveles de actividad XYL fueron observados durante los primeros días de incubación (días 1-5), esto es parecido a lo reportado por Conejo-Saucedo et al. (2016) donde la máxima actividad xilanasas se detectó el día 7 en la raza patógena, sin embargo, en nuestra cinética de actividad fue posible observar un repunte en la actividad XYL el día 12 de crecimiento que no se presentó en los experimentos de Conejo-Saucedo et al. Por otra parte, la máxima actividad XYLO y ABF se detectó hasta los días 11 a 14 en esta raza. Se ha reportado que la actividad xilanasas libera arabinooligosacáridos que después son hidrolizados por  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas y  $\beta$ -xilodisasas (Lagaert et al. 2014), lo que podría explicar la producción temprana de XYL y la máxima actividad XYLO y ABF en días posteriores. Una mayor inducción de actividad enzimática después del día 7 de crecimiento (como en el caso XYLO y ABF) es congruente con lo reportado para la PNL2, donde en ambas razas de *C. lindemuthianum*, los niveles más altos de actividad específica se observaron del día 7 a 12 de incubación (Hernández-Silva 2007). Esto puede explicarse debido a que se sabe que los productos de degradación de sustratos como la xilana, son capaces de promover la expresión de genes que codifican varias enzimas hidrolíticas, entre ellas XYLOs y ABFs (Glass et al. 2013; Tani 2014). Interesantemente, en la raza 0 de *C. lindemuthianum* se observan altos niveles de actividad XYL, XYLO y ABF en el día 5 de incubación. Un posterior repunte de actividad se observó en el día 10 y 12 para XYL, 11 para XYLO

y 10 para ABF. Esta congruencia en tiempo, sugiere una actividad coordinada para la degradación de xilana de las tres enzimas en la raza no patógena.

Uno de los sustratos naturales evaluados como inductores de la producción de enzimas hemicelulolíticas en *C. lindemuthianum* en este trabajo fue el lirio acuático. En cultivos de la raza 1472, la mayor actividad ABF, XYLO y XYL se observó en los primeros cuatro días de crecimiento con una rápida disminución en el día 5 y un ligero aumento el día 6. Interesantemente, la cinética de actividad de las tres enzimas mostró el mismo patrón, sugiriendo una actividad sinérgica de las tres enzimas en la degradación de lirio acuático. Un patrón muy similar se observó para la raza 0, donde la producción máxima de las tres carbohidrasas evaluadas se presentó el día 3 de inducción, con un rápido declive el día 4 de crecimiento. En el caso de ABF y XYLO, se observó un ligero aumento en los niveles de actividad enzimática para el día 8 de inducción el cual no se detectó para la actividad XYL. Es importante destacar que cuando el lirio acuático fue utilizado como fuente de carbono, se detectaron los valores mayores de actividad ABF y XYL, esto podría deberse a una mayor cantidad de biomasa micelial durante el crecimiento en este sustrato o bien, se sabe que el lirio acuático posee un contenido muy alto en hemicelulosa (30-55%), del cual el 25% del peso seco de la pared celular del lirio acuático corresponde a xilosa (Nigam 2002). Como se mencionó anteriormente, los productos de degradación de sustratos complejos como como xilosa, xilobiosa y celobiosa son capaces de activar factores de transcripción que promueven la transcripción de genes que codifican enzimas líticas, particularmente xilanasas y arabinofuranosidasas (Glass et al. 2013).

Por último, el bagazo de caña no fue capaz de inducir la producción de hemicelulasas en *C. lindemuthinum*, en la mayoría de las condiciones evaluadas los niveles de actividad ABF, XYLO y XYL fueron similares a los valores actividad enzimática basal detectadas cuando la glucosa fue utilizada como fuente de carbono. Aunque en las gráficas de actividad específica es posible observar un pico de actividad en los primeros dos días de crecimiento, esto se debe a que el crecimiento del hongo en estos cultivos fue muy lento y por lo tanto la concentración de proteína extracelular detectada es muy baja, lo que incrementa los valores de actividad enzimática. Es importante resaltar que aunque la biomasa micelial aumenta después del día 11, no se observa un incremento en la actividad ABF, XYLO y XYL. Aunque se ha reportado que hongos como *Trichoderma reesei*, *Aspergillus phoenicis* y *Aspergillus niger* secretan una gran cantidad de celulasas y xilanasas en medios suplementados con bagazo de caña (Gutierrez-correa & Tengerdy 1998), los resultados de este trabajo indican que el bagazo de caña no es

un buen inductor para la producción de hemicelulasas en *C. lindemuthinum*. Esto podría deberse a que la composición de la pared celular del bagazo de caña es 50% de celulosa, 25% de lignina y únicamente 25% de hemicelulosa (Pandey et al. 2000). Es posible que el alto contenido de lignina en el bagazo de caña, dificulte la liberación de monosacáridos y disacáridos que promuevan la expresión de genes codificantes de enzimas hidrolíticas y por lo tanto haya solo una producción basal de ABF, XYLO y XYL en *C. lindemuthianum*.

## 8. CONCLUSIONES

- ❖ Los medios ejote-agar y lirio-agar son una buena alternativa para el mantenimiento de cepas de *C. lindemuthianum*.
- ❖ La xilana y el lirio acuático son los sustratos que favorecieron el mejor crecimiento de *C. lindemuthianum* en medios de cultivo líquido.
- ❖ La raza no patógena de *C. lindemuthianum* presentó una mayor producción de biomasa en la mayoría de los sustratos evaluados.
- ❖ La xilana y el lirio acuático fueron los mejores inductores para la producción extracelular  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa,  $\beta$ -xilosidasa y endo- $\beta$ -1,4-xilanasas, y la raza 0 de *C. lindemuthianum* presentó los niveles más altos de actividad enzimática en la mayoría de las condiciones evaluadas.
- ❖ El bagazo de caña de azúcar no es un buen sustrato para el crecimiento, ni un buen inductor de actividad hemicelulasa de *C. lindemuthianum*.
- ❖ *C. lindemuthianum* es un hongo mejor adaptado para la degradación de paredes celulares ricas en hemicelulosa.

## 9. LITERATURA CITADA

- Acosta-Rodríguez, I., 2005. Degradation of cellulose by the bean-pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. Production of extracellular cellulolytic enzymes by cellulose induction. , pp.301–310.
- Albersheim, P., 1994. Structure and function studies of plant cell wall polysaccharides. *Biochemical Society transactions*, 22(2), pp.374–378.
- Amore, A. A., 2013. Regulation of cellulase and hemicellulase gene expression in fungi. *Current Genomics*, 14(4), pp.230–249.
- Anderson, A.J., 1978. Extracellular Enzymes Produced by *Colletotrichum lindemuthianum*. , pp.1585–1589.
- Ashton, L., 1984. Production of Pectin Lyase by *Colletotrichum Zindemuthianum* in Culture. , (1984), pp.285–290.
- Bakir, U. et al., 2001. An endo- $\beta$ -1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(6), pp.328–334.
- Battaglia, E. et al., 2013. Xlr1 is involved in the transcriptional control of the pentose catabolic pathway , but not hemi-cellulolytic enzymes in *Magnaporthe oryzae*. , 57, pp.76–84.
- Burton, R.A., 2010. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nature Chemical Biology*, 6(10), pp.724–732.
- Caffall, K.H., 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344(14), pp.1879–1900. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2009.05.021>.
- Centis, S., 1997. Endopolygalacturonase Genes from *Colletotrichum lindemuthianum*: Cloning of CLPG2 and Comparison of Its Expression to That of CLPG1 During Saprophytic and Parasitic Growth of the Fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10(6), pp.769–775. Available at: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI.1997.10.6.769> [Accessed March 22, 2017].
- Chen, H., 2014. *Biotechnology of lignocellulose: Theory and practice*,

- Crossen-Fassoni, A., 2013. The pectate lyase encoded by the *pecCII* gene is an important determinant for the aggressiveness of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Journal of Microbiology*, 51(4), pp.461–470. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s12275-013-3078-9> [Accessed March 22, 2017].
- Collins, T., Gerday, C. & Feller, G., 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), pp.3–23.
- Conejo-saucedo, U., 2017. Protein homology modeling , docking , and phylogenetic analyses of *Colletotrichum lindemuthianum*.
- Conejo-Saucedo, U., 2016. Cloning and characterization of an endo- $\beta$ -1,4-xylanase gene from *Colletotrichum lindemuthianum* and phylogenetic analysis of similar genes from phytopathogenic fungus. *African Journal of Microbiology Research*, 10(32), pp.1292–1305.
- Conejo Saucedo, U., 2011. Hemicellulases of fungi: A vision of their function in the coordinated degradation of polysaccharides of plant cell walls. *Current Trends in Microbiology*, 7, pp.1–13.
- Cosgrove, D.J., 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(November), pp.850–861.
- Dumas, B., 1999. Use of green fluorescent protein to detect expression of an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum lindemuthianum* during bean infection. *Applied and environmental microbiology*, 65(4), pp.1769–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10103279> [Accessed March 22, 2017].
- Dyk, J.S. Van & Pletschke, B.I., 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes — Factors affecting enzymes , conversion and synergy. *Biotechnology Advances*, 30(6), pp.1458–1480. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.002>.
- Ebringerová, A., 2006. Structural diversity and application potential of hemicelluloses. *Macromolecular Symposia*, 232(333), pp.1–12.
- Fry, S.C., 1988. The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. *New York*, 203, p.333.
- Glass, N.L. et al., 2013. Plant Cell Wall Deconstruction by Ascomycete Fungi , (June), pp.477–498.

- Goldbeck, R. et al., 2016. Effect of hemicellulolytic enzymes to improve sugarcane bagasse saccharification and xylooligosaccharides production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 131, pp.36–46.
- González-Chavira, M. et al., 2004. Analysis of pathotypes of *Colletotrichum lindemuthianum* found in the central region of Mexico and resistance in elite germ plasm of *Phaseolus vulgaris*. *Plant disease*, 88(2), pp.152–156.
- Gutierrez-correa, M. & Tengerdy, R.P., 1998. Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugar cane bagasse. , 20(1), pp.45–47.
- Herbert, C., 2004. Production of a cell wall-associated endopolygalacturonase by *Colletotrichum lindemuthianum* and pectin degradation during bean infection. *Fungal Genetics and Biology*, 41(2), pp.140–147. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087184503001506> [Accessed March 22, 2017].
- Hernández-Silva, L., 2007. Comparison of fungal growth and production of extracellular pectin lyase activity by pathogenic and non-pathogenic races of *Colletotrichum lindemuthianum* cultivated under different conditions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 70(1–3), pp.88–95.
- Hernández, J.A., 2015. Aprovechamiento de *Eichhornia crassipes* (lirio acuático) proveniente de la zona de Yuriria, Guanajuato, como fuente de Lignina, Celulosa y Hemicelulosa. , pp.1–7.
- Herrmann, M.C. et al., 1997. The beta-D-xylosidase of *Trichoderma reesei* is a multifunctional beta-D-xylan xylohydrolase. *The Biochemical journal*, 321 ( Pt 2, pp.375–81.
- Hugouvieux, V., 1997. Induction by (alpha)-L-Arabinose and (alpha)-L-Rhamnose of Endopolygalacturonase Gene Expression in *Colletotrichum lindemuthianum*. *Applied and environmental microbiology*, 63(6), pp.2287–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16535626> [Accessed March 22, 2017].
- Imura, K.K. et al., 2012. Crystal Structures of Glycoside Hydrolase Family 51 - L -Arabinofuranosidase from *Thermotoga maritima*. , 76(2), pp.423–428.
- Isikgor, F.H. & Becer, C.R., 2015. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polym. Chem.*, 6(25), pp.4497–4559. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5PY00263J>.

- Jamet, E. et al., 2006. Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends in plant science*, 11(1), pp.33–9. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138505002943%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16356755>.
- Juturu, V. & Wu, J.C., 2012. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances*, 30(6), pp.1219–1227.
- Keegstra, K., 2010. Plant Cell Walls. *American Society of Plant Biologists*, 154(October), pp.483–486.
- Knob, A., Terrasan, C.R.F. & Carmona, E.C., 2010. beta-Xylosidases from filamentous fungi: An overview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(3), pp.389–407.
- Knogge, W., 1998. Fungal pathogenicity Wolfgang Knogge. *Current Opinion in Plant Biology*, 1, pp.324–328. Available at: <http://biomednet.com/elecref/1369526600100324>.
- Koseki, T. et al., 2003. Role of Two  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases in Arabinoxylan Degradation and Characteristics of the Encoding Genes from Shochu Koji Molds, *Aspergillus kawachii* and *Aspergillus awamori*. , 96(3), pp.232–241.
- Kousar, S., Mustafa, G. & Jamil, A., 2013. Microbial xylosidases: Production and biochemical characterization. *Pakistan Journal of Life and Social Sciences*, 11(2), pp.85–95.
- Lagaert, S. et al., 2014.  $\beta$ -Xylosidases and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases: Accessory enzymes for arabinoxylan degradation. *Biotechnology Advances*, 32(2), pp.316–332.
- Lara-Márquez, A., 2011a. Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi. *Biotechnology Letters*, 33(5), pp.859–868.
- Lara-Márquez, A., 2011b. Cloning and characterization of a pectin lyase gene from *Colletotrichum lindemuthianum* and comparative phylogenetic/structural analyses with genes from phytopathogenic and saprophytic/opportunistic microorganisms. *BMC Microbiology*, 11(1), p.260.
- Lee, R.C. et al., 2003. Bifunctional family 3 glycoside hydrolases from barley with  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and  $\beta$ -D-xylosidase activity: Characterization, primary structures, and COOH-terminal processing. *Journal of Biological Chemistry*, 278(7), pp.5377–5387.
- Lerouxel, O., 2006. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides — a complex process. *Current*

*Opinion in Plant Biology*, 9(6), pp.621–630.

Lowe, S.E., Theodorou, M.K. & Trinci, A.P.J., 1987. Cellulases and xylanase of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose, and xylan. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(6), pp.1216–1223.

Magdalena de Jesús, R., 2014. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE ARABINOXILOOLIGOSACÁRIDOS A PARTIR DE PERICARPIO DE MAÍZ NIXTAMALIZADO Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PREBIÓTICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

Martínez, S.T. et al., 2012. Determinación in vitro de los patrones de inducción de una In vitro determination of secretion patterns of Fusarium and partial characterization Determinação —in vitro” dos padrões de indução de uma Orgánica y Bioquímica. , 41(3), pp.359–376.

Mendgen, K. & Hahn, M., 2002. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Science*, 7(8), pp.352–356.

Milagres, A.M.F., Magalhães, P.O. & Ferraz, A., 2005. Purification and properties of a xylanase from *Ceriporiopsis subvermispora* cultivated on *Pinus taeda*. *FEMS Microbiology Letters*, 253(2), pp.267–272.

Miyanaga, A. et al., 2004. Crystal Structure of a Family 54  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase Reveals a Novel Carbohydrate-binding Module That Can Bind Arabinose \*. , 279(43), pp.44907–44914.

Miyanaga, A. et al., 2006. Crystal Structure of GH54  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase and Unique Function of CBM42 Attached to It. , 148, pp.143–148.

Morales, A. et al., 2013. Ferulated arabinoxylans from cereals. A review of their physico-chemical characteristics and gelling capability. *Rev. Fitotec. Mex*, 36(4), pp.439–446.

Münch, S., 2008. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *Journal of Plant Physiology*, 165(1), pp.41–51.

Nigam, J.N., 2002. Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose – fermenting yeast. , 97, pp.107–116.

Numan, M.T. & Bhosle, N.B., 2006.  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases: the potential applications in

- biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 33(4), pp.247–260.
- O’Connell, R.J., Bailey, J.A. & Richmond, D.V., 1985. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological Plant Pathology*, 27(1), pp.75–98.
- Okafor, U. a. et al., 2007. Xylanase production by *Aspergillus niger* ANL 301 using agro - wastes. *African Journal of Biotechnology*, 6(July), pp.1710–1714.
- Pandey, A. et al., 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues . I: sugarcane bagasse. , 74.
- Pedersen, M. et al., 2007. Identification of thermostable  $\beta$ -xylosidase activities produced by *Aspergillus brasiliensis* and *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, 29(5), pp.743–748.
- Perfect, S.E., 1999. *Colletotrichum*: A Model Genus for Studies on Pathology and Fungal–Plant Interactions. *Fungal Genetics and Biology*, 27(2), pp.186–198.
- Perfect, S.E., 2001. Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. *Molecular Plant Pathology*, 2(2), pp.101–108.
- Polizeli, M.L.T.M. et al., 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(5), pp.577–591.
- Priya, E.S. & Selvan, P.S., 2017. Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) – An efficient and economic adsorbent for textile effluent treatment – A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, pp.S3548–S3558. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.03.002>.
- Rasmussen, L.E. et al., 2012. Enzyme kinetics and identification of the rate-limiting step of enzymatic arabinoxylan degradation. *Biochemical Engineering Journal*, 69, pp.8–16. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2012.08.004>.
- Rodríguez-Guerra, R. et al., 2006. Patotipos de *Colletotrichum lindemuthianum* y su implicación en la generación de cultivares resistentes de frijol. *Agricultura técnica en México*, 32(1), pp.101–114.
- Saha, B.C., 2003. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(5), pp.279–291.
- Saha, B.C., 2000.  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in

- biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18(5), pp.403–423.
- Sakamoto, T., 2013. Substrate specificity and gene expression of two *Penicillium chrysogenum*  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases (AFQ1 and AFS1) belonging to glycoside hydrolase families 51 and 54. , pp.1121–1130.
- Salazar Iribe, A., 2013. Importancia de las pectinas en la dinámica de la pared celular durante el desarrollo vegetal. *REB. Revista de educación bioquímica*, 32(2), pp.67–75.
- Sanchez, G. et al., 2009. *Colletotrichum lindemuthianum* PATHOTYPES IN OAXACA AND SAN LUIS POTOSI, MEXICO, AND RESISTANCE IN COMMON BEAN.
- Sarkar, M., Rahman, A.K.M.L. & Bhounik, N.C., 2017. Remediation of chromium and copper on water hyacinth (*E. crassipes*) shoot powder. *Water Resources and Industry*, 17(October 2016), pp.1–6. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wri.2016.12.003>.
- Scheller, H.V. & Ulvskov, P., 2010. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), pp.263–289. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>.
- Siguiet, B. et al., 2014. First Structural Insights into  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases from the Two GH62 Glycoside Hydrolase Subfamilies \* □. , 289(8), pp.5261–5273.
- Suurnäkki, a et al., 1997. Hemicellulases in the bleaching of chemical pulps. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 57, pp.261–87.
- Tani, S., 2014. Complex regulation of hydrolytic enzyme genes for cellulosic biomass degradation in filamentous fungi. , pp.4829–4837.
- Valenciaga, D., 2004. La pared celular . Influencia de su naturaleza en la degradación microbiana ruminal de los forrajes.
- Villa-Rivera, M.G., 2016. Differences in the expression profile of endo-??-(1,6)-d-galactanase in pathogenic and non-pathogenic races of *Colletotrichum lindemuthianum* grown in the presence of arabinogalactan, xylan or *Phaseolus vulgaris* cell walls. *Physiological and Molecular Plant Pathology*.
- Villamagna, A.M., 2010. Ecological and socio-economic impacts of invasive water hyacinth (*Eichhornia crassipes*): a review. , pp.282–298.

- Wijesundera, R.L.C. et al., 1989. Cell wall degrading enzymes of *Colletotrichum lindemuthianum*: their role in the development of bean anthracnose. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 34(5), pp.403–413.
- Zanoelo, F.F. et al., 2004. Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant beta- D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 31(4), pp.170–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15160297>.
- Zhang, N., 2015. Cellulose-hemicellulose interaction in wood secondary cell-wall. *Modelling and Simulation in Materials Science and Engineering*, 23(8), p.85010. Available at: <http://stacks.iop.org/0965-0393/23/i=8/a=085010?key=crossref.98abf802802a4c25fbc62d0c68825a42>.