



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

LABORATORIO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

TESIS

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD XILANOLÍTICA DE AISLADOS
FÚNGICOS DE DIFERENTES ECOSISTEMAS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

p.Q.F.B. ANA LAURA AMADO GARCÍA

ASESOR:

M.C. ALBERTO FLORES GARCÍA

Abril del 2014, Morelia, Michoacán, México.



RESUMEN

Los hongos filamentosos presentan ventajas en la producción de xilanasas comparado con bacterias y levaduras, ya que secretan estas enzimas al medio y su actividad es mayor, pero la actividad xilanolítica de este interesante grupo de microorganismos depende incluso de su ecosistema. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad xilanolítica de hongos aislados de diferentes ecosistemas. Ciento tres hongos de ecosistemas hortícolas, frutícolas y boscosos se sembraron en medio basal para su mantenimiento y propagación. El índice xilanolítico y crecimiento de los aislados fúngicos se determinaron, mediante un análisis de correspondencia entre los ecosistemas, el crecimiento e índice xilanolítico se estudió el comportamiento de la población de hongos. El índice xilanolítico se utilizó como criterio de selección del mejor aislado fúngico, el cual se identificó por técnicas moleculares. El aislado 63 se seleccionó ya que destacó por tener el mayor índice xilanolítico (1.232 ± 0.023).

ABSTRACT

Filamentous fungi have advantages in the production of xylanases compared to bacteria and yeast, and secreting these enzymes to the medium and its activity is higher, but the xylanolytic activity of this interesting group of microorganisms depends even its ecosystem. The aim of this study was to determine the xylanolytic activity of fungi isolated from different ecosystems. One hundred and three fungi vegetable, fruit and forest ecosystems were seeded in basal medium for maintenance and propagation. The xilanolítico index and growth of fungal isolates were determined through an analysis of correspondence between ecosystems and xilanolítico growth rate behavior of the population of fungi was studied. The xilanolítico index was used as a criterion for selection of the best fungal isolate, which was identified by molecular techniques. The isolated 63 was selected as notable for having the largest xilanolítico index (1.232 ± 0.023).

Palabras clave: xilana, xilanasas, *Fusarium tricinctum*.

ÍNDICE GENERAL

Capítulo	Página
Resumen	I
Abstract	I
Índice general	II-IV
Índice de figuras	V
Índice de cuadros	VI
1 Introducción	1
2 Marco teórico	2
2.1 La pared celular vegetal	2
2.2 Estructura química de la pared celular	2
2.2.1 Lámina media.....	2
2.2.2 Pared primaria.....	2
2.2.3 Pared secundaria.....	3
2.3 Composición química de la pared celular	3
2.3.1 Celulosa.....	4
2.3.2 Pectinas.....	4
2.3.3 Lignina.....	4-5
2.3.4 Hemicelulosas.....	5-6
2.4 Xilana	6-8
2.4.1 Enzimas degradadoras de la xilana	8-9
2.4.1.1 Enzimas implicadas en la despolimerización del esqueleto principal de xilosas.....	9
2.4.1.2 Enzimas encargadas de la eliminación de las cadenas laterales de la xilana, llamadas también accesorias o desramificantes.....	9-10
2.4.2 β -xilosidasas.....	10

2.4.3	Esterasas.....	10-11
2.4.3	α -L-arabinofuranosidasas.....	11
2.4.4	α -D-glucuronidasas.....	11-12
2.5	Clasificación y modo de acción de las xilanasas	12-13
2.5	Microorganismos productores de xilanasas	13-14
2.6	Métodos de producción de xilanasas	15
2.7	Aplicaciones industriales de las xilanasas	15
2.7.1	Xilanasas en la alimentación animal	16
2.7.2	Fabricación de pan, alimentos y bebidas	16-17
2.7.3	Aplicaciones farmacéuticas y químicas	17-18
2.7.4	Textiles	18-19
2.7.5	Pulpa de celulosa y papel	19
3	Justificación	20
4	Hipótesis	21
5	Objetivos	22
5.1	General.....	22
5.2	Específicos.....	22
6	Materiales y métodos	23
6.1	Material biológico.....	23
6.2	Medio de propagación y mantenimiento.....	23
6.3	Crecimiento en medio de cultivo sólido con xilana.....	23
6.4	Determinación del índice xilanolítico (IX).....	23-24
6.5	Análisis de correspondencia.....	24
6.6	Identificación molecular del aislado fúngico.....	24
6.6.1	Extracción del DNA genómico.....	24-25

6.6.2	Amplificación de la región de los espaciadores transcritos internos (ITS).....	25-26
6.7	Curso temporal de la actividad xilanolítica en cultivo líquido.....	26
6.8	Actividad xilanolítica.....	26-27
6.9	Cuantificación de proteína.....	27
6.10	Electroforesis SDS-PAGE.....	27
6.10.1	Zimograma.....	27
6.10.2	Tinción con plata.....	28
7	Discusión	29
7.1	Selección del aislado fúngico con el mayor IX.....	29-30
7.2	Análisis de correspondencia.....	30
7.3	Identificación molecular del aislado fúngico.....	30-32
7.4	Curso temporal de la actividad xilanolítica en cultivo líquido.....	32-33
7.5	Electroforesis SDS-PAGE.....	33
7.5.1	Zimograma.....	33
8.	Conclusión	34
9.	Bibliografías	35-38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Pared celular (a), microscopía electrónica de transmisión de la pared celular en células de tejidos rígidos (b), pared celular de una célula vegetal en crecimiento (c) (tomado de Cuervo <i>et al.</i> , 2009).....	3
2	Estructura química de una molécula de xilana y sus ramificaciones (modificada de Polizeli <i>et al.</i> , 2005).....	7
3	Enzimas necesarias para la degradación de la xilana y sitios de acción (tomado de Collins <i>et al.</i> , 2005).....	9

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Tipos de hemicelulosas (tomado de Kacuráková <i>et al.</i> , 2000).....	5-6
2 Revisión de microorganismos productores de xilanasas (modificado de Motta <i>et al.</i> , 2013).....	14
3 Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la identificación del aislado fúngico seleccionado.....	25
4 Composición del gel de poliacrilamida.....	27

1.- INTRODUCCIÓN

Desde 1950, la importancia de las enzimas xilanolíticas aumentó en diferentes industrias, tales como en la producción de alimentos, industria textil y papelera, agricultura e investigación, debido a las ventajas que presentan en la optimización de procesos, en respuesta a la demanda creciente de estas enzimas, se ha impulsado la investigación y el estudio de diferentes microorganismos lignocelulolíticos (Bhat, 2000).

Desde el punto de vista industrial, los hongos filamentosos son organismos de primera selección en la producción de xilanasas, debido a un extraordinario sistema de secreción proteico y en la liberación extracelular de enzimas (Chidi *et al.*, 2008). Los hongos filamentosos son la fuente principal de producción de xilanasas, debido a su fácil manejo y bajo costo económico de manipulación (Kheng *et al.*, 2005).

Debido a ello, el propósito de esta investigación fue determinar la actividad enzimática de enzimas xilanolíticas de una colección de 103 aislados fúngicos obtenidos de diferentes ecosistemas en medio sólido así como su identificación molecular, una vez identificado el hongo con mayor actividad xilanolítica en medio sólido, se estudió su producción de xilanasas extracelulares en fermentación líquida y se utilizó una técnica electroforética para obtener un zimograma y observar claramente la actividad enzimática.

2.- MARCO TEÓRICO

2.1.- LA PARED CELULAR VEGETAL

La pared celular se localiza en la zona exterior, en contacto íntimo con la membrana plasmática. Su función es proporcionar rigidez, soporte estructural y mecánico a las células, determina la morfología y el crecimiento celular, y por tanto, en última instancia, la arquitectura de la planta. Además, la pared celular previene la excesiva expansión de la célula y es el compartimiento celular que media todas las relaciones de la célula vegetal con el entorno (Dieter, 2002).

2.2.- ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA PARED CELULAR

La pared celular vegetal se estructura en tres partes fundamentales.

2.2.1.- Lámina media: es la primera capa que se deposita durante la división celular vegetal, y una vez completada ésta, queda localizada entre las paredes primarias de las células resultantes. Está formada principalmente por sustancias pécticas que cementan las paredes primarias de células adyacentes manteniendo la unión entre éstas (Heredia *et al.*, 1995).

2.2.2.- Pared primaria: está presente en todas las células vegetales y es producto de la acumulación de microfibrillas de celulosa, orientadas en diversas direcciones, las cuales forman una red relativamente laxa que permite el crecimiento celular. En la pared primaria es dominante la matriz amorfa, formada por hemicelulosas y polisacáridos no celulósicos (Goodwin, 1990).

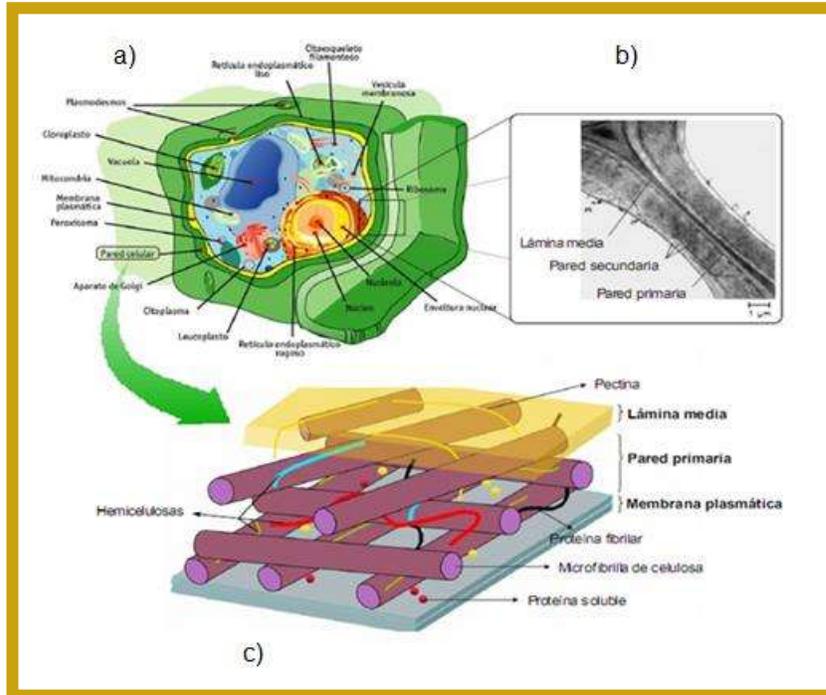


Figura 1. Pared celular (a), microscopía electrónica de transmisión de la pared celular en células de tejidos rígidos (b), pared celular de una célula vegetal en crecimiento (c) (tomado de Cuervo *et al.*, 2009).

2.2.3.- Pared secundaria: cuando existe, es la capa más adyacente a la membrana plasmática. Se forma en algunos tipos de células vegetales una vez que se ha detenido el crecimiento celular, y generalmente está formada por tres subcapas: S1 (la más externa), S2 y S3 (las internas). A diferencia de la pared primaria, la pared secundaria contiene una mayor proporción de celulosa, una baja cantidad de hemicelulosas y, en algunos tipos celulares (como las fibras de xilema y las traqueidas), lignina y/o ceras (suberina y cutina). Esta composición da como resultado una estructura más gruesa y compacta que la pared primaria, con una mayor rigidez y resistencia (Goodwin, 1990).

2.3.- COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA PARED CELULAR

La pared celular vegetal es una red compleja altamente organizada, formada por microfibrillas de celulosa, unidas entre sí por hemicelulosas, embebidas en una matriz gelatinosa de sustancias pécticas, y reforzada por glicoproteínas estructurales y, en ocasiones, por compuestos aromáticos como la lignina, que en conjunto constituyen la lignocelulosa (Wong *et al.*, 1988; Heredia *et al.*, 1995).

2.3.1- Celulosa

Es el componente más abundante de la biomasa vegetal y se considera el biopolímero más abundante de la tierra (Saxena, 2005). Se encuentra formando parte de la fase microfibrilar de la pared vegetal (altamente cristalina), la cual, además de celulosa, puede contener microfibrillas de mananas o de xilanas. Las cadenas de celulosa se encuentran asociadas entre sí de manera intramolecular e intermolecularmente mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, lo que da lugar a una estructura fibrilar rígida, insoluble y cristalina denominada microfibrilla. Cada microfibrilla de celulosa está formada por unas 36 cadenas de celulosa y su diámetro es de unos 3 nm (Lerouxel *et al.*, 2006).

2.3.2.- Pectinas

Las pectinas o polisacáridos pécticos son una mezcla compleja de heteropolímeros ácidos y neutros, que se caracterizan por su capacidad para formar geles. Forman parte de la matriz amorfa de la pared celular y actúan como lubricantes y cementantes tanto en la pared primaria como en la lámina media (donde se encuentran en mayor concentración). A diferencia de las hemicelulosas, pueden extraerse de la pared celular mediante métodos en condiciones relativamente suaves, como tratamientos con agua caliente, con agentes quelantes, como el EDTA o con ácidos diluidos. Entre las pectinas se encuentran la galacturonana, la ramnogalacturonana II, la galactana, la arabinogalactana y la arabinana (Heredia, 1995; De Vries y Visser, 2001).

2.3.3.- Lignina

Es un polímero heterogéneo formado por fenilpropanoides (alcoholes fenólicos) unidos entre sí por enlaces éter (C-O-C) o enlaces carbono-carbono (C-C). Los fenilpropanoides que forman la lignina son los alcoholes *p*-cumarílico (*p*-hidroxifenil propanol), coniferílico (guaiaquil propanol) y sinapílico (siringil propanol). Su proporción en la lignina depende del tipo celular y de la especie vegetal. La lignina es la sustancia más abundante en la matriz amorfa de la pared de las plantas leñosas, encontrándose sobre todo en la lámina media y en la pared secundaria. Debido a su

carácter hidrofóbico, desplaza al agua de las paredes celulares secundarias, dando lugar a una red hidrofóbica tridimensional que interacciona con los demás componentes de la pared y los mantiene unidos, aumentando de esta manera la rigidez de la pared y su resistencia frente a la degradación química y biológica (Anaya *et al.*, 2008).

2.3.4.- Hemicelulosas

Son polisacáridos heterogéneos, neutros, que presentan una cadena principal con ramificaciones cortas. Representan normalmente el 20-35% del peso seco de la pared celular vegetal, donde, junto con la pectina, la lignina y las proteínas, constituyen la matriz amorfa de la pared celular, dentro de la cual se encuentra embebida la fase microfibrilar cristalina. La hemicelulosa más abundante en los cereales y las maderas duras (angiospermas) es la xilana, mientras que en las maderas blandas (gimnospermas) es el galactoglucomanano, otras hemicelulosas frecuentes en vegetales son la xiloglucana, la galactomanana, la glucomanana, la manana pura y la calosa (De Vries y Visser, 2001).

Cuadro 1. Tipos de hemicelulosas (tomado de Kacuráková *et al.*, 2000).

Xilana	Cadenas de xilosa β (1-4) con cadenas laterales cortas de otros azúcares a la cadena principal mediante el C2 y el C3 de las xilosas.
Manana pura	Polímero no ramificado de manosa β (1-4). Muy compacto debido a la presencia de numerosos puentes de hidrógeno intramoleculares.
Glucomanana	Cadenas de manosa β (1-4) que contienen residuos de glucosa. La relación manosa: glucosa es de 3:1
Galactomanana	Cadenas de manosa β (1-4) con cadenas laterales de residuos de

	galactosa simples unidos por enlaces α (1-6) a los residuos de manosa de la cadena principal.
Galactoglucomanana	Como el glucomanano, pero con cadenas laterales de residuos de galactosa simples unidos por enlaces α (1-6) a los residuos de glucosa o manosa de la cadena principal.
Xiloglucana	Cadenas de glucosa β (1-4) con cadenas laterales cortas de xilosa unidas por enlaces α (1-6) a los residuos de glucosa de la cadena principal.
Calosa	Polimero no ramificado de glucosa β (1-3).

2.4.- XILANA

Es el polisacárido más abundante en la naturaleza, después de la celulosa (Collins *et al.*, 2005). Forma parte de las hemicelulosas presentes en la matriz amorfa de la pared celular secundaria de los tejidos lignificados de las plantas leñosas, aunque también se puede encontrar en la matriz de paredes primarias de células en crecimiento y de semillas y bulbos, donde tiene una función de reserva. En las maderas duras (angiospermas), representa un 15-30% del peso seco de la pared vegetal y es menos abundante en el caso de las maderas blandas (gimnospermas), donde representa un 7-12% del peso seco. Su función parece ser básicamente estructural, ya que mantiene la integridad de la pared celular junto con otras hemicelulosas, la celulosa, las pectinas y la lignina. Además, junto con la lignina, ayuda a proteger las microfibrillas de celulosa de la biodegradación (Wong *et al.*, 1988).

La xilana está formada por un esqueleto de moléculas de β -D-xilopiranosas y puede tener diferente grado de polimerización, siendo mayor en el caso de las maderas duras (150—200 residuos de D-xilosa) que en maderas blandas (70—130 residuos). Normalmente la cadena de β -D-xilopiranosas presenta ramificaciones laterales de diferente naturaleza, aunque en algunas plantas terrestres y algas se han encontrado homoxilanas formadas exclusivamente por D-xilosa. Lo más común es que la xilana se encuentre en forma de heteropolisacárido. El número y la naturaleza de estas ramificaciones laterales dependen de la especie vegetal y del tipo de tejido, siendo las más comunes aquellas formadas por ácido 4-O-metil- α -D-glucurónico, α -L-arabinosa, ácido *p*-cumárico, grupo acetilo, β -D-xilopiranosas, ácido α -D-glucurónico y ácido ferúlico (Beg *et al.*, 2001).

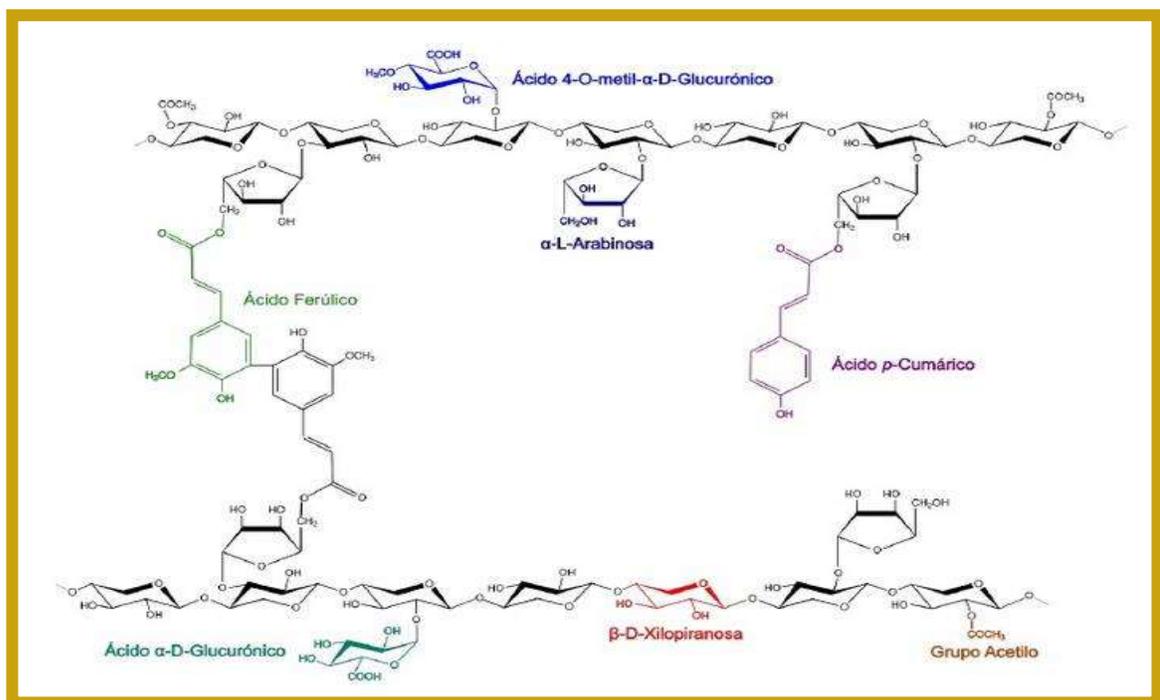


Figura 2. Estructura química de una molécula de xilana y sus ramificaciones (modificada de Polizeli *et al.*, 2005).

En función de las ramificaciones laterales podemos clasificar a las xilanas en cuatro familias principales (Da Silva *et al.*, 2005):

- a. **Arabinoxilanas:** se denomina así a las xilanas de plantas herbáceas, debido a la gran cantidad de residuos laterales de α -L-arabinofuranosa. Además presentan grupos laterales acetilo, de ácido glucurónico y de ácido ferúlico y *p*-cumárico.
- b. **Glucuronoxilanas:** son las xilanas de maderas duras, que poseen cadenas laterales de ácido α -D-glucurónico y/o ácido 4-O-metil- α -D-glucurónico, además de grupos O-acetilo.
- c. **Glucuronoarabinoxilanas:** son xilanas de maderas blandas, denominadas así por presentar cadenas laterales de α -L-arabinofuranosa, ácido α -D-glucurónico y/o ácido 4-O-metil- α -D-glucurónico y ácidos ferúlico y cumárico.
- d. **Homoxilanas lineales:** no presentan ramificaciones en las cadenas de β -D-xilopiranosas. Sólo se han encontrado en fibra, en el tallo del tabaco, y en algunas algas.

La xilana se encuentra unida a otros componentes de la pared celular, donde actúa como nexo de unión entre lignina y el resto de polímeros de la pared secundaria de las plantas. Puede unirse a la celulosa y a otras cadenas de xilana y hemicelulosa mediante enlaces covalentes y no covalentes (puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals). También, se une a la lignina mediante enlaces covalentes, que pueden ser enlaces éter entre la lignina y los ácidos cumárico y ferúlico esterificados a residuos de arabinosa (arabinoxilanas y glucuronoarabinoxilanas) y enlaces éster entre la lignina y el ácido 4-O-metil glucurónico (glucuronoxilanas y glucuronoarabinoxilanas). Las cadenas de arabinoxilanas y glucuronoarabinoxilanas además pueden unirse entre ellas y con otras hemicelulosas y lignina a través de la formación de diferulatos, es un enlace covalente entre dos residuos de ácido ferúlico (Wong *et al.*, 1988).

2.4.1.- ENZIMAS DEGRADADORAS DE LA XILANA

La capacidad de degradar la xilana está ampliamente distribuida entre los microorganismos saprófitos, tanto bacterias como hongos. Estos microorganismos poseen complejos sistemas enzimáticos para llevar a cabo la degradación de la xilana. La necesidad de un conjunto amplio de diferentes enzimas, cada una con una función

definida y determinada, para la completa degradación de la xilana, se debe a su heterogeneidad y elevada complejidad estructural. Las enzimas degradadoras de la xilana se clasifican en dos grupos principales.

2.4.1.1.- Enzimas implicadas en la despolimerización del esqueleto principal de xilosas: Endoxilanasas (β -1,4-D-xilan-xilanhidrolasas) y β -xilosidasas (β -1,4-D-xilan-xilohidrolasas).

2.4.1.2.- Enzimas encargadas de la eliminación de las cadenas laterales de la xilana, llamadas también accesorias o desramificantes: α -L-arabinofuranosidasas, α -D-glucuronidasas, acetilxilana esterasas, y ferúlico y *p*-cúmarico esterasas (hidroxicinámico esterasas).

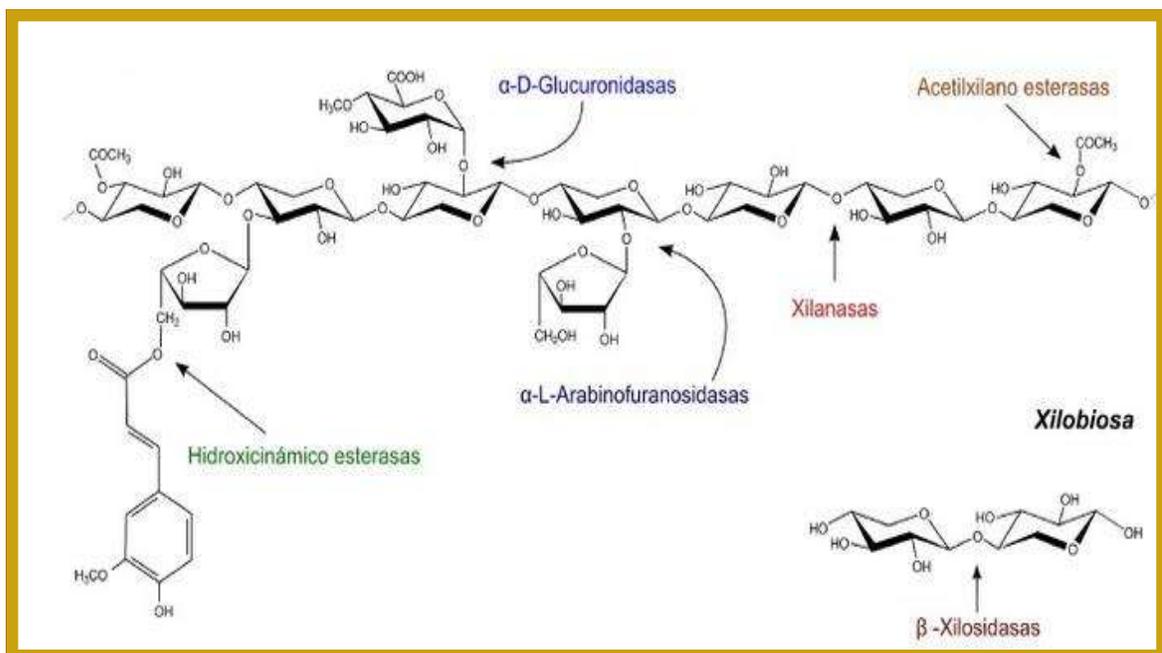


Figura 3. Enzimas necesarias para la degradación de la xilana y sitios de acción (tomado de Collins *et al.*, 2005).

Las endoxilanasas o xilanasas (endo- β -1,4-xilanasas; EC 3.2.1.2.8) son las enzimas que actúan sobre la cadena principal de xilana hidrolizando los enlaces internos β (1-4) entre moléculas de xilosa, dando lugar a una mezcla de xilooligosacáridos de diferente grado de polimerización, siendo más activas cuanto mayor es el grado de polimerización, pero no hidrolizan la xilobiosas, lo que permite distinguirlas claramente

de las β -xilosidasas. Las xilanasas son las principales enzimas implicadas en la degradación de la xilana (Bastawde, 1992).

2.4.2.- β -xilosidasas

Las β -1,4-xilosidasas (EC 3.2.1.37) son enzimas que actúan sobre xilobiosa y xilooligosacáridos cortos no sustituidos, hidrolizan los enlaces β -(1 \rightarrow 4) y liberan residuos de D-xilosa a partir del extremo no reductor de estos sustratos. La afinidad de las β -xilosidasas por los xilooligosacáridos disminuye al aumentar el grado de polimerización de éstos, no son activas sobre la xilana polimérica. Las β -xilosidasas complementan la acción degradadora de las endoxilanasas al romper los xilooligómeros que éstas últimas generan a partir de xilana. Ya que, los oligosacáridos pueden penetrar dentro de la célula, las β -xilosidasas suelen ser enzimas intracelulares, aunque también las hay extracelulares. Muchas β -xilosidasas disponen además de actividad de transferasa o transxilosidasa, por lo que pueden generar productos de mayor tamaño que los oligosacáridos iniciales, lo cual, las hace de interés para su utilización en biosíntesis de oligosacáridos. El mecanismo catalítico utilizado por estas enzimas puede ser de inversión o de retención de la configuración anomérica. En este último caso, para la hidrólisis del sustrato se produce un doble desplazamiento, lo que permite a algunas enzimas que usan este mecanismo de retención catalizar reacciones de transglicosilación (De Vries y Visser, 2001). Las β -xilosidasas suelen ser de gran peso molecular (360 kDa) y pueden estar formadas por dos o más subunidades (Coughlan, 1993)

2.4.3.- Esterasas

Actúan hidrolizando los enlaces éster presentes en el polímero de xilana. Las acetilxilan esterazas (EC 3.1.1.72) hidrolizan los enlaces que unen grupos acetilo a residuos de xilosa del esqueleto principal de xilana. La degradación completa de xilana requiere necesariamente de este tipo de enzimas, puesto que su acción permite la accesibilidad de otras enzimas a la pared celular, así como al esqueleto de xilana. Las ferúlico y *p*-cumárico esterazas, también denominadas en conjunto como hidroxicinámico esterazas, actúan sobre los enlaces que unen residuos laterales de

arabinosa a ácido ferúlico y cumárico, respectivamente. Permiten de esta manera romper uniones entre cadenas de xilana y lignina (Coughlan *et al.*, 1993).

2.4.3.- α -L-arabinofuranosidasas

Estas enzimas (EC 3.2.1.55) liberan las moléculas de L-arabinosa unidas por enlaces α -(1,2) o α -(1,3) a las cadenas de xilana o a otros polisacáridos que contienen arabinosa. Con esta ruptura permiten la creación de zonas no ramificadas susceptibles de ser atacadas por endoxilanasas, existiendo un importante sinergismo entre estas enzimas. La especificidad por sustrato y el tipo de enlace que hidrolizan varía mucho de una α -L-arabinofuranosidasa a otra, estas características son específicas de cada enzima. Esto ocasiona que un mismo microorganismo pueda producir múltiples α -L-arabinofuranosidasas, cada una con diferentes propiedades físico-químicas (Saha, 2003).

2.4.4.- α -D-glucuronidasas

Las α -D-glucuronidasas (EC 3.2.1.131) eliminan los residuos laterales de ácido glucurónico y ácido 4-O-metil glucurónico, pero generalmente sólo a partir de xilooligómeros sustituidos, disminuyendo su actividad inversamente proporcional al grado de polimerización de estos xilooligosacáridos, por lo que suelen requerir de la acción de endoxilanasas que proporcionan xilooligómeros sustituidos del tamaño adecuado a partir de la xilana. Con frecuencia, entre éstas enzimas existen relaciones de sinergismo, de modo que las enzimas no ramificadas permiten una mayor accesibilidad de las xilanasas al esqueleto principal de D-xilosa, y a su vez, estas enzimas accesorias liberan los sustituyentes laterales más fácilmente a partir de fragmentos de xilana y no a partir de la xilana polimérica. De esta manera, se ha visto que existe sinergismo entre xilanasas, enzimas desramificadoras y β -xilosidasas (Coughlan *et al.*, 1993; De Vries *et al.*, 2001).

Cabe mencionar que se ha descrito un tipo de xilanasas con un modo de acción tipo exo, que se han denominado "exoxilanasas". Estas enzimas catalizan la hidrólisis de la molécula de xilana a partir de un extremo (y no en el interior de la molécula, como sucede con las endoxilanasas), generándose un solo tipo de xilooligosacáridos como

producto de la hidrólisis de la xilana. Este modo de acción equivale a la degradación progresiva de celulosa por las exocelulasas. Sin embargo, no se ha admitido la existencia de auténticas exoxilanasas debido a que un mecanismo catalítico de este tipo requiere en primer lugar la eliminación de todos los sustituyentes laterales de la cadena de xilosas. Por ello, el uso del término “exoxilanasas” no es aceptado formalmente (Sánchez *et al.*, 2003).

En los microbios xilanolíticos hay una gran multiplicidad de xilanasas. Varios genes distintos que además cada uno de ellos puede dar lugar a diferentes xilanasas en función del procesamiento post-transcripcional y post-traducciona, que difieren en su especificidad respecto a la xilana. Esta gran diversidad de xilanasas está relacionada con el hecho de que la xilana es un polímero complejo y se requiere de xilanasas distintas para degradar las diferentes regiones de la xilana y las diferentes xilanas (Wong *et al.*, 1988).

2.5.- CLASIFICACIÓN Y MODO DE ACCIÓN DE LAS XILANASAS

Las xilanasas, como miembros de las glucósido hidrolasas, catalizan la hidrólisis del enlace glicosídico (β -1, 4) de xilósidos. Las xilanasas se han clasificado en al menos tres maneras: basándose en el peso molecular y punto isoeléctrico, la estructura cristalina y propiedades cinéticas, o la especificidad por el sustrato y el perfil de productos de hidrólisis. La primera clasificación no es suficiente para clasificar a todas las xilanasas, ya que se han encontrado varias excepciones, no todas las xilanasas tienen peso molecular grande (por encima de 30 kDa) y bajo punto isoeléctrico o un peso molecular pequeño (menos de 30 kDa) y alto punto isoeléctrico. Por lo tanto, se introdujo un sistema más completo, basado en la estructura primaria y la comparación de los dominios catalíticos, al analizar tanto características estructurales como mecanísticas (Motta, *et al.*, 2013).

Las xilanasas (EC3.2.1.8) pertenecen a las familias de las glucósido hidrolasas (GH) 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51 y 62. Sin embargo, las secuencias clasificadas en las familias 16, 51 y 62 parecen ser enzimas bifuncionales que contienen dos dominios catalíticos, a diferencia de las familias 5, 7, 8, 10, 11 y 43, que tienen un

dominio catalítico completamente distinto a los dominios con actividad de endo β -1,4-xilanasa (Motta, *et al.*, 2013).

2.5.- MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE XILANASAS

Los microorganismos, en particular los hongos, han sido considerados como una fuente de enzimas útil debido a que se multiplican a tasas extremadamente aceleradas y sintetizan productos biológicamente activos que pueden ser controlados por los seres humanos. Estas enzimas ofrecen ventajas sobre el uso de catalizadores químicos convencionales por numerosas razones: presentan una excelente actividad catalítica y un grado único de especificidad por el sustrato, pueden producirse en grandes cantidades, son rápidamente biodegradables, no representan una amenaza para el medio ambiente y son económicamente viables (Dashtban *et al.*, 2009).

Las xilanasas microbianas son los catalizadores preferidos para la hidrólisis de la xilana, debido a su especificidad, a las condiciones suaves de reacción, a la pérdida insignificante de sustrato y a que no generan productos secundarios. Los nichos ecológicos de estos microorganismos son extensos y normalmente incluyen entornos en donde los materiales vegetales se acumulan y deterioran (Belien *et al.*, 2006).

Microorganismos que hidrolizan fácilmente xilanas mediante la síntesis de 1,4- β -D endoxilanasas (EC 3.2.18) y β -xilosidasas (EC 3.2.1.37) se han reportado. El cuadro 2 presenta un listado de algunos de los microorganismos que producen xilanasa y sus condiciones óptimas de catálisis y el medio de crecimiento. La producción de xilanasas debe mejorarse mediante la búsqueda de cepas fúngicas o bacterianas más potentes o mediante la inducción de cepas mutantes para secretar mayores cantidades de enzimas. Por otra parte, el nivel de producción de las enzimas microbianas está influenciado por una variedad de factores nutricionales y fisiológicos, tales como el suministro de carbono y nitrógeno, las circunstancias físicas y las condiciones químicas.

En particular, los hongos filamentosos son productores interesantes de xilanasas y otras enzimas degradadoras de xilana, ya que secretan las enzimas en el medio y sus

niveles de actividad son elevados comparados con levaduras y bacterias. Los géneros de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aureobasidium*, *Chaetomium*, *Phanerochaete*, *Rhizomucor* y *Talaromyces* se consideran buenos productores de xilanasas (Kheng *et al.*, 2005). Se ha demostrado que los hongos de podredumbre blanca también producen xilanasas extracelulares que actúan sobre una amplia gama de materiales hemicelulósicos (Motta *et al.*, 2013). Sin embargo, las xilanasas son producidas a escala industrial principalmente por *Aspergillus* y *Trichoderma* (Ahmed *et al.*, 2009).

Cuadro 2. Revisión de microorganismos productores de xilanasas (modificado de Motta *et al.*, 2013).

Microorganismos	Xilanasas	Condición	Medio
<i>Penicillium canescens</i>	18.895 IU/g	pH 7.0; 30°C	Aceite de soja y peptona de caseína
<i>Streptomyces sp. P12-137</i>	27.8 IU/mL	pH 7.2; 28°C	Salvado de trigo y KNO ₃
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	8.237 IU/g	pH 6.0; 40°C	Mazorca de maíz y salvado de trigo y (NH ₄) ₂ SO ₄
<i>Penicillium fellutanum</i>	39.7 IU/mL	30°C	Xilana de avena, urea, peptona y extracto de levadura
<i>Penicillium clerotiorum</i>	7.5 IU/mL	pH 6.5; 30°C	Salvado de trigo
<i>Acremonium furcatum</i>	33.1 IU/mL	30°C	Xilana de avena, urea peptona y extracto de levadura
<i>Aspergillus niger</i> PPI	16.0 IU/mL	pH 5.0; 25 °C	Avena y urea
<i>Neocallimastix sp. cepa L1</i>	1.13 IU/mL	50°C	Avicel (pH 10.5) de serva (Heidelberg, Alemania)
<i>Cochliobolus sativus Cs6</i>	1,464.4 IU/mL	pH 4.5 ; 30 °C	Paja de trigo y NaNO ₃
<i>Bacillys circulans D1</i>	8.41 IU/MI	pH 9.0; 45 °C	Hidrolizados de bagazo
<i>Streptomyces sp. cepa Ib 24 D</i>	1,447.01 IU/mL	pH 7.5; 28 °C	Tomate orujo
<i>Paecilomyces themophila J18</i>	18,580.01 IU/g	pH 6.9; 50°C	Paja de trigo y extracto de levadura

2.6.- MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE XILANASAS

Los hongos filamentosos son buenos productores de xilanasas desde el punto de vista industrial. Son capaces de producir altos niveles de enzimas extracelulares y pueden ser cultivadas muy fácilmente muchas veces la razón es que no son patógenos (Simoes *et al.*, 2009). Las xilanasas fúngicas generalmente se producen por fermentación en estado sólido y líquido (Suprabha *et al.*, 2008). En la mayoría de las investigaciones sobre producción de xilanasas se ha utilizado la fermentación sumergida (Gaurav *et al.*, 2010).

Las enzimas extracelulares tienen ventajas desde el punto de vista industrial, ya que facilitan el procedimiento de extracción. Una producción considerable de xilanasas se realiza con sistemas de fermentación líquida. La fermentación en estado sólido es más económica debido principalmente a la disponibilidad y abundancia de desechos agrícolas que pueden ser utilizados como sustratos. La fermentación en sistema sólido ofrece ventajas sobre la fermentación líquida, que incluye la economía de espacio necesario para la fermentación, sin necesidad de maquinaria, equipos y un control complejo, una mayor capacidad del recipiente de fermentación debido a un volumen menor de agua, mayor rendimiento del producto, reducción de la demanda de energía y un inferior capital en los gastos recurrentes en la operación industrial, fácil escalamiento, menor volumen de disolvente necesario para la recuperación del producto y rendimientos superiores, ausencia de formación de espuma, y un control fácil de los contaminantes debido al bajo nivel de humedad en el sistema de fermentación (Kheng *et al.*, 2005).

2.7.- APLICACIONES INDUSTRIALES DE LAS XILANASAS

Los productos finales de la degradación de xilana son de considerable importancia comercial, como el furfural y el xilitol. La xilana se puede convertir en β -D-xilopiranosido y sus oligosacáridos a través de dos tipos de hidrólisis: ácida o enzimática. A menudo, la hidrólisis ácida se prefiere porque es más rápida, pero se acompaña de la formación de sustancias tóxicas, compuestos que pueden dificultar la posterior fermentación microbiana (Polizeli, *et al.*, 2005).

2.7.1.- XILANASAS EN LA ALIMENTACIÓN ANIMAL

El uso de enzimas en la producción de alimento para ganado es un importante sector de la agroindustria. Las xilanasas se utilizan en la alimentación animal junto con otras enzimas, ya que rompen las arabinoxilanas de los ingredientes del alimento y reducen la viscosidad de la materia prima. La arabinoxilanas que se encuentran en las paredes celulares de los cereales tiene un efecto anti-nutrientes en aves de corral. Cuando tales componentes están presentes en forma soluble, pueden aumentar la viscosidad del alimento ingerido, lo que interfiere con la movilidad y la absorción de otros componentes. Si se añaden enzimas xilanolíticas a un alimento que contiene maíz y sorgo, que es menos viscosidad, puede mejorar la digestión de los nutrientes en la parte inicial del tracto digestivo, lo que resulta en un mejor uso de la energía. La acción conjunta del resto de las enzimas produce una mezcla de alimentos más digestibles. Las jóvenes aves de corral y cerdos producen enzimas endógenas en menores cantidades que los adultos, por lo que los suplementos alimenticios que contengan enzimas exógenas deben mejorar su rendimiento. Por otra parte, este tipo de dieta se ha diseñado para reducir residuos no deseados en los excrementos (fósforo, nitrógeno, cobre y zinc), un efecto que podría reducir la contaminación del medio ambiente (Dhiman *et al.*, 2008).

2.7.2.- FABRICACIÓN DE PAN, ALIMENTOS Y BEBIDAS

Las xilanasas pueden emplearse en la fabricación de pan, junto con α -amilasa, amilasa de malteado, glucosa oxidasa y proteasas. Las xilanasas, al igual que las otras hemicelulasas, rompen la hemicelulosa en la harina de trigo, lo que ayuda en la redistribución de agua y deja la masa más suave y fácil de amasar. Durante el proceso de panificación, se retrasa la formación de la miga, lo que permite que la masa crezca. Con el uso de xilanasas, hay un aumento en el volumen del pan, mayor absorción de agua y mayor resistencia a la fermentación. Las industrias de jugo y el vino constituyen una buena parte del mercado de enzimas. La producción de frutas, hortalizas y jugos requiere métodos de extracción, limpieza y estabilización. Hoy en día, el uso de las xilanasas conducen a un rendimiento mejorado de jugo por medio de licuefacción de

frutas y hortalizas, la estabilización de la pulpa del fruto, lo que aumenta la recuperación de aromas, aceites esenciales, vitaminas, sales minerales, colorantes comestibles y pigmentos. Las xilanasas contribuyen a la reducción de la viscosidad, la hidrólisis de sustancias que impiden la limpieza física o química del jugo, o que puedan causar turbidez al concentrarse. Las xilanasas en combinación con endoglucanasas participan en la hidrólisis de arabinoxilana y almidón, mejoran la separación y aislamiento del gluten a partir del almidón en la harina de trigo. Esta enzima también se utiliza para eliminar el mucílago de grano de café. Las principales propiedades deseables de las xilanasas para su uso en la industria de los alimentos son la estabilidad y actividad óptima a un pH ácido. Con los avances en las técnicas de la biología molecular, se han descubierto otros usos de las xilanasas. Recientemente, una levadura recombinante de vino se construyó con el gen de una xilanasas de *Aspergillus nidulans*, *xlnA*, lo que dio como resultado un vino con un aroma más pronunciado que el tradicional. Durante la fabricación de la cerveza, la pared celular de la cebada se hidroliza al liberar largas cadenas de arabinoxilanas que aumentan la viscosidad de la cerveza. Por lo tanto, las xilanasas se utilizan para hidrolizar las arabinoxilanas y reducirlas a oligosacáridos, lo que disminuye la viscosidad de la cerveza y, por consiguiente elimina su aspecto turbio (Polizeli, *et al.*, 2005).

2.7.3.- APLICACIONES FARMACÉUTICAS Y QUÍMICAS

Las xilanasas y la xilana se utilizan poco en la industria farmacéutica. La xilanasas se añaden en combinación con complejos de enzimas (hemicelulasas, proteasas) como un suplemento dietético o para tratar la mala digestión, algunos medicamentos contienen estas enzimas en su formulación (Da Silva *et al.*, 2012).

Productos de hidrólisis de la xilana, tales como residuos de β -D-xilopiranosilo, se pueden convertir en combustibles líquidos (etanol), disolventes y edulcorantes artificiales bajos en calorías. Los primeros pasos son la designificación de material rico en hemicelulosas, seguido de hidrólisis por hemicelulasas, para producir azúcares tales como unidades de β -D-xilopiranosilo. A continuación, los productos se fermentan, principalmente por levaduras (*Pichia stipitis* y *Candida shehatae*), para producir xilitol o

etanol. Entre los azúcares utilizados en la producción de alcohol etílico, los residuos de β -D-xilopiranosilo representan entre el 5 y el 20%. El xilitol es un polialcohol con poder edulcorante comparable al de la sacarosa. Es un edulcorante no cariogénico, conveniente para los individuos diabéticos y obesos y recomendado para la prevención de la osteoporosis y las infecciones respiratorias, trastorno de metabolismo de los lípidos, lesiones renales y parenterales. Una variedad de productos comerciales que contienen xilitol, tales como la goma de mascar, se pueden encontrar en el mercado (Howard *et al.*, 2003).

Aunque la hidrólisis enzimática de la xilana es un método prometedor para la obtención de unidades de β -D-xilopiranosilo, en la actualidad el xilitol comercial se produce a gran escala mediante catálisis química. Es un proceso costoso, debido a que inicialmente la xilosa tiene que ser purificada en varios pasos. Además de esto, las reacciones químicas a menudo generan subproductos tóxicos de la fermentación y en la descomposición del material lignocelulósico pueden formarse subproductos que se derivan de la degradación de la glucosa (hidroximetilfurfural), xilosa (furfural) y lignina (compuestos y aldehídos aromáticos y fenólicos). Las sustancias liberadas de la estructura de lignocelulosa, tal como ácido acético y el material extraído (por ejemplo, terpenos y sus derivados, tropolones y compuestos fenólicos tales como flavonoides, estilbenos, quinonas, lignanos y taninos), o desde el equipo (hierro, cromo, níquel y cobre), pueden ser potentes inhibidores de la actividad microbiana. El desarrollo de una tecnología más apropiada para la producción de xilitol ha generado una gran expectativa en las industrias alimentaria, farmacéutica y odontológica (Da Silva *et al.*, 2012).

2.7.4.- TEXTILES

El complejo xilanólítico se puede utilizar en la industria textil para procesar fibras vegetales, tales como arpillera o lino. Para este propósito, la xilanasa debe estar libre de enzimas celulolíticas. Un ejemplo consiste en incubar la "ramee" seca (hierba China) con xilanasas para liberar intactas las fibras largas de celulosa. Después de usar este método, no hay necesidad de utilizar la fuerte etapa de blanqueo, ya que la lignina no

se somete a la oxidación, lo que llevaría al oscurecimiento de las fibras. Relativamente poca investigación se ha realizado sobre preparaciones enzimáticas para aplicarlas en fibras textiles, sin embargo, parece ser un mercado prometedor que demanda el desarrollo de nuevas técnicas (Polizeli, *et al.*, 2005).

2.7.5.- PULPA DE CELULOSA Y PAPEL

La principal aplicación industrial de las xilanasas es en el blanqueo de pasta de celulosa. Las enzimas comenzaron a utilizarse en este sector desde hace dos décadas, cuando las peroxidasas se aplicaron para degradar la lignina. En la actualidad, en muchos países se emplea el proceso químico en lugar de hidrólisis enzimática, para la fabricación de papel. Particularmente, tres especies de eucalipto (*Eucalyptus grandis*, *E. saligna* y *E. urophylla*) son utilizadas como materia prima (Howard *et al.*, 2003).

La utilización de xilanasas podría dar lugar a la sustitución de un porcentaje de dióxido de cloro por tonelada de pasta de papel Kraft y una reducción en el número de kappa, que es una medida del contenido de lignina en la pasta de celulosa. Las xilanasas empleadas en la tecnología del papel no necesitan estar purificadas, pero deben estar activas a altas temperaturas y pH alcalino, y no deben contener enzimas celulolíticas con el fin de preservar las fibras de celulosa. La eficiencia de las xilanasas microbianas en el proceso de blanqueo se ha estudiado en diversos microorganismos (Beg *et al.*, 2001).

3.- JUSTIFICACIÓN

En la diversidad microbiana, solo un pequeño porcentaje de los hongos existentes han sido estudiados. Es importante investigar y seleccionar hongos que produzcan complejos xilanolíticos con rendimiento significativo, debido a las aplicaciones industriales que poseen tanto la xilana como su complejo hidrolítico que generan un impacto positivo a nivel económico para su utilización en diversos sectores industriales así como en el medio ambiente.

4.- HIPÓTESIS

La actividad xilanolítica extracelular de hongos filamentosos aislados de diversos ecosistemas depende de su estilo de vida.

5.- OBJETIVOS

5.1.- General

Determinar la actividad xilanolítica extracelular de hongos filamentosos aislados de diferentes ecosistemas.

5.2.- Específicos

- 1.- Seleccionar el aislado fúngico con mayor actividad xilanolítica en cultivo sólido.
- 2.- Identificar molecularmente al aislado fúngico seleccionado.
- 3.- Estudiar la producción de xilanasas extracelulares del aislado fúngico seleccionado por fermentación en medio líquido.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.- Material biológico

Ciento tres hongos aislados de diferentes ecosistemas se utilizaron en este trabajo. Setenta y ocho pertenecen a ecosistemas hortícolas, diecisiete a ecosistemas frutícolas y ocho a ecosistemas boscosos. Una colección fúngica ubicada en el Laboratorio de Fisiología Celular del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

6.2.- Medio de propagación y mantenimiento

Los aislados fúngicos se sembraron en medio basal que está compuesto por 5 g de $C_4H_{12}N_2O_6$, 1 g de KH_2PO_4 , 0.5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g de extracto de levadura, 0.001 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, enriquecido con glucosa al 0.4 % (w/v) y solidificado con agar al 1.6 % (w/v), disueltos en 1 L de agua tridestilada y se ajustó a pH de 4.5 y se esterilizó en autoclave a 15 lb de presión durante 15 min y se vació en cajas Petri. Los medios se inocularon por duplicado con un propágulo de 5 x 5 mm a partir de placas con el hongo crecido previamente en PDA y se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente.

6.3.- Crecimiento en medio de cultivo sólido con xilana

Los aislados fúngicos, previamente crecidos en medio basal, se sembraron en medio con xilana al 4% (w/v) y 1.6% (w/v) de agar, con 3 propágulos de 5 x 5 mm, separados a la misma distancia en la superficie de la placa. Las placas se incubaron en oscuridad hasta observar crecimiento de las colonias de 2 cm de diámetro. Las placas se tiñeron con yodo (0.25 g de KI y 0.125 g de I_2 en 100 mL de H_2O tridestilada), se incubaron por 5 minutos en agitación constante y la solución se retiró de la superficie de la placa y ésta última se lavó con agua tridestilada para eliminar el exceso de tintura.

6.4.- Determinación del índice xilanolítico (IX)

Se tomaron fotografías a las colonias del hongo antes y después de teñirlas con yodo. El IX es igual al diámetro de degradación de la xilana entre el diámetro de las colonias,

los cuales se midieron mediante el uso del procesador de imágenes digitales Image J. Se obtuvieron 12 lecturas del IX por aislado fúngico.

$$IX = \frac{D_d}{D_c}$$

Dónde:

IX: índice xilanolítico

D_d: diámetro de degradación y

D_c: diámetro de crecimiento

6.5.- Análisis de correspondencia

Para determinar las relaciones de dependencia de las variables IX, tipo de ecosistema y velocidad de crecimiento, un análisis de correspondencia se realizó en el programa Statistica 8.

6.6.- Identificación molecular del aislado fúngico

6.6.1.- Extracción del DNA genómico

El micelio del aislado fúngico, crecido previamente por quince días sobre papel celofán colocado en la superficie de medio PDA se obtuvo, se colocó en un mortero con nitrógeno líquido, se trituró hasta obtener un polvo fino que se transfirió a un tubo eppendorf y se añadieron 600 µL de tampón de extracción de ADN y 5 µL de RNAasa, se mezcló y se incubó a 65 °C en baño de agua durante 15 minutos para después centrifugar a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se extrajo el sobrenadante y se añadió un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló y se centrifugó a 12,000 rpm durante 3 minutos para posteriormente extraer la fase superior, que se transfirió a un nuevo tubo. El paso anterior se repitió. El ADN aislado se precipitó con adición de 600 µL de isopropanol a 4 °C y se incubó a -80 °C por 10 minutos. El precipitado se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El sedimento se lavó dos veces con 1 mL etanol al 70 %

(v/v) a 4 °C y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos. El sedimento se resuspendió en 50 µL de buffer TE y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

6.6.2.- Amplificación de la región de los espaciadores transcritos internos (ITS)

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se basa en la generación de copias de las regiones o fragmento de ADN que nos interesan (ITS). Este proceso se denomina amplificación e incluye tres fases caracterizadas cada una de ellas por una temperatura determinada. La muestra se coloca en un termociclador, que sirve para cambiar la temperatura de manera precisa, en función de la fase de amplificación, estos cambios se repiten una y otra vez (ciclos de reacción) la primera fase es a 95°C (desnaturalización) durante la cual las dobles cadenas del ADN se desnaturalizan en forma de cadenas sencillas, después el termociclador ajusta la temperatura a 50°C (alineamiento), a esta temperatura se forman y se rompen constantemente los puentes de hidrógeno entre los oligonucleótidos y el ADN, y aquellas uniones más estables las complementarias son las que duran más tiempo. Los oligonucleótidos “alineados” forman una pequeña región de doble cadena y la polimerasa se une a este pequeño fragmento de ADN de doble cadena y comienza a copiar en sentido de 5´ a 3´, la temperatura aumenta a 72°C (extensión), ya que a esa temperatura la polimerasa alcanza su máxima actividad, y continúa la síntesis de los fragmentos de ADN a partir de los oligonucleótidos que ya se han alineado. Los ITS utilizados para la identificación del hongo fueron los que se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la identificación del aislado fúngico seleccionado.

Oligonucleótido	Secuencia	Posición
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	1761-1779
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	2390-2409

La muestra de la región genómica de ITS del hongo seleccionado se secuenció. El análisis de las secuencias obtenidas se realizó mediante el uso del programa MegaBLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Una búsqueda de las secuencias con el mayor porcentaje de identidad se realizó.

6.7.- Curso temporal de la actividad xilanolítica en cultivo líquido

Un volumen de 179 mL de agua tridestilada se mezcló con 1 g de xilana (beechwood xylan, Sigma), el pH se ajustó a 5.0 y la suspensión se esterilizó en autoclave a 15 Lb de presión por 15 minutos. A la suspensión con xilana se agregaron 20 mL de solución de microelementos previamente esterilizada por filtración al vacío con una membrana de 0.22 μm , cuya composición es: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.4 g, KH_2PO_4 , 2.0 g, urea, 0.1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g, CaCl_2 , 0.3 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5.0 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.56 mg, CoCl_2 , 2.0 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.4 mg y vitaminas (Sigma), disueltos en 1 L de agua tridestilada, finalmente, 1 mL de dextrosa al 0.02% (w/v) se adicionó al medio de cultivo para completar 100 mL.

El medio se inoculó con micelio del aislado fúngico seleccionado, previamente sembrado y crecido por catorce días sobre una membrana de papel celofán, colocados sobre la superficie de las placas de PDA. Los matraces inoculados se incubaron a 150 rpm de agitación durante quince días a temperatura ambiente. Muestreros de 1 mL se realizaron cada 24 h para determinar la actividad xilanolítica y la proteína extracelular.

6.8.- Actividad xilanolítica

La mezcla de reacción contuvo 580 μL de buffer de citrato de sodio 50 mM pH 5.0, 600 μL de xilana al 1% (w/v) y 20 μL de enzima (equivalente a 4-8 μg de proteína) del sobrenadante de la fermentación. La mezcla de reacción se incubó en baño de agua a 50 °C por 30 minutos. Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos para separar la xilana de los azúcares liberados, se extrajo 1 mL del sobrenadante y se agregó 1 mL DNS para detener la reacción, las muestras se sometieron a ebullición durante 15 minutos en baño de agua, los tubos se enfriaron en baño de agua fría. La

absorbencia de las muestras se leyó a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro marca CARY 50 BIO UV-VISIBLE.

6.9.- Cuantificación de proteína

La proteína extracelular se cuantificó por el método de Lowry (1951), albúmina de suero de bovino se utilizó como estándar y la absorbencia se leyó a 640 nm.

6.10.- Electroforesis SDS-PAGE

6.10.1.- Zimograma

Un gel discontinuo de poliacrilamida se preparó con las cantidades descritas en el cuadro.

Cuadro 4. Composición del gel de poliacrilamida.

Porcentaje del gel	Agua desionizada (mL)	Acilamida 30% (mL)	Buffer del gel (mL)	Xilana al 1% (w/v) (mL)	SDS al 10% (w/v) (mL)
4%	6.1	1.3	2.5	2.5	0.1
12%	3.2	4	2.5	2.5	0.1

La muestra se preparó al mezclar 45 μ L de extracto enzimático con 90 μ L de buffer Tris-HCl-SDS y 4.5 μ L de β -mercaptoetanol, que se hirvió por 4 minutos a 95 °C. La muestra se inyectó en el gel que posteriormente se colocó en la cámara de electroforesis, la cual se llenó con buffer Tris-glicina-SDS con 0.5 g de SDS, pH 8.3. La cámara se cerró y se sumergió en baño con hielo y los electrodos se conectaron a la fuente de poder, 112 V se aplicaron durante 1 h y 40 minutos.

El zimograma se enjuagó con agua desionizada por 3 veces y se incubó en rojo Congo al 0.1% (w/v) por 30 minutos. El exceso de colorante se eliminó al lavar con NaCl 1 M. El gel se incubó por 1.5 h en tritón X-100 al 2.5 % (v/v), tiempo en el cual se realizaron 4 lavados con tritón, luego se lavó de 9 a 10 veces con agua desionizada hasta eliminar exceso de espuma, se lavó 4 veces más con buffer de citrato de sodio 50 mM, pH 5.0 y se incubó en el mismo buffer a 50°C por 72 h.

6.10.2.- Tinción con plata

El gel se lavó en agua desionizada durante 30 minutos. Tiosulfato de sodio al 0.02% (0,04 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 100 ml de H_2O) se adicionó al gel por 1 minutos con agitación suave para aumentar la sensibilidad. El gel se lavó con agua desionizada 3 veces por 20 segundos. El gel se incubó durante 20 minutos en una solución de nitrato de plata al 0.1% (w/v) a 4° C (AgNO_3 0,2 g, 200 mL de H_2O), 0,02% de formaldehído (añadir 40 μL 35% de formaldehído justo antes de su uso). El gel se lavó con agua desionizada por 3 veces x 20 segundos y se volvió a adicionar una solución de nitrato de plata. El gel se lavó con agua desionizada durante 1 minuto. Carbonato de sodio al 3 % (3.0 g de Na_2CO_3 en 100 mL de H_2O) con formaldehído al 0,05% (50 μL de formaldehído al 35%) se adicionó al gel y la solución reveladora se reemplazó inmediatamente después de cambiar a color amarillo. El gel se lavó con agua desionizada durante 20 segundos. La tinción se detuvo en ácido acético al 5% durante 5 minutos. El gel se lavó nuevamente con agua por 3 veces durante 10 minutos para asegurar la eliminación completa del ácido acético.

7.- DISCUSIÓN

Aunque se ha reportado un gran número de bacterias, levaduras y hongos filamentosos productores de xilanasas (Cruz et al., 2009). Los hongos filamentosos han ganado importancia como productores de xilanasas por encima de levaduras y bacterias desde el punto de vista industrial, debido a su naturaleza no patógena, su fácil cultivo en condiciones de fermentación y debido a que son capaces de producir cantidades significativas de enzimas extracelulares (Sridevi et al., 2011). Por lo tanto, hemos decidido centrar nuestra atención en aquél aislado fúngico con mayor capacidad de producción de xilanasas.

7.1.- Selección del aislado fúngico con el mayor IX

Uno de los principales problemas para estudiar la capacidad de producción de xilanasas es el gran número de cepas y la falta de técnicas de evaluación rápidas y confiables. Por consiguiente, el método de detección en placas se utilizó para la detección y confirmación de la producción de xilanasas, que se trata de una práctica habitual en los procedimientos de selección. En nuestro estudio, la cepa que produjo una mayor zona de hidrólisis se seleccionó para estudios adicionales.

En esta investigación, el aislado fúngico 63, perteneciente a hortalizas de la región de Zacatecas, presentó un IX de 1.232 ± 0.023 mm, pero su crecimiento fue lento (0.644 ± 0.032 cm/día) comparado con los 20 hongos de mayor IX. El hongo filamentoso *Penicillium sp.* mostró un halo de degradación al utilizar xilana como fuente de carbono (Villalba et al., 2004). *Aspergillus niger* produjo una zona de hidrólisis naranja-rojizo en placas de agar suplementadas con xilana, después de la tinción con rojo Congo, con lo que se confirmó la producción de xilanasas por el hongo (Kavya et al., 2009; Padmavathi et al., 2011).

Los resultados de nuestro estudio mostraron una influencia significativa del ecosistema de los hongos (frutícola, hortícola y boscoso) sobre el IX. Esto puede deberse a la diferente capacidad de colonización en función del ecosistema de los hongos, que depende de la producción de enzimas xilanolíticas extracelulares, ya que el tipo y

contenido de hemicelulosa puede conducir a mecanismos diferentes de inducción de las xilanasas según Regalado *et al.*, 2011. Por lo tanto, con el fin de saber si existe correlación entre la producción de xilanasas, la velocidad de crecimiento y el ecosistema se realizó un análisis de correspondencia.

7.2.- Análisis de correspondencia

De acuerdo al análisis de correspondencia, los hongos muestran una distribución en función de las variables en el espacio bidimensional. Una densa población de hongos se localizó cerca de la variable EH, debido a que la mayoría pertenecen al ecosistema hortícola. Este mismo grupo de hongos se encuentra cerca del IX, mientras que los aislados de los ecosistemas boscoso y frutícola estuvieron más alejados de dicha variable. Este comportamiento puede deberse a que existe una gran diversidad de microorganismos conocidos por producir diferente tipos de xilanasas, entre ellos los hongos filamentosos, pero no todos con la capacidad de producir el complejo enzimático completo, que es necesario para la utilización eficiente de la xilana como fuente de carbono (Palaniswamy *et al.*, 2008). La habilidad de un hongo filamentosos para producir enzimas hidrolíticas extracelulares y degradar un determinado material lignocelulósico depende de su estilo de vida, si es fitopatógeno o saprófito (Regalado *et al.*, 2011).

7.3.- Identificación molecular del aislado fúngico

Los métodos moleculares se han convertido en herramientas importantes para el estudio de los hongos, la detección de ácidos nucleicos mediante PCR se ha convertido en una herramienta común para la identificación microbiana y el diagnóstico (Liu *et al.*, 2000). Sin embargo, un pre-requisito para realizar estos análisis es el aislamiento de ADN de buena calidad en forma eficiente y rápida, ya que se pueden presentar varios problemas en la extracción del ADN del hongo. Es necesario romper la pared celular sin llegar a dañar el ADN, eliminar contaminantes, especialmente los polisacáridos, incrementar el rendimiento, ya que la extracción de una cantidad insuficiente de ADN afecta directamente al resultado obtenido, lo que interfiere en la obtención de la información requerida, aunque en ocasiones se comience con una

muestra de volumen considerable. Uno de los objetivos ribosomal más comunes para la identificación de la secuencia es el espaciador interno transcrito (ITS), la región ITS puede ser amplificado a partir de un amplio espectro de hongos con cebadores SU - 1 y SU - 4 y, en general se puede recuperar en una única PCR, ya que el amplicón es por lo general ~ 400 a 700 pb de longitud la combinación de regiones conservadas y variables ofrece una gran flexibilidad para la sensibilidad de la PCR y la especificidad (Romanelli, et al., 2009). En el presente estudio, no tuvimos problemas de degradación o de contaminación al trabajar con tejido seco.

El aislado fúngico 63, que fue seleccionado por su habilidad para producir xilanasas extracelulares en medio sólido, fue identificado como *Fusarium tricinctum*. Este hongo filamentoso es reconocido por su filo Ascomycota (División Eumycota, Subdivisión Ascomycotina, Clase Pyrenom), presenta microconidias en conidióforos laterales, ovados o periformes, con un o ningún septo de 7-16 x 4.5-7.5 µm, con 1-2 fiálicas simples o ramificadas. Macroconidias formadas en esporodioquios y tienen forma de hoz, 3-5 septos y miden 26-53 x 3-4.8 µm. Sus principales huéspedes son Gramineas, plantera. (Melgarejo et al., 2010). *F. tricinctum*, ha sido reportado como productor de enniatins, antibióticos asociados con efectos fitotóxicos (Turner et al., 1998). *Fusarium tricinctum* no se relaciona con toxicosis en humanos ni en animales, aunque es capaz de producir varias toxinas (Savard y Blackwell, 1994, Desjardins, 2006). Se considera un patógeno débil de plantas, aunque varios estudios han informado de su alta prevalencia en la microbiota de granos de cereales en determinadas condiciones pero no con maíz (Kulik et al., 2010; Harrow et al., 2006).

Fusarium es un género cosmopolita de hongos ascomicetos filamentosos (Sordaryomicetes: Hypocreales: Nectriaceae) que incluye a muchos patógenos que producen toxinas de plantas de importancia agrícola. Las enfermedades de *Fusarium* incluyen marchites, tizones, pudriciones y chancros de muchos cultivos de hortalizas de campo, plantas ornamentales y forestales, tanto en ecosistemas naturales como zonas agrícolas. Un amplio análisis filogenético dio un grupo monofilético que abarca todas las especies de *Fusarium* económicamente importantes menos 9 de todas las especies monofiléticas consisten en un máximo de 60 especies como mínimo siete nombres

genéricos alternativos basados en las etapas sexuales están vinculados a *Fusarium* (por ejemplo, *Gibberella*, *Nectria* y *Neocosmospora*) el género incluye cerca de 300 especies filogenéticamente diagnosticables la mayoría de las cuales carecen de nombres formales la mayoría de los primeros divergentes linajes de *Fusarium* están asociados con las plantas leñosas como parásitos, endófitos o saprofitos (Li *et al.*, 2013).

En los ecosistemas hortícolas encontramos productos perecederos, susceptibles al ataque de microorganismos antes o después de la cosecha y durante su almacenamiento; tal es el caso de los hongos fitopatógenos, los cuales pueden provocar grandes pérdidas en la producción de hortalizas (Trigos *et al.*, 2008). Los patógenos del suelo causan infección en las raíces de plantas (enfermedades) que son un problema importante en todo el mundo en la producción de hortalizas. La producción intensiva de plantaciones sucesivas de cultivos vegetales susceptibles a menudo resulta en la acumulación de grupos de patógenos transportados por el suelo, por ejemplo, las especies de *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Sclerotinia*, son los patógenos del suelo más perjudiciales que afectan económicamente una amplia gama de cultivos de hortalizas (Mc Master *et al.*, 2013). Los hongos filamentosos aislados con más frecuencia de las hortalizas son *Fusarium*, *Aureobasidium*, *Alternaria*, *Epicoccum*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Phoma*, *Chaetomium* y en menor proporción *Aspergillus*, *Acremonium*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Sclerotium*, *Trichoderma* y *Ulocladium* (Carrillo *et al.*, 2007).

7.4.- Curso temporal de la actividad xilanolítica en cultivo líquido

En el primer día de fermentación se obtuvo una actividad específica máxima (0.08 U/ml), después de las 24 h del curso temporal la actividad descendió. Los resultados muestran que la producción de xilanasas en fermentación en medio líquido fue pequeña, pero se sabe que el tipo de sustrato, el grado de aireación, el pH y la temperatura durante la fermentación regulan la producción de enzimas (Suprabha *et al.*, 2008). El hongo *Chaetomium thermophilum* produjo una actividad de xilanasas (3.9 ± 0.02 U/ml), *Trichoderma harzianum* tuvo una menor secreción en fermentación líquida con xilana de madera de abedul como sustrato (Ahamed *et al.*, 2012). *Fusarium*

solani F7 (Cupta *et al.*, 2009), *Aspergillus awamori* (Lemos *et al.*, 2000), *Aspergillus flavus* MTCC 9390 (Bhushan *et al.*, 2012), *Trichoderma reesei*, *Phanerochaete chrysosporium* (Cristica *et al.*, 2012), *Thermomyces lanuginosus* (Khucharoenphaisan *et al.*, 2009), *Penicillium sclerotiorum* (Knob y Cano, 2008) y *Myrothecium roridum* (Oluwanisola *et al.*, 2010) son capaces de producir enzimas xilanasas en fermentación líquida. La producción de xilanasas por hongos filamentosos en fermentación líquida está influenciada por fuerzas hidrodinámicas, ya que al aumentar ocasionan una mayor homogeneidad de los nutrientes y favorecen la producción pues existe una mayor secreción de enzimas (García *et al.*, 2009). Las condiciones de cultivo afectan de manera significativa la producción de xilanasas (Ahamed *et al.*, 2009).

La diferencia que se encontró en la actividad enzimática en medio de cultivo sólido comparado con medio líquido se debe a la influencia que tiene el ecosistema del cual fue aislado ya que este hongo se obtuvo de un ecosistema hortícola, caracterizado por proporcionar sustratos sólidos con baja cantidad de humedad. La optimización de los procesos de fermentación mediante la modificación de la composición del medio utilizado en esta investigación mejoraría la producción de xilanasas por el hongo seleccionado, en un menor tiempo de fermentación y a un bajo costo, lo que resultaría atractivo para su utilización industrial.

7.5.- Electroforesis SDS-PAGE

7.5.1.- Zimograma

La actividad enzimática de *F. tricinctum* no fue visible en gel de poliacrilamida después de separar el extracto enzimático mediante electroforesis y realizar una tinción del gel con rojo Congo, lo cual concuerda con la escasa actividad xilanolítica observada durante la fermentación en medio líquido y con la pequeña cantidad de proteína extraída y concentrada a partir del sobrenadante de las fermentaciones. Es posible que la desnaturalización parcial de las enzimas, con SDS, β -mercaptoetanol y calor, antes de separarlas por electroforesis, haya ocasionado la pérdida irreversible de la actividad enzimática, por lo que se requieren ensayos adicionales bajo condiciones nativas para verificar esta hipótesis.

8.- CONCLUSIÓN

El aislado 63 presento el mejor índice xilanolítico y se identificó hasta el momento como del género *Fusarium tricinctum*.

9.- BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, S., Riaz S., Jamil A. (2009). Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. *Appl Microbiol Biotechnology*. 84:19–35.
- Ahmed, S., Sana, I. S., Jamil, S. (2012). Comparative study for the kinetics of extracellular xylanases from *Trichoderma harzianum* and *Chaetomium thermophilum*. *Electronic Journal of Biotechnology*. 0717-3458.
- Anaya, M. C., Balcázar, L. E., Dantan G., Mallol, F. J. (2008). Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 50:3-4.119-131.
- Bhat, M. K. y Hazlewood, G. P. (2000). Enzymology and Other Characteristics of Cellulases and Xylanases. *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. 11-50.
- Bastawde, K. B. (1992). Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 8. 353-368.
- Beg, Q. K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G. S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*. 56:326–338
- Belien, T., Campenhout, S. V., Acker, M. V., Robben J., Courtin, C. M., Delcour, J. A., Guido, V. (2007). Mutational Analysis of Endoxylanases XylA and XylB from the Phytopathogen *Fusarium graminearum* Reveals Comprehensive Insights into Their Inhibitor Insensitivity. *Applied and environmental microbiology*. 73:14. 4602–4608.
- Bhushan, B., Pal, A., Jain, V. (2012). Isolation, Screening and Optimized Production of Extracellular Xylanase under Submerged Condition from *Aspergillus Flavus* Mtcc 9390. *Enzyme Engineering*. 1:1. 1-6.
- Carrillo, L. y Audisio, M. C. (2007). Manual de Microbiología de los alimentos. Impreso por la Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNJU, SS Jujuy. 1ª edición. 71-82.
- Cristica, M., Barbanegra, T., Ciornea, E., Manoliu A. (2012). Influence of pH on β -xylanase activity in the filamentous fungi *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Lucrări Științifice*. 55:2. 321-325.
- Chidi, S. B., Godana B., Ncube I., Rensburg V. J. E., Cronshaw A., Abotsi K. E. (2008). Production, purification and characterization of cellulase-free xylanase from *Aspergillus terreus* UL 4209. *African Journal of Biotechnology*. 7:21. 3939-3948.
- Coughlan, M.P. y Hazlewood, G.P. (1993). β -1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 17: 259-289.
- Collins, T, Gerday, C, Feller, G. (2005) Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 29 (1). 3-23.

- Cuervo, L., Folch, J. L., Quiroz, R. E. (2009). Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol. *BioTecnología*.13:3. 11-25.
- Cruz, N., Castellanos, D., Arguello, H. (2009). Degradación de celulosa y xilano por microorganismos aislados de dos tipos de compost de residuos agrícolas en la Sabana de Bogotá. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 3:2. 237-249.
- Dashtban, M., Schraft, H., Qin, W. (2009). Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *International Journal of Biological Sciences*. 5:6.578-595.
- Da Silva, R., Lago, S. E., Merheb, C. W., Macchione, M. M., Park, Y. K., Gomes, E. (2005). Xylan, a Promising Hemicellulose for Pharmaceutical Use. *Brazilian Journal of Microbiology*. 36:235-241.
- De Vries, R.P. y Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65: 497-522.
- Dieter, R. W. (2002). Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*. 5:536–542.
- Dhiman, S. S., Sharma, J., Battan, B. (2008). Microbial xylanases. *Review BioResources* 3:4.1377-1402.
- García, S. M. L., Tauk, T. S. M., Tapia, T. D. M. (2009). Screening of culture condition for xylanase production by filamentous fungi. *African Journal of Biotechnology*. 8:22. 6317-6326.
- Gaurav, V., Rina D. y Kishore K. S. R. (2010). Thermostable xylanase production and partial purification by solid-state fermentation using agricultural waste wheat straw. *Mycology*. 1: 2: 106–112.
- Goodwin, T.W. y Mercer, E. I. (1990) The plant cell wall. In *Introduction to Plant Biochemistry*. pp. 55-91. Goodwin, T.W. y Mercer, E.I., Eds. Pergamon Press, Oxford. 55-91.
- Gupta, V. K., Gaur. R., Gautam, N., Kumar, P., Yadav, I. J., Darmwal, N. S. (2009). Optimization of food xylanase production for *fusarium solani* F7. *American Journal of food technology*. 4:1. 20-29.
- Howard, R.L., Abotsi, E., Jansen Van, R. E. L. and Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*. 2 :1. 602-619
- Heredia, A., Jiménez, A. y Guillén, R. (1995). Composition of plant cell wall. *Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und-Forschung*. 200: 24-31

- Kavya, V., Padmavathi, T. (2009). Optimization of growth conditions for xylanase production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. Polish Journal of Microbiology. 58:2.125-130.
- Kheng, p. y Ibrahim, C. (2005). Xylanase production by a local fungal isolate, *Aspergillus niger* USM AI 1 via solid state fermentation using palm kernel cake (PKC) as substrate. Songklanakarin J. Sci. Technol.27: 326-335.
- Khucharoenphaisan, K., Tokuyama, S., Ratanakhanokchai. K., Kitpreechavanich. V. (2009). A comparative study of *Thermomyces lanuginosus* strains on thermostable xylanase production. African Journal of Biotechnology. 8:8. 1608-1614.
- Knob, A., Cano, C. E. (2008). Xylanase Production by *Penicillium sclerotiorum* and its Characterization. World Applied Sciences Journal. 4:2.277-283.
- Kulik, T., Jestoi, M., Okorski, A. (2011). Development of TaqMan assay for the quantitative detection of *Fusarium avenaceum*/*Fusarium tricinctum* and *Fusarium poae esyn1* genotypes from cereal grain. FEMS Microbiol lett. 314. 49-56.
- Lemos, S. L. J., Bon, P. S. E., Santana, E. F. de M., Junior, P. P. (2000). Thermal stability of xylanases produced by *Aspergillus awamori*. Brazilian Journal of Microbiology. 31.206-211.
- Lerouxel, O., Cavalier, DM, Liepman, A. H. y Keegstra, K. (2006) Biosíntesis de célula vegetal.
- Liu, D., Coloe S., Baird, R., Pederson, J., (2000). Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. Journal of clinical Microbiology. 38:1.471.
- Li, J. M., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D. M., Manners, J. M., Kazan, K. (2013). *Fusarium Pathogenomics*. Rev. Microbiol. 67.399-416.
- Motta, F. L., Andrade, C. C. P., Santana A. H. M. (2013). A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications.
- Mc Master C. A., Plummer K. M., Porter I. J., Donald E. C., (2013). Antimicrobial activity of essential oils and pure oil compounds against soilborne pathogens of vegetables. Australasian Plant Pathology.
- Oluwanisola, O. W., Olabode, G. G., Adediran, O. A., Adeyinka, A. O., Abiola, O. S. (2010). Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by a phytopathogenic *Myrothecium roridum* and some avirulent fungal isolates from water hyacinth. African Journal of Biotechnology. 9:7. 1074-1078.
- Palaniswamy, M., Vaikuntavasan, B., Sathya, R., Angayarkanni, J. (2008). Isolation, identification and screening of potential xylanolytic enzyme from litter degrading fungi. African Journal of Biotechnology. 7:11. 1978-1982.

- Padmavathi, T., Kavya, V. (2011). Isolation, identification and optimization of xylanase enzyme produced by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. 1:4.137-147.
- Polizeli, M. L., Rizzatti, A. C., Monti, R. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 67: 577–591.
- Regalado, C., Obregón V. I., Almendárez G. E. B., Domínguez D. J., Barreyro A. A., Reyes A. A. (2011). Xylanolytic enzymes production by *Aspergillus niger* GS1 from solid-state fermentation on corn stover and their effect on ruminal digestibility. *Electronic Journal of Biotechnology*. 0717-3458.
- Romanelli, A. M., Sutton, D. A., Thompson, H.E. Rinaldi, G. M., Wickes, L. B. (2010). Sequence-Based identification of Filamentous Basidiomycetous fungi from Clinical Specimens: a Cautionary Note. *Journal of Clinical Microbiology*. 48.3. 741-752.
- Saha, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 30: 279-291.
- Saxena, I.M. y Brown, R.M. (2005). Cellulose biosynthesis: current views and evolving concepts. *Annals of Botany* 96: 9-21.
- Simoës, M. L, Tornisielo, T. S., Tapia, T, D. (2009). Screening of culture condition for xylanase production by filamentous fungi. *African Journal of Biotechnology*. 8:22. 6317-6326.
- Suprabha, G. N., Sindhu. R., Shankar, S. (2008). Fungal xylanase production under solid state and submerged fermentation conditions. *African Journal of Microbiology Research*.2: 082-086.
- Turner, A. S, Lees. A. K, Razanoor H. N., Nicholson P. (1998). Refinement of PCR-detection of *Fusarium avenaceum* and evidence from DNA marker studies for phonetic relatedness to *Fusarium tricinctum*. *Plant Pathology*. 47.278-288.
- Trigos, A., Ramirez, K., Salinas, A. (2008). Presencia de hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria. *Revista Mexicana de Micología*. 28: 125-129.
- Villalba, L. S., Mikán, J. F., Sánchez, J. (2004). Actividades hidrolíticas y caracterización isoenzimática de poblaciones microbianas aisladas del patrimonio documental del Archivo General de Colombia. *Nova- Publicación Científica*. 2:2. 1-108.
- Wong, K. Y, Tan, U. L, Saddlers, J. N., (1988). Multiplicity of 3-1,4-Xylanase in Microorganisms: Functions and Applications. *Microbiological reviews*. 52:3. 305-317.