

Determinación *in vitro* de los patrones de inducción de una endo-xilanasa (E.C.3.2.1.8) secretada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. Purificación y caracterización parcial

In vitro determination of secretion patterns of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* endoxylanase (E.C.3.2.1.8). Purification and partial characterization

Determinação “*in vitro*” dos padrões de indução de uma endoxilanase (E.C.3.2.1.8) segregada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. Purificação e caracterização parcial

Sixta T. Martínez¹, Paola Martínez, Vicky Carolina González, Blanca L. Higuera¹

Recibido: 12/10/12 – Aceptado: 13/12/12

RESUMEN

Al hacer un ensayo *in vitro*, la enzima xilanasa secretada por el patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* se induce en presencia de pared celular de tallo y raíz de clavel de variedades tolerantes y resistentes. Se observa un comportamiento diferencial según el órgano y la variedad, que demuestra la influencia, en la inducción, de las características del hospedero.

La enzima se purifica parcialmente utilizando cromatografías de intercambio catiónico, aniónico y tamiz molecular. La caracterización bioquímica presenta los siguientes valores: masa molecular 38,8 kDa, temperatura y pH óptimo 35 °C y 10, respectivamente, $K_m^{ap} = 0,2$ mg/mL, $V_{max}^{ap} = 500$ U/mg.

La presencia de oligogalacturónidos como productos de hidrólisis detectados con una cromatografía en capa delgada permite clasificar la enzima como una endoxilanasa.

La enzima retiene el 50 % de su estabilidad a pH muy alcalino, y presenta alta termoestabilidad en un intervalo de temperatura entre 30 y 80 °C.

Palabras clave: xilanasa, *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, clavel, pared celular.

ABSTRACT

By means of an *in vitro* assay of xylanase enzyme, secreted by the pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* in the presence of stem and root carnation cell

1 Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Colombia. stmartinezp@unal.edu.co

wall from tolerant and resistant varieties, the enzyme was induced. A differential behavior was observed according to the organ and the variety which shows the influence of the host characteristics in the induction.

The enzyme was partially purified using cationic, anionic exchange and sieve molecular chromatography. The biochemical characterization showed the following enzyme data: 38.8 kDa of molecular mass, 35°C and 10 of optimum temperature and pH respectively, $K_m^{ap}=0.2$ mg/mL and $V_{max}^{ap}=500$ U/mg.

The presence of oligogalacturonides as hydrolysis products detected with thin layer chromatography, allowed us to classify the enzyme as an endoxylanase.

The enzyme keeps 50% of its stability at a very alkaline pH and shows thermostability in a range temperature between 30-80°C.

Key words: xylanase, *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, carnation, cell wall.

RESUMO

Usando um ensaio “in vitro” a enzima xilanase segregada pelo fungo patogénico *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* se induz em presença de parede celular de caule e raiz de cravo de variedades tolerantes e resistentes. Se observa um comportamento diferencial segundo o órgão e a variedade que demonstram a influencia, na indução, das características do hospedeiro.

A enzima se purifica parcialmente utilizando os métodos de cromatografia de intercâmbio catiônico, aniônico e peneira molecular. A caracterização bioquímica apresenta os seguintes valores: Massa molecular 38,8 kDa, temperatura e pH óptimos de 35°C e 10, respectivamente, $K_m^{ap}=0,2$ mg/mL, $V_{max}^{ap}=500$ U/mg.

A presença de oligogalacturonídos como produtos de hidrólise detectados com uma cromatografia em capa fina permite classificar a enzima como uma endoxilanase.

A enzima retém 50% da sua estabilidade a pH muito alcalino e apresenta uma alta termoestabilidade num intervalo de temperatura entre 30 e 80 °C

Palavras-chave: endoxilanase, *Fusarium*, cravo, indução xilanase

INTRODUCCIÓN

La floricultura colombiana constituye uno de los principales sectores agrícolas en el país; los claveles junto con las rosas son las principales flores de corte comercializadas globalmente. Colombia lidera la exportación de claveles en el mundo, siendo una flor aceptada por su color y belleza (1). Uno de los problemas limitantes en la producción del clavel es la enfermedad de la marchitez vascular, ocasionada por el patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (Fod). Desde 1975, en la sabana de Bogotá se han presentado epidemias severas con pérdidas económicas muy significativas, lo que ha impulsado a los productores a utilizar suelos nuevos no infestados por el patógeno, y a aplicar medidas de control quí-

mico, con el consiguiente aumento en los costos de producción y contaminación ambiental. Estas pérdidas persisten entre un 10 y 15 % a pesar de las medidas de control adoptadas (1, 2).

Muchos microorganismos que actúan como patógenos de plantas o como saprófitos de estas secretan enzimas que degradan los componentes de la pared celular; entre ellas, celulasas, pectinasas y xilananas (3). Se considera que las enzimas desempeñan un papel importante en patogénesis porque permiten el avance del microorganismo por la pared celular de la planta hidrolizando sus componentes (4). El xilano componente de la hemicelulosa es un carbohidrato heterogéneo con una cadena principal de 150-200 residuos de xilosa unidas por enlace $\beta(1-4)$ y cadenas laterales de arabinosa $\alpha(1-3)$ o ácido glucorónico $\alpha(1-2)$. La degradación de esta molécula compleja requiere varias enzimas, una de ellas la endo $\beta(1-4)$ xilanasa (E.C.3.2.1.8) que hidroliza los enlaces glicosídicos $\beta(1-4)$ de la cadena principal produciendo xilooligosacáridos de diferente longitud (5).

Las xilananas se reportan como factores proteicos que elicitán respuesta de defensa en tabaco (*Nicotiana tabacum*) y tomate (*Lycopersicon esculentum*); aplicadas a hojas de estos cultivos inducen síntesis de etileno, producción de fitoalexinas y de proteínas relacionadas con patogenicidad, así como necrosis y respuesta hipersensible (6). De otro lado, trabajos realizados con *Magnaporthe grisea*, *Cochliobolus carbonum* y *Trichoderma* spp muestran que esta enzima no es necesaria para patogenicidad ni induce actividad elicitora (6-7). Gómez-Gómez (8) reportan que la inactivación

de los genes *xyl4* y *xyl3* de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* no presenta efecto detectable en la virulencia del patógeno en plantas de tomate. González Ronceiro *et al.* (9) afirman que la presencia de varios genes que codifican para esta enzima determinó su no influencia en patogenicidad. Sin embargo, el interés en esta clase de proteínas que degradan pared se mantiene, dado que el patógeno debe penetrar la pared celular (PC) para los procesos de colonización. Jorge *et al.* (10) afirman que la degradación de la PC, debe representar una función importante en la enfermedad del marchitamiento vascular debido a que el patógeno crece a través del córtex de la raíz y coloniza el xilema. La primera evidencia del papel en patogénesis de la xilanasa se obtiene eliminando el gen que la codifica del patógeno de plantas *Botrytis cinerea*, con lo cual se afecta severamente la virulencia del microorganismo tanto en hojas de tomate como de vid (11). Beliën *et al.* (4) destacan el papel dual de las endoxilananas como promotores de virulencia de microorganismos fitopatógenos y en la inducción de respuesta de defensa en las plantas. Debido a su potencial relevancia en procesos de patogenicidad y también al posible uso en la industria, la enzima ha sido purificada y caracterizada en diferentes microorganismos tanto en *Fusarium* como en otros géneros *F. verticilloides* (12), *F. proliferatum* (13), *F. oxysporum* (14, 15, 16), *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (5), *Bacillus pumilus* (17), *Chaetomium cellulolyticum* (18), *Bacillus amyloliquefaciens* (19), *Rhizopus oryzae* (20), *Aspergillus ficuum* (21).

Los hongos filamentosos secretan enzimas que degradan xilano con niveles

más altos que en bacterias y levaduras, razón por la cual resultan interesantes a nivel industrial (21). El uso de xilanases mejora la calidad y textura de productos de panadería, reduce la cantidad de cloro requerido para blanqueamiento de pulpa de papel y aumenta la calidad nutricional de la dieta de pollos (22, 23).

Con el propósito de avanzar en el conocimiento de la interacción Fod-clavel, en el aspecto concerniente a las enzimas que secreta el hongo en contacto con el hospedero, se compara la influencia de dos tejidos de clavel raíz y tallo de variedades resistentes y susceptibles, en la secreción de xilanasa por *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*. La enzima que secreta el patógeno en tiempos relativamente tempranos se purificó y caracterizó parcialmente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se emplearon esquejes de clavel de una variedad susceptible (S) Delphi (D) de color blanco y otra resistente (R) Bright rendez vous lavander bicoloro (BRV), al marchitamiento vascular causado por el hongo Fod, donados por la empresa Louisiana Farms.

El aislamiento del hongo fue suministrado por el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, conservado en medio PDA, revirulentado en esquejes de clavel de la variedad susceptible. El inóculo se preparó a partir del micelio conservado en medio PDA, se propagó en medio líquido que contenía

25 % de papa y 0,2 % de glucosa durante 5 días con agitación a 25 °C. Finalizado el tiempo se filtró en condiciones asépticas y se llevó a una concentración de 1 x 10⁵ conidias /mL (conteo realizado en hemocitómetro).

Determinación de actividad xilanasa

La actividad xilanasa se cuantificó midiendo los azúcares reductores liberados por la enzima en la mezcla de reacción, con el método de Somogyi Nelson (24-25). Se usó como sustrato xilano de madera de abedul (Sigma), un polisacárido con más del 90 % de residuos de xilosa. Las condiciones iniciales para la medida de actividad fueron las reportadas por Parra (26). La mezcla que se utilizó luego de ajustar las condiciones de reacción para la enzima xilanasa secretada por Fod en extracto crudo fueron: 120 μ L de xilano de madera de abedul 0,5 % como sustrato, 60 μ L de solución reguladora $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_3^{2-}$ 100 mM pH 10 y 70 μ L de la solución que contenía la enzima; la mezcla de reacción se incubó a 45 °C durante 20 minutos. Se realizaron simultáneamente blancos de enzima y de sustrato para restarlos al valor de mezcla de reacción. La unidad de actividad xilanasa se definió como la cantidad de enzima que libera un nanomol de azúcares reductores por segundo bajo las condiciones de trabajo. La actividad específica se expresó como nkatal /mg de proteína. Para determinar la actividad de la enzima se realizó una curva de calibración con patrón xilosa y concentraciones entre 0-500 μ g/mL. El intervalo de concentración se determinó mediante la curva de Ringbom, realizando cada determinación por triplicado.

Los métodos más utilizados para determinar el contenido de azúcares reductores son el de 3,5 dinitrosalicilato y el de Somogyi-Nelson; una de las ventajas de este último sobre el primero es la sensibilidad del ensayo y la mejor relación estequiométrica con el color a medida que aumenta el grado de polimerización del sustrato (21).

Extracción de pared celular

A partir de los tallos y raíces de las variedades D y BRV se extrajo la pared celular utilizando tampón fosfato y SDS (26, 27).

Ensayo *in vitro* para la determinación de la actividad xilanasa secretada por el hongo Fod

En erlenmeyers que contenían caldo de papa 25 %, con una concentración final de $5,5 \times 10^5$ conidias de Fod/mL, se colocaron los respectivos inductores en una concentración de 0,5 %. El ensayo se planeó para un tiempo total de 73 horas y se detuvieron los ensayos a las 6,5, 17, 25, 29, 33, 43, 50, 60, 65 y 73 horas; finalizado el tiempo se filtraron dos medios de cultivo por ensayo, se dializaron y se determinó la actividad enzimática por triplicado al igual que la cantidad de proteína. El sobrenadante del cultivo se utilizó como extracto crudo (E crudo). Cada uno de los ensayos realizados estuvo acompañado de un control al cual no se le agregaba inductor. Como inductores se utilizaron pared celular extraída de raíz y de tallo de las dos variedades propuestas y xilano de hojuelas de avena (sigma).

Cuantificación de proteína

El contenido de proteína se determinó con el método de Bradford (28, 29). Se realizó una curva de calibración con BSA.

Purificación parcial de la enzima

A partir del extracto crudo, obtenido en el día en que se presenta la mayor inducción, se inició la purificación de la enzima. Primero se eliminaron compuestos de bajo peso molecular, entre ellos azúcares reductores usando diáfiltración. El extracto crudo dializado se liofilizó, se disolvió en tampón fosfato $H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$ 25 mM pH 7,5, y se pasó por columna de CM-Sephadex (20,7 cm x 1,7 cm); este tampón se utilizó también para equilibrar y eluir la columna con una velocidad de flujo 0,6 mL/min. Se recogieron fracciones de 2,0 mL; las proteínas retenidas se eluyeron con NaCl 1 M. Los tubos con actividad xilanasa se dializaron, se liofilizaron y se colocaron en una columna empacada con DEAE-celulosa (6,3 cm x 1,7 cm) disueltos en tris-HCl 25 mM pH 7,5, tampón que se usó también para equilibrar y eluir la columna con una velocidad de 1 mL/min; se recogieron fracciones de 2,0 mL; las proteínas retenidas se eluyeron con NaCl 1 M. El pico que presentó actividad se dializó y concentró por liofilización para pasarlo por una columna de tamiz molecular Sephadex G-75 (20,7 cm x 1,7 cm) en la cual se utilizó como eluente Tris-HCl 25 mM pH 7,5 usado en el paso anterior para desarrollar las mismas etapas enumeradas para las cromatografías anteriores. Al conjunto de tubos que constituyan un pico de actividad xilanasa se le determinó la actividad, al igual que el contenido

de proteína, y se usó para la caracterización bioquímica.

Determinación de parámetros óptimos de reacción

La variación de la actividad con el pH se determinó usando buffer AcOH/AcO⁻, para pH 3-5,4; H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ para pH 6-8, glicina/NaOH para pH 9-10 o Borato/HCl para pH 9 y HCO₃⁻/CO₃²⁻ y Na₂CO₃/HCO₃⁻ para pH 10; todos en concentración 100 mM. La actividad a pH 9 y 10 se repitió haciendo mediciones con soluciones reguladoras diferentes para corroborar el resultado. La determinación de la temperatura de mayor actividad se realizó con ensayos entre 20 y 60 °C. Estas determinaciones se llevaron a cabo con extracto crudo y con enzima pura.

Determinación de constantes cinéticas

Obtenidos los parámetros que determinan la mayor actividad de la enzima, finalmente se realizó el efecto de la concentración de sustrato usando valores de xilano de abedul entre 0,2 y 1,0 %. Con los resultados obtenidos y usando el método de los inversos de Lineweaver-Burk se determinó Km^{ap} y V_{max}^{ap}.

Determinación del peso molecular

El peso molecular de la enzima purificada se determinó por SDS-PAGE; se utilizó un gel de 8,8 %. Los patrones de bajo peso molecular usados fueron (Sigma M3913): albúmina de suero bovino (66 kDa), ovoalbúmina de huevo de gallina (45 kDa), gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa de músculo de conejo (36

kDa), anhidrasa carbónica de eritrocitos de bovino (29 kDa), tripsinógeno de páncreas de bovino (24 kDa), inhibidor de tripsina de granos de soya (20 kDa), α -lactoalbúmina de leche de bovino (14 kDa) y aprotinina (6,5 kDa).

Caracterización de actividad endoxilanasa

Con el propósito de conocer si la enzima tiene actividad endo o exo se utilizó cromatografía en placa delgada con soporte sílicagel 60 y eluente: cloroformo/ácido acético/ agua (6:7:1). Como revelador se usó Etanol/ ácido sulfúrico (95:5). Finalizada la cromatografía, las placas se calentaron a 100 °C hasta que aparecieron manchas. Como patrón se utilizó xilosa 1%. La hidrólisis de la muestra se llevó a cabo a 1,2 y 3 horas (30).

Determinación de estabilidad al pH

La determinación de la estabilidad al pH de la enzima se realizó entre los valores de 3 y 12. La xilanasa se incubó durante 12 horas en las soluciones de los pH seleccionados a temperatura ambiente; finalizado el tiempo se determinó la actividad residual con las condiciones ajustadas para la enzima parcialmente purificada. Las soluciones reguladoras utilizadas para los valores entre 3 y 10 son las mismas ensayadas para determinar el valor de pH óptimo. Para los valores 11 y 12 se utilizó glicina /NaCl 100 mM (12, 13, 31).

Determinación de estabilidad a la temperatura

Para establecer la termoestabilidad de la enzima xilanasa, se evaluó la pérdida de

actividad cuando se incuba la enzima a distintas temperaturas: 40, 50, 60, 70 y 80 °C durante 30 minutos. Finalizado el tiempo, se determinó la actividad residual a las condiciones óptimas encontradas y se compararon con un control de la enzima no sometido a incubación (12, 13, 31).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ensayos *in vitro* con inductores son una modalidad que se ha utilizado para observar comportamientos en cuanto a la secreción, niveles, tiempo y regulación de enzimas producidas por los patógenos (27, 32).

A partir de los ensayos *in vitro* realizados, se indujo la actividad enzimática y se obtuvieron los perfiles de producción de la enzima xilanasa usando como inductores PC obtenida de tallo y de raíz, de dos variedades de clavel S y R (Figuras 1 y 2). La actividad xilanasa se indujo con los dos componentes de la planta adicionados al medio de cultivo. Los mayores niveles de actividad se observaron en presencia de raíz aunque a un tiempo de inducción posterior al presentado en el tallo, hecho que muestra una respuesta diferencial de la secreción de la enzima de acuerdo con la parte de la planta y el grado de resistencia del hospedero en contacto con el patógeno. Este comportamiento se puede presentar debido a que se requieren mayores niveles de enzima al inicio del proceso de colonización en el primer sitio de contacto, como lo muestran los resultados de actividad en raíz; sin embargo, los niveles más altos de actividad se presentan a un tiempo posterior comparado con el tallo, hecho que podría reflejar la diferencia en com-

posición del xilano entre los inductores o la presencia de compuestos preformados por la planta en la raíz que retardan la acción del patógeno. Se ha reportado en algunas especies de plantas, como por ejemplo cereales, la presencia de proteínas inhibidoras de xilanasa que actúan en el proceso de defensa en plantas (4). El tiempo al cual se induce la enzima en los órganos estudiados es temprano, con raíz en presencia de las dos variedades a las 20 horas, la cual aumenta considerablemente hacia las 50 horas para la variedad R y a las 70 h para la variedad S, y con tallo a las 25 y 35 horas, con las variedades R y S, respectivamente; estos corresponden a tiempos menores de inducción que los presentados por pectato liasa y serin proteasa secretadas por este hongo en ensayos similares (26, 27). Estos resultados permiten considerar la xilanasa como una de las primeras enzimas secretadas por el patógeno en el proceso de infección, y es, por tanto, importante para la colonización del hospedero. Ensayos con patógenos de cebada en medio de cultivo líquido utilizando PC de hojas, raíces y tallos concluyen que la actividad xilanasa estaba influida por la fuente de carbono, y que las razas más agresivas producen mayores niveles de esta enzima (32).

Las enzimas hidrolíticas que secreta el patógeno se usan como herramientas para la colonización del hospedero y para utilizar los productos de hidrólisis de la PC como fuente de carbono. Estas no le son útiles solamente al patógeno, puesto que también la planta se beneficia de ellas, dado que los oligalacturónidos producto de las enzimas hidrolíticas, los utiliza esta como elicidores de la respuesta de defensa, con lo cual se aplica lo

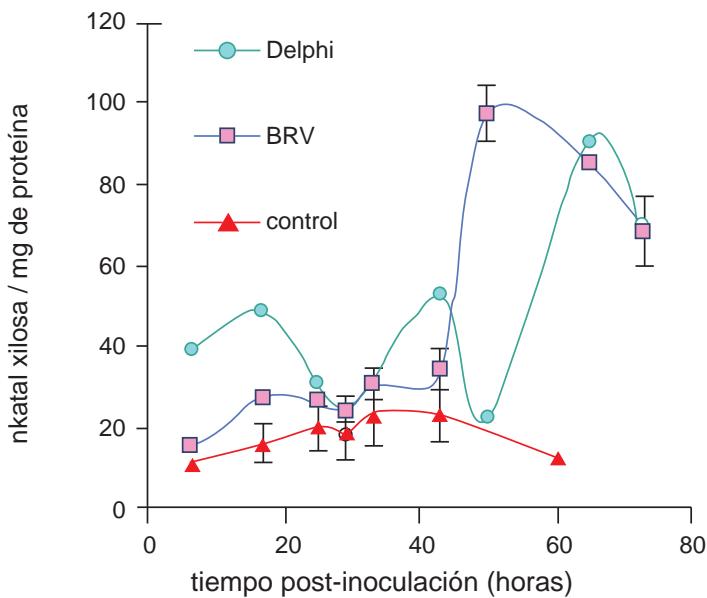


Figura 1. Evolución de la actividad xilanasa con el tiempo de cultivo de Fod en medios que contenían pared celular de raíz 0,5% de las variedades Delphi (S) y BRV (R).

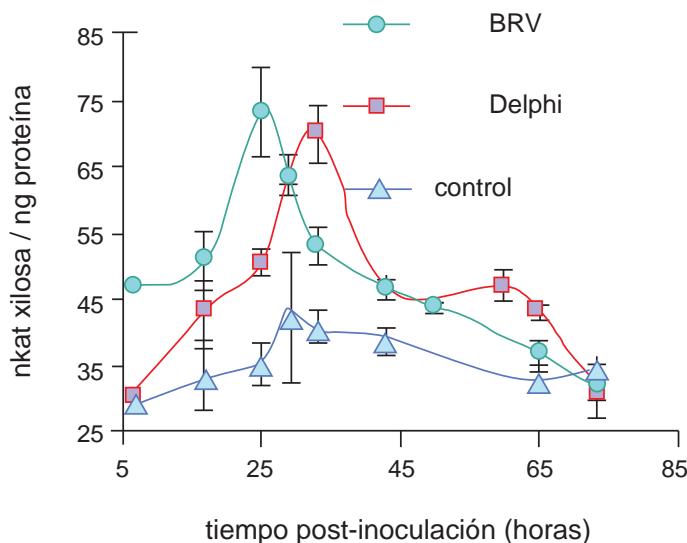


Figura 2. Evolución de la actividad xilanasa con el tiempo de cultivo de Fod en medios que contenían pared celular de tallo 0,5% de las variedades Delphi (S) y BRV (R).

afirmado por Esquerré-Tugayé (33): "La interacción entre microorganismo y planta es un diálogo en el cual la planta también resulta beneficiada".

La importancia de las enzimas que degradan pared es particular para cada modelo; por ejemplo Fod no secreta poligalacturonasa en presencia de PC y macerado de raíz de clavel, mientras que con estos inductores sí se induce pectato liasa (27). La actividad xilanasa, en este estudio, no se detectó en presencia de xilano de hojuelas de avena, hecho que podría reflejar la especificidad de la xilanasa secretada por Fod hacia el xilano del clavel o la intervención para su secreción de factores específicos que se encuentran en la planta.

La enzima se purificó usando columnas de intercambio iónico y tamiz molecular. Luego de pasar el E crudo dializado por una columna de CM-Sephadex, se obtuvo la actividad xilanasa en la fracción no retenido. Se continuó con el proceso de purificación en la columna de DEAE-celulosa (Figura 3), en donde se presentó una fracción con actividad también en la fracción no retenida, lo cual indica que probablemente la proteína estaba cerca al punto isoeléctrico pH 7,5. Finalmente se utilizó una columna de Sephadex G-75 en la cual el pico de actividad se encontró entre las fracciones 25-35 (Figura 4). El resumen de las técnicas y resultados de la purificación se presenta en la Tabla 1. A través del proceso se observó un único pico con actividad xilanasa, hecho que muestra cómo Fod, en las condiciones del cultivo usadas, produce una sola forma enzimática. Saha (12, 13) reporta resultados similares cuando la purifica de *F. verticillioides* utilizando xilano de

maíz como fuente de carbono. Producción de una sola forma enzimática por microorganismos diferentes a *Fusarium* se reportan en *Streptomyces viridosporus* T7A (34), *Trichoderma longibrachiatum* (35), *Rhizopus oryzae* (20), *Aspergillus carneus* (36). Es frecuente encontrar la presencia de isoenzimas secretadas por microorganismos para hidrolizar componentes de pared. Christakopoulos *et al.* (14, 15, 16) reportan la presencia de estas en *Fusarium oxysporum*; Ruiz *et al.* (5) detectan una xilanasa ácida y una básica cuando crece *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* en medio mínimo suplementado con tejido vascular de tomate como fuente de carbono.

El peso molecular de la enzima obtenida por PAGE-SDS fue de 38,8 kDa (Figura 5) semejante al de otras xilanases secretadas por el género *Fusarium*. *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* y *F. oxysporum* F3 aislado de comino secretan xilanases de 40 kDa (5) y 38 kDa (16), respectivamente. Reportes de xilanases con masas moleculares mayores o menores aparecen en (13, 14, 15, 37). El peso molecular obtenido está dentro del rango de masa 30-40 kDa, lo cual le permite a la proteína en el proceso de infección, como afirman Vorwerk y Somerville (38), difundir de la superficie de la pared celular a la membrana plasmática de la planta antes del contacto físico entre el patógeno y esta última.

Los factores que determinan la actividad enzimática se midieron en E crudo y con la enzima parcialmente pura. El pH presentó un valor de 10 en las dos formas, mientras que la temperatura manifestó diferencias: en el primero mostró un rango con amplia actividad entre 37 y

Tabla 1. Etapas de purificación para la enzima xilanasa secretada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*

Paso de purificación	Actividad total	Proteína total (mg)	Actividad Específica	Rendimiento %	Factor de purificación
Extracto crudo	97,123	7,589	12,797	100	1
CM-sephadex	55,258	2,569	21,510	56,89	1,68
DEAE-celulosa	35,516	0,768	46,24	36,57	3,61
Sephadex G-75	13,889	0,120	115,741	14,30	9,04

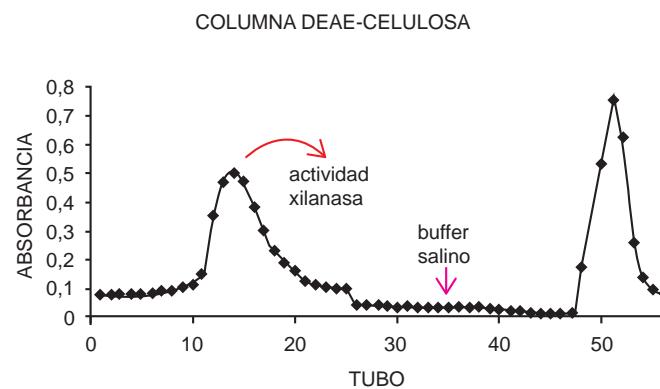


Figura 3. Perfil de elución en columna DEAE-celulosa, para purificación de xilanasa secretada por FOD. Elución discontinua con Tris-HCl 25 mM pH 7,5 y Tris-HCl 25mM con NaCl 1,0 mλ=280nm.

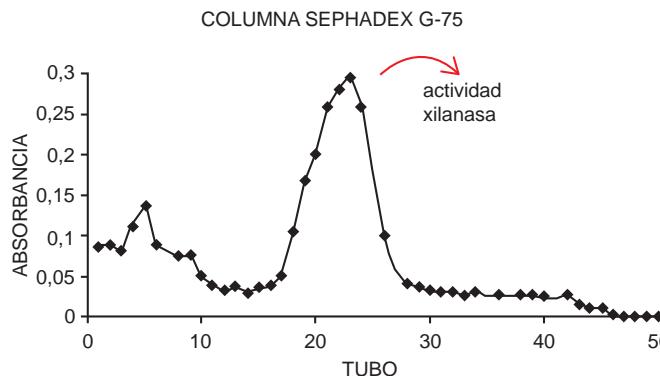


Figura 4. Perfil de elución en columna Sephadex G-75 para purificación de xilanasa secretada por Fod. Columna equilibrada y eluida con Tris-HCl 25mM absorbancia mλ=280nm.

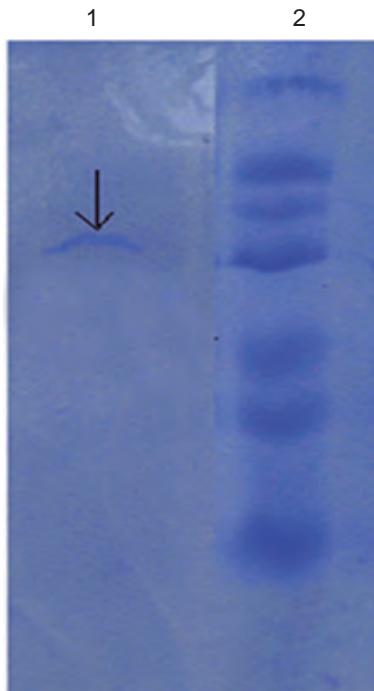


Figura 5. Determinación del peso molecular de la enzima xilanasa por PAGE-SDS. Carril 1:50 μ L de enzima carril 2: patrones de peso molecular.

55 °C. Sin embargo, la enzima parcialmente purificada presentó claramente la más alta actividad a 35 °C (Figura 6), hecho que hace suponer la presencia de un factor que estabiliza la enzima presente en el E. crudo, haciéndola resistente a la desnaturalización con la temperatura. La temperatura óptima de 35 °C se encuentra por debajo de las xilanásas secretadas por *Fusarium*; varias de las temperaturas óptimas secretadas por este hongo están entre 40 y 55 °C (13, 15, 16).

Bataillon *et al.* (39) observan cambios en el valor del pH para la enzima purificada y la presente en el E. crudo, hecho que atribuyen a la presencia de polisacáridos en el filtrado de cultivo o a las diferentes interacciones químicas

que presentan las enzimas cuando están en E. crudo o se encuentran purificadas. *Fusarium* secreta xilanásas cuyo rango de actividad va de ácido a neutro con pH entre 4,5 y 7,5 (12, 13, 14, 15, 16). Para microorganismos diferentes a *Fusarium* se reporta una con pH óptimo de 9 secretada por *Cellulomonas flavigena* (40).

Las constantes cinéticas obtenidas con la enzima parcialmente purificada son K_m^{ap} 0,2mg/ml y V_{max}^{ap} 500U/mg. Valores de K_m de 0,41mg/ml y 0,37 mg/ml obtiene Christakopoulos *et al.* (14) para las xilanásas I y II purificadas a partir de *Fusarium oxysporum* F3.

En el ensayo, usando cromatografía en capa delgada para determinar los

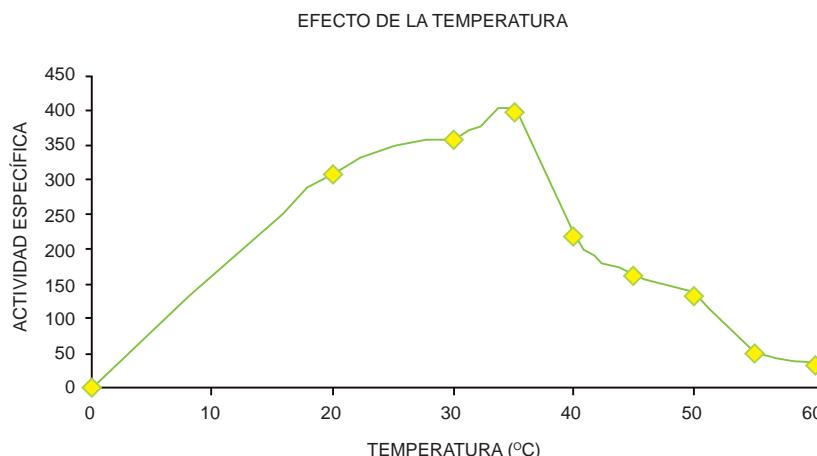


Figura 6. Variación de la actividad de la enzima xilanasa secretada por Fod con la temperatura. La actividad de la enzima se determinó incubándola con xilano de madera de abedul 0.5% en $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 100 mM pH 10.

productos de hidrólisis aparecen oligosacáridos, deducción que se comprueba comparando con el patrón de xilosa, resultado que conduce a clasificar la enzima como endoxilanasa.

La endoxilanasa presenta un rango amplio de estabilidad térmica entre 30 y 80 °C; a estas temperaturas retiene más del 70 % de estabilidad (Figura 7). Ensayos con tiempos de incubación semejantes al utilizado en este trabajo se realizaron con xilanases secretadas por *Streptomyces viridosporus* T7A (34) y *F. proliferatum* (13), las cuales iniciaron pérdida de actividad a los 60 °C. La enzima secretada por *F. verticillioides* (12) presentó comportamiento semejante a la secretada por Fod.

La enzima xilanasa secretada por Fod presenta un 30 % de estabilidad a pH entre 3 y 9; a partir de este valor aumenta hasta mantener 50 % de estabilidad a pH de 11 y 12 (Figura 8). Xilanases secre-

tadas por *Bacillus* sp. Strain SPS-0 (39), *F. verticillioides* (12), *F. proliferatum* (13) conservan su estabilidad hasta pH 9. La xilanasa secretada por *Aspergillus carneus* M34 retiene el 50 % de actividad a pH 7-9 luego de 12 h de incubación (36).

El valor de pH óptimo en la región alcalina, lo mismo que su estabilidad a pH alcalino, hace que surja la pregunta de si el patógeno modula el pH del hospedero en el proceso de colonización, como lo sugieren Yakobi *et al.* (41) y Kramer-Haimovich *et al.* (42). Estos autores afirman que los patógenos pueden alterar el pH en la vecindad del sitio de infección, y así modular la expresión de factores de patogenicidad.

La buena actividad de la enzima xilanasa secretada por Fod a pH alcalinos la hace muy buena candidata para ser utilizada en procesos industriales, entre ellos el de blanqueamiento de papel (23).

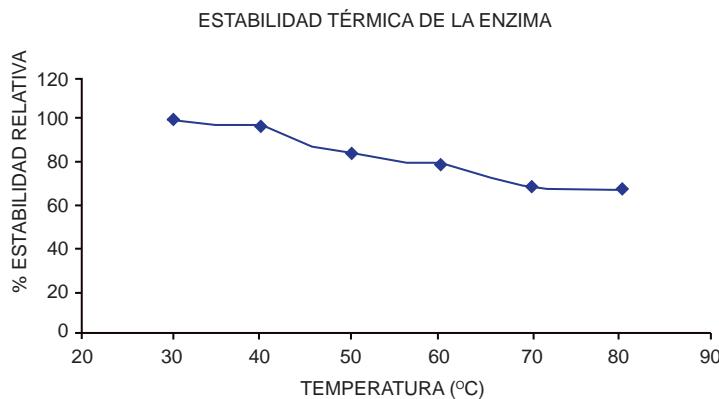


Figura 7. Determinación de la estabilidad a la temperatura de la enzima xilanasa secretada por Fod. La enzima se incubó a varias temperaturas en $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ pH 10 por 30 min.

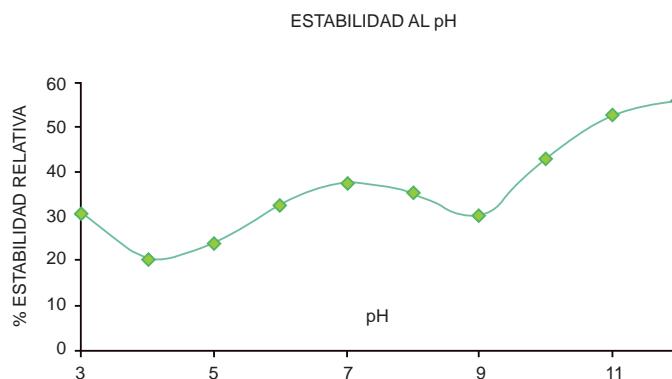


Figura 8. Determinación de la estabilidad al pH de la enzima xilanasa secretada por Fod. La enzima se incubó a diferentes pH durante 12h. Finalizado el tiempo se determinó su actividad a las condiciones óptimas.

CONCLUSIONES

El patógeno Fod secreta una endoxilanasa en presencia de pared celular de raíz y tallo de variedades S y R de clavel a tiempos más tempranos que otras enzimas hidrolíticas, lo cual lleva a pensar en la posibilidad de su participación en el proceso de colonización de su hospedero, el clavel.

La enzima con actividad endo tiene un peso molecular de 38,8 kDa, un pH y temperatura óptimos de 10 y 35 °C, respectivamente, una buena estabilidad en un amplio rango de temperatura y mayor al 50 % a pH alcalino; tiene características bioquímicas que la hacen interesante para estudios como factor de patogenicidad, y además la colocan con posibilidades de ser ensayada en procesos industriales que se desarrollen a pH muy alcalinos.

AGRADECIMIENTOS

El proyecto fue financiado con aportes de la DIB Universidad Nacional de Colombia y de Colciencias proyecto código 1101-452-21303.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castellanos, O. F.; Fonseca, S.; Buriticá, S. Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de flores y follajes con énfasis en clavel. Grupo de investigación y desarrollo en gestión, productividad y competitividad BioGestión. Universidad Nacional de Colombia.
2. Arbeláez, G. Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Colombiana*. 2000. **17**: 11-22.
3. Walton, J. D. Deconstructing the Cell Wall. *Plant Physiology*. 1994. **104**: 1113-1118.
4. Beliën, T.; Van Campenhout, S.; Robben, J.; Volckaert, G. Microbial endoxylanases: Effective Weapons to breach the Plant Cell-Wall Barrier or, rather, triggers of plant defense systems? *Molecular Plant Microbe Interactions*. 2006. **19** (10): 1072-1081.
5. Ruiz, M. C.; Di Pietro, A.; González Roncero, M. I. Purification and characterization of an acidic endo- β -1,4-xylanase from the tomato vascular pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *FEMS Microbiology Letters*. 1997. **148**: 75-82.
6. Enkerli, J.; Felix, G.; Boller, T. The enzymatic activity of fungal xylanase is not necessary for its elicitor activity. *Plant Physiology*. 1999. **121** (2): 391-397.
7. Apel, P. C.; Panaccione, D. G.; Holden, F. R.; Walton, J. D. Cloning and targeted gene disruption of XYL1, a beta 1,4-xylanase gene from the maize pathogen *Cochliobolus carbonum*. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 1993. **6** (4): 467-473.
8. Gómez-Gómez, E.; Ruiz-Roldán, M. C.; Di Pietro, A.; González Roncero, M. I.; Hera, C. Role in Pathogenesis of Two Endo- β -1,4-xylanase Genes from the Vascular Wilt Fungus *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology*. 2002. **35**: 213-222.
9. González Roncero, M. I.; Di Pietro, A.; Ruiz-Roldán, M. C.; Huertas-González, M. D.; García-Maceira, F. I.; Méglez, E.; Jiménez, A.; Caracuel, Z.; Sancho-Zapatero, R.; Hera, C.; Gómez-Gómez, E.; Ruiz-Rubio, M.; González-Verdejo, C. I.; Páez, M. J. Papel de enzimas líticas de la pared celular en la patogenicidad de *Fusarium oxysporum*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2000. **17**: S47-S53.
10. Navas-Cortés, J. I.; Jiménez-Díaz, R. M.; Tena, M. Cell wall degrading enzymes in *fusarium* wilt of chickpea: correlation between pectinase and xylanase activities and

- disease development in plants infected with two pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris*. *Canadian Journal of Botany*. 2006. **84**: 1395.
11. Juge, N. Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. *Trends in Plant Science*. 2006. **11** (7): 359-367.
 12. Saha, B. C. Xylanase from a newly isolated *Fusarium verticillioides* capable of utilizing corn fiber xylan. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001 **56**: 762-766.
 13. Saha, B. C. Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. *Process Biochemistry*. 2002. **37**: 1279-1284.
 14. Christakopoulos, P.; Nerinkcx, W.; Kekos, D.; Macris, B.; Claeysens, M. Purification and characterization of two low molecular mass alkaline xylanases from *Fusarium oxysporum* F3. *Journal of Biotechnology*. 1996. **51** (2): 181-189.
 15. Christakopoulos, P.; Kekos, D.; Macris, B. J.; Claeysens, M.; Bhat, M. K. Purification and characterization of a major xylanase with cellulase and transferase activities from *Fusarium oxysporum*. *Carbohydrate Research*. 1996. **289**: 91-104.
 16. Christakopoulos, P.; Nerinkcx, W.; Kekos, D.; Macris, B.; Claeysens, M. The alkaline xylanase III from *Fusarium oxysporum* F3 belongs to family F/10. *Carbohydrate Research*. 1997. **302**: 191-195.
 17. Asha Poorna, C.; Prema, P. Production and partial characterization of endoxylanase by *Bacillus pumilus* using agro industrial residues. *Biochemical Engineering Journal*. 2006. **32** (2): 106-112.
 18. Baraznenok, V. A.; Becker, E. G.; Ankudimova, N. V.; Okunev, N. N. Characterization of neutral xylanases from *Chaetomium cellulolyticum* and their biobleaching effect on eucalyptus pulp. *Enzyme and Microbial Technology*. 1999. **25** (8): 651-659.
 19. Breccia, J. D.; Siñeriz, F.; Baigorí, M. D.; Castro, G. R.; Hatti-Kaul, R. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology*. 1998. **22**:42-49.
 20. Bakır, U.; Yavascaoglu, S.; Guvenc, F.; Ersayın, A. An endo- β -1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. *Enzyme and Microbial Technology*. 2001. **29** (6/7): 328-334.
 21. Lu, F.; Lu, M.; Lu, Z.; Bie, X.; Zhao, H.; Wang, Y. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. *Bioresource Technology*. 2008. **99** (13): 5938-3941.
 22. Haltrich, D.; Nidetzky, B.; Kulbe, K. D.; Steiner, W.; Župančič, S. Production of fungal xylanases. *Bioresource Technology*. 1996. **58**: 137-161.

23. Khasin, A.; Alchanati, I.; Shoham, Y. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Applied Environmental Microbiology*. 1993. **59** (6): 1725-1730.
24. Somogy, M. A reagent for the copper-iodometric determination of very small amounts of sugar. *The Journal of Biological Chemistry*. 1937. **117**: 771-776.
25. Somogy, M. Notes on sugar determination. *The Journal of Biological Chemistry*. **159**: 19-23.
26. Parra Dimate, L. F. Estudio de enzimas que participan en la infección *Fusarium*- Clavel. Purificación y caracterización parcial de Poligalacturonasa (E.C. 3.2.1.15.) y Pectato Lasa (E.C.4.2.2.2.). Tesis para optar al título de Químico. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Química. 2001.
27. Gómez García, L.; Martínez, S. T. Inducción de dos enzimas pectolíticas en el modelo *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* - Clavel. *Revista Colombiana de Química*. 2001. **34**: 25.
28. Zor, T.; Selinger, Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Analytical Biochemistry*. 1996. **236** (2): 302-308.
29. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976. **72**: 248-254.
30. Ninawe, S.; Kapoor, M.; Kuhad, R. C. Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyanescens* SN32. *Bioresource Technology*. 2008. **99** (5): 1252-1258.
31. Wang, S-L.; Yen, Y-H.; Shih, I-L.; Chang, A. C.; Chang, W-T.; Wu, W-C.; Chai, Y-D. Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-15. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003. **33**: 917-925.
32. Peltonen, S. Comparison of xylanase production by fungal pathogens of barley with special reference to *Bipolaris sorokinian*. *Mycological Research*. 1995. **99** (6): 717-723.
33. Esquerré-Tugayé, M. T.; Boudart, G.; Dumas, B. Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogens. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2000. **38**: 157-163.
34. Magnuson, T. S.; Crawford, D. L. Purification and characterization of an alkaline xylanase from *Streptomyces viridosporus* T7A. *Enzyme and Microbial Technology*. 1997. **21** (3): 160-164.
35. Chen, C.; Chen, J-L.; Lin, T-Y. Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* for xylooligosaccharide

- production. *Enzyme and Microbial Technology*. 1997. **21**: 91-96.
36. Fang, H-Y.; Chang, S-M.; Lan, C-H.; Fang, T. J. Purification and characterization of a xylanase from *Aspergillus carneus* M34 and its potential use in photoprotectant preparation. *Process Biochemistry*. 2008. **43**: 49-55.
37. Alconada, T. M.; Martínez, M. J. Purification and characterization of an extracellular endo-1,4 β -xylanase from *Fusarium oxysporum* f.sp.*melonis*. *FEMS Microbiology Letters*. **118**: 305-310.
38. Vorwerk, S; Somerville, C. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends in Plant Science*. 2004. **9** (4): 203-209.
39. Bataillon, M.; Nunes Cardinali, A.-P.; Castillon, N.; Duchiron, F. Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase from *Bacillus* sp. strain SPS-0. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000. **26**: 187-192.
40. Martínez-Trujillo, A.; Pérez-Avalos, O.; Ponce-Noyola, T. Enzymatic properties of a purified xylanase from mutant PN-120 of *Cellulomonas flavigena*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003. **32**: 401-406.
41. Yakoby, N.; Kobiler, I.; Dinoor, A.; Prusky, D. pH Regulation of Pectate Lyase Secretion Modulates the Attack of *Colletotrichum gloeosporioides* on Avocado Fruits. *Applied Environmental Microbiology*. 2000. **66** (3): 1026-1030.
42. Kramer-Haimovich, H.; Servi, E.; Katan, T.; Rollins, J.; Okon, Y.; Prusky, D. Effect of ammonia production by *Colletotrichum gloeosporioides* on *pelB* activation, pectate lyase secretion, and fruit pathogenicity. *Applied Environmental Microbiology*. 2006. **72** (2): 1034-1039.

