

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa



Casa abierta al tiempo

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado en Biotecnología

**Optimización de un medio de cultivo para la producción de fitasa
por *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido.**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestra en Biotecnología

PRESENTA

Guadalupe Olmedo Obrero

Ingeniera Biotecnóloga

Dr. Ernesto Favela Torres

Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda

Dr. Nicolás Óscar Soto Cruz

Director de tesis

Asesora

Asesor

México D.F, abril de 2010.

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465.

México D.F. a 16 de abril del 2010

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**Optimización de un medio de cultivo para la producción de fitasa
por *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido.**

que presentó

**Guadalupe Olmedo Obrero
Ingeniera Biotecnóloga**

Comité Tutorial:

Director: **Dr. Ernesto Favela Torres** _____

Asesora: **Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda** _____

Asesor: **Dr. Nicolás Óscar Soto Cruz** _____

Jurado:

Presidenta: **Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda** _____

Secretaria: **Dra. Ascención Ramírez Coronel** _____

Vocal: **Dr. Nicolás Óscar Soto Cruz** _____

Vocal: **Dr. Luis Raúl Tóvar Gálvez** _____

Agradecimientos

Agradezco el apoyo otorgado para la realización de este trabajo de tesis a las siguientes instituciones:

- Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa
- CONACyT
- Alltech SSF, S.A de C.V.

Resumen

El fósforo es un macromineral presente en todas las células y líquidos del cuerpo, interviene en la formación y mantenimiento de los huesos, dientes, en la formación de tejidos musculares y en el metabolismo celular. Este mineral es almacenado en cereales, semillas y leguminosas en forma de ácido fítico (mio-inositol hexakisfosfatado). Sin embargo, los animales monogástricos (a diferencia de los rumiantes) no pueden degradar el ácido fítico, por lo que es excretado en las heces causando un problema de contaminación ambiental. Por esta razón, se ha empleado la adición de una enzima llamada fitasa (mioinositol hexakisfosfato fosfohidrolasa), la cual hidroliza los grupos fosfatos del ácido fítico dando lugar a la formación de diversos fosfatos de inositol. La fitasa es producida a través de fermentación líquida y sólida empleando diversos subproductos agroindustriales, por lo que se hace necesario realizar varios pasos de separación para la purificación de la enzima.

El objetivo de la presente tesis, fue diseñar un medio óptimo para la maximizar la producción de fitasa en un soporte inerte por fermentación en medio sólido, para lo cual se empleó una metodología de superficies de respuesta con un diseño estadístico llamado compuesto central, en el cual se consideraron las concentraciones de almidón, glucosa, ácido fítico, fósforo inorgánico y minerales, como variables a optimizar. Asimismo, se determinaron las condiciones de operación óptimas del sistema.

Se determinaron las condiciones de 1.75% de inóculo, 80% de humedad inicial, 72h de tiempo de incubación del medio semilla y 144h de tiempo de fermentación, como óptimas para la producción de la enzima fitasa en fermentación en medio sólido empleando espuma de poliuretano como soporte.

Se determinó a la concentración de peptona en el sistema, como la variable con mayor efecto positivo sobre la producción de la enzima, siendo la concentración óptima de 35g/100 g.m.s. Con respecto al resto de las variables, también analizadas a través de la metodología de superficies de respuesta, se determinaron concentraciones de 5.0g/100g.ms. de glucosa, 7.8g/100g.m.s de almidón, 2.8g/100g.m.s de ácido fítico, 0.31g/g.m.s de KH_2PO_4 , 0.33 g.m.s de Mg_2SO_4 , CaCl y KCl, como la combinación óptima de niveles que maximiza la producción de fitasa en fermentación en medio sólido sobre espuma de poliuretano.

Abstract

Phosphorus is a macromineral present in all cells and body fluids, involved in the formation and maintenance of bones, teeth, muscle tissue formation and cell metabolism. This mineral is stored in grains, seeds and legumes in the form of phytic acid (myo-inositol hexakisphosphate). However, monogastric animals (unlike ruminants) can not degrade phytic acid, so it is excreted in the feces causing environmental pollution problem. For this reason, it has used the addition of an enzyme called phytase (myo-inositol hexakisphosphate phosphatase), which hydrolyzes the phosphate groups of phytic acid leading to the formation of various inositol phosphates. Phytase is produced through liquid and solid fermentation using various agro-products, so it is necessary to realize several separation steps to purify the enzyme.

The objective of this thesis was to design an optimum environment for maximizing the production of phytase in an inert solid medium by fermentation, for which employed a response surface methodology with a statistical design called compound central, in which were considered the concentrations of starch, glucose, phytic acid, inorganic phosphorus and minerals, such as variables to be optimized. Also determined the optimum operating conditions of the system.

Conditions were determined 1.75% of inoculum, initial moisture 80%, 72 h incubation time the medium seed and 144h of fermentation time, as optimal for the production of the phytase in solid state fermentation using polyurethane foam as support.

In the system, peptone concentration was determined as the variable with the greatest positive effect on production of the enzyme, being the optimal concentration of 35g/100 g.m.s. With regard to the rest of the variables, also analyzed across the surface methodology of response, there decided concentrations of 5.0g/100g.m.s. of glucose, 7.8g/100g.m.s of starch, 2.8g/100g.m.s of phytic acid, 0.31g/g.m.s of KH_2PO_4 , 0.33 g.m.s of Mg_2SO_4 , CaCl and KCl, as the best combination of levels that maximizes the production of phytase in solid state fermentation in polyurethane foam.

Índice

Resumen	iv
Abstract.....	v
Índice	vi
Índice de Figuras	vii
Índice de Tablas	viii
1. Introducción	1
2. Marco teórico.....	2
2.1. Fósforo.....	2
2.2. Ácido fítico	4
2.3 Fitasa	6
2.4 Microorganismos productores de fitasa.....	8
2.5 Producción microbiana de fitasas.....	11
2.6 Espuma de poliuretano (PUF)	13
2.7 Género <i>Aspergillus</i>	13
2.8 Procesos de optimización.....	15
2.9 Métodos de optimización	17
2.9.1 Superficies de respuesta	17
2.9.2 Diseño compuesto central	18
3. Justificación	20
4. Objetivos.....	21
4.1 Objetivo general.....	21
4.2 Objetivos particulares	21
5. Materiales y métodos.....	22
5.1 Soporte inerte	22
5.2 Microorganismo	22
5.3 Conservación de cepas	22
5.4 Medios de cultivo.....	23
5.4.1. Medio de mantenimiento y esporulación	23
5.4.2. Medio para la propagación de inóculo.....	23
5.4.3. Medio para producción de fitasa.....	24
5.5.- <i>Obtención del extracto enzimático crudo</i>	24
5.6 Actividad enzimática	25
5.7 Proceso de optimización.....	26
5.8 Determinación de humedad.....	28
5.9 Determinación de pH.....	28
5.10 Determinación de la actividad del agua (Aw)	28
6. Resultados.....	30
6.1 Etapa exploratoria.....	30
6.1.1 Selección del medio base.....	30
6.1.2 Condiciones de fermentación	31
6.2 Etapa de Optimización.....	39
6.3 Segunda etapa del proceso de optimización.....	49
7. Conclusiones	58
8. Referencias.	60.
9. Anexos.....	70

Índice de figuras

Figura 1 a) Conformación energética favorable del ácido fítico (mio-inositol hexakisfosfato). b) Representación tridimensional del ácido fítico.	4
Figura 2 Conformación energética más favorable del mio-inositol.	5
Figura 3 Interacción del ácido fítico con proteínas y minerales (Thompson, 1987).	5
Figura 4 Imagen tridimensional, generada por computadora, de una molécula de fitasa. ...	7
Figura 5 Ruta de degradación del ácido fítico.	10
Figura 6 Microscopía electrónica de la espuma de poliuretano.	13
Figura 7 Estructura morfológica de <i>Aspergillus niger</i>	15
Figura 8 Diseño compuesto central.	18
Figura 9 Esquematización de los diferentes medios empleados.	26
Figura 10 Esquematización de la estrategia experimental.	29
Figura 11. Efecto de la concentración de inóculo sobre la producción de fitasa.	32
Figura 12. Efecto de la concentración de inóculo (barras oscuras, 1.75%; barras claras, 10%) y del contenido de humedad sobre la producción de fitasa.	33
Figura 13. a) Cinética de producción de fitasa (línea oscura) y de pH (línea clara) y b) % Humedad (línea oscura) y A_w (línea clara).	36
Figura 14. a) Cinética de producción de fitasa (línea oscura) y de pH (línea clara) y b) % Humedad (línea oscura) y A_w (línea clara).	37
Figura 15. Distribución de la probabilidad de los residuales.	43
Figura 16. a) Gráfica de superficie del efecto de la variable peptona y minerales sobre la actividad enzimática de la enzima fitasa, fijando en un valor de "0" el resto de las variables del modelo. b) Gráfica de contorno del efecto de la variable peptona y minerales sobre la actividad enzimática de la enzima fitasa, fijando en un valor de "0" el resto de las variables del modelo.	46
Figura 17. a) Gráfica de superficie del efecto de la variable ácido fítico y minerales sobre la actividad enzimática de la enzima fitasa. b) Gráfica de contorno del efecto de la variable ácido fítico y minerales sobre la actividad enzimática de la enzima fitasa.	48
Figura 18. Distribución de probabilidades de los residuales.	52
Figura 19. Gráfica de superficie del efecto de la variable peptona y minerales sobre la actividad enzimática de la enzima fitasa. b) Gráfica de contorno de la variable peptona y minerales sobre la actividad enzimática de la enzima fitasa.	55

Índice de tablas.

Tabla 1 Comparación de las propiedades básicas de fitasas obtenidas a partir de diferentes fuentes (Vats y Banerjee, 2004).	8
Tabla 2. Diseños centrales compuestos rotatorios con precisión uniforme (Kuehl, 2001).	19
Tabla 3 Medio de cultivo para la propagación de inóculos	23
Tabla 4 Medio Gibson para la producción de fitasa (Gibson, 1987)	24
Tabla 5 Combinación de niveles de concentración a experimentar de cada una de las variables	26
Tabla 6 Medios probados para la selección del medio base, en función de la actividad enzimática obtenida.	30
Tabla 7 Análisis estadístico comparativo de los medio empleados para la selección del medio base.	30
Tabla 8. Efecto de la concentración de inóculo sobre la producción enzimática	33
Tabla 9. Efecto de la humedad inicial	34
Tabla 10. Efecto de la cantidad de inóculo inicial	35
Tabla 11. Análisis estadístico de la cinética enzimática	38
Tabla 12. Niveles de los componentes del medio experimentados para la optimización del medio de cultivo.	40
Tabla 13. Composición de los medios experimentados y actividad enzimática obtenida para cada combinación	40
Tabla 14. Coeficientes del modelo cuadrático ajustado	43
Tabla 15. Estimación del coeficiente de determinación del modelo ajustado.	45
Tabla 16. Niveles experimentados para el segundo proceso de optimización	49
Tabla 17. Composición de medios experimentados y actividad enzimática obtenida para cada combinación	50
Tabla 18. Coeficientes del modelo cuadrático	52
Tabla 19. Actividad enzimática y composición de los medios de cultivo inicial y después de la optimización.	56
Tabla 20. Comparación de las actividades enzimáticas reportadas	57

1. Introducción

Un factor importante en la industria de alimentos para animales, lo constituyen las fuentes vegetales de proteínas como las semillas y los cereales, que además contienen minerales. Las semillas y cereales son reservas de nutrientes importantes como proteínas, fósforo y calcio, entre otros minerales (Harland y Oberleas, 1999). Sin embargo, se ha limitado su uso como alimento debido a la presencia de factores antinutricionales como los glucosinolatos, fenoles, inhibidores de tripsina, nitrógeno no proteico y el ácido fítico (Raboy, 2001). El ácido fítico (mio inositol hexakisfosfato) tiene la capacidad de establecer fuertes uniones iónicas con minerales esenciales en la nutrición, formando quelatos insolubles que no pueden ser absorbidos por el organismo. Los cereales y las semillas de leguminosas contienen cantidades considerables de ácido fítico (más del 1%), cuya principal función es almacenar fósforo como fuente de energía para la planta (Raboy, 2003).

Para remover el ácido fítico existen métodos como la molienda o el triturado del cereal. El remojo y la germinación de las semillas, así como los procesos de fermentación han demostrado ser los métodos más eficaces para la degradación de los fitatos presentes en las semillas y cereales. Sin embargo, el modo más frecuente para eliminar el ácido fítico, es la adición de una enzima exógena llamada fitasa, la cual ha sido aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos para su empleo en la alimentación de aves y cerdos.

La enzima fitasa se encuentra de manera natural en el tracto digestivo de algunos animales, en plantas y también es producida por microorganismos como bacterias, levaduras y hongos. *Aspergillus*, es el género de hongos filamentosos que produce la fitasa extracelular más activa y por ello es el microorganismo más empleado en la producción industrial de esta enzima (Brenes y col., 2002).

La producción comercial de fitasa por cepas de *Aspergillus niger* se realiza de manera tradicional con diversos sustratos formulados con subproductos agroindustriales, a través de cultivos de tipo sumergido y, más recientemente por fermentación en medio sólido (Roopesh y col., 2006). La fermentación en medio sólido, si bien presenta varias ventajas sobre la fermentación sumergida, también muestra algunas desventajas asociadas al escalamiento y

al control del proceso, debido a la complejidad que reviste su naturaleza heterogénea (Pérez-Guerra y col., 2003).

El objetivo del presente trabajo fue optimizar un medio de cultivo para la producción de la enzima fitasa empleando *Aspergillus niger* cultivado sobre espuma de poliuretano como soporte inerte.

2. Marco teórico

El uso de fitasas en la alimentación animal, está directamente relacionado con el aprovechamiento del fósforo presente en forma de ácido fítico en semillas y cereales frecuentemente utilizados en la dieta de animales monogástricos (como el cerdo y la gallina). En esta sección se presenta información relacionada con el fósforo y sus principales fuentes, para su uso en alimentación animal. Asimismo, se presenta una revisión acerca de la enzima utilizada comercialmente para aumentar la biodisponibilidad del fósforo presente en semillas y cereales, y los microorganismos que las producen.

2.1. Fósforo

El fósforo forma parte de un gran número de compuestos biológicos involucrados en procesos de intercambio de energía, además de que es componente de huesos, coenzimas y ácidos nucleicos, entre otros; por lo que es esencial en la nutrición humana y animal (Mathews y col., 2000). Sin embargo, alrededor de dos tercios del fósforo contenido en las materias primas de origen vegetal se encuentran en forma de fitatos, cuya disponibilidad para los animales monogástricos es prácticamente nula. Por tanto, en situaciones normales, el fósforo proveniente del ácido fítico que no es asimilado por los animales, aparece en las heces casi intacto. Una vez en el suelo, este fósforo es liberado mediante la acción de enzimas llamadas fitasas producidas por los microorganismos presentes en el suelo, y pasa a ríos y lagos, dando lugar a los fenómenos de eutricación de los reservorios acuáticos. Bajo estas circunstancias hay un crecimiento acelerado de las algas y un agotamiento del contenido en oxígeno del agua, lo que provoca mortalidad de la fauna acuática (Vallardi y col., 2002). Es así que el potencial impacto negativo del fósforo presente en el estiércol proveniente de los sistemas de producción intensiva del cerdo y pollos, se encuentra bien estudiado y documentado.

Para compensar las limitaciones del fósforo disponible de las fuentes de origen vegetal, los alimentos para los cerdos y aves generalmente tienen que ser suplementados con fosfato inorgánico, y así alcanzar los requisitos de fósforo de estos animales (Wodzinski y Ullah, 1996; Wyss y col., 1999b). Esta situación crea dos problemas al ganadero; por un lado la necesidad de suplementar las dietas con fósforo inorgánico, con el consiguiente encarecimiento del producto final, y por otro, la excreción al medio de altas cantidades de este macromineral, y por lo mismo también se intensifica el problema de contaminación ambiental.

Actualmente, la legislación sobre medio ambiente en los países desarrollados tiende a penalizar este exceso. Así, en diversas partes del mundo se han propuesto medidas legislativas; por ejemplo, en el estado de Maryland en Estados Unidos redactó el "Water Quality Improvement Act", que obliga a partir del año 2000, a la inclusión de fitasas u otros aditivos en piensos para aves y cerdos para reducir el nivel del fósforo en las deyecciones (Harter-Denis, 1999). Medidas similares han sido propuestas en los Países Bajos y otros países europeos (Jongbloed, y col., 1996 y Rodehutsord, 1998).

Además, a nivel económico el fósforo inorgánico es el tercer componente más caro presente en una ración de alimento para animales monogástricos después de las proteínas y otros compuestos para la obtención de energía (Vallardi y col., 2002).

Una alternativa para evitar la adición de fósforo inorgánico, es la suplementación del alimento con una enzima llamada fitasa, esta enzima degrada el ácido fítico (Wodzinski y Ullah, 1996), lo cual es preferible a la suplementación de fósforo inorgánico porque de esta forma se reduce la contaminación de fósforo al ambiente, producto del estiércol del animal (Wodzinski y Ullah, 1996).

La hidrólisis del ácido fítico mediante la acción de las fitasas mejora en proporciones variables la absorción y retención, por animales monogástricos, del fósforo, calcio, magnesio, zinc, cobre, hierro y aminoácidos, especialmente en dietas deficientes (Kornegay, 1999). Se ha reportado que la problemática de la contaminación ambiental por minerales puede reducirse hasta en un 50% si se utilizan alimentos ricos en fitasas naturales o cuando se adicionan fitasas exógenas (Harter-Denis, 1999). Sin embargo, los animales monogástricos

producen muy pocas cantidades o no producen fitasa, por lo que se hace necesario el empleo de fitasas exógenas.

2.2. Ácido fítico

El ácido fítico fue descrito por primera vez por Posternak en 1903 (Wodzinski y Ullah, 1996), consiste de una molécula de inositol con uno a seis grupos ortofosfato (IP6, InsP6 o Ins 6-P) unidos mediante enlaces ester (Figura 1).

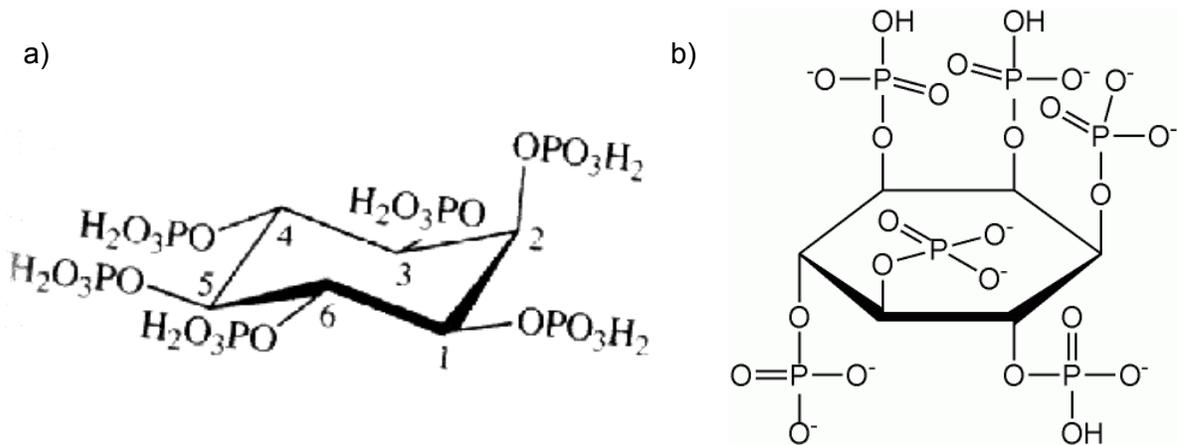


Figura 1 a) Conformación energética favorable del ácido fítico (mio-inositol hexakisfosfatado).
b) Representación tridimensional del ácido fítico.

La *International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry (IUPAC-IUB)* han reportado que la estructura del inositol, también llamado hexahidrociclohexano, tiene un total de nueve formas estereoisoméricas (IUPAC-IUB, 1968), de las cuales el mioinositol (Figura 2) es la principal estructura localizada en plantas (Raboy, 2003). Según la IUPAC, respecto al número de grupos de fosfatos substituidos en el anillo de inositol (que va de uno a seis), estos se indican en su nombre químico con los prefijos mono, bis, tris, tetrakis, pentakis y hexakis (preferentemente en lugar de: di, tri, tetra, penta y hexa). Por lo que el ácido fítico se define como como mioinositol 1, 2, 3, 4, 5, 6, hexakis dihidrógeno fosfato (IUPAC y IUPAC-IUB, 1968, IUPAC-IUB, 1977).

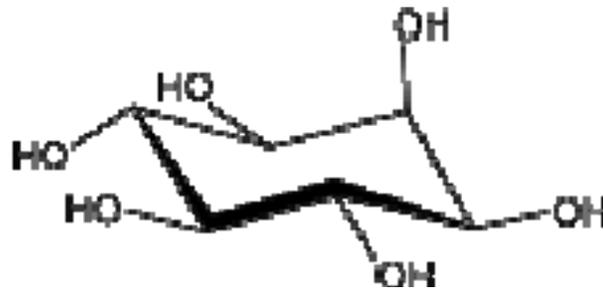


Figura 2 Conformación energética más favorable del mio-inositol.

El ácido fítico contiene un 28.2% de fósforo y posee seis grupos ortofosfato con afinidad variable por ciertos cationes y aminoácidos, tiene una fórmula molecular $C_6H_{18}O_{24}P_6$ y un peso molecular de 659.86g/mol (Vohra y Satyanarayana, 2002).

Aproximadamente, el 75% del fósforo presente en semillas, leguminosas y cereales se encuentra como ácido fítico, el cual es un compuesto considerado como un factor antinutricional debido a su propiedad de quelación de cationes divalentes como el magnesio, zinc, calcio, cobalto y el hierro, y cationes trivalentes como el aluminio y hierro (Quan y col., 2003); además de minerales traza como el manganeso, molibdeno y el cobre. Aunado a esto, el ácido fítico puede interactuar con proteínas (Pandey y col., 2001; Martínez y col., 1996), lo que reduce la biodisponibilidad de proteínas y minerales importantes, presentes en los nutrientes vegetales (Figura 3).

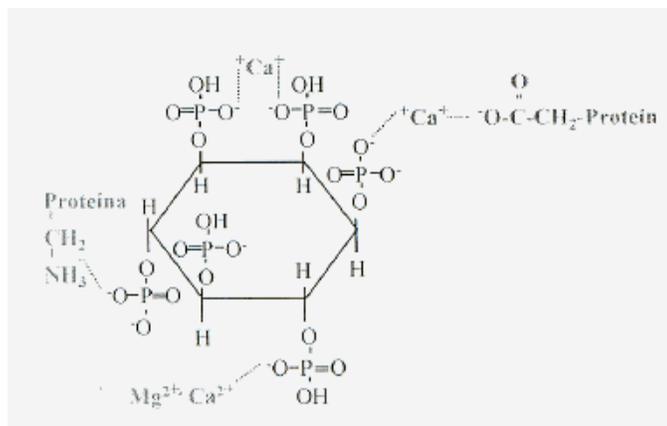


Figura 3 Interacción del ácido fítico con proteínas y minerales (Thompson, 1987).

Un método para remover el ácido fítico de las semillas, leguminosas y cereales, es el tratamiento enzimático con fitasas.

2.3 Fitasa

Las fitasas son enzimas que pertenecen a una subfamilia de las fosfatasas. Las fosfatasas son un conjunto diferenciado de enzimas que se clasifican a su vez en fosfatasas alcalinas, fosfatasas ácidas de alto y bajo peso molecular y fosfatasas-proteína (Vincent y col., 1992).

Algunos ejemplos de la Familia de las “fosfatasas ácidas” son:

- Fosfatasa ácida pH 2.5 (gene *appA*) de *Escherichia coli*
- Glucosa-1-fosfatasa (EC 3.1.3.10) (gene *agp*) de *Escherichia coli*
- Fitasas A y B (EC 3.1.3.8) (gene *phyA* y *phyB*) del género *Aspergillus*
- Fosfatasas ácidas lisosomal y prostática de mamíferos.

Entre las fosfatasas, las fosfatasas ácidas (EC 3.1.3.2) son un grupo heterogéneo de proteínas que hidrolizan las uniones fosfomonoester del fitato (sales de myo-inositol hexakisfosfato) o del myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis dihidrógeno fosfato (ácido fítico), produciendo fosfatos del myo-inositol de estequiometría variable y fosfato inorgánico (Ullah, 1988, Ullah y Phillippy, 1994). Es decir, son capaces de catalizar la hidrólisis de los fosfatos monoesterificados del ácido fítico (IP6), dando lugar de forma progresiva a la formación de inositol-5 fosfato (IP5), inositol-4 fosfato (IP4), inositol-3 fosfato (IP3), inositol-2 fosfato (IP2) e inositol-1 fosfato (IP1) (myoinositol fosfatos, myo-inositol, y fósforo inorgánico) (Frossard y col., 2000).

Las fitasas (mioinositol hexakisfosfato fosfohidrolasas, EC 3.1.3.8 y 3.1.3.26), están catalogadas como enzimas que pertenecen a una “subfamilia de las fosfatasas ácidas” (Ostanin y col., 1992), y reciben su nombre según la posición específica en donde comienza la hidrólisis en el grupo éster fosfato en la molécula del fitato. La mayoría de las fitasas conocidas pertenecen a las 3-fitasas (EC 3.1.3.8) o 6-fitasas (EC 3.1.3.26) (Lassen y col., 2001), aunque se han reportado excepciones como lo es una fitasa alcalina del polen de la azucena, la cual inicialmente hidroliza el grupo 5-fosfato (Barrientos y col., 1994). Las fitasas fúngicas y bacterianas se caracterizan generalmente por liberar cinco de los seis fosfatos (Wyss y col., 1999a).

La estructura cristalina a una resolución de 2,5 Å. muestra que la fitasa (Figura 4) es una fosfatasa ácida de alto peso molecular.

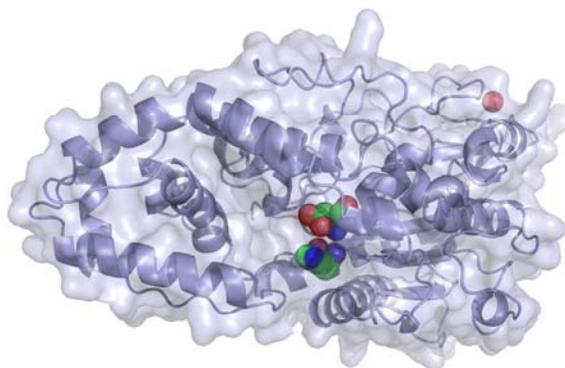


Figura 4 Imagen de tridimensional, generada por computadora, de una molécula de fitasa.

Las fitasas se pueden clasificar en función de su pH óptimo como fitasas ácidas y alcalinas; también pueden clasificarse en función de la posición del carbono del anillo de mio-inositol en la molécula de fitato en el que la fitasa comienza el proceso de desfosforilación. De acuerdo con lo anterior, las fitasas se clasifican en:

- 3-fitasa (E.C. 3.1.3.8)
- 6-fitasa (E.C. 3.1.3.26)
- 5-fitasa (E.C. 3.1.3.72).

La presencia de la fitasa, ha sido reportada en un gran número de semillas, incluyendo la soya, frijoles y el trigo, entre otras (Gibson y Ullah, 1988). Sin embargo, aún cuando los alimentos empleados para la alimentación contengan fitasa nativa, durante el procesamiento del alimento, la enzima puede inactivarse debido a las condiciones de temperatura y pH utilizadas (Wodzinski y Ullah, 1996). Cuando las semillas se encuentran en proceso de germinación, hay un incremento en los niveles de fitasa; una vez terminada la germinación, el ácido fítico presente desaparece de los tejidos; lo cual se atribuye al incremento en la actividad de esta enzima.

La mayoría de las fitasas que han sido purificadas y caracterizadas (Tabla 1) tienen un tamaño molecular de 36 a 120kDa.

Tabla 1 Comparación de las propiedades básicas de fitasas obtenidas a partir de diferentes fuentes (Vats y Banerjee, 2004).

Fuente	Peso Molecular (kDa)	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	Constante de Michaelis (mM)	Referencias
<i>Bacillus subtilis</i>	36-38	6.0-6.5	60	0.50	Kerovuo y col., 1998, 2000
<i>Escherichia coli</i>	42	4.5	60	0.13	Greiner y col., 1993
<i>Pseudomonas syringae</i>	45	5.5	40	0.38	Cho y col., 2003
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	120	2.0–2.5, 5.0–5.5	55–60		Han y col., 1999
<i>Aspergillus niger</i> (phyA)	85	2.5, 5.0	58	0.03	Ullah y Gibson, 1987
<i>Aspergillus niger</i> (phyB)	68	2.5	63	0.10	Ehrlich y col., 1993, Ullah y Cummins, 1987
Maíz	76	4.8	55	0.12	Laboure y col., 1993
Soya	60	4.5-4.8	55	0.05	Gibson y Ullah. 1988

2.4 Microorganismos productores de fitasa.

Se han reportado muchos microorganismos productores de fitasa, en 1962 en Estados Unidos por ejemplo, se enlistaron más de 2000 organismos con esta actividad (Wodzinski y Ullah, 1996). De entre los microorganismos que pueden producir la enzima fitasa se encuentran: *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus oryzae*, *R. oligosporus*, *R. stolonifer*, *Penicillium sp.*, *Mucor primorffis*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus amstelodami*, *A. chevalieri*, *A. candidus*, *A. niger*, *A. ficum*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. vesicolor*, entre otros (Wodzinski y Ullah, 1996).

En relación a las fitasas producidas por bacterias, se ha detectado que se producen en una gran variedad de estos microorganismos tales como *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas sp.* (Wodzinski y Ullah 1996), *Klebsiella pneumoniae* (Wang y col., 2004), y *Escherichia coli.* (Nagashima y col., 1999). Sin embargo, este tipo de fitasas presentan varios inconvenientes:

- Sólo la fitasa producida por el *Bacillus subtilis* es extracelular.
- Las fitasas bacterianas presentan bajo rendimiento productivo.
- Su pH neutro-alcalino que necesitan hacen prácticamente inútil su empleo como aditivos para piensos (Wodzinski y Ullah, 1996).

Este tipo de fitasas que también se encuentran en la flora microbiana del intestino grueso, aunque tienen una actividad hidrolítica sobre los fitatos, no ejercen ningún efecto beneficioso observable para el animal, ya que el fósforo liberado no se absorbe y es totalmente excretado (Brenes y col., 2002).

Las fitasas de origen fúngico, EC 3.1.3.8 (IUPAC-IUB, 1984) de nombre sistemático: mioinositolhexakisfosfato 3-fosfohidrolasa, y de nombre común: 3-fitasa (otros nombres empleados son: 1-fitasa; fitasa; fitasa 1 fosfatasa; fitasa 3- fosfatasa), se conocen en una gran cantidad de especies de hongos y levaduras. Entre este tipo de fitasas, destacan las producidas por levaduras como *Schwanniomyces castellii* y *Saccharomyces cerevisiae* (Nagashima y col., 1999) y las producidas hongos como *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *A. fumigatus*, *Emericella nidulans*, *Myceliophthora thermophila*, y *Talaromyces thermophilus* (Wyss y col., 1999b).

De todos los organismos estudiados (plantas, bacterias y hongos), el *A. ficum*, es el que produce la fitasa extracelular más activa. *Aspergillus ficum* fue localizado en el grupo taxonómico de *Aspergillus niger* (Wodzinski y Ullah, 1996). Sin embargo, posteriores estudios de ADN sugirieron que *Aspergillus ficum* no era un especie válida, por lo que se conservó la designación de *Aspergillus niger* (Frisvad y col, 1990, Peterson, 1992).

Para fines comerciales, las fitasas utilizadas, son producidas principalmente por hongos del género *Aspergillus*. Estos hongos (cuyas características y taxonomía es explicada más adelante) producen enzimas extracelulares del tipo 3-fitasa con capacidad hidrolítica del IP6 sobre el grupo ortofosfato situado en posición 3 de la molécula, dando lugar a Dmyoinositol 1, 2, 4, 5, 6-pentakifosfato y una molécula de ortofosfato (Brenes y col., 2002). Estas fitasas no hidrolizan completamente el IP6, siendo incapaces de degradar el éster monofosfórico (IP1) (Wodzinski y Ullah, 1996); para ello la adición de una fosfatasa ácida (EC 3.1.3.2) permite acelerar y completar esta desfosforilización (Zyla, 1993).

El hongo *Aspergillus niger* produce dos tipos de fitasas: la fitasa tipo A (phyA) con dos valores de pH óptimos (2.5 y 5.5), y la fitasa tipo B (phyB) cuyo pH óptimo se ubica cercano a 2.0. Este hongo, produce también otra fosfatasa ácida con un pH óptimo de 6 (Wodzinski y Ullah, 1995).

En la Figura 5, se muestra una representación de la ruta de degradación del ácido fítico por *Aspergillus niger* (Chen y Li, 2003):

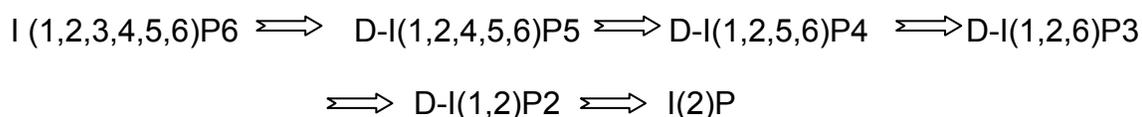


Figura 5 Ruta de degradación del ácido fítico.

La actividad fitasa se mide en unidades de actividad enzimática, que se definen como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 micro mol de fosfato inorgánico por minuto. En general, las condiciones de reacción para determinar la actividad enzimática son pH 5.5 y temperatura de 37°C.

La FDA ha aprobado la utilización de la fitasa para su uso en alimentos, por lo que ha sido comercializada para estos fines en los Estados Unidos desde 1996.

2.5 Producción microbiana de fitasas

Los procesos microbianos involucran un conjunto de reacciones catabólicas productoras de ATP, en las cuales, moléculas orgánicas e inorgánicas actúan como donadores primarios y aceptores finales de electrones (Cox y Nelson, 2005). Como producto de estas reacciones se producen compuestos de utilidad práctica para el hombre.

Es una costumbre hablar de fermentaciones para referirse, en el ámbito industrial, a los procesos microbiológicos de producción de tales compuestos (Brock y col., 1987 y Scriban, 1985).

La mayoría de las fermentaciones industriales en la sociedad occidental han utilizado y desarrollado la denominada “fermentación en medio líquido” (FML) o “sumergida” (SmF) (Hesseltine, 1972). En ella, los microorganismos son inoculados en un medio de cultivo líquido. El medio de cultivo consiste en una solución o suspensión acuosa de nutrientes que se agita a fin de obtener un adecuado contacto entre todos los componentes del medio (Scriban, 1985).

También existe otra técnica de fermentación denominada “fermentación en medio sólido (FMS)”, la cual se define como el crecimiento de microorganismos en medios sólidos o semi-sólidos en presencia de un bajo contenido de agua libre (Pandey, 2003). Esta técnica ha sido aplicada desde la antigüedad en la preparación de alimentos fermentados. Generalmente, en este tipo de fermentaciones el sustrato no está disuelto ni en suspensión. La FMS puede ser definida más exactamente como una técnica de cultivo de microorganismos sobre la superficie de partículas sólidas humedecidas a un grado tal que permite el crecimiento de dichos microorganismos pero no excede el nivel de retención máxima de agua de la matriz sólida, de manera que se forma una fase gaseosa en los espacios existentes entre las partículas sólidas (Minjares y col., 1997). La FMS es un proceso microbiano que se desarrolla en la superficie y en el interior de una matriz sólida (Lonsane y col., 1985), que tiene la propiedad de absorber o contener agua, con o sin nutrientes solubles. Los materiales sólidos pueden ser o no biodegradables, por ejemplo, almidón y celulosa son soportes degradables, mientras que el poliuretano no lo es. El crecimiento de los microorganismos en FMS requiere que éstos crezcan sobre un soporte que difunda nutrientes, bajo una atmósfera gaseosa (Viniegra-González y col., 2003).

Doelle y col. (1992) consideran como ventajas de la FMS los siguientes aspectos:

- Los medios de cultivo son simples, generalmente se emplean subproductos agrícolas que presentan un alto contenido de los nutrientes necesarios.
- La baja actividad del agua (A_w) es de gran ayuda para evitar las contaminaciones, especialmente de bacterias y levaduras.
- La concentración natural del sustrato permite utilizar reactores más pequeños, en comparación con los utilizados en otro tipo de fermentación.
- Tiene mayor productividad volumétrica.
- La aireación forzada es facilitada por la porosidad del soporte, lo que permite una alta transferencia de oxígeno al microorganismo.
- Pueden emplearse, frecuentemente conidios como inóculo en los procesos de crecimiento de hongos, lo cual disminuye los costos y las manipulaciones en la preparación del inóculo.
- Los conidios de los hongos que se producen son mucho más resistentes y tienen mejor adaptabilidad a las condiciones en las que se aplican como agente de biocontrol.
- Los procesos se consideran generalmente como tecnologías limpias.

Sin embargo, este tipo de fermentación tiene algunas desventajas, entre las cuales pueden destacarse el excesivo espesor de la capa de sustrato y la baja porosidad de algunos soportes, todos estos factores pueden limitar la ventilación, la remoción de calor y la absorción de nutrientes.

Entre los materiales no biodegradables utilizados como soporte para los procesos de FMS destacan la amberlita (Auria y col., 1995), la agrolita y la espuma de poliuretano (Díaz-Godínez y col. 2001). A diferencia de la agrolita y la amberlita, la espuma de poliuretano (PUF) presenta una alta capacidad de retención de agua y facilita la extracción de los productos del metabolismo microbiano.

2.6 Espuma de poliuretano (PUF)

El uso de soportes inertes para la FMS, permite la extracción de los productos de fermentación sin necesidad de incrementar las etapas de separación, además de que su uso favorece la aireación del sistema de cultivo (Auria y col., 1995). Por su alta porosidad, baja densidad y alta absorción de agua, la espuma de poliuretano (Figura 6) se ha utilizado como soporte para procesos de FMS.

La PUF tiene un tamaño de poro que favorece el crecimiento de hongos. Además, su uso facilita la obtención de extractos enzimáticos y permite el uso de medios de cultivo definidos, lo que genera un número reducido de impurezas, facilitando la purificación de los productos (Auria, 1995, Diaz-Godinez, 2001 y Van de Lagemaat y Pyle, 2005).

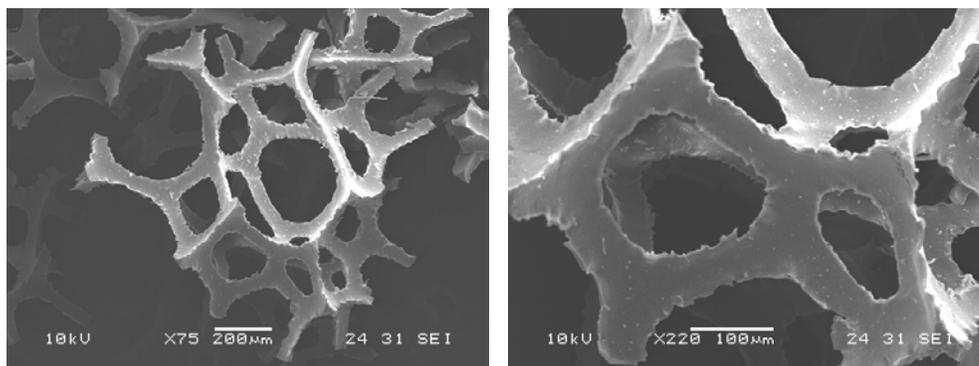


Figura 6 Microscopía electrónica de la espuma de poliuretano.

2.7 Género *Aspergillus*

Las especies del género *Aspergillus* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, pudiéndose aislar de una gran variedad de substratos (Abarca, 2000). Los hongos del género *Aspergillus* adoptaron en la naturaleza un estilo de vida saprófito, que los hizo capaces de utilizar un rango muy amplio de materiales como fuente de nutrientes, esto significa que deben de existir diferentes rutas bioquímicas para la asimilación de todas las fuentes de carbono y nitrógeno susceptibles de ser degradadas. Por lo que este género de hongo produce una variedad de sustancias.

Dentro del grupo de los *Aspergillus*, los más usados en la industria son los miembros del grupo *Aspergillus niger* o conocidos también como *Aspergillus* “sección *Nigri*”, caracterizándose este grupo, porque están distribuidos a nivel mundial, y por ser considerados los hongos más comunes que se presentan en la descomposición de los alimentos (Raper y Fennell, 1965). Se debe destacar que los *Aspergillus*, aunque también son reconocidos como patógenos oportunistas, los miembros pertenecientes a la sección *Nigri* normalmente se consideran como hongos benignos (Abarca y col., 2004).

La principal aplicación de *A. niger*, se encuentra la producción de enzimas empleadas en la industria alimentaria, tales como la amilasa, amiloglucosidasa, celulasas, lactasas, pectinasas, proteasas ácidas y fitasas.

El género *Aspergillus* es un género mitospórico que se caracteriza por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas que originarán las esporas asexuales o conidios (Abarca, 2000).

Sobre el conidióforo característico presente en los *Aspergillus*, aunque es una estructura unicelular posee cuatro partes bien diferenciadas:

- Vesícula (extremo apical hinchado, o ápice hinchado).
- Fiálides (célula conidiógena) células que se disponen sobre la vesícula.
- Estipe (parte media) sección cilíndrica situada debajo de la vesícula.
- Célula pie (parte basal) sección final, a veces separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio.

En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas métulas (célula soporte). Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan uniseriadas, y las que presentan fiálides y métulas, biseriadas (Abarca, 2000) (ver Figura 7).

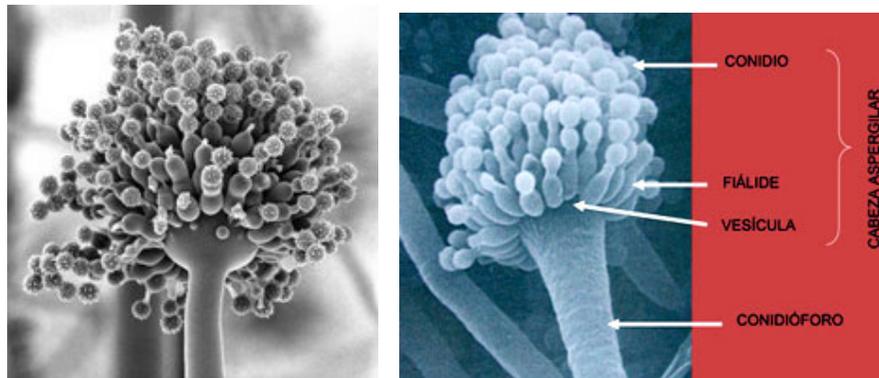


Figura 7 Estructura morfológica de *Aspergillus niger*

La mayor distinción que se usa actualmente para la separación de especies de *A. niger*, de las otras especies de *Aspergillus*, es la producción de esporas color negro carbón o castaño muy oscuro, que presentan las fiálides biseriadas (Raper y Fennell, 1965). Otros rasgos incluyen conidióforos uniformes y generalmente descoloridos y esporas que de $\leq 5 \mu\text{m}$, globosa, teniendo crestas manifiestas o espinas no ordenadas en filas (Raper y Fennell, 1965).

2.8 Procesos de optimización

En esta sección se presenta información relacionada con las metodologías estadísticas para la optimización

Pueden ocurrir situaciones en las cuales sea imperativa la optimización de los medios de cultivo (Ertola y col., 1994). Entre ellas podemos mencionar las siguientes:

- La carencia de información respecto a coeficientes de rendimiento de macro y micro elementos para el cultivo un microorganismo determinado
- La existencia de limitaciones nutricionales ocultas, especialmente de microelementos y factores de crecimiento
- El uso de medios de cultivo que contengan elementos en exceso, con respecto a los requerimientos nutricionales del microorganismo en cuestión, que pueden causar inhibición del crecimiento
- El ensayo de sustancias estimulantes, activadoras e inhibidoras del crecimiento y formación del producto
- El empleo de fuentes nutricionales no convencionales

- La búsqueda de una mayor producción y productividad del compuesto de interés en medios de cultivo de menor costo

Al respecto, existen en la literatura diferentes ejemplos sobre técnicas que hacen posible la optimización de un medio de cultivo. La mayoría de éstas, basan la formulación de los mismos en la composición elemental del microorganismo a estudiar o de otros similares que puedan servir de referencia para realizar un balance de materia apropiado. En la mayoría de los casos, la optimización de los medios de cultivo con fines industriales ha sido realizada mediante procedimientos empíricos de ensayo y error, no sólo en la formulación del medio de cultivo, sino también en las condiciones de operación. De cualquier manera, es probable que el medio de cultivo original pueda optimizarse modificando el contenido de los componentes del mismo y las materias primas utilizadas, siendo factible en muchos casos, optimizar un medio de tal manera que no sea solamente más productivo, sino de menor o igual costo que el original, para lo cual se requiere del uso de métodos racionales de optimización.

Un aspecto relevante en la optimización de un medio de cultivo de interés industrial, no es sólo el logro de una formulación del mismo, sino también la posible inclusión de materias primas de bajo costo que hagan rentable el proceso. Ello ha llevado a la búsqueda de subproductos de bajo valor comercial que puedan sustituir componentes costosos y que puedan ser utilizados como fuentes de carbono o nitrógeno.

En el desarrollo de cualquier proceso de fermentación, la optimización de las variables del proceso, en particular, los parámetros físicos y químicos, es de gran importancia debido a su impacto en la economía y la viabilidad del proceso. Los métodos de optimización clásica consisten en la variación de un sólo factor, manteniendo los demás factores constantes. Este método no es adecuado para la optimización de factores múltiples, no sólo porque implica mucho tiempo, sino también porque es incapaz de detectar el verdadero óptimo, debido sobre todo, a las interacciones entre los factores (Liu y Tzeng, 1998 y Weuster-Botz, 2000). La limitación en este método se evita mediante un diseño estadístico llamado factorial, el cual, consiste en una colección de estrategias experimentales, métodos matemáticos e inferencias estadísticas.

Los diseños estadísticos permiten además explicar las interacciones entre los diferentes factores (Elibol, 2004 y Liu y Tzeng, 1998). Estos diseños han sido aplicados para optimizar los procesos de fermentación, precisamente en el cultivo de *Aspergillus* (Jahani y col., 2008) y para la producción de la enzima fitasa (Vohra y Satyanarayana, 2002, Singh y Satyanarayana, 2008, Sunitha y col., 2000, Kaur y Satyanarayana, 2005 y Li y col., 2008). El diseño compuesto central es uno de los diseños más empleados para la optimización de medios de cultivo (Dey y col., 2001 y Vohra y Satyanarayana, 2002).

2.9 Métodos de optimización

2.9.1 Superficies de respuesta

La metodología de superficies de respuesta es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles para modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés es influenciada por varias variables, y el objetivo es optimizar esta respuesta (Kuehl, 2001)

La metodología de superficies de respuesta es una técnica secuencial, ya que en primer lugar, se establece la región donde se encuentra el punto óptimo, y a partir de esta información, se gira el experimento a la cercanía general del punto óptimo. De esta manera, el objetivo eventual de la metodología de superficies de respuesta consiste en determinar las condiciones de operación óptima para un sistema, o determinar la región del espacio de los factores en los que se satisfacen las condiciones de operación. Sin embargo, la metodología de superficies de respuesta garantiza la convergencia solo a un óptimo relativo (Montgomery, 2000). El ajuste de superficies de respuesta, se facilita con la elección de un diseño experimental apropiado.

Las características deseables que debe cumplir dicho diseño son (Montgomery, 2000):

- Proporcionar una distribución razonable de puntos de datos (y por tanto información) en toda la región de interés
- Permitir la determinación de la idoneidad del modelo (incluyendo la falta de ajuste)
- Permitir la realización de experimentos en bloques
- Permitir la construcción secuencial de experimentos de orden superior
- Proporcionar una estimación de error instantánea
- No requerir un número grande de corridas

- No requerir demasiados niveles de las variables independientes
- Asegurar simplicidad de los cálculos de los parámetros del modelo.

Un diseño experimental para ajustar un diseño de segundo orden debe tener por lo menos tres niveles de cada factor. Existen diseños que pueden emplearse para ajustar un modelo de segundo orden, así que elegir un diseño apropiado es útil para establecer un criterio de diseño. Para el modelo de primer orden, la ortogonalidad es una propiedad de diseño óptima, ya que minimiza la varianza de los coeficientes de regresión. La ortogonalidad, también es deseable en el caso de primer orden debido a que resulta ser una propiedad muy conveniente para la varianza de la respuesta predicha (Montgomery, 2000).

Se dice que un diseño experimental es rotatable o girable, si la varianza de la respuesta predicha en algún punto es función sólo de la distancia al punto desde el centro de diseño y no es una función de dirección. Además, un diseño con esta propiedad dejará sin cambio a la varianza (Box y Draper, 1987).

2.9.2 Diseño compuesto central

El diseño compuesto central (Figura 8) está constituido por un diseño factorial fraccionado (2^{k-1}), además de la utilización de puntos centrales y puntos axiales para la estimación del modelo cuadrático y del error puro (Kuehl, 2001). En la Tabla 2 se muestran el número de experimentos necesarios para la realización de un diseño central. La totalidad de las combinaciones para un diseño compuesto central con un diseño factorial fraccionado 2^{6-1} se presentan en la Tabla 1 del Anexo.

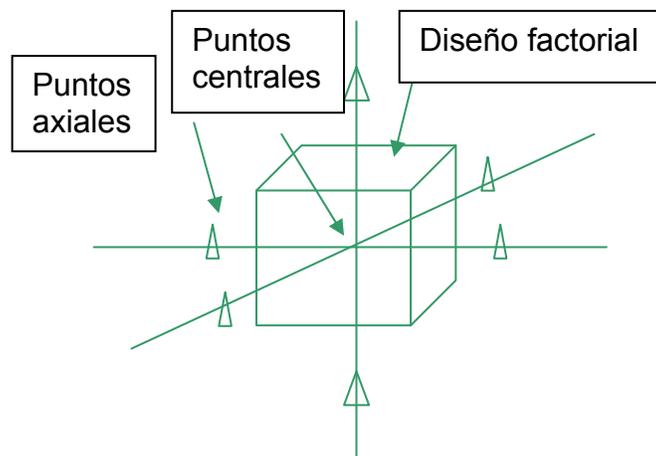


Figura 8 Diseño compuesto central

Tabla 2. Diseños centrales compuestos rotatorios con precisión uniforme (Kuehl, 2001)

Número de factores	2	3	4	5	5	6	6
Factor 2ⁿ	1	1	1	1	½	1	½
α	1.414	1.682	2.000	2.378	2.000	2.828	2.378
N_f	4	8	16	32	16	64	32
N_a	4	6	8	10	10	12	12
M	5	6	7	10	6	15	9
N	15	20	31	52	32	91	53

donde:

- α Constante de rotabilidad para puntos axiales
- N_f** Número de experimentos requeridos en el diseño factorial
- N_a** Número de experimentos requeridos para los puntos axiales
- M** Número de experimentos requeridos para los puntos centrales
- N** Número total de experimentos.

3. Justificación

En años recientes, se han incrementando las publicaciones que reportan las ventajas que tiene la FMS con respecto a la FML, principalmente en la producción de metabolitos de origen fúngico y especialmente en la producción de enzimas. Sin embargo, una de las desventajas críticas de la FMS al emplear subproductos de la agricultura tales como el salvado de trigo, bagazo de caña, borra de café, entre otros, es que se producen gran cantidad de otras proteínas adicionales a las deseadas. Esas proteínas representan un problema cuando se trata de obtener un producto con alto grado de pureza.

En algunas obras ya se ha informado sobre la optimización de la producción de la enzima fitasa empleando *Aspergillus niger* y subproductos agroindustriales. Sin embargo, no se ha reportado información sobre la optimización de la producción de fitasa sobre espuma de poliuretano. Por lo que, en este proyecto se propuso la utilización de espuma de poliuretano como soporte inerte para lograr la optimización de la producción de la enzima fitasa, y la posible reducción de posteriores etapas de purificación de esta enzima.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Optimizar la composición de un medio de cultivo para la producción de fitasa por *Aspergillus niger* a través de fermentación en medio sólido cultivado sobre espuma de poliuretano como soporte inerte.

4.2 Objetivos particulares

- Evaluar la concentración del inóculo y humedad en el medio para producir fitasa por FMS utilizando espuma de poliuretano como soporte y estimar el tiempo de fermentación donde se observe la mayor actividad enzimática.
- Establecer la composición del medio base para la producción de la enzima fitasa en FMS por *Aspergillus niger*, utilizando espuma de poliuretano como soporte inerte.
- Seleccionar las variables y los niveles a emplear en la optimización de las concentraciones de los componentes del medio base.
- Optimizar el medio de cultivo a ser empleado en la producción de la fitasa en FMS por *Aspergillus niger*, utilizando espuma de poliuretano como soporte inerte.

5. Materiales y métodos

5.1 Soporte inerte

Se empleó espuma de poliuretano de baja densidad como soporte inerte par realizar la fermentación en medio sólido. La espuma de poliuretano se cortó en muestras de aproximadamente 0.3cm³ y se llevó a ebullición con agua destilada por aproximadamente 10 minutos; posteriormente, se lavó tres veces con agua destilada y luego se dejó secar durante toda la noche a 60°C.

5.2 Microorganismo

Se empleó una cepa de *Aspergillus niger* la cual es reportada como sobreproductora de fitasa. Se conservó en tubos inclinados con medio Agar Papa Dextrosa (PDA).

5.3 Conservación de cepas

La conservación se basó en una metodología que ha sido probada con éxito para *Aspergillus niger* (Loera y col., 1999). A continuación se describe la secuencia de pasos realizados:

1. Se propagaron las cepas en medio para esporulación (PDA)
2. Se cosecharon las esporas para lograr una concentración de 1×10^7 esporas por mililitro, usando Tween 80 (al 0.05%) disuelto en agua destilada
3. Con material estéril, se adicionaron 100mL de la suspensión de esporas del paso dos viales previamente esterilizados. Se homogenizó con un vórtex para distribuir las esporas en todos los granos de sílica gel. Se realizó un control negativo poniendo 100mL (sin esporas) en un vial extra (ver paso 11) y se trató como los demás viales
4. Se colocaron los viales inoculados y etiquetados en un desecador con vacío (con la tapa ligeramente abierta)
5. Se tapó rápidamente cada vial, poniéndole una capa de parafilm en la tapa
6. Se guardó el grupo de viales en otro desecador a temperatura ambiente
7. Se realizó el control de viabilidad para cada cepa a los 10 días de haberlos conservado. Para ello, se sembraron unos cuantos granos de los viales y se propagaron en su totalidad en cajas petri. Cada vial alcanzó para un total de cinco cajas tipo Petri
8. Se realizó un control negativo (100mL de leche descremada sin esporas) en la misma prueba de viabilidad, se descartó cualquier posible contaminación arrastrada en la solución con la que se cosecharon las esporas.

En la prueba de viabilidad las cepas crecieron sin contaminación y en el control negativo no hubo crecimiento alguno, por lo que las cepas se conservaron y se etiquetó bien cada vial.

Con esta metodología se pueden conservar los viales hasta por cinco años como máximo. Se recomienda la resiembra de cada cepa una vez al año, que es cuando se practica otra prueba de viabilidad y se generan nuevas esporas.

5.4 Medios de cultivo

5.4.1. Medio de mantenimiento y esporulación

El medio de mantenimiento y esporulación de la cepa fue medio agar papa dextrosa (PDA). El medio se preparó disolviendo 39g de medio PDA (Bioxon) en un litro de agua destilada; se agregaron 50 mL de medio PDA a matraces de 250mL. El medio se esterilizó a 121°C durante 15 minutos y, una vez frío, se inoculó con 500µl de suspensión de esporas con una concentración de 1×10^7 esporas por mililitro.

5.4.2. Medio para la propagación de inóculo

En la Tabla 3 se presenta la composición del medio de cultivo utilizado para la propagación de inóculos. El medio se esterilizó a 121°C durante 20 minutos.

Tabla 3 Medio de cultivo para la propagación de inóculos

Componente	Concentración (g/100mL)
Almidón	2.80
Peptona	1.80
Glucosa	0.50
KCl	0.05
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.15
KH ₂ PO ₄	0.10
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.20

Medio semilla. Se llevó a cabo en matraces tipo Erlenmeyer de 250mL con 50mL de medio de cultivo y fue inoculado con todo con dos pedazos (0.5x0.5cm) de colonia de *Aspergillus niger* crecida en medio PDA. Se incubó a 30°C bajo agitación (200rpm) durante tres días.

5.4.3. Medio para producción de fitasa

Para la producción de fitasa se empleó un medio de cultivo reportado por Gibson (1987), el cual es descrito en la Tabla 4.

El medio se preparó en matraces Erlenmeyer de 125mL, a los cuales se les agregó 1.6g de PUF y 9.6mL del medio, todos los componentes se mezclaron para homogeneizar el soporte y el medio. Los matraces preparados con el medio se esterilizaron a 121°C durante 30 minutos, se inocularon y se incubaron a 30°C durante cuatro días.

Tabla 4 Medio Gibson para la producción de fitasa (Gibson, 1987)

Componente	Concentración (g/100mL)
Glucosa	3.0
Almidón	1.0
KCl	0.05
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.01
NaNO ₃	0.86

5.5 Obtención del extracto enzimático crudo

Al término de la fermentación, el PUF se filtró a vacío en un embudo Büchner y el extracto obtenido se filtró nuevamente a través de membranas de 0.8 µm (Millipore) y después por membranas de 0.4 µm. El matraz y la espuma se lavaron con agua destilada en una cantidad igual al volumen de extracto obtenido y se mezclaron. Lo anterior se realizó con la finalidad de solubilizar toda la proteína presente. Este procedimiento se realizó en cada fermentación.

5.6 Actividad enzimática

Se empleó un método espectrofotométrico para lo cual, se pasó un gramo del medio de fermentación sólida a un tubo de ensayo con 20mL de agua destilada, se agitó durante dos minutos en un vórtex (Caframo Leax2000) para obtener un extracto enzimático. Se tomaron 0.5 mL de este extracto y se le adicionaron 4.5mL de agua destilada para diluirlo. En otro

tubo de ensayo se preparó 2.5mL de fitato de sodio 3mM en buffer de acetato 1M a pH de 5.5 y se adicionó 0.5mL del extracto enzimático diluido (Fiske y Subarrow, 1925). Posteriormente se incubó en un baño de agua (Lauda MAG) a temperatura controlada de 37°C durante 30 minutos.

Para detener la reacción, en otro tubo con 0.9mL de ácido tricloro acético (TCA) al 8.9% adicionados previamente, se puso 0.1mL de la reacción enzimática del primer tubo, se agitó y dejó reposar durante 10 minutos. Después de los 10 minutos de reposo se agregó al tubo con TCA 0.5mL de Molibdato de Amonio (preparado con 1.25% de molibdato de amonio y H₂SO₄ 2.5N), también se agregó 4.5mL de agua destilada y el reactivo de Fiske y Subarrow (se preparó aforando 1.5873g del reactivo en 10mL de agua destilada, se agitó y dejó reposar durante 10 minutos). Posteriormente se procedió a leer a 660nm en un espectrofotómetro (SHIMADZU UV-160A), los resultados se obtuvieron interpolando los puntos correspondientes a las muestras analizadas, en una curva estándar realizada previamente y se consideró la humedad de la muestra para obtener la actividad enzimática por gramo de medio sólido.

La actividad se calculó interpolando la absorbancia correspondiente a las muestras analizadas, en una curva estándar realizada con concentraciones de fosfato inorgánico en el rango de 0.15 – 2.5 µmoles. Una unidad de actividad fitasa (PU), se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un microgramo de fosfato inorgánico por minuto a pH de 5.5 a 37°C.

En la Figura 9 se muestra el orden cronológico de los pasos realizados para realizar la fermentación en medio sólido.



Figura 9 Esquemización de los diferentes medios empleados

5.7 Proceso de optimización

Para la optimización del medio de cultivo, con la actividad fitasa como variable de respuesta, se empleó un diseño factorial fraccional (2^{k-1}). Para lo cual, se probaron 32 combinaciones (2^{6-1}), más nueve puntos centrales y 12 puntos axiales, y cada variable en el diseño se estudió en cinco niveles diferentes ($-\alpha, -1, 0, 1, +\alpha$). Las combinaciones de los niveles experimentados se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5 Combinación de niveles de concentración a experimentar de cada una de las variables

Tratamiento	Glucosa	Almidón	Peptona	Ácido fítico	Fósforo	Minerales
1	1	1	1	1	1	1
2	-1	1	1	1	1	-1
3	1	-1	1	1	1	-1
4	-1	-1	1	1	1	1
5	1	1	-1	1	1	-1
6	-1	1	-1	1	1	1
7	1	-1	-1	1	1	1
8	-1	-1	-1	1	1	-1
9	1	1	1	-1	1	-1
10	-1	1	1	-1	1	1
11	1	-1	1	-1	1	1
12	-1	-1	1	-1	1	-1
13	1	1	-1	-1	1	1
14	-1	1	-1	-1	1	-1
15	1	-1	-1	-1	1	-1
16	-1	-1	-1	-1	1	1

Tratamiento	Glucosa	Almidón	Peptona	Ácido fítico	Fósforo	Minerales
17	1	1	1	1	-1	-1
18	-1	1	1	1	-1	1
19	1	-1	1	1	-1	1
20	-1	-1	1	1	-1	-1
21	1	1	-1	1	-1	1
22	-1	1	-1	1	-1	-1
23	1	-1	-1	1	-1	-1
24	-1	-1	-1	1	-1	1
25	1	1	1	-1	-1	1
26	-1	1	1	-1	-1	-1
27	1	-1	1	-1	-1	-1
28	-1	-1	1	-1	-1	1
29	1	1	-1	-1	-1	-1
30	-1	1	-1	-1	-1	1
31	1	-1	-1	-1	-1	1
32	-1	-1	-1	-1	-1	-1
33	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0
41	0	0	0	0	0	0
42	2.378	0	0	0	0	0
43	-2.378	0	0	0	0	0
44	0	2.378	0	0	0	0
45	0	-2.378	0	0	0	0
46	0	0	2.378	0	0	0
47	0	0	-2.378	0	0	0
48	0	0	0	2.378	0	0
49	0	0	0	-2.378	0	0
50	0	0	0	0	2.378	0
51	0	0	0	0	-2.378	0
52	0	0	0	0	0	2.378
53	0	0	0	0	0	-2.378

Para analizar los datos obtenidos del diseño experimental, se empleó la metodología de superficie de respuesta con el fin de determinar la correlación de las variables

independientes (concentraciones de glucosa, almidón, peptona, ácido fítico, fósforo y minerales) sobre la variable respuesta (actividad enzimática).

Se empleó un modelo de segundo orden el cual fue ajustado a través del paquete estadístico SPSS mediante un procedimiento de regresión múltiple usando la siguiente ecuación (Montgomery, 2000):

$$\hat{Y} = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_j x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j$$

dónde \hat{Y} es la respuesta esperada (actividad enzimática); X_i y X_j son las variables independientes (glucosa, almidón, peptona, ácido fítico, fósforo y minerales) que influyen sobre la variable de respuesta \hat{Y} ; β_0 es el término independiente; β_i es el coeficiente lineal de primer orden; β_j es el coeficiente de segundo grado y de β_{ij} es el coeficiente de las interacciones analizadas.

5.8 Determinación de humedad

Esta se determinó gravimétricamente en una termobalanza (OHAUS modelo 6010).

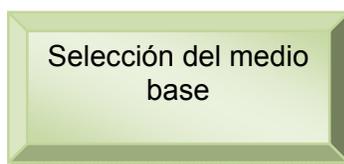
5.9 Determinación de pH

Se tomó un gramo del producto fermentado, se adicionaron 20mL de agua destilada y se midió el pH con un potenciómetro (Conductronic pH 120).

5.10 Determinación de la actividad del agua (A_w)

Esta se determinó en un equipo AcuaLab Cx-2.

En la Figura 10 se muestra la estrategia experimental empleada



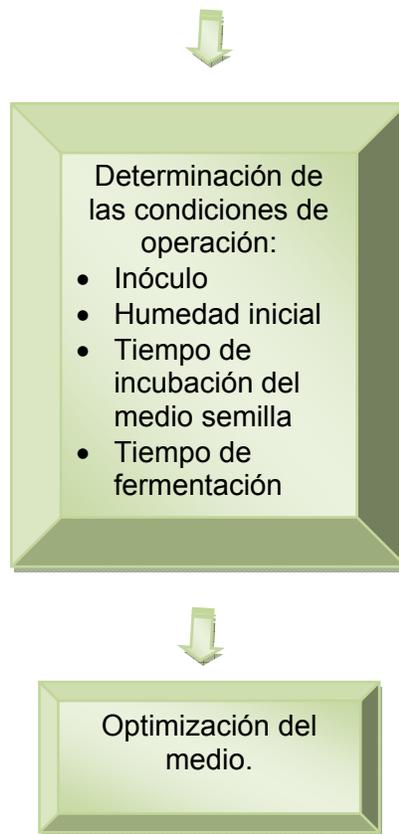


Figura 10 Esquematización de la estrategia experimental

6. Resultados

Los resultados obtenidos, se dividen en dos etapas, primeramente se realizó una exploración para seleccionar el medio base a emplear, así como para determinar las condiciones de operación, una vez que se fijaron estas condiciones, se realizó el proceso de optimización, cuya meta fue la obtención de la formulación del medio en el cual se obtenga la máxima actividad enzimática.

6.1 Etapa exploratoria

6.1.1 Selección del medio base

Para la selección del medio a partir del cual se iniciaría el proceso de optimización (medio base), se realizó una fermentación en medio líquido con un tiempo de incubación de 72h empleando dos medios, los cuales se reportan como medios para la producción de fitasa: el medio Gibson y un medio industrial. A ambos medios se les adicionó ácido fítico como inductor enzimático a una concentración de 0.12%. Como criterio para la selección del medio base se cuantificó la actividad fitasa obtenida en cada uno (Tabla 6).

Tabla 6 Medios probados para la selección del medio base, en función de la actividad enzimática obtenida.

Medio (adicionado con ácido fítico)	Actividad enzimática (PU/mL)*
Gibson	20.5 ± 2.88
Industrial	45.6 ± 3.72

* PU: unidad de actividad fitasa

Los resultados obtenidos mostraron que se obtiene una actividad enzimática significativamente mayor empleando el medio industrial (Tabla 7), por lo que se seleccionó como medio base. Este medio se empleó también como medio de cultivo para la propagación del inóculo para los cultivos en medio sólido.

Tabla 7 Análisis estadístico comparativo de los medio empleados para la selección del medio base.

Tabla de ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Actividad enzimática (PU/mL) * Medio	Inter-grupos (Combinadas)	625.00	1	625.00	55.36	0.02
	Intra-grupos	22.58	2	11.29		

Tabla de ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Actividad enzimática (PU/mL) * Medio	Inter-grupos (Combinadas)	625.00	1	625.00	55.36	0.02
	Intra-grupos	22.58	2	11.29		
	Total	647.58	3			

6.1.2 Condiciones de fermentación

Para establecer las condiciones de fermentación, se determinó la concentración óptima de inóculo y humedad a emplear, así como el tiempo de incubación del medio semilla.

Primeramente se determinó la concentración de inóculo sobre la producción enzimática, y dado que para el sistema no se ha reportado el efecto de la concentración de inóculo sobre la producción enzimática empleando espuma de poliuretano como soporte, se trató de abarcar un amplio espectro de concentraciones de inóculo para caracterizar el sistema, por lo cual se analizaron las concentraciones de 1.75%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% y 70% de inóculo. Los resultados son mostrados en la Figura 11.

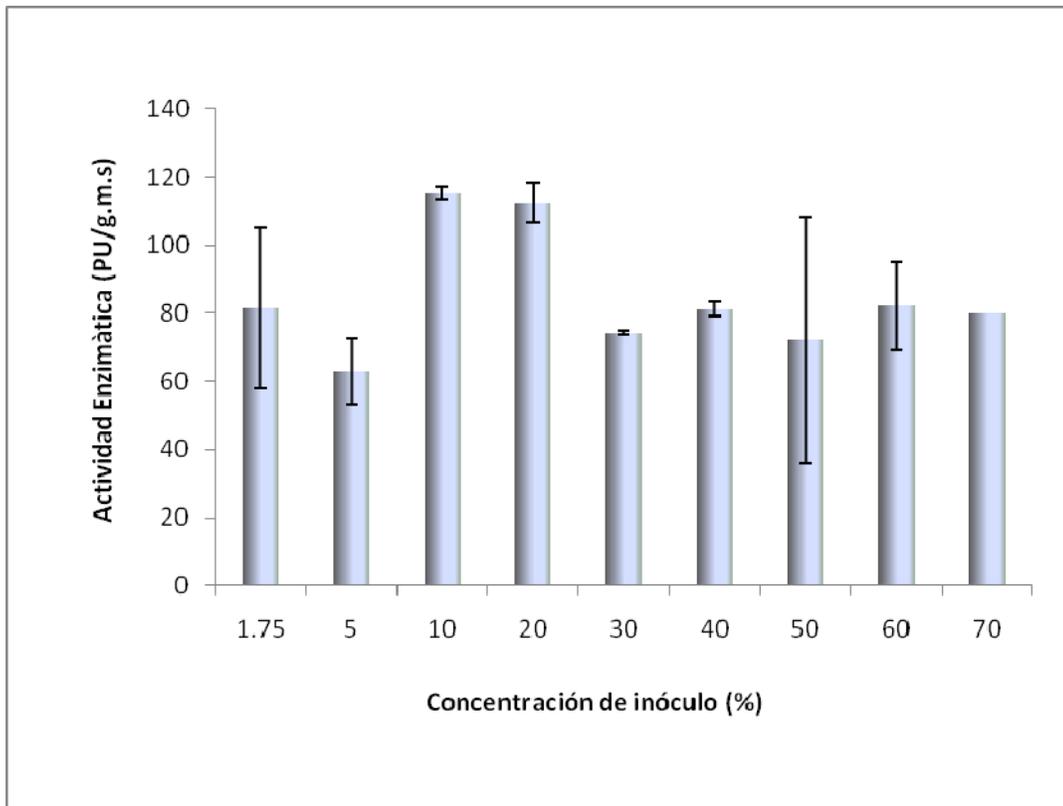


Figura 11. Efecto de la concentración de inóculo sobre la producción de fitasa

Aún cuando en los datos obtenidos, no se muestra evidencia que la concentración de inóculo tenga un efecto significativo sobre la producción enzimática (Tabla 8), se observa que, de las tres concentraciones más bajas (1.75%, 5% y 10%), la concentración de 5% de inóculo da una producción enzimática promedio más baja que con el resto de las concentraciones, por lo que se decide realizar un segundo experimento con las concentraciones de 1.5% y 10% de inóculo para determinar la concentración óptima. Este efecto, puede atribuirse probablemente a que la composición del medio no esté limitada por fuente de carbono, no generando competencia por los nutrientes y lo que se ve reflejado en la ausencia de efecto sobre la producción enzimática.

Tabla 8. Efecto de la concentración de inóculo sobre la producción enzimática

		Suma de	Gl	Media	F	Sig.
		cuadrados		cuadrática		
Actividad enzimática	Inter-grupos	9156.65	9	1017.41	1.20	0.39
% de inóculo	(Combinadas)					
	Intra-grupos	8457.20	10	845.72		
	Total	17613.85	19			

En el siguiente experimento, además de la concentración de inóculo, se analizó el efecto de la humedad inicial sobre la producción enzimática, para lo cual se probaron valores iniciales de humedad de 50%, 60%, 70%, 80%, 85% y 90% con dos niveles de inóculo (1.75 y 10%). Los resultados son mostrados en la Figura 12.

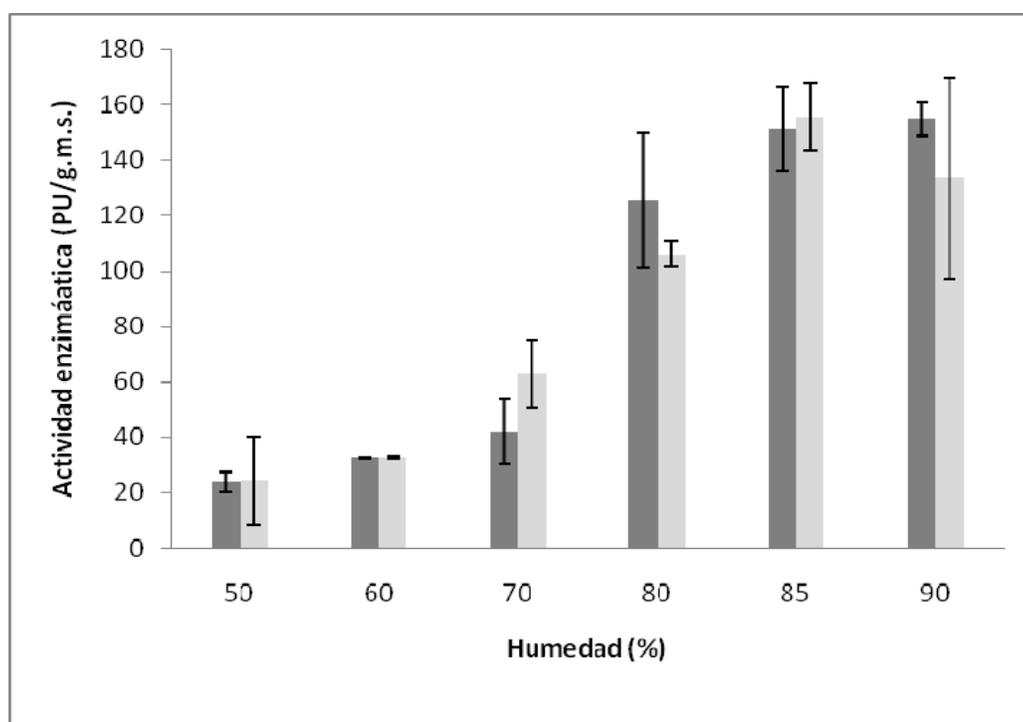


Figura 12. Efecto de la concentración de inóculo (barras oscuras, 1.75%; barras claras, 10%) y del contenido de humedad sobre la producción de fitasa.

De acuerdo a El-Batal (El-Batal y Karem, 2001), la humedad juega un papel importante tanto en el crecimiento celular como en la producción de enzimas, ya que ésta facilita la utilización del substrato por el microorganismo; así, el contenido óptimo de humedad depende de cada

sistema en particular. El mismo autor reporta valores óptimos de humedad de 70% para la producción de la enzima fitasa por *Aspergillus niger*. Sin embargo, en el presente trabajo se determinó que para el sistema analizado, las concentraciones de 80%, 85% y 90% de humedad, no mostraron diferencia significativa sobre la producción enzimática, pero dichos valores sí tuvieron un efecto significativamente más elevado ($\alpha=0.05$) en la producción enzimática que los valores de humedad de 50%, 60% y 70% de humedad. (Tabla 9).

Tabla 9. Efecto de la humedad inicial

HSD de Tukey ^a			
Subconjunto para alfa = 0.05			
Humedad (%)	N	1	2
50.00	4	24.17	
60.00	4	32.67	
70.00	4	52.45	
80.00	4		115.72
90.00	4		144.21
85.00	4		158.33
Sig.		0.42	0.09

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4.00.

Con base en los resultados anteriores, se decidió emplear una humedad inicial de 80% como la óptima, que es ligeramente más elevada de la reportada por El-Batal (El-Batal y Karem,2001). Esta diferencia puede deberse a que la espuma de poliuretano tiene una alta capacidad de retención de agua, como lo reporta Marin-Cervantes (Marin-Cervantes y col., 2008).

Por otro lado, los datos obtenidos muestran que, aún cuando la concentración de inóculo no tiene efecto significativo sobre la producción de la enzima fitasa (Tabla 9). La obtención de una actividad enzimática más elevada se obtuvo en la interacción de 1.75% de inóculo y 80% de humedad, por lo que se decidió emplear la concentración de 1.75% de inóculo dado

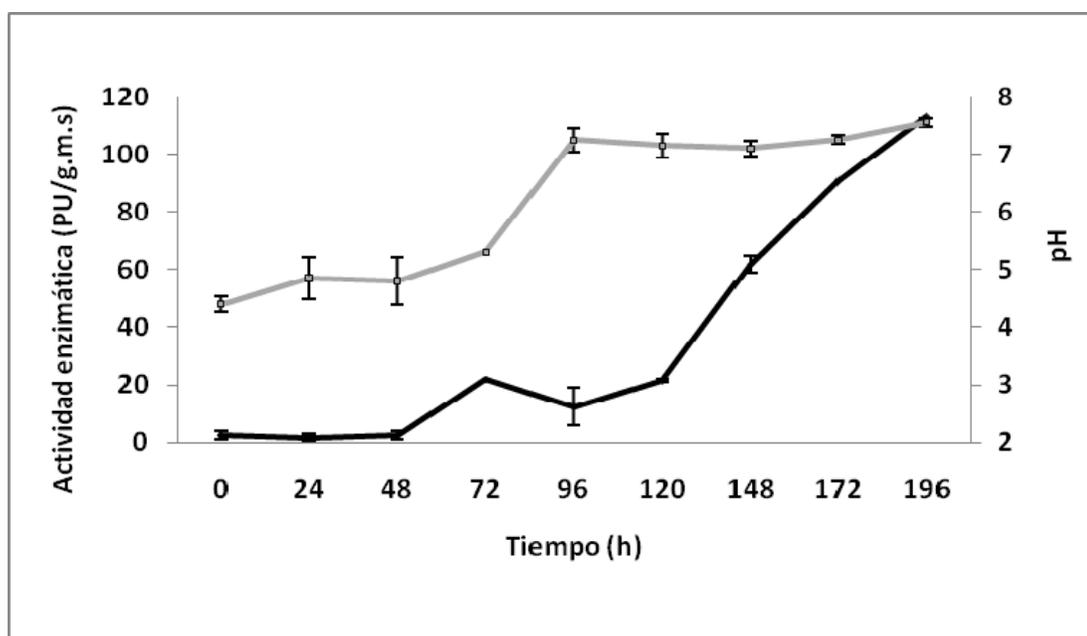
que ya había sido reportada como concentración óptima de inoculación probada para el género *Pichia anomala* (Vohra y Satyanarayana, 2002).

Tabla 10. Efecto de la cantidad de inóculo inicial

		Suma de	gl	Media	F	Sig.
		cuadrados		cuadrática		
Actividad enzimática *	Inter-grupos	3.90	1	3.90	0.00	0.97
% inóculo	(Combinadas)					
	Intra-grupos	76926.65	22	3496.67		
	Total	76930.55	23			

Una vez determinadas las condiciones de humedad inicial e inóculo a emplear, se realizó una cinética de producción de fitasa empleando las condiciones previamente seleccionadas (1.75% de inóculo y 80% de humedad) y un inóculo incubado durante 96h. En la Figura 13 se muestran los cambios en la actividad enzimática y el pH en función del tiempo de incubación.

a)



b)

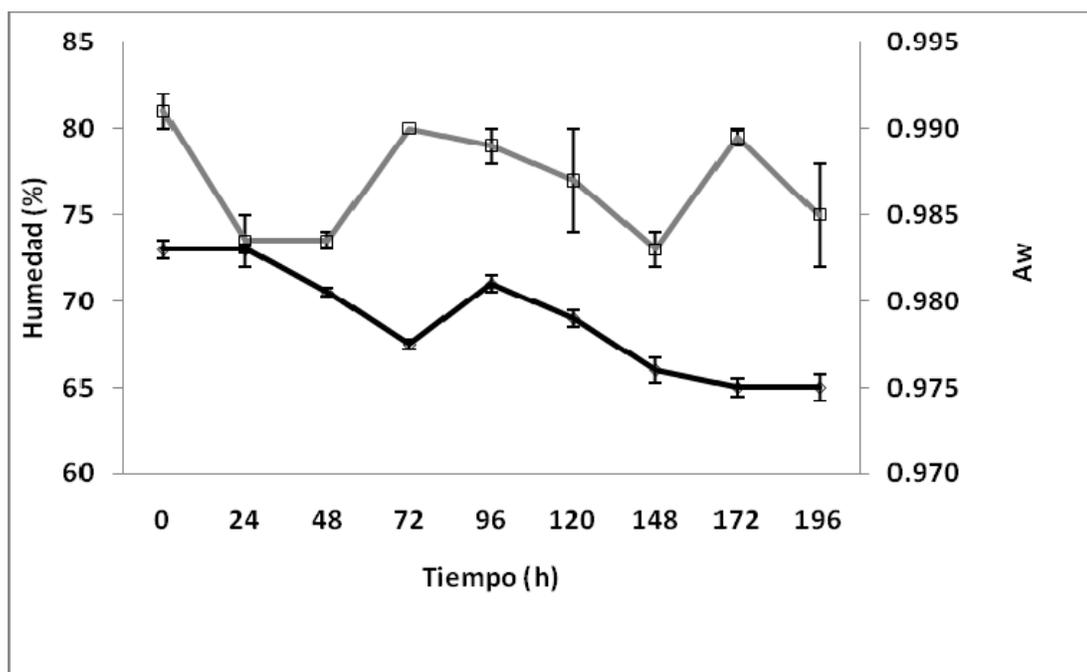
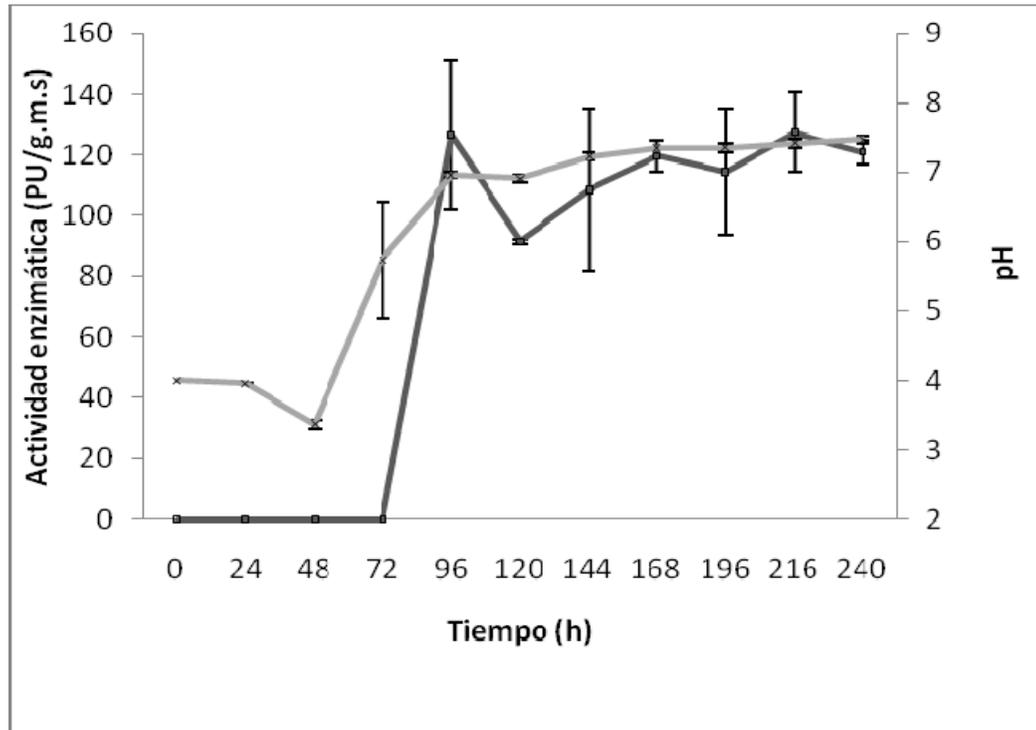


Figura 13. a) Cinética de producción de fitasa (línea oscura) y de pH (línea clara) y b) % Humedad (línea oscura) y Aw (línea clara).

En la Figura 13a se observa que el pH del medio de cultivo se mantuvo constante al inicio del cultivo, posteriormente, éste alcanzó un valor de alrededor de 7.5 que se mantuvo constante hasta el final del periodo de incubación. La cinética de producción de fitasa presenta un comportamiento similar; es decir, se fue incrementando proporcionalmente con el incremento del pH en el medio, alcanzando su valor máximo a las 196h.

Como puede verse, la actividad de agua del medio de cultivo varió entre 0.980 y 0.995 durante el tiempo de cultivo, y la humedad bajó hasta valores de alrededor de 70% (Figura 13b). Para determinar si efectivamente a las 196 h de cultivo se alcanza la máxima producción enzimática y para disminuir el tiempo en el que se alcanza el valor máximo de actividad enzimática, se probó un medio semilla de 72h de incubación, considerando además para la siguiente cinética, probar hasta un tiempo de incubación de 240h. Los resultados son mostrados en la Figura 14.

a)



b)

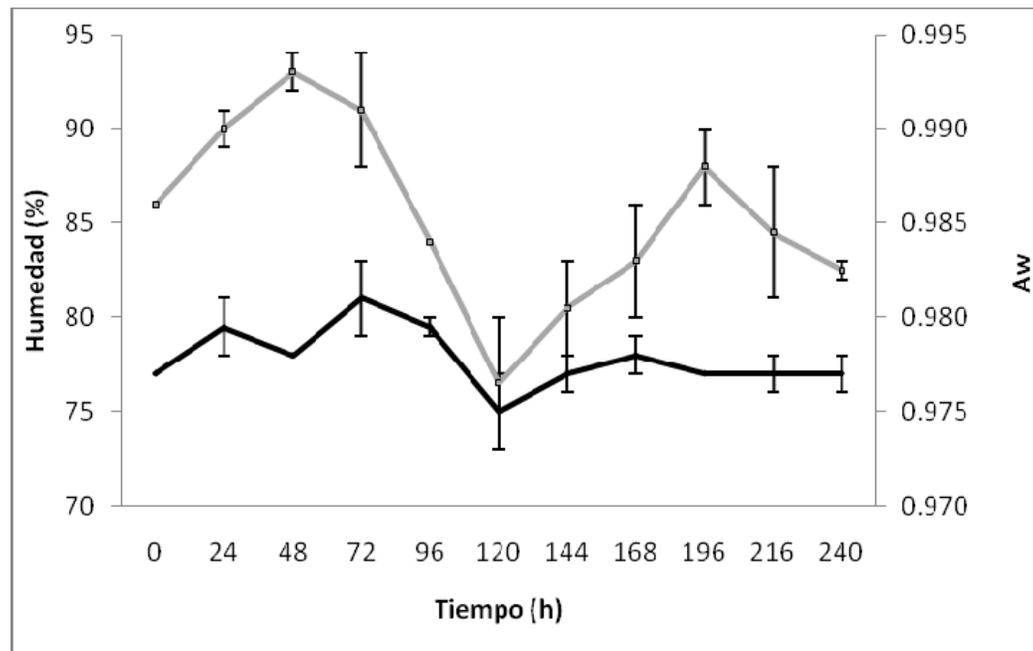


Figura 14. a) Cinética de producción de fitasa (línea oscura) y de pH (línea clara) y b) % Humedad (línea oscura) y Aw (línea clara).

En la figura 14a, se observa que la producción de fitasa alcanzó su máximo valor a las 96h, manteniéndolo constante hasta el final del tiempo de incubación (lo cual es verificado mediante un análisis estadístico de varianza ANOVA, mostrado en la Tabla 9). Un perfil enzimático similar es reportado por Doo-Sang y col. (1999), en la que reportan una actividad máxima de la enzima fitasa a partir de las 96h, y esta actividad enzimática, se mantuvo constante hasta el tiempo final considerado (192h). En la misma gráfica, se observa que este perfil está directamente relacionado con el incremento del pH en el medio de cultivo tal como sucedió en la primera cinética. Además, en esta cinética, se observa que aumentó la velocidad de producción de enzima, lo que puede ser atribuido a que el inóculo empleado en la primera cinética estuviera en la fase estacionaria de crecimiento, en la presente cinética el inóculo probablemente se encontraba en la fase de crecimiento exponencial, lo que le permitió asimilar de manera más rápida los nutrientes del medio. Por otro lado, se observa que la concentración de humedad y la actividad de agua (Figura 14b) mostraron una tendencia similar a la observada en la cinética previa.

Tabla 11. Análisis estadístico de la cinética enzimática

Tukey			
Tiempo (h)	Subconjunto para alfa =		
	N	0.05	
		1	2
0	2	0.00	
24	2	0.00	
48	2	0.00	
72	2	0.00	
120	2		91.35
144	2		108.44
192	2		114.35
168	2		119.71
240	2		120.97
96	2		126.55
216	2		127.50
Significancia		1.00	0.70

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Con base en los resultados de esta cinética, se decidió fijar el tiempo de fermentación constante a un valor de 144h para los estudios de optimización.

Una vez obtenidos estos resultados, se procedió a iniciar el estudio de optimización de los componentes del medio de cultivo, para ello se usaron las condiciones de operación fijadas en la etapa exploratoria, usando los siguientes valores:

- Concentración de inóculo: 1.75%,
- Humedad inicial: 80%,
- Tiempo de incubación del medio semilla: 72h,
- Tiempo de fermentación: 144h.

6.2 Etapa de Optimización.

La concentración de la glucosa, almidón, peptona y del fósforo, han sido reportadas como variables que tienen efecto sobre la producción de la fitasa (Doo-Sang y col., 1999, Vats y Banerjee, 2002, Ramachandran y col., 2005 y Li y col., 2008), por lo que se seleccionaron como variables a optimizar. Además, el ácido fítico, como inductor de la producción de la fitasa, también se consideró como otra variable a optimizar, y por lo tanto, también se consideró la concentración de los minerales empleados como una variable a optimizar, debido a la capacidad de quelación del ácido fítico con algunos minerales (Harland y Oberleas, 1999). Los minerales empleados fueron CaCl, Mg₂SO₄ y KCl, siendo consideradas las concentraciones de las tres sales como una sola variable.

Para establecer los niveles de la concentración de cada una de las variables a experimentar, se fijó el nivel “- α ” en las concentraciones del medio que se habían utilizado en los experimentos previos. A partir de estos valores, se calcularon las concentraciones de los diferentes niveles (- α , -1, 0, +1, + α), considerando un diseño factorial fraccionado con 32 diferentes combinaciones (2^{6-1}) y un valor de $\alpha=2.378$ ($32^{1/4}$), los tratamientos realizados para cada nivel experimentado son mostrados en la Tabla 12.

Tabla 12. Niveles de los componentes del medio experimentados para la optimización del medio de cultivo.

Variable	Concentración (g/100g.m.s)				
	- α	-1	0	+1	+ α
Glucosa (G)	1.20	9.50	15.60	21.66	30.00
Almidón (A)	6.72	15.20	21.36	27.52	36.00
Peptona (P)	4.32	11.76	17.2	22.56	30.00
Ácido fítico (Fi)	0.12	0.81	1.31	1.81	2.50
KH ₂ PO ₄ (Fo)	0.14	0.74	1.17	1.60	2.20
Minerales (M)	0.50	0.79	1.00	1.20	1.50

Con estos niveles de concentración para cada variable, se obtienen las combinaciones para cada tratamiento requerido en un diseño compuesto central. En la Tabla 13 se muestran las combinaciones de los tratamientos experimentados, así como la actividad enzimática obtenida en cada uno.

Tabla 13. Composición de los medios experimentados y actividad enzimática obtenida para cada combinación

Tratamiento	Concentración (g/100g PUF)						Actividad enzimática (PU/g.m.s.)
	Glucosa	Almidón	Peptona	Ácido fítico	Fósforo	Minerales	
1	21.66	27.52	22.56	1.81	1.60	1.20	0
2	9.50	27.52	22.56	1.81	1.60	0.79	111.10
3	21.66	15.20	22.56	1.81	1.60	0.79	100.49
4	9.50	15.20	22.56	1.81	1.60	1.20	97.54
5	21.66	27.52	11.76	1.81	1.60	0.79	10.73
6	9.50	27.52	11.76	1.81	1.60	1.20	31.11
7	21.66	15.20	11.76	1.81	1.60	1.20	31.96
8	9.50	15.20	11.76	1.81	1.60	0.79	60.39
9	21.66	27.52	22.56	0.81	1.60	0.79	102.48
10	9.50	27.52	22.56	0.81	1.60	1.20	108.16

Tratamiento	Concentración (g/100g PUF)						Actividad enzimática (PU/g.m.s.)
	Glucosa	Almidón	Peptona	Ácido fítico	Fósforo	Minerales	
11	21.66	15.20	22.56	0.81	1.60	1.20	103.60
12	9.50	15.20	22.56	0.81	1.60	0.79	19.71
13	21.66	27.52	11.76	0.81	1.60	1.20	11.57
14	9.50	27.52	11.76	0.81	1.60	0.79	21.49
15	21.66	15.20	11.76	0.81	1.60	0.79	30.79
16	9.50	15.20	11.76	0.81	1.60	1.20	57.36
17	21.66	27.52	22.56	1.81	0.74	0.79	104.66
18	9.50	27.52	22.56	1.81	0.74	1.20	86.62
19	21.66	15.20	22.56	1.81	0.74	1.20	89.09
20	9.50	15.20	22.56	1.81	0.74	0.79	50.00
21	21.66	27.52	11.76	1.81	0.74	1.20	70.00
22	9.50	27.52	11.76	1.81	0.74	0.79	39.57
23	21.66	15.20	11.76	1.81	0.74	0.79	12.94
24	9.50	15.20	11.76	1.81	0.74	1.20	48.15
25	21.66	27.52	22.56	0.81	0.74	1.20	131.5
26	9.50	27.52	22.56	0.81	0.74	0.79	9.75
27	21.66	15.20	22.56	0.81	0.74	0.79	92.11
28	9.50	15.20	22.56	0.81	0.74	1.20	65.11
29	21.66	27.52	11.76	0.81	0.74	0.79	14.00
30	9.50	27.52	11.76	0.81	0.74	1.20	23.96
31	21.66	15.20	11.76	0.81	0.74	1.20	32.71
32	9.50	15.20	11.76	0.81	0.74	0.79	32.36
33	15.60	21.36	17.20	1.31	1.17	1.00	83.15
34	15.60	21.36	17.20	1.31	1.17	1.00	73.26
35	15.60	21.36	17.20	1.31	1.17	1.00	84.99
36	15.60	21.36	17.20	1.31	1.17	1.00	70.01
37	15.60	21.36	17.20	1.31	1.17	1.00	67.78
38	15.60	21.36	17.20	1.31	1.17	1.00	67.50
39	15.60	21.36	17.20	1.31	1.17	1.00	68.22

Tratamiento	Concentración (g/100g PUF)						Actividad enzimática (PU/g.m.s.)
	Glucosa	Almidón	Peptona	Ácido fítico	Fósforo	Minerales	
40	15.60	21.36	17.20	1.31	1.17	1.00	81.31
41	15.60	21.36	17.20	1.31	1.17	1.00	64.99
42	30.00	21.36	17.20	1.31	1.17	1.00	37.3
43	1.20	21.36	17.20	1.31	1.17	1.00	58.51
44	15.60	36.00	17.20	1.31	1.17	1.00	56.78
45	15.60	6.72	17.20	1.31	1.17	1.00	62.87
46	15.60	21.36	30.00	1.31	1.17	1.00	108.17
47	15.60	21.36	4.32	1.31	1.17	1.00	0.00
48	15.60	21.36	17.20	2.50	1.17	1.00	72.92
49	15.60	21.36	17.20	0.12	1.17	1.00	77.58
50	15.60	21.36	17.20	1.31	2.20	1.00	63.70
51	15.60	21.36	17.20	1.31	0.14	1.00	33.06
52	15.60	21.36	17.20	1.31	1.17	1.50	83.22
53	15.60	21.36	17.20	1.31	1.17	0.50	54.33

Estos resultados se ajustaron por el método de mínimos cuadrados a un modelo de segundo grado (los análisis estadísticos correspondientes, son mostrados en la sección dos del anexo) a través del paquete estadístico SPSS 17.0.

Un fundamento importante de las estimaciones estadísticas, es el hecho de que los errores experimentales aleatorios son independientes y siguen una distribución normal; en este sentido, las gráficas de distribución son una medida visual sencilla para evaluar esta suposición (Kuehl R.O, 2001). Como puede observarse en la Figura 15, los residuales obtenidos siguen una distribución normal, indicando que se cumple con este fundamento de los análisis estadísticos.

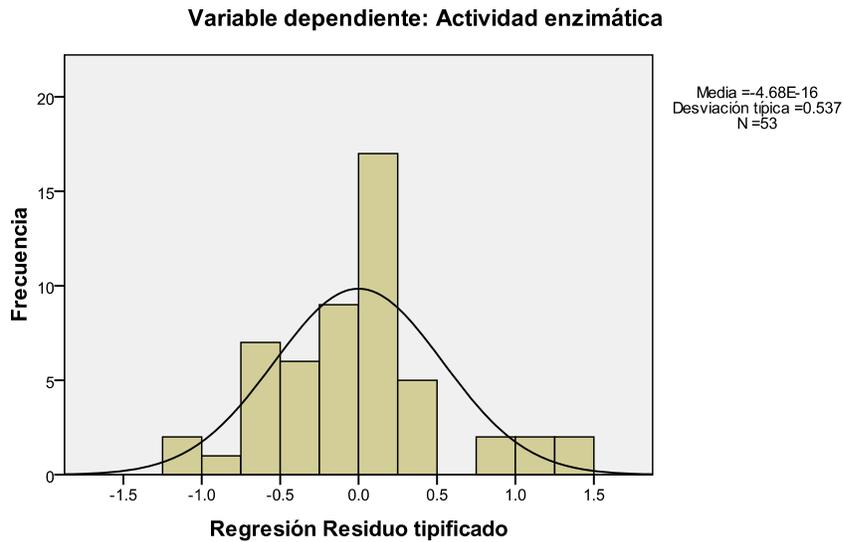


Figura 15. Distribución de la probabilidad de los residuales.

Los valores estimados de cada coeficiente del modelo así como su nivel de significancia, son presentados en la Tabla 14 y la estimación del coeficiente de determinación se muestra en la Tabla 15.

Tabla 14. Coeficientes del modelo cuadrático ajustado

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	T	Sig.
	B	Error típ.	Beta		
	(Constante)	73.57	3.18		
Glucosa	0.60	1.45	0.02	0.41	0.69
Almidón	-1.43	1.45	-0.04	-0.99	0.34
Peptona	23.09	1.45	0.64	15.91	0.00
Ácido fítico	1.77	1.45	0.05	1.22	0.24
Fósforo	1.59	1.45	0.04	1.10	0.29
Minerales	5.65	1.45	0.16	3.89	0.00
G*A	-1.56	1.69	-0.04	-0.92	0.37
G*P	8.61	1.69	0.21	5.10	0.00
G*Fi	-8.92	1.69	-0.21	-5.29	0.00

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	T	Sig.
	B	Error típ.	Beta		
G*Fo	-9.59	1.69	-0.23	-5.68	0.00
G*M	-5.36	1.69	-0.13	-3.17	0.01
A*P	3.78	1.69	0.10	2.24	0.04
A*Fi	-0.81	1.69	-0.02	-0.48	0.64
A*Fo	-5.09	1.69	-0.12	-3.01	0.01
A*M	-2.43	1.69	-0.06	-1.44	0.17
P*Fi	-2.30	1.69	-0.06	-1.36	0.19
P*Fo	1.02	1.69	0.02	0.60	0.56
P*M	0.21	1.69	0.01	0.13	0.90
Fi*Fo	-3.48	1.69	-0.08	-2.06	0.06
Fi*M	-7.71	1.69	-0.18	-4.57	0.00
Fo*M	-6.49	1.69	-0.16	-3.84	0.00
G*A*Fi	-2.28	1.69	-0.05	-1.35	0.20
A*P*Fi	-5.82	1.69	-0.14	-3.45	0.00
A*P*Fo	2.85	1.69	0.07	1.69	0.11
A*P*M	-3.50	1.69	-0.08	-2.07	0.06
A*Fi*Fo	-9.80	1.69	-0.23	-5.80	0.00
A*Fi*M	-5.15	1.69	-0.12	-3.05	0.01
A*Fo*M	-8.45	1.69	-0.20	-5.01	0.00
P*Fi*Fo	-0.07	1.69	-0.00	-0.04	0.97
P*Fi*M	-9.62	1.69	-0.23	-5.70	0.00
Fi*Fo*M	-6.56	1.69	-0.16	-3.89	0.00
G*G	-4.77	1.24	-0.16	-3.85	0.00
A*A	-2.66	1.24	-0.09	-2.15	0.05
P*P	-3.68	1.24	-0.12	-2.97	0.01
Fi*Fi	0.064	1.24	0.00	0.05	0.96
Fo*Fo	-4.69	1.24	-0.15	-3.78	0.00
M*M	-1.08	1.24	-0.04	-0.87	0.40

a. Variable dependiente: Actividad enzimática

Tabla 15. Estimación del coeficiente de determinación del modelo ajustado.

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	0.99 ^a	0.98	0.92	9.55

a. Variables predictoras: (Constante), M*M, FI*Fo*M, P*FI*M, P*Fi*Fo, A*Fo*M, A*Fi*M, A*Fi*Fo, A*P*M, A*P*Fo, A*P*Fi, G*A*Fi, Fo*M, Fi*M, Fi*Fo, P*M, P*Fo, P*Fi, A*M, A*Fo, A*Fi, A*P, G*M, G*Fo, G*Fi, G*P, G*A, Minerales, Fósforo, Ácido fólico, Peptona, Almidón, Glucosa, Fo*Fo, Fi*Fi, P*P, A*A, G*G

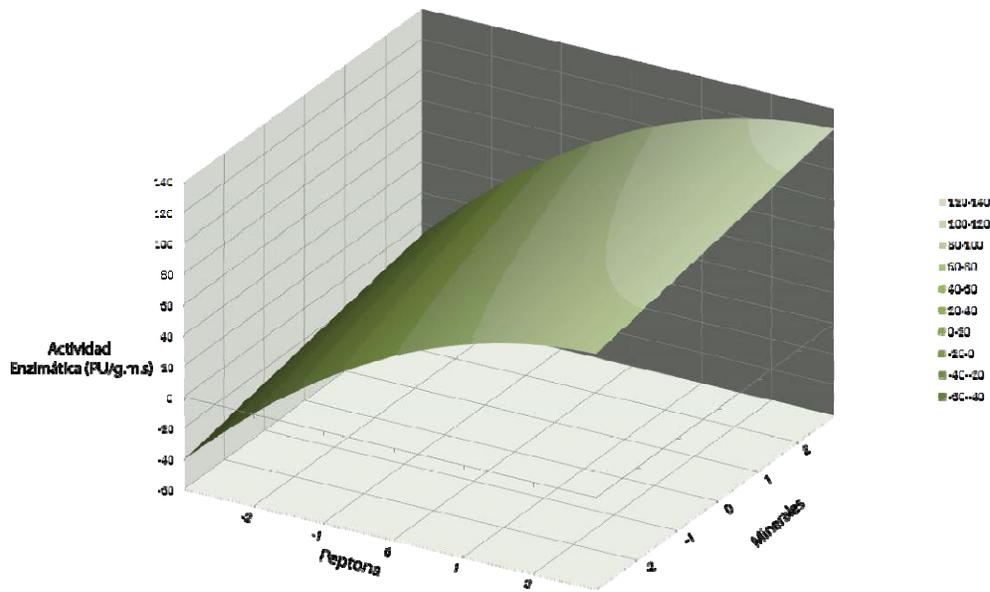
Variable dependiente: Actividad enzimática

A partir de la Tabla 12, se estimó el siguiente modelo estadístico para el sistema:

$$\hat{Y} = 73.7 + 23.09P + 5.65M + 8.61GP - 8.92GFi - 9.59GFo - 5.36GM + 3.78AP - 5.09AFo - 7.71FiM - 6.49FoM - 5.82APFi - 9.80AFiFo - 5.15AFiM - 8.45AFoM - 9.62PFiM - 6.56FiFoM - 4.77G^2 - 2.66A^2 - 3.68P^2 - 4.69Fo^2. (R^2 = 0.916).$$

En base a estos resultados, se observa que la concentración de peptona muestra un impacto fuertemente positivo sobre la producción de la enzima fitasa; un efecto similar ha sido reportado en estudios de optimización de fitasa (Vats y Banerjee, 2002) y para la producción de la enzima amilasa (Ramachandran y col., 2005), y por otro lado, de acuerdo a las cinéticas de producción realizadas como parte de la fase exploratoria de este trabajo, el pH a lo largo de la fermentación se mantiene a niveles de alrededor de 7.0, por lo que es posible asumir que en el sistema, se favorece la asimilación de nitrógeno lo que probablemente induce la producción de la enzima fitasa, viéndose reflejado en el efecto positivo mostrado de esta variable sobre la producción de la fitasa. Asimismo, en la Figura 16 se muestra una gráfica de superficie y su correspondiente gráfica de contorno (realizadas a través del paquete Excel 2007), en las que se observa que al incrementar los niveles de esta variable, es probable encontrar un óptimo de producción enzimática, por lo que se propuso probar a niveles mayores de concentración en un siguiente experimento de optimización.

a)



b)

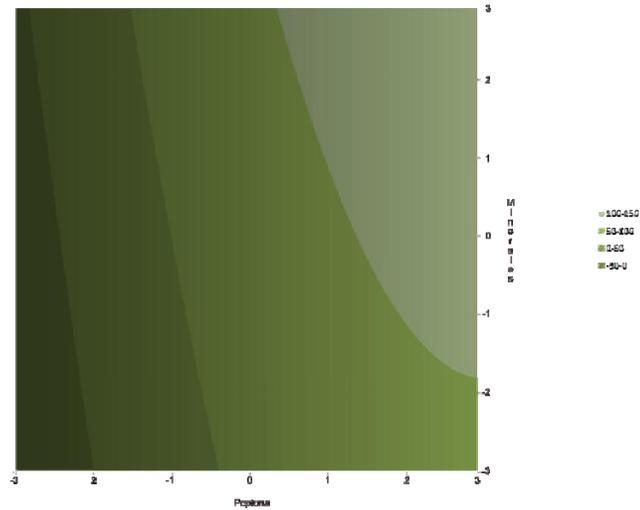


Figura 16. a) Gráfica de superficie del efecto de la variable peptona y minerales sobre la actividad enzimática de la enzima fitasa, fijando en un valor de "0" el resto de las variables del modelo. b) Gráfica de contorno del efecto de la variable peptona y minerales sobre la actividad enzimática de la enzima fitasa, fijando en un valor de "0" el resto de las variables del modelo.

Por su parte los minerales, en las concentraciones analizadas, por sí solos muestran un efecto positivo sobre la producción enzimática, sin embargo, en las siete interacciones, con el resto de las variables, muestran efectos negativos, por lo que se decidió probar en niveles inferiores de concentración en el siguiente experimento de optimización.

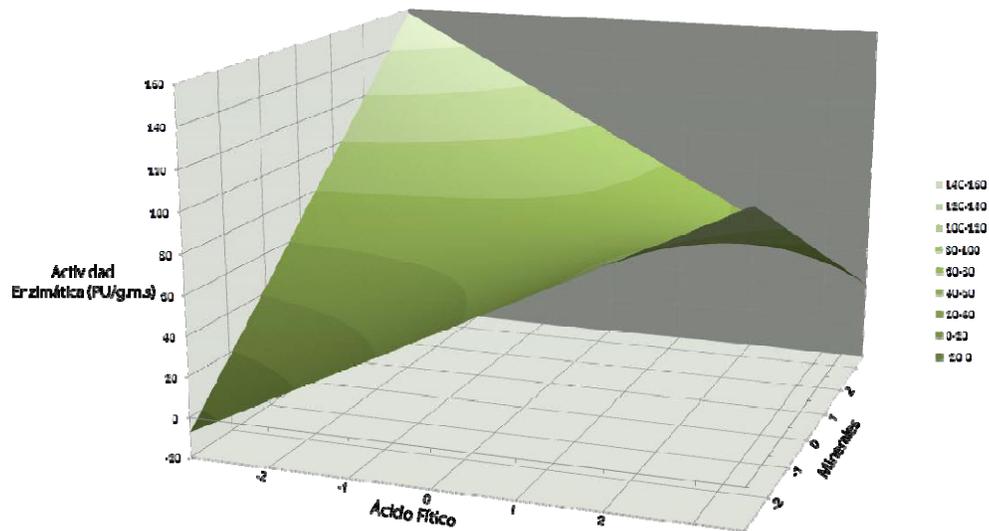
Por otro lado, en el intervalo de las concentraciones analizadas de glucosa y almidón, por sí solas no muestran un efecto significativo sobre la producción de la fitasa. Sin embargo, en ocho de las 10 interacciones significativas entre estas variables, presentan efectos negativos. Una posible justificación a estos efectos negativos, es que los niveles iniciales de las fuentes de carbono en el medio de crecimiento, son importantes para la producción de la enzima, pero un incremento en estos niveles, ejercen un efecto de inhibición por carbono. Sreeramulu y col. (1996), Vohra y Satyanarayana (2002) y Roopesh y col. (2006), reportan tendencias similares para la producción de fitasa. Por lo tanto, las variables glucosa y almidón, se siguen considerando en el proceso de optimización en un siguiente experimento a concentraciones menores.

El fósforo por sí solo no muestra efecto significativo sobre la producción de la fitasa. Sin embargo, en las seis interacciones con el resto de las variables en las que muestra un efecto significativo, estos efectos son negativos. Una posible justificación a estos efectos negativos, es que los niveles iniciales del fósforo en el medio de crecimiento, son importantes para la producción de la enzima, pero un incremento en estos niveles, inhibe la síntesis de la fitasa. El-Batal y Karem (2001) reportan una tendencia similar en un sistema de fermentación en medio sólido sobre semilla de colza con el género *Aspergillus*. Por lo anterior, se decidió seguir considerando el fósforo en el proceso de optimización en niveles menores de concentración.

El ácido fólico, no muestra efecto significativo ni lineal ni cuadrático sobre la producción de la enzima. Sin embargo, en la Figura 17, se muestran las gráficas de superficie y de contorno (realizadas a través del paquete Excel 2007) del efecto de la interacción entre el ácido fólico y los minerales, en donde se observa que al bajar la concentración de minerales (como se decidió previamente), es necesario incrementar los niveles del ácido fólico para ejercer un efecto positivo sobre la producción enzimática. Este efecto positivo del ácido fólico, puede

atribuirse probablemente a la inducción que ejerce en la producción de la enzima fitasa, por lo que se decide probar concentraciones mayores de este elemento.

a)



b)

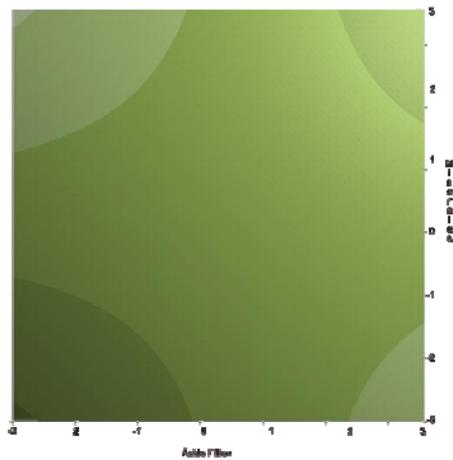


Figura 17. a) Gráfica de superficie del efecto de la variable ácido fítico y minerales sobre la actividad enzimática de la enzima fitasa, fijando en un valor de "0" el resto de las variables del modelo. b) Gráfica de contorno del efecto de la variable ácido fítico y minerales sobre la actividad enzimática de la enzima fitasa, fijando en un valor de "0" el resto de las variables del modelo.

Con respecto al coeficiente de determinación del modelo (R^2), el cual se estimó en un valor de 0.976, indica que las variables consideradas en el modelo, y por tanto en el proceso de optimización, son capaces de explicar el 97.6% de la variación de la producción enzimática, mientras que aproximadamente el 3% de la producción podría explicarse por algunos otros parámetros no considerados en este modelo. De esta forma, en el siguiente diseño de optimización se consideraron las mismas variables. Cabe mencionar, que el análisis estadístico realizado es válido únicamente dentro de los rangos de concentración estudiados para cada una de las variables independientes.

Los resultados de esa etapa de optimización, permitieron conocer el comportamiento del sistema en función de las variables probadas y dentro de las concentraciones establecidos para cada variable. Asimismo, permitió estimar la región probable de localización de un óptimo relativo de producción de la enzima.

6.3 Segunda etapa del proceso de optimización.

Con base en los resultados de la etapa anterior, se propuso un segundo experimento considerando concentraciones menores a las experimentadas para cada variable, con excepción de la variable peptona y del ácido fítico, las cuales mostraron tener efecto positivo sobre la producción de la enzima fitasa, dentro de los límites de concentración experimentados. Para esta etapa nuevamente se empleó un diseño compuesto central cuyo niveles son mostrados en la Tabla 16.

Tabla 16. Niveles experimentados para el segundo proceso de optimización.

Variable	Concentración (g/100g PUF)				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
G	0.10	1.52	2.60	3.60	5.00
A	0.50	4.70	7.80	10.80	15.00
P	20.00	28.69	35.00	43.10	50.00
Fi	0.50	1.80	2.80	3.70	5.00
Fo	0.01	0.18	0.31	0.43	0.60

M 0.05 0.21 0.33 0.44 0.60

Las combinaciones de concentraciones para cada variable, así como su correspondiente actividad enzimática se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Composición de medios experimentados y actividad enzimática obtenida para cada combinación.

Tratamiento	(g/100g PUF)						Actividad enzimática (PU/g.m.s.)
	Glucosa	Almidón	Peptona	Ácido fítico	Fósforo	Minerales	
1	3.60	10.80	43.10	3.70	0.43	0.44	--
2	1.52	10.80	43.10	3.70	0.43	0.21	29.5
3	3.60	4.70	43.10	3.70	0.43	0.21	41.56
4	1.52	4.70	43.10	3.70	0.43	0.44	45.65
5	3.60	10.80	28.69	3.70	0.43	0.21	31.41
6	1.52	10.80	28.69	3.70	0.43	0.44	53.52
7	3.60	4.70	28.69	3.70	0.43	0.44	23.23
8	1.52	4.70	28.69	3.70	0.43	0.21	30.85
9	3.60	10.80	43.10	1.80	0.43	0.21	40.58
10	1.52	10.80	43.10	1.80	0.43	0.44	48.51
11	3.60	4.70	43.10	1.80	0.43	0.44	56.96
12	1.52	4.70	43.10	1.80	0.43	0.21	30.58
13	3.60	10.80	28.69	1.80	0.43	0.44	28.68
14	1.52	10.80	28.69	1.80	0.43	0.21	35.37
15	3.60	4.70	28.69	1.80	0.43	0.21	37.42
16	1.52	4.70	28.69	1.80	0.43	0.44	22.01
17	3.60	10.80	43.10	3.70	0.18	0.21	27.07
18	1.52	10.80	43.10	3.70	0.18	0.44	58.13
19	3.60	4.70	43.10	3.70	0.18	0.44	28.04
20	1.52	4.70	43.10	3.70	0.18	0.21	38.25
21	3.60	10.80	28.69	3.70	0.18	0.44	41.89
22	1.52	10.80	28.69	3.70	0.18	0.21	42.63

Tratamiento	(g/100g PUF)						Actividad enzimática (PU/g.m.s.)
	Glucosa	Almidón	Peptona	Ácido fítico	Fósforo	Minerales	
23	3.60	4.70	28.69	3.70	0.18	0.21	49.02
24	1.52	4.70	28.69	3.70	0.18	0.44	49.02
25	3.60	10.80	43.10	1.80	0.18	0.44	32.41
26	1.52	10.80	43.10	1.80	0.18	0.21	32.41
27	3.60	4.70	43.10	1.80	0.18	0.21	34.37
28	1.52	4.70	43.10	1.80	0.18	0.44	34.99
29	3.60	10.80	28.69	1.80	0.18	0.21	34.36
30	1.52	10.80	28.69	1.80	0.18	0.44	38.65
31	3.60	4.70	28.69	1.80	0.18	0.44	34.84
32	1.52	4.70	28.69	1.80	0.18	0.21	22.83
33	2.60	7.80	35.00	2.80	0.31	0.33	2.7
34	2.60	7.80	35.00	2.80	0.31	0.33	14.45
35	2.60	7.80	35.00	2.80	0.31	0.33	1.27
36	2.60	7.80	35.00	2.80	0.31	0.33	1.29
37	2.60	7.80	35.00	2.80	0.31	0.33	2.7
38	2.60	7.80	35.00	2.80	0.31	0.33	6.75
39	2.60	7.80	35.00	2.80	0.31	0.33	6.75
40	2.60	7.80	35.00	2.80	0.31	0.33	6.75
41	2.60	7.80	35.00	2.80	0.31	0.33	6.75
42	5.00	7.80	35.00	2.80	0.31	0.33	221.36
43	0.10	7.80	35.00	2.80	0.31	0.33	23.23
44	2.60	15.00	35.00	2.80	0.31	0.33	30.17
45	2.60	0.50	35.00	2.80	0.31	0.33	14.41
46	2.60	7.80	50.00	2.80	0.31	0.33	28.2
47	2.60	7.80	20.00	2.80	0.31	0.33	29.2
48	2.60	7.80	35.00	5.00	0.31	0.33	41.46
49	2.60	7.80	35.00	0.50	0.31	0.33	3.58
50	2.60	7.80	35.00	2.80	0.60	0.33	1.38
51	2.60	7.80	35.00	2.80	0.01	0.33	26.67

Tratamiento	(g/100g PUF)						Actividad enzimática (PU/g.m.s.)
	Glucosa	Almidón	Peptona	Ácido fítico	Fósforo	Minerales	
52	2.60	7.80	35.00	2.80	0.31	0.60	26.15
53	2.60	7.80	35.00	2.80	0.31	0.05	23.24

Estos resultados se ajustaron por el método de mínimos cuadrados a un modelo de segundo grado (ver anexo sección 3) a través del paquete estadístico SPSS 17.0. En la Figura 18 se muestra la distribución de los residuales, y los valores estimados de cada coeficiente del modelo, su nivel de significancia se presenta en la Tabla 18.

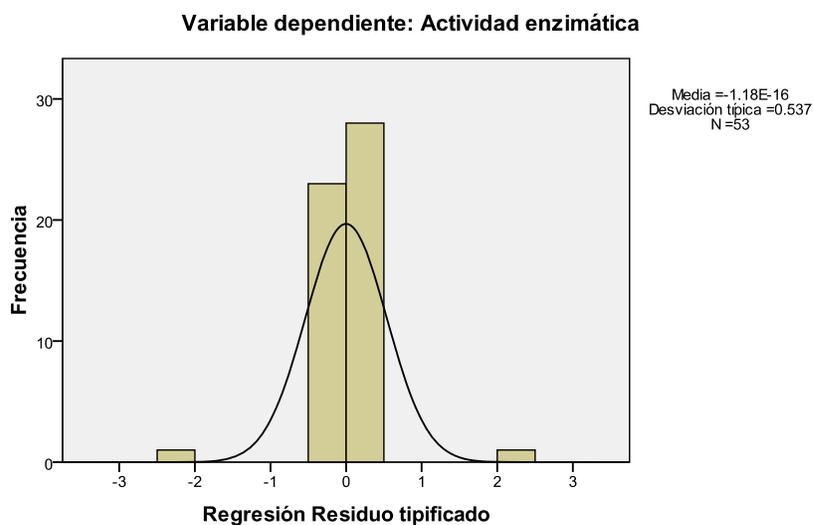


Figura 18. Distribución de probabilidades de los residuales.

Tabla 18. Coeficientes del modelo cuadrático

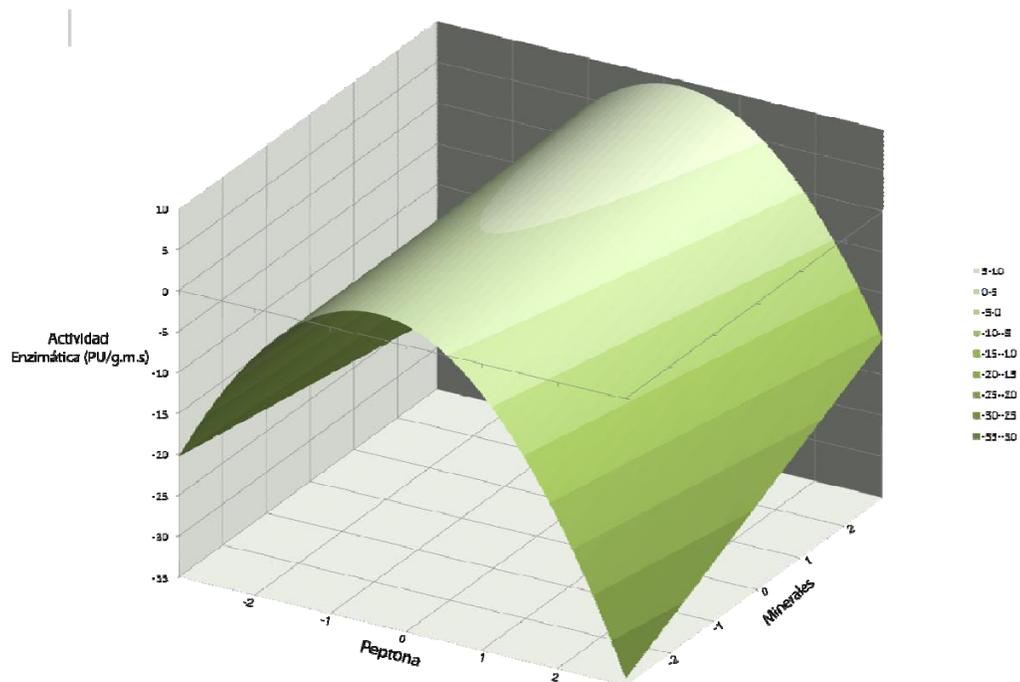
Modelo	Coeficientes no estandarizados	Coeficientes tipificados	T	Sig.
--------	--------------------------------	--------------------------	---	------

	B	Error típ.	Beta		
(Constante)	5.76	11.24		0.51	0.62
Glucosa	9.24	5.13	0.27	1.80	0.09
Almidón	0.76	5.13	0.02	0.15	0.88
Peptona	0.02	5.13	0.00	0.00	1.00
Ácido fólico	2.65	5.13	0.08	0.52	0.61
Fósforo	-2.38	5.13	-0.07	-0.47	0.65
Minerales	1.05	5.13	0.03	0.20	0.84
G*A	-4.17	5.97	-0.11	-0.70	0.5
G*P	-1.34	5.97	-0.03	-0.23	0.83
G*Fi	-4.36	5.97	-0.11	-0.73	0.48
G*Fo	-0.04	5.97	0.00	-0.01	1.00
G*M	-4.31	5.97	-0.11	-0.72	0.48
A*P	-2.47	5.97	-0.06	-0.41	0.69
A*Fi	-1.20	5.97	-0.03	-0.20	0.84
A*Fo	-1.15	5.97	-0.03	-0.19	0.85
A*M	0.58	5.97	0.02	0.10	0.92
P*Fi	-3.44	5.97	-0.09	-0.58	0.57
P*Fo	1.83	5.97	0.05	0.31	0.76
P*M	0.70	5.97	0.02	0.12	0.91
Fi*Fo	-3.55	5.97	-0.09	-0.60	0.56
Fi*M	-0.62	5.97	-0.02	-0.10	0.92
Fo*M	-1.12	5.97	-0.03	-0.19	0.85
G*A*Fi	0.33	5.97	0.01	0.06	0.96
A*P*Fi	-1.04	5.97	-0.03	-0.17	0.86
A*P*Fo	-3.26	5.97	-0.08	-0.55	0.59
A*P*M	-1.29	5.97	-0.03	-0.22	0.83
A*Fi*Fo	-0.86	5.97	-0.02	-0.15	0.89
A*Fi*M	1.71	5.97	0.04	0.29	0.78
A*Fo*M	-1.43	5.97	-0.04	-0.24	0.81
P*Fi*Fo	-1.28	5.97	-0.03	-0.21	0.83
P*Fi*M	-1.85	5.97	-0.05	-0.31	0.76

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	T	Sig.
	B	Error típ.	Beta		
FI*Fo*M	-0.82	5.97	-0.02	-0.14	0.89
G*G	19.98	4.38	0.70	4.56	0.00
A*A	2.29	4.38	0.08	0.52	0.61
P*P	3.43	4.38	0.12	0.78	0.45
Fi*Fi	2.33	4.38	0.08	0.53	0.60
Fo*Fo	0.83	4.38	0.03	0.19	0.85
M*M	2.72	4.38	0.10	0.62	0.54

a. Variable dependiente: Actividad enzimática

a)



b)

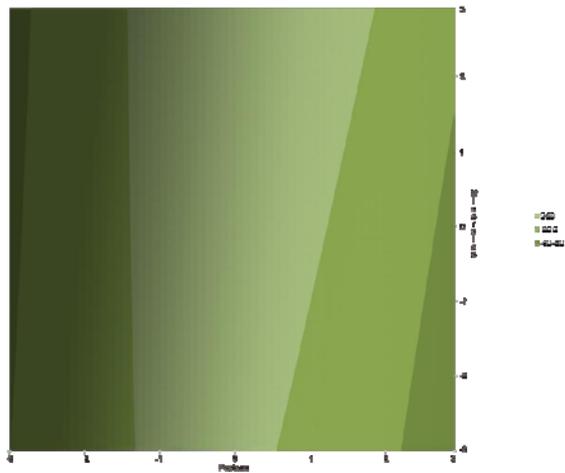


Figura 19. Gráfica de superficie del efecto de la variable peptona y minerales sobre la actividad enzimática de la enzima fitasa, fijando en un valor de “0” el resto de las variables del modelo. b) Gráfica de contorno de la variable peptona y minerales sobre la actividad enzimática de la enzima fitasa, fijando en un valor de “0” el resto de las variables del modelo.

En la Figura 19, se muestra la obtención de un óptimo relativo de producción enzimática dentro de las concentraciones probadas en este experimento. Además, como se muestra en la Figura 18 y en la Tabla 18, para las concentraciones experimentadas las variables independientes consideradas dejaron de tener efecto significativo sobre la actividad enzimática, por lo que se decidió parar el proceso de optimización una vez que se cumplió con el objetivo de la optimización de la producción de la enzima fitasa usando PUF como soporte inerte.

Con la composición del medio de cultivo optimizado (mostrada en la Tabla 19), se obtiene una actividad enzimática de 221 PU/g.m.s, la cual representa 84% más actividad que la actividad obtenida en el medio inicial, en el cual se obtuvo una actividad enzimática máxima de 120 PU/g.m.s.

Tabla 19. Actividad enzimática y composición de los medios de cultivo inicial y después de la optimización.

Variable	Composición del medio inicial (g/100g.m.s)	Composición del medio optimizado (g/100g.m.s)
Glucosa	1.20	5.00
Almidón	6.70	7.80
Peptona	4.30	35
Ácido fítico	0.12	2.80
KH ₂ PO ₄	0.14	0.31
CaCl	0.50	0.33
Mg ₂ SO ₄	0.50	0.33
KCl	0.50	0.33
Actividad enzimática(PU/g.m.s.)	120.00	221.00

Las variables consideradas en el proceso de optimización, son factores cruciales en la producción de la fitasa por *Aspergillus niger* y el efecto negativo de su exceso, de manera independiente es considerada por los modelos hiperbólicos como Michaelis y Menten o el de Monod. Sin embargo, estos modelos resultan inadecuados para optimizar la concentración debido a los efectos de interacción entre las variables, por lo que la realización de estudios de optimización, se hacen necesarios para determinar el efecto combinado. Así, en el presente trabajo, al analizar los efectos de cada variable y de sus interacciones, se logró obtener un medio con el cual se logra un óptimo de producción enzimática.

Por otro lado, en la Tabla 20 se muestra un análisis comparativo con las actividades enzimáticas reportadas en otros substratos, encontrando que en el presente trabajo, se obtiene una actividad enzimática al menos 51% más elevada que las reportadas en la literatura.

Tabla 20. Comparación de las actividades enzimáticas reportadas

.Substrato	Actividad enzimática	Referencia
Salvado de trigo con Aceite de sésamo	44.5 PU/g.m.s.	Roopesh y col., 2006
Aceite de coco y de sésamo	64.0 PU/g.m.s.	Ramachandran y col., 2005
Medio líquido	120 PU/g.m.s.	Vohra y Styanarayana, 2002
Medio líquido	11.0 PU/mL	Vats y Banerjee, 2002
Medio líquido	1.0 PU/mL	Sunitha y col., 2000
Medio líquido	20.0 PU/mL	Doo-Sang y col., 1999
Aceite de sésamo	20.88 PU/g.m.s.	Singh y Satyanarayana, 2008
Medio líquido	146 PU/mL	Sreeramulu y col., 1996

7. Conclusiones

Las condiciones de operación encontradas como óptimas para la fermentación en medio sólido empleando espuma de poliuretano como soporte inerte, fueron empleando 1.75% de concentración de inóculo, 80% de humedad y 72h de incubación del medio semilla. El tiempo de fermentación se fijó en 144h, dado que la actividad enzimática no varió entre las 96h y las 240h de fermentación.

En la etapa de optimización se empleó una metodología de superficies de respuesta con un diseño factorial fraccionado. La utilización de esta metodología permitió la exploración de seis variables independientes y sus interacciones, con un total de 53 experimentos por cada etapa de optimización que, de otro modo, al emplear técnicas clásicas, se requerirían 15625 experimentos debido a un mayor número de combinaciones a experimentar.

Se determinó que empleando PUF como soporte inerte, la concentración de peptona es la variable con mayor efecto positivo sobre la producción enzimática en medio sólido, debido probablemente al pH de alrededor de 7.0 que se genera en este medio y que favorece la asimilación del nitrógeno de la peptona.

Aún cuando en los intervalos de las concentraciones experimentadas para glucosa, almidón y ácido fólico no hubo efectos significativos sobre la producción enzimática, los efectos de las interacciones si resultaron significativos.

Con el presente trabajo, se muestra que la espuma de poliuretano adicionada con un medio optimizado, proporciona las condiciones necesarias para la producción de la enzima fitasa empleando *Aspergillus niger*, con lo que se logra una actividad enzimática 84% más elevada que el medio inicial.

Dentro de las concentraciones empleadas en el segundo modelo de optimización, se observó que hay un efecto significativo del segundo grado de la variable glucosa, por lo que se sugiere realizar experimentos exploratorios para determinar si aún se puede incrementar la producción enzimática al modificar las concentraciones de esta variable.

Dada la correlación observada del pH sobre la producción enzimática al ejercer un efecto positivo de la peptona, se sugiere la realización de experimentos para determinar el efecto del pH inicial del medio sobre la producción enzimática.

Por otro lado, para conocer el tipo de enzima y su grado de pureza, se sugiere realizar la purificación y caracterización de la enzima fitasa. Además, dado que se conoce la composición exacta del medio, se sugiere la realización de un balance de materia y energía para realizar un posible modelamiento matemático del sistema.

Finalmente, se sugiere realizar un balance de costos una vez purificada y caracterizada la fitasa obtenida con el medio diseñado sobre espuma de poliuretano, para determinar la factibilidad económica del empleo de este medio.

8. Referencias.

- Abarca M.L. 2000. Taxonomy y identification of the species involved in nosocomial aspergillosis. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17(3): S79-S84.
- Abarca M.L., Accensi F., Cano, J. y Cabañes F. J. 2004 Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86: 33–49.
- Auria R., Ortiz I., Villegas E. y Revah S. 1995. Influence of growth and high mould concentration on the pressure drop in solid state fermentations. *Process Biochemistry*, 30 (8): 751–756.
- Barrientos L., Scott J.J. y Murthy P.P.N. 1994. Specificity of hydrolysis of phytic acid by alkaline phytase from lily pollen. *Plant Physiology*, 106: 1489-1495.
- Brenes J., Viveros A., y Brenes A. 2002. Los enzimas en nutrición porcina (II). *Producción Animal*, Año XVII (181): 4-18.
- Brock T.D., Smith D.W., Madigan M.T. 1987. Microbiología, 4ª. Ed. *Prentice may Hispanoamericana*, México. 85-96.
- Box G.E.P., Draper N.R. 1987. Emperical Model building and Response Surfaces. *Wiley*, Nueva York.
- Cho J.S., Lee C.W., Kang S.H., Lee J.C., Bok J.D., Moon Y.S. 2003. Purification and characterization of a phytase from *Pseudomonas syringae* OK1. *Current Microbiology*, 47(4): 290–294.
- Chen Q.C., Li B.W. 2003. Separation of phytic acid and other related inositol phosphates by high-performance ion chromatography and its applications. *Journal of Chromatography*, 1018(1): 41-52.
- Dey G., Mitra A., Banerjee R., Maiti B.R. 2001. Enhanced production of amylase by optimization of nutritional constituents using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 7: 227–231.

- Díaz Godínez G., Soriano Santos J., Augur C. y Viniegra González G. 2001. Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26 (5): 271-275.
- Doelle H. W., Mitchell D. A. y Rolz C. E. 1992. Solid Substrate Cultivation. *Elsevier Applied Science*, London, New York, 3: 35.
- Doo Sang K., Godber J. S, Hyeung Rak K. 1999. Culture conditions for a new phytase-producing fungus. *Biotechnology Letters*, 21: 1077–1081.
- Ehrlich K.C., Montalbano B.G., Mullaney E.J., Dischinger H.C., Ullah A.H.J. 1993. Identification and cloning of a second phytase gene (phyB) from *Aspergillus niger(ficum)*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 195: 53–57.
- Elibol M. 2004. Optimization of medium composition for actiorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) with response surface methodology. *Process Biochemistry*, 39: 1057–1062.
- El Batal A.I., Karem H. Abdel. 2001. Phytase production and phytic acid reduction in rapeseed meal by *Aspergillus niger* during solid state fermentation. *Food Research International*, 34: 715–720.
- Ertola R., Yantorno O. y Mignone C. 1994. Microbiología Industrial. http://www.science.oas.org/Simbio/mbio_ind/mbio_ind.htm. Ben Gurion University, Israel.
- Fiske C.H., Subbarow Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*. 66: 376–400.
- Frisvad J.C., Hawksworth D.L., Kozakiewicz Z, Pitt J. I, Samsom R.A y Stolk A.C. 1990. In “Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification” R. A. Samsom y J.I. Pitte Edit. Plenum Press New York. 83-88.

- Frossard, E., Bucher M., Mächler F., Mozafar A. y Hurrell R. 2000. Potential for increasing the content and bioavailability of Fe, Zn, and Ca in plants for human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 861-879.
- Gibson D.M., Ullah A.H.J. 1988. Purification and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 260: 503–513.
- Gibson D.M., 1987. Production of extracellular phytase from *Aspergillus ficum* on starch media. *Biotechnology Letters*, 9(5): 305-310.
- Greiner R., Konietzny U., Jany K.D. 1993. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303: 107–113.
- Han Y.W., Wilson D.B., Lei X.G. 1999. Expression of an *Aspergillus niger* phytase gene (phyA) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 1915–1918.
- Harland B.F., Oberleas D. 1999. Phytic acid complex in feed ingredients. In: *Coelho MB, Kornegay ET (eds) Phytase in animal nutrition and waste management*, 2nd rev edn. BASF, México. 69–76.
- Harter Denis. 1999. Biotechnology in the feed industry. *Proc. Alltech's 15th Annual Symposium*. Ed. T.P. Lyons y K.A. Jacques. Nottingham University Press. 511-522.
- Hesseltine C.W. 1972. Solid State Fermentation. Biotechnology Report. *Biotechnology and Bioengineering*, XIV: 517-532.
- IUPAC y IUPAC-IUB. 1968. The nomenclature of cyclitols. *European Journal of Biochemistry*, 5: 1–12.

- IUPAC-IUB: Commission on Biochemical Nomenclature. 1977. Nomenclature of phosphorus containing compounds of biochemical importance. *European Journal of Biochemistry*, 79: 1–11.
- IUPAC-IUB. 1984. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry. Enzyme nomenclature. Academic Press Inc.
- Jahani M., Alizadeh M., Pirozifard M., Qudsevali A. 2008. Optimization of enzymatic degumming process for rice bran oil using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 41: 1892-1898.
- Jongbloed A.W., Van Der Klis J.D, Kemme P.A., Versteegh H.A.J., Mroz Z. 1996. *Proc. 47th European Association for Animal Production (EAAP)*, Lillehammer, Austria. 1-17.
- Kaur P., Satyanarayana T. 2005. Production of cell-bound phytase by *Pichia anomala* in an economical cane molasses medium: Optimization using statistical tools. *Process Biochemistry*, 40: 3095–3102.
- Kerovuo J., Lauraeus M., Nurminen P., Kalkkinen N., Apajalahti J. 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 2079–2085.
- Kornegay E.T. 1999. Feeding to reduce nutrient excretion: Effects of phytase on phosphorus and other nutrients. *Biotechnology in the Feed Industry. Proc. Alltech's 15th Annual Symposium Ed. T. P. Lyons and K. A. Jacques, ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK.* 461– 490.
- Kuehl R. O. 2001. Diseño de Experimentos: principios estadísticos de diseño y análisis de investigación, 2ª Edic. Thomson Learning. 435.
- Laboure A.M., Gagnon J, Lescure A.M. 1993. Purification and characterization of phytase (myo-inositol-hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (*Zea mays*) seedlings during germination. *Biochemical Journal*, 295:413–419.

- Lassen S.F., Breinholt P.J., Ostergaard R., Brugger R., Bischoff A., Wyss M. y Fuglsang C.C. 2001. Expression, Gene Cloning, and Characterization of Five Novel Phytases from Four Basidiomycete Fungi: *Peniophora iyicii*, *Agrocybe pediades*, *Ceriporia sp.*, and *Trametes pubescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4701–4707.
- Cox M.M., Nelson L.D. 2005. Lehninger. Principios de Bioquímica. 4ªEd. Editorial: Omega
- Li X.Y., Liu Z.Q., Chi Z.M. 2008. Production of phytase by a marine yeast *Kodamaea ohmeri* BG3 in an oats medium: Optimization by response surface methodology, *Bioresource Technology*, 99: 6386–6390.
- Liu B.L., Tzeng Y.M. 1998. Optimization of growth medium for production of spores from *Bacillus thuringiensis* using response surface methodology. *Bioprocess Engineering*, 18: 413–418.
- Loera O., Aguirre J., Viniegra G. 1999. Pectinase production by a diploid construct from two *Aspergillus niger* overproducing mutants. *Enzyme and Microbiology technology*, 25: 103–108.
- Lonsane B.K., Ghildyal N.P., Budiartman S. y Ramakrishna S.V. 1985. Engineering aspects of solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 7: 258–265.
- Marin Cervantes M. C., Matsumoto Y., Ramírez Coutiño L., Rocha Pino Z., Viniegra González G., Shirai K. 2008. Effect of moisture content in polyurethane foams as support for solid-substrate fermentation of *Lecanicillium lecanii* on the production profiles of chitinases. *Process Biochemistry*, 43: 24–32
- Martínez C., Ros G., Periago M.J., López G., Ortuño J. y Rincón. 1996. El ácido fítico en la nutrición humana. *Food Science and Technology International*, 2(4): 201-209.
- Mathews C.K., Van Holde K.E. y Ahern K.G. 2000. *Biochemistry*. 3ª Edición. Calif Pearson Education, 95: 701-704.

- Minjares Carranco A., Trejo Aguilar B.A., Aguilar G. y Viniegra González G. 1997. Physiochemical comparison between pectinase producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 21: 25–31.
- Montgomery D. C. 2000. Diseño y análisis de experimentos. 2ª Edición, México. *Limusa Wiley*. 467-494.
- Nagashima T., Tange T. y Anazawa H. 1999. Dephosphorylation of Phytate by Using the *Aspergillus niger* Phytase with a High Affinity for Phytate. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10): 4682-4684.
- Ostanin K., Harms E. H., Stevis P. E., Kuciel R., Zhou M. M. y Van Etten R.L. 1992. Overexpression, site-directed mutagenesis, and mechanism of *Escherichia coli* acid phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 22830-22836.
- Pandey A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13: 81-84.
- Pandey A., Szakacs G., Soccol C., Rodriguez-Leon J. and Zocol V. 2001. Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technology*, 77: 203–214.
- Pérez Guerra A., Torrado Agrassar C., López Macias y Pastrana L. 2003. Main characteristics and applications of solid state fermentation, *Electron. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2(3): 343–350.
- Peterson S.W. 1992. Abstr. 92nd Gen. Meeting Am. Soc. Microbiol. *American Society for Microbiology*. Washington D.C.: 198.
- Quan Chunsan, Fan S. y Ohta Y. 2003. Pathway of Dephosphorylation of myo-Inositol Hexakisphosphate by a Novel Phytase from *Candida krusei* WZ-001. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95 (5): 530-533.

- Raboy V. 2001. Seeds for a better future: Low phytate grains help to overcome malnutrition and reduce pollution, *Trends in Plant Science*, 6: 458–462.
- Raboy V. 2003. Myo-Inositol-1, 2, 3, 4, 5, 6-hexakisphosphate. *Phytochemistry*, 64: 1033–1043.
- Ramachandran S., Roopesha K., Nampoothiria K. Madhavan, Szakacs G., Pandey A. 2005. Mixed substrate fermentation for the production of phytase by *Rhizopus spp.* using oilcakes as substrates. *Process Biochemistry*, 40: 1749–1754
- Raper K.B. y Fennell D.I. 1965. The Genus *Aspergillus*. *Baltimore: Williams & Wilkins Company*. 686.
- Rodehutsord M. 1998. Proc. BASF Technical Symposium. *Raleigh, NC*: 32-45.
- Roopesh K., Ramachandran S., Nampoothiri K.M., Szakacs G. y Pandey A. 2006. Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*. *Bioresource Technology*, 97(3): 506-511.
- Scriban R. 1985. Biotecnología. 2da edición. *Editorial El manual Moderno S.A. México*. 669.
- Singh B., Satyanarayana T. 2008. Phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in solid state fermentation and its potential applications, *Bioresource Technology*, 99: 2824–2830.
- Sunitha K., Young Ok k., Jung Kee L., Tae Kwang O. 2000. Statistical optimization of seed and induction conditions to enhance phytase production by recombinant *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal*, 5: 51-56.
- Sreeramulu G., Srinivasa D.S., Nand K. y Josep R. 1996. *Lactobacillus amylovorus* as a phytase producer in submerged cultura. *Letters in Applied Microbiology*, 23: 385-388.

- Thompson L.V. 1987. Reduction of phytic acid concentration in protein isolates by acylation techniques. *Journal AOCS*, 64: 1712-717.
- Ullah A.H.J., Cummins B.J. 1987. Purification, N-terminal amino acid sequence and characterisation of pH 2.5 optimum acid phosphatase (E.C.3.1.3.2) from *Aspergillus ficuum*. *Preparative Biochemistry*, 17: 397– 422.
- Ullah A.H.J., Gibson D.M. 1987. Extracellular phytase (E.C.3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization. *Preparative Biochemistry*, 17: 63–91.
- Ullah A.H.J. 1988. *Aspergillus ficuum* phytase: partial primary structure, substrate selectivity, and kinetic characterization. *Preparative Biochemistry*, 18: 459-471.
- Ullah A.H. J. y Phillippy B.Q. 1994. Substrate selectivity in *Aspergillus ficuum* phytase and acid phosphatases using myo-inositol phosphates. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 42: 423-425.
- Vallardi M., Morales R., y Ávila E. 2002. Efecto de la adición de fitasa como fuente de fósforo inorgánico en dietas para gallinas de postura. *Técnica Pecuaria en México*, 40(2): 181-186.
- Van de Lagemaat J. y Pyle D.L. 2005. Modeling the uptake and growth kinetics of *Penicillium glabrum* in a tannic acid containing solid state fermentation for tannase production, *Process Biochemistry*, 40: 1773–1782.
- Vats P., Banerjee U.C. 2002. Studies on the production of phytase by a newly isolated strain of *Aspergillus niger* var *Teigham* obtained from rotten wood-logs. *Process Biochemistry*, 38: 211-217.
- Vats P., Banerjee U.C. 2004. Review. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. *Enzyme and Microbial Technology*, 35: 3–14

- Vincent J.B., Crowder M.W. y Averill B.A. 1992. Hydrolysis of phosphate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions. *Trends in Biochemical Sciences*, 17: 105- 110.
- Viniegra González G., Favela Torres E, Aguilar C, Romero Gómez S., Díaz Godínez G, Augur C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, 13: 157–167.
- Vohra Ashima, Satyanarayana T. 2002. Statistical optimization of the medium components by response surface methodology to enhance phytase production by *Pichia anomala*. *Process Biochemistry*, 37: 999–100
- Wang X., Upatham S., Panbangred W., Isarangkul D., Sumppunn P., Wiyakrutta S. y Meevootisomd V. 2004. Purification, Characterization, Gene Cloning and Sequence Analysis of a Phytase from *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* XY- 5. *Science Asia*, 30: 383-390.
- Weuster Botz D., 2000. Experimental design for fermentation media development: statistical design or Global random search?. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90 (5): 473–483.
- Wodzinski R.J., Ullah A.H.J. 1996. Phytase. *Advances in Applied Microbiology*, 42: 263-302.
- Wyss M., Brugger R., Kronenberg A., Remy R., Fimbel R., Oesterhel, G., Lehman M. y Van Loon A. P.G.M. 1999a. Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 367-373.
- Wyss M., Pasamontes L., Friedlein A., Rémy R., Tessier M., Kronenberger A., Middendorf A., Lehmann M., Schnoebelen L., Röthlisberger U., Kusznir E., Wahl G., Müller F., Lahm H.W., Vogel K. y Van Loon A. P. G. M. 1999b. Biophysical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): molecular sizes,

glycosylation patterns, and engineering of proteolytic resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 359-366.

Zyla K. 1993. The role of acid phosphatase activity during enzymic dephosphorylation of phytates by *Aspergillus niger* phytase. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 9, 117-119.

9. Anexos

9.1 Combinaciones en un diseño factorial fraccionado 2^{k-1}

Tabla A1. Combinación de niveles para un diseño factorial fraccionado 2^{6-1}

	Variable 1	Variable 2	Variable 3	Variable 4	Variable 5	Variable 6
1	1	1	1	1	1	1
2	-1	1	1	1	1	-1
3	1	-1	1	1	1	-1
4	-1	-1	1	1	1	1
5	1	1	-1	1	1	-1
6	-1	1	-1	1	1	1
7	1	-1	-1	1	1	1
8	-1	-1	-1	1	1	-1
9	1	1	1	-1	1	-1
10	-1	1	1	-1	1	1
11	1	-1	1	-1	1	1
12	-1	-1	1	-1	1	-1
13	1	1	-1	-1	1	1
14	-1	1	-1	-1	1	-1
15	1	-1	-1	-1	1	-1
16	-1	-1	-1	-1	1	1
17	1	1	1	1	-1	-1
18	-1	1	1	1	-1	1
19	1	-1	1	1	-1	1
20	-1	-1	1	1	-1	-1
21	1	1	-1	1	-1	1
22	-1	1	-1	1	-1	-1
23	1	-1	-1	1	-1	-1
24	-1	-1	-1	1	-1	1
25	1	1	1	-1	-1	1
26	-1	1	1	-1	-1	-1
27	1	-1	1	-1	-1	-1
28	-1	-1	1	-1	-1	1
29	1	1	-1	-1	-1	-1
30	-1	1	-1	-1	-1	1
31	1	-1	-1	-1	-1	1
32	-1	-1	-1	-1	-1	-1
33	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0
	Variable 1	Variable 2	Variable 3	Variable 4	Variable 5	Variable 6
35	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0

37	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0
41	0	0	0	0	0	0
42	α	0	0	0	0	0
43	$-\alpha$	0	0	0	0	0
44	0	α	0	0	0	0
45	0	$-\alpha$	0	0	0	0
46	0	0	α	0	0	0
47	0	0	$-\alpha$	0	0	0
48	0	0	0	α	0	0
49	0	0	0	$-\alpha$	0	0
50	0	0	0	0	α	0
51	0	0	0	0	$-\alpha$	0
52	0	0	0	0	0	α
53	0	0	0	0	0	$-\alpha$

9.2. Primer proceso de optimización

9.2.1. Regresión por mínimos cuadrados

Tabla A2. Variables introducidas y eliminadas

Modelo	Variables introducidas	Variables eliminadas	Método
1	M*M, FI*Fo*M, P*FI*M, P*Fi*Fo, A*Fo*M, A*Fi*M, A*Fi*Fo, A*P*M, A*P*Fo, A*P*Fi, G*A*Fi, Fo*M, Fi*M, Fi*Fo, P*M, P*Fo, P*Fi, A*M, A*Fo, A*Fi, A*P, G*M, G*Fo, G*Fi, G*P, G*A, Minerales, Fósforo, Ácido fólico, Peptona, Almidón, Glucosa, Fo*Fo, Fi*Fi, P*P, A*A, G*G ^a		. Introducir

Tabla A3. ANOVA^b

Modelo		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	54758.74	37	1479.97	16.23	0.00 ^a

Residual	1367.85	15	91.19
Total	56126.60	52	

a. Variables predictoras: (Constante), M*M, FI*Fo*M, P*FI*M, P*Fi*Fo, A*Fo*M, A*Fi*M, A*Fi*Fo, A*P*M, A*P*Fo, A*P*Fi, G*A*Fi, Fo*M, Fi*M, Fi*Fo, P*M, P*Fo, P*Fi, A*M, A*Fo, A*Fi, A*P, G*M, G*Fo, G*Fi, G*P, G*A, Minerales, Fósforo, Ácido fólico, Peptona, Almidón, Glucosa, Fo*Fo, Fi*Fi, P*P, A*A, G*G

b. Variable dependiente: Actividad enzimática

Tabla A4. Estadísticos sobre los residuos^a

	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica	N
Valor pronosticado	-2.15	129.52	59.82	32.45	53
Residual	-10.7	13.34	0.00	5.13	53
Valor pronosticado tip.	-1.91	2.15	0.00	1.00	53
Residuo típ.	-1.12	1.40	0.00	0.54	53

a. Variable dependiente: Actividad enzimática

Gráfico P-P normal de regresión Residuo tipificado

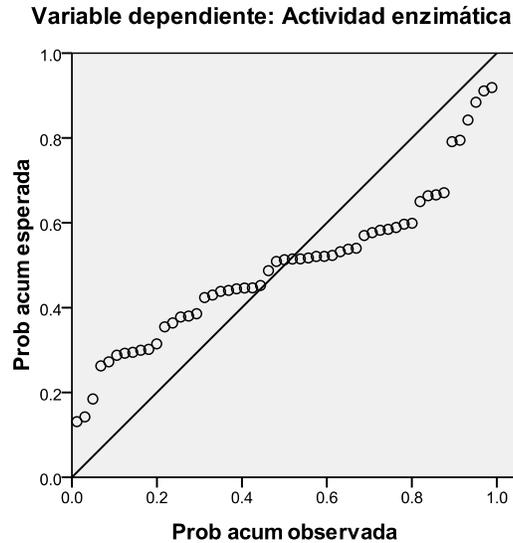


Figura A1. Distribución normal tipificada de los residuos.

9.3 .Segundo proceso de optimización

9.3.1 Regresión por mínimos cuadrados

Tabla A5. Variables introducidas y eliminadas

Modelo	Variables introducidas	Variables eliminadas	Método
1	M*M, FI*Fo*M, P*FI*M, P*Fi*Fo, A*Fo*M, A*Fi*M, A*Fi*Fo, A*P*M, A*P*Fo, A*P*Fi, G*A*Fi, Fo*M, Fi*M, Fi*Fo, P*M, P*Fo, P*Fi, A*M, A*Fo, A*Fi, A*P, G*M, G*Fo, G*Fi, G*P, G*A, Minerales, Fósforo, Ácido fólico, Peptona, Almidón, Glucosa, Fo*Fo, Fi*Fi, P*P, A*A, G*G ^a	.	Introducir

Tabla A6. ANOVA^b

Modelo	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
1 Regresión	32279.71	37	872.43	0.77	0.75 ^a
Residual	17097.72	15	1139.85		
Total	49377.43	52			

a. Variables predictoras: (Constante), M*M, FI*Fo*M, P*FI*M, P*Fi*Fo, A*Fo*M, A*Fi*M, A*Fi*Fo, A*P*M, A*P*Fo, A*P*Fi, G*A*Fi, Fo*M, Fi*M, Fi*Fo, P*M, P*Fo, P*Fi, A*M, A*Fo, A*Fi, A*P, G*M, G*Fo, G*Fi, G*P, G*A, Minerales, Fósforo, Ácido fólico, Peptona, Almidón, Glucosa, Fo*Fo, Fi*Fi, P*P, A*A, G*G

b. Variable dependiente: Actividad enzimática

Tabla A7. Estadísticos sobre los residuos^a

	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica	N
Valor pronosticado	4.80	140.70	31.57	24.92	53
Residual	-73.54	80.66	0.00	18.13	53
Valor pronosticado tip.	-1.08	4.38	0.00	1.00	53
Residuo típ.	-2.18	2.39	0.00	0.54	53

a. Variable dependiente: Actividad enzimática

**Gráfico P-P normal de regresión Residuo
tipificado**

Variable dependiente: Actividad enzimática

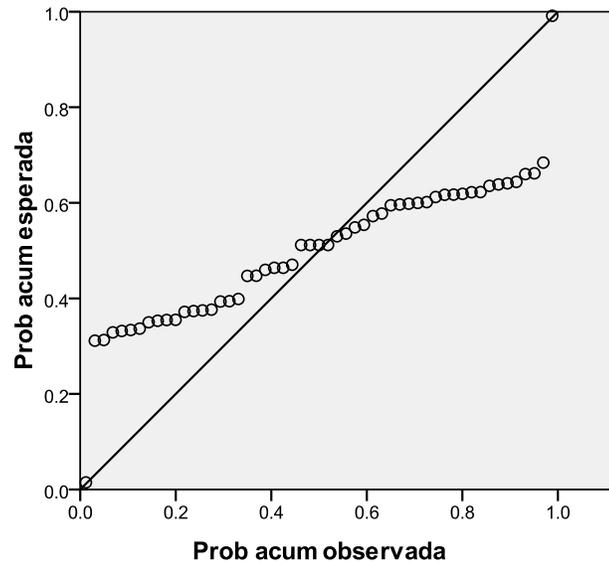


Figura A2. Distribución normal tipificada de los residuos.