

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



“Xilanasa de *Aspergillus oryzae* ATCC 14605 para la producción de Xilo-oligosacáridos (XOS)”

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera, como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

DANIELA ALEJANDRA TAPIA HENRÍQUEZ

TEMUCO-CHILE

2012

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



“Xilanasa de *Aspergillus oryzae* ATCC 14605 para la producción de Xilo-oligosacáridos (XOS)”

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera, como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

DANIELA ALEJANDRA TAPIA HENRÍQUEZ

PROFESOR GUÍA: CAROLINA MARÍA SHENE DE VIDTS

TEMUCO-CHILE

2012

“Xilanasa de *Aspergillus oryzae* ATCC 14605 para la producción de Xilo-oligosacáridos (XOS)”

PROFESOR GUÍA : _____
Dra. Carolina María Shene De Vidts
Ingeniero Civil Químico
Departamento de Ingeniería Química
Universidad de La Frontera.

PROFESOR CO-GUIAS : _____
Dra. Mariela Yanet Bustamante López
Ingeniero en Alimentos
Departamento de Ingeniería Química
Universidad de La Frontera.

CALIFICACION PROMEDIO TESIS: _____

RESUMEN

Los xilo-oligosacáridos (XOS) son oligómeros de xilosa unidos a través de enlaces β -1,4 xilosídicos. Pueden obtenerse a través de hidrólisis del xilano por β -1,4-D-xilano xilanhidrolasa (EC 3.2.1.8) generalmente conocidas como endoxilanasas o xilanasas. Diversos microorganismos, incluyendo bacterias, levaduras y especialmente hongos filamentosos, han reportado una importante producción de xilanasas. El objetivo de este estudio fue establecer el efecto del residuo agroindustrial (salvado de trigo, cáscaras de lupino y/o cáscaras de linaza) en la producción de xilanasas de *Aspergillus oryzae* ATCC 14605 en condiciones de pH y temperatura controlados. La actividad xilanasas se determinó como la enzima requerida para producir 1 μ mol de xilosa por minuto utilizando 1% xilano de madera de haya (BWX) como sustrato. Los resultados indican que de los residuos agroindustriales utilizados, el salvado de trigo es el más idóneo para la producción de la enzima, mientras que para la producción de XOS, el sustrato con el que se reportan mejores resultados es xilano.

ABSTRACT

Xilo-oligosaccharides (XOS) are xylose oligomers linked via β -1, 4 xylosidics bonds. They are obtained through hydrolysis of xylan by β -1 ,4-D-xylan xylanohydrolase (EC 3.2.1.8), generally known as endoxylanases or xylanases. Various microorganisms, including bacteria, yeasts and especially filamentous fungi, have reported a significant production of xylanases. The objective of this study was to determine the effect of agricultural wastes (wheat bran, lupine husks and/or linseed husks) in the production of xylanase by *Aspergillus oryzae* ATCC 14605 under controlled pH and temperature. Xylanase activity was determined as the enzyme required to produce 1 μ mole of xylose per minute using 1% beechwood xylan (BWX) as substrate. The results indicated that among the agricultural wastes used, wheat bran is most suitable for the production of the enzyme, while for the production of XOS, the substrate with the best results is xylan.

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN.	1
2.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Residuos agroindustriales	3
2.2	Clasificación de los residuos agroindustriales	3
2.3	Residuos agroindustriales generados en Chile	5
2.4	Composición de la pared celular vegetal	6
2.5	Xilano	7
2.5.1	Degradación enzimática de xilano	8
2.5.2	Endo-1,4- β -xilanasas	8
2.5.3	Aplicaciones de endo-1,4- β -xilanasas	9
2.6	Xilo-oligosacáridos como prebióticos	10
2.7	<i>Aspergillus</i>	10
3.	PROBLEMÁTICA	12
3.1	Hipótesis	12
3.2	Objetivo general	12
3.3	Objetivos específicos	12
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1	Materiales	13
4.1.1	Material de Vidrio	13
4.1.2	Equipos	13
4.1.3	Reactivos	14
4.1.4	Material Extra	15
4.2	Microorganismos	15
4.3	Material vegetal	15
4.4	Metodología	16
4.4.1	Preparación del inóculo	16
4.4.2	Obtención de esporas	16

4.4.3	Producción enzimática	17
4.4.4	Curva de crecimiento	18
4.4.5	Recuento cámara de Neubauer	18
4.4.6	Producción de xilo-oligosacáridos	19
4.5	Métodos analíticos.	20
4.5.1	Determinación de la actividad xilanasa	20
4.5.2	Determinación de la actividad celulasa	20
4.5.3	Determinación de la concentración de proteína soluble (PS)	20
4.5.4	Determinación de la concentración de azúcares totales (AT)	21
4.5.5	Determinación de la concentración de azúcares reductores (AR)	21
4.5.6	Cromatografía de capa fina (TLC) de azúcares	22
4.6	Análisis estadístico	22
5.	RESULTADOS y DISCUSION	23
5.1	Producción enzimática	23
5.2	Curva de crecimiento	24
5.3	Producción enzimática: evaluación del sustrato para producción de xilanasa	25
5.4	Producción de xilo-oligosacáridos	26
5.5	Cromatografía de capa fina (TLC) de azúcares.	28
6.	CONCLUSIONES	30
7.	LITERATURA CITADA	32
8.	ANEXOS	37

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los distintos tipos de desechos generados a nivel nacional.

Figura 2. Estimación de los principales desechos de plantaciones generados por las principales regiones que se dedican a prácticas agrarias. Fuente: CNE, 2007.

Figura 3. Estructura del xilano de una planta hipotética mostrando los diferentes grupos sustituyentes con los sitios de ataque de las xilanasas microbianas. Fuente: Beg, *et.,al*, 2001.

Figura 4. Muestra el producto del hidrolizado de salvado de trigo, usando como patrones xilano, glucosa, sacarosa, xilosa y arabinosa de 10 g/L cada uno.

Figura 5. Muestra el producto del hidrolizado de xilano, usando como patrones xilano, glucosa, sacarosa, xilosa y arabinosa de 10 g/L cada uno.

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición de los medios de propagación para el crecimiento de los hongos.

Cuadro 2. Composición del medio sólido agar nutritivo.

Cuadro 3. Composición medios de cultivo A y B para crecimiento de *A. oryzae* y *A.niger* y la producción de xilanasa.

Cuadro 4. Concentración de azúcares reductores (AR), proteína soluble (PS), y actividad de celulasa y xilanasa en el sobrenadante de los cultivos de *A. niger* ATCC 11414 y *A. oryzae* ATCC 14605.

Cuadro 5. Efecto de la concentración de esporas de *A. oryzae* ATCC 14605 en la actividad de xilanasa de un nuevo cultivo realizado bajo las mismas condiciones descritas previamente.

Cuadro 6. Actividad de xilanasa en el medio de cultivo de *A. oryzae* ATCC 14605. Se inoculó una concentración de 1×10^4 esporas/mL en el medio de cultivo en la cuadro 2 de materiales y métodos, e incubado en agitador orbital a 27°C a 150 rpm.

Cuadro 7. Actividad xilanasa obtenida con *A. oryzae* ATCC 14605, cultivado en medio de A suplementado con 1% p/v de salvado de trigo; (B) medio de cultivo B suplementado con 1% p/v de salvado de trigo; (C) medio de cultivo A suplementado con 1% p/v cáscaras de lupino; (D) medio de cultivo B suplementado con 1% p/v cáscaras de lupino; (E) medio de cultivo A suplementando con 1% p/v cáscaras de linaza; (F) medio de cultivo B suplementado con 1% p/v de cáscaras de linaza; (G) medio de cultivo A sin fuente de xilano; (H) medio de cultivo B sin fuente de xilano.

Cuadro 8. Actividad enzimática xilanasa del extracto agregado a los matraces con medio de cultivo. Adicionalmente se tomó una muestra cada 24 h para verificar el aumento de la actividad xilanasa en 96 h de cultivo.

Cuadro 9. Producción de xilo-oligosacáridos a partir del extracto obtenido del cultivo de *A. oryzae* ATCC 14605 usando como sustrato salvado de trigo, cada 1 h de incubación.

Cuadro 10. Producción de xilo-oligosacáridos a partir del extracto obtenido del cultivo de *A. oryzae* ATCC 14605 usando como sustrato xilano (Sigma, Co), cada 1 h de incubación.

1. INTRODUCCIÓN

Los xilo-oligosacáridos (XOS) son un tipo de fibra soluble con aplicación en distintas áreas, como medicina, industria alimentaria y biotecnología, entre otras. Los XOS ejercen un efecto benéfico a la salud humana ya que favorecen la actividad de la microflora intestinal actuando como un importante prebiótico. En la industria alimentaria, pueden ser usados como fibra dietética soluble, ya que no es metabolizado por el sistema digestivo humano. Los XOS son oligómeros de xilosa unidos por enlaces β -1,4 xilosídicos. El xilano es hidrolizado por β -1,4 D-xilano hidrolasas (EC 3.2.1.8) generalmente conocidas como endoxilanasas o xilanasas. Sustratos ricos en xilano, son por ejemplo los residuos agroindustriales como el salvado de trigo. Por otro lado, los hongos filamentosos del género *Aspergillus*, poseen la batería enzimática necesaria para hidrolizar sustratos complejos tales como los polisacáridos de la pared celular de los residuos industriales mencionados.

En este contexto, el objetivo de este estudio fue establecer el efecto del tipo de residuo agroindustrial en la producción de xilanasas de *Aspergillus oryzae* ATCC 14605. Se realizaron seis tratamientos más el respectivo control, cada tratamiento constó de un medio de cultivo compuesto por extracto de levadura, peptona, NaNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y suplementado con 1% de los siguientes residuos agroindustriales: salvado de trigo, cáscaras de lupino y cáscaras de linaza. La actividad xilanasas fue evaluada en el sobrenadante previamente filtrado, determinando la concentración de azúcares reductores por el método de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Una unidad de xilanasas es definida como la cantidad de enzima requerida para producir 1 μmol de xilosa por minuto en condiciones de pH 5,4 y temperatura de 50 °C utilizando 1% de xilano de haya (BWX; beechwood xylan) como sustrato.

Los resultados indican que el cultivo de 96 h de *Aspergillus oryzae* ATCC 14605 utilizando 1% de salvado de trigo como sustrato, se obtienen los mayores valores de actividad enzimática, mientras que a las 6 h de reacción se obtienen los mayores valores de producción de xilo-oligosacáridos utilizando como sustrato 1% BWX.

Con estos resultados se debería realizar una segunda etapa del estudio, la cual es optimizar el proceso de producción de XOS producidos por la enzima xilanasa secretada por *A. oryzae* y evaluar el efecto de estos azúcares en la composición de la microflora intestinal de humanos.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Residuos agroindustriales

Ya en 1997 el desarrollo industrial y la modernización del sector agroindustrial mostraban elevados índices de productividad que podrían ser comparados con las actividades manufactureras más adelantadas, generando con ello un importante aumento en la producción de residuos agroindustriales (FAO, 1997) siendo hoy de primera necesidad la correcta eliminación de éstos y la búsqueda de un posible valor agregado.

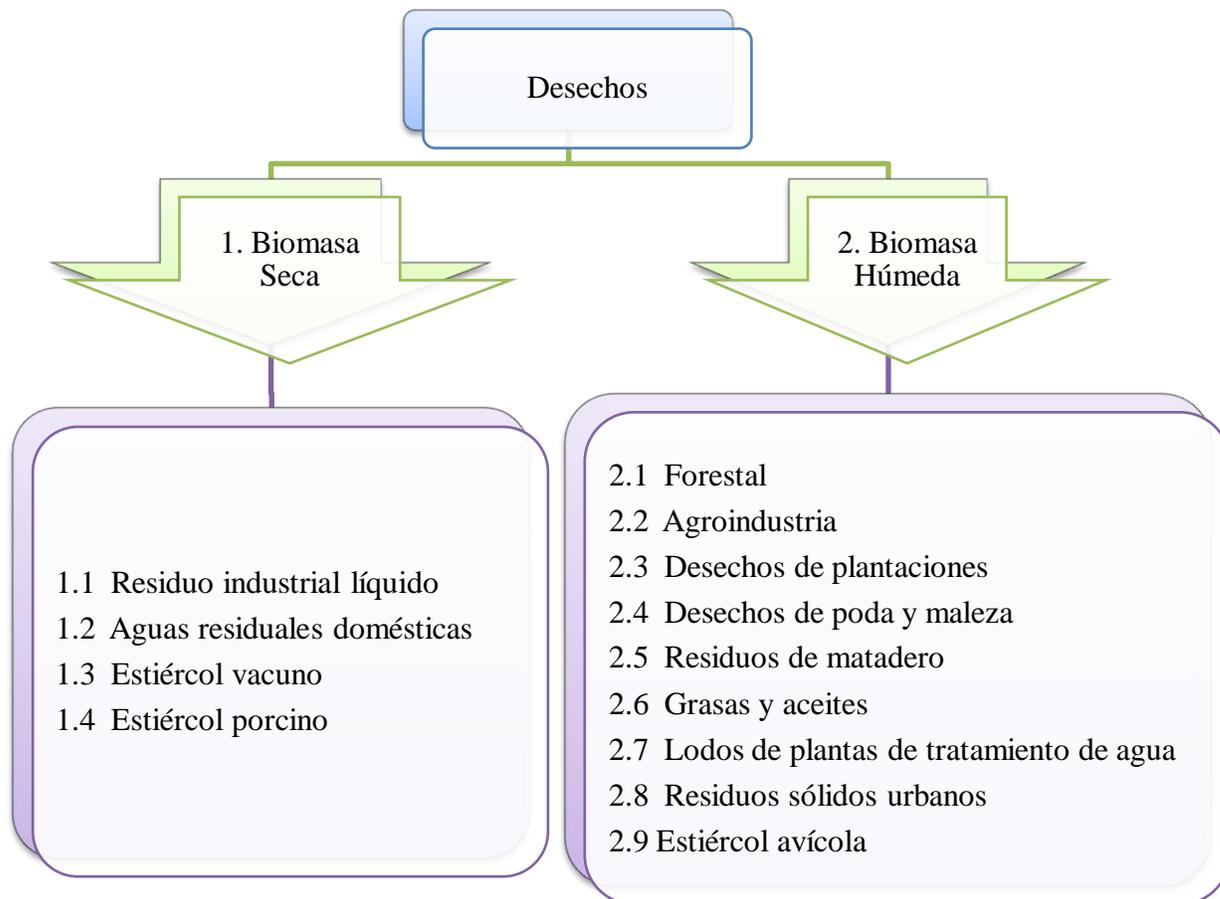
Tanto la diversidad de los residuos industriales y volúmenes generados en la actualidad, hace que sea de vital importancia la clasificación y un adecuado pre-tratamiento de éstos antes de ser depositados en un relleno sanitario o para una posterior reutilización. Sin embargo, esto no ocurre y sólo la disposición de los residuos agroindustriales, en su mayoría son aprovechados o reutilizados por los mismos entes que los generan, contando a nivel país con una variedad de empresas que se dedican a la comercialización total o parcial de sus productos con origen en algún residuo agroindustrial.

Paralelo a esto y de manera importante los residuos agroindustriales han sido foco de atención de numerosas investigaciones, donde desechos sólidos provenientes de frutas, como vegetales en general, son una importante materia prima para la obtención de diversos compuestos usados en la industria, como por ejemplo la industria farmacológica y cosmética (Laroze, *et al.*, 2010). Por lo tanto, es posible la utilización de la fracción externa de restos vegetales (semillas, tallos, vástago, etc.), como así también la fracción de hemicelulosa de éstos.

2.2. Clasificación de los residuos agroindustriales

Independientemente de su origen o estructura es factible que estos residuos puedan ser reutilizados, recuperados o liberados al medio ambiente de manera menos tóxica, sin embargo, la tecnología disponible, el nivel de concientización y, por sobre todo, los recursos legales y económicos son factores decisivos para llevar a cabo algún método de gestión.

Figura 1. Clasificación de los distintos tipos de desechos generados a nivel nacional.



La Figura 1 muestra un esquema general con la clasificación de los distintos tipos de desechos generados con base en la biomasa. Como desechos húmedos son clasificados los materiales que contienen menos de 10% de sustancia seca, según un estudio realizado por la CNE en el 2007. Encontrándose todos aquellos residuos provenientes del tratamiento de las aguas residuales domésticas e industriales y del estiércol de porcino y vacuno. En relación a los desechos secos, su clasificación es acorde al sector que los produce, dentro de los cuales se incluye: residuos forestales de la industria maderera, residuos agroindustriales de la producción de alimentos, desechos de plantaciones, desechos de poda y maleza, beneficio de ganado (residuos de matadero), aceites y grasas, lodos provenientes de plantas de tratamiento de aguas (PTA), residuos sólidos urbanos (RSU) y estiércol avícola.

En general, los residuos agroindustriales pueden ser considerados de naturaleza orgánica lo que permite su utilización en innumerables aplicaciones que pueden dar origen a su aprovechamiento en los sectores energético, agrícola, ganadero e industrial, entre muchos otros.

Con el fin de aumentar la digestibilidad de algunos residuos agrícolas de naturaleza fibrosa, como salvado de trigo e incluso hoja de olivo, se han realizado variados estudios, por lo que se propone una vía interesante de aprovechamiento de estos residuos al utilizarlos como fuente de xilano en la producción de xilo-oligosacáridos.

2.3. Residuos agroindustriales generados en Chile

Si bien Chile no es una potencia mundial en la producción de semillas (como en el caso de las exportaciones de hortalizas) con una organización industrial cada vez más avanzada, se ha logrado fortalecer el subsector agroindustrial beneficiando principalmente a los productores de plantaciones tales como trigo, maíz, papa, raps y remolacha, entre otros, que poco a poco se abren camino. Siendo los subproductos de estos cultivos usados casi exclusivamente en alimentación animal.

Figura 2. Estimación de los principales desechos de plantaciones generados por las principales regiones que se dedican a prácticas agrarias. (Fuente: CNE, 2007).

Cultivo	Regiones								
	III ton/año	IV ton/año	V ton/año	VI ton/año	VII ton/año	VIII ton/año	IX ton/año	X ton/año	TOTAL ton/año
Trigo	1.694	14.000	47.000	128.400	266.838	505.463	726.173	187.578	1.877.146
Avena	-	-	1.134	3.300	4.500	152.550	319.510	53.245	534.239
Cebada	-	-	277	238	3.210	14.868	27.775	9.624	55.992
Centeno	-	-	-	-	-	-	108	-	108
Maiz	1.410	5.840	13.288	846.000	228.000	53.460	910	-	1.148.908
Arroz	-	-	-	14.385	87.020	17.860	-	-	119.265
Poroto	-	754	954	7.200	28.665	9.346	1.368	-	48.287
Lenteja	-	-	-	-	165	560	66	-	791
Garbanzo	-	-	397	890	1.225	365	65	-	2.941
Arveja	-	-	-	139	256	155	466	-	1.015
Chicharo	-	-	-	-	191	3	-	-	193
Papa	2.769	109.620	15.000	65.550	57.190	128.320	302.400	390.784	1.071.633
Maravilla	-	-	105	1.053	1.277	323	-	-	2.758
Raps	-	-	-	-	486	5.883	11.563	4.179	22.111
Remolacha	-	-	-	70.644	832.370	1.038.125	80.464	256.700	2.278.303
Lupino	-	-	-	-	-	435	49.140	2.436	52.011

Como se aprecia en la Figura 2, la novena región de La Araucanía es la principal productora de leguminosas a nivel país, donde la producción de trigo y el lupino son un 38% y un 94%, respectivamente, del total producido al año.

2.4. Composición de la pared celular vegetal

Una de las características distintivas de las células vegetales es la presencia en ellas de la pared celular, la cual es de vital importancia para proteger el contenido celular proporcionando forma y rigidez a la estructura de la planta, además de proveer el medio para la circulación y distribución del agua, minerales y otras moléculas pequeñas (Williams, 2003).

La pared celular vegetal se compone principalmente de tres polímeros 1) la celulosa, un polímero insoluble compuesto de residuos de β -D-glucopiranosil unidos por enlaces β -1, 4-glicosídicos; 2) la lignina, un polifenol complejo, íntimamente interconectado con las hemicelulosas, formando una matriz que rodea las microfibrillas de celulosa ordenadas; y 3) hemicelulosa, una serie de heteropolisacáridos que incluye xilanos, glucanos, mananos y arabinanos. En conjunto, la biomasa comprende en promedio 23% lignina, 40% de celulosa y 33% de hemicelulosa en peso seco, (Coughlan & Hazlewood, 1993). Es importante mencionar que éstos no se acumulan en la naturaleza debido a que son aprovechados por los microorganismos al degradarlos como parte del ciclo del carbono.

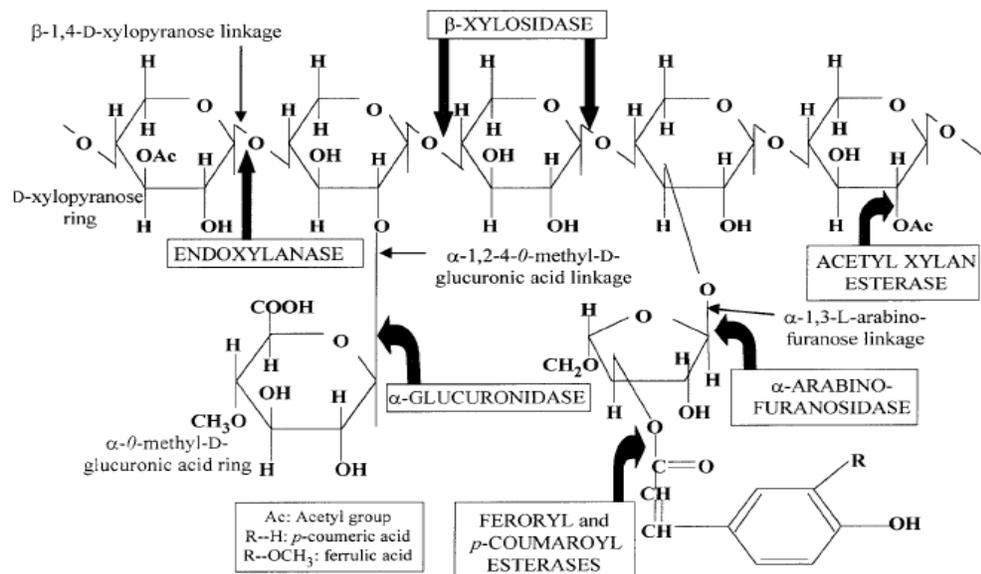
Los posibles sustratos que pueden ser utilizados para la producción de xilanasas son muy variados, destacándose los cereales tales como trigo, centeno, arroz y maíz (De Ory, *et al.*, 2007; Harland & Harland, 1980) y subproductos industriales como la torta de canola (Duvnjak, *et al.*, 1995). También se usan desechos de la agroindustria, los cuales son considerados los mejores sustratos, ya que además de agregarle valor añadido a estos residuos, proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos (Krishna, 2005); ejemplo de ello son los residuos de manzana, plátano, uva, cítricos, caña de azúcar trigo y maíz (Blandino, *et al.*, 2005).

2.5. Xilano

Schulze (1981) introdujo por primera vez el término “hemicelulosa” para las fracciones aisladas o extraídas de materias vegetales utilizando para ello un álcali diluido. Las hemicelulosas como ya se mencionó, incluyen principalmente xilano, manano, galactano, arabinano, entre otros heteropolímeros. La clasificación de estas fracciones se realiza de acuerdo a los tipos de azúcares presentes. Los principales monómeros presentes en las hemicelulosas son D-xilosa, D-manosa, D-galactosa y L-arabinosa. En cuanto al xilano, estos son heteropolímeros constituidos principalmente por D-xilosa como unidad monomérica y también en algunos casos puede contener trazas de L-arabinosa (Bastawde, 1992). En las plantas, las hemicelulosas o xilanos, con una estructura química consistente, parecen estar intercalados, entrelazados y ligados covalentemente en varios puntos a la cadena de lignina produciendo una capa entorno a la cadena de celulosa (Biely, 1985).

El β (1–4)-D-xilano es un polisacárido complejo que comprende una columna vertebral de residuos de xilosa unidos por enlaces β -1,4-glucosídico (Figura 3), y el polisacárido hemicelulósico más común en las paredes celulares de las plantas terrestres, lo que representa hasta el 30 – 35 % del peso seco total (Joseleau, *et al.*, 1992).

Figura 3. Estructura del xilano de una planta hipotética mostrando los diferentes grupos sustituyentes con los sitios de ataque de las xilanasas microbianas (Fuente: Beg, *et al.*, 2001).



2.5.1. Degradación enzimática de xilano

Las enzimas son esenciales para catalizar cualquier reacción química y como tal, han sido el foco de atención en múltiples investigaciones en diversas áreas, aplicadas en bioremediación, salud, industria textil y en la industria alimenticia.

Desde siempre las enzimas han jugado un rol fundamental en el diseño de muchos procesos, como en la producción del vino, queso, pan, entre otros. En la segunda mitad del siglo XX se produjo una expansión sin precedentes antes conocida en la utilización de microorganismos, sus productos metabólicos y enzimas. Sin embargo solo en las últimas dos décadas las enzimas microbianas han sido utilizadas comercialmente en varias áreas de la industria textil (Beg, *et al.*, 2001).

Debido a la heterogeneidad del xilano, la hidrólisis de éste requiere de la acción de un complejo sistema enzimático, siendo necesaria la interacción de aquellas enzimas que degradan la cadena principal, y luego de aquellas que degradan las cadenas laterales y/o substituyentes. Las enzimas envueltas en la cadena principal son endo- β -1,4-xilanasas, β -1,4-xilosidasas y las recientemente descubiertas exoxilanasas (Gasparic, *et al.*, 1995). Dependiendo de la fuente y el procedimiento de extracción y purificación, las cadenas laterales serán escindidas por α -L-arabinofuranosidasas y α -D-glucoronidasas.

2.5.2. Endo-1,4- β -xilanasas

Endo-1,4- β -xilanasas (endo-(1 \rightarrow 4)- β -xilano 4-xilanohidrolasas; [EC 3.2.1.8](#)) son por mucho unas de las importantes enzimas degradadoras de xilano; estas enzimas escinden los enlaces glicosídicos internos de la cadena de xilano. El ataque de este sustrato no es al azar y depende de la duración y el grado de ramificación del sustrato o de la presencia de substituyentes específicos dentro de ella (Coughlan, 1992). Han sido diferenciadas según los productos finales de la hidrólisis del xilano por ejemplo, xilosa, xilobiosa y xilotriosa, y/o arabinosa. Así, las xilanasas pueden ser clasificadas como enzimas no-desramificadoras (no liberadoras de arabinosa) o desramificadoras (liberadoras de arabinosa).

Muchos organismos son capaces de producir ambos tipos de xilanasas, dando como resultado la máxima eficiencia de la hidrólisis de xilano. En vista de las interacciones sinérgicas entre endoxilanasas y arabinofuranosidasas, la resolución de esta dicotomía puede ser posible mediante la determinación de si las enzimas conservan la capacidad de arabinosa libre, así como para hidrolizar los enlaces de la cadena principal (Wu, *et al.*, 2006; Okazaki, *et al.*, 2005)

Las xilanasas fúngicas y bacterianas son subunidades proteicas casi exclusivamente individuales cuyos peso moleculares van desde 8,5 hasta 85 kDa y su punto isoeléctrico (pI) entre 4,0 y 10,3; estando la mayoría de ellas glicosiladas (Coughlan, *et al.*, 1993; Polizeli, *et al.*, 2005). La mayoría de las xilanasas caracterizadas, son óptimamente activas a temperaturas que oscilan entre 45 y 75 °C, sólo un pequeño número muestra actividad máxima a temperaturas superiores a 80 °C siendo éstas pertenecientes a bacterias termófilas (Yang, *et al.*, 2007).

2.5.3. Aplicaciones de endo-1,4-β-xilanasas

El uso de xilanasas en la industria ha aumentado significativamente con el descubrimiento de Viikari *et al.* (1986) en la industria de la pulpa y el papel. Desde entonces los investigadores en todo el mundo centraron sus investigaciones en obtener nuevas cepas microbianas para la producción de esta enzima. Un indicador es el importante número de publicaciones científicas en los últimos años describiendo numerosas fuentes de producción de xilanasas registradas principalmente a partir de bacterias (Gilbert & Hazlewood, 1993; Sunna & Antranikian, 1997), hongos (Sunna & Antranikian, 1997), actinomicetes (Ball & McCarthy, 1989; Beg, *et al.*, 2000), y algunas levaduras (Hrmova, *et al.*, 1984; Liu, *et al.*, 1998, 1999).

Además del uso de xilanasas en la industria de la pulpa y el papel, también se utilizan como aditivos de alimentos para aves de corral (Bedford & Classen, 1992), en la harina de trigo para mejorar el manejo de la masa y la calidad de los productos horneados (Maat, *et al.*, 1992), para la extracción del café, aceites vegetales y almidón (Wong & Saddler, 1992), en la mejora de las propiedades nutricionales del ensilaje y cereales forrajeros (Kuhad & Singh, 1993), en combinación con pectinasa y celulasa para la clarificación de los jugos de fruta (Biely, 1985), desgomado de fuentes de fibra vegetal tales como el lino, el cáñamo, el yute entre otros (Kapoor, *et al.*, 2001; Puchart, *et al.*, 1999; Sharma, 1987).

Las xilanasas son también utilizadas en procesos de biodegradación con el fin de proporcionar una fuente de energía metabolizable. Por ejemplo, la degradación de xilano durante la germinación de la cebada y la digestión de vegetales con altos contenidos de fibra dietética (Gasparic, *et al.*, 1995).

2.6. Xilo-oligosacáridos como prebióticos

Un prebiótico se define como un “ingrediente alimenticio no digerible que beneficia selectivamente el crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon y que, por lo tanto, mejoran la salud del huésped” (Gibson & Roberfroid, 1995). Varios tipos de prebióticos han sido encontrados como componentes naturales de la leche, la miel, las frutas y verduras, como cebolla, alcachofa, achicoria, ajo, cebada, entre otros (Mussatto & Mancilha, 2007).

Los xilo-oligosacáridos son oligómeros de azúcar formados por unidades de xilosa, que aparecen en los brotes de bambú, frutas, verduras, leche y miel (Vazquez, *et al.*, 2000), que presenta numerosas ventajas atribuibles a la ingesta de estos como prebióticos. Los espárragos, remolacha, ajo, achicoria, cebolla, alcachofa de Jerusalén, trigo, miel, plátano, cebada, tomate, y el centeno son también consideradas fuentes especiales de fructooligosacáridos oligómeros presente en las especies vegetales (Ziemer & Gibson, 1998; Sangeetha, *et al.*, 2005).

2.7. *Aspergillus*

Los mohos del género *Aspergillus* causan el deterioro de muchos productos alimenticios. Los productos metabólicos del ataque de estos microorganismos pueden llegar a ser muy tóxicos, tanto para el hombre como para otros animales. Además producen la inhibición de la germinación junto con cambios de color, calentamiento, amohosado, apelmazado y finalmente podredumbre de las semillas (Kozakiewicz, 1989).

En cuanto a la morfología, el color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos aspergilos, poseen distintos tonos verdes, pardos, amarillos, blancos, grises y negros (Kozakiewicz, 1989).

La enzimología comercial moderna es uno de los negocios más próspero basados en que *A. niger* y *A. oryzae* se encuentran entre los principales productores de enzimas hidrolíticas (Godfrey & West, 1996).

A. oryzae ha sido usado desde hace miles de años en la industria de la fermentación tradicional japonesa para producir *sake* (vino de arroz), *shoyu* (salsa de soja) y *maise* (pasta de soja). En estas fermentaciones *A. oryzae* secreta una cantidad significativa de amilasas y/o proteasas para transformar el almidón a azúcar y proteínas a péptidos/amino ácidos (Kobayashi, *et al.*, 2007).

Por todas las razones expuestas anteriormente, la presente investigación se centró en la producción enzimática de xilanasas a partir de un cultivo de *Aspergillus*, utilizando como fuente de xilano residuos agroindustriales con el fin de agregarle un valor añadido a éstos, y aprovecharlos para la obtención de los productos de esta fermentación, xilo-oligosacáridos, de gran interés comercial.

3 PROBLEMÁTICA

3.1 HIPOTESIS

Es posible producir xilo-oligosacáridos a partir de las enzimas extracelulares secretadas por hongos del género *Aspergillus* cultivados en medios en los cuales se utilizan residuos agroindustriales.

3.2 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de las condiciones del medio de cultivo de un hongo del género *Aspergillus* para la obtención de extracto crudo con alta actividad xilanasa y la producción de xilo-oligosacáridos a partir de éste, utilizando como fuente de xilano residuos agroindustriales.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el potencial de *A.oryzae* ATCC 14605 y *A. niger* ATCC 11414 para la producción de xilanasa.
- Establecer el efecto de la concentración en esporas del microorganismo seleccionado en la producción de xilanasa.
- Identificar el residuo agroindustrial (salvado de trigo, cáscaras de linaza, o cáscaras de lupino) que reporta la mayor producción de xilanasa.
- Identificar xilo-oligosacáridos en el producto hidrolizado con el extracto enzimático producido por *Aspergillus*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

4.1.1 Material de vidrio

- Matraces Erlenmeyer de 125, 250 y 500 mL.
- Cámara para cromatografía (TLC)
- Placas Petri
- Tubos de ensayo.
- Vasos precipitados de 0.1, 0.5, 1 L.
- Porta y cubre objetos.
- Probetas 100 y 250 mL.

4.1.2 Equipos

- Agitador orbital shaker ZHWY-211C, Thermo scientific.
- Agitador magnético termorregulado, Thermo scientific.
- Agitador vortex, modelo 37600 mixer , Thermoline.
- Autoclave, vertical HL 341, Huxley.
- Balanza analítica digital, modelo BP 2215, Sartorius.
- Balanza granataria digital, modelo BL 1500, Sartorius.
- Baño termorregulado de calor seco, modelo 2001-1, Barnstead.
- Cámara de Neubauer Bright Line, 0,1 mm de profundidad, BOECO
- Cámara de flujo laminar, Microflow
- Centrífuga, modelo 5804, Eppendorf.
- Centrifuga digital, modelo CT15E, Hitachi,
- Espectrofotómetro, modelo Genesys 6, Thermo.
- Estufa de cultivo, modelo BE-500, Memmert,

- Horno digital, Memmert.
- Microscopio CX 41, Olympus.
- Micropipetas LABNET.
- pH-metro, modelo 420. Orion.

4.1.3 Reactivos

- α -Naphthol, Merck.
- Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$), Winkler Ltda.
- Ácido dinitrosalisílico (DNS), Merck.
- Ácido orto-fosfórico 85% p/v, Merk.
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4), Merck.
- Agar papa dextrosa (PDA), DB Difco.
- Agar, Winkler Ltda.
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3), Merck.
- Citrato de sodio ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$), Merck.
- Cloruro de magnesio heptahidratado ($MgCl \cdot 7H_2O$), Merck.
- Extracto de levadura, DB Difco.
- Extracto de malta, DB Difco.
- Fenol, Merck.
- Folin-Ciocalteu phenol, Merck.
- Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), JT Baker.
- Glucosa, Winkler Ltda.
- Hidróxido de sodio (NaOH), Merck.
- Metasulfito de sodio, Arquimed.
- Nitrato de sodio ($NaNO_3$), JT Baker.
- Peptona, DB Difco.
- Suero albumina bovino (BSA), Merck.
- Sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), Merck.

- Tartrato de sodio y potasio, Winkler Ltda.
- Tween 80, Merck.
- Xilano, Sigma Co.

4.1.4 Material extra

- Filtros 0,2 μm , Orange Scientific.
- Microtubos eppendorf de 1,57 y 2 mL.
- Placas de aluminio de silica gel F₂₅₄ (10 x10 cm), Merck.
- Tubos Fálcon de 50 mL.
- Whatman N°1 de 10 cm de diámetro, Merck.

4.2 MICROORGANISMOS

Las cepas fúngicas de *Aspergillus niger* ATCC 11414 y *Aspergillus oryzae* ATCC 14605 fueron facilitadas por el Laboratorio de Bioprocesos, del Departamento de Ingeniería Química en las dependencias del Instituto de Agroindustrias en la Universidad de La Frontera.

4.3 RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

Los residuos agroindustriales utilizados como fuente de xilano fueron salvado de trigo, cáscaras de lupino y cáscaras de linaza.

El salvado de trigo, obtenido en el mercado local, se lavó repetidamente con agua caliente (en ebullición) durante 15 min y fue secado a 60°C por 12 h. Se almacenó hasta su uso. De la misma forma las cáscaras de lupino fueron lavadas reiteradamente con agua a temperatura de ebullición durante 15 min y secadas a 60°C por 12 h. Se almacenó hasta su uso. Las semillas de linaza fueron incubadas a temperatura de ebullición durante 15 min, una vez a temperatura ambiente se removieron las cáscaras con una prensa, y fueron secadas a 60°C por 12 h. Se almacenó hasta su uso.

4.4 METODOLOGÍA

4.4.1 Preparación del inóculo

Medio de propagación de los microorganismos. Se replicó previamente cada hongo y se sembró en matraces de 250 mL con 100 mL del medio de propagación respectivo, cuya composición se muestra en el Cuadro 1. Los matraces fueron incubados en agitador orbital a 27°C a 150 rpm.

Cuadro 1. Composición de los medios de propagación para el crecimiento de los hongos.

Componente	Concentración (g/L)
Extracto de malta	3
Extracto de levadura	3
Peptona	5
Glucosa	10

4.4.2 Obtención de esporas

Una vez obtenida la biomasa de cada hongo se sembró en agar nutritivo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Composición del agar nutritivo.

Componente	Concentración (g/L)
Extracto de malta	3
Extracto de levadura	3
Peptona	5
Glucosa	10
Agar	15

Una vez inoculadas las placas estas fueron incubadas a 27°C por 6 días. Para cada ensayo se preparó una suspensión de esporas de *A. niger* ATCC 11414 y *A. oryzae* ATCC 14605, con 15 mL de Tween ® 80 al 1% estéril, la suspensión se almacenó a -16°C hasta su uso.

4.4.3 Producción enzimática

Para la producción de xilanasa se preparó un medio de cultivo al cual se le adicionó una fuente de xilano (Cuadro 3). El pH del medio de cultivo fue ajustado a 5,5 antes de ser inoculado con *A. oryzae* y pH 5,0 para *A. niger*. La incubación se realizó a 27°C y 150 rpm. Se evaluó el efecto del microorganismo, la concentración del inóculo (esporas/mL de medio cultivo) y el periodo de crecimiento para la máxima producción enzimática.

Una vez determinado el microorganismo y la concentración del inóculo se evaluó nuevamente el tiempo de incubación. Finalmente se evaluó el efecto de la concentración de tres sustratos como fuente de xilano: salvado de trigo, cáscaras de lupino o cáscaras de linaza. La actividad de xilanasa fue determinada en el sobrenadante de los cultivos libre de biomasa; para ello, el medio de cultivo fue centrifugado (8000 rpm, 15 min, 4°C) y filtrado (0,2 µm).

Cuadro 3. Composición medios de cultivo A y B para crecimiento de *A. oryzae* y *A.niger* y la producción de xilanasa.

Componente	A	B
	Concentración g/L	Concentración g/L
Extracto de levadura	5	2,5
NaNO ₃	1	0,05
KH ₂ PO ₄	1	0,05
Peptona	1	0,05
MgCl * 7 H ₂ O	0,03	0,015
Fuente de xilano	10	10

Los distintos tratamientos empleados corresponden a:

- (A) : Medio de cultivo A suplementado con 1% de salvado de trigo;
- (B) : Medio de cultivo B suplementado con 1% de salvado de trigo;
- (C) : Medio de cultivo A suplementado con 1% cáscaras de lupino;
- (D) : Medio de cultivo B suplementado con 1% cáscaras de lupino;
- (E) : Medio de cultivo A suplementando con 1% cáscaras de linaza;
- (F) : Medio de cultivo B suplementado con 1% de cáscaras de linaza;
- (G) : Medio de cultivo A sin fuente de xilano;
- (H) : Medio de cultivo B sin fuente de xilano.

4.4.4 Curva de crecimiento

Se prepararon 3 matraces de 250 mL con 100 mL de medio cultivo expuesto en el Cuadro 3, los cuales fueron inoculados con 1×10^4 esporas/mL. Se midió actividad xilanasa cada 24 h.

4.4.5 Recuento cámara de Neubauer

De la solución de esporas descrita previamente, se tomaron 5 μ L y se adicionaron en una de las cámaras o cubetas con ayuda de un cubre objeto en la cámara de Neubauer, se observó bajo el microscopio. El número de partículas contadas se remplazó en la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{mL}} = \frac{\text{Partículas contadas}}{\text{Superficie contada (mm}^2\text{)* Profundidad cámara (mm)* Dilución.}}$$

A partir de este dato se determinó el volumen de solución de esporas necesario para cada ensayo.

4.4.6 Producción de xilo-oligosacáridos

Para producir xilo-oligosacáridos se usó como sustrato xilano de madera de haya (BWV) y salvado de trigo ambos al 1% p/v. Se preparó un matraz para cada sustrato al cual se le agregó extracto con actividad xilanasa y buffer fosfato-citrato 0,05 M y se ajustó a pH 5,5 con un volumen final de 50 mL (cada ensayo se realizó en duplicado). La incubación se realizó a 50°C, siempre bajo condiciones de esterilidad. Se evaluó el efecto del sustrato y tiempo de incubación bajo las condiciones mencionadas anteriormente.

La liberación de azúcares reductores (AR) fue cuantificada a través del método de ácido dinitrosalísílico (DNS) (Miller, 1959).

4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.5.1 Determinación de la actividad xilanasa con xilano de BXW

La actividad xilanasa se determinó con xilano de madera de haya al 1% p/v (beechwood: BWX. Sigma, Co) como sustrato en buffer fosfato-citrato 0,05 M pH 5,5.

En un total de 0,9 mL del sustrato, se le agregó 0,1 mL de la muestra previamente filtrada bajo 0,2 μm . La solución fue incubada a 50 °C por 10 min (Aachary & Prapulla, 2008). La concentración de AR liberados fue determinada con el método de DNS (Miller, 1959). Una unidad de xilanasa fue definida como la cantidad de enzima requerida para producir 1 μmol de xilosa por min, en las condiciones del ensayo descritas previamente.

4.5.2. Determinación de la actividad de celulasa

La actividad total de celulasa se determinó a partir del método recomendado por la IUPAC (1987). En un tubo de ensayo se agregó 500 μL de buffer citrato 0,05 M, pH 4,8; se agregaron 250 μL de la muestra y 2 discos de papel filtro (Whatman N°1 diámetro 10 cm) como sustrato. La incubación se realizó a 50 °C durante 60 min. Se retiró el papel filtro y se enfrió durante 10 min a temperatura ambiente. El blanco de la muestra se realizó sin la adición de los discos de papel. La cuantificación de la glucosa producida se determinó con el método DNS descrito anteriormente.

4.5.3 Determinación de la concentración de proteína soluble

La concentración de proteína soluble (PS) fue medida de acuerdo al método de Lowry, *et al.*, (1951). La muestra (0,5 mL) se mezcló con 2,5 mL de solución C, para luego agitar y dejar reposar durante 10 min. Se agregó 0,25 mL de solución D, se agitó por 1 min y se dejó reposar por 30 min. Se leyó la absorbancia a 750 nm, usando como blanco agua destilada. La

concentración de PS se obtuvo interpolando en la curva de calibración construida usando soluciones de albúmina de suero bovino (BSA) de concentración conocida.

Los reactivos se prepararon de la siguiente forma:

- Reactivo A: Se disolvieron 0,5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 1 g de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, en 100 mL de agua.
- Reactivo B: Se disolvieron 4 g NaOH en 250 mL de agua, luego se agregaron 20 g de Na_2CO_3 y se agitó hasta homogenizar, diluyendo después a 1 L.
- Reactivo C: Se preparó mezclando 1 mL del reactivo A y 50 mL del reactivo B.
- Reactivo D: Se preparó mezclando reactivo Folin-Ciocalteu phenol y agua destilada en una proporción (50:50).

4.5.4. Determinación de la concentración de azúcares totales (AT)

La concentración de AT fue medida de acuerdo al método del fenol-ácido sulfúrico (Dubois, *et al.*, 1956). La muestra 400 μL fue mezclada con 400 μL de fenol (5% p/v) y se agitó. Se adicionaron 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla resultante se enfrió a temperatura ambiente y se agitó. Después de 20 min, se leyó la absorbancia a 476 nm usando como blanco agua destilada. La concentración de AT se obtuvo interpolando en la curva de calibración construida usando soluciones de glucosa de concentración conocida.

4.5.5. Determinación de la concentración de azúcares reductores (AR)

Para determinar la concentración de AR se utilizó el método de ácido dinitrosalisílico o DNS descrito por Miller (1959).

4.5.6. Cromatografía de capa final (TLC) de azúcares.

Para esta determinación se empleó la técnica de cromatografía en capa fina (TLC). Las muestras fueron filtradas previamente bajo 0,2 μm .

La cromatografía se llevó a cabo en placas de aluminio de sílica gel F₂₅₄ (10 x10 cm), la cual fue trazada con lápiz grafito 2 cm sobre el borde inferior y se marcó la posición de las muestras, las cuales se encontraban separadas de los bordes y entre ellas por 1 cm. Se cargó dos veces 0,5 μL de muestra y la placa se secó a temperatura ambiente

La placa se introdujo en la cámara cromatográfica con el solvente, se usó la cantidad necesaria para que su nivel quedara 1 cm por debajo de la línea trazada de las muestras. Se dejó ascender la fase móvil (solvente) hasta 1 cm del borde superior de la placa, se retiró suavemente y secó a temperatura ambiente. Una vez seca se pulverizó con la solución reveladora y se dejó secar a temperatura ambiente, luego de esto se colocó sobre una placa calefactora a 100 °C hasta la aparición de las manchas.

Se utilizó como solvente acetato de etilo: ácido acético: metanol: agua en las proporciones 12:3:3:2 v/v/v/v. La solución reveladora contenía 50 mL de etanol, 6 mL de ácido ortofosfórico y 0,5 g de α -naphthol.

Como patrones se utilizaron soluciones de xilano, glucosa, sacarosa, xilosa y arabinosa de 10 g/L.

4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar el efecto de los distintos tratamientos utilizados en la producción enzimática de xilanasa se realizó análisis de varianza (ANOVA) de un factor y prueba de Duncan para determinar la significancia de los datos con una probabilidad de 0,5%.

Todos los resultados son presentados como el valor promedio \pm el valor de la desviación estándar.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Producción enzimática

Debido a que la literatura señala que *A. niger* y *A. oryzae* son los hongos filamentosos con elevada actividad xilanasa, se evaluó la producción enzimática de éstos. Además se determinó la actividad de celulasa y la concentración de PS. Los resultados se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Concentración de azúcares reductores (AR), proteína soluble (PS), y actividad de celulasa y xilanasa en el sobrenadante de los cultivos de *A. niger* ATCC 11414 y *A. oryzae* ATCC 14605.

Microorganismo	AR (g/L)	PS mg/mL	Act. celulasa (U/mL)	Act. xilanasa U/mL
<i>A. niger</i> ATCC 11414	2,3 ± 0,3	3,8 ± 0,0	26568,3 ± 276,5	82,2 ± 0,0
<i>A. oryzae</i> ATC14605	4,1 ± 0,5	0,5 ± 0,0	4956,8 ± 48,9	149,2 ± 0,1
Control	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	27,7 ± 14,3	4,0 ± 0,3

Como se aprecia en el Cuadro 4, *A. niger* ATCC 11414 presenta altos valores de actividad celulasa, pero una baja actividad xilanasa, mientras que *A. oryzae* ATCC 14605 presenta mayor actividad xilanasa y una menor actividad celulasa. Como el objetivo del ensayo era evaluar la producción de xilo-oligosacáridos por la enzima xilanasa, se determinó que *A. oryzae* ATCC 14605 es el hongo filamentosos que permitirá obtener mejor resultados en cuanto a la producción de XOS,

Se realizó un nuevo cultivo preparado con las condiciones descritas previamente. Cada medio de cultivo fue inoculado con distintas concentraciones de esporas: 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 esporas/mL. Los resultados se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Efecto de la concentración de esporas de *A. oryzae* ATCC 14605 en la actividad de xilanasas de un nuevo cultivo realizado bajo las mismas condiciones descritas previamente.

Concentración esporas (número/mL)	Act. xilanasas ($\mu\text{mol/L/min}$)
1×10^4	$1721,1 \pm 120,1^a$
1×10^3	$1194,6 \pm 64,1^b$
1×10^2	$1647,8 \pm 96,1^a$

Distintas letras representan diferencias estadísticamente significativas.

El Cuadro 5 muestra que la actividad xilanasas es significativamente diferente cuando la concentración inicial de esporas es de 1×10^3 a 1×10^4 . Sin embargo no es posible realizar esta afirmación considerando la actividad xilanasas cuando el inóculo fue de 1×10^2 , ya que ésta posee una actividad xilanasas similar a la del cultivo inoculado con 1×10^4 . Se decidió seguir los ensayos con un inóculo de *A. oryzae* de 1×10^4 esporas por mL de cultivo.

5.2 Curva de crecimiento

Se realizó una curva de crecimiento para determinar el momento de máxima productividad de xilanasas en función del tiempo. Los resultados se presentan en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Actividad de xilanasas en el medio de cultivo de *A. oryzae* ATCC 14605. Se inoculó una concentración de 1×10^4 esporas/mL en el medio de cultivo en la Cuadro 2 e incubado en agitador orbital a 27°C a 150 rpm.

Tiempo (h)	Act. xilanasas ($\mu\text{mol/L/min}$)
0	0
8	$12,7 \pm 1,8$
29	$10,2 \pm 4,4$
37	$18,1 \pm 2,7$

La incubación se realizó por 37 h y se midió actividad xilanasa con la metodología previamente descrita. De aquí se concluye que no hay un aumento proporcional de la actividad xilanasa en periodos prolongados de tiempo como se esperaba, y se plantea la posibilidad de inhibición de ésta enzima por parte de los productos liberados en esta reacción.

5.3. Producción enzimática: evaluación del sustrato para la producción de xilanasa

Para la producción enzimática, se realizaron distintos ensayos con el fin de evaluar la producción de xilanasa por el microorganismo e inóculo determinado previamente. Los resultados se exponen en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Actividad xilanasa ($\mu\text{mol/L min}$) obtenida con *A. oryzae* ATCC 14605 en distintos tiempos de incubación, cultivado en medio de A suplementado con 1% p/v de salvado de trigo; (B) medio de cultivo B suplementado con 1% p/v de salvado de trigo; (C) medio de cultivo A suplementado con 1% p/v cáscaras de lupino; (D) medio de cultivo B suplementado con 1% p/v cáscaras de lupino; (E) medio de cultivo A suplementando con 1% p/v cáscaras de linaza; (F) medio de cultivo B suplementado con 1% p/v de cáscaras de linaza; (G) medio de cultivo A sin fuente de xilano; (H) medio de cultivo B sin fuente de xilano.

Tratamiento	24 h	48 h	72 h	96 h
	$\mu\text{mol/L min}$	$\mu\text{mol/L min}$	$\mu\text{mol/L min}$	$\mu\text{mol/L min}$
A	110,8 \pm 12,1 ^a	650,6 \pm 47,2 ^a	1387,4 \pm 62,2 ^a	2857,2 \pm 76,1 ^a
B	41,6 \pm 20,1 ^b	495,5 \pm 44,4 ^c	1172,6 \pm 82,8 ^b	2567,9 \pm 68,2 ^b
C	0,0 \pm 2,6 ^c	559,6 \pm 25,6 ^b	749,3 \pm 250,9 ^c	759,8 \pm 203,0 ^c
D	0,0 \pm 4,0 ^c	0,0 \pm 2,2 ^d	0,0 \pm 4,0 ^d	0,0 \pm 3,4 ^d
E	0,0 \pm 10,5 ^c	0,0 \pm 2,8 ^d	0,0 \pm 7,5 ^d	0,0 \pm 2,7 ^d
F	0,0 \pm 5,4 ^c	0,0 \pm 31,6 ^d	0,0 \pm 7,7 ^d	0,0 \pm 7,3 ^d
G	0,0 \pm 0,8 ^c	0,0 \pm 14,9 ^d	0,0 \pm 10,3 ^d	0,0 \pm 10,9 ^d
H	0,0 \pm 2,0 ^c	0,0 \pm 4,3 ^d	0,0 \pm 3,9 ^d	0,0 \pm 5,9 ^d

Distintas letras representan diferencias estadísticamente significativas.

Como se observa en el Cuadro 7, los datos presentan diferencias estadísticamente significativas en el transcurso de las 96 h de incubación. Cuando el ensayo fue realizado bajo las condiciones del tratamiento A, es decir se inoculo 1×10^4 esporas/mL de *A. oryzae* ATCC 14605 en el medio de cultivo A suplementado con 1% de salvado de trigo como fuente de xilano se obtienen los mayores valores de producción de xilanasa. Por lo tanto y una vez establecidas las condiciones de cultivos, se procedió a la producción de xilo-oligosacáridos.

5.4. Producción de xilo-oligosacáridos.

La producción de xilo-oligosacáridos se realizó usando como sustrato xilano de madera de haya (BWX) y salvado de trigo ambos al 1% p/v. A cada matraz con 50 mL de medio de buffer fosfato-citrato 0,05 M pH 5,5 se le agregó 20 mL extracto enzimático con $3024,2 \pm 271,0$ $\mu\text{mol/L min}$ de actividad xilanasa como lo muestra el Cuadro 8.

Cuadro 8. Actividad enzimática xilanasa del extracto agregado a los matraces con medio de cultivo. Adicionalmente se tomó una muestra cada 24 h para verificar el aumento de la actividad xilanasa en 96 h de cultivo.

Tiempo de incubación	Act. Xilanasa $\mu\text{mol/L min}$
24 h	0 \pm 2,7
48 h	40,5 \pm 4,3
72 h	1864,8 \pm 44,4
96 h	3024,2 \pm 271

Una vez transcurrido las 96 h de cultivo y agregado el extracto con actividad enzimática xilanasa se midió la producción de XOS, expresando este valor en azúcares reductores (AR), y azúcares totales (AT) como se muestra en los Cuadro 9 para los XOS producidos a partir de salvado de trigo y el Cuadro 10 para los XOS producidos a partir de xilano, mientras que los productos de la hidrolisis enzimática se muestran en la Figura 4 y 5.

Cuadro 9. Producción de xilo-oligosacáridos a partir del extracto obtenido del cultivo de *A. oryzae* ATCC 14605 usando como sustrato salvado de trigo, cada 1 h de incubación.

Tiempo de incubación	Azúcares totales g/L	Azúcares reductores g/L	Porcentaje de oligosacaridos
0	0,6 ± 0,0	0,1 ± 0,0	87,8
1	1,5 ± 0,0	0,9 ± 0,0	39,7
2	1,6 ± 0,0	1,0 ± 0,0	36,6
3	2,6 ± 0,0	1,3 ± 0,0	50,5
4	2,3 ± 0,0	1,5 ± 0,0	35,5
5	3,1 ± 0,0	1,6 ± 0,0	47,2
6	2,5 ± 0,0	1,2 ± 0,0	49,7
7	2,8 ± 0,0	1,2 ± 0,0	55,6
8	2,9 ± 0,0	1,2 ± 0,0	58,9

Cuadro 10. Producción de xilo-oligosacáridos a partir del extracto obtenido del cultivo de *A. oryzae* ATCC 14605 usando como sustrato xilano (Sigma, Co), cada 1 h de incubación.

Tiempo de incubación	Azúcares Totales g/L	Azúcares reductores g/L	Porcentaje de oligosacaridos
0	1,1 ± 0,0	1,0 ± 0,0	6,9
1	1,0 ± 0,0	3,9 ± 0,0	0
2	0,8 ± 0,0	3,7 ± 0,0	-392,6
3	1,1 ± 0,0	2,9 ± 0,0	-171,4
4	1,3 ± 0,0	4,6 ± 0,0	-246,5
5	1,2 ± 0,0	5,2 ± 0,0	-334,1
6	2,2 ± 0,0	2,8 ± 0,0	-30,9
7	1,6 ± 0,0	2,3 ± 0,1	-43,7
8	1,2 ± 0,0	2,4 ± 0,1	-105,2

En este caso se estimó el porcentaje de oligosacaridos producidos en la reacción, como la división del producto de la sustracción de AT menos AR, por AT multiplicado por 100.

Luego de 8 h de incubación se obtienen los mejores resultados de producción de azúcares para el ensayo en el que se utilizó como sustrato salvado de trigo, mientras que en la producción de XOS a partir de xilano (Sigma, Co) luego de 5 h de incubación se observa tan solo un aumento en la producción de AR, y no así, en el porcentaje de oligosacaridos en el cual la cifras son negativas.

5.5. Cromatografía de capa final (TLC) de azúcares.

Figura 4. Muestra el producto del hidrolizado de salvado de trigo, usando como patrones xilano, glucosa, sacarosa, xilosa y arabinosa de 10 g/L cada uno.

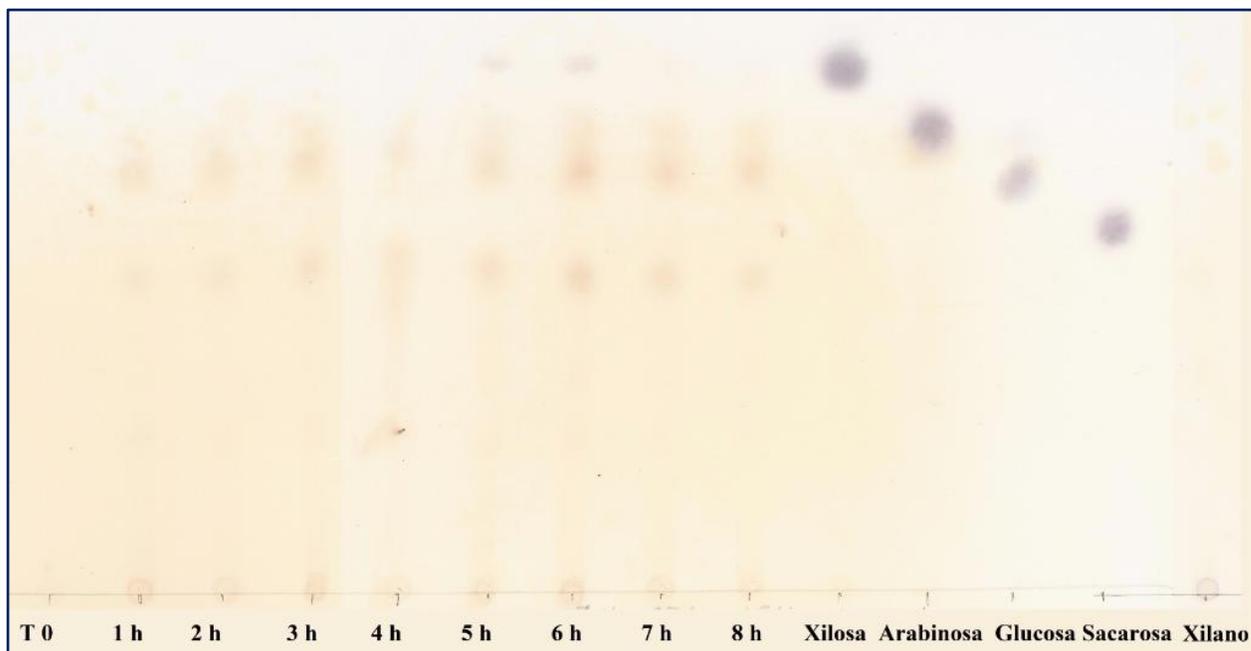
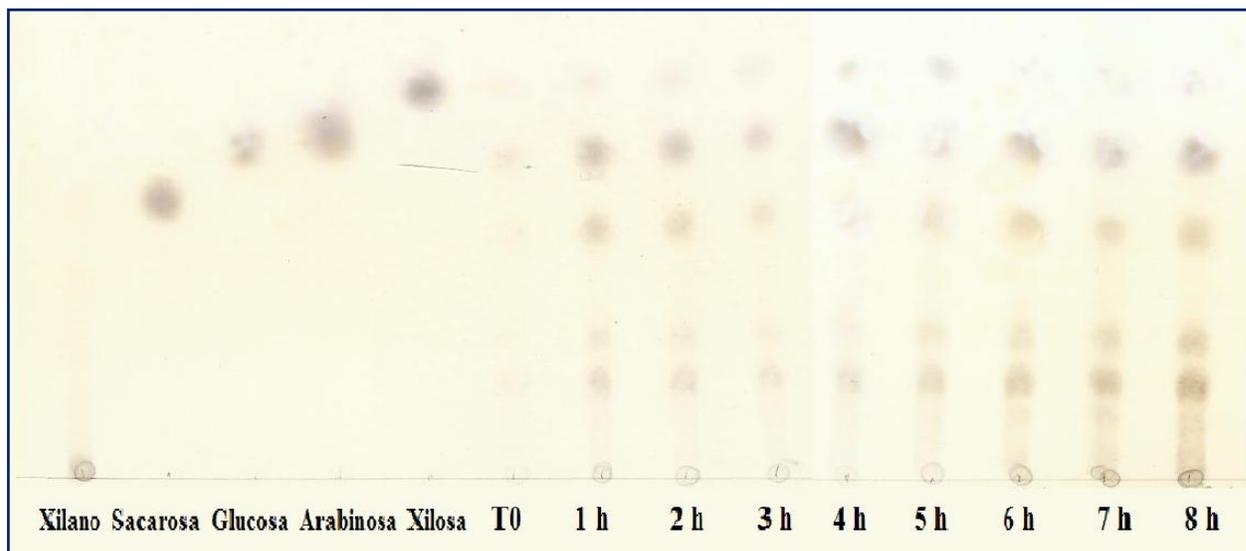


Figura 5. Muestra el producto del hidrolizado de xilano, usando como patrones xilano, glucosa, sacarosa, xilosa y arabinosa de 10 g/L cada uno.



Como se muestra en las Figuras 4 y 5 al comparar los productos de la hidrólisis producidos, se observan distintas manchas las cuales pueden corresponder a otros XOS como xilobiosa, xilotriosa, xilotetraosa (dependiendo del número de xilosas unidas) entre otros (Puchart & Biely, 2008), y por ello la aparición de manchas cada vez más oscuras y cercanas a la línea de carga, es importante recordar que las moléculas más pesadas quedaran más cercanas a la línea de carga. Por otra parte, al comparar los productos obtenidos cada 1 h durante la reacción, a las 5 y 6 h de incubación se obtiene xilosa, principal monómero de XOS.

6. CONCLUSIONES

Debido a los valores obtenidos en la producción enzimática de xilanasa, evaluados en dos microorganismos *A. niger* ATCC 11414 y *A. oryzae* ATCC 14605, en los que con este último se obtienen $149,2 \pm 0,08$ U/mL por sobre $82,180 \pm 0,04$ U/mL del primero, y no siendo la actividad celulasa excluyente, se determinó que *A. oryzae* ATCC 14605 es más eficiente para producir xilanasa y por lo tanto fue el microorganismo seleccionado para continuar con los ensayos.

Cuando se utilizó un inóculo de 1×10^4 esporas/mL de *A. oryzae* ATCC 14605, se obtuvieron los valores más altos de producción enzimática con $1721,1 \pm 120,1$ $\mu\text{mol/L/min}$ a los 3 días de cultivo sobre $1194,6 \pm 64,1$ $\mu\text{mol/L/min}$ producidos con un inóculo de 1×10^3 esporas/mL. Debido a que estadísticamente no existen diferencias entre los resultados obtenidos con un inóculo de 1×10^4 esporas/mL y 1×10^2 esporas/mL, observando la concentración de esporas elegida fue la de 1×10^4 esporas por cada mL de medio de cultivo.

Los tratamientos empleados (A) medio de cultivo A suplementado con 1%p/v de salvado de trigo; (B) medio de cultivo B suplementado con 1%p/v de salvado de trigo; (C) medio de cultivo A suplementado con 1%p/v cáscaras de lupino; (D) medio de cultivo B suplementado con 1%p/v cáscaras de lupino; (E) medio de cultivo A suplementando con 1%p/v cáscaras de linaza; (F) medio de cultivo B suplementado con 1%p/v de cáscaras de linaza; (G) medio de cultivo A sin fuente de xilano; (H) medio de cultivo B sin fuente de xilano, todos inoculados con 1×10^4 esporas/mL de *A. oryzae* ATCC 14605, presentan importantes diferencias en la producción enzimática. A medida que transcurre el tiempo total de incubación los valores para los tratamientos A, B y C van en aumento, mientras que los valores de producción enzimática para el resto de los tratamientos (D, E, F, G y H) continuamente tienden a 0. En el caso del tratamiento (C) la producción enzimática de xilanasa se vuelve irregular luego de 3 días (72 h) de cultivo, en las repeticiones, provocando un importante aumento en la desviación estándar en ese tratamiento, dando un claro indicio de que los resultados para la producción de XOS no serán los esperados.

La actividad xilanasa obtenida por Aachary y Prapulla (2008) a las 96 h de cultivo utilizando mazorca de maíz como sustrato e inóculo de *A. oryzae*, fue de $55,8 \pm 0,53$ U/ml/min,

mientras que la actividad xilanasa obtenida utilizando salvado de trigo como sustrato y un inóculo del mismo microorganismo fue de $2857,2 \pm 76,1$ U/mL/min, demostrando que es el salvado de trigo el mejor sustrato para la producción de xilanasa, necesaria en la producción de xilo-oligosacáridos.

En cuanto a la producción de xilo-oligosacáridos, los mejores resultados de producción se obtuvieron en la hidrólisis llevada a cabo con salvado de trigo como sustrato, ya que durante las 8 h de incubación la producción de oligosacáridos (XOS) siempre fue en aumento, lo que se hace más evidente luego de las 5 h de incubación. En el ensayo realizado con xilano (Sigma, Co) se obtiene el máximo de producción de azúcares totales y reductores a las 5 h de incubación al igual que en la reacción llevada a cabo con salvado de trigo como sustrato. Sin embargo, considerando el porcentaje de oligosacáridos producidos a partir de xilano, se observan cifras negativas, lo que significa que no hubo producción de XOS. Debido a que el principal interés del presente estudio es la producción de XOS, se estima que es necesario un mínimo 5 h de incubación utilizando como sustrato salvado de trigo para la producción de estos oligosacáridos, ya que luego de eso el porcentaje de estos comienza a aumentar hasta las 8 h tiempo total de incubación, y se desconoce si luego de este tiempo la actividad xilanasa comienza a disminuir y por ende disminuir la producción de XOS.

Las cromatografías de capa fina realizadas, revelan el producto de la hidrólisis enzimática tanto del salvado de trigo como del xilano, y se observa por comparación la formación de xilosa, uno de los principales monómeros de xilano. Pero se observa además una importante producción de otros oligómeros que aparecen antes del punto correspondiente a sacarosa, por lo tanto se concluye que hubo producción de XOS a partir de la hidrólisis realizada con el extracto enzimático de xilanasa obtenido del cultivo de *A. oryzae* ATCC 14605 con 1% (p/v) de salvado de trigo.

7. LITERATURA CITADA

1. **Aachary, A.A., Prapulla, S.G. (2008).** Corncob-induced endo-1,4- β -D-xylanase of *Aspergillus oryzae* MTCC 5154: production and characterization of xylobiose from glucuronoxylan. *J Agric Food Chem*, 56(11): 3981–88.
2. **Ball, A.S., McCarthy, A.J. (1989).** Production and purification of xylanase from actinomycetes. *J Appl Bacteriol*, 66: 439–444.
3. **Bastawde, K.B. (1992).** Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World J Microbiol Biotechnol*, 8: 353–368.
4. **Bedford, M.R., Classen, H.L. (1992).** The influence of dietary xylanase on intestinal viscosity and molecular weight distribution of carbohydrates in rye-fed broiler chick. In: Visser J, Beldman G, vanSomeren MAK, Voragen AGJ (eds) *Xylans and xylanases*, Elsevier, Amsterdam, 361–370.
5. **Beg, Q.K., Bhushan, B., Kapoor, M., Hoondal, G.S. (2000).** Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from a *Streptomyces* sp. QG-11-3. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 24:396–402.
6. **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.
7. **Biely, P. (1985).** Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol*, 3:286–290.
8. **Blandino, A., Botella, C., De Ory, I., Webb, C., Cantero, D. (2005).** Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochem Eng J*, 26: 100-106.
9. **Comisión Nacional de Energía (CNE) & deutsche gesellschaft für technische zusammenarbeit (GTZ). (2007).** “Energías renovables no convencionales en Chile”: identificación y clasificación de los distintos tipos de biomasa disponibles en Chile para la generación de biogás. http://www.inapiprojecta.cl/605/articles-1660_recurso_1.pdf.
10. **Costa, M., Torres, M., Magarinos, H., Reyes, A. (2010).** Producción y purificación parcial de enzimas hidrolíticas de *Aspergillus ficuum* en fermentación sólida sobre residuos agroindustriales. *Rev colomb Biotechnol*, 12: 163-175.
11. **Coughlan, M.P. (1992).** Towards an understanding of the mechanism of action of main chain-hydrolyzing xylanases. In *Xylan and Xylanases*. J Visser, G Beldman, MA Kuster-van Someren and AGJ Voragen (Eds). Elsevier, Amsterdam. 111-139.

12. **Coughlan, M., Hazlewood, G. (1993).** β -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems, biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol Appl Biochem*, 17:259–289.
13. **Coughlan, M.P., Touhy, M.G., Filho, E.X.F., Puls, J., Claeysens, M., Vrsanska, M. Hughes, M.M. (1993).** Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems. In *Hemicellulose and Hemicellulases*. Coughlan MP and Hazlewood GP (Eds). Portlan Press, London. 53-84.
14. **De Ory, I., Caro, I., Díaz, A. B., Blandino, A. (2007).** Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolytic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace. *Enzyme and Microbial Technol*, 41: 302-306.
15. **Dubois, M.K., Gils, J.K., Hanniton, P.A., Robes, Smith, F. (1956).** Use of phenol reagent for the determination of total sugar. *Anal Chem*, 28: 350-356.
16. **Duvnjak, Z., Ebune, A., Al-Asheh, S. (1995).** Production of phytase during solid state fermentation using *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 in canola meal. *Bioresource Technol*, 53: 7-12.
17. **Ebringerová, A., Kardosová, A., Hromádková, Z., Malovíková, A., Hříbalova, V. (2002).** Immunomodulatory activity of acidic xylans in relation to their structural and molecular properties. *Int J Biol. Macromol*, 30: 1–6.
18. **Food and Agriculture Organization (FAO).** The state of food and agriculture. (1997). *Agriculture Series N° .30.* <http://www.fao.org/docrep/w5800e/w5800e01.htm#E35E1>. Revisado el 7 de Agosto de 2012.
19. **Gasparic, A., Martin, J., Daniel, A.S., Flint, H.J. (1995).** A xylan hydrolase gene cluster in *Prevotella ruminicola* B(1)4: sequence relationships, synergistic interactions, and oxygen sensitivity of a novel enzyme with exoxylanase and beta- (1,4)-xylosidase activities. *Appl Environ Microbiol*, 61: 2958–2964.
20. **Gibson, G.R., Roberfroid, M.B. (1995).** Dietary modulation of the human colon microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutri*, 125:1401–1412.
21. **Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P. (1993).** Bacterial cellulases and xylanases. *J Gen Microbiol*, 139:187–194.
22. **Godfrey, T., West S. (1996).** Introduction to industrial enzymology. In: *Industrial enzymology*. 2nd Ed. New. York: Stockton Press. 1-8.
23. **Harland, B., Harland, J. (1980).** Fermentative reduction of phytase in rye, white, and whole wheat breads. *Cereal Chem*, 57 (3): 226-229.

24. **Hrmova, M., Biely, P., Vrsanka, M., Petrakova, E. (1984).** Induction of cellulose-and xylan-degrading enzyme complex in yeast *Trichosporon cutaneum*. *Arch Microbiol*, 161:371–376.
25. **International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). (1984).** Commission on Biotechnology, in "Measurement of cellulase activities". T.K. Ghose, ed. Biochemical Engineering Research Centre, Indian institute of Technology. New Delhi
26. **Joseleau, J.P., Comtat, J., Ruel, K. (1992).** Chemical structure of xylans and their interactions in the plant cell walls. In: Visser J, Beldman G, vanSomeren MAK, Voragen AGJ (eds) Xylans and xylanases. Elsevier, Amsterdam, 1–15.
27. **Kapoor, M., Beg, Q.K., Bhushan, B., Singh, K., Dadhich, K.S., Hoondal, G.S. (2001).** Application of an alkaline and thermostable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2 in degumming of ramie (*Boehmeria nivea*) and sunn hemp (*Crotalaria juncea*) bast fibers. *Process Biochem*, 36:803–807.
28. **Kobayashi, T., Abe K., Asai K., Gomi K., Juvvadi, P.R., Kato, M., Kitamoto, K., Takeuchi, K., Machida, M. (2007).** Genomics of *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 71:646–670.
29. **Kozakiewicz, Z. (1989).** *Aspergillus* species on stored products. *CAB International Mycological Institute, Kew, Surrey.*
30. **Krishna, C. (2005).** Solid State Fermentation Systems – An Overview. *Critical Rev Biotechnol*, 25: 1-30.
31. **Kuhad, R.C., Singh, A. (1993).** Lignocellulosic biotechnology: current and future prospects. *Crit Rev Biotechnol*, 13:151–172.
32. **Laroze, L., Soto, C., Zúñiga, M. (2010).** Phenolic antioxidants extraction from raspberry wastes assisted by-enzymes. *Electron. J Biotechnol*, 13(6):11-12.
33. **Liu, W., Lu, Y., Ma, G. (1999).** Induction and glucose repression of endo- β -xylanase in the yeast *Trichosporon cutaneum* SL 409. *Process Biochem*, 34:67–72.
34. **Liu, W., Zhu, W., Lu, Y., Kong, Y., Ma, G. (1998).** Production, partial purification and characterization of xylanase from *Trichosporon cutaneum* SL409. *Process Biochem*, 3:331–326.
35. **Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Fair, A.L., Randall, R.J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Bio Chem*, 193:265–275.

36. **Maat, J., Roza, M., Verbakel, J., Stam, H., daSilva, M.J.S., Egmond, M.R., Hagemans, M.L.D., vanGarcom, R.F.M., Hessing, J.G.M., vanDerhondel, C.A.M.J.J., vanRotterdam, C. (1992)** Xylanases and their application in bakery. In: Visser J, Beldman G, vanSomeren MAK, Voragen AGJ (eds) Xylans and xylanases. Elsevier, Amsterdam, 349–360.
37. **Miller, G.L. (1959).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem*, 31: 426–428.
38. **Mussatto, S.I., Mancilha, I.M. (2007).** Nondigestible oligosaccharides: a review. *Carbohydr Polym* 68(3):587–97.
39. **Okazaki, F., Shiraki, K., Tamaru, Y., Araki, T., Takagi, M. (2005).** The first thermodynamic characterization of beta-1,3-xylanase from a marine bacterium. *Protein J*, 24: 413-421.
40. **Polizeli, M.L., Rizzatti, A.C., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Amorim, D.S. (2005).** Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 67: 577-591.
41. **Puchart, V., Biely, P. (2008).** Simultaneous production of endo- β -1,4-xylanase and branched xylooligosaccharides by *Thermomyces lanuginosus*. *J Biotechnol*, 137:34-43.
42. **Puchart, V., Katapodis, P., Biely, P., Kremnický, L., Christakopoulos, P., Vrsanska, M., Kekos, D., Marcis, B.J., Bhat, M.K. (1999).** Production of xylanases, mannanases, and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme Microb Technol*, 24:355–361.
43. **Sangeetha, P.T., Ramesh, M.N., Prapulla, S.G. (2005).** Recent trends in the microbial production, analysis and application of FOS. *Trends Food Sci Technol*, 16:442–57.
44. **Schulze, E. (1891).** Information regarding chemical composition of plant cell membrane. *Ber Dtsch Chem Ges*, 24:2277–2287.
45. **Sharma, H.S.S. (1987).** Enzymatic degradation of residual non-cellulosic polysaccharides present on dew-retted flax fibers. *Appl Microbiol Biotechnol*, 26:358–362.
46. **Sunna, A, Antranikian, G. (1997).** Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit Rev Biotechnol*, 17:39–67.
47. **Vazquez, M.J., Alonso, J.L., Dominguez, H., Parajo, J.C. (2000).** Xylooligosaccharides: manufacture and applications. *Trends Food Sci Technol*, 11:387–93.

48. **Viikari L, Ranva M, Kantelinen A, Sandquist J, Linko M (1986).** Bleaching with enzymes. Third international conference in biotechnology in pulp and paper industry. 16–19:67–69
49. **Williams, K. (2003).** The physiological and morphological effects of grazing on grasses: An invitational Conference. Disponible en <http://www.grc.uri.edu/programs/2003.hlm> Revisado el 8 de Agosto 2012.
50. **Wong, K.K.Y., Saddler, J.N. (1992).** *Trichoderma* xylanases, their properties and purification. *Crit Rev Biotechnol*, 12:413– 435.
51. **Wu, S.C., Halley, JE., Luttig, C., Fernekes, L.M., Gutierrez-Sanchez G., Darvill, A.G., Albersheim P. (2006).** Identification of an endo-beta-1,4-D-xylanase from *Magnaporthe grisea* by gene knockout analysis, purification, and heterologous expression. *Appl Environ Microbiol*, 72: 986-993.
52. **Yang, C.H., Yang, S.F., Liu, W.H. (2007).** Production of xylooligosaccharides from xylans by extracellular xylanase from *Thermobifida fusca*. *J Agric. Food Chem*, 55:3955-3959.
53. **Ziemer, C.J., Gibson, G.R. (1998).** An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: Perspectives and future strategies. *Int Dairy J*, 8:473–479.

8. ANEXOS

Anexo 1. Análisis estadístico de la actividad xilanas obtenida con distintas concentraciones del inóculo.

Actividad xilanas con distintas concentraciones de inóculo			
Repeticiones / Tratamiento	1×10⁴	1×10³	1×10²
1	1721,1	1194,6	1647,8
2	1682,9	1068,3	1570,9
3	1910,3	1100,1	1450,3

Resumen análisis de varianza de un factor				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
1×104	3	5314,3	1771,43333	14827,7733
1×103	3	3363	1121	4315,53
1×102	3	4669	1556,33333	9910,70333

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	658846,642	2	329423,321	34,0149286	0,00053239	5,14325285
Dentro de los grupos	58108,0133	6	9684,66889			
Total	716954,656	8				

Anexo 2. Test de Duncan de actividad xilanasa obtenida con distintas concentraciones de inculo.

DMS	56,81745298	
Valores de tabla	6,085	6,085
Valores P	345,734201	345,734201

	1771,43333	1556,33333	1121
1771,43333	-	215,1	650,433333
1556,33333		-	435,333333
1121			-

1771,4 a 1156,3 a 1121,0 b

Anexo 3. Análisis estadístico para actividad xilanas con 24 h de incubación.

<i>Repeticiones / Tratamiento</i>	<i>Actividad xilanas de distintos Tratamientos con 24 horas de incubación</i>							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	97,9	25,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	112,4	64,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	122,1	35,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
A	3	332,42	110,81	147,55
B	3	124,87	41,62	403,82
C	3	0,00	0,00	0,00
D	3	0,00	0,00	0,00
E	3	0,00	0,00	0,00
F	3	0,00	0,00	0,00
G	3	0,00	0,00	0,00
H	3	0,00	0,00	0,00

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	33319,02	7	4759,8601	69,06217	9,2E-11	2,6572
Dentro de los grupos	1102,742	16	68,92138			
Total	34421,76	23				

Anexo 5. Análisis estadístico para actividad xilanasa con 48 h de incubación.

<i>Repeticiones / Tratamientos</i>	<i>Actividad xilanasa de distintos Tratamientos con 48 horas de incubación</i>							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	704,7	496,2	585,0	0,0	0,0	27,5	23,7	0,0
2	629,4	450,8	533,8	0,0	0,0	0,0	16,4	0,0
3	617,8	539,6	559,9	0,0	0,0	2,4	0,0	0,0

Resumen análisis de varianza de un factor

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
A	3	1951,9	650,6	2225,4
B	3	1486,6	495,5	1972,2
C	3	1678,8	559,6	654,5
D	3	0,0	0,0	0,0
E	3	0,0	0,0	0,0
F	3	29,9	10,0	232,2
G	3	40,1	13,4	146,9
H	3	0,0	0,0	0,0

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1825784	7	260826,279	398,8816	9,74E-17	2,6572
Dentro de los grupos	10462,304	16	653,893983			
Total	1836246,3	23				

Anexo 6. Test de Duncan de actividad xilanasa con 48 h de incubación.

DMS	9,040837786						
Valores de tabla	3,344	3,477	3,548	3,588	3,611	3,622	3,626
Valores P	30,23256 2	31,43499 3	32,076892 5	32,43852 6	32,6464 7	32,745 9	32,7820778 1

	650,6	559,6	495,5	13,4	10,0	0,0	0,0	0,0
650,6	-	91,06	155,10	637,29	640,67	650,65	650,65	650,65
559,6		-	64,03	546,23	549,61	559,58	559,58	559,58
495,5			-	482,19	485,57	495,55	495,55	495,55
13,4				-	3,38	13,36	13,36	13,36
10,0					-	9,98	9,98	9,98
0,0						-	0,00	0,00
0,0							-	0,00
0,0								-

650,6 a	559,6 b	495,5 c	13,4 d	10,0 d	0,0 d	0,0 d	0,0 d
----------------	----------------	----------------	---------------	---------------	--------------	--------------	--------------

Anexo 7. Análisis estadístico para actividad xilanasa con 72 h de incubación.

<i>Repeticiones</i> / <i>Tratamientos</i>	<i>Actividad xilanasa de distintos Tratamientos con 72 horas de incubación</i>							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	1455,8	1206,2	460,0	0,0	2,9	0,0	10,6	0,0
2	1372,3	1078,3	880,9	0,0	0,0	2,9	0,0	0,0
3	1334,1	1233,2	907,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Resumen análisis de varianza de un factor

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
A	3	4162,1	1387,4	3870,2
B	3	3517,8	1172,6	6849,5
C	3	2247,9	749,3	62933,0
D	3	0,0	0,0	0,0
E	3	2,9	1,0	2,8
F	3	2,9	1,0	2,8
G	3	10,6	3,5	37,7
H	3	0,0	0,0	0,0

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	7463363,3	7	1066194,8	115,73963	1,68E-12	2,657197
Dentro de los grupos	147392,17	16	9212,0108			
Total	7610755,4	23				

Anexo 8. Test de Duncan de actividad xilanasa con 72 h de incubación.

DMS	33,93377889						
Valores de tabla	3,344	3,477	3,548	3,588	3,611	3,622	3,626
Valores P	113,47456	117,98775	120,39705	121,7544	122,5349	122,9081	123,04388

	1387,4	1172,6	749,3	3,5	1,0	1,0	0,0	0,0
1387,4	-	214,79	638,09	1383,83	1386,40	1386,41	1387,38	1387,38
1172,6		-	423,30	1169,04	1171,61	1171,62	1172,59	1172,59
749,3			-	745,74	748,31	748,31	749,28	749,28
3,5				-	2,57	2,57	3,54	3,54
1,0					-	0,00	0,97	0,97
1,0						-	0,97	0,97
0,0							-	0,00
0,0								-

1387, 4 a 1172,6 b 749,3 c 3,5 d 1,0 d 1,0 d 0,0 d 0,0 d

Anexo 9. Análisis estadístico para actividad xilanasa con 96 h de incubación.

<i>Repeticiones/ Tratamiento</i>	<i>Actividad xilanasa de distintos Tratamientos con 96 horas de incubación</i>							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	2777,7	2493,0	525,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	2929,3	2584,7	882,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	2864,6	2626,2	871,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Resumen análisis de varianza de un factor

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
A	3	8571,7	2857,2	5783,6
B	3	7703,8	2567,9	4646,7
C	3	2279,5	759,8	41191,0
D	3	0,0	0,0	0,0
E	3	0,0	0,0	0,0
F	3	0,0	0,0	0,0
G	3	0,0	0,0	0,0
H	3	0,0	0,0	0,0

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	31660732	7	4522962	700,94	1,1E-18	2,657197
Dentro de los grupos	103242,75	16	6452,672			
Total	31763975	23				

Anexo 10. Test de Duncan de actividad xilanas con 96 h de incubación.

DMS	28,40042251						
Valores de tabla	3,344	3,477	3,548	3,588	3,611	3,622	3,626
Valores P	94,971013	98,74827	100,7647	101,9	102,5539	102,8663	102,9799

	2857,2	2567,9	759,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2857,2	-	289,28	2097,38	2857,22	2857,22	2857,22	2857,22	2857,22
2567,9		-	1808,09	2567,94	2567,94	2567,94	2567,94	2567,94
759,8			-	759,84	759,84	759,84	759,84	759,84
0,0				-	0,00	0,00	0,00	0,00
0,0					-	0,00	0,00	0,00
0,0						-	0,00	0,00
0,0							-	0,00
0,0								-

2857,2 a 2567,9 b 759,8 c 0,0 d 0,0 d 0,0 d 0,0 d 0,0 d
