



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

**Facultad de Ciencias de la Vida**

**"BIOPROSPECCIÓN DE ACTIVIDADES XILANOLÍTICAS A PARTIR DE  
HONGOS ENDÓFITOS AISLADOS DE *Theobroma cacao*"**

**Trabajo de titulación Previo a la obtención del Título de Magíster en Biociencias  
Aplicadas con Mención en Biodescubrimiento**

Presentado por: Jhon Victor Cruz Dávila

Guayaquil – Ecuador

2022

## AGRADECIMIENTO

Al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) y a sus colaboradores por todo el apoyo brindado durante la ejecución de mi tesis. Especialmente, quiero agradecer a mi tutora, Ph.D. Nardy Diez, por ser una verdadera líder que supo confiar en mí en todo momento, y también aconsejarme con paciencia y experiencia cuando fue necesario. A mi carismático amigo Ing. Jeffrey Vargas por su tiempo y sus conocimientos en el área de proteómica, que fueron muy útiles para cumplir varios de mis objetivos. Al Ph.D. Juan Manuel Cevallos por su amabilidad y entereza para dirigir el programa de maestría. A la Ph. D. Daynet Sosa por su confianza y respaldo incondicional desde la concepción de este proyecto de investigación. A mi cotutor, Ph.D. Edwin Vera, por su guía durante las pasantías y en el suministro de algunos reactivos. A la Red Universitaria VLIR Network Ecuador por el financiamiento del programa de investigación y posgrado. Además, no hubiera podido culminar este proyecto sin la ayuda de mi amada compañera de maestría y ahora de vida, Geovanna, y el apoyo afectivo de mi mamá, mi papá, mis hermanos, mi sobrina y mi gato, quienes le dan balance a mi vida.

**DEDICATORIA**

A mis queridos abuelos, papi Miguel y mami Rosita, y a todas aquellas almas que nos dejaron durante los momentos difíciles de la pandemia de COVID-19. Siempre estarán en mi memoria.

**TRIBUNAL DE GRADUACIÓN**

---

María Isabel Jiménez, Ph.D.  
**Presidenta**

---

Nardy Diez García, Ph.D.  
**Tutor**

---

Edwin Vera, Ph.D.  
**Cotutor**

---

Juan Manuel Cevallos, Ph.D.  
**Evaluador**

---

Denisse Peña, Ph.D.  
**Evaluador**

### **DECLARACIÓN EXPRESA**

"La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral".

---

Jhon Victor Cruz Dávila

## RESUMEN

En la actualidad, existe una tendencia por parte de la industria en la búsqueda de enzimas de origen natural y con alta actividad hidrolítica, que faciliten la bioconversión de la biomasa lignocelulósica para su aprovechamiento y aplicación en diversos procesos. Los hongos endófitos tienen la capacidad de producir una variedad de enzimas altamente específicas para la degradación de la pared celular vegetal, tales como xilanasas y celulasas. El objetivo de este estudio consistió en determinar la actividad xilanolítica de hongos endófitos aislados de hojas de *Theobroma cacao*. Se realizó la bioprospección de 24 cepas obtenidas del banco de microorganismos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Una primera selección cualitativa se llevó a cabo mediante un ensayo en placa, usando carboximetilcelulosa como sustrato (incubación: 72-120 h a 28°C, revelador: Rojo Congo). Posteriormente, se estimó cuantitativamente las actividades xilanolítica y celulolítica de los aislados seleccionados, mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), utilizando un medio mínimo salino suplementado con salvado de trigo como única fuente de carbono. Se seleccionó la cepa con mayor actividad xilanolítica y su producción de xilanasas fue optimizada en función de tres factores: tiempo de incubación, pH y temperatura por medio de la metodología de superficie de respuesta (MSR). La complejidad del secretoma de la cepa seleccionada se determinó mediante un análisis proteómico. Cinco cepas fúngicas presentaron amplias zonas de hidrólisis en placa y obtuvieron los mayores índices de actividad enzimática en la selección cualitativa. En el ensayo DNS, la cepa Ec220 (*Fusarium graminearum*) obtuvo la actividad xilanolítica más alta y significativa del estudio, además de una baja actividad celulolítica, por lo cual fue seleccionada como la cepa con mayor potencial xilanolítico. Las condiciones óptimas establecidas para la producción de xilanasas fueron: 6.5 días de incubación, pH 5.79 y 29.8°C, donde la mayor actividad xilanolítica observada (1.786 U/ml) estuvo en buena concordancia con lo predicho por el modelo estadístico obtenido por MSR. Finalmente, en el análisis proteómico se logró determinar dos puntos proteicos con pesos moleculares (26.05 y 27.70 kDa) y puntos isoeléctricos (6.18 y 9.20) que coinciden con los reportados en la literatura para xilanasas de *F. graminearum*. Se concluye que los hongos endófitos de *T. cacao* pueden ser una fuente importante de actividades xilanolíticas cuando se cultivan con salvado de trigo como única fuente de carbono. Además, las xilanasas con baja actividad celulolítica de la cepa Ec220 merecen ser caracterizadas a mayor profundidad, ya que resultan de gran interés investigativo para posibles aplicaciones en la industria.

## ABSTRACT

Today, there is an industrial trend to search for natural enzymes with high hydrolytic capacity that can improve the bioconversion of lignocellulosic biomass so it can be properly utilized and applied to different processes in the industry. Endophytic fungi have the ability to produce a variety of highly specific enzymes for plant cell wall degradation, such as xylanases and cellulases. The aim of this study was to determine the xylanolytic activity of endophytic fungi isolated from *Theobroma cacao* leaves. A bioprospecting study with 24 strains obtained from the bank of microorganisms of Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) was carried out. The first screening was qualitative, using the Petri plate assay with carboxymethylcellulose as substrate (incubation: 72-120 h at 28°C, staining: Congo Red). Next, the xylanase and cellulase activities were quantified by means of the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay, using a minimal salts medium with wheat bran as the only carbon source. The strain with the highest xylanolytic activity was selected and its xylanase production was optimized as a function of three factors: incubation time, pH and temperature, using the response surface methodology (MSR). A proteomic analysis was carried out in order to determine the complexity of the secretome of the selected strain, under optimal conditions. Five fungal strains showed consistent clear zones of hydrolysis in the plate assay, obtaining the best enzymatic activity indexes of the qualitative screening. In the DNS assay, the strain Ec220 (*Fusarium graminearum*) presented the highest and most significant xylanolytic activity of the study, and low cellulase activity. Ec220 was selected as the most potent strain to produce xylanases in this study. The optimal conditions for xylanase production were: 6.5 days of incubation, pH 5.79 and 29.8°C, and the highest observed xylanolytic activity (1.786 U/ml) was in good agreement with the predicted value of the statistical model obtained by MSR. Finally, in the proteomic analysis, two protein spots presented molecular weights (26.05 and 27.70 kDa) and isoelectric points (6.18 and 9.20) similar to those reported in the literature for *F. graminearum* xylanases. To conclude, endophytic fungi isolated from *T. cacao* can be an important source of xylanolytic activities when cultured on wheat bran as the only carbon source. In addition, xylanases low in cellulases found in strain Ec220 deserve to be further explored and characterized as they are of great research interest for possible applications in several industries.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
<b>AGRADECIMIENTO .....</b>	<b>II</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>III</b>
<b>TRIBUNAL DE GRADUACIÓN .....</b>	<b>IV</b>
<b>DECLARACIÓN EXPRESA.....</b>	<b>V</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE GENERAL .....</b>	<b>VIII</b>
<b>SIMBOLOGÍA .....</b>	<b>XI</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>1</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>2</b>
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
1.1. <i>Antecedentes y Justificación .....</i>	<i>3</i>
1.2. <i>Objetivo General .....</i>	<i>5</i>
1.3. <i>Objetivos Específicos .....</i>	<i>5</i>
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>6</b>
<b>MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>6</b>
2.1. <i>Material lignocelulósico.....</i>	<i>6</i>
2.1.1. <i>Hemicelulosa.....</i>	<i>6</i>
2.1.1.1 <i>Xilano .....</i>	<i>6</i>
2.2. <i>Enzimas xilanasas.....</i>	<i>7</i>
2.2.1. <i>Fuentes de obtención.....</i>	<i>7</i>

2.2.2. Aplicación industrial.....	7
2.3. Hongos endófitos.....	8
2.3.1. Hongos endófitos aislados de <i>Theobroma cacao</i> .....	8
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>10</b>
<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>10</b>
3.1. Cepas fúngicas .....	11
3.2. Selección cualitativa.....	11
3.2.1. Detección de Actividades Enzimáticas .....	11
3.3. Selección Cuantitativa.....	12
3.3.1. Producción de Enzimas.....	12
3.3.2. Determinación de Actividades Xilanólíticas y Celulolíticas .....	12
3.4. Optimización de Factores para la Producción de Xilanasas .....	13
3.4.1. Diseño Experimental .....	13
3.4.2. Modelo Estadístico.....	14
3.5. Análisis Proteómico del Secretoma de la Cepa Fúngica Seleccionada .....	15
3.5.1. Concentración de la Muestra por el Método de Liofilizado .....	15
3.5.2. Precipitación de Proteínas por el Método TCA/Acetona + Fenol.....	15
3.5.3. Cuantificación de Proteínas por el Método de Bradford .....	15
3.5.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).....	15
3.5.5. Electroforesis en gel bidimensional (2-D PAGE).....	16
3.6. Análisis Estadístico.....	16
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>17</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>17</b>
4.1. Detección de Actividades Enzimáticas para la Selección Cualitativa de las Cepas Fúngicas .....	17
4.2. Determinación de Actividades Enzimáticas para la Selección Cuantitativa de las Cepas Fúngicas .....	19
4.3. Optimización de Factores para la Producción de Xilanasas por la Cepa Fúngica Seleccionada.....	21
4.4. Análisis Proteómico del Secretoma de la Cepa Fúngica Seleccionada .....	24
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>28</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>29</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>38</b>

**ABREVIATURAS**

2-D PAGE	Electroforesis en Gel Bidimensional (por sus siglas en inglés)
ANOVA	Análisis de Varianza
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
CMC	Caboximetilcelulosa
DCC	Diseño Central Compuesto
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico (por sus siglas en inglés)
DTT	Ditiotreitol
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
GH	Glicosil Hidrolasa
IAE	Índice de Actividad Enzimática
IEF	Isoelectroenfoque
LOF	Carencia de Ajuste (por sus siglas en inglés)
MHS	Medio con Harina de Soya
MMS	Medio Mínimo Salino
MSR	Metodología de Superficie de Respuesta
PCWDE	Enzimas Degradadoras de Pared Celular Vegetal (por sus siglas en inglés)
PDA	Agar Papa Dextrosa
PM	Peso Molecular
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico (por sus siglas en inglés)
TCA	Ácido Tricloroacético

**SIMBOLOGÍA**

°C	grado centígrado
cm <sup>2</sup>	centímetro cuadrado
g	gramo
h	hora
kDa	kilodalton
kg	kilogramo
L	litro
M	molar
min	minutos
ml	mililitro
mg	miligramo
nm	nanómetros
pH	potencial de hidrógeno
pI	punto isoeléctrico
p/p	peso sobre peso
p/v	peso sobre volumen
rpm	revoluciones por minuto
U/ml	unidades enzimáticas sobre mililitros
µg	microgramo
µl	microlitro

$\mu\text{mol}$	micromol
%	porcentaje

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Esquema general del estudio de bioprospección.....	10
Figura 2. Detección de actividades enzimáticas de acuerdo a la presencia de halos de hidrólisis en placas con medio 1.0 % CMC, después de teñirlas con 0.5% Rojo Congo. (A) Ec023 ( <i>Fusarium equiseti</i> ) y (B) Ec220 ( <i>Fusarium graminearum</i> ). .....	18
Figura 3. Índice de actividad enzimática (IAE) de las cepas capaces de crecer y degradar el medio 1.0% CMC en placa. La línea roja en el 50% IAE representa el punto de corte para la selección cualitativa de las cepas fúngicas con mayor actividad enzimática. ....	18
Figura 4. Gráfico 3D de superficie de respuesta y contornos que muestra la actividad xilanolítica de la cepa Ec220 en función de los factores temperatura (°C) y tiempo de incubación (días). .....	22
Figura 5. Gráfico 3D de superficie de respuesta y contornos que muestra la actividad xilanolítica de la cepa Ec220 en función de los factores pH y tiempo de incubación (días). .....	23
Figura 6. SDS-PAGE del secretoma de la cepa Ec220 <i>F. graminearum</i> bajo condiciones óptimas de cultivo con salvado de trigo como sustrato. (M) Marcador de peso molecular de proteínas (RunBlue Prestained) (1) Extracto crudo concentrado; las bandas señaladas con una flecha corresponden a PM (36.7, 30.3, 27.0 y 26.1 kDa, respectivamente) similares a los reportados previamente para xilanasas de <i>F. graminearum</i> . .....	25
Figura 7. Electroforesis en gel bidimensional del secretoma de la cepa Ec220 <i>F. graminearum</i> bajo condiciones óptimas de cultivo con salvado de trigo como sustrato. En el gel se muestran dos puntos proteicos (P1 y P2) sugerentes de dos xilanasas (Xyl A y Xyl B) previamente reportadas para <i>F. graminearum</i> . El marcador de peso molecular de proteínas estuvo en el rango de 262-10 kDa (Spectra Multicolor Broad Range). .....	27

**ÍNDICE DE TABLAS****Pág.**

Tabla 1. Niveles y rango de valores de las variables independientes para los dos diseños compuestos centrales (DCC) usados para la optimización de la producción de xilanasas. .....	14
Tabla 2. Valores de actividad enzimática determinados en el ensayo DNS para las cepas fúngicas seleccionadas .....	20

## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

#### 1.1. Antecedentes y Justificación

Actualmente, existe una necesidad a nivel industrial de encontrar enzimas de origen natural con alta capacidad hidrolítica, que permitan degradar con mayor eficiencia la biomasa lignocelulósica. Este recurso es cada vez más relevante industrialmente debido a que es una importante fuente de energía renovable, posee una amplia disponibilidad y puede ser obtenido a muy bajos costos en forma de residuos agroindustriales (Fatma et al., 2018; Porras y González, 2016; Ruiz-Colorado, 2014). Sin embargo, la mayor limitación para utilizar el material lignocelulósico como fuente de materias primas en procesos industriales es su naturaleza recalcitrante y alta resistencia a la degradación, que se debe a la complejidad polimérica y fuertes uniones covalentes y no covalentes que forman sus tres componentes principales: celulosa, hemicelulosa y lignina (Prasad et al., 2019; Zoghلامي y Paës, 2019). Para solventar esto, varios autores han destacado el uso de enzimas degradadoras de la pared celular vegetal (PCWDE), tales como celulasas y hemicelulasas, para la bioconversión eficiente de la lignocelulosa en compuestos de menor peso molecular que pueden ser utilizados en la industria (Giovannoni et al., 2020; Srivastava et al., 2020).

Las xilanasas, principal tipo de hemicelulasas, han sido objeto de importante investigación científica por su potencial biotecnológico para una amplia gama de aplicaciones industriales. Entre los procesos donde más se ha destacado el uso de estas enzimas se encuentran: la producción de biocombustibles, el blanqueo de pulpa, la elaboración del pan y la bioconversión de residuos agroindustriales (Alokika y Singh, 2019). Las enzimas xilanolíticas, especialmente xilanasas libre de celulasas, han demostrado ser eficaces para remover selectivamente la hemicelulosa y otros polisacáridos no celulósicos que recubren las fibras de celulosa de la biomasa (Martínez-Pacheco et al., 2020; Subramaniyan y Prema, 2000). Esto es de gran utilidad en diferentes procesos como en la producción de bioetanol, ya que permite que la celulosa quede expuesta al ataque enzimático y así lograr un mejor aprovechamiento y conversión del material lignocelulósico para la obtención de compuestos más simples como el etanol (Bibra et al., 2018).

Por otro lado, en la industria papelera, estas enzimas permiten obtener un papel de calidad superior debido a que no causan daños o alteraciones a los componentes de celulosa del papel. Además, ayudan a disminuir en gran proporción el uso de químicos clorados, reduciendo así los elevados costos de producción y contaminación ambiental generados por los tratamientos químicos convencionales de esta industria (Mhiri et al., 2020; Desai y Iyer, 2016). Por esto, las xilanasas son cada año utilizadas con mayor frecuencia en la industria como una alternativa a los métodos tradicionales de conversión de la biomasa. Sin embargo, aún es necesario prospectar nuevas fuentes naturales para encontrar organismos capaces de producir cantidades abundantes de xilanasas con alto poder hidrolítico, especificidad y bajos costos de producción (Bhardwaj et al., 2019; Klein-Marcuschamer et al., 2012).

Los microorganismos, especialmente los hongos filamentosos, son los principales productores de xilanasas a nivel comercial por su fácil cultivo y elevada producción de enzimas extracelulares (Patel y Savanth, 2015; Chakdar et al., 2016). Los hongos endófitos se encuentran entre los microorganismos con mayor potencial para producir enzimas con alta actividad xilanolítica. Esto debido a que viven en simbiosis con organismos vegetales, por lo que son capaces de secretar una amplia variedad de PCWDE para poder colonizar las hojas y estructuras más complejas como la corteza y raíz de las plantas (Corrêa et al., 2014).

Poco se conoce del potencial xilanolítico de los hongos endófitos de *Theobroma cacao*, aunque un estudio previo con aislados de la cascarilla del cacao encontró que los géneros *Fusarium* y *Aspergillus* presentaron la mayor actividad enzimática (Afolabi et al., 2019). *F. graminearum* (*Gibberella zeae*) es comúnmente conocido como un patógeno muy agresivo de la planta del trigo que causa pérdidas millonarias anualmente, pero en *T. cacao* actúa como un endófito que no causa daños aparentes a la planta (Ortega et al, 2013; Rubini et al., 2005). Debeire et al. (2014) destacaron la capacidad de *F. graminearum* para secretar una gran variedad de PCWDEs, incluyendo varias xilanasas, al utilizar diferentes materiales lignocelulósicos como sustrato. Por lo anterior expuesto, el objetivo de este estudio consistió en determinar la actividad xilanolítica de hongos endófitos aislados de *T. cacao*, presentes en el banco de microorganismos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), mediante el cultivo en presencia de salvado de trigo como única fuente de carbono.

## **1.2. Objetivo General**

Determinar la actividad xilanolítica de hongos endófitos aislados de *Theobroma cacao* presentes en el banco de microorganismos del CIBE.

## **1.3. Objetivos Específicos**

Evaluar la presencia de actividad hemicelulolítica, con énfasis en la actividad xilanolítica, en las cepas de hongos endófitos.

Optimizar la producción de la actividad xilanolítica seleccionada, mediante la metodología de superficie de respuesta.

Determinar la complejidad del secretoma de la cepa seleccionada mediante herramientas de proteómica.

## CAPÍTULO 2

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Material lignocelulósico

La biomasa lignocelulósica es el principal componente de la pared celular vegetal, la cual se encuentra compuesta por celulosa (40-50%), hemicelulosa (25-30%) y lignina (15-20%) (Bhardwaj et al., 2019). Estos pueden degradarse en azúcares simples y compuestos aromáticos mediante la acción enzimática o química (Liu y Qu, 2021). Esta biomasa es la principal fuente de energía renovable y el recurso más abundante y disponible de la Tierra, por lo que puede ser utilizado en diversas aplicaciones industriales (Fatma et al., 2018). Además, este recurso se puede encontrar en forma de biomasa virgen como, por ejemplo, las plantas naturales, pastos y árboles; y también en forma de biomasa residual como los subproductos obtenidos de procesos agroindustriales, por ejemplo, el salvado de trigo, el bagazo de la caña de azúcar, el raquis de maíz y entre otros (Torres-Jaramillo et al., 2017; Ruiz-Colorado et al., 2014).

##### 2.1.1. Hemicelulosa

La hemicelulosa es un polímero heterogéneo, que se encuentra en la pared celular vegetal, cuya estructura química se compone de cadenas ramificadas de diversos monosacáridos, tales como: L-arabinosa, D-manosa, D-galactosa, D-glucosa y D-xilosa (Benaimeche et al., 2019).

##### 2.1.1.1 Xilano

El xilano, conformado por una cadena principal de D-xilosa unida por enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos y trazas de L-arabinosa, es la estructura hemicelulolítica más predominante en la naturaleza. Además, es el segundo polisacárido más abundante después de la celulosa y constituye casi un tercio de la biomasa lignocelulósica disponible en el planeta (Musa y Bwatanglang, 2020). Se encuentra presente en un 15-30% de maderas duras como O-acetil-4-O-metilglucuronoxilano, en un 10% de maderas blandas como arabino-4-O-metilglucuronoxilano, y en pastos y plantas anuales en forma de arabinoxilanos (Walia et al., 2017; Soni, 2013). El xilano es químicamente complejo por lo que requiere de enzimas específicas para su hidrólisis y, debido a su amplia disponibilidad y utilidad industrial, existe un gran interés por

encontrar enzimas del tipo xilanasas que permitan una eficiente hidrólisis de este polisacárido para su máximo aprovechamiento (Walia et al., 2017).

## **2.2. Enzimas xilanasas**

Las endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas, conocidas como xilanasas, son enzimas glicosidasas que rompen los enlaces glicosídicos de la cadena 1,4- $\beta$ -xilana, ayudando a la hidrólisis del xilano para su degradación a xilooligosacáridos como la xilosa, xilobiosa, xilotriosa y entre otras (Wang et al., 2021).

### **2.2.1. Fuentes de obtención**

Las xilanasas pueden ser obtenidas a partir de diferentes organismos vivos en la naturaleza. Sin embargo, los microorganismos, especialmente hongos y bacterias, son los principales productores de estas enzimas a escala industrial (Atel y Savanth, 2015; Chakdar et al., 2016). Hoy en día, se ha reportado una gran variedad de xilanasas de uso comercial, con diferentes actividades y especificidades, aisladas en su mayoría a partir de hongos filamentosos y bacterias del género *Bacillus* (Bhardwaj et al., 2019; Chakdar et al., 2016; Soliman et al., 2012). La necesidad industrial actualmente es encontrar y seleccionar microorganismos capaces de producir grandes cantidades de xilanasas con alta especificidad y a un bajo costo. La elección de la fuente de carbono o sustrato es un factor muy importante para la producción de xilanasas y su proceso de fermentación a nivel industrial (Klein-Marcuschamer et al, 2012).

### **2.2.2. Aplicación industrial**

Las xilanasas han sido objeto de importante investigación científica debido a su gran potencial biotecnológico en una amplia variedad de procesos industriales tales como el blanqueo de pulpa, la elaboración del pan, la clarificación de jugos y cervezas, la producción de biocombustibles, la bioconversión de residuos agroindustriales, la recuperación de fibras textiles, como componente de pienso animal, entre muchos otros más (Alokika y Singh, 2019; Mhiri et al., 2020). La aplicación de estas enzimas como producto biotecnológico a escala industrial ha demostrado ser mucho más efectivo, económico y ecológico que los métodos empleados habitualmente en la industria (Alokika y Singh, 2019; Bhardwaj et al., 2019). En el pretratamiento y blanqueo de la pulpa de papel, el uso de xilanasas ha ayudado a disminuir la cantidad de químicos clorados comúnmente utilizados, los cuales no solo causan daños irreparables en el medio

ambiente, sino que representan un alto costo en la industria papelera (Desai y Iyer, 2016; Sridevi et al., 2017; Woldesenbet et al., 2012). Otra de las principales aplicaciones de las xilanasas actualmente es en la industria alimentaria, sobre todo en el sector panadero. La adición de xilanasas durante la preparación del pan ha resultado ser efectiva para incrementar la calidad y el valor nutricional del producto final (Bala y Singh, 2017; Passarinho et al., 2019; Wu et al., 2018). Asimismo, en la industria de biocombustibles, las xilanasas en combinación con enzimas celulolíticas han probado ser muy eficientes en la hidrólisis y bioconversión de la biomasa lignocelulósica para la producción de energía renovable y amigable con el medioambiente como, por ejemplo, el bioetanol (Ramanjaneyulu et al., 2017; Uday et al., 2017).

### **2.3. Hongos endófitos**

Los hongos endófitos son microorganismos que habitan en los tejidos inter e intracelulares de las plantas, sin llegar a causar síntomas de enfermedad. El principal mecanismo que utilizan estos hongos para residir en los tejidos vegetales es la secreción de enzimas extracelulares, como las PCWDE, que les permiten penetrar la pared celular vegetal. Esto, al mismo tiempo, ayuda a las plantas a modificar y reforzar su mecanismo de defensa contra los patógenos para su supervivencia (Techaoei et al., 2020; González-Coloma, 2016). Además, estos microorganismos son considerados una fuente importante de diversos metabolitos y enzimas con alto potencial biotecnológico, por lo que muchos de ellos son utilizados como objeto de bioprospección de compuestos novedosos y con posible aplicación industrial (Ferreira et al., 2015; Ginting et al., 2013; González-Coloma, 2016).

#### **2.3.1. Hongos endófitos aislados de *Theobroma cacao***

El cacao, *Theobroma cacao* (Malvaceae), es un árbol originario de las zonas tropicales de América del Sur y Central. La pared celular del grano de cacao está compuesta en un 10-12% por dos importantes polisacáridos hemicelulósicos llamados xiloglucano y galactoglucomanano. Estas hemicelulosas a su vez forman fuertes enlaces de hidrógeno con las fibras de celulosa (28%) presentes en la pared celular del cacao (Redgwell et al., 2000)

Los hongos endófitos de *T. cacao* han sido principalmente estudiados como agentes de control biológico contra patógenos del cacao, pero se conoce muy poco sobre su potencial

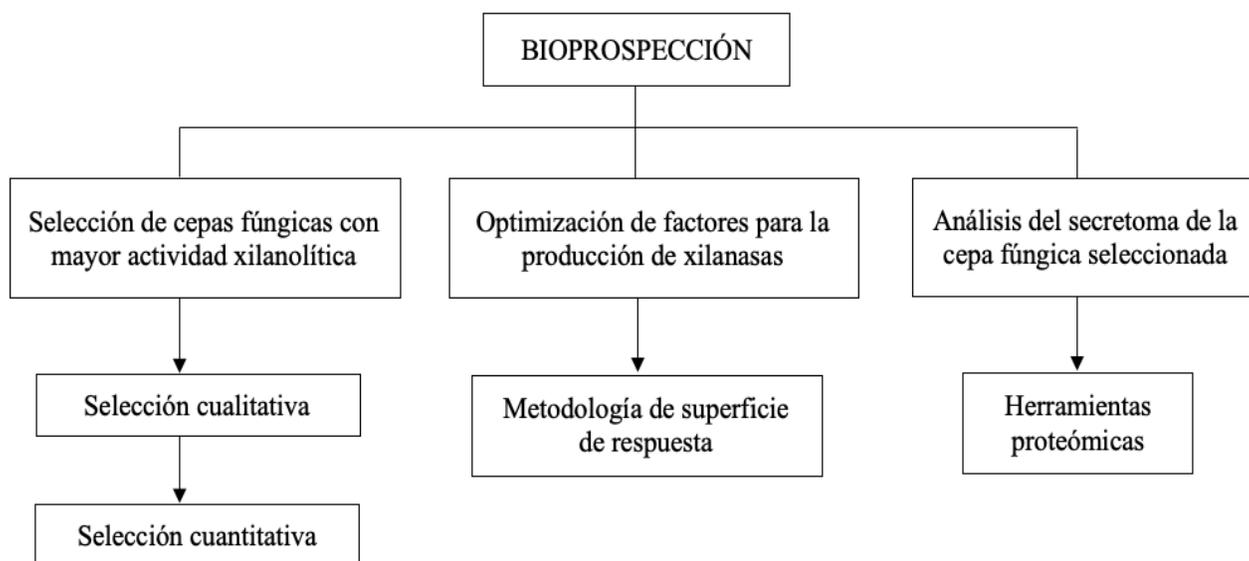
para secretar enzimas xilanolíticas u otras PCWDE. Varios autores han descrito una diversidad de hongos endófitos aislados de las hojas, ramas y tallo de *T. cacao*, entre los cuales se ha mencionado la presencia de *Pestalotiopsis sp.*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Xylaria sp.* y *Colletotrichum gloeosporoides*, pero principalmente aislados del género *Fusarium*, que han demostrado ser ubicuos y de alta prevalencia como endófitos de la planta de cacao (Hanada et al., 2010; Mejía et al., 2008; Rubini et al., 2005; Villavicencio-Vásquez et al., 2018).

*Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) es un hongo endófito del cacao, aunque es más conocido por ser un patógeno agresivo causante de la fusariosis de la espiga de trigo, una enfermedad devastadora que anualmente representa pérdidas millonarias en el sector agrícola (Dong et al., 2012). Debido a esto, las enzimas PCWDE de este hongo han sido previamente estudiadas, ya que son cruciales en el proceso infeccioso de un patógeno. Además, se ha reportado que la alta producción de xilanasas de *F. graminearum* durante el comienzo de la infección es lo que le permite tener una exitosa patogenicidad (Ortega et al., 2013). Además, varios autores han logrado purificar y caracterizar cuatro xilanasas de *F. graminearum*, dos de bajo peso molecular pertenecientes a la familia glicosil hidrolasa (GH)11, conocidas como Xyl A y Xyl B, y dos de mayor peso molecular categorizadas en la familia GH10, llamadas Xyl C y Xyl D (Pollet et al., 2009; Beliën et al., 2005).

### CAPÍTULO 3

## METODOLOGÍA

El presente proyecto de investigación fue de tipo exploratorio que consistió en una bioprospección microbiana dirigida a la identificación y determinación de actividades xilanolíticas, utilizando como material de estudio diferentes aislados fúngicos endófitos de la planta del cacao (*Theobroma cacao*). En la Fig. 1 se muestran las etapas del estudio de bioprospección como: la selección de las cepas fúngicas con mayor actividad xilanolítica, la optimización de factores que afectan la producción de xilanasas y el análisis proteómico del secretoma de la cepa seleccionada.



**Figura 1.** Esquema general del estudio de bioprospección

### **3.1. Cepas fúngicas**

La bioprospección se llevó a cabo con 24 cepas fúngicas, obtenidas de una colección de 146 hongos endófitos aislados de hojas de *Theobroma cacao*, la cual pertenece al banco de microorganismos del CIBE-ESPOL. Las cepas fueron previamente identificadas taxonómicamente (Villavicencio-Vásquez et al., 2018) y a cada una se le asignó un código CIBE (Anexo 1). Debido al tipo de investigación de este proyecto, no se calculó un tamaño de muestra para la bioprospección. Las cepas fueron escogidas de acuerdo a una revisión bibliográfica, utilizando como criterio de selección su capacidad hidrolítica para degradar material lignocelulósico y producir enzimas de interés (Ruiz-Colorado et al., 2014; Burlacu et al., 2016; Villavicencio-Vásquez et al., 2018). Para el estudio, los aislados fúngicos fueron reactivados en Agar Papa Dextrosa (PDA, Becton Dickinson, Sparks, MD, EE. UU.) a 28°C por siete días. Posteriormente, se almacenaron a 4°C en cajas Petri con medio sólido preparado con harina de soya (MHS; Olpiegala SA, Guayaquil, Ecuador), sustrato que induce a la actividad hidrolítica para la descomposición de la pared celular vegetal (Orlandelli et al., 2015).

### **3.2. Selección cualitativa**

#### ***3.2.1. Detección de Actividades Enzimáticas***

La presencia de actividades enzimáticas de interés, celulolítica y hemicelulolítica, fue evaluada mediante el ensayo en placa Petri, donde fragmentos de agar de 5 mm de diámetro de cultivos de MHS frescos fueron inoculados en placas con medio carboximetilcelulosa [CMC; 1% (p/v) agar (Bacto™ Agar, Becton Dickinson, Sparks, MD, EE. UU.) y 1% (p/v) carboximetilcelulosa sódica (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.)], e incubados a 28°C. El ensayo se realizó por triplicado. Las placas de CMC fueron reveladas a las 72 ó 120 h, de acuerdo al crecimiento de las cepas en el medio. Para el revelado, se tiñó cubriendo totalmente las placas con 0.5% (p/v) Rojo Congo (Fluka-Chemie AG, St. Gallen, Switzerland) durante 15 min, y luego se destiñó con 5% (p/v) solución cloruro de sodio (NaCl; Promega, Madison, WI, EE. UU.). La actividad enzimática se detectó de acuerdo a la presencia de un halo amarillo alrededor del micelio frente a un fondo rojo. Para el análisis cualitativo, se calculó un índice de actividad enzimática (IAE) para cada una de las cepas analizadas, que consistió en la relación entre dos variables independientes: el radio del halo (amarillo) de degradación enzimática y el radio del crecimiento del micelio. La relación obtenida fue luego transformada en porcentaje, tomando como referencia el aislado que obtuvo el índice de actividad más alto como el 100% y el control

negativo (placa de CMC sin inoculación) como el 0% (Félix et al., 2018). Las cinco cepas fúngicas que obtuvieron los mayores índices de actividad enzimática fueron seleccionadas para la producción enzimática.

### **3.3. Selección Cuantitativa**

#### ***3.3.1. Producción de Enzimas***

La producción de enzimas de interés se llevó a cabo con las cinco cepas que presentaron la mayor actividad enzimática en el análisis cualitativo mediante fermentación sumergida. Se utilizó un medio mínimo salino (MMS) (Crawford, 1978) suplementado con 0.6% (p/v) extracto de levadura y 1% (p/v) salvado de trigo (Schullo SA, Quito, Ecuador) como única fuente de carbono (Ferreira et al., 1999). Adicionalmente, se agregó 1 ml de solución oligoelementos 10x [en (p/v): 0.64%  $\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.11%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.79%  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  and 0.15%  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ] por 1L de MMS.

El salvado de trigo fue acondicionado según la técnica de Borneman et al. (1990). Brevemente, la materia prima fue lavada con agua caliente hasta la remoción total del almidón, y luego se secó en una estufa a 60°C. Una vez seco, el salvado de trigo se tamizó, utilizando una malla de alambre de acero calibrado (Newark Wire Cloth, Clifton, NJ, EE. UU.), donde únicamente se escogieron partículas mayores al tamaño 35 mesh. El pH del medio MMS se ajustó a 6.0, usando alícuotas de 37% (p/p) HCl (Mallinckrodt, Staines-upon-Thames, Reino Unido), y se autoclavó por 30 min a 121°C y 1 kg/cm<sup>2</sup>.

Finalmente, se añadió 100 ml de MMS en matraces Erlenmeyer de 500 ml de capacidad, que fueron luego inoculados con cinco fragmentos de agar de 5 mm de diámetro tomados de cultivos frescos en medio MMS, y se incubó a 30°C y 120 rpm en un agitador rotatorio (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, EE. UU.). Un matraz con 100 ml de MMS y sin inoculación fúngica fue considerado como control negativo. Las muestras de cultivo se obtuvieron diariamente y luego se centrifugaron durante 10 min a 15,000 rpm. Los sobrenadantes resultantes se recogieron y usaron como extractos enzimáticos crudos para la determinación de las actividades enzimáticas.

#### ***3.3.2. Determinación de Actividades Xilanolíticas y Celulolíticas***

Las actividades xilanolíticas y celulolíticas se midieron de acuerdo a la cantidad de azúcares reductores liberados en el medio, mediante la técnica colorimétrica del ácido

3,5-dinitrosalicílico (DNS) modificada por Bailey et al. (1992). Brevemente, se preparó una solución sustrato al 1.0% (p/v) disuelta en buffer acetato de sodio 0.2 M (pH 5.0), utilizando como sustratos xilano de madera de haya (Biosynth, Berkshir, Reino Unido) para la actividad xilanolítica y CMC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) para la actividad celulolítica.

Se añadieron 50  $\mu$ l de extracto enzimático a 450  $\mu$ l de solución sustrato y luego la mezcla se incubó a 50°C durante 30 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 750  $\mu$ l de reactivo DNS, a 100°C, durante 10 min (Miller, 1959). A continuación, los tubos se enfriaron en agua fría durante 10 min y se midió la absorbancia a 540 nm, usando un espectrofotómetro lector de microplacas (Biotek, Synergy HT, Winooski, VE, EE. UU.). Las absorbancias obtenidas para cada muestra fueron corregidas de acuerdo a las muestras blanco utilizadas. El blanco consistió en un tubo que atravesó las mismas condiciones del proceso, pero la muestra del extracto enzimático respectivo fue añadida a la mezcla luego de que la reacción fue detenida por la adición del reactivo DNS.

Como curvas estándar, se prepararon varias concentraciones de xilosa y glucosa para la actividad xilanolítica y celulolítica, respectivamente. Para evitar el sesgo por instrumento, las absorbancias de las muestras experimentales y de las curvas estándar se midieron con la misma microplaca. Una unidad de enzima (U) se definió como la cantidad de enzima requerida para liberar 1  $\mu$ mol de azúcar reductor (xilosa o glucosa) por minuto. Los datos se presentan como el promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. Se seleccionó la cepa que tuvo la actividad xilanolítica más alta y estadísticamente significativa entre los aislados fúngicos analizados.

### **3.4. Optimización de Factores para la Producción de Xilanasas**

#### ***3.4.1. Diseño Experimental***

La actividad xilanolítica de la cepa fúngica seleccionada fue considerada como la variable de respuesta a optimizar, para lo cual se determinó el valor óptimo de tres variables independientes o factores cruciales en la producción de xilanasas: temperatura, pH y tiempo de incubación del cultivo (Biswas et al., 2019; Sadaf y Khare, 2014).

Se llevaron a cabo dos diseños compuestos centrales (DCC). Para el primero se utilizaron los factores temperatura y tiempo de incubación a dos niveles diferentes, con cuatro puntos factoriales, dos puntos centrales y dos puntos axiales. El segundo DCC tuvo como factores

pH y tiempo de incubación a cuatro niveles diferentes, con 16 puntos factoriales, dos puntos centrales y seis puntos axiales, dando un total de 24 tratamientos experimentales (Anexo 3). La codificación y los valores asignados a cada nivel se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Niveles y rango de valores de las variables independientes para los dos diseños compuestos centrales (DCC) usados para la optimización de la producción de xilanasas.

Variables		Nivel				
Código	Factor	Más bajo (-2)	Bajo (-1)	Punto central (0)	Alto (+1)	Más alto (+2)
<i>Primer DCC</i>						
X <sub>1</sub>	Temperatura (°C)	-	25	30	35	-
X <sub>2</sub>	Tiempo de incubación (días)	-	6	7	8	-
<i>Segundo DCC</i>						
X <sub>2</sub>	Tiempo de incubación (días)	4	5	6	7	8
X <sub>3</sub>	pH	4.0	5.0	5.5	6.0	7.0

### 3.4.2. Modelo Estadístico

Los resultados obtenidos en el diseño experimental fueron analizados mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR), donde los datos fueron ajustados a un modelo estadístico que consistió en la ecuación polinómica de segundo orden que se presenta a continuación:

$$Y = \beta_0 + \sum_i \beta_i X_i + \sum_{ij} \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{ii} \beta_{ii} X_i^2 \quad (1)$$

En esta ecuación polinómica,  $Y$  corresponde a la variable de respuesta,  $X_i$  y  $X_j$  son las variables independientes,  $\beta_0$  es el término constante,  $\beta_i$  es el coeficiente lineal que afecta el factor  $X_i$ ,  $\beta_{ij}$  es el coeficiente de interacción entre los factores  $X_i$  y  $X_j$ , y  $\beta_{ii}$  es el coeficiente cuadrático que explica la curvatura del factor  $X_i^2$ .

### **3.5. Análisis Proteómico del Secretoma de la Cepa Fúngica Seleccionada**

#### ***3.5.1. Concentración de la Muestra por el Método de Liofilizado***

El extracto enzimático crudo obtenido bajo parámetros óptimos fue concentrado usando un equipo liofilizador (Freeze Dryer 4.5, Labconco™, Kansas City, MO, EE. UU.) en condiciones de - 40°C por 72 h.

#### ***3.5.2. Precipitación de Proteínas por el Método TCA/Acetona + Fenol***

Se utilizó el protocolo descrito por Wang et al. (2006), con ligeras modificaciones. Las proteínas de la muestra liofilizada (0.1 g) fueron precipitadas usando 1 ml de solución 10% (p/v) ácido tricloroacético (TCA)/acetona, conservando el pellet después de centrifugar a 4°C a 12000 rpm por 10 min. Se lavó varias veces con 1ml de 80% (p/v) acetona y se dejó secar el pellet toda la noche. El pellet fue resuspendido usando 500 µl de buffer dodecilsulfato sódico (SDS) y 75µl de 2-mercaptoetanol, homogenizando con vórtex. Luego se adicionó 500 µl de fenol (pH 9.0; Sigma) y se incubó en frío por 5 min. Se realizó un nuevo ciclo de centrifugación, y se transfirió la parte fenólica a un nuevo tubo con 1 ml de buffer de precipitación (0.1 M acetato de amonio en metanol al 100%). Se dejó reposar por 15 min a -80°C para la precipitación. Se centrifugó y luego se resuspendió el pellet con 500 µl de metanol al 100%. Se hizo un último lavado con 500% de acetona al 80% y se dejó secar toda la noche. El precipitado fue resuspendido en 20 µl de buffer de rehidratación [7M urea, 2M tiourea, 4% (p/v) CHAPS, 2% (p/v) Triton X-100 y 100mM DTT (ditiotreitól)].

#### ***3.5.3. Cuantificación de Proteínas por el Método de Bradford***

La concentración de proteínas en la muestra fue cuantificada por el método de Bradford (1976), usando una curva estándar entre 0 y 1 mg de albúmina de suero bovino como estándar. Brevemente, en un pocillo de una microplaca de 96 pocillos se añadió 200 µl del reactivo de Bradford 1X (Protein Assay Dye Reagent, Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.), seguido de 10 µl de muestra. Se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro con lector de microplacas.

#### ***3.5.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)***

La SDS-PAGE se llevó a cabo de acuerdo a la metodología establecida por Laemmli (1970). Para la preparación de la muestra, esta fue diluida en proporción 2:1 (v/v) en buffer de muestra [1.28 M Tris base 4X, pH 6.8, 10% (p/v) SDS, 8.21% (p/v) 2-mercaptoetanol,

26% (v/v) glicerol y 0.02% (p/v) azul de bromofenol]. Se calentó en agua a 100°C por 10 min. La electroforesis se realizó en un gel desnaturalizante de 12% (p/v) poliacrilamida, utilizando el equipo Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) a 120 V por 140 min. Luego de la electroforesis, para observar la separación de las proteínas, el gel fue sumergido totalmente en reactivo azul de Coomassie [50% (p/v) metanol, 10% (p/v) ácido acético, 40% (p/v) agua destilada y 0.05% Coomassie blue G250] por 25 min a una agitación de 30 rpm a temperatura ambiente. Se retiró el exceso de azul de Coomassie y se destiñó agregando una solución de 7% (v/v) ácido acético. Se dejó reposar hasta evidenciar bandas en el gel. Las imágenes fueron analizadas en el programa Image Lab v 6.0.1 (Bio-Rad).

### ***3.5.5. Electroforesis en gel bidimensional (2-D PAGE)***

Una cantidad de 169 µg de muestra precipitada disuelta en 81 µl de buffer de rehidratación ReadyPrep-BioRad [10 ml de 8 M urea, 2% (p/v) CHAPS, 50 mM DTT, 0.2% (p/v) Bio-Lyte® y 0,005% (p/v) bromofenol azul] fueron aplicados a una tira IPG de 7 cm de longitud y rango de pH 3-10 (ReadyStrip™ IPG Strips, BioRad). El isoelectroenfoque (IEF) de las tiras IPG se llevó a cabo en el sistema Protean i12 IEF Cell (Bio-Rad). Posteriormente, la tira fue equilibrada usando dos soluciones de equilibrio: Buffer I [20 ml de 6 M urea, 2% (p/v) SDS, 0.375 M tris HCl (pH 8.8), 20% (p/v) glicerol y 2% (p/v) DTT] y Buffer II (mismos componentes del Buffer I excepto DTT); ambas aplicadas a la tira por 30 min cada una. La tira fue lavada con 1.875 M Tris (pH 8.8) para quitar el exceso de solución de equilibrio. La segunda dimensión se realizó en un gel de poliacrilamida al 12%, colocando la tira de forma horizontal sobre el gel y siguiendo el protocolo SDS-PAGE a un amperaje constante de 35 mA por 2 h. Para la detección de los puntos proteicos y cuantificación de sus intensidades, se utilizó el programa PDQuest™ 2-D analysis software v 8.0.1 (Bio-Rad).

## **3.6. Análisis Estadístico**

El análisis de los datos se llevó a cabo en el programa R studio v 4.0.0 mediante el análisis de varianza (ANOVA) conjuntamente con una prueba de rango post-hoc. La prueba de Tukey para comparaciones múltiples se utilizó en el análisis de datos del ensayo DNS y la prueba de distribución de Fisher (*F test*) en el modelo estadístico MSR. Adicionalmente, la distribución normal de los datos se verificó usando el test Shappiro-Wilks.

## CAPÍTULO 4

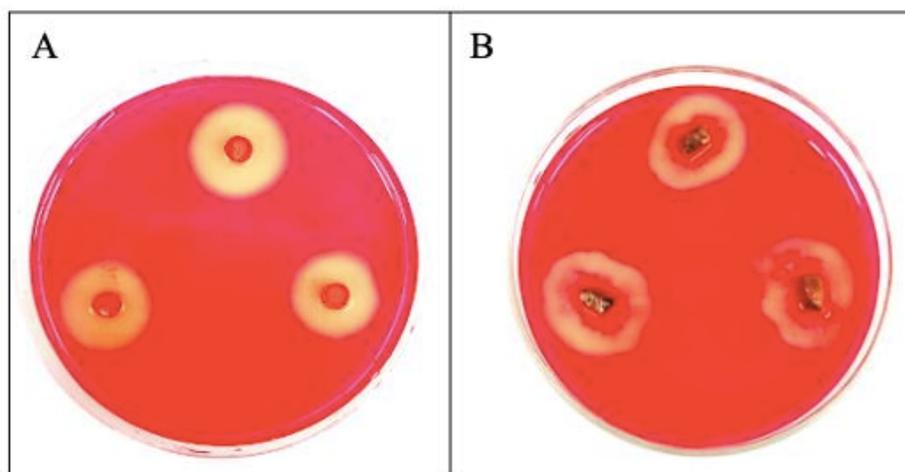
### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 4.1. Detección de Actividades Enzimáticas para la Selección Cualitativa de las Cepas Fúngicas

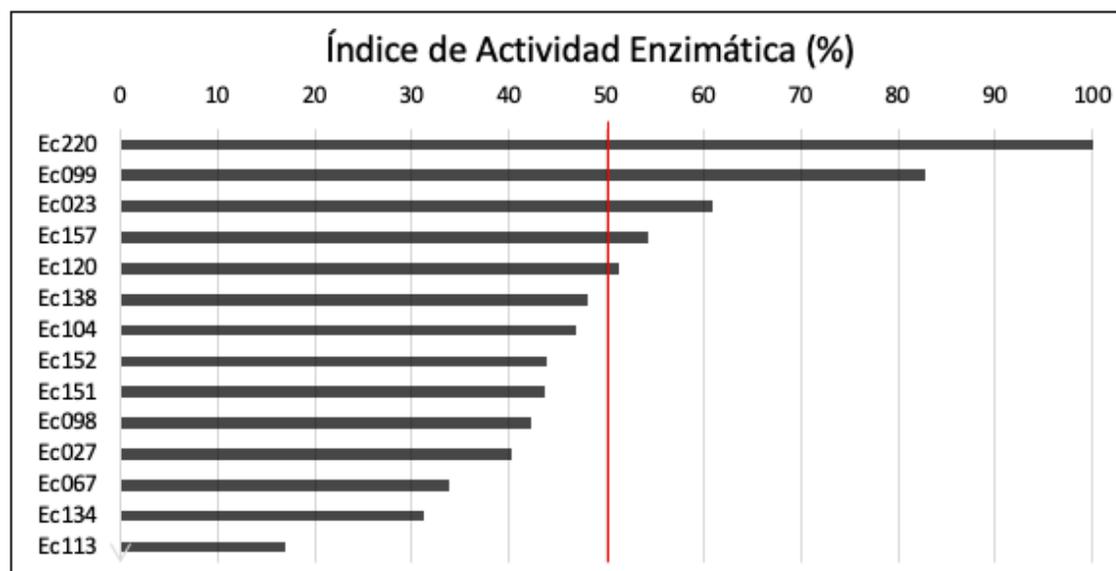
Se inició la bioprospección con 24 cepas fúngicas, la mayoría pertenecientes a los géneros *Fusarium* (8) y *Lasiodiplodia* (7) (Anexo 1). La presencia de actividades enzimáticas de interés se detectó mediante el ensayo en placa Petri de acuerdo a la presencia de un halo de hidrólisis amarillo alrededor del crecimiento del hongo, en contraste con un fondo rojo (Fig. 2). Veinte cepas fúngicas crecieron en el medio, pero solo 14 secretaron enzimas capaces de hidrolizar la CMC, sustrato utilizado para detectar enzimas extracelulares que degradan la pared celular vegetal (Khoirunnisa et al., 2020; Xue et al., 2018).

Para cada una de las cepas se calculó un índice de actividad enzimática (IAE). La cepa Ec220 (*Fusarium graminearum*) obtuvo el mayor IAE (1.42), por lo cual este valor fue considerado como el 100% en el análisis comparativo. Se seleccionaron los cinco aislados con el IAE porcentual mayor al 50%, utilizado como el punto de corte para la selección cualitativa (Fig. 3). Las cinco mejores cepas fúngicas (con su IAE %) fueron: Ec220 (100%), Ec099 (*Xylaria sp.*; 82.7%), Ec023 (*Fusarium equiseti*; 61%), Ec157 (*Lasiodiplodia theobromae*; 54.2%) y Ec120 (*Lasiodiplodia theobromae*; 51.3%).

Un estudio con aislados fúngicos de residuos de cacao también encontró una alta actividad hidrolítica en cepas del género *Fusarium* en el ensayo en placas de CMC (Afolabi et al., 2019). Se ha reportado que aislados de *F. graminearum* y *F. equiseti* fueron capaces de producir, en placa, una alta cantidad de enzimas extracelulares involucradas en la degradación de la pared celular vegetal, tales como xilanasas y celulasas (Bakri et al., 2014; Kwon et al., 2007). Asimismo, Félix et al. (2018) demostraron que cepas de *L. theobromae*, de diferentes orígenes, presentaron amplias zonas de hidrólisis y altos índices de actividad enzimática durante ensayos en placa. Sin embargo, para la cepa *Xylaria sp.* se han reportado valores de actividad opuestos a los encontrados en el presente estudio. Toghueo et al. (2017) encontraron una escasa actividad enzimática de esta cepa en placas de CMC en comparación con la presentada por otros hongos endófitos aislados de la planta medicinal *Terminalia mantaly*.



**Figura 2.** Detección de actividades enzimáticas de acuerdo a la presencia de halos de hidrólisis en placas con medio 1.0% CMC, después de teñirlas con 0.5% Rojo Congo. (A) Ec023 (*Fusarium equiseti*) y (B) Ec220 (*Fusarium graminearum*).



**Figura 3.** Índice de actividad enzimática (IAE) de las cepas capaces de crecer y degradar el medio 1.0% CMC en placa. La línea roja en el 50% IAE representa el punto de corte para la selección cualitativa de las cepas fúngicas con mayor actividad enzimática.

#### 4.2. Determinación de Actividades Enzimáticas para la Selección Cuantitativa de las Cepas Fúngicas

Las actividades enzimáticas se midieron por el método DNS, utilizando los extractos enzimáticos crudos tomados diariamente de los cultivos fúngicos. Se utilizaron condiciones de cultivo establecidas como estándar para el crecimiento fúngico (30°C y pH 6.0), según lo reportado en la literatura (Pietikäinen et al., 2005).

Cuatro de las cinco cepas fúngicas seleccionadas presentaron actividades xilanolíticas significativas en el rango de 0.878-1.779 U/ml, al utilizar salvado de trigo como sustrato. Sin embargo, la mayor actividad xilanolítica ( $1.779 \pm 0.042$  U/ml) se determinó para la cepa Ec220 en el sexto día de incubación, la cual fue estadísticamente ( $p < 0.001$ ) superior a la calculada para las otras cuatro cepas analizadas (Tabla 2). En comparación con otros estudios que determinaron actividades xilanolíticas en aislados de *F. graminearum*, la cepa utilizada en este proyecto presentó una actividad mucho más alta. Dong et al. (2012) reportó una actividad de 0.678 U/ml, después de siete días de incubación, usando un medio sintético modificado suplementado con salvado de trigo. Estudios con otros sustratos como xilano de abedul y xilano de avena de espelta también presentaron actividades xilanolíticas inferiores (0.380 U/ml y 0.320 U/ml, respectivamente) a la obtenida en este estudio (Paccanaro et al., 2017; Burlacu et al., 2016). Varios investigadores han destacado el uso del salvado de trigo como inductor de xilanasas, demostrando que este material lignocelulósico es mucho más eficiente que otros sustratos costosos y comúnmente utilizados como el xilano (Biswas et al. 2019; Dong et al., 2012; Debeire et al., 2014).

La actividad celulolítica también fue determinada para evaluar la selectividad del salvado de trigo para inducir actividades xilanolíticas en el medio MMS. La cepa Ec220 tuvo una actividad celulolítica de  $0.243 \pm 0.002$  U/ml en el séptimo día de incubación. Esta fue significativamente menor ( $p < 0.001$ ) a la presentada por las dos cepas de *L. theobromae* (Ec157 y Ec120), que obtuvieron las actividades celulolíticas más altas en el ensayo DNS (Tabla 2). Sin embargo, la producción de celulasas de las cepas de *L. theobromae* en el presente estudio fue considerablemente bajo en comparación con lo reportado por Esteves et al. (2014), quien utilizó CMC como sustrato.

**Tabla 2.** Valores de actividad enzimática determinados en el ensayo DNS para las cepas fúngicas seleccionadas

Cepa	Actividad Enzimática (U/ml) *		Día de colección del extracto crudo **	
	Xilanasa	Celulasa	Xil.	Cel.
<i>F. graminearum</i> Ec220	1.779 ± 0.042 <sup>a</sup>	0.243 ± 0.002 <sup>a</sup>	6	7
<i>L. theobromae</i> Ec157	1.392 ± 0.014 <sup>b</sup>	0.621 ± 0.001 <sup>b</sup>	7	7
<i>F. equiseti</i> Ec023	1.341 ± 0.024 <sup>b</sup>	0.176 ± 0.007 <sup>c</sup>	5	6
<i>L. theobromae</i> Ec120	0.878 ± 0.001 <sup>c</sup>	0.400 ± 0.004 <sup>d</sup>	7	5
<i>Xylaria sp.</i> Ec099	0.043 ± 0.001 <sup>d</sup>	0.171 ± 0.006 <sup>c</sup>	9	6

\* Las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) entre cepas, de acuerdo a los valores de actividad enzimática, fueron representadas por un superíndice literal (a, b, c y d) según el test de Tukey para comparaciones múltiples.

\*\*Día en el que se registró la mayor actividad enzimática (xilanolítica y celulolítica, respectivamente) para cada cepa fúngica bajo condiciones estándar: 30°C y pH 6.0.

Por otra parte, la amplia diferencia entre los valores de actividad xilanolítica y actividad celulolítica determinados para la cepa Ec220 coincide con lo reportado en un estudio previo con aislados de *F. graminearum*, donde también se encontró una actividad celulolítica (0.320-0.330 U/ml) menor a la xilanolítica (0.880-0.840 U/ml), con salvado de avena como sustrato, un material lignocelulósico con composición química similar a la del salvado de trigo (Kikot et al., 2010). Otro estudio, que utilizó diferentes subproductos agrícolas como sustrato, encontró que *F. graminearum* tuvo una actividad celulolítica muy alta (1.01 U/ml) al usar rastrojo de maíz como sustrato, mientras que el rendimiento más bajo reportado por ellos fue 0.31 U/ml con paja de arroz (Azzaz et al., 2020). Al comparar estos resultados, se puede observar que la actividad celulolítica de *F. graminearum* obtenida en el presente estudio (0.243 ± 0.002 U/ml) fue muy baja usando salvado de trigo como sustrato. Esto se debe en gran parte a la composición química de estos materiales residuales, ya que el salvado de trigo en su composición química tiene un porcentaje mayor de hemicelulosas (51.8%, principalmente xilanos) que de celulosa (18.5%), mientras que otros subproductos agrícolas como el rastrojo de maíz y la paja de arroz están compuestos

más por celulosa (35-40%) que hemicelulosa (18-22%) (Merali et al., 2015; Gou et al., 2018; Yang et al., 2016). En base a esto, se puede suponer que la utilización de salvado de trigo como sustrato en el medio MMS promueve selectivamente las actividades xilanolíticas de la cepa Ec220 *F. graminearum* con una baja producción de celulasas.

Desde el punto de vista biotecnológico, este resultado tiene un gran potencial de aplicación, ya que actualmente existe la necesidad en industrias como la papelera y de detergentes de encontrar xilanasas microbianas libres o bajas en celulasas que permitan obtener un producto final de mejor calidad. En las industrias de la pulpa y papel, se ha encontrado que las xilanasas libres de celulasas son mucho más efectivas para remover selectivamente la hemicelulosa sin alterar o dañar las fibras de celulosa durante el blanqueamiento de la pulpa, con lo cual se obtiene un papel más blanco y de calidad superior, con un mínimo uso de compuestos clorados (da Silva et al., 2015; Subramaniyan y Prema, 2000)

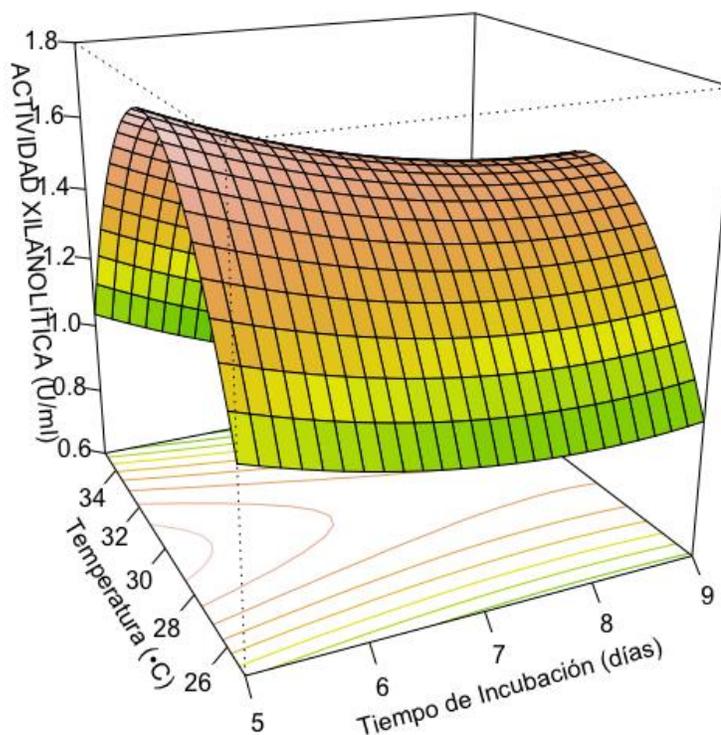
Finalmente, Ec220 fue seleccionada como la cepa con mayor potencial xilanolítico en la bioprospección, ya que su actividad xilanolítica fue la más alta, estadísticamente, entre las cepas analizadas, por lo cual se decidió optimizar su rendimiento.

#### **4.3. Optimización de Factores para la Producción de Xilanasas por la Cepa Fúngica Seleccionada**

Se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR) para la optimización de los factores: temperatura, tiempo de incubación y pH

En el primer DCC, con temperatura ( $X_1$ ) y tiempo de incubación ( $X_2$ ) como factores, el  $R^2$  ajustado fue de 0.875, lo que significa que la variable respuesta o actividad de xilanasas se explica en un 87.5 % por estos dos factores. Sin embargo, el ANOVA (*F test*) mostró que solo los términos lineales  $X_1$  y  $X_2$  de la ecuación (1), y no su interacción, fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.001$ ) en el modelo estadístico predicho por el MSR. Además, la falta de ajuste (LOF) fue significativamente mayor que el error puro ( $p < 0.001$ ), sugiriendo que no hubo un buen ajuste del modelo, lo que puede deberse a la falta de variación en los datos experimentales (Venkateswarulu et al., 2017). Como se muestra en la Fig. 4, la actividad de xilanasas alta se observó principalmente en la temperatura central (30°C), mientras que en los niveles -1 (25°C) y +1 (35°C) los rendimientos fueron mucho más bajos y tuvieron poca variación a lo largo del tiempo de incubación. No obstante, aunque el modelo predicho no se ajustó bien a los datos reales, la temperatura óptima (29.8°C) predicha por el MSR coincidió con la temperatura experimental (30°C)

donde se observó la mayor actividad de xilanas. Además, esta temperatura también ha sido reportada por otros autores como óptima para el crecimiento y la producción de enzimas de *F. graminearum* (Peter Mshelia et al., 2020; Burlacu et al., 2016; Ortega et al., 2013).



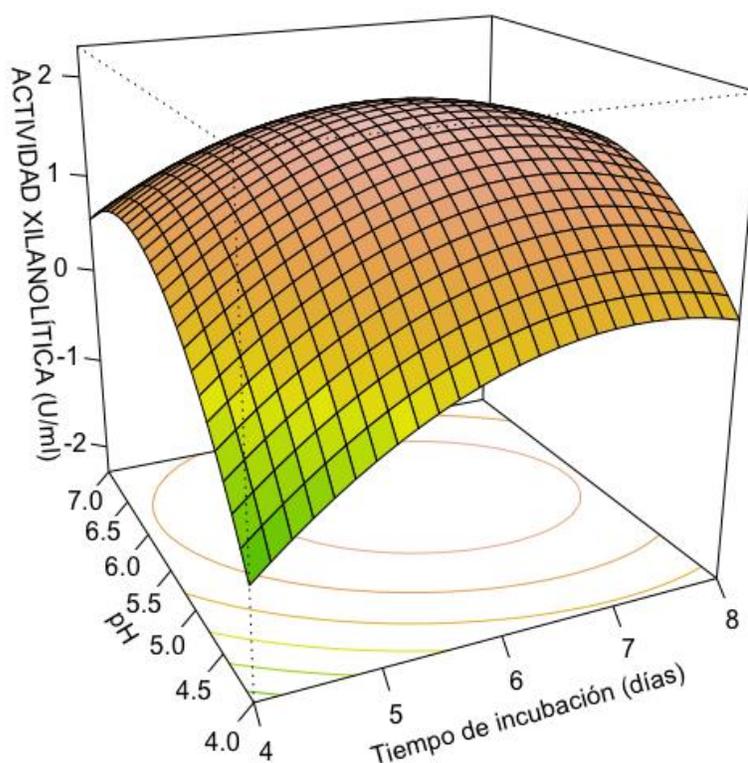
**Figura 4.** Gráfico 3D de superficie de respuesta y contornos que muestra la actividad xilanolítica de la cepa Ec220 en función de los factores temperatura (°C) y tiempo de incubación (días).

Para el segundo DCC, se utilizaron como factores el tiempo de incubación ( $X_2$ ) y el pH ( $X_3$ ). Adicionalmente, se mantuvo constante la temperatura óptima (29.8°C) establecida por el MSR en el primer DCC. Primero, los resultados experimentales se ajustaron usando la ecuación (1). Posteriormente, la significancia estadística del modelo obtenido, ecuación (2), se analizó mediante un ANOVA (*F-test*). Todos los términos: lineales ( $X_2$  y  $X_3$ ), la interacción ( $X_2X_3$ ) y cuadráticos ( $X_2^2$  y  $X_3^2$ ) fueron significativos ( $p < 0.001$ ). Además, el  $R^2 = 0.808$  fue similar al  $R^2$  ajustado = 0.773, lo que sugiere que los valores predichos

coincidieron con los valores experimentales (Soni et al., 2016). Además, el LOF no fue significativo ( $p > 0.05$ ), lo que indica que el modelo fue adecuado para este diseño experimental y puede usarse para predecir la variable respuesta.

Por lo tanto, el efecto del tiempo de incubación ( $X_2$ ) y el pH ( $X_3$ ) sobre la actividad xilanolítica de la cepa Ec220 ( $Y$ ) puede ser representado mediante la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \text{Actividad Xilanolítica (Y)} = & + 1.728 + 0.182 X_1 + 0.164 X_2 \\ & - 0.064 X_1 X_2 - 0.165 X_1^2 - 0.114 X_2^2 \end{aligned} \quad (2)$$



**Figura 5.** Gráfico 3D de superficie de respuesta y contornos que muestra la actividad xilanolítica de la cepa Ec220 en función de los factores pH y tiempo de incubación (días).

En la Fig. 5 se muestra el gráfico 3D de la curva del modelo MSR y su respectivo gráfico de contornos, donde se puede observar el efecto de los dos factores con respecto a la variable respuesta. La actividad xilanolítica aumentó exponencialmente desde el nivel -2 (pH 4.0) hasta alcanzar su punto más alto cerca del nivel +1 (pH 6.0), y luego decreció moderadamente en el nivel más alto +2 (pH 7.0). El punto estacionario predicho por el modelo (2), que es donde se obtiene el mayor rendimiento, fue en el pH 5.79. No se conocen datos previos respecto al pH óptimo para la producción de xilanasas con aislados de *F. graminearum* en cultivos líquidos. Sin embargo, Peter Mshelia et al. (2020) reportaron un pH de 5.6 para el crecimiento óptimo de *F. graminearum*. Por otro lado, un estudio con *F. solani* encontró un pH óptimo de 5.5 para la producción de xilanasas (Gupta et al, 2009), los cuales concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio.

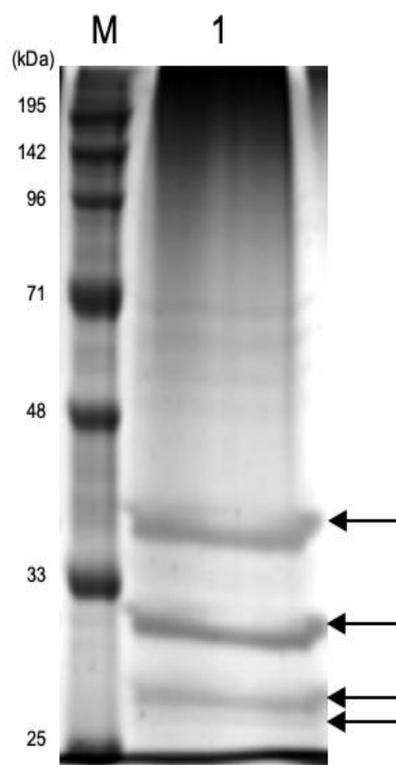
En el caso del tiempo de incubación, la mayor producción de xilanasas se presentó entre los días 6 y 7, calculándose el punto estacionario en el día 6.5, lo que concuerda con estudios previos con *F. solani* y *Aspergillus niger* (Martínez-Pacheco et al., 2020; Kavya y Padmavati, 2009).

Además, la mayor actividad de xilanasas observada en condiciones óptimas de cultivo fue de  $1.786 \pm 0.076$  U/ml, que no fue estadísticamente diferente ( $p > 0.05$ ) del rendimiento (1.817 U/ml) predicho por el modelo estadístico (2). Este modelo fue apropiado para predecir la mayoría de los valores obtenidos experimentalmente, excepto aquellos obtenidos a pH 4.0 (Anexo 3). Esto puede deberse al hecho de que a este pH la actividad xilanolítica fue casi nula. Sin embargo, se recomienda llevar a cabo un modelo MSR que incluya las tres condiciones de cultivo para futuros estudios. Finalmente, las condiciones establecidas como óptimas para la producción de xilanasas por la cepa Ec220 fueron: día 6.5 de tiempo de incubación, pH 5.79 y temperatura 29.8°C.

#### **4.4. Análisis Proteómico del Secretoma de la Cepa Fúngica Seleccionada**

El extracto enzimático crudo tomado bajo las condiciones óptimas de producción xilanolítica fue concentrado y luego precipitado para una mejor resolución de las proteínas presentes en el secretoma de la cepa Ec220.

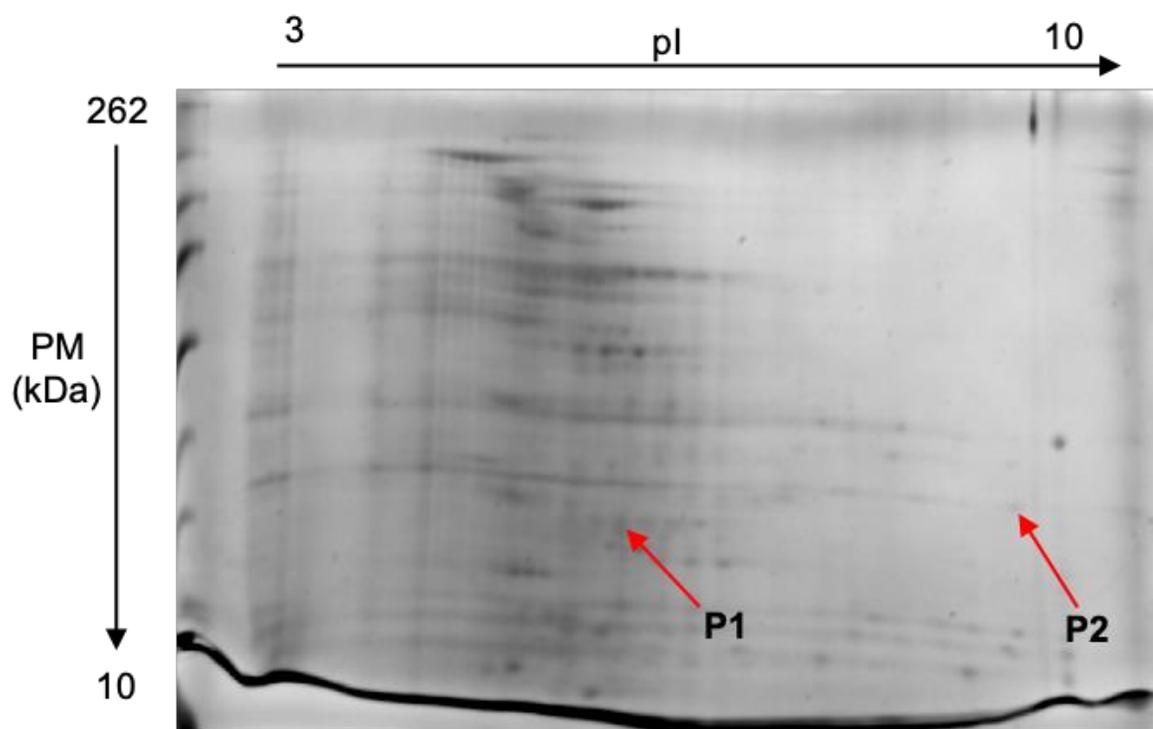
La SDS-PAGE de la muestra precipitada reveló tres bandas de gran intensidad a 36,7, 30,3 y 27,0 kDa, y una de menor intensidad a 26,1 kDa (Fig. 6). Pollet et al. (2009) encontraron resultados similares con cuatro xilanasas purificadas de *F. graminearum*. Ellos clasificaron las de mayor peso molecular (PM), Xyl D (39.7 kDa) y Xyl C (34.1 kDa), como glicosil hidrolasas (GH)10, mientras que las otros dos con menor PM, Xyl A (27.3 kDa) y Xyl B (26.0) fueron clasificadas como xilanasas GH11. Esto sugiere que las proteínas expresadas más predominantemente en el secretoma de Ec220, luego de ser cultivadas en salvado de trigo, podrían ser una o más de las xilanasas descritas previamente en aislados de *F. graminearum*.



**Figura 6.** SDS-PAGE del secretoma de la cepa Ec220 *F. graminearum* bajo condiciones óptimas de cultivo con salvado de trigo como sustrato. (1) Extracto enzimático precipitado; las bandas señaladas con una flecha corresponden a PM (36.7, 30.3, 27.0 y 26.1 kDa, de arriba a abajo) similares a los reportados previamente para xilanasas de *F. graminearum*. (M) Marcador de peso molecular de proteínas (RunBlue Prestained).

Para lograr una mejor separación e identificación del perfil proteico del secretoma de la cepa Ec220, se llevó a cabo una electroforesis en un gel bidimensional (2D-PAGE). En el análisis de datos se identificaron 192 puntos proteicos, de los cuales dos se encuentran en el rango de los PM y puntos isoeléctricos (pI) descritos en la literatura para xilanasas de la familia GH11. Como se muestra en la Fig. 7, el primer punto (P1) tuvo un PM de 26.05 kDa y un pI de 6.18, lo cual concuerda en buena medida con el PM (24-27.3 kDa) y pI (6.20) reportados previamente para la Xyl A de *F. graminearum* (Pollet et al., 2009). El segundo punto (P2) tuvo un pI de 9.13, que fue similar al pI (9.20) reportado para la Xyl B de *F. graminearum*; sin embargo, su PM (27.70 kDa) estuvo ligeramente fuera del rango (23-26 kDa) indicado en otros estudios (Pollet et al., 2009; Beliën et al., 2005). Además, en otras especies de *Fusarium* también se ha reportado la presencia de xilanasas GH11 como, por ejemplo, en *F. oxysporum* (PM: 23.5 kDa y pI: 8.70) y *F. verticillioides* (PM: 24 kDa y pI: 8.60) (Dong et al., 2012; Saha et al., 2001; Christakopoulos et al., 1996).

Por otro lado, no se identificó ningún punto proteico que coincida con los valores de PM y pI reportados para xilanasas de la familia GH10 (Xyl C y Xyl D). Esto difiere de lo reportado en un estudio donde se encontró que tanto xilanasas GH11 como xilanasas GH10 estuvieron presentes en el secretoma de *F. graminearum*, al utilizar salvado de trigo como inductor de la actividad enzimática (Debeire et al., 2014). No obstante, Dong et al. (2012) demostraron que las xilanasas de alto peso molecular (GH10) producidas por *F. graminearum* fueron menos estables a cambios de temperatura y pH ácidos (< 5.50) en comparación con las xilanasas de bajo peso molecular (GH11). Por lo tanto, es probable que las xilanasas GH10 se hayan degradado en la muestra analizada, debido a las diferentes condiciones experimentales utilizadas, por lo cual en el presente estudio se logró identificar únicamente xilanasas GH11 que, de acuerdo al análisis proteómico, coinciden con dos xilanasas, Xyl A y Xyl B, previamente descritas para el hongo *F. graminearum*.



**Figura 7.** Electroforesis en gel bidimensional del secretoma de la cepa Ec220 *F. graminearum* bajo condiciones óptimas de cultivo con salvado de trigo como sustrato. En el gel se muestran dos puntos proteicos (P1 y P2) sugerentes de dos xilanasas (Xyl A y Xyl B) previamente reportadas para *F. graminearum*. El marcador de peso molecular de proteínas estuvo en el rango de 262-10 kDa (Spectra Multicolor Broad Range).

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Según lo que se conoce, este es el primer reporte que explora el potencial xilanolítico de hongos endófitos aislados de las hojas de *Theobroma cacao*. La cepa seleccionada tras el estudio, Ec220 (*Fusarium graminearum*), que forma parte de la colección de microorganismos del CIBE-ESPOL, presentó la actividad xilanolítica más alta entre 24 aislados analizados al utilizar salvado de trigo como única fuente de carbono, destacando además el interés que podría generar a la industria el hecho de que posee una baja actividad celulolítica.

El modelo estadístico obtenido usando el MSR fue apropiado para predecir las condiciones óptimas de producción de xilanasas de la cepa Ec220 (*F. graminearum*), que fueron establecidas como: 6.5 días de incubación, pH 5.79 y temperatura 29.8°C.

Los puntos proteicos que corresponden a las enzimas xilanolíticas de la cepa Ec220 (P1 y P2) fueron evidenciados dentro del total de proteínas presentes en el secretoma analizado en el gel bidimensional, en base a la comparación con datos bibliográficos de estas enzimas.

Para finalizar, la metodología descrita en el presente trabajo abre la puerta para continuar investigaciones en la búsqueda de otros hongos endófitos con actividades xilanolíticas capaces de transformar materiales de desecho agroindustrial y aprovechar su potencial biotecnológico.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Fatma, S., Hameed, A., Noman, M., Ahmed, T., Shahid, M., Tariq, M., Sohail, I., & Tabassum, R. (2018). Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Bioenergy Source for the Future. *Protein and Peptide Letters*, 25(2), 148–163. <https://doi.org/10.2174/0929866525666180122144504>
2. Porras, A. C., & González, A. R. (2016). Aprovechamiento de residuos orgánicos agrícolas y forestales en Iberoamérica. *Academia y Virtualidad*, 9(2), 90–107. <https://doi.org/10.18359/ravi.2004>
3. Ruiz-Colorado, A., Quintana, J. C., Niño, J., Cano, N., Gómez, A. C., Daza, S., Sierra, A. F., & Correa, J. F. (2014). Biomasa lignocelulósica en Colombia, pretratamientos y productos de valor agregado. En Y. Piñeros-Castro (Ed.), *Aprovechamiento de biomasa lignocelulósica, algunas experiencias de investigación en Colombia* (pp. 7-58). Bogotá, Colombia.
4. Prasad, R. K., Chatterjee, S., Mazumder, P. B., Gupta, S. K., Sharma, S., Vairale, M. G., Datta, S., Dwivedi, S. K., & Gupta, D. K. (2019). Bioethanol production from waste lignocelluloses: A review on microbial degradation potential. *Chemosphere*, 231, 588–606. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.142>
5. Zoghalmi, A., & Paës, G. (2019). Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. *Frontiers in Chemistry*, 7, 874. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00874>
6. Giovannoni, M., Gramegna, G., Benedetti, M., & Mattei, B. (2020). Industrial Use of Cell Wall Degrading Enzymes: The Fine Line Between Production Strategy and Economic Feasibility. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00356>
7. Srivastava, S., Sharma, M., Usmani, Z., Dubey, S., Yadav, G. K., Singh, N. P., & Bhargava, A. (2020). Plant cell wall degrading enzymes in biomass bioprocessing to biorefineries: a review. En V. K. Gupta (Eds.), *Recent Developments in Bioenergy Research*, 415–432. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819597-0.00022-2>
8. Alokika, & Singh, B. (2019). Production, characteristics, and biotechnological applications of microbial xylanases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10108-6>
9. Martínez-Pacheco, M. M., Flores-García, A., Zamudio-Jaramillo, M. A., Chávez-Parga, M. C., & Alvarez-Navarrete, M. (2020). Optimization of production of xylanases with low cellulases in *Fusarium solani* by means of a solid state fermentation using statistical experimental design. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(4), 328–338. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.12.003>
10. Subramaniyan, S., & Prema, P. (2000). Cellulase-free xylanases from Bacillus and other microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 183(1), 1-7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08925.x>

11. Bibra, M., Kunreddy, V., & Sani, R. (2018). Thermostable xylanase production by *Geobacillus sp.* strain DUSELR13, and its application in ethanol production with lignocellulosic biomass. *Microorganisms*, 6(3):93. [https://doi: 10.3390/microorganisms6030093](https://doi.org/10.3390/microorganisms6030093)
12. Mhiri, S., Bouanane-Darenfed, A., Jemli, S., Neifar, S., Ameri, R., Mezghani, M., Bouacem, K., Jaouadi, B., & Bejar, S. (2020). A thermophilic and thermostable xylanase from *Caldicoprobacter algeriensis*: Recombinant expression, characterization and application in paper biobleaching. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 808–817. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.162>
13. Desai, D. I., & Iyer B. D. (2016). Biodeinking of old newspaper pulp using a cellulase-free xylanase preparation of *Aspergillus niger* DX-23. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 5:78–85. doi:10.1016/j.bcab.2015.11.001
14. Bhardwaj N., Kumar B., & Verma P. (2019). A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. *Bioresources. Bioprocessing*, 6(40). <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0276-2>
15. Klein-Marcuschamer, D., Oleskowicz-Popiel, P., Simmons, B. A., Blanch, H. W. (2012). The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnology Bioengineering*, 109(4):1083–1087. <https://doi: 10.1002/bit.24370>
16. Patel, S. J., & Savanth, V. D. (2015). Review on fungal xylanases and their applications. *International Journal of Advanced Research*, 3(3): 311-315. ISSN 2320-5407.
17. Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P. L., & Srivastava, A. K. (2016). Bacterial xylanases: biology to biotechnology. *3 Biotech*, 6(2), 150. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0457-z>
18. Corrêa, R. C. G., Rhoden, S. A., Mota, T. R., Azevedo, J. L., Pamphile, J. A., de Souza, C. G. M., Polizeli, M. de L. T. de M., Bracht, A., & Peralta, R. M. (2014). Endophytic fungi: Expanding the arsenal of industrial enzyme producers. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41(10), 1467–1478. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1496-2>
19. Afolabi, F.T., Obisesan, O. & Igbinalolor, R.O. (2019). Isolation and Screening of Cellulolytic Fungi from Cocoa Pod Husks and Optimization Conditions for Cellulase Production. *Acta Microbiologica Bulgarica*, 35(4), 190-199.
20. Ortega, L. M., Kikot, G. E., Astoreca, A. L., & Alconada, T. M. (2013). Screening of *Fusarium graminearum* isolates for enzymes extracellular and deoxynivalenol production. *Journal of Mycology*, vol. 2013, Article ID 358140, 7 pages. <https://doi.org/10.1155/2013/358140>
21. Rubini, M. R., Silva-Ribeiro, R. T., Pomella, A. W. V., Maki, C. S., Araújo, W. L., dos Santos, D. R., & Azevedo, J. L. (2005). Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao L.*) and biological control of Crinipellis

- perniciosa, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal of Biological Sciences*, 24–33. <https://doi:10.7150/ijbs.1.24>
22. Debeire, P., Delalande, F., Habrylo, O., Jeltsch, J. M., Van Dorsselaer, A., & Phalip, V. (2014). Enzymatic cocktails produced by *Fusarium graminearum* under submerged fermentation using different lignocellulosic biomasses. *FEMS Microbiology Letters*, 355(2), 116–123. <https://doi:10.1111/1574-6968.12467>
  23. Liu, G., & Qu, Y. (2021). Integrated engineering of enzymes and microorganisms for improving the efficiency of industrial lignocellulose deconstruction. *Engineering Microbiology*, 1(July), 100005. <https://doi.org/10.1016/j.engmic.2021.100005>
  24. Torres-Jaramillo, D., Morales-Vélez, S. P., & Quintero-Díaz, J. C. (2017). Evaluación de pretratamientos químicos sobre materiales lignocelulósicos. *Ingeniare. Revista chilena de ingeniería*, 25(4), 733-743. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-33052017000400733>
  25. Benaimche, O., Seghir, N. T., Sadowski, Ł., & Mellas, M. (2019). The Utilization of Vegetable Fibers in Cementitious Materials. *Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials*, 2(1):649-662. <https://doi:10.1016/b978-0-12-803581-8.11596-6>
  26. Musa, Y., & Bwatanglang, I. B. (2020). Current role and future developments of biopolymers in green and sustainable chemistry and catalysis. *Sustainable Nanocellulose and Nanohydrogels from Natural Sources*, 131–154. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816789-2.00006-7>
  27. Walia, A., Guleria, S., Mehta, P., Chauhan, A., & Parkash, J. (2017). Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. *3 Biotech*, 7(11):1-12. <https://doi:10.1007/s13205-016-0584-6>
  28. Soni H, Kango N. Hemicellulases in Lignocellulose Biotechnology: Recent Patents. (2013). *Recent Patents on Biotechnology*, 7(3):207-218. <https://doi:10.1080/21501203.2017.1337657>
  29. Wang, L., Cao, K., Pedroso, M. M., Wu, B., Gao, Z., He, B., & Schenk, G. (2021). Sequence- and structure-guided improvement of the catalytic performance of a GH11 family xylanase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 297(5), 101262. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101262>
  30. Atel, S.J., & Savanth, V.D. (2015). Review on fungal xylanases and their applications. *International Journal of Advanced Research*, 3(3), 311-315. ISSN 2320-5407.
  31. Soliman, H.M., Sherief, A.S., & EL-Tanash, A.B. (2012). Production of Xylanase by *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* using Some Agriculture Residues. *International Journal of Agricultural Research.*, 7(1), 46-57. <https://doi.org/10.3923/ijar.2012.46.57>

32. Sridevi, A., Ramanjaneyulu, G., & Suvarnalatha Devi, P. (2017). Biobleaching of paper pulp with xylanase produced by *Trichoderma asperellum*. *3 Biotech*, 7(4):266. [https://doi: 10.1007/s13205-017-0898-z](https://doi.org/10.1007/s13205-017-0898-z)
33. Woldesenbet, F., Virk, A. P., Gupta, N., & Sharma, P. (2012). Effect of Microwave Irradiation on Xylanase Production from Wheat Bran and Biobleaching of Eucalyptus Kraft Pulp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(1): 100–108. [https://doi:10.1007/s12010-012-9663-2](https://doi.org/10.1007/s12010-012-9663-2)
34. Bala, A., & Singh, B. (2017). Concomitant production of cellulase and xylanase by thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in solid state fermentation and their applicability in bread making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 1, 33(6),109. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2278-6>
35. Passarinho, A.T.P., Ventorim, R.Z., Maitan-Alfenas, G.P., de Oliveira, E.B., Guimaraes, V.M. (2019). Engineered GH11 xylanases from *Orpinomyces* sp. PC-2 improve techno-functional properties of bread dough. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 99(2), 741–747. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9242>
36. Wu, J., Qiu, C., Ren, Y., Yan, R., Ye, X., Wang, G. (2018). Novel salt-tolerant xylanase from a mangrove-isolated fungus *Phoma* sp. MF13 and its application in chinese steamed bread. *ACS omega*. 3(4), 708–3716. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00345>
37. Ramanjaneyulu, G., Sridevi, A., Seshapani, P., Ramya, A., Dileep Kumar, K., Praveen Kumar Reddy, G., & Rajasekhar Reddy, B. (2017). Enhanced production of xylanase by *Fusarium* sp. BVKT R2 and evaluation of its biomass saccharification efficiency. *3 Biotech*, 7(5), 351. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0977-1>
38. Uday, U. S. P., Majumdar, R., Tiwari, O. N., Mishra, U., Mondal, A., Bandyopadhyay, T. K., & Bhunia, B. (2017). Isolation, screening and characterization of a novel extracellular xylanase from *Aspergillus niger* (KP874102.1) and its application in orange peel hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 401–409. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.06>
39. Techaoei, S., Jirayuthcharoenkul, C., Jarmkom, K., Dumrongphuttidecha, T., & Khobjai, W. (2020). Chemical evaluation and antibacterial activity of novel bioactive compounds from endophytic fungi in *Nelumbo nucifera*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(11), 2883–2889. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.037>
40. González-Coloma, A., Cosoveanu, A., Cabrera, R., Giménez, C., & Nutan Kaushik. (2016). Endophytic Fungi and Their Bioprospection. En S. K. Deshmukh, J. K. Misra, J. P. Tewari, & T. Papp (Eds), *Fungi: Applications and Management Strategies* (pp.14-31). CRC Press.

41. Redgwell, R. J., & Hansen, C. E. (2000). Isolation and characterisation of cell wall polysaccharides from cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans. *Planta*, 210(5), 823–830. doi:10.1007/s004250050685
42. Ferreira, M. C., Vieira, M. de L. A., Zani, C. L., Alves, T. M. de A., Junior, P. A. S., Murta, S. M. F., Romanha, A. J., Gil, L. H. V. G., Carvalho, A. G. de O., Zilli, J. E., Vital, M. J. S., Rosa, C. A., & Rosa, L. H. (2015). Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 59, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2014.12.017>
43. Ginting, R. C. B., Sukarno, N., Widyastuti, U., Darusman, L. K., & Kanaya, S. (2013). Diversity of Endophytic Fungi from Red Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) Plant and Their Inhibitory Effect to *Fusarium oxysporum* Plant Pathogenic Fungi. *HAYATI Journal of Biosciences*, 20(3), 127–137. <https://doi.org/10.4308/hjb.20.3.127>
44. Suwastika, I. N., Muslimin, Rifka, Aisyah, N., Rahmansyah, Mutmainah, Ishizaki, Y., Basri, Z., & Shiina, T. (2015). Genotyping Based on SSR Marker on Local Cacao (*Theobroma Cacao* L.) from Central Sulawesi. *Procedia Environmental Sciences*, 28, 88–91. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2015.07.013>
45. Hanada, R. E., Pomella, A. W. V., Costa, H. S., Bezerra, J. L., Loguercio, L. L., & Pereira, J. O. (2010). Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. *Fungal Biology*, 114(11-12), 901–910. <https://doi:10.1016/j.funbio.2010.08.006>
46. Mejía, L. C., Rojas, E. I., Maynard, Z., Bael, S. V., Arnold, A. E., Hebbbar, P., Samuels, G. J., Robbins, N., & Herre, E. A. (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*, 46(1), 4–14. <https://doi:10.1016/j.biocontrol.2008>.
47. Villavicencio-Vásquez, M., Espinoza-Lozano, R., Sosa del Castillo, D., & Pérez-Martínez, S. (2018). Hongos endófitos foliares como candidatos a biocontroladores contra *Moniliophthora spp.* de *Theobroma cacao* (Malvaceae) en Ecuador. *Acta Biológica Colombiana*, 23(3), 235–241. doi:10.15446/abc.v23n3.69455
48. Dong, X., Meinhardt, S. W., & Schwarz, P. B. (2012). Isolation and characterization of two endoxylanases from *Fusarium graminearum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(10), 2538–2545. <https://doi:10.1021/jf203407p>
49. Pollet, A., Beliën, T., Fierens, K., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2009). *Fusarium graminearum* xylanases show different functional stabilities, substrate specificities and inhibition sensitivities. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(4), 189–195. <http://doi:10.1016/j.enzmictec.2008.12.005>

50. Beliën, T., Van Campenhout, S., Van Acker, M., & Volckaert, G. (2005). Cloning and characterization of two endoxylanases from the cereal phytopathogen *Fusarium graminearum* and their inhibition profile against endoxylanase inhibitors from wheat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 327(2), 407–414. <http://doi:10.1016/j.bbrc.2004.12.036>
51. Burlacu, A., Cornea, C. P. & Israel-Roming, F. (2016). Screening of xylanase producing microorganisms. *Research Journal of Agricultural Science*, 48 (2), 8-12
52. Orlandelli, R. C., Almeida, T. T. de, Alberto, R. N., Polonio, J. C., Azevedo, J. L., & Pamphile, J. A. (2015). Antifungal and proteolytic activities of endophytic fungi isolated from *Piper hispidum* Sw. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 359–366. <https://doi:10.1590/s1517-838246220131042>
53. Félix, C., Libório, S., Nunes, M., Félix, R., Duarte, A. S., Alves, A., & Esteves, A. C. (2018). *Lasiodiplodia theobromae* as a Producer of Biotechnologically Relevant Enzymes. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020029>
54. Crawford D. L. (1978) Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains. *Appl Environ Microbiol*, 35:1041–1045.
55. Ferreira, P., Diez, N., Gutierrez, C., Soliveri, J., & Copa-Patiño, J. L. (1999). *Streptomyces avermitilis* CECT 3339 produces a ferulic acid esterase able to release ferulic acid from sugar beet pulp soluble feruloylated oligosaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 440–442. [https://doi:10.1002/\(sici\)1097-0010\(19990301\)79:3<440::aid-jsfa278>3.0.co;2-c](https://doi:10.1002/(sici)1097-0010(19990301)79:3<440::aid-jsfa278>3.0.co;2-c)
56. Borneman, W. S., Hartley, R. D., Morrison, W. H., Akin, D. E., & Ljungdahl, L. G. (1990). Feruloyl and p-coumaroyl esterase from anaerobic fungi in relation to plant cell wall degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 345–351. <https://doi.org/10.1007/BF00164534>
57. Bailey, M. J., Biely, P., & Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, 23(3), 257–270. [https://doi:10.1016/0168-1656\(92\)90074-j](https://doi:10.1016/0168-1656(92)90074-j)
58. Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31, 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
59. Biswas, P., Bharti, A. K., Kadam, A., & Dutt, D. (2019). Wheat bran as substrate for enzyme production and its application in the bio-deinking of mixed office waste (MOW) paper. *Bioresources*, 14(3), 5788-5806.
60. Sadaf, A., & Khare, S. K. (2014). Production of *Sporotrichum thermophile* xylanase by solid state fermentation utilizing deoiled *Jatropha curcas* seed cake and its application in xylooligosachharide synthesis. *Bioresource Technology*, 153, 126–130. <https://doi:10.1016/j.biortech.2013.11.058>

61. Wang, W., Vignani, R., Scali, M., & Cresti, M. (2006). A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis*, 27(13), 2782–2786. <https://doi:10.1002/elps.200500722>
62. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
63. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685
64. Khoirunnisa, N.S., Anwari, S. & Santosa, D.A. (2020). Isolation and Selection of Cellulolytic Bacteria from Rice Straw for Consortium of Microbial Fuel Cell. *Biodiversita Journal of Biological Diversity*, 21(4), 1686-1696. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210450>
65. Xue, C.Y., Zhou, R.J., Li, Y.J., Xiao, D., Fu, J.F. (2018). Cell-wall-degrading enzymes produced in vitro and in vivo by *Rhizoctonia solani*, the causative fungus of peanut sheath blight. *PeerJ*, 6:e5580. <https://doi:10.7717/peerj.5580>
66. Bakri, Y., Jawhard, M. & Arabi, M. I. E. (2014). Enzymatic Activity of the Endophytic *Fusarium* Species Strains Isolated from Wheat. *Advances in Horticultural Scienc*, 28(3), 129-132. <https://www.jstor.org/stable/24586859>
67. Kwon, H. W., Yoon, J. H., Kim, S. H., Hong, S. B., Cheon, Y., & Ko, S. J. (2007). Detection of Extracellular enzymes Activities in Various *Fusarium spp.* *Mycobiology*, 35(3), 162–165. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2007.35.3.162>
68. Toghueo, R. M. K., Ejiya, I. E., Sahal, D., Yazdani, S.S. & Boyom, F.F. (2017). Production of Cellulolytic Enzymes by Endophytic Fungi Isolated from Cameroonian Medicinal Plants. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(2), 1264-1271. <https://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2017.602.142>
69. Pietikäinen, J., Pettersson, M., & Bååth, E. (2005). Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. *FEMS Microbiology Ecology*, 52(1), 49–58. <https://doi:10.1016/j.femsec.2004.10.002>
70. Paccanaro, M. C., Sella, L., Castiglioni, C., Giacomello, F., Martínez-Rocha, A. L., D’Ovidio, R., Schäfer, W. & Favaron, F. (2017). Synergistic effect of different plant cell wall-degrading enzymes is important for virulence of *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(11), 886–895. <https://doi:10.1094/mpmi-07-17-0179-r>
71. Esteves, A. C., Saraiva, M., Correia, A., & Alves, A. (2014). Botryosphaerales fungi produce extracellular enzymes with biotechnological potential. *Canadian Journal of Microbiology*, 60(5), 332–342. <http://doi:10.1139/cjm-2014-0134>
72. Kikot, E. G., Hours, R. A., & Alconada, T.M. (2010). Extracellular enzymes of *Fusarium graminearum* isolates. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(4), 779-783.

73. Azzaz, H. H., Murad, H. A., Aboamer, A. A., Alzahar, H., & Fahmy, M. (2020). Cellulase production by *Fusarium graminearum* and its application in ruminant's diets degradation. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 23(1), 27-34. <http://doi:10.3923/pjbs.2020.27.34>
74. Merali, Z., Collins, S. R. A., Elliston, A., Wilson, D. R., Käsper, A., & Waldron, K. W. (2015). Characterization of cell wall components of wheat bran following hydrothermal pretreatment and fractionation. *Biotechnology for Biofuels*, 8, 23. <http://doi:10.1186/s13068-015-0207-1>
75. Gou, G., Wei, W., Jiang, M., Zhang, S., Lu, T., Xie, X., Meng, F., & Zhou, Z. (2018). Environmentally friendly method for the separation of cellulose from steam-exploded rice straw and its high-value applications. En S. N. Kazi (Ed.). *Pulp and Paper Processing* (pp.133-153). IntechOpen, Londres. <http://doi:10.5772/intechopen.79014>
76. Yang, S., Zhang, Y., Yue, W., Wang, W., Wang, Y., Yuan, T., & Sun, R. (2016). Valorization of lignin and cellulose in acid-steam-exploded corn stover by a moderate alkaline ethanol post-treatment based on an integrated biorefinery concept. *Biotechnology Biofuels* 9, 38. <http://doi.org/10.1186/s13068-016-0656-1>
77. da Silva, P. O., de Alencar Guimarães, N. C., Peixoto-Nogueira, S. C., Betini, J. H., Marchetti, C.R., Zanoelo, F.F., de Moraes Polizeli, M. L. T., Marques, M. R., & Giannesi, G. C. (2015). Production of cellulase-free xylanase by *Aspergillus flavus*: Effect of polyols on the thermostability and its application on cellulose pulp biobleaching. *African Journal of Biotechnology*, 14(52), 3368–3373. <http://doi:10.5897/ajb2015.14943>
78. Subramaniyan, S., & Prema, P. (2000). Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 183(1), 1-7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08925.x>
79. Venkateswarulu, T. C., Prabhakar, K. V., Kumar, R. B., & Krupanidhi, S. (2017). Modeling and optimization of fermentation variables for enhanced production of lactase by isolated *Bacillus subtilis* strain VUVD001 using artificial neural networking and response surface methodology. *3 Biotech*, 7(3), 186. <http://doi.org/10.1007/s13205-017-0802-x>
80. Peter Mshelia, L., Selamat, J., Iskandar Putra Samsudin, N., Rafii, M. Y., Abdul Mutalib, N.-A., Nordin, N., & Berthiller, F. (2020). Effect of temperature, water activity and carbon dioxide on fungal growth and mycotoxin production of acclimatised isolates of *Fusarium verticillioides* and *F. graminearum*. *Toxins*, 12(8), 478. <http://doi:10.3390/toxins12080478>
81. Soni, H., Rawat, H. K., Pletschke, B. I., & Kango, N. (2016). Purification and characterization of  $\beta$ -mannanase from *Aspergillus terreus* and its applicability in depolymerization of mannans and saccharification of lignocellulosic biomass. *3 Biotech*, 6(2). <http://doi:10.1007/s13205-016-0454-2>

82. Gupta, V.K., Gaur, R., Gautam, N., Kumar, P., Yadav, I.J., & Darmwal, N.S. (2009). Optimization of Xylanase Production from *Fusarium solani* F7. *American Journal of Food Technology*, 4: 20-29.
83. Kavya, V., Padmavathi, T. Optimization of growth conditions for xylanase production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Polish Journal of Microbiology*. 2009;58(2):125-130.
84. Saha, B.C. (2002). Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. *Process Biochemistry*, 37(1), 1279-1284.
85. Christakopoulos, P., Nerinckx, W., Kekos, D., Macris, B., and Claeysens, M. (1996). Purification and characterization of two low molecular mass alkaline xylanases from *Fusarium oxysporum* F3. *Journal of Biotechnology*. 51, 181–189.

# **ANEXOS**

## Anexo 1

**Identificación taxonómica y origen de las 24 cepas fúngicas del banco de microorganismos del CIBE utilizadas para la bioprospección**

<b>Cepa (Código CIBE)</b>	<b>Identidad Taxonómica</b>	<b>Lugar de origen</b>
Ec008	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Balao, Guayas
Ec023	<i>Fusarium equiseti</i>	Molleturo, Azuay
Ec027	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Molleturo, Azuay
Ec035	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Molleturo, Azuay
Ec036	<i>Phoma</i> sp.	Molleturo, Azuay
Ec059	<i>Xylaria feejeensis</i>	Naranjal, Guayas
Ec060	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	Naranjal, Guayas
Ec067	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Naranjal, Guayas
Ec069	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	Naranjal, Guayas
Ec071	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Naranjal, Guayas
Ec095	<i>Fusarium decemcellulare</i>	Naranjal, Guayas
Ec098	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Naranjal, Guayas
Ec099	<i>Xylaria</i> sp.	Balao, Guayas
Ec104	<i>Fusarium thapsinum</i>	Balao, Guayas
Ec107	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Balao, Guayas
Ec113	<i>Hypoxyylon investiens</i>	Balao, Guayas
Ec120	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Balao, Guayas
Ec134	<i>Fusarium camptoceras</i>	Molleturo, Azuay
Ec138	<i>Fusarium equiseti</i>	Molleturo, Azuay
Ec151	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Naranjal, Guayas
Ec152	<i>Fusarium</i> sp.	Naranjal, Guayas
Ec157	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Naranjal, Guayas
Ec196	<i>Fusarium decemcellulare</i>	Naranjal, Guayas
Ec220	<i>Fusarium graminearum</i>	Molleturo, Azuay

## Anexo 2

**Índices de actividad enzimática calculados para aquellas cepas fúngicas capaces de crecer e hidrolizar el CMC en el ensayo en placa**

<b>Cepa</b>	<b>Crecimiento micelial (radio en cm)</b>	<b>Halo de hidrólisis (radio en cm)</b>	<b>Índice de Actividad Enzimática (IAE)</b>	<b>Porcentaje IAE (%)</b>
Ec220	0.76 ± 0.05	1.08 ± 0.10	1.42	100.00
Ec099	0.88 ± 0.01	1.03 ± 0.03	1.18	82.70
Ec023	1.21 ± 0.13	1.05 ± 0.04	0.87	60.97
Ec157	1.45 ± 0.10	1.13 ± 0.07	0.77	54.20
Ec120	1.13 ± 0.12	0.82 ± 0.05	0.73	51.33
Ec138	1.90 ± 0.15	1.30 ± 0.08	0.68	48.07
Ec104	1.50 ± 0.08	1.00 ± 0.06	0.67	46.84
Ec152	0.80 ± 0.10	0.50 ± 0.07	0.63	43.91
Ec151	2.25 ± 0.19	1.40 ± 0.10	0.62	43.72
Ec098	2.50 ± 0.13	1.50 ± 0.07	0.60	42.15
Ec027	1.40 ± 0.11	0.80 ± 0.05	0.57	40.15
Ec067	2.50 ± 0.15	1.20 ± 0.06	0.48	33.72
Ec134	1.65 ± 0.07	0.73 ± 0.05	0.44	31.21
Ec113	2.50 ± 0.10	0.60 ± 0.07	0.24	16.86

### Anexo 3

**Matriz del diseño central compuesto (DCC) según los niveles codificados de los factores tiempo de incubación y pH junto con los valores predichos y experimentales para la actividad xilanolítica**

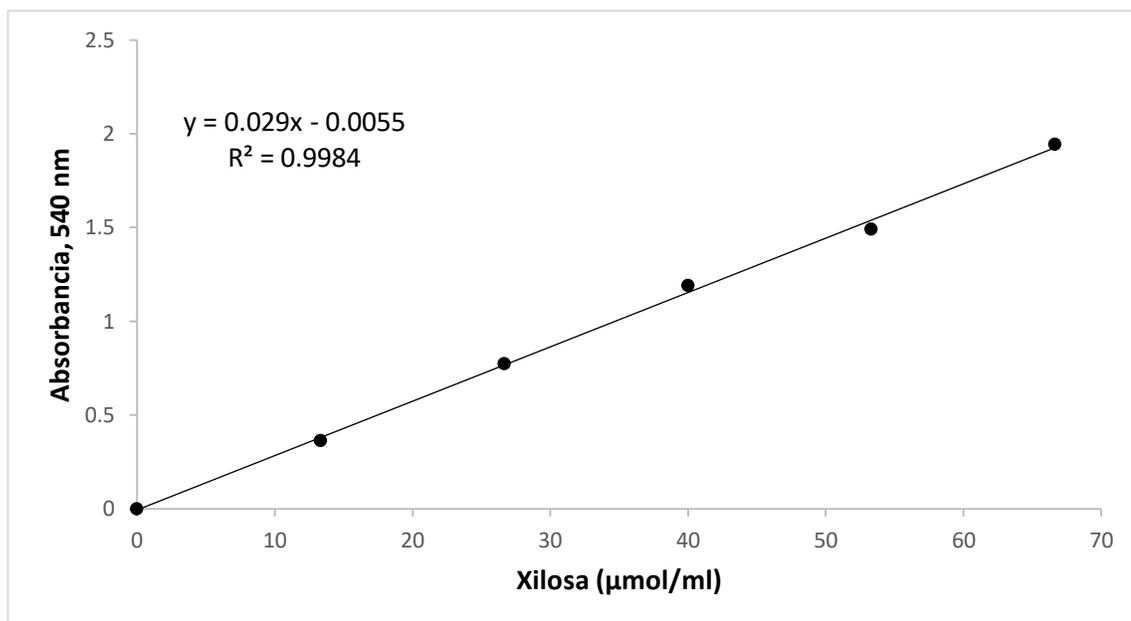
<b>T**</b>	<b>Tiempo de incubación (X<sub>2</sub>)</b>	<b>pH (X<sub>3</sub>)</b>	<b>Valor Predicho (U/ml)</b>	<b>Valor Experimental (U/ml)*</b>
1	-2	+2	0.832	0.761 ± 0.023
2	-1	+2	1.381	1.099 ± 0.454
3	0	+2	1.600	0.818 ± 0.276
4	+1	+2	1.489	0.720 ± 0.330
5	+2	+2	1.048	0.665 ± 0.029
6	-2	+1	0.882	0.419 ± 0.003
7	-1	+1	1.495	1.768 ± 0.123
8	0	+1	1.778	1.779 ± 0.042
9	+1	+1	1.731	1.534 ± 0.080
10	+2	+1	1.345	1.450 ± 0.078
11	-1	0	1.381	1.354 ± 0.023
12	0	0	1.728	1.550 ± 0.014
13	0	0	1.728	1.762 ± 0.013
14	+2	0	1.432	1.142 ± 0.045
15	-2	-1	0.298	0.043 ± 0.005
16	-1	-1	1.039	0.940 ± 0.021
17	0	-1	1.450	1.614 ± 0.019
18	+1	-1	1.531	1.655 ± 0.043
19	+2	-1	1.282	1.724 ± 0.012
20	-2	-2	-0.336	0.000 ± 0.000
21	-1	-2	0.469	0.002 ± 0.000
22	0	-2	0.944	0.008 ± 0.001
23	+1	-2	1.089	0.101 ± 0.020
24	+2	-2	0.904	0.063 ± 0.022

\*Values are expressed as mean ± SD, n=3

\*\* T = Tratamiento

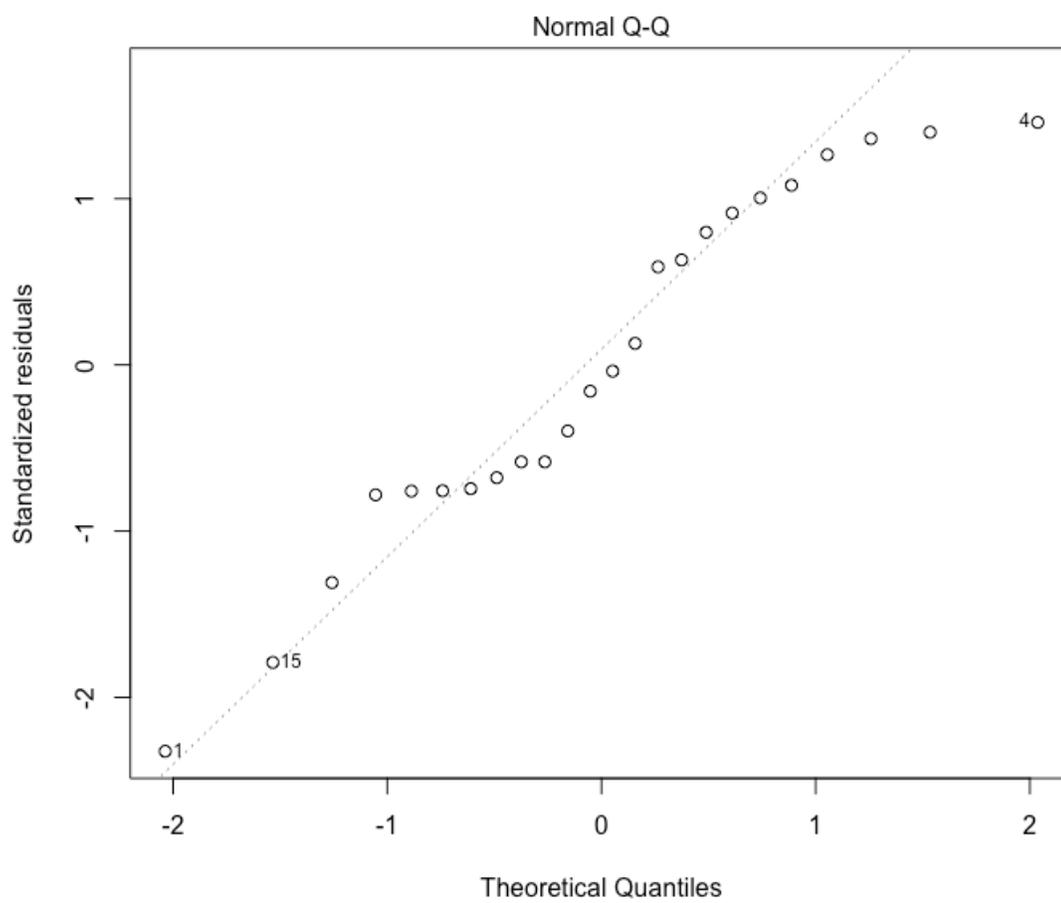
**Anexo 4**

**Curva estándar para la xilosa en presencia de xilano de haya (10 mg/ml) obtenida mediante el ensayo DNS**



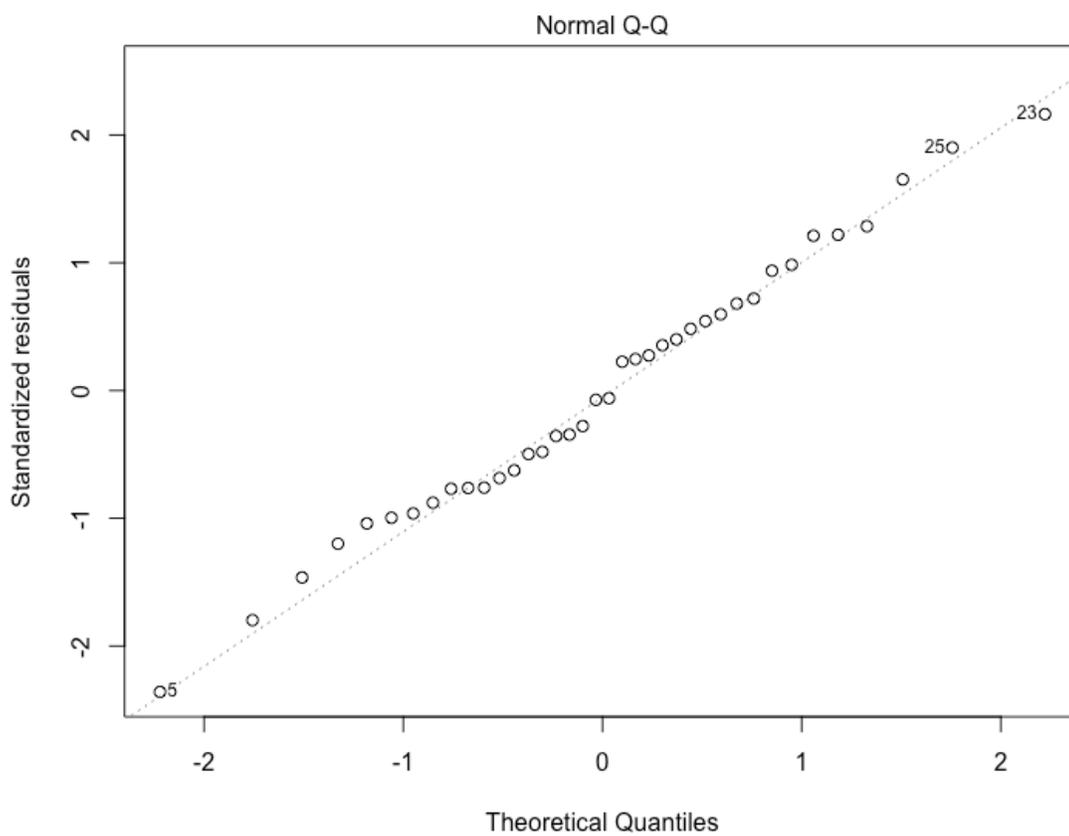
## Anexo 5

**Gráfico Q-Q de la normalidad de los datos de los factores temperatura y tiempo de incubación utilizados en el primer diseño experimental DCC**



**Anexo 6**

**Gráfico Q-Q de la normalidad de los datos de los factores pH y tiempo de incubación utilizados en el segundo diseño experimental DCC**



## Anexo 7

Gráfico de contornos del segundo modelo estadístico para la producción de xilanasas en función del pH y el tiempo de incubación

