



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOLOGÍA

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN DE UNA DISACÁRIDO
ÓXIDO-REDUCTASA EN *Colletotrichum lindemuthianum***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

PQFB. LAURA YANIN MADRIGAL OCAMPO

ASESOR

DC. MAURO MANUEL MARTÍNEZ PACHECO

Morelia, Mich., agosto de 2013

Índice General

| | |
|--|----|
| I. Introducción | 2 |
| II. Antecedentes | 3 |
| II.1. Óxido-reductasas | 3 |
| II.2. Celobiosa deshidrogenasa (CDH) | 3 |
| II.3. Función biológica de la CDH | 5 |
| II.4. Aplicaciones de la CDH | 6 |
| II.5. Organismos productores de Celobiosa deshidrogenasa | 6 |
| II.6. Nutrientes esenciales para la producción de enzimas fúngicas | 7 |
| II.7. Diseños Estadísticos de Experimentos | 8 |
| II.8. Producción de CDH en <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> | 9 |
| II.9. Biología de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> | 10 |
| III. Justificación | 13 |
| IV. Hipotesis | 14 |
| V. Objetivos | 14 |
| VI. Materiales y Métodos | 15 |
| VI.1. Material biológico | 15 |
| VI.2. Medios de cultivo | 15 |
| VI.3. Siembra del hongo <i>C. lindemuthianum</i> | 15 |
| VI.4. Obtención de esporas de <i>C. lindemuthianum</i> | 16 |
| VI.5. Conteo de esporas de <i>C. lindemuthianum</i> | 16 |
| VI.6. Esterilización por filtración | 16 |
| VI.7. Determinación de proteína soluble | 16 |
| VI.8. Determinación de la actividad específica de CDH | 17 |
| VI.9. Diseño experimental Plackett-Burman | 18 |
| VI.10. Curso temporal de CDH | 19 |
| VI.11. Análisis estadístico | 19 |
| VII. Discusión | 20 |
| VIII. Conclusión | 21 |
| IX. Bibliografía | 22 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Fig 1. Esquema de reacción de óxido reducción | 3 |
| Fig. 2 Vía hidrolítica [A] y oxidativa [B] del metabolismo de celobiosa | 4 |
| Fig. 3 Reacciones de celobiosa deshidrogenasa | 5 |
| Fig. 4 Ciclo de vida de <i>C. lindemuthianum</i> . | 11 |
| Fig. 5 Curva de calibración de proteína obtenida por el método de Lowry | 17 |

Índice de Cuadros

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Enzimas extracelulares caracterizadas de <i>C. lindemuthianum</i> . | 12 |
| Cuadro 2. Composición del medio mínimo líquido | 16 |

I. Introducción

Las enzimas son proteínas que catalizan las reacciones químicas y poseen diversas características tales como especificidad, reactividad, así como sus propiedades catalíticas y biológicas. El uso de las enzimas ya sean aisladas o como parte de células vivas, ha sido desarrollado en forma rigurosa y sistemática en procesos catalíticos industriales económicamente viables y por supuesto amigables con el medio ambiente, yendo a la par con el rápido avance y expansión de la biotecnología moderna.

La baja disponibilidad de productos comerciales de óxido-reductasas y la vasta presencia de estas en la naturaleza, crea un área de oportunidad potencial para el desarrollo de biocatalizadores basados en reacciones de óxido-reducción. Las óxido-reductasas catalizan la transferencia de electrones desde un sustrato a otro y emplean varios centros activos redox; estas enzimas están ampliamente distribuidas entre microorganismos, plantas y animales (Xu 2005).

Colletotrichum lindemuthianum es un hongo fitopatógeno causante de la antracnosis del frijol pertenece a la clase de deuteromicetos y cuenta con la presencia de enzimas extracelulares involucradas en la degradación de polímeros de la pared celular de plantas, los cuales se pueden absorber y utilizar nutricionalmente.

La celulosa es el componente más abundante de la biomasa vegetal, un producto de su degradación es la celobiosa la cual es catalizada por la celobiosa deshidrogenasa (CDH) a celobiolactona.

La CDH es una disacárido óxido reductasa producida por un gran número de hongos degradadores de los componentes de la pared celular vegetal, se emplea como agente aclarador en la industria textil, clarificación de jugos, biosensor y bio-remediador en compuestos fenólicos (Henriksson *et al.*, 1995); tiene gran aplicación biotecnológica y es interesante el estudio de los organismos productores de esta enzima además, es muy importante la investigación de sus características fisicoquímicas para su estabilidad así como la evaluación de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno para alcanzar una elevada producción enzimática. Es por ello, que en este trabajo se utilizó el diseño experimental Plackett-Burman para presentar un diseño nutricional que optimizar la fermentación de celulosa para obtener niveles aceptables de la enzima celobiosa deshidrogenasa.

II. Antecedentes

II. 1. Óxido-reductasas

Las óxidorreductasas catalizan la transferencia de electrones desde un sustrato a otro, donde el sustrato oxidado se conoce como electrón donante en contraste con el sustrato reducido, el aceptor de electrones. El nombre recomendado según el sistema de clasificación de las enzimas es "donador: aceptor oxidoreductasa", "deshidrogenasa donante", "aceptor reductasa" y, cuando el oxígeno molecular es el electrón aceptor, "donante oxidasa" (Demarche *et al.*, 2011)

Para lograr su función biológica, las óxido-reductasas emplean varios centros activos redox. Los más comunes incluyen residuos de aminoácidos como tirosina o cisteína, iones metálicos como cobre, hierro y molibdeno, centros hierro-azufre o grupos hemo, y coenzimas como FMN y FAD. Esta clase de enzimas están ampliamente distribuidas entre los microorganismos, plantas y animales (Xu 2005).

En la figura 1 se muestra el modelo de una reacción de óxido-reducción catalizada por una enzima, que en este caso requiere de una coenzima, con sustrato en su estado reducido y el agente externo que se encuentra oxidado, se tiene a la enzima que para este caso requiere de una coenzima, así como de un agente oxidante externo. Una vez que se da la interacción enzima-coenzima-sustrato, se lleva a cabo el transporte de electrones del sustrato a la coenzima y finalmente al agente oxidante, de tal forma que al terminar la catálisis el sustrato queda oxidado y el agente externo queda reducido.

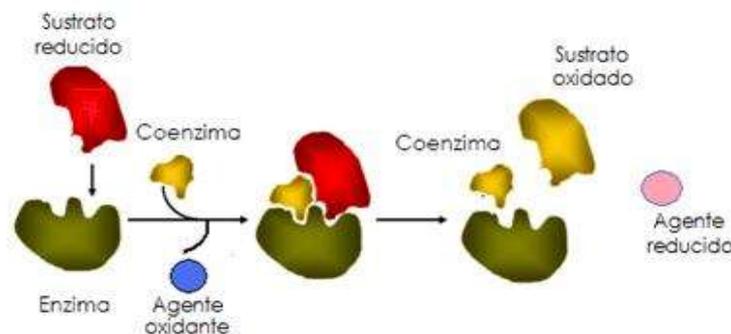


Fig. 1. Esquema de reacción de óxido reducción catalizada por una enzima.

II.2 Celobiosa deshidrogenasa (CDH)

Las enzimas secretadas por hongos que degradan la madera son principalmente hidrolasas específicas, es decir, celulasas, xilasas, mannasas, etc. La actividad de CDH fue descubierta por primera vez por Ulla Westermark y Karl-Erick Eriksson en 1974 como celobiosa-reducción dependiente de quinonas en dos hongos de podredumbre blanca: *Trametes versicolor* y *Phanerochaete chrysosporium*. En 1975, Westermark y Eriksson purificaron una enzima llamada celobiosa quinona oxidoreductasa (CBQ); posteriormente, fue nombrada celobiosa oxidasa (CBO) ya que se suponía que prefería a dioxígeno quinonas como aceptor de electrones. Recientemente, 'CBQ' ha sido identificada como un fragmento catalítico activo de la "CBO" que ahora es llamado CDH (Henriksson *et al.*, 1991).

CDH es una enzima extracelular producida por basidiomicetos y ascomicetos, oxida celodextrinas, celobiosa, mannodextrinas y lactosa a sus correspondientes lactonas empleando aceptores de electrones como quinonas, fenoxirradicales, Fe^{+3} , Cu^{+2} , citocromo C o ion triyoduro (Zamocky *et al.*, 2006).

CDH es una proteína monomérica de 90-110 kDa con glicosilación en el intervalo de 10-20%; es una enzima estable con respecto al pH y a la temperatura: es más estable en el intervalo de pH de 3 a 5, menos estable entre 5 y 8 y completamente inestable a pH de 8 a 10, mientras que a pH de 2 la enzima es casi inactiva en dos horas debido a la liberación de la coenzima FAD (Ramírez 2012).

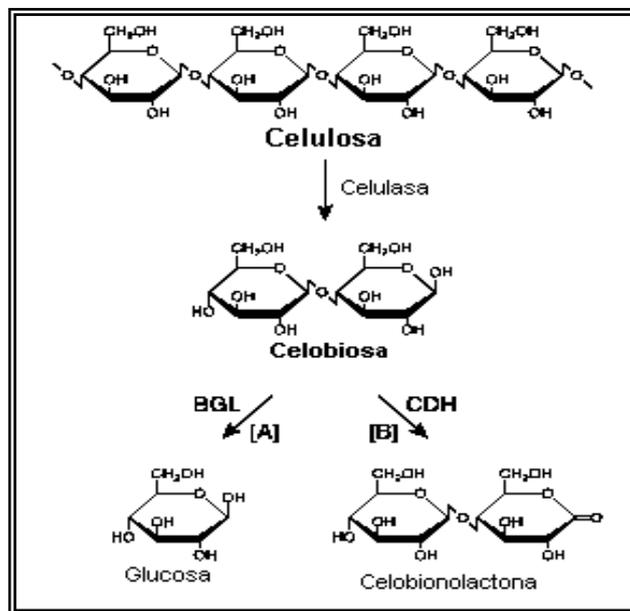


Figura 2. Vía hidrolítica [A] y oxidativa [B] del metabolismo de celobiosa en el sistema celulolítico de *Phanerochaete chrysosporium*. BGL: β -glucosidasa, CDH: Celobiosa deshidrogenasa (Yoshida *et al.*, 2004).

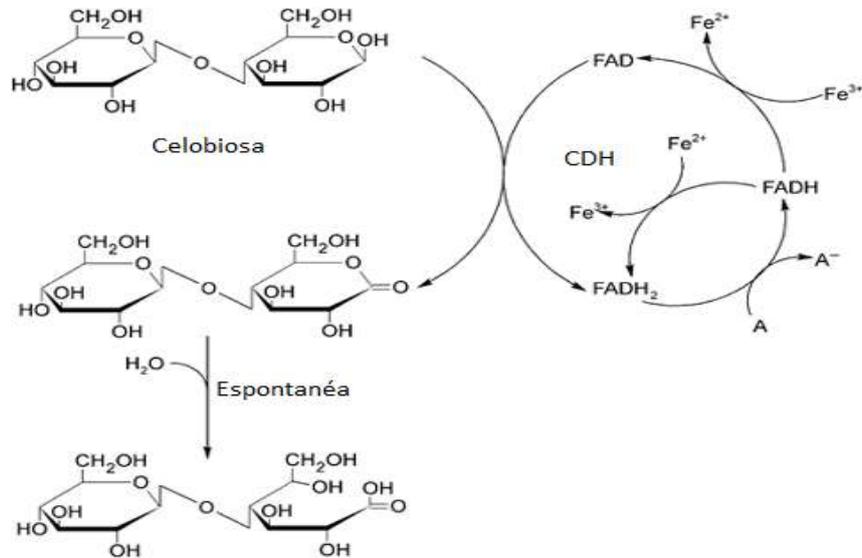


Fig.3. Reacciones de celobiosasa deshidrogenasa, `Fe` representa el hierro y `A` representa el aceptor de un electrón (Baldrian *et al.*, 2008).

La enzima ha sido aislada principalmente de basidiomicetos de pudrición blanca pero también se ha detectado actividad en otras especies de basidiomicetos (Zamocky *et al.*, 2006). Los hongos de pudrición café no producen CDH con la única excepción de *Coniophora puteana* (Baldrian *et al.*, 2008).

CDH es una oxidorreductasa y presenta dos dominios: uno *hemo* y uno *flavino*, la reacción oxidativa representa una oxidación en la posición C1 de un sacárido; el hemiacetal en esta posición se convierte en lactona que se hidroliza espontáneamente a un ácido carboxílico. Los dos electrones tomados por la enzima son transferidos a un aceptor de electrones. La oxidación del donador de electrones se lleva a cabo por el grupo FAD, que se convierte en FADH₂. La reducción del citocromo *c* y otros aceptores de electrones por CDH se realiza por el dominio *hemo* después de la transferencia de electrones (Baldrian *et al.*, 2008).

II.3. Función biológica de la CDH

Aunque CDH fue la primera en aislarse y caracterizarse hace más de 35 años atrás, su rol en la descomposición de la madera no está claramente definido. CDH fue identificado como la primera enzima no hidrolítica de unión a celulosa. A diferencia de muchas otras proteínas de unión a celulosa, CDH se une específicamente a la celulosa y no se une a xilana, manana, almidón y quitina; esta especificidad puede ser una clave a su función biológica (Henriksson *et al.*, 1998).

Se ha demostrado que CDH está implicada en la degradación de xilana y lignina en presencia de H₂O₂ e iones Fe⁺ quelados (Henriksson *et al.*, 1998). Además, degrada y modifica celulosa, hemicelulosa y la lignina mediante la generación de radicales hidroxilo en una reacción de tipo Fenton. La enzima puede reducir Fe⁺³ a Fe⁺², Cu⁺² a Cu⁺¹ por oxidación de celobiosa. La reacción posterior entre las especies reducidas y H₂O₂ genera radicales hidroxilo que pueden modificar y despolimerizar la pared celular de la planta (Baldrian *et al.*, 2008)

La actividad de β -glucosidasa es competitivamente inhibida por tres principales factores: glucosa, gluconolactona y celobionolactona. Como ya es mencionado, celobionolactona es el producto de oxidación de la celobiosa de CDH, por lo tanto, puede ser concluido que CDH indirectamente influencia la actividad de β -glucosidasa (Kim *et al.*, 2011).

II.4. Aplicaciones de la CDH

CDH tiene varias propiedades interesantes, encontrando diversas aplicaciones técnicas. Celobiosa deshidrogenasa puede transferir electrones a un electrodo que contiene osmio de polímero activo, funcionando como un biosensor amperométrico adecuado para la medición de celobiosa y lactosa presente en los alimentos, ideal para las personas con intolerancia a este disacárido.

Además, el dominio *hemo* de la CDH permite a la enzima transferir electrones directamente a un electrodo de grafito, una propiedad inusual que permite la construcción de electrodos y usado en combinación con un electrodo de glucosa oxidasa y una columna de fase inversa, CDH proporciona una poderosa herramienta analítica para la determinación de celodextrinas (Henriksson *et al.*, 1998).

Una posible aplicación es la medición de la actividad de celulasa y el control del nivel de la lactosa durante la elaboración del queso. CDH también se puede utilizar en ensayos colorimétricos para la determinación de celobiosa o lactosa; y es utilizada para el blanqueo de la pasta de manera similar como con enzimas lignolíticas (Henriksson *et al.*, 1998). También se emplea como agente aclarador en la industria textil, clarificación de jugos y bio-remediador en compuestos fenólicos (Henriksson, 1995).

II.5. Organismos productores de Celobiosa deshidrogenasa

Zamocky *et al.*, 2006 mencionan que la CDH es producida por un gran número de hongos fitopatógenos y saprófitos, con metabolismo heterótrofo que adquieren sus nutrimentos mediante absorción. Secretan enzimas extracelulares que descomponen moléculas complejas a compuestos simples que pueden absorber y utilizar.

Asimismo, se han reportado otros organismos productores de CDH, como lo son las bacterias celulolíticas: *Cytophaga LX-7*, que puede degradar la celulosa completamente y *Fibrobacter succinogenes S85*, la cual ha revelado en su genoma más de 100 enzimas activas contra polisacáridos vegetales. Sin embargo, la presencia de la actividad CDH permanece como “cuestionable” en estos organismos (Li *et al.*, 1996; Nouaille *et al.*, 2009; Henriksson *et al.*, 2000).

II.6. Nutrientes esenciales para la producción de enzimas fúngicas.

Para su desarrollo los hongos requieren sustancias nitrogenadas, azúcares, macroelementos (K, P, Mg, S y Ca), microelementos (Fe, Zn, Mn, Mo, Co y Cu) y vitaminas.

El nitrógeno es utilizado por los hongos con fines funcionales y estructurales. La pared celular de muchas especies, excepto oomicetos y levaduras, contiene quitina, que es un polímero lineal de la D- glucosamina. Las proteínas, purinas, pirimidinas, enzimas y algunas vitaminas son también compuestos que contienen nitrógeno.

La concentración de nitrógeno en el medio de cultivo es importante: ya que el crecimiento vegetativo y la esporulación son normales solo cuando la cantidad de nitrógeno es apropiada, la ausencia de nitrógeno ocasiona que el crecimiento micelial sea raquítico y nula la esporulación, mientras que un ligero exceso da como resultado abundante micelio pero poca esporulación.

La fuente de carbono es probablemente el factor más importante para la esporulación de los hongos: una elevada concentración de carbohidratos generalmente favorece el crecimiento del micelio. Los oligosacáridos y polisacáridos generalmente favorecen más la esporulación que los monosacáridos, puesto que su hidrólisis lenta equivale a usar una concentración baja de azúcares, lo cual permite poco crecimiento del micelio, pero algo de esporulación. Los monosacáridos y disacáridos que son hidrolizados rápidamente dan como resultado una elevada concentración de azúcar y, con ello, mucho micelio, pero poca esporulación.

Macroelementos

Fósforo. Este elemento es considerado esencial para los hongos, toda vez que del micelio y esporas se han aislado varios compuestos fosforados que intervienen en diversas transformaciones químicas y en el transporte de energía. Por ejemplo, se sabe con certeza que el Fósforo participa en la oxidación de la glucosa, forma parte de las nucleoproteínas, regula la utilización del carbono y del nitrógeno y afecta la síntesis de algunas vitaminas, como la tiamina, la riboflavina y el ácido nicotínico. Aparentemente, el Fósforo es utilizado por los hongos solo en forma de fosfatos.

Potasio. Es absorbido en su forma catiónica, K^+ , interviene en la síntesis de azúcar y almidón, traslado de azúcares, síntesis de proteínas y en la estimulación enzimática.

Magnesio. A semejanza del Fósforo, muchos sistemas enzimáticos son activados por el Magnesio y se le encuentra involucrado en procesos de fermentación y en la oxidación aeróbica de los carbohidratos.

Microelementos

Hierro. Este elemento es considerado esencial para los hongos por el hecho de que es bien conocida la existencia de un grupo grande de enzimas que lo contienen. Además, se ha visto que algunos hongos secretan mayor cantidad de enzimas cuando se incrementa el Hierro.

Zinc. Activa, inhibe o forma parte de varias enzimas y es importante en la utilización de la glucosa, cuya oxidación completa es favorecida por concentraciones relativamente altas de Zinc.

Cobre. El Cobre es un elemento esencial pero también es un ingrediente activo de muchos fungicidas, por consiguiente, la concentración de este elemento debe tomarse en cuenta al estudiar sus efectos. También debe considerarse el fenómeno de antagonismo iónico, pues el efecto de una cantidad determinada de Cobre depende de los demás ingredientes del medio de cultivo.

Manganeso. Naturalmente presente en la corteza de la Tierra, desempeña funciones esenciales en la retención de Carbono, la fotosíntesis y en el transporte de nutrientes.

Molibdeno. La característica más notable de este elemento esencial es su participación en el metabolismo del nitrógeno. La utilización de nitrógeno procedente de nitratos por plantas verdes y hongos así como por la fijación de Nitrógeno atmosférico por bacterias depende del Molibdeno.

Vitaminas

Algunos hongos son capaces de sintetizar, a partir del substrato, las vitaminas y factores de crecimiento que necesitan, pero otros no pueden hacerlo. Así, cuando en un medio de cultivo particularmente sintético, algún hongo no crece bien, es necesario investigar si no se debe a falta de vitaminas. Los requerimientos de número y tipo de vitaminas dependen de la especie de hongo. La biotina o vitamina A, la tiamina, piridoxina, el inositol, ácido nicotínico y el ácido pantoténico, comúnmente, no son sintetizados por algunos hongos. Sin embargo, la vitamina que falta, con mayor frecuencia, es la tiamina.

II.7. Diseños Estadísticos de Experimentos

Para optimizar procesos de fabricación, condiciones de reacción y métodos de análisis entre otros ambientes, es necesario conocer qué variables influyen significativamente en la respuesta y cómo la afectan. El diseño estadístico de experimentos contempla una amplia variedad de estrategias experimentales que son óptimas para generar la información que se busca. Estos experimentos están planeados de forma que se varían simultáneamente varios factores a diferentes niveles. Además, los experimentos se complementan de tal modo que la información buscada se obtiene combinando las respuestas de todos ellos. Esto permite obtener la información con el mínimo número de experimentos y por tanto, con el menor coste y con la menor incertidumbre posible. A cada tipo de diseños le corresponde un modelo matemático el cual, permitirá predecir matemáticamente el comportamiento de variables en un proceso físico.

Una clase única de diseños que minimizan la varianza de los coeficientes de regresión (β_i) son los diseños ortogonales de primer orden. Por ortogonal se entiende que los elementos fuera de la diagonal de la matriz son iguales a cero, lo cual implica que los productos cruzados de las columnas de la matriz x son igual a cero. Esta clase de diseños ortogonales de primer orden incluyen: los diseños factoriales 2^k , fracciones de la serie 2^k , diseños simplex y diseños Plackett-Burman.

Diseños factoriales 2^k : En este diseño los k factores se codifican a los niveles estandarizados ± 1 . El diseño permite la estimación del error experimental a menos que se repitan los experimentos, para lograr esto, se aumenta el diseño con observaciones en el centro resultando ser una desventaja de este diseño ya que los puntos centrales no tienen influencia en los β_i .

Fracciones de la serie 2^k : Se denomina fracción de un diseño factorial a un diseño en el que no se realizan todos los experimentos que se indican en la tabla estándar, sino sólo una fracción de ellos. La fracción $\frac{1}{2}$ se denota como 2^{k-1} y contiene la mitad de las combinaciones de un 2^k mientras que la fracción $\frac{1}{4}$ se denota como 2^{k-2} y contiene la cuarta parte de las combinaciones de un 2^k . Además, cabe señalar que al usar un diseño 2^{k-1} no podemos medir la posible falta de ajuste del modelo, a menos que se cuente con una estimación de la varianza del error haciendo réplicas del punto central.

Diseño simplex: En este diseño los puntos se localizan en los vértices de una figura regular, esta tiene $k+1$ vértices y está en k dimensiones. Para $k=2$ la figura geométrica es un triángulo equilátero y para $k=3$ es un tetraedro. Como el número de puntos es igual al número de coeficientes de los modelos se recomienda adicionar réplicas en el punto central para que sea posible la varianza del error y/o llevar a cabo la prueba de falta de ajuste.

Diseños Plackett-Burman: Estos diseños son fraccionales de arreglos factoriales 2^k . A diferencia del resto de los diseños de primer orden; con este diseño los coeficientes de regresión se estiman con máxima precisión y el número final de experimentos es muy reducido con una baja variabilidad entre ellos.

II.8. Producción de CDH en *Colletotrichum lindemuthianum*

CDH es producida cuando la celulosa es la principal fuente de carbono, en paralelo con las celulasas y hemicelulasas. Sin embargo, Szabo *et al.*, 1996 lograron producir grandes cantidades de CDH en fermentaciones de *P. chrysosporium* por la adición de cantidades limitantes de celobiosa o mezclas de celobiosa y glucosa. Por tanto, parece probable que las CDHs sean inducidas por bajas concentraciones de celobiosa (que es el principal producto enzimático de la degradación de la celulosa), sino que también, estén sometidas a represión catábolica por concentraciones excesivas de celobiosa o glucosa (Baldrian *et al.*, 2008).

Para acelerar el crecimiento y producción de enzimas de *C. lindemuthianum* se adiciona dextrosa al medio ya que la celulosa como única fuente de carbono, el hongo produce la mayor cantidad de sus celulasas hasta después del día 16 de incubación (Flores García 2004). Bajo estas condiciones de crecimiento con dextrosa al 5% *C. lindemuthianum* tiene un rendimiento de enzima producida (actividad de celobiosa deshidrogenasa) por dextrosa consumida de $18.9E-05$ U/mg/ml, una velocidad de crecimiento de 0.0529 h^{-1} , una velocidad de enzima producida de $3.2E-05$ U/h y una velocidad de consumo de dextrosa de $0.1103 \text{ mg/ml} \cdot \text{h}$. Por consiguiente, la dextrosa

al 5% supera el rendimiento de producción de enzima por más de dos veces y por más de 10 veces a las que contienen celulosa y dextrosa al 5% (Calderón Oropeza, 2009).

El cambio de la fuente de carbono de dextrosa por los diferentes disacáridos no favorece la producción de la enzima; el cambio de fuente de nitrógeno de nitrato de amonio por nitrato de potasio logra un aumento en la producción de actividad de hasta 1.6 veces con un rendimiento de 48.5 U/l, aunque esta última contiene nitrógeno en menor proporción, la presencia de potasio y su capacidad para ionizarse en medio acuoso, permite una mejor disposición de nitrógeno, además de que el potasio es un macroelemento esencial (Calderón Oropeza *et al.*, 2009).

II.9. Biología de *Colletotrichum lindemuthianum*

Colletotrichum lindemuthianum es un organismo que cuenta con la presencia de celulasas motivo por el cual fue seleccionado además, es un hongo ascomiceto y pertenece a la clase de deuteromicetos es causante de la antracnosis del frijol, presenta dos conductas de alimentación para obtener las fuentes de carbono y nitrógeno a través de enzimas líticas que rompen la pared de la célula vegetal (Calderón Oropeza 2009).

C. lindemuthianum posee un ciclo de vida complejo presentando varias fases de desarrollo para adquirir nutrientes. Cada fase es muy diferenciada permitiéndole al hongo sobrevivir de manera independiente de su fase de desarrollo. En la forma imperfecta la reproducción es asexual, las esporas se producen dentro de acérvulus y a estas a su vez están concentradas en un mucílago. El desarrollo de estas esporas presenta dos ciclos de vida: como saprófito o biótrofo siendo así clasificado como hemibiótrofo (Martínez Pacheco *et al.*, 2009).

Durante su fase saprofítica la germinación de las esporas comienza cuando el periodo de latencia ha terminado, posterior a la germinación comienza el crecimiento vegetativo, seguido de la formación de estructuras fructíferas para que finalmente se presente la esporogénesis, finalmente su ciclo de vida de completa y comienza todo de nuevo.

En su estilo de vida como biótrofo, la germinación de las esporas comienza bajo condiciones adecuadas de humedad, iniciando con la adhesión de la espora a la superficie de la planta, donde debido a la absorción de agua y al crecimiento activo se produce un aumento de tamaño generando un tubo germinativo que le ayuda a atravesar la barrera de la pared vegetal, seguido de la formación de la hifa primaria, la cual le permite obtener su alimento a partir del contenido celular, terminando el ciclo con el crecimiento vegetativo. En ambos estilos de vida, el hongo requiere de un conjunto de enzimas extracelulares para la obtención de sus nutrimentos (Martínez *et al.*, 2009).

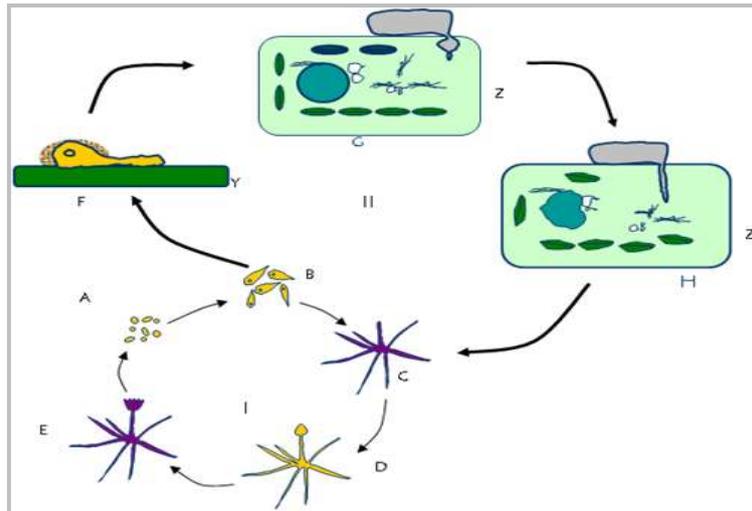


Fig 4. Ciclo de vida de *C. lindemuthianum*. I. Fase saprofitica. II. Fase biotrófica, A) Esporas; B) Germinación de las esporas; C) Crecimiento vegetativo; D) Estructuras fructíferas; E) Esporogénesis; F) Adhesión; G) Penetración; H) Hifa primaria; Y) Superficie del frijol; Z) Célula del frijol (Flores , 2004; Martínez et al., 2009).

En el hongo *C. lindemuthianum* se han descrito diversas enzimas extracelulares, todas ellas están involucradas en la degradación de algunos componentes de la pared celular vegetal.

Calderón Oropeza *et al.*, 2011 realizaron la caracterización parcial de una enzima con actividad enzimática tipo disacárido deshidrogenasa en el hongo *C. lindemuthianum*. Cuando se analizó la actividad de ésta disacárido oxidorreductasa, se observó que podía usar a la celobiosa como tal, por lo que se consideró una CDH.

Sin embargo, mostró afinidad por otros sustratos, como lactosa y sacarosa. Se determinó que la concentración óptima de celulosa con la que se obtiene mayor producción de CDH se encuentra en el intervalo de los 31-54 g/L. Se consideró la adición de dextrosa para acelerar el crecimiento y producción de enzimas de *C. lindemuthianum* ya que se determinó que con celulosa como única fuente de carbono, el hongo produce la mayor cantidad de sus celulasas hasta después del día 16 de incubación (Flores García, 2004). Los resultados indicaron que la celulosa no es un inductor en la producción de CDH ya que los parámetros cinéticos obtenidos con dextrosa a las dos concentraciones probadas fueron mejores a los obtenidos con la mezcla de celulosa y dextrosa a las dos concentraciones evaluadas (Calderón Oropeza *et al.*, 2011)

Además resulta interesante el estudio de CDH, ya que presenta ventajas tanto de estabilidad como de producción en el área de la biotecnología. En cuanto a la estabilidad, presenta un intervalo de temperatura óptima, donde a una temperatura de 55°C la enzima ya es inactiva y es inducida en presencia de glucosa y otros oligosacáridos, ventaja que a nivel industrial se traduce en un ahorro económico, para mantener la eficiencia del sistema. Por lo anterior, en este trabajo se planteó la pregunta de si diferentes sustratos incrementan la producción y actividad específica de CDH.

Cuadro 1. Enzimas extracelulares caracterizadas de *C. lindemuthianum*.

| Enzimas | Función | Referencia |
|--|---|---|
| Celobiosa deshidrogenasa | Degradación de celobiosa | Calderón Oropeza <i>et al.</i> , 2011 |
| β-glucosidasa, Endo y Exocelulasas | Degradación de celulosa | Flores García, 2004 Martínez Pacheco <i>et al.</i> , 2009 |
| Poligalacturonasas; Pectin y Pectatoliasas | Hidrólisis de α -D-galacturonosil-(1,4)-O- α -D-galacturonato, rhamnogalacturonanas, arabinanas, galactanas | Anderson, 1978; Wijesundera <i>et al.</i> , 1989; Keon, 1990; Wattard <i>et al.</i> , 1997 |
| Quitina desacetilasa | Degradación de quitina | Tsigos y Bouriotis, 1995 |
| Cutinasa | Degradación de alcoholes primarios, ácidos y sus esteres, alcoholes secundarios, cetonas, parafinas | Dickman y Patil, 1986; Sthal y Shafer, 1992 |
| Lacasa | Oxidación de lignanos, alcoholes cinnamílicos | Anderson y Nicholson, 1996 |

III. Justificación

Actualmente existe una creciente demanda industrial por catalizadores biológicos, entre los que se encuentra la celobiosa deshidrogenasa (CDH) que está presente en el hongo *C. lindemuthianum*; posee gran aplicación biotecnológica y un amplio espectro de sustratos para llevar a cabo transformaciones químicas y energéticas. Una alternativa para mejorar los procesos industriales catalizados por CDH es mediante la implementación de diversas fuentes de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo analizadas con diseños experimentales estadísticos, que proporcionarán las condiciones de fermentación óptimas que permitan incrementar la producción y actividad específica de CDH para su obtención y/o purificación.

IV. Hipótesis

Diversas fuentes de carbono y nitrógeno en el medio de fermentación de *C. lindemuthianum* incrementan la producción de CDH y su actividad específica

V. Objetivos

V.1. Objetivo general

- Optimizar el medio de fermentación de *C. lindemuthianum*

V.2. Objetivos particulares

- Seleccionar los componentes del medio de cultivo para mejorar la producción de CDH
- Establecer nueva condición de fermentación para una disacárido óxido-reductasa
- Demostrar la efectividad del empleo del diseño factorial Plackett-Burman

VI. Materiales y Métodos.

VI. 1. Material biológico

El aislado silvestre AFG2 de *C. lindemuthianum* proviene de campos de labranza sembrados con *Phaseolus vulgaris* var. flor de mayo del Estado de Zacatecas, durante los años de 1995 a 2001 y forma parte del cepario del laboratorio de Fisiología Celular del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH.

VI.2. Medios de cultivo

a) Agar papa dextrosa (PDA). Se utilizaron 39 g del medio agar papa dextrosa (Bioxon) y se disolvieron en 1L de agua destilada, se sometió a ebullición durante un minuto y finalmente se esterilizó.

b) Medio mínimo líquido (Bartnicki-García y Nickerson, 1962).

Cuadro 2. Composición del medio mínimo líquido.

| Componente | Gramos por litro |
|---------------------------------------|----------------------|
| Glucosa | 20 |
| KH ₂ PO ₄ | 3 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 0.5 |
| NH ₄ NO ₃ | 0.5 |
| ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 1.8X10 ⁻³ |
| FeSO ₄ · 7H ₂ O | 1X10 ⁻³ |
| Tiamina | 1X10 ⁻³ |
| Ácido nicotínico | 1X10 ⁻³ |
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | 4X10 ⁻⁴ |
| MnSO ₄ · H ₂ O | 3X10 ⁻⁴ |

Todos los componentes del medio de cultivo se disolvieron en amortiguador a pH de 4.5 para finalmente esterilizarlo por filtración.

c) Caldo papa dextrosa (PDB). Contiene infusiones de papa y dextrosa. Se utilizaron 24.0 g/L de PDB (SIGMA), se disolvieron en agua desionizada y por último se esterilizó.

d) Medio mínimo reportado por Calderón Oropeza en el 2009. Este medio contiene 5% de dextrosa y 0.1% de nitrato de potasio como fuente de carbono y nitrógeno respectivamente ambos se disuelven en agua desionizada y posteriormente se esteriliza por filtración.

VI.3. Siembra del hongo *C.lindemuthianum*

Para la propagación del hongo se realizan diluciones 1:10 de esporas de *C.lindemuthianum* en agua desionizada estéril, posteriormente se distribuyeron 100 µl de la suspensión de esporas en las cajas de Petri con agar PDA. Las cajas se almacenan a 28°C durante 8 días tiempo necesario para que las esporas germinen.

VI.4. Obtención de esporas de *C.lindemuthianum*

Una vez que las esporas ya germinaron en las cajas de PDA, se añaden 6 ml de agua tridestilada estéril, se frota débilmente la superficie total de la placa con el empleo de un bisturí posteriormente, se recolecta la suspensión de esporas en un tubo Falcón, se agita y centrifuga a 3700 rpm durante 8 minutos, se desecha el sobrenadante y se continua con los lavados hasta que el líquido sobrenadante sea transparente. Por último, la suspensión de esporas se almacena a 4°C.

VI.5. Conteo de esporas de *C.lindemuthianum*

Se realizaron diluciones 1:10, 1:100, 1:1000 del concentrado de esporas con agua desionizada estéril, se colocó una pequeña muestra de cada dilución en la cámara de Neubauer y se determinó la concentración de esporas 5×10^8 esporas/ml. Para obtener la cantidad de esporas por ml, se utilizó la siguiente fórmula:

$$(\text{Dilución})(\text{Número de esporas})(\text{Número de campos}) / (1 \times 10^{-6} \text{ ml} = \text{esporas/ml}) \quad (1)$$

VI.6. Esterilización por filtración

Para la esterilización de disoluciones con componentes termolábiles se empleó el método de esterilización por filtración; este método se realizó mediante el empleo de una membrana de nylon MILLIPORE con un tamaño de poro de 0.22 y 0.45 μm capaces de retener bacterias presentes en el medio de cultivo.

Además de las membranas se utilizó un equipo de filtración el cual consta de un matraz kitasato, embudo de filtración, vaso de filtración, pinzas y bomba al vacío, los cuales son esterilizados previamente en autoclave. El filtrado obtenido se transfirió a matraces Erlenmeyer de 250 ml con tapón de algodón estériles.

VI.7. Determinación de proteína soluble

El método de Lowry es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas, este método se basa en la reacción de Biuret y en la reacción de Folin-Ciocalteu. Se forma un complejo colorido en las proteínas, siendo la intensidad de color de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer. Este método consta de dos etapas: en la primera los iones Cu^{+2} en medio alcalino se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos, exponiéndose los residuos de tirosina que participan en la segunda reacción. En la segunda etapa, el cobre actúa como catalizador de la reducción, el constituyente principal de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, que al ser reducido por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina da lugar a un complejo de color azul intenso (Lowry *et al.*, 1951).

Este método emplea las siguientes disoluciones:

A: 3% de Na_2CO_3 en NaOH 0.2 M

B: 4% de Citrato de sodio.

C: 2% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Se preparó una mezcla de las disoluciones anteriores en una proporción de 48:1:1 de A: B: C. Para tal caso se obtuvo una curva patrón de proteína en donde la pendiente de la curva ($Y = 0.0667X - 0.0485$) fue utilizada para determinar el contenido de proteína de la muestra problema. Se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) como estándar en un intervalo de concentración de 1 a 100 $\mu\text{g/ml}$, la formación de color azul se determinó a 600 nm.

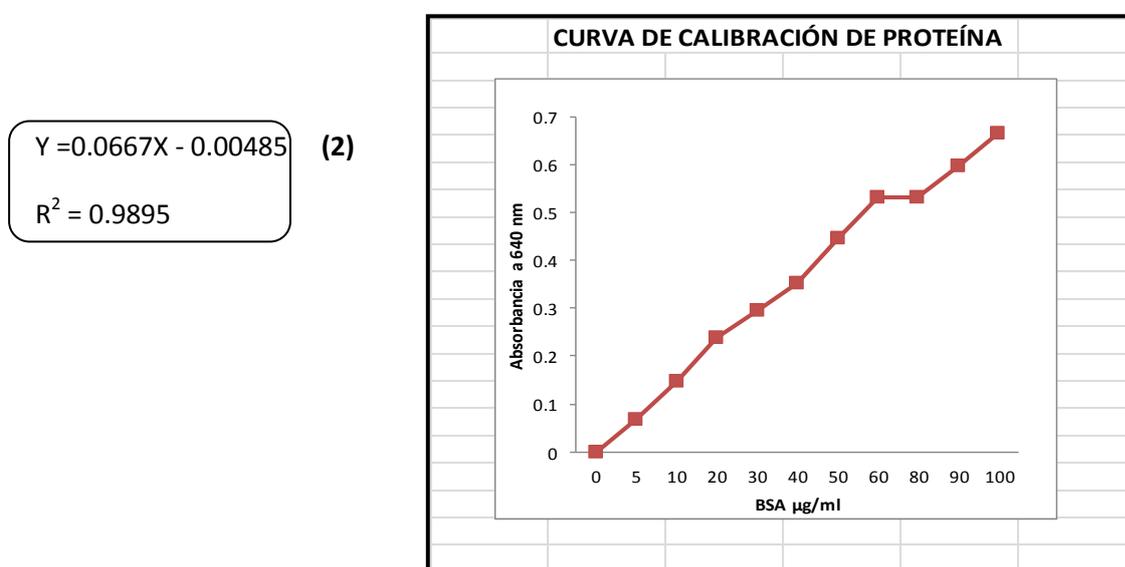


Fig.5. Curva de calibración de proteína obtenida por el método de Lowry.

VI.8. Determinación de la actividad específica de CDH

El ensayo enzimático se realizó mediante el método descrito por Ghahfarokhi *et al.*, 2004, el cual mide la actividad enzimática de la CDH mediante la disminución de la absorbancia del DCPIP durante el primer minuto. La absorbancia se midió con un espectrofotómetro de luz ultravioleta-luz visible Cary 50 UV-Vis a 600 nm.

La celobiosa, el diclorofenolindofenol y el fluoruro de sodio se encuentran disueltos en un amortiguador de fosfato a una concentración 10mM a pH de 6.3. La preparación del blanco se realizó con todos los componentes anteriores a excepción de la proteína extracelular. La proteína extracelular se obtuvo mediante la filtración del cultivo, una vez que el cultivo se hizo pasar a través de papel filtro, el filtrado se recuperó y se empleó para la determinación de actividad.

| | | | |
|-----------------|-----------|---------|-----------------------|
| Celobiosa 2.5mM | DCPIP 2Mm | NaF 4mM | Proteína extracelular |
| 850 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl |

La reacción fue iniciada inmediatamente por la adición del filtrado; el espectrofotómetro registra el curso temporal de la reacción enzimática durante el primer minuto y detecta la disminución de la absorbencia debido a la reducción del aceptor de electrones, que es este caso es del 2,6-dicloroindofenol. El espectro registró una pendiente y su valor se utilizó para determinar la actividad enzimática. Para determinar la actividad total se utilizó el coeficiente de extinción molar (ϵ) del 2,6-diclorofenolindofenol cuando es leído a 600 nm a 25°C y a presión de 1.012atm.

$$\epsilon_{600}^{DCFIF} = 1.5712 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\text{Actividad específica} = \frac{(\text{Valor de la pendiente}) \cdot (\text{Volumen total de reacción})}{(\epsilon_{600}^{DCFIF}) \cdot (\text{Longitud de la cubeta})} \div \text{mg de proteína} \quad (3)$$

Actividad específica = mol/min·mg proteína

Para determinar la actividad específica se obtuvo el cociente de la actividad total y el contenido de proteína. El ensayo se realizó al menos tres veces.

VI.9. Diseño experimental Plackett-Burman

Para la optimización del medio de fermentación se empleó el diseño Plackett-Burman el cual es un diseño de para escrutinio que permite establecer la relación entre variables de estudio y la variable respuesta. Es un diseño completamente ortogonal que reduce sustancialmente el número de experimentos a realizarse con un elevado número de variables. En este diseño cada factor se coloca a dos niveles que se denotan como (-1) y (+1); pudiendo escribirse en forma simple como (-) y (+); las variables pueden ser de tipo cualitativa o cuantitativa (Plackett y Burman, 1946).

Es simple de construir una matriz para este tipo de diseño; en la mayoría de los casos la primera línea ya está dada y las restantes se obtienen por permutaciones. El diseño se representa mediante una ecuación polinomial.

VI.10. Curso temporal de CDH

Todos los medios de cultivo utilizados en micología han de contener los nutrientes suficientes para asegurar el desarrollo de los hongos (fuentes de carbono, nitrógeno, vitaminas, oligoelementos, etc.). El ensayo enzimático se realizó mediante diferentes tratamientos de fermentación.

Se prepararon 50 ml de cada medio de cultivo líquido, se inocularon con esporas de *C. lindemuthianum* con una concentración de 5×10^8 esporas/ml y se dejaron en agitación durante ocho días a temperatura ambiente. A las 24 h se tomó una alícuota de 5 ml la cual, se filtró para ser posteriormente empleada para la cuantificación de proteína y determinación de la actividad específica de CDH. El ensayo se realizó por triplicado.

VI.11. Análisis estadístico

Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y el promedio obtenido fue considerado como el valor de la respuesta.

Los datos obtenidos se expresan como la media \pm error estándar (ee), se realizó la prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha = 0,05$), así como un análisis de varianza de dos vías con el paquete estadístico Statistic versión 7.0 para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados.

Para el análisis estadístico de la matriz de datos del diseño Plackett-Burman se empleó el Industrial Statistics and Six Sigma para el diseño experimental del paquete estadístico Statistic versión 7.0 para determinar las variables de estudio significativas entre las diversas fermentaciones realizadas.

VII. Discusión

C. lindemuthianum es un hongo fitopatógeno causante de la antracnosis del frijol; ha sido reportado como un organismo eficiente para la producción de enzimas degradadoras de la pared celular vegetal destacando la celobiosa deshidrogenasa que posee una única especificidad y estructura además de sus atractivas y potenciales aplicaciones en la industria del papel, en biorremediación/biodegradación y biocatálisis (Calderón *et al.*, 2011; Baminger *et al.*, 1999; Zamocky *et al.*, 2006). Celobiosa deshidrogenasa es inducida en presencia de un amplio espectro de sustratos, resultando ser una ventaja a nivel industrial pues se traduce en un ahorro económico.

Los diseños experimentales basados estadísticamente han probado ser valiosas herramientas para la optimización de condiciones de fermentación (Al-Sarrani *et al.*, 2005). Una de las ventajas de emplear un diseño experimental multi-factorial es que tal enfoque considera la interacción entre la naturaleza no lineal de las respuestas en pocos experimentos (Gresham e Inamine, 1986). A través del empleo de diseños experimentales se mejora cualquier proceso biotecnológico e industrial con miras a su optimización; además no solo se aplican estas herramientas matemáticas a las condiciones de fermentación de microorganismos sino a un sin fin de procesos, tal es el caso de: Tinoco *et al.*, 2011 que implementaron estas herramientas estadísticas para la optimización de la calidad sensorial de las mortadelas.

Existen diferentes diseños estadísticos experimentales donde el objetivo primordial es el análisis de la influencia de diversos factores sobre una respuesta dada. Entre estos diseños se destaca el diseño Plackett-Burman el cual estudia el efecto de diversas variables sobre la respuesta reduciendo al mínimo la varianza de las estimaciones de estas dependencias utilizando un número limitado de experimentos y donde los coeficientes de regresión son muy precisos. Es por ello, que el diseño Plackett-Burman resulta ser una herramienta con más ventajas debido a la precisión de la ejecución de sus experimentos comparada con otros diseños factoriales (Ríos 2012).

En el presente estudio, el diseño Plackett-Burman demostró ser una eficiente propuesta para optimizar los componentes del medio que afectan la producción y actividad enzimática de CDH en *C. lindemuthianum*. Además, los 18 tratamientos mostraron completa ortogonalidad, esto redujo la variabilidad entre cada una de las ejecuciones.

Estadísticamente todos los tratamientos del diseño Plackett-Burman son iguales. Sin embargo, los tratamientos 3 y 16 presentaron mayor actividad específica en términos numéricos esto se debe a que el diseño no considera los efectos de la interacción entre los nutrientes sino únicamente el efecto de cada variable sobre la respuesta (Plackett y Burman, 1946). Es por ello, que específicamente no se sabe que combinación de elementos influyen mayormente sobre la respuesta.

Los nutrientes significativos fueron elegidos debido a su efecto final sobre la actividad enzimática. El valor de probabilidad y la distribución de F son los indicadores más importantes para la selección de aquellas variables que influyen sobre la optimización de un proceso experimental; asimismo, los coeficientes de regresión señalan aquellas variables que presentan un efecto sobre la respuesta y el nivel de concentración al que cada parámetro debe ser empleado. Aravindan *et al.*, 2007 emplearon estos mismos indicadores para la optimización de la producción de lipasas por *P. fluorescens*.

Hayder *et al.*, 2011 consideraron al valor de p como la mejor herramienta para la selección de cada nutriente significativo. De igual manera, Bakonyi *et al.*, 2011 en su trabajo de optimización de la fermentación de biohidrógeno por *E. coli* señala que los parámetros por encima del nivel de confianza del 95% fueron seleccionados para la optimización de hidrógeno. En definitiva, las variables independientes con un valor de $p \geq \alpha$ a los niveles de confianza incrementan la respuesta del proceso a optimizar.

VIII. Conclusión

Las fuentes de carbono y nitrógeno son esenciales para el desarrollo biológico de los microorganismos; y son sumamente necesarias para que las enzimas lleven a cabo transformaciones químicas y obtengan energía además, la presencia de nitrógeno en el medio es utilizado por los hongos para fines funcionales y estructurales.

El diseño estadístico de experimentos Plackett-Burman resultó ser una herramienta efectiva para la optimización del medio de producción de *C. lindemuthianum*. Este modelo experimental convierte las variables de proceso en un modelo matemático que predice donde es probable que se intensifique la respuesta. La celulosa, celobiosa, urea, KNO_3 , MgSO_4 y KCl son los elementos con efecto significativo sobre la producción y actividad de CDH.

IX. Bibliografía

- Al-Sarrani, A.Q.M., El-Naggar, M.Y.M. 2006. Application of Plackett-Burman factorial design to improve citrinin production in *Monascus ruber* batch cultures. Botanical Studies. 47:167-174.
- Anderson A.J. 1978. Extracellular enzymes produced by *Colletotrichum lindemuthianum* and *Helminthosporium maydis* during growth on isolated bean and corn walls. Phytopathology. 68:1585-1590.
- Anderson D.W., Nicholson R.L. 1996. Characterization of a laccase in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. Mycology. 88: 996-1002
- Aravindan, R., Meikandhan, T., Viruthagiri, T. 2007. Statistical evaluation of medium components by Plackett-Burman experimental design and kinetics modeling of lipase production by *Pseudomonas fluorescens*. Indian Journal of Biotechnology. Vol 6, pp 469-478.
- Bakonyi, P., Nemestóthy, E.L., Bélafi-Bakó, K. 2011. Application of Plackett-Burman experimental design to optimize biohydrogen fermentation by *E.coli* (XL1-BLUE). International Journal of Hydrogen Energy. 36: 13949-13954.
- Baldrian, P., Valashkova, V. 2008. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. FEMS Microbiol. 32: 501-521.
- Baminger, U., Nidetzky, B., Kulbe, D.K., Haltrich, D. 1999. A simple assay for measuring cellobiose dehydrogenase activity in the presence of laccase. Journal of Microbiological Methods. 35:253-259.
- Bartnicki-García, S., Nickerson, W.J. 1962. Nutrition, growth and morphogenesis of *Mucor rouxii*. Journal of Bacteriology. 84: 841-858.
- Calderón Oropeza M. A. 2009. Caracterización parcial de la celobiosa deshidrogenasa de *Colletotrichum lindemuthianum*. Tesis de maestría. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Calderón O. M., Mendoza, M.R., López, G., Santoyo, G., Flores, G.A., Martínez, P. M.M. 2011. Scrutiny for a disaccharide oxide reductase from filamentous extracellular pathogens. African Journal of Microbiology. Vol. 5(21), pp 3487-3492.
- Demarche P., Junghanns C., Nair R., Aghatos N. 2011. Harnessing the power of enzymes for environmental stewardship. Biotechnol. Adv. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.05.013.
- Dickman M.B., Patil S.S. 1986. Cutinase deficient mutants of *Colletotrichum gloeosporoides* are nonpathogenic to papaya fruit. Physiological and Molecular Plant Pathology. 28: 235-243.
- Flores García, A. 2004. Capacidad celulolítica de *Colletotrichum lindemuthianum* en la fase saprofítica. Tesis de maestría en ciencias. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Ghahfarokhi, M.S., Fazli, A., Lotfi, A., Abyaneh, B.R. 2004. Cellobiose dehydrogenase production by the genus *Cladosporium*. Iranian Biomedical Journal. 8: 107-111

- Gresham, R., Inamine, E. 1986. Nutritional improvement of process. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. pp. 41-48.
- Hayder, K., Zulkuli, M.M.D. 2011. Application of Plackett-Burman design for screening the media components for citric acid production from paddy straw using solid-state fermentation. International Journal of ChemTech Research. Vol. 3(2): 1015-1019.
- Henriksson, G., Ander, P., Pettersson, B., Pettersson, G. 1995. Cellobiose dehydrogenase (Cellobiose oxidase) as a wood degrading enzymes. Studies on cellulose, xylan and synthetic lignin. Applied Microbiology and Biotechnology. 42, 790-796.
- Henriksson G. 1995. Structure, function and applications of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*. Ph.D. Dissertation, Uppsala University, Sweden. Almqvist and Wiksell International, Stockholm, Sweden ISBN 91-554-3503-3
- Henriksson, G., Johansson, G., Petersson, G. 2000. A critical review of cellobiose dehydrogenases. Journal of Biotechnology. 78, 93-113.
- Henriksson, G., Pettersson, G., Johanson, G., Ruiz, A., Uzcategui, E. 1991. Cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* can be cleaved by papain into two domains. European Journal of Biochemistry. 196, 101-106.
- Henriksson, G., Sild, V., Szabo, I.J., Pettersson, G., Johansson, G. 1998. Substrate specificity of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*. Biochimica et Biophysical Acta, 1383, 48-54.
- Keon J.P., Wadman G., Bailey J.A. 1990. A comparative of the biochemical and physiological properties of polygalacturonase from two races of *Colletotrichum lindemuthianum*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 37: 193-199.
- Kremer, S. M., Wood, P.M. 1992. Evidence that cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* is primarily an iron(III) reductase: kinetic comparison with neutrophil NADPH oxidase and yeast flavocytochrome b2. Eur J Biochem 205:133-138.
- Kim, E., Choi, H.S., Kang, S.W., Song, H. K., Han, S.O., Park, C., Kim, S.W. 2011. Enhanced production of cellobiose dehydrogenase and β -glucosidase by *Phanerochaete chrysosporium*. Korean J. Chem. 29: 77-81.
- Li, X., Huang, Y., Xu, D., Xiao, D., Jin, F., Gao, P. 1996. Cellobiose-oxidizing enzyme from a newly isolated cellulolytic bacterium *Cytophaga* sp. LX-7. 2: 205-210.
- Lowry, D.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193: 268-275.
- Ludwing, R., Haltrich, D. 2003. Optimisation of cellobiose dehydrogenase production by the fungus *Sclerotium (Athelia) rolfsii*. Appl. MicrobiolBiotechnol. 61:32-39.
- Martínez M.M., Saucedo L.J., Flores G.A., Martínez R.E., Campos G.J. 2009. *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. Is a potencial cellulases producer microorganism. Revista Latinoamericana de Microbiología. 51: 23-31.

Nouaille R., Matuloya M., Pätöprstý V., Delort A.M., Forano E. 2009. Production of oligosaccharides and cellobionic acid by *Fibrobacter succinogenes* s85 growing on sugars, cellulose and wheat straw. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83: 425-433.

Plackett and Burman.1946. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika.* 4: 305-325.

Ramírez Valdespino C. A. 2011. Determinación de la presencia del gen *cdh* en *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magnus) Lamb Scrib. Tesis de maestría. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Ríos, Varillas, C. 2012. Estadística y diseño de experimentos. Universidad Nacional de Ingeniería. Lima. 3^o edición. Editorial Universitaria.

Romero, C. 1993. Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. México pp.347

Roy, B.P., Dumonceaux, T., Koukoulas, A.A.1996. Purification and characterization of cellobiose dehydrogenases from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol* 62:4417–4427

Sthal D.J., Shafer W. 1992. Cutinase is not required for fungal pathogenicity on pea. *The Plant Cell.* 4: 621-625.

Szabó, I. J., Johansson, G., Pettersson, G. 1996. Optimized cellulose production by *Phanerochaete chrysosporium*: control of catabolite repression by fed-batch cultivation. *Journal of Biotechnology.* 48: 221-230.

Tinoco, M., Rojas, C., Tripaldi, P., Criollo, M., Huayasaca, L. 2011. Multicriteria decisión functions and Plackett-Burman design application for the study of sensory quality of mortadelas. *Revista Venezolana y Tecnología de Alimentos.* 2(1): 142-157.

Tsigos T.Y., Bouriotis V. 1995. Purification and characterization of chitin desacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Journal of Biological Chemistry.* 270: 26286-26291.

Wattard C., Dobir D., Dinoor A., Prusky D. 1997. Pectate lyase of *Colletotrichum gloeosporioides* attacking avocado fruit: cloning and involvement in pathogenicity. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 50: 197-212.

Wijesundera R.L.C., Bailey J.A., Byrde R.J., Fielding A.H. 1989. Cell wall degrading enzymes of *Colletotrichum lindemuthianum*: Their role in the development of bean anthracnose. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 34 : 403-413.

Xu, F. 2005. Applications of oxidoreductases: Recent Progress. *Industrial Biotechnology.* 8, 38-50.

Yoshida, M., Igarashi, K., Kawai, R., Aida, K. Samejima, M.2004. Differential transcription of β -glucosidase and cellobiose dehydrogenase genes in cellulose degradation by the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Letters,* 235, 177-182

Zamocky, M., Ludwig, R., Peterbauer, C., Hällberg, B. M., Divne, C., Nicholls, P., Haltrich, D. 2006. Cellobiose dehydrogenase- a flavocytochrome from wood-

degrading, phytopathogenic and saprotropic fungi. *Current Protein and Peptide Science*, 7, 255-280.