

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

Producción de lipasas por *Yarrowia lipolytica* en
fermentación en medio sólido

TESIS

para obtener el grado de
Maestra en Biotecnología

PRESENTA

Gabriela Carrillo Sancén

Director: Dr. Ernesto Favela Torres
Asesores: Dra. Georgina B. Sandoval Fabián
Dr. Héctor B. Escalona Buendía

1 de diciembre del 2011

“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 1 de diciembre del 2011

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

Producción de lipasas por *Yarrowia lipolytica* en fermentación en medio sólido

que presentó
Gabriela Carrillo Sancén

Comité Tutorial:

Director: Dr. Ernesto Favela Torres
Asesor: Dra. Georgina B. Sandoval Fabián
Asesor: Dr. Héctor B. Escalona Buendía

Jurado:


Presidente: Dra. Concepción Keiko Shirai Matusmoto

Secretario: Dr. Héctor B. Escalona Buendía

Vocal: Dra. Georgina B. Sandoval Fabián



Vocal: Dr. Ricardo Hernández Martínez



DEDICATORIA

A Ximena, mi hija

A mi abuelita Gloria (q.e.p.d.)

A mis padres Fernando y Teresa que me han apoyado durante toda mi vida.

A mis hermanos Pepe y Fer

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar para agradecerles a todas estas personas que me ayudaron de alguna manera para poder llevar a cabo este trabajo.

Al Dr. Ernesto Favela Torres por dirigir esta tesis, por apoyarme y estar siempre presente para discutir cualquiera de mis necesidades.

A los miembros de mi jurado: Dr. Héctor Escalona Buendía, Dra. Georgina Sandoval Fabián, Dra. Keiko Shirai Matusmoto y Dr. Ricardo Hernández Martínez por sus aportaciones y sugerencias que ayudaron a mejorar este trabajo.

A mi amiga Daniela, gracias por acompañarme todos esos días y noches en el laboratorio, por escucharme y hacerme reír.

A mi amiga Josefa, por estar siempre presente.

A mis compañeros y amigos Nayeli, Ruth, Sara, Blanca, Miguel, Luz y Toño.

A todos mis compañeros de la planta piloto cuatro.

A todos muchas gracias!!!!

RESUMEN

Se evaluó la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* en fermentación en medio sólido (FMS) empleando agrolita como soporte inerte. Primero, se obtuvo la curva de crecimiento de *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en medio PDA para la producción de inóculo para la FMS. El crecimiento de *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en medio PDA mostró un comportamiento de cultivo sincrónico, con dos etapas de crecimiento lineal. Se seleccionó el inóculo de cinco días de incubación, ya que este se encontraba en la segunda fase de crecimiento lineal que tenía mayor concentración celular (3.6×10^8 células/mL).

Posteriormente, se evaluó la producción de lipasa por tres cepas de *Yarrowia lipolytica* (*Yarrowia lipolytica* ATCC 9773, *Yarrowia lipolytica* L0018 y *Yarrowia lipolytica* PC) mediante cinéticas a 30°C y 40°C. El sistema de fermentación empleado para la FMS consistió en matraces Erlenmeyer de 125 mL con agrolita impregnada con medio de cultivo basal inoculado y aceite de girasol como inductor. La cepa *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 a las 24 horas mostró la mayor producción de actividad lipasa (2.26 U/g_{si}) seguida de la cepa *Yarrowia lipolytica* L0018 (1 U/g_{si}) a las 48 horas de fermentación, ambas a 30°C, razón por la cual se seleccionaron estas dos cepas para llevar a cabo los siguientes estudios.

Con las cepas *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 y *Yarrowia lipolytica* L0018 se llevaron a cabo estudios de extracción de lipasa de la materia seca fermentada con soluciones de detergentes (NLS y Tritón X-100 en amortiguador de NaH₂PO₄ 100mM, NaCl 100 mM pH 7.0). Los valores mayores de actividad lipasa se obtuvieron extrayendo con la solución de NLS 3 mM. Además se realizó una cinética de producción de lipasa extrayendo con la solución de NLS 3 mM. La cepa *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 mostró producción constante de lipasa durante 1 día aproximadamente a partir de las 24 horas de fermentación, razón por la cual se seleccionó para realizar los estudios de optimización de la producción de lipasa en FMS.

Para los estudios de optimización de la producción de lipasa primero se evaluaron 12 factores mediante un diseño factorial fraccionado 2^{12-8} en la etapa de cribado. A partir de ese diseño se seleccionaron seis factores que se evaluaron en un diseño factorial fraccionado 2^{6-2} en la etapa de búsqueda de primer orden. Se seleccionaron los factores concentración de glucosa, aceite de girasol y urea para evaluarlos en un diseño Box-Behnken, el primer diseño

de búsqueda de segundo orden. A partir de este, se seleccionaron los factores concentración de glucosa y urea que se evaluaron en los siguientes diseños (factorial 4^2 , factorial 3^2 A y factorial 3^2 B). Se incluyeron controles en los últimos tres diseños para verificar que la actividad lipasa obtenida en los diseños sobrepasaba la actividad obtenida con las condiciones iniciales de producción de lipasa. Lo cual no ocurrió, razón por la cual se seleccionaron las condiciones y el medio del control como las mejores para la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en FMS obteniendo 37.2 U/g_{si}. Esta actividad sobrepasa los niveles de actividad lipasa de algunos de los reportes de la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* en FMS y en fermentación sumergida.

Este es el primer reporte de la producción y extracción (con soluciones de detergentes) de lipasas por *Yarrowia lipolytica* en FMS utilizando agrolita como soporte inerte.

ABSTRACT

Lipase production by *Yarrowia lipolytica* in solid state fermentation (SSF) using perlite as inert support was evaluated. Firstly, the growth curve of *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 in PDA medium for the inoculum production for the SSF was obtained. The growth of *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 in PDA medium showed a behavior of a synchronic culture, with two lineal growth stages. The inoculum of five days of incubation was selected, because it was in the second stage of lineal growth that had the highest cell concentration (3.6×10^8 cells/mL).

Then the production of lipase by three strains of *Yarrowia lipolytica* (*Yarrowia lipolytica* ATCC 9773, *Yarrowia lipolytica* L0018 y *Yarrowia lipolytica* PC) was evaluated with kinetics at 30°C and 40°C. The fermentation system employed for the SSF was a 125mL Erlenmeyer flask with perlite impregnated with inoculated basal medium with sunflower oil as inductor. The strain *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 at 24 hours showed the highest production of lipase activity (2.26 U/g_{si}) then continued the strain *Yarrowia lipolytica* L0018 (1 U/g_{si}) at 48 hours of fermentation, both at 30°C, the reason why these two strains were selected to conduct the following studies.

Studies on the extraction of lipase from the dry fermented matter with detergents solutions (NLS y Triton X-100 in NaH₂PO₄ 100mM, NaCl 100 mM pH 7.0 buffer) with the strains *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 y *Yarrowia lipolytica* L0018 were carried out. The highest values of lipase activity were obtained extracting with the NLS 3 mM solution. A kinetic of the production of lipase extracting with NLS 3 mM was realized. The strain *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 showed a constant production during 1 day approximately beginning at 24 hours of fermentation, which is the reason why it was selected to carry out the studies of optimization of the lipase production in SSF.

For the optimization of the production of lipase studies, first 12 factors were evaluated using a fractional factorial 2^{12-8} design in the stage of screening. From that design six factors were selected and were evaluated in a fractional factorial 2^{6-2} at the stage of first order search. The factors glucose, sunflower oil and urea concentration were selected to be evaluated in a Box-Behnken design, the first design of second order search. From this we selected the factors glucose and urea concentrations that were evaluated in the following designs (factorial 4^2 , factorial 3^2 A y factorial 3^2 B). Controls were included in the last three designs to verify that the

lipase activity obtained in the designs exceeded the activity obtained with the initial conditions for lipase production. This did not happen, the reason why the conditions and the medium of the control were chosen as the best for the production of lipase by *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 in SSF, obtaining 37.2 U/g_{si}. This activity surpasses lipase activity levels of some of the reports of the production of lipase by *Yarrowia lipolytica* in SSF and submerged fermentation.

This is the first report of the production and extraction (with detergent solutions) of lipase by *Yarrowia lipolytica* in SSF using perlite as inert support.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Lipasas.....	2
2.1.1 Fuentes.....	3
2.1.2 Aplicaciones.....	3
2.1.3 Producción de lipasas.....	4
2.2 Fermentación en medio sólido.....	9
2.2.1 Agrolita.....	11
2.3 <i>Yarrowia lipolytica</i>	11
2.3.1 Dimorfismo.....	11
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVOS	14
5.1 Objetivo general.....	14
5.2 Objetivos específicos.....	14
6. ESTRATEGIA GENERAL	15
7. MATERIALES Y MÉTODOS	17
7.1 Materiales y reactivos.....	17
7.2 Equipos.....	18
7.3 Metodología.....	18
7.3.1 Conservación de los microorganismos.....	18
7.3.2 Curva de crecimiento de <i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 9773 en medio PDA.....	18
7.3.3 Fermentación en medio sólido para la producción de lipasa.....	21
7.3.4 Determinación de actividad lipasa.....	25
7.3.5 Efecto de detergentes en la extracción de lipasa.....	27
7.3.6 Optimización de la producción de lipasa por <i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 9773 en fermentación en medio sólido.....	29
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
8.1 Producción de inóculo de <i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 9773 en medio PDA.....	32
8.1.1 Conclusiones parciales.....	35
8.2 Producción de lipasa por tres cepas de <i>Yarrowia lipolytica</i> en fermentación en medio sólido.....	36
8.2.1 Conclusiones parciales.....	41
8.3 Efecto de detergentes en la extracción de lipasa producida por <i>Yarrowia lipolytica</i> en fermentación en medio sólido.....	42
8.3.1 Efecto de detergentes en la actividad lipasa extracelular.....	44
8.3.2 Extracción de lipasa de materia seca fermentada.....	48
8.3.3 Cinéticas de producción de lipasas.....	53
8.3.4 Conclusiones parciales.....	56
8.4 Optimización de la producción de lipasa por <i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 9773 en fermentación en medio sólido.....	56
8.4.1 Efecto del inductor sobre la producción de lipasa por <i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 9773 en fermentación en medio sólido.....	56

8.4.2	Efecto de diferentes concentraciones del medio de cultivo basal sobre la producción de lipasa por <i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 9773 en fermentación en medio sólido.....	59
8.4.3	Optimización.....	61
8.4.4	Conclusiones parciales.....	102
8.5	Discusión general.....	103
9.	CONCLUSIONES	104
10.	RECOMENDACION	105
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
12.	ANEXOS	116
12.1	Curva estándar de <i>p</i> -nitrofenol.....	116
12.2	Diseños estadísticos.....	116
12.3	Efecto de detergentes en la actividad y en la extracción de lipasa de materia seca fermentada de <i>Yarrowia lipolytica</i>	127
12.4	Efecto de diferentes concentraciones del medio de cultivo basal sobre la producción de lipasa por <i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 9773 en fermentación en medio sólido.....	129
12.5	Análisis de los diseños estadísticos.....	130
12.6	Relación C/N de los medios de cultivo.....	134

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página	
Figura 6.1	Estrategia general.....	16
Figura 7.1	Matraces Erlenmeyer de 250 mL con medio PDA inoculados con <i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 9773 en incubación a 30°C.....	19
Figura 7.2	Llenado de la cámara de Neubauer.....	20
Figura 7.3	Cámara de Neubauer.....	20
Figura 7.4	Tamices empleados en el tamizado de la agrolita.....	22
Figura 7.5	Sistema para la FMS para la producción de lipasa por <i>Yarrowia lipolytica</i>	25
Figura 8.1	Curva de crecimiento de <i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 9773 en PDA.....	32
Figura 8.2	Microfotografías (objetivo 40 X) a una dilución 1:100 a diferentes días de incubación en medio PDA utilizando <i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 9773.....	33
Figura 8.3	Relación lineal entre concentración celular (No. de células/mL) y densidad óptica (420 nm).....	35
Figura 8.4	Cinéticas de producción de lipasa en fermentación en medio sólido a 30°C.....	36
Figura 8.5	Evolución del pH durante la fermentación en medio sólido a 30°C.....	37
Figura 8.6	Microfotografías (objetivo 40 X) de <i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 9773 durante la FMS a 30°C.....	38
Figura 8.7	Microfotografías (objetivo 40 X) de <i>Yarrowia lipolytica</i> L0018 durante la FMS a 30°C.....	39

Figura 8.8	Cinética de producción de lipasa en fermentación en medio sólido a 40°C.....	40
Figura 8.9	Evolución del pH durante la fermentación en medio sólido a 40°C.....	40
Figura 8.10	Microfotografías (objetivo 40 X) de <i>Yarrowia lipolytica</i> PC durante la FMS a 40°C.	41
Figura 8.11	Estrategia utilizada en la extracción de lipasa de la materia seca fermentada.	43
Figura 8.12	Efecto del detergente en la actividad del extracto extracelular.....	46
Figura 8.13	Extracción de lipasa de la materia seca fermentada con soluciones de detergentes.....	48
Figura 8.14	Valores de actividad lipasa posterior a lavados sucesivos de la materia seca fermentada con amortiguador de NaH ₂ PO ₄ 100mM, NaCl 100 mM pH 7.0 empleada en los estudios de extracción con la solución del detergente NLS.....	49
Figura 8.15	Extracción de lipasa de materia seca fermentada con la solución del detergente NLS posterior a los dos lavados con amortiguador.....	50
Figura 8.16	Valores de actividad lipasa posterior a lavados sucesivos de la materia seca fermentada con amortiguador de NaH ₂ PO ₄ 100mM, NaCl 100 mM pH 7.0 empleada en los estudios de extracción con la solución del detergente Tritón X-100.....	50
Figura 8.17	Extracción de lipasa de materia seca fermentada con la solución del detergente Tritón X-100 posterior a los dos lavados con amortiguador... ..	51
Figura 8.18	Cinética de producción de lipasa por <i>Yarrowia lipolytica</i> en fermentación en medio sólido.....	54
Figura 8.19	Cinética de comparación de los inductores: aceite de girasol y aceite de oliva sobre la producción de lipasa.....	57
Figura 8.20	Productividad de lipasa empleando diferentes concentraciones del medio de cultivo basal.....	60
Figura 8.21	Estrategia de los estudios de optimización de la producción de lipasa.....	62
Figura 8.22	Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño factorial fraccionado 2 ³ con punto al centro.....	65
Figura 8.23	Microfotografías (objetivo 40 X) de <i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC a una dilución 1:100 para los tratamientos con menos contaminación.....	65
Figura 8.24	Gráfica de Pareto estandarizada para actividad lipasa del diseño 2 ³ con punto al centro.....	66
Figura 8.25	Gráfica de efectos principales para actividad lipasa del diseño 2 ³ con punto al centro.....	66
Figura 8.26	Gráfica de interacciones para actividad lipasa del diseño 2 ³ con punto al centro.....	67
Figura 8.27	Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño factorial fraccionado 2 ¹²⁻⁸	71
Figura 8.28	Gráfica de Pareto estandarizada para actividad lipasa del diseño 2 ¹²⁻⁸	71
Figura 8.29	Gráfica de efectos principales para actividad lipasa del diseño 2 ¹²⁻⁸	72
Figura 8.30	Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño factorial fraccionado 2 ⁶⁻²	75

Figura 8.31	Gráfica de Pareto estandarizada para actividad lipasa del diseño 2^{6-2}	76
Figura 8.32	Gráfica de efectos principales para actividad lipasa del diseño 2^{6-2}	76
Figura 8.33	Gráfica de efectos principales para actividad lipasa normalizada de los factores: glucosa, aceite de girasol y urea. Diseños: factorial fraccionado 2^{12-8} , factorial fraccionado 2^{6-2}	78
Figura 8.34	Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño Box-Behnken.	81
Figura 8.35	Gráfica de Pareto estandarizada para actividad lipasa del diseño Box-Behnken.	82
Figura 8.36	Gráfica de efectos principales para actividad lipasa del diseño Box-Behnken.	82
Figura 8.37	Superficie de respuesta estimada del diseño Box-Behnken. Aceite de girasol = 25mg/gsi.	83
Figura 8.38	Gráfica de efectos principales para actividad lipasa normalizada de los factores: glucosa, aceite de girasol y urea. Diseños: factorial fraccionado 2^{12-8} , factorial fraccionado 2^{6-2} , Box-Behnken.....	84
Figura 8.39	Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño 4^2	87
Figura 8.40	Gráfica de Pareto estandarizada para actividad lipasa del diseño factorial 4^2	88
Figura 8.41	Gráfica de efectos principales para actividad lipasa del diseño 4^2	88
Figura 8.42	Superficie de respuesta estimada del diseño 4^2	89
Figura 8.43	Gráfica de efectos principales para actividad lipasa normalizada de los factores: glucosa y urea. Diseños: factorial fraccionado 2^{12-8} , factorial fraccionado 2^{6-2} , Box-Behnken, factorial 4^2	90
Figura 8.44	Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño factorial 3^2A	92
Figura 8.45	Gráfica de Pareto estandarizada para actividad lipasa del diseño factorial 3^2A	93
Figura 8.46	Gráfica de efectos principales para actividad lipasa del diseño 3^2A	93
Figura 8.47	Superficie de respuesta estimada del diseño 3^2A	94
Figura 8.48	Gráfica de efectos principales para actividad lipasa normalizada de los factores: glucosa y urea. Diseños: factorial fraccionado 2^{12-8} , factorial fraccionado 2^{6-2} , Box-Behnken, factorial 4^2 , factorial 3^2A	95
Figura 8.49	Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño factorial 3^2B	97
Figura 8.50	Gráfica de Pareto estandarizada para actividad lipasa del diseño factorial 3^2B	98
Figura 8.51	Gráfica de efectos principales para actividad lipasa del diseño 3^2B	98
Figura 8.52	Superficie de respuesta estimada del diseño 3^2B	99
Figura 8.53	Gráfica de efectos principales para actividad lipasa normalizada de los factores: glucosa y urea. Diseños: factorial fraccionado 2^{12-8} , factorial fraccionado 2^{6-2} , Box-Behnken, factorial 4^2 , factorial 3^2A , factorial 3^2B	99
Figura 8.54	Efecto de la relación C/N sobre la producción de lipasa.....	100

Figura 8.55	Actividad de enzimas lipolíticas de <i>Yarrowia lipolytica</i> en esteres de <i>p</i> -nitrofenol con ácidos grasos de diferente longitud de cadena (solución cruda de enzima extracelular concentrada, 100% actividad=406U/dm ³). (Deive y col. 2009).....	104
Figura 12.1	Curva estándar de <i>p</i> -nitrofenol.....	116
Figura 12.2	Cinéticas empleando las diferentes concentraciones del medio de cultivo basal.....	129
Figura 12.3	Gráfica de interacciones para actividad del diseño Box-Behnken.....	132
Figura 12.4	Gráfica de interacciones para actividad del diseño factorial 4 ²	132
Figura 12.5	Gráfica de interacciones para actividad del diseño factorial 3 ^{2a}	133
Figura 12.6	Gráfica de interacciones para actividad del diseño factorial 3 ^{2B}	134

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 7.1	Macronutrientes del medio de cultivo basal para la fermentación en medio sólido para la producción de lipasa.....	23
Tabla 7.2	Oligoelementos del medio de cultivo basal para la fermentación en medio sólido para la producción de lipasa.....	24
Tabla 7.3	Soluciones concentradas de cada uno de los componentes del medio de cultivo con su correspondiente densidad.....	29
Tabla 8.1	Concentración celular de levaduras y esporas de hongos filamentosos en medio sólido.....	34
Tabla 8.2	Estudios en los cuales comparan la producción de lipasa empleando diferentes tipos de inductores lipídicos.....	58
Tabla 8.3	Composición de ácidos grasos de algunos aceites vegetales (Takaç y Marul 2008, Mittelbach 1990 y Noor Lida y col. 2002).....	59
Tabla 8.4	Factores y niveles empleados en el diseño factorial 2 ³ con punto al centro.....	64
Tabla 8.5	Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño factorial fraccionado 2 ³ con punto al centro.....	64
Tabla 8.6	Factores y niveles empleados en el diseño factorial saturado 2 ¹²⁻⁸	69
Tabla 8.7	Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño factorial fraccionado 2 ¹²⁻⁸	70
Tabla 8.8	Factores y niveles empleados en el diseño factorial saturado 2 ⁶⁻²	74
Tabla 8.9	Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño factorial fraccionado 2 ⁶⁻²	75
Tabla 8.10	Factores y niveles empleados en el diseño Box Behnken.....	80
Tabla 8.11	Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño Box-Behnken.....	81
Tabla 8.12	Factores y niveles empleados en el diseño factorial 4 ²	86
Tabla 8.13	Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño 4 ²	87
Tabla 8.14	Factores y niveles empleados en el diseño factorial 3 ^{2A}	91
Tabla 8.15	Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño	

	factorial 3^2 A.....	92
Tabla 8.16	Factores y niveles empleados en el diseño factorial 3^2 B.	96
Tabla 8.17	Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño factorial 3^2 B.....	97
Tabla 8.18	Actividad máxima obtenida con los diseños de optimización junto con la combinación de la concentración de los componentes glucosa, aceite de girasol y urea.....	101
Tabla 8.19	Diferentes actividades lipasa obtenidas en otras referencias utilizando <i>Yarrowia lipolytica</i>	106
Tabla 12.1	Preparación de los medios correspondientes a cada tratamiento del diseño factorial fraccionado 2^{12-8}	117
Tabla 12.2	Preparación de los medios correspondientes a cada tratamiento del diseño factorial fraccionado 2^{6-2}	119
Tabla 12.3	Preparación de los medios correspondientes a cada tratamiento del diseño Box Behnken.....	121
Tabla 12.4	Preparación de los medios correspondientes a cada tratamiento del diseño factorial 4^2	123
Tabla 12.5	Preparación de los medios correspondientes a cada tratamiento del diseño factorial 3^2 A.....	125
Tabla 12.6	Preparación de los medios correspondientes a cada tratamiento del diseño factorial 3^2 B.....	126
Tabla 12.7	Efecto del NLS en la actividad y en la extracción de lipasa de materia seca fermentada de <i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 9773.....	127
Tabla 12.8	Efecto del NLS en la actividad y en la extracción de lipasa de materia seca fermentada de <i>Yarrowia lipolytica</i> L0018.....	127
Tabla 12.9	Efecto del tritón X-100 en la actividad y en la extracción de lipasa de materia seca fermentada de <i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 9773.....	128
Tabla 12.10	Efecto del tritón X-100 en la actividad y en la extracción de lipasa de materia seca fermentada de <i>Yarrowia lipolytica</i> L0018.....	128
Tabla 12.11	Análisis de varianza de la productividad de lipasa empleando diferentes concentraciones del medio de cultivo basal.....	129
Tabla 12.12	Resultados del método de Tukey de la productividad de lipasa empleando diferentes concentraciones del medio de cultivo basal.....	130
Tabla 12.13	Análisis de varianza del diseño factorial 2^3 con punto al centro.....	130
Tabla 12.14	Análisis de varianza del diseño factorial saturado 2^{12-8}	130
Tabla 12.15	Análisis de varianza del diseño factorial saturado 2^{6-2}	131
Tabla 12.16	Análisis de varianza del diseño Box Behnken.....	131
Tabla 12.17	Análisis de varianza del diseño factorial 4^2	132
Tabla 12.18	Análisis de varianza del diseño factorial 3^2 A.....	133
Tabla 12.19	Análisis de varianza del diseño factorial 3^2 B.....	133
Tabla 12.20	Relación C/N de los tratamientos del diseño factorial 4^2	136
Tabla 12.21	Relación C/N de los tratamientos del diseño factorial 3^2 A.....	137
Tabla 12.22	Relación C/N de los tratamientos del diseño factorial 3^2 B.....	137

1. INTRODUCCIÓN

Las lipasas (triacilglicerol ester hidrolasas, EC 3.1.1.3) son enzimas clave en la biotecnología, ya que tienen una gran variedad de aplicaciones industriales (Gupta y col. 2004).

Las lipasas microbianas han obtenido especial atención industrial debido a su estabilidad, selectividad y amplia especificidad por sustratos. Muchos microorganismos tienen la capacidad de producir lipasas extracelulares, incluyendo bacterias, levaduras y hongos (Treichel y col. 2010).

Yarrowia lipolytica es una levadura Ascomycota que ha sido descrita como un buen productor de lipasas (Deive y col. 2010). La gran mayoría de los reportes de la producción de lipasas por *Yarrowia lipolytica* emplean la fermentación sumergida (FSm) y solo se han encontrado dos en los cuales emplean la fermentación en medio sólido (FMS) (Domínguez y col. 2003a y Babu y col. 2007b).

La fermentación en medio sólido (FMS) se define como el cultivo de microorganismos en soportes sólidos húmedos, ya sea en soportes inertes o en sustratos insolubles que pueden servir como fuente de carbono y energía. La FMS es una tecnología que resulta tener varias ventajas, aunque hasta el momento solo a pequeña escala, de potencial económico significativo e importancia ecológica comparada con la FSm. Algunas de ellas son: productividades más altas, menor represión catabólica y requiere menor cantidad de agua (Hölker y col. 2004).

Con base en lo anterior resulta de interés estudiar la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* en el sistema FMS como una estrategia de buscar mejorar la productividad de esta enzima. Para lo cual en el presente trabajo primero se estableció la metodología para la producción de inóculo, seguido de la realización de la FMS empleando agrolita como soporte inerte. Posteriormente se llevaron a cabo estudios de extracción de lipasa mediante soluciones de detergentes. Finalmente se buscó la optimización de la producción de lipasa mediante la metodología de superficie de respuesta.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lipasas

Las lipasas (triacilglicerol ester hidrolasas, EC 3.1.1.3) son enzimas ubicuas que pertenecen a la familia de las serín hidrolasas (Reetz 2002; Ghanem 2007). Bajo condiciones acuosas hidrolizan el enlace carboxil ester presente en triglicéridos para liberar ácidos grasos y glicerol (Gupta y col. 2004). Cuando se emplean solventes orgánicos como medio de reacción, llevan a cabo las reacciones de esterificación, transesterificación (incluye alcoholisis y acidólisis), interesterificación y aminolisis (Ghanem 2007; Gupta y col. 2004; Pandey y col. 1999). Las lipasas también poseen actividad estereolítica, a pesar de que actúan sobre una amplia gama de sustratos, son catalizadores altamente quimio-, regio- y enantioselectivos (Gupta y col. 2004).

Aunque normalmente sus sustratos preferidos son triglicéridos, estas enzimas pueden hidrolizar una amplia gama de esteres insolubles (Fickers y col. 2005b).

Su especificidad por sustratos, su regio- y enantio- selectividad y requerimientos de temperaturas y presiones más bajas constituyen importantes ventajas sobre los catalizadores químicos (Domínguez y col. 2003b).

Las lipasas comparten un plegamiento en común del tipo α/β hidrolasa, y la estructura comúnmente contiene una pequeña hélice α , conocida como tapa, la cual cubre al sitio activo. Esta conformación es llamada la conformación cerrada. Cuando la lipasa es adsorbida a una interfase, la tapa es desplazada para que el sitio activo se vuelva accesible al sustrato. Esta conformación es llamada la conformación abierta. Se piensa que las estructuras de la lipasa libre o ligada representan las conformaciones de comienzo y finalización del proceso de activación interfacial. (Mogensen y col. 2005).

Tanto las lipasas como las esterasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces ester. Las lipasas pueden ser distinguidas de las esterasas por el fenómeno de activación interfacial y/o por tener una tapa que cubre al sitio activo de la enzima. Además, las esterasas son definidas como las enzimas que hidrolizan triglicéridos de cadenas cortas y sustratos solubles en agua, mientras que las lipasas son enzimas que hidrolizan triglicéridos de cadenas largas y prefieren sustratos insolubles (Ateşlier y Metin 2006).

2.1.1 Fuentes

A pesar de que las lipasas se encuentran distribuidas en la flora y fauna de todo el planeta, siendo producidas por varias plantas, animales y microorganismos; son producidas por una gran diversidad de microorganismos, y son éstas, las lipasas más utilizadas en biotecnología y química orgánica (Pandey y col. 1999; Gupta y col. 2004).

Dependiendo del microorganismo se pueden producir lipasas con diferentes propiedades enzimológicas y especificidades por sustratos (Domínguez y col. 2003b).

La demanda industrial por nuevas fuentes de lipasas con diferentes características catalíticas estimula el aislamiento y selección de nuevas cepas. Microorganismos productores de lipasas han sido aislados en diferentes hábitats tales como residuos industriales, fabricas procesadoras de aceite vegetal, plantas de lácteos, suelos contaminados con aceites y semillas oleaginosas con aceites, entre otras (Treichel y col. 2010).

2.1.2 Aplicaciones

Las lipasas han emergido como enzimas clave en la biotecnología, ya que debido a sus propiedades multifacéticas tienen una gran variedad de aplicaciones industriales (Gupta y col. 2004). En la industria de alimentos se emplean en el desarrollo de sabores. Se usan como ingredientes en la formulación de detergentes. Pero además su aplicación se da en industrias tales como: de los cosméticos y perfumes, del papel, la textil y en pesticidas.

El hecho de que las lipasas se mantengan activas en varios solventes orgánicos ha permitido su uso en la catálisis de reacciones de inter- y trans-esterificación de aceites y grasas. Además, llevan a cabo la resolución de mezclas racémicas farmacéuticas. Tienen aplicación en la biorremediación, por ejemplo en el tratamiento de aguas residuales.

Otras aplicaciones de las lipasas son: herramienta de diagnóstico, en biomédica, en el desengrasado de la piel, en la producción de biodiesel, entre otras (Hasan y col. 2006; Pandey y col. 1999; Fickers y col. 2005b).

En los campos médico y terapéutico son particularmente importantes como sustitutos de las lipasas pancreáticas (Fickers y col. 2005b).

2.1.3 Producción de lipasas

La producción de lipasas microbianas es influenciada de gran manera por la composición del medio de cultivo además de factores fisicoquímicos tales como temperatura, pH y aireación.

El mayor factor para la expresión de la actividad lipasa siempre se ha reportado como la fuente de carbono, ya que las lipasas son enzimas inducibles. Estas enzimas son generalmente producidas en la presencia de lípidos tales como aceites u otros inductores, como triglicéridos, ácidos grasos, esteres hidrolizables, surfactantes (Tweens, sales biliares, etc) y glicerol (Domínguez y col. 2003b y Treichel y col. 2010).

Las fuentes de carbono lipídicas parecen ser esenciales para obtener un alto rendimiento de lipasa. Aunque las fuentes de nitrógeno y micronutrientes esenciales también deben ser considerados cuidadosamente para el crecimiento y la optimización de la producción (Treichel y col. 2010).

2.1.3.1 Producción de lipasas por *Yarrowia lipolytica*

La levadura *Yarrowia lipolytica* ha sido descrita como un buen productor de lipasas (Deive y col. 2010). Esta levadura presenta actividad extracelular, ligada a la membrana e intracelular. La producción de lipasa por esta levadura depende de la composición del medio y las condiciones ambientales (Darvishi y col. 2007).

Existen diversos estudios de la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica*. En algunos han mejorado la producción de esta enzima modificando el medio de cultivo y las condiciones cultivo (Corzo y Revah 1999, Domínguez y col. 2003b, Fickers y col. 2004, Kamzolova y col. 2005, Fonseca y col. 2007, Babu y col. 2007a y Darvishi y col. 2009). Otros han recurrido a la modificación genética de las cepas (Destain y col. 1997 y Fickers y col. 2005a).

Aunque cabe destacar que se ha reportado gran variabilidad entre las cepas de *Yarrowia lipolytica* en cuanto a la producción de estas enzimas. Guerzoni y col. (2001), realizaron una investigación con 12 diferentes cepas de esta levadura, encontrando variabilidad de actividad lipolítica entre las cepas. Kamzolova y col. (2005) evaluaron la producción de lipasa en 27 diferentes cepas de *Yarrowia lipolytica* encontrando heterogeneidad en los niveles de actividad obtenidos con las diferentes cepas. Domínguez y col. (2003b) mencionan que la existencia de diferencias significativas en el comportamiento de diferentes cepas de *Yarrowia*

lipolytica y apoyan la necesidad de realizar un estudio preliminar cuando se lleva a cabo la producción de lipasa por una cepa en particular.

En algunos de los reportes de producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* se ha encontrado que la mejor fuente de carbono es la glucosa (Babu y col. 2007a y Corzo y Revah 1999), en otros es el ácido oleico (Fickers y col. 2004) o aceites tales como el de oliva (Darvishi y col. 2009) o el de colza (Kamzolova y col. 2005).

Las fuentes de nitrógeno orgánico (urea, extracto de levadura, triptona) son las que más favorecen la producción de lipasa por esta levadura (Babu y col. 2007a, Corzo y Revah 1999, Darvishi y col. 2009 y Fickers y col. 2004).

La condición de cultivo que menos varía independientemente de la cepa es la temperatura, esta generalmente se fija a 30°C (Domínguez y col. 2003b y Darvishi y col. 2009). Corzo y Revah (1999) mediante un análisis de superficie de respuesta, encontraron que la temperatura era el factor más importante en la producción de lipasas por *Yarrowia lipolytica* en FSM, siendo el valor óptimo predicho de 29.5 °C. De igual manera, en el reporte de Babu y col. 2007a, al evaluar el efecto de la temperatura encontraron que el óptimo era 30°C.

El efecto del pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* es el menos estudiado. Generalmente, este es fijado a valores que van desde 4.5 (Deive y col. 2010 y Kamzolova y col. 2005) hasta 7 (Destain y col. 1997). Mediante un análisis de superficie de respuesta Corzo y Revah (1999) encontraron que el pH inicial óptimo era de 4.7.

Se ha observado que la presencia de determinados compuestos en el medio de cultivo inhiben la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica*. No se ha observado actividad lipasa en medios que contenían glicerol, ya que este es el producto final de la hidrólisis de triglicéridos y podría reprimir la inducción de lipasa. Tampoco se detectó producción de lipasa en medios que contenían sulfato de amonio (Corzo y Revah 1999 y Babu y col. 2007a).

Se ha reportado que la producción de lipasas por *Yarrowia lipolytica* está relacionada con la producción de biomasa (Domínguez y col. 2003a y Corzo y Revah 1999). En el reporte de Darvishi y col. (2009) se obtuvo la producción de actividad lipasa máxima cuando las células de *Yarrowia lipolytica* estaban en la fase estacionaria de crecimiento.

La gran mayoría de los estudios de la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* se han realizado en FSm y solo se han encontrado dos reportes de la producción de lipasa por FMS.

2.1.3.2 Producción de lipasas por *Yarrowia lipolytica* en FMS

Existen pocos reportes de la producción de lipasas por levaduras empleando fermentación en medio sólido (Rao y col. 1993a, Rao y col. 1993b, Bhushan y col. 1994, Benjamín y Pandey 1998, Domínguez y col. 2003a, y Babu y col. 2007b). Solo se han encontrado dos reportes de la producción de lipasa *Yarrowia lipolytica* en este sistema de cultivo (Domínguez y col. 2003a y Babu y col. 2007b).

En el reporte de Domínguez y col. (2003a) se evaluaron diferentes tipos de soportes y la presencia de aceites vegetales como inductores en la producción de lipasa. Con el soporte-sustrato nuez triturada, un desecho, con un contenido de aceite de alrededor del 65-75%, se obtuvo el valor más alto de actividad lipasa de 69 U/g de materia seca (23 kU/L) a los once días de fermentación sin la necesidad de adicionar un inductor.

Babu y col. (2007b) optimizaron las condiciones de producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* en FMS. Empleando la estrategia de optimizar un factor a la vez, la máxima actividad lipasa encontrada fue de 9.3 U/g sustrato seco fermentado. Encontrando como condiciones óptimas el empleo de la mezcla de bagazo de caña con salvado de trigo con un contenido de humedad del 80%, glucosa y urea como fuente de carbono y nitrógeno respectivamente, a los 7 días de fermentación.

En los dos reportes de la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* en FMS no se realizan estudios de la extracción de esta enzima. En el reporte de Domínguez y col. (2003a) obtienen las muestras para medir actividad lipasa mediante la extrusión del contenido de los matraces con una jeringa. En el reporte de Babu y col. (2007b) realizan la extracción de lipasa extracelular añadiendo al sustrato fermentado amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7) y agitando la mezcla en un shaker rotatorio (200 rpm) por 60 minutos a 37 °C.

2.1.3.3 Optimización de la producción de lipasa

El desarrollo inicial de un medio químicamente definido normalmente comienza con la selección más o menos arbitraria de una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas, elementos traza y factores de crecimiento. Aunque este medio podría dar buenos

resultados, después de la formulación inicial del medio es común establecer los nutrientes apropiados y óptimas concentraciones de estos (Ooijkaas y col. 2000).

Usualmente esto es determinado mediante el proceso de optimización que involucra el método de una variable a la vez, OVAT por sus siglas en inglés (one-variable-at-a-time method), variando un factor mientras se mantienen los otros factores a un nivel constante. Es una técnica sencilla aunque se requiere de mucho tiempo y trabajo y además descuida la interacción entre variables y no garantiza alcanzar el punto óptimo (Abdel-Fattah 2002 y Treichel y col. 2010). Este tipo de técnica se ha empleado en la producción de lipasa en FMS con microorganismo tales como *Candida rugosa* (Rao y col. 1993a), *Rhizopus homothallicus* (Rodríguez y col. 2006) y *Yarrowia lipolytica* (Babu y col. 2007b).

El diseño estadístico que involucra la variación simultánea de varios factores es útil en la identificación de los nutrientes importantes y en la interacción entre dos o más nutrientes (Ooijkaas y col. 2000). Este tipo de diseños se emplean en la metodología de superficie de respuesta (MSR). La MSR es la estrategia experimental y de análisis que permite resolver el problema de encontrar las condiciones de operación óptimas de un proceso, es decir, aquellas que dan por resultado “valores óptimos” de una o varias características de calidad del producto. En la MSR se distinguen tres etapas en la búsqueda del punto óptimo, a continuación se describen cada una de las etapas:

1. Cribado. Etapa inicial de la optimización de un proceso en la que se tienen muchos factores que pueden influir en la variable de interés.
2. Búsqueda I o de primer orden. Esta etapa se aplica cuando se tienen pocos factores (menor o igual a 5 factores), y se sabe que éstos influyen en la variable de respuesta. Se utiliza un diseño-modelo de primer orden para caracterizar de manera preliminar la superficie y detectar curvatura. Por lo general se utiliza un diseño factorial completo o fraccionado con repeticiones al centro.
3. Búsqueda II o de segundo orden. En el momento en el que se detecta la presencia de curvatura, se utiliza un diseño-modelo de segundo orden con el que se caracteriza adecuadamente la superficie de respuesta, incluyendo la curvatura (Gutiérrez-Pulido y De la Vara-Salazar 2008).

Se han empleado los diseños estadísticos para determinar las condiciones óptimas de producción de lipasas por diferentes microorganismos tales como: *Candida rugosa* (Rao y col. 1993b) y *Geobacillus thermoleovorans* (Abdel-Fattah 2002).

No se han encontrado reportes de la optimización de la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* en FMS empleando la MSR.

2.1.3.4 Lipasas de *Yarrowia lipolytica*

Se ha reportado que *Yarrowia lipolytica* produce tres lipasas extracelulares, YLLIP2, YLLIP7 y YLLIP8 (Fickers y col. 2005b). Dichas enzimas presentan diferente especificidad por sustratos que van desde esterres de ácidos grasos de cadena corta, mediana y larga. La lipasa YLLIP2 mostró la mejor actividad con metil miristato (C14), indicando la preferencia de la lipasa por cadenas largas. YLLIP7 y YLLIP8 mostraron mayor afinidad por *p*-nitrofenil caproato (C6) y *p*-nitrofenil caprato (C10) respectivamente (Mingrui y col. 2007). A continuación se describen otras características de estas enzimas.

➤ YLLIP2

YLLIP2 es la principal lipasa extracelular secretada por esta levadura (Pignède y col. 2000). YLLIP2 es expresada como una proteína de 301 aminoácidos de 38 kDa. La estructura cristalina de YLLIP2 adopta un plegamiento típico α/β hidrolasa observado para las lipasas de la familia de las lipasas fúngicas. La lamina β central está formada por nueve cadenas β y cinco hélices α que están empacadas a los dos lados de la lamina. La estructura de YLLIP2 es altamente homologa a las estructuras conocidas de las lipasas de la familia fúngica (lipasas de *Thermomyces lanuginosa*, *Rhizopus niveus*, y *Rhizomucor miehei*) (Bordes y col. 2010).

YLLIP2 presenta actividad catalítica óptima a 37°C y pH 7 (Fickers y col. 2005a).

Actualmente dicha enzima está siendo utilizada en varias aplicaciones ambientales y nutraceuticas (por ejemplo, Artechno SA, Gembloux, Bélgica).

Además YLLIP2 ha mostrado ser un catalizador muy eficiente en la resolución de los esterres del 2-bromo-arilacetico, una clase importante de intermediarios en la industria farmacéutica como analgésicos y precursores semisintéticos de la penicilina (Bordes y col. 2010).

Debido a su resistencia al pH ácido y la presencia de detergentes es un buen candidato para su uso en terapias de reemplazo enzimático en el tratamiento de insuficiencia pancreática exocrina (Aloulou y col. 2007b).

➤ **YLLIP7 y YLLIP8**

A pesar de que la mayor parte de la actividad extracelular resulta de YLLIP2, las lipasas YLLIP7 y YLLIP8 son parcialmente secretadas por *Yarrowia lipolytica*.

Tanto YLLIP7 como YLLIP8 están asociadas principalmente a la pared celular. Aunque, podían ser fácilmente liberadas por el lavado de las células con amortiguador de fosfato. Lo cual sugiere que estas enzimas corresponden a la lipasa ligada a la célula descrita previamente por Ota y col. (1982) (Fickers y col. 2005b).

YLLIP7 y YLLIP8 contienen 366 y 371 aminoácidos respectivamente.

2.2 Fermentación en medio sólido

La fermentación en medio sólido (FMS) se define como el cultivo de microorganismos en soportes sólidos húmedos, ya sea en soportes inertes o en sustratos insolubles que además pueden ser utilizados como fuente de carbono y energía (Hölker y col. 2004). La fermentación se lleva a cabo en ausencia o casi ausencia de agua libre; aunque, el sustrato debe poseer suficiente humedad para soportar el crecimiento y metabolismo del microorganismo. Esto se acerca al ambiente natural al cual los microorganismos están adaptados (Pandey 2003).

Entre las aplicaciones de la FMS se encuentra la producción de metabolitos secundarios, aflatoxinas, enzimas, cultivo de hongos, entre otras.

Se pueden distinguir dos tipos de sistemas en FMS dependiendo de la naturaleza de la fase sólida utilizada. El primer sistema y más comúnmente utilizado involucra el cultivo en un material natural; a este sistema se le denomina “cultivo en sustratos naturales”. El segundo sistema, que no es tan frecuentemente utilizado, involucra el cultivo en soportes inertes impregnados con un medio líquido.

Los soportes inertes solo sirven como punto de anclaje para el microorganismo. Algunos ejemplos de este tipo de soporte son: agrolita, espuma de poliuretano, bagazo de caña y vermiculita.

Existen ventajas del uso de soportes inertes impregnados con un medio líquido sobre los soportes-sustratos. La primera sería que al emplear soportes inertes la recuperación del

producto es menos complicada al contener menos impurezas. Al emplear un medio químicamente definido, los efectos de ciertos componentes del medio en la fisiología y cinéticas de crecimiento del microorganismo y en la producción de metabolitos, enzimas y esporas, pueden ser estudiados a detalle. También se puede mejorar la consistencia en los procesos ya que medios químicamente definidos apoyan la reproducibilidad de los procesos. Otra ventaja es en el diseño de medios para la optimización de la producción de metabolitos, enzimas y esporas (Ooijkaas y col. 2000), ya que permite evaluar solo el efecto de los factores de interés sin la intervención de la variabilidad que pudiera existir en caso de emplear un soporte-sustrato.

Una desventaja del uso de soportes inertes frente a los naturales es el costo. Aunque para productos de alto valor agregado como son las enzimas, se pueden emplear soportes inertes ya que el costo de este solo representa una fracción de los costos generales de producción (Ooijkaas y col. 2000).

Uno de los soportes inertes empleados en la FMS es la agrolita. Este tipo de soporte ha sido empleado en la producción de lipasa por cepas de *Rhizopus* sp. (Martínez-Ruiz y col. 2008 y Hernández-Rodríguez y col. 2009). A continuación se mencionan algunas características de este soporte el cual es el empleado en la FMS realizada en este trabajo.

2.2.1 Agrolita

La agrolita es un mineral de aluminio-silicato de origen volcánico obtenido por minería en varios países, incluyendo Estados Unidos y Nueva Zelanda. Después de ser extraído el material se aplasta y se expone a temperaturas de hasta 1,000 °C (1,832 °F) produciendo partículas blancas y ligeras.

Tiene una estructura celular cerrada, por lo cual el agua solo se adhiere a la superficie de las partículas de agrolita (Landis y col. 1990). Tiene una capacidad de retención de agua en la superficie de las partículas igual a tres o cuatro veces su peso (Davidson y col. 1988). La agrolita es rígida y no se comprime fácilmente lo que promueve una buena porosidad. Debido a las altas temperaturas de las cuales procede, la agrolita es completamente estéril. Es esencialmente infértil ya que prácticamente no contiene nutrientes. El pH de la agrolita oscila alrededor de la neutralidad (Landis y col. 1990).

2.3 *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica es una levadura Ascomycota anteriormente conocida como *Candida*, *Endomycopsis* o *Saccharomyces lipolytica*. Esta levadura, la única especie reconocida hasta ahora en el género *Yarrowia* (Aloulou y col. 2007a), forma parte del grupo de levaduras llamado “no-convencionales”, término que originalmente se utilizó para diferenciar este grupo de levaduras de las que frecuentemente se utilizaban y ya habían sido bien estudiadas, las “convencionales”, tal como *Saccharomyces cerevisiae*.

Es una levadura aerobia estricta, ya que no sobrevive bajo condiciones anaeróbicas. No requiere de la limitación de nitrógeno para la inducción de la esporulación a diferencia de *S. cerevisiae* y otras levaduras. La esporulación se da en cepas diploides ya sea en medio líquido o sólido cuando se ha agotado la glucosa (Barth y Gaillardin 1997).

Yarrowia lipolytica ha sido aprobada como GRAS (Generally Recognized As Safe) en varios procesos industriales.

La mayoría de las cepas de esta especie han sido aisladas de alimentos ricos en lípidos tales como el queso o el aceite de oliva, al igual que de aguas residuales, además crece rápidamente en sustratos hidrofóbicos tales como alcanos, ácidos grasos y aceites (Aloulou y col. 2007a). Su preferencia por estos sustratos se ha atribuido a la existencia de una producción y secreción eficiente de enzimas proteolíticas y degradadoras de sustratos hidrofóbicos (Fickers y col. 2005b).

Además, se ha observado que es capaz de secretar grandes cantidades de ácidos orgánicos (citrato e isocitrato) y enzimas tales como proteasas, RNasas, fosfatasas, esterases y lipasas (Barth y Gaillardin 1997).

2.3.1 Dimorfismo

Yarrowia lipolytica presenta dimorfismo. El dimorfismo es la capacidad de los hongos para crecer de dos distintas maneras, como levaduras (células ovaladas individuales) o en forma de micelio, de manera reversible entre estas dos formas (Ruiz-Herrera y Sentandreu 2002; Kawase y col. 2003). La morfología es determinada por las condiciones de crecimiento (aireación, fuentes de nitrógeno y carbono, pH, etc.) y por el historial genético de la cepa (Barth y Gaillardin 1997). Se cree que el dimorfismo de levaduras está relacionado a un mecanismo de defensa de condiciones adversas, tales como temperatura y cambios

nutricionales. En cepas silvestres la habilidad de crecer en forma de hifa puede proveer una ventaja selectiva cuando se está enfrentando a condiciones de estrés.

El dimorfismo se caracteriza generalmente por la presencia de muchas formas morfológicas intermediarias, mostrando una amplia distribución de células de diferentes formas y tamaños. No obstante, bajo ciertas condiciones, una morfología particular puede dominar. Este amplio espectro morfológico afecta en gran medida el desempeño de la fermentación, ya que puede inducir cambios reológicos y consecuentemente alterar la transferencia de masa y calor en el cultivo. Por lo tanto, el entendimiento de la morfología celular se convirtió en una clave importante para el mejoramiento y la optimización de la productividad (Kawasse y col. 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

La mayor parte del mercado industrial de enzimas está ocupado por enzimas hidrolíticas, tales como proteasas, amilasas, amidasas, esterases y lipasas. Las lipasas han emergido en tiempos recientes como enzimas clave en la biotecnología, ya que tienen una gran variedad de aplicaciones industriales (Gupta y col. 2004).

El uso de lipasas en la industria está limitado por su costo que está determinado por los rendimientos de producción, requerimientos de separación y estabilidad enzimática (Domínguez y col. 2003b).

El aumento en la productividad de lipasas durante el proceso de fermentación es de gran importancia ya que menores costos de producción pueden promover su aplicación. La productividad de las lipasas está influenciada por varios factores ambientales tales como temperatura, pH, composición del medio y presencia de inductores, entre otros (Corzo y Revah 1999). Mediante la MSR se puede conocer el efecto de estos factores y sus interacciones con el objetivo de optimizar la producción de lipasa.

Además, mediante la FMS hay una mayor producción de enzimas en comparación con FSm, cuando se compara la misma cepa y el mismo caldo de fermentación (Viniégra-González y col. 2003). La FMS también es un proceso que es menos propenso a problemas de inhibición por sustrato, se producen enzimas con mayor estabilidad a la temperatura y el pH y asimismo el tiempo de fermentación puede ser más corto (Hölker y Lenz 2005).

La producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* en el sistema de FMS ha sido muy poco estudiado. Solo se han encontrado dos reportes que emplean este sistema (Domínguez y col. 2003a y Babu y col. 2007b). Por lo tanto, en este trabajo se pretende mejorar el proceso de producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* en FMS para aumentar la productividad de esta enzima. Esto mediante el diseño de una metodología de extracción de lipasa de la materia fermentada con soluciones de detergentes y la optimización de las condiciones de cultivo mediante la MSR.

4. HIPÓTESIS

Al optimizar el medio de cultivo y las condiciones de operación para la producción de lipasas por *Yarrowia lipolytica* en fermentación en medio sólido se obtendrán niveles de producción superiores a los reportados para esta levadura.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto de las condiciones de cultivo y optimizar el medio de cultivo para la producción de lipasas por *Yarrowia lipolytica* en fermentación en estado sólido.

5.2 Objetivos específicos

- 1) Establecer las condiciones de producción y extracción de lipasas por *Yarrowia lipolytica* en fermentación en estado sólido.
- 2) Determinar el efecto de la temperatura, pH inicial, humedad, tamaño de inóculo y aireación y, sus interacciones sobre la producción de lipasas por *Yarrowia lipolytica*.
- 3) Determinar el efecto de la naturaleza del inductor sobre la producción de lipasas.
- 4) Optimizar la composición del medio de cultivo para la producción de lipasas por *Yarrowia lipolytica* en fermentación en estado sólido.

6. ESTRATEGIA GENERAL

Con la finalidad de llevar a cabo la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* en FMS se planteó una estrategia general la cual se muestra en la Fig. 6.1.

En la primer etapa se realizó un estudio de la curva de crecimiento de *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en medio PDA para poder desarrollar una metodología de producción de inóculo para la FMS. Posteriormente, se llevaron a cabo cinéticas de producción de lipasa en FMS empleando tres cepas de *Yarrowia lipolytica* a 30 y 40 °C. De esta última etapa se seleccionaron dos cepas de *Yarrowia lipolytica* con las cuales se llevaron a cabo estudios de extracción de lipasa de la materia fermentada. Finalmente, a partir de estos estudios se seleccionó la cepa de *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 con la cual se realizaron los estudios de optimización de la producción de lipasa en FMS.

Uno de los objetivos particulares consistió en la evaluación de las condiciones de cultivo sobre la producción de lipasa en FMS.

La aireación no fue evaluada debido a que el sistema de cultivo utilizado (matraces Erlenmeyer de 125 mL) no era adecuado para dicho propósito.

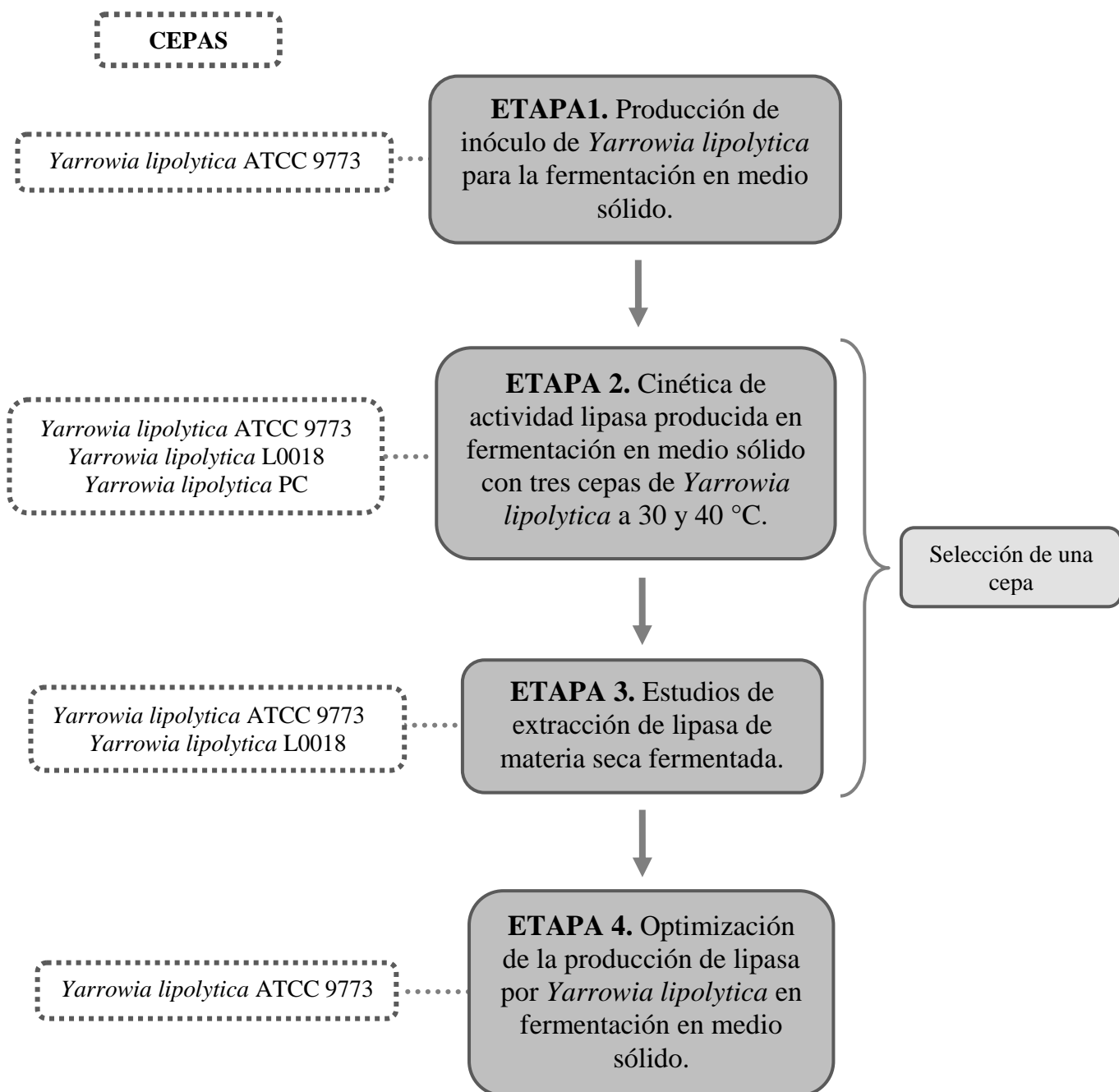


Figura 6.1 Estrategia general.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Se describe a continuación las metodologías y los materiales empleados.

7.1 Materiales y reactivos

A continuación se mencionan los materiales y reactivos empleados.

➤ **Microorganismos**

Se utilizaron tres cepas de *Yarrowia lipolytica*: *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773, *Yarrowia lipolytica* L0018 y *Yarrowia lipolytica* PC. Las primeras dos fueron proporcionadas por la Dra. Georgina C. Sandoval Fabián de la Unidad de Biotecnología Industrial del CIATEJ, Guadalajara, Jalisco, México. La cepa *Yarrowia lipolytica* PC pertenece a la colección de cepas microbianas del Dr. Jesús Córdova López del Laboratorio de Bioprocesos de la UdeG Guadalajara, Jalisco, México. Con fines de identificación para este trabajo al nombre de la tercera cepa se le agregaron las letras PC al final debido a que fue aislada de la pasta de copra. *Yarrowia lipolytica* PC fue previamente empleada en un estudio de Hernández-Martínez y col. 2011 en la producción de una proteasa alcalina termoestable.

➤ **Conservación de los microorganismos**

- **PDA (agar-papa-dextrosa)** es de la marca BD Bioxon®.

Tiene la siguiente fórmula aproximada para 1000 mL de agua purificada:

Infusión de papa (sólidos)	4.0 g
Dextrosa	20.0 g
Agar	15.0 g
pH final	5.6±0.2

➤ **Agua**

El agua empleada en el medio de cultivo para la fermentación en medio sólido y en la elaboración de los amortiguadores para los estudios de extracción de lipasas es de la marca Bonafont®.

➤ **Fermentación en medio sólido**

Se desglosan los reactivos empleados en el medio de cultivo para la producción de lipasas en la fermentación en medio sólido:

- La glucosa, urea, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , NaCl , H_3BO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, KI , $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ son de la marca JT-Baker®.

- El aceite de girasol es de la marca Técnico Distribuidor INFAC S.A. de C.V.
- El alcohol polivinílico es de la marca Sigma-Aldrich®.
- El extracto de levadura es de la marca BD Bioxon®.

➤ **Actividad lipasa**

Para medir actividad lipasa se emplearon los siguientes reactivos:

- El *p*-nitrofenol y el *p*-nitrofenil octanoato son de la marca Sigma-Aldrich®
- El 2-propanol, NaH₂PO₄, NaCl y NaOH son de la marca JT-Baker®.

Efecto de detergentes en la extracción de lipasa

En los estudios de extracción de lipasa se empleó el *N*-lauril sarcosina (NLS) y el Tritón X-100 que son de la marca Sigma-Aldrich®.

7.2 Equipos

Se menciona la marca y el modelo de algunos de los equipos más importantes empleados en la elaboración de este trabajo:

- **Espectrofotómetro** marca Shimadzu®, modelo UV-1800.
- **Lector de absorbancia de microplacas** marca Biotek™, modelo ELx808.
- **Centrífuga** marca Eppendorf, modelo 5418.
- **Centrífuga** marca Beckman Coulter™ modelo Allegra™ 25R.
- **Potenciómetro** marca Conductronic, modelo pH 120.
- **Microscopio de contraste de fase** marca Olympus, modelo BX-40.
- **Batidora** marca Oster®, modelo 2523-13, 440-20, fuente de sodas de 2 velocidades.

7.3 Metodología

7.3.1 Conservación de los microorganismos

La conservación de las cepas a corto plazo se realizó sembrando por estría tubos inclinados con 10 mL de medio PDA en agua destilada. Los tubos se incubaron durante 5 días a 30°C, una vez transcurrido este tiempo se almacenaron a 4°C.

7.3.2 Curva de crecimiento de *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en medio PDA

Para conocer la curva de crecimiento de *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en medio PDA se siguió el siguiente procedimiento:

- 1) Se añadieron 10 mL de NaCl 0.9% estéril a un tubo de conservación (sección 7.3.1) y se agitó durante 20 segundos. La suspensión de células obtenida se pasó a un frasco estéril.

- 2) Cada matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio PDA estéril con tapones de gasa y algodón se inoculó con 0.5 mL de la suspensión de células. Se esparció la suspensión por toda la superficie del medio.
- 3) Se inocularon 14 matraces para tomar dos matraces para analizarlos los días 1,2,3,4,5,7 y 9. La incubación se realizó a 30 °C. En la Fig. 7.1 se muestran los matraces en incubación.
- 4) Una vez transcurrido el tiempo de incubación se extrajeron las células del agar añadiendo a cada matraz 10 mL de NaCl 0.9%. Se agitó durante un minuto con un agitador magnético en una parrilla hasta remover toda la biomasa de la superficie del agar.
- 5) De la suspensión de células obtenida se realizaron diluciones 1:10 y 1:100 para hacer el conteo de células en la cámara de Neubauer (sección 7.3.2.1) y medir la densidad óptica (D.O.) a 420nm. La razón por la cual se midió la densidad óptica a 420 nm es porque al realizar el espectro de absorción de la suspensión de células, se observó una meseta alrededor de la longitud de onda de 420 nm.
- 6) Se tomaron 2 mL de extracto para tomar microfotografías en un microscopio de contraste de fase con el objetivo 40X/0.65. Se realizaron diluciones 1:10 y 1:100 para tomar las microfotografías. Se procesaron las microfotografías con un analizador de imágenes (Image-Pro[®] Plus versión 5.0 para Windows[™])



Figura 7.1 Matraces Erlenmeyer de 250 mL con medio PDA inoculados con *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en incubación a 30°C.

7.3.2.1 Conteo de células en la cámara de Neubauer

Para realizar el conteo de células en el microscopio se empleó la cámara de Neubauer (Fig. 7.2). A continuación se describe la metodología para realizar el conteo:

- 1) Con una pipeta Pasteur se agregó una pequeña cantidad de la suspensión de levaduras diluida en la parte media de la cámara de Neubauer (Fig. 7.2). Posteriormente, se colocó el portaobjetos encima y se llenaron los canales de la cámara con la suspensión de levaduras. Generalmente se emplearon diluciones 1:10 y 1:100).

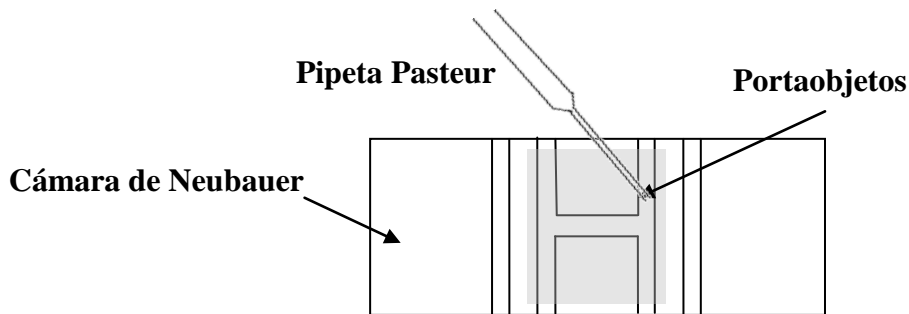


Figura 7.2 Llenado de la cámara de Neubauer.

- 2) Se colocó la cámara de Neubauer en la platina del microscopio.
- 3) Utilizando el objetivo 10X se enfocó una de las cuadrículas con 25 cuadros, hay una en la parte inferior y otra en la parte superior de la parte media de la cámara de Neubauer y tiene la apariencia como se muestra en la Fig. 7.3a.

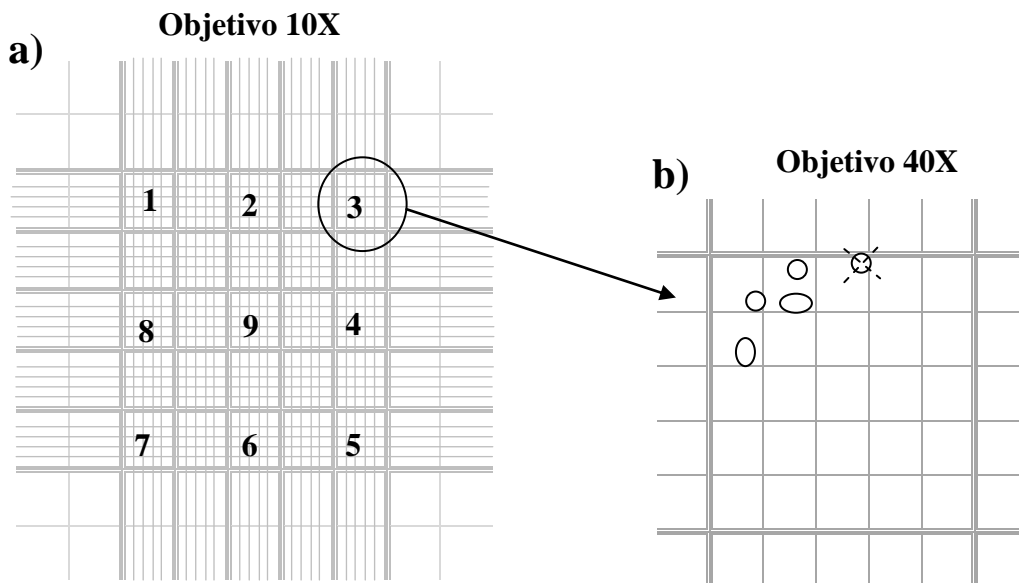


Figura 7.3 Cámara de Neubauer.

- 4) Posteriormente, se pasa al objetivo 40X y se enfoca el primer cuadrante (Fig. 7.3a). Al enfocarlo se verá como en la Fig. 7.3b.
- 5) Se realizó el conteo en el orden y solo los nueve cuadrantes que se enumeran en la Fig. 7.3a.
- 6) Se puede observar que cada cuadro está delimitado por 3 líneas (Fig. 7.3b). Solo se consideraron dentro del conteo las células que solo tocaban la línea interna y no se tomaron en cuenta las células que tocaban la línea media. Se muestra un ejemplo en la Fig. 7.3b, la célula que tiene una X es la que no se hubiera considerado dentro del conteo.
- 7) Finalmente, se realizaron los siguientes cálculos para poder determinar el número de células que había por mL de suspensión:

$$\frac{\text{No. de células}}{\text{mL de suspensión}} = \frac{\text{No. de células contadas}}{9} * 25 * \text{FD} * \frac{10,000}{\text{mL de suspensión}}$$

Donde:

25: número de cuadrantes

FD: factor de dilución = $\frac{\text{vol. de muestra}}{\text{vol. de dilución}}$

$$10,000 \text{ mL}^{-1} = \frac{1}{\text{superficie contada}} \cdot \frac{1}{\text{profundidad de cámara}} = \frac{1}{1 \text{ mm}^2} \cdot \frac{1}{0.1 \text{ mm}} = \frac{1}{0.1 \text{ mm}^3} = \frac{1}{0.0001 \text{ mL}}$$

7.3.3 Fermentación en medio sólido para la producción de lipasa

Se describen a continuación las diferentes etapas de preparación de la FMS.

7.3.3.1. Preparación del soporte

Se utilizó agrolita como soporte inerte para la FMS. La preparación de la agrolita constó de lo siguiente.

1) Tamizado

Se tamizó la agrolita durante diez minutos utilizando los tamices del número 6, 12, 16 y 20. Se colectó la agrolita retenida en los tamices del número 16 y 20 y se desechó la retenida en la base y en los tamices del número 6 y 12 (Fig. 7.4).

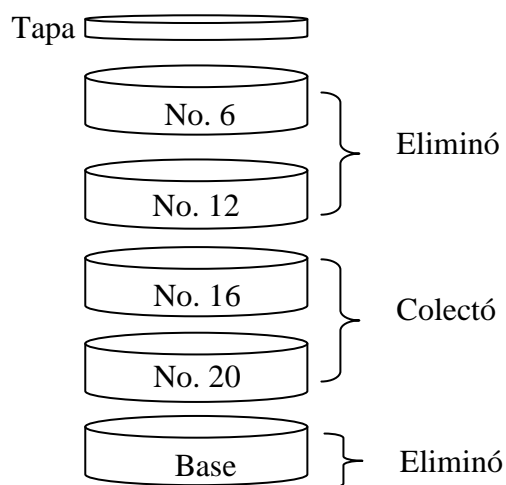


Figura 7.4. Tamices empleados en el tamizado de la agrolita.

La agrolita retenida en los tamices 16 y 20 tiene un tamaño menor a 1.70 mm y mayor a 0.85 mm.

2) Lavado

La agrolita tamizada se lavó dos veces con agua destilada a temperatura ambiente y una vez con agua caliente.

3) Secado

Una vez lavada la agrolita se escurrió y se puso en charolas de aluminio formando una capa delgada para secarla en una estufa a 60°C durante 48 horas o hasta tener un contenido de humedad menor al 1%.

4) Almacenamiento

Se almacenó la agrolita en bolsas de plástico cerradas.

7.3.3.2 Producción del inóculo

Se describe a continuación la metodología para obtener el inóculo de *Yarrowia lipolytica* para realizar la FMS.

- 1) Se añadieron 10 mL de NaCl 0.9% estéril a un tubo de conservación (sección 7.3.1) y se agitó durante 20 segundos.
- 2) Se inocularon, con 0.5 mL de la suspensión de células, dos matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio PDA estéril con tapones de gasa y algodón. Se esparció la suspensión por toda la superficie del medio.

- 3) Se incubaron los matraces durante 5 días a 30°C.
- 4) Una vez transcurrido el tiempo de incubación se extrajeron las células añadiendo a cada matraz 10 mL de NaCl 0.9% y agitando durante un minuto con un agitador magnético en una parrilla hasta remover toda la biomasa de la superficie del agar.
- 5) De la suspensión de células obtenida se realizaron diluciones 1:10 y 1:100 para hacer conteo de células en la cámara de Neubauer y medir la densidad óptica (D.O.) a 420 nm.

7.3.3.3 Medio basal

Se utilizó el medio reportado por Corzo y Revah (1999) con modificaciones. Los macronutrientes y oligoelementos que lo conforman se presentan en la Tabla 7.1 y 7.2. Las modificaciones fueron: a) se concentró dos veces el medio, b) se cambió el aceite de oliva por aceite de girasol, c) se adicionó alcohol polivinílico (PVA) y d) se sustituyeron las vitaminas por extracto de levadura.

Para la preparación del medio basal se siguió el siguiente procedimiento:

- 1) Se disolvieron los componentes conforme a la lista excepto el aceite de girasol.
- 2) Se ajustó el pH del medio a 6.2 (6.8 es el pH requerido, pero al añadir la agrolita y el aceite de girasol aumenta el pH 0.5 unidades).
- 3) Se vertió el medio en un matraz aforado, se añadió el aceite de girasol y se aforó el medio.
- 4) Finalmente, el medio se emulsificó a velocidad 2 durante 5 minutos en una batidora.

Tabla 7.1 Macronutrientes del medio de cultivo basal para la fermentación en medio sólido para la producción de lipasa.

Componentes	g/L
Glucosa	40
Aceite de girasol	20
Urea	4
KH ₂ PO ₄	2
Alcohol polivinílico	1.6
Extracto de levadura	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1
CaCl ₂	0.2
NaCl	0.2

Tabla 7.2 Oligoelementos del medio de cultivo basal para la fermentación en medio sólido para la producción de lipasa.

Componentes	mg/L
H ₃ BO ₃	1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.08
KI	0.2
FeCl ₃ ·4H ₂ O	0.4
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.8
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.8

7.3.3.4 Fermentación en medio sólido

La FMS se llevó a cabo de la siguiente manera:

- 1) Se pesaron 3 g de agrolita en un matraz Erlenmeyer de 125 mL.
- 2) Se adicionó el inóculo al medio basal emulsificado mientras éste se mantuvo en agitación.
Consideración: cada gramo de soporte inerte se inoculó con 2×10^7 células y se utilizaron 5 mL de medio por cada 3 g de agrolita. El volumen del inóculo en las fermentaciones representaba alrededor del 3% con respecto al volumen del medio basal emulsificado. De esta manera la concentración de los componentes del medio basal emulsificado solo fue disminuida en menos de un 3% con respecto al medio basal sin la adición del inóculo.
- 3) Se adicionaron 5 mL de medio basal inoculado a los 3 g de soporte inerte. El contenido del matraz se homogeneizó dándole tres golpes por cada cuarto de vuelta, durante dos vueltas. Se taparon los matraces con un pedazo de cubrebocas el cual se ajustó con una liga (Fig. 7.5).
- 4) Los matraces Erlenmeyer se incubaron a 30°C en un cuarto de temperatura controlada, poniendo agua debajo de los matraces para asegurar tener humedad en el ambiente.
- 5) Cada 24 horas se tomaron dos matraces Erlenmeyer y se realizaron los siguientes análisis al extracto:
 - a. Medición de actividad lipasa mediante un método espectrofotométrico.
 - b. Medición de pH.
 - c. Microfotografías.



Figura 7.5 Sistema para la FMS para la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica*.

7.3.3.5 Extracción de actividad lipasa de la materia fermentada

La extracción de actividad lipasa de la materia fermentada se realizó de la siguiente manera:

- 1) A un matraz Erlenmeyer de 125 mL con la materia fermentada (con 3 g de soporte inerte) se le adicionaron 30 mL de agua Bonafont® y se agitó en una parrilla durante 1 minuto con un agitador magnético.
- 2) Se tomaron 2 mL del extracto y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 2 minutos. Se tomaron 1.5 mL del sobrenadante y se almacenaron a -20°C hasta utilizarse para medir actividad lipasa.
- 3) Se midió el pH del extracto.
- 4) Se tomaron 2 mL de extracto para tomar microfotografías en un microscopio de contraste de fase con el objetivo 40X/0.65. Se realizaron diluciones 1:10 y 1:100 para tomar las microfotografías. Se tomaron microfotografías utilizando un analizador de imágenes (Image-Pro® Plus versión 5.0 para Windows™).

7.3.4 Determinación de actividad lipasa

Se utilizó un método colorimétrico, en el cual se mide el incremento en la absorbancia a 405 nm producido por la hidrólisis del *p*-nitrofenil octanoato (*p*-NPO) y la liberación del anión *p*-nitrofenolato. La metodología empleada fue proporcionada por Sandoval-Fabián (2010) y Velasco-Lozano (2010) con modificaciones. El procedimiento se describe a continuación.

Soluciones

- 1) Solución stock de *p*-NPO 10mM en 2-propanol.
- 2) Amortiguador pH 7.0 con NaH₂PO₄ 100mM y NaCl 100 mM. Ajustar pH con hojuelas NaOH.
- 3) Sustrato de *p*-NPO 1mM. Dilución 1:10 de la solución stock de *p*-NPO 10 mM en el amortiguador.

Procedimiento

- 1) Para formar la mezcla de reacción se agregaron 100 μL de sustrato y 50 μL de extracto enzimático en cada pozo de la microplaca.
- 2) Se midió posteriormente la absorbancia (405 nm) en el lector de absorbancia de microplacas cada 20 segundos durante diez minutos a una temperatura de 30 °C. Se agitó 5 segundos antes de cada lectura.
- 3) Los cálculos para la obtención de la actividad son:

$$\frac{m_1 - m_2}{\epsilon} \left| \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \right| \left| \frac{1000 \text{ mmol}}{1 \text{ mol}} \right| \left| \frac{1000 \text{ } \mu\text{mol}}{1 \text{ mmol}} \right| \left| \frac{0.150 \text{ mL}_{\text{mat e f i z a m e n t a d a}}}{0.05 \text{ mL}_{\text{extracto}}} \right| \left| \frac{30 \text{ mL}_{\text{extract}}}{3 \text{ g}_{\text{soporiert}}} \right|$$

Donde:

ϵ = coeficiente de extinción molar (Absorbancia L mol⁻¹ cm⁻¹)

m_1 = pendiente de la muestra (Absorbancia cm⁻¹ min⁻¹)

m_2 = pendiente del blanco (solución amortiguadora pH 7.0 con NaH₂PO₄ 100mM, NaCl 100 mM y alcohol polivinílico (PVA) 0.25% (p/v)) (Absorbancia cm⁻¹ min⁻¹)

El análisis dimensional es el siguiente:

$$\frac{\text{U}}{\text{g}} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \cdot \frac{\text{L}}{\text{cm}} \cdot \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot \frac{\text{L}}{\text{mL}} \cdot \frac{\text{mL}}{\text{g}}$$

Unidad de actividad lipasa

Se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de ácido octanoico por minuto bajo las condiciones de ensayo.

El coeficiente de extinción molar que se utilizó fue de 4024 absorbancia mol L⁻¹cm⁻¹. El cual se obtuvo de una curva estándar de *p*-nitrofenol (Anexo 12.1).

7.3.5 Efecto de detergentes en la extracción de lipasa

Las metodologías empleadas para determinar el efecto de detergentes en la extracción de lipasa son las siguientes:

7.3.5.1 Secado de materia húmeda fermentada

La materia fermentada, obtenida de la fermentación en matraces Erlenmeyer de 125 mL, se juntó y se mezcló. Posteriormente, se pasó a columnas de vidrio y se le hizo pasar una corriente de aire con un flujo de aproximadamente $0.5 \text{ L/min} \cdot \text{g}_{\text{materia fermentada}}$ hasta que la humedad fuera cercana al 1%.

7.3.5.2 Efecto de detergentes en la extracción de lipasa de materia seca fermentada

Se realizó la extracción de la actividad lipasa de la materia seca fermentada utilizando diferentes concentraciones de los detergentes NLS y Tritón X-100. Se emplearon dos metodologías para la extracción, en la primera se hizo la extracción con los diferentes detergentes utilizando la materia seca y en la segunda se le hicieron lavados a la materia seca con amortiguador para posteriormente extraer la lipasa de la materia seca lavada empleando los detergentes. A continuación se describe el procedimiento seguido en las dos metodologías.

Metodología 1

1. Se pesaron 0.5 g de materia seca fermentada por duplicado para cada tratamiento.
2. Se le agregaron 10 mL de soluciones de los detergentes NLS y Tritón X-100 en amortiguador de NaH_2PO_4 100 mM, NaCl 100 mM pH 7 (4 °C) y se agitaron en vórtex durante 1 minuto.
3. Se tomaron 2 mL del extracto y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 2 minutos. Se tomaron 1.5 mL del sobrenadante y se almacenó a -20°C hasta utilizarse para medir actividad lipasa.
4. Al medir actividad lipasa el medio de reacción tenía la misma concentración de detergente que la que se utilizó para extraer la lipasa.

Metodología 2

1. Se pesaron 0.5 g de materia seca fermentada en un tubo por duplicado para cada tratamiento.
2. Se agregaron 10 mL de amortiguador de NaH_2PO_4 100 mM, NaCl 100 mM pH 7 (4 °C) y se agitó en vórtex durante 1 minuto.

3. Se tomaron 2 mL del extracto y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 2 minutos. Se tomaron 1.5 mL del sobrenadante y se almacenó a -20°C hasta utilizarse para medir actividad lipasa.
4. El extracto restante se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C . Se eliminó el sobrenadante.
5. Al precipitado se le agregaron 10 mL de NaH_2PO_4 100 mM, NaCl 100 mM pH 7 (4°C) y se agitó en vórtex durante 1 minuto.
6. Se tomaron 2 mL del extracto y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 2 minutos. Se tomaron 1.5 mL del sobrenadante y se almacenó a -20°C hasta utilizarse para medir actividad lipasa.
7. El extracto restante se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C . Se eliminó el sobrenadante.
8. Al precipitado se le agregaron 10 mL de soluciones de los detergentes NLS o Tritón X-100 en amortiguador de NaH_2PO_4 100 mM, NaCl 100 mM pH 7 (4°C) y se agitaron en vórtex durante 1 minuto.
9. Se tomaron 2 mL del extracto y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 2 minutos. Se tomó 1.5 mL del sobrenadante y se almacenó a -20°C hasta utilizarse para medir actividad lipasa.
10. Al medir actividad lipasa el medio de reacción tenía la misma concentración de detergente que la que se utilizó para extraer la lipasa.

7.3.5.3 Efecto de detergentes en la actividad lipasa extracelular

Para evaluar el efecto de los detergentes en la actividad lipasa extracelular se utilizó un extracto obtenido mediante la extracción con el amortiguador de NaH_2PO_4 100 mM, NaCl 100 mM pH 7 (4°C). Al extracto se le midió actividad lipasa asegurando que el medio de reacción tuviera la concentración deseada de detergente.

7.3.6 Optimización de la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en fermentación en medio sólido

Para realizar los estudios de optimización de la producción de lipasa se realizaron diseños estadísticos. En cada diseño se evaluaron diversos tratamientos con diferente composición del medio de cultivo y condiciones de fermentación.

Para la preparación de los medios de cultivos, adición de agua (para ajustar la humedad) e inóculo se tenía como base de cálculo un gramo de soporte inerte. La cantidad adicionada de cada uno de los componentes del medio de cultivo, agua, inóculo y el pH inicial ajustado para cada tratamiento se describe en los resultados al presentar cada diseño empleado.

Para adicionar la cantidad necesaria de cada uno de los componentes del medio de cultivo (excepto el aceite de girasol) se prepararon soluciones concentradas de cada uno de los componentes (Tabla 7.3). Los oligoelementos se juntaron en una sola solución. Las soluciones se prepararon en base peso/peso (% p/p). De esta manera se conoce con precisión la cantidad adicionada de cada uno de los componentes y de agua. Conociendo la cantidad de agua adicionada se hizo la suma del aporte de esta por las soluciones y por el inóculo para conocer la cantidad de agua que se tenía que agregar para ajustar la humedad deseada. Se determinó la densidad de cada una de las soluciones (Tabla 7.3) para poder adicionar estas con micropipeta.

En el Anexo 12.2 se muestran las tablas empleadas en la elaboración de los diseños experimentales. Se muestra la cantidad adicionada de cada una de las soluciones concentradas, de inóculo, las aportaciones de agua por las soluciones, y todo lo necesario para tener las condiciones requeridas en cada uno de los tratamientos. La base de cálculo en estas tablas es un gramo de soporte inerte.

Tabla 7.3 Soluciones concentradas de cada uno de los componentes del medio de cultivo con su correspondiente densidad.

Componente	% p/p	Densidad
Glucosa	30	1.12
Aceite de girasol	-	0.92
Urea	10	1.02
Extracto de levadura	10	1.02
KH ₂ PO ₄	10	1.04
MgSO ₄ ·7H ₂ O	10	1.03
CaCl ₂	10	1.03
NaCl	10	1.05
Alcohol polivinílico	5	1
Oligoelementos		1
H ₃ BO ₃	0.025	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.002	
KI	0.005	
FeCl ₃ ·4H ₂ O	0.01	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.02	
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.02	

La metodología empleada al realizar cada uno de los diseños fue la siguiente:

- 1) En un tubo se agregó el volumen necesario de la solución de cada uno de los componentes del medio de cultivo, excepto el aceite de girasol.
- 2) Posteriormente, se adicionó la cantidad de agua necesaria para ajustar la humedad.
- 3) Se ajustó el pH inicial del medio de cultivo empleando una solución concentrada de NaOH 1M o HCl 10% según fuera el caso.
- 4) Se agregó el aceite de girasol.
- 5) Se adicionó el inóculo, tomando el tiempo al cual se hizo esto. La obtención del inóculo fue como se describe en la sección 7.3.3.2. Cada gramo de soporte inerte se inoculó con 1×10^8 células. Se realizó la consideración de la densidad de la suspensión de células como 1 g/mL para adicionar esta al medio de cultivo.
- 6) Se midió el volumen del medio de cultivo. Conociendo el volumen se calculó la densidad del medio de cultivo considerando que previamente se conoce el peso del medio. A partir de esto se determinó el volumen del medio requerido para adicionar a cada matraz.
- 7) Se homogeneizó el medio agitando 30 segundos con un vortex.
- 8) A un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 3 g de agrolita se le adicionó la cantidad de medio que se había calculado previamente.
- 9) El contenido del matraz se homogeneizó dándole tres golpes por cada cuarto de vuelta, durante dos vueltas. Se taparon los matraces con un pedazo de cubrebocas el cual se ajustó con una liga (Fig. 7.5).
- 10) Los matraces Erlenmeyer se incubaron a 30°C durante 24 horas en un cuarto de temperatura controlada, poniendo agua debajo de los matraces para asegurar tener humedad en el ambiente.
- 11) Se consideró el tiempo inicial de la fermentación como el tiempo medio entre la adición de inóculo a cada uno de los medios y la hora de inicio de incubación de los matraces a 30°C en el cuarto de temperatura controlada.
- 12) A las 24 horas de incubación se realizó la extracción de lipasa de la materia fermentada, lo cual se realizó de la siguiente manera:
 - ✓ A cada matraz Erlenmeyer de 125 mL con la materia fermentada se le agregaron 60 mL de NLS 3 mM en NaH_2PO_4 100 mM, NaCl 100 mM pH 7 (4 °C).

- ✓ Se agitó en la parrilla durante 1 minuto con un agitador magnético.
- ✓ Se tomaron 2 mL del extracto y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 2 minutos. Se tomaron 1.5 mL del sobrenadante y se almacenaron a -20°C hasta utilizarse para medir actividad lipasa.

13) Se midió la actividad lipasa (sección 7.3.4). Fue necesario realizar diluciones del extracto.

7.3.6.1 Análisis estadístico

Se empleó el programa STATGRAPHICS® Plus (versión 4.0, 1999) para elaborar los diseños y realizar su análisis.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la primera parte se presentan los resultados obtenidos para establecer la edad del inóculo, posteriormente se presentan los resultados de los estudios para la obtención de los extractos enzimáticos y finalmente se presentan los resultados de los diseños experimentales para optimizar la producción de lipasa.

8.1 Producción de inóculo de *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en medio PDA

Para establecer las condiciones de producción del inóculo para los estudios en FMS se obtuvo la curva de crecimiento de *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en medio PDA. Para ello, se inocularon matraces Erlenmeyer con PDA y se determinó la concentración celular y la turbidez de la suspensión a diferentes tiempos de incubación. El crecimiento se midió mediante dos métodos: 1) cuenta de células totales, una medida directa del crecimiento y 2) turbidez, una medida indirecta del crecimiento (Madigan y col. 2004). Mediante la curva de crecimiento se seleccionó la edad del inóculo para los estudios de FMS. Los resultados obtenidos se presentan en la Fig. 8.1. En ambas lecturas (densidad óptica (D.O.) y concentración celular) se observan dos fases de crecimiento rápido (de 0 a 2 d y de 4 a 7 d). A los 9 días de incubación se obtiene una concentración celular de 6×10^8 células por mL equivalente a una D.O. cercana a 45.

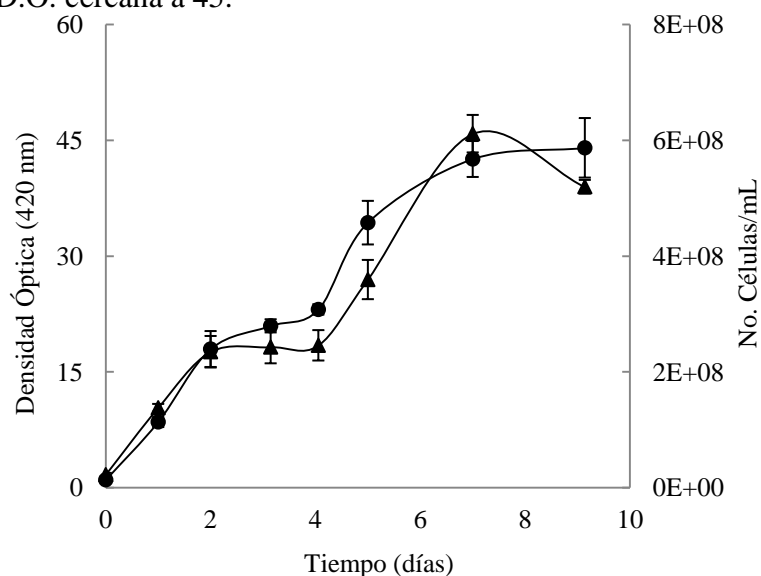


Figura 8.1 Curva de crecimiento de *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en PDA [No. células/mL (▲), densidad óptica (●)].

En la Fig. 8.1 se observa que las dos curvas de crecimiento de *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en PDA medidas por dos métodos diferentes, cuenta de célula totales y turbidez, tienen un comportamiento muy similar. En cada una de las dos etapas hay una fase de crecimiento lineal y una estacionaria. No se alcanza a observar de manera clara una fase de muerte en el tiempo que se analizó el cultivo. Este tipo de comportamiento es característico de un cultivo sincrónico en el cual, las células geman al mismo tiempo, generando una gemación regular rítmica. Esto se presenta tanto en cultivo en lote como en continuo cuando un cultivo es cultivado a partir de una sola célula. Además, se puede conseguir sometiendo al cultivo a choques térmicos, limitación de nutrientes, filtración en membrana entre otros métodos (Kocková-Kratochvílová 1990). En las microfotografías (Fig. 8.2) se puede corroborar el comportamiento de cultivo sincrónico. En el día uno no hay células gemando solo células individuales de gran tamaño. En los otros días se observan las células gemando solo que con diferente intensidad pero con un comportamiento similar en la mayoría de las células del mismo cultivo.

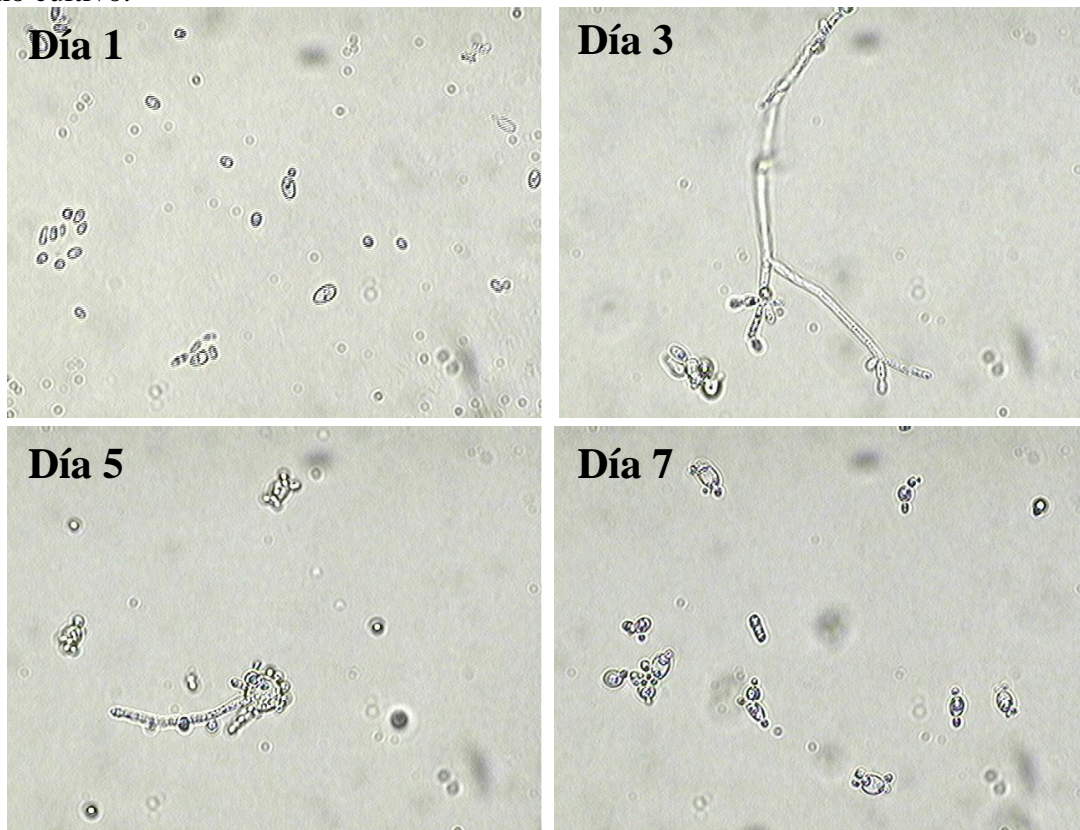


Figura 8.2 Microfotografías (objetivo 40 X) a una dilución 1:100 a diferentes días de incubación en medio PDA utilizando *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773.

Cottrell y col. (1975) estudiaron el contenido total de ADN y citocromos *aa₃*, *b* y *c* durante el ciclo celular utilizando un cultivo sincrónico de *Saccharomyces cerevisiae*. El comportamiento de la curva del contenido total de ADN es similar a la curva de crecimiento de *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en medio PDA.

Por el contrario, en un cultivo asincrónico no todas las células geman simultáneamente ni con la misma intensidad, es una mezcla de células de diferentes edades, donde los ciclos individuales de las células se traslapan. Este tipo de cultivo tiene una curva de crecimiento con las siguientes etapas: fase estacionaria inicial (fase latente o fase lag), fase de rápido crecimiento, fase estacionaria y fase de muerte (fase de crecimiento negativo) (Kocková-Kratochvílová 1990).

En la Tabla 8.1 se presenta la concentración celular por cm² de *Yarrowia lipolytica*, de otras levaduras de distintos géneros (Gognies y Belarbi 2010) y la concentración de esporas por cm² de algunos hongos filamentosos (Ramírez-Coronel 2010) en medio sólido. Al comparar la concentración celular de *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 y de otras levaduras de diferentes géneros en medio PDA y YPD a los cinco y tres días de incubación respectivamente, se observa que la concentración celular de *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 es mayor que el de las otras levaduras aunque tienen mayor tiempo de incubación. La concentración de *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en el quinto día de incubación es muy similar a la de las esporas de los hongos filamentosos de varios géneros en el mismo medio.

Tabla 8.1 Concentración celular de levaduras y esporas de hongos filamentosos en medio sólido.

Cepa	Medio	Esporas o células/cm ²	Referencia
<i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 9773	PDA	1.21x10 ⁸	Este trabajo
<i>Rhizopus</i> sp.	PDA	1.24 x10 ⁸	Ramírez-Coronel 2010
<i>Penicillium</i> sp.	PDA	9.20x10 ⁷	Ramírez-Coronel 2010
<i>Trichoderma harzianum</i>	PDA	2.01 x10 ⁸	Ramírez-Coronel 2010
<i>Candida pelliculosa</i>	YPD	2.5X10 ⁵	Gognies y Belarbi 2010
<i>Saccharomyces bayanus</i>	YPD	8.1X10 ⁵	Gognies y Belarbi 2010
<i>Pichia fermentans</i>	YPD	1.9X10 ⁶	Gognies y Belarbi 2010
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i>	YPD	1.0X10 ⁶	Gognies y Belarbi 2010
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Σ1278b	YPD	4.0X10 ⁵	Gognies y Belarbi 2010
<i>Pichia membranifaciens</i>	YPD	1.8X10 ⁶	Gognies y Belarbi 2010

Para seleccionar la edad del inóculo para los estudios de FMS se consideró que la curva de crecimiento (Fig. 8.1) tiene dos etapas de crecimiento lineales. La primera se presenta al primer día de incubación y la segunda en el quinto día de incubación. Se seleccionó la edad de inóculo de 5 días para los estudios de FMS, ya que además de estar en la fase lineal de crecimiento tiene una mayor concentración celular que en el primer día de incubación.

Como se mencionó previamente, la curva de cuenta de células totales y la de turbidez, tienen un comportamiento muy similar. Por lo cual, se obtuvo una curva de calibración (Fig. 8.3). Esta curva nos va a permitir a partir de la medición de turbidez de la suspensión de células predecir el No. de células/mL, con un error menor al 10%, ya que el coeficiente de regresión de la recta ajustada es de 0.9423. Una ventaja de esta curva es que no depende de la edad del inóculo.

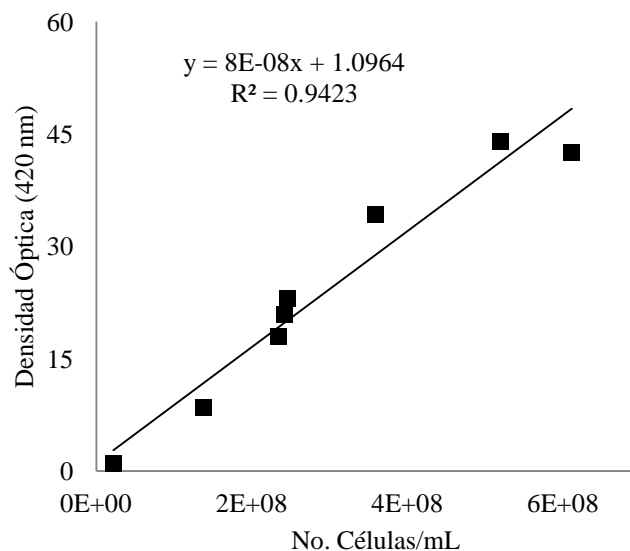


Figura 8.3 Relación lineal entre concentración celular (No. de células/mL) y densidad óptica (420 nm).

8.1.1 Conclusiones parciales

1. El crecimiento de *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en medio PDA tiene un comportamiento de cultivo sincrónico.
2. Se seleccionó el inóculo de cinco días de incubación en medio PDA para utilizarlo en la fermentación en medio sólido.

Una vez seleccionada la edad del inóculo se prosiguió a evaluar la producción de lipasa por tres cepas de *Yarrowia lipolytica* en FMS.

8.2 Producción de lipasa por tres cepas de *Yarrowia lipolytica* en fermentación en medio sólido

Se evaluó la producción de lipasa en FMS por tres cepas de *Yarrowia lipolytica*: *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773, *Yarrowia lipolytica* L0018 y *Yarrowia lipolytica* PC. Se empleó agrolita como soporte inerte impregnado con el medio reportado por Corzo y Revah (1999) con modificaciones. Este estudio se realizó para diseñar la metodología de obtención de extracto enzimático y poder seleccionar una cepa para hacer estudios posteriores de optimización de la producción de lipasa por FMS. Las cinéticas se realizaron a dos temperaturas, 30 y 40 °C. Además de evaluar la actividad lipasa, se evaluó el pH y la morfología de las levaduras. Se incluyó un control negativo en la fermentación, el cual tuvo la misma preparación y condiciones de fermentación que las otras muestras solo que en ausencia de inóculo. El control negativo se incluyó para asegurarnos que la producción de lipasa es por las cepas utilizadas y no por alguna contaminación microbiana.

A 30°C solo crecieron las cepas ATCC 9773 y L0018. En la Fig. 8.4 se presentan las cinéticas de producción de lipasa por estas dos cepas. Se observa que la cepa ATCC 9773 presenta la producción máxima de lipasa (2.26 U/g_{si}) a las 24 horas de fermentación y la cepa L0018 obtuvo un valor máximo (1.0 U/g_{si}) a las 48 horas de fermentación. Los valores de actividad lipasa del control negativo siempre fueron inferiores a las 0.1 U/g_{si}, asegurándonos de esta manera que no hay producción de lipasa por alguna contaminación.

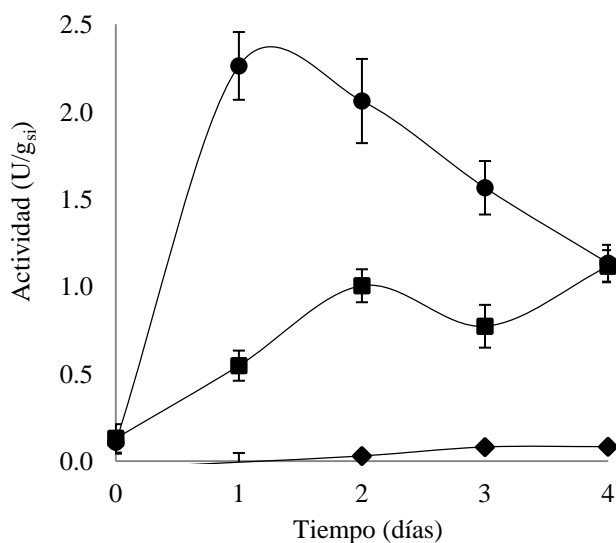


Figura 8.4 Cinéticas de producción de lipasa en fermentación en medio sólido a 30°C. *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 (●), *Yarrowia lipolytica* L0018 (■), Control negativo (◆).

Con respecto a la evolución del pH en las fermentaciones a 30°C. El pH del extracto de ambas cepas (*Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 y *Yarrowia lipolytica* L0018) en el inicio de la fermentación tiene un valor de alrededor de 6.8 y tiene un ligero descenso en el primer día de fermentación. En los días posteriores este asciende a valores de alrededor de 7 (Fig. 8.5). En los reportes de Domínguez y col. (2003a) y Domínguez y col. (2003b) de producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* en FMS y FSm respectivamente observaron este mismo comportamiento en la evolución del pH. Estos autores asocian el primer descenso del pH a la liberación de ácidos grasos por la presencia de las lipasas producidas; y atribuyen un ligero incremento en los valores del pH durante la última etapa de los cultivos a la ocurrencia de la lisis celular. En el estudio de producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* en FSm reportado por Corzo y Revah (1999) se asocia un primer descenso del pH a la producción de ácidos orgánicos tales como ácido cítrico y un subsecuente incremento en el pH como consecuencia del consumo de los ácidos y de proteólisis.

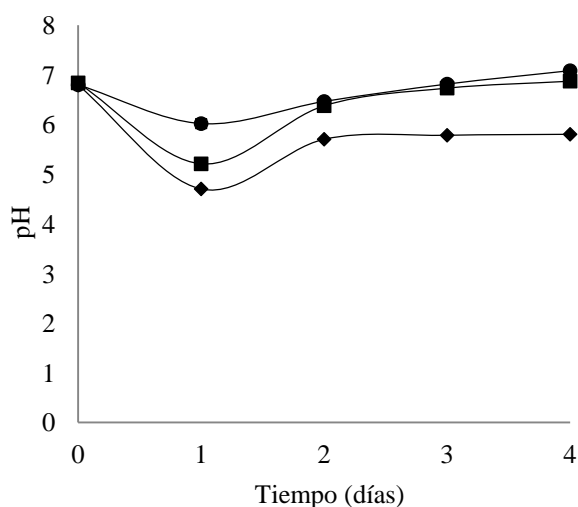


Figura 8.5 Evolución del pH durante la fermentación en medio sólido a 30°C. *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 (●), *Yarrowia lipolytica* L0018 (■), Control negativo (◆).

Las muestras obtenidas durante las cinéticas fueron utilizadas para tomar microfotografías del cultivo. Aunque *Yarrowia lipolytica* L0018 presentó morfología tipo micelio en el primer día de fermentación, tanto esta cepa como *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 presentaron de manera predominante una morfología tipo levadura (células individuales ovaladas) en los días analizados (Figuras 8.6 y 8.7). Por lo tanto, no se encontró una relación entre la máxima

producción de lipasa con alguna morfología en particular, ya que la morfología permaneció constante durante los días analizados en la fermentación. En el reporte de Novotný y col. (1994) no encontraron una correlación general entre altos niveles de producción de lipasa extracelular y la formación de micelio al evaluar 6 diferentes cepas de levaduras lipolíticas (entre las cepas evaluadas estaba *Yarrowia lipolytica*). De manera contraria, en el reporte de Bushan y Hoondal (1997), los autores observaron en una cepa de *Candida* sp. que ciertos compuestos orgánicos (ácido nitrilotriacético, octanol, hexanol, xileno, naftaleno y camfor) e inorgánicos (Ni^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Cr^{3+} y SeO_3^{2-}) incrementaban la producción de lipasa y a su vez la formación de micelio.

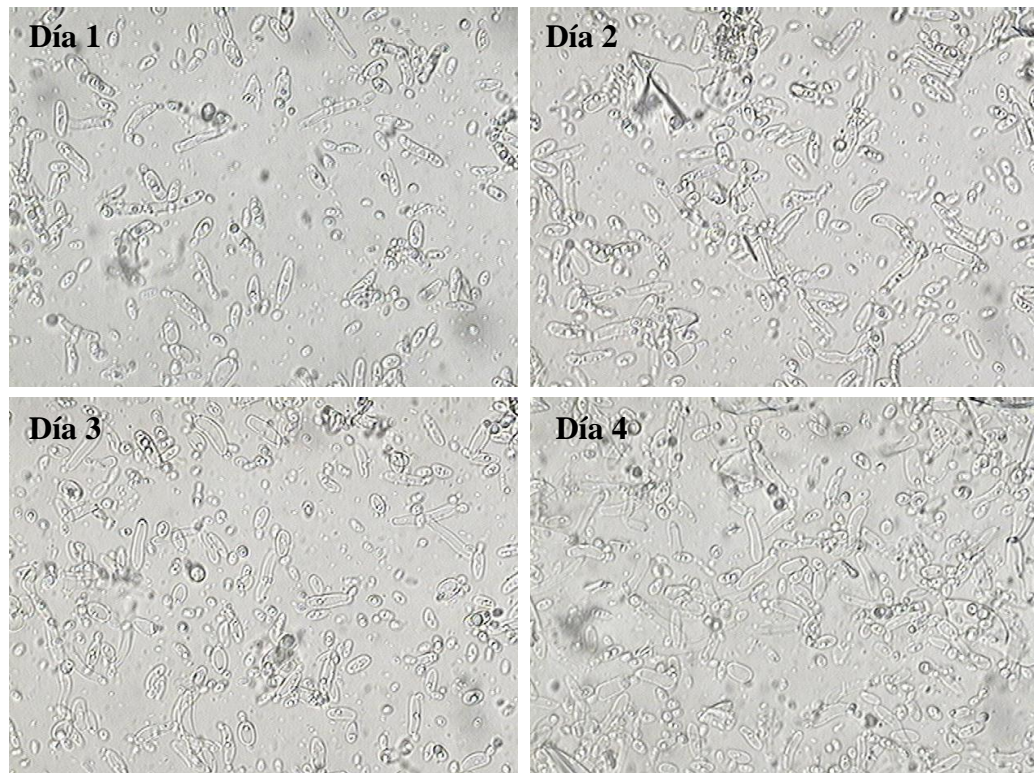


Figura 8.6 Microfotografías (objetivo 40 X) de *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 durante la FMS a 30°C.

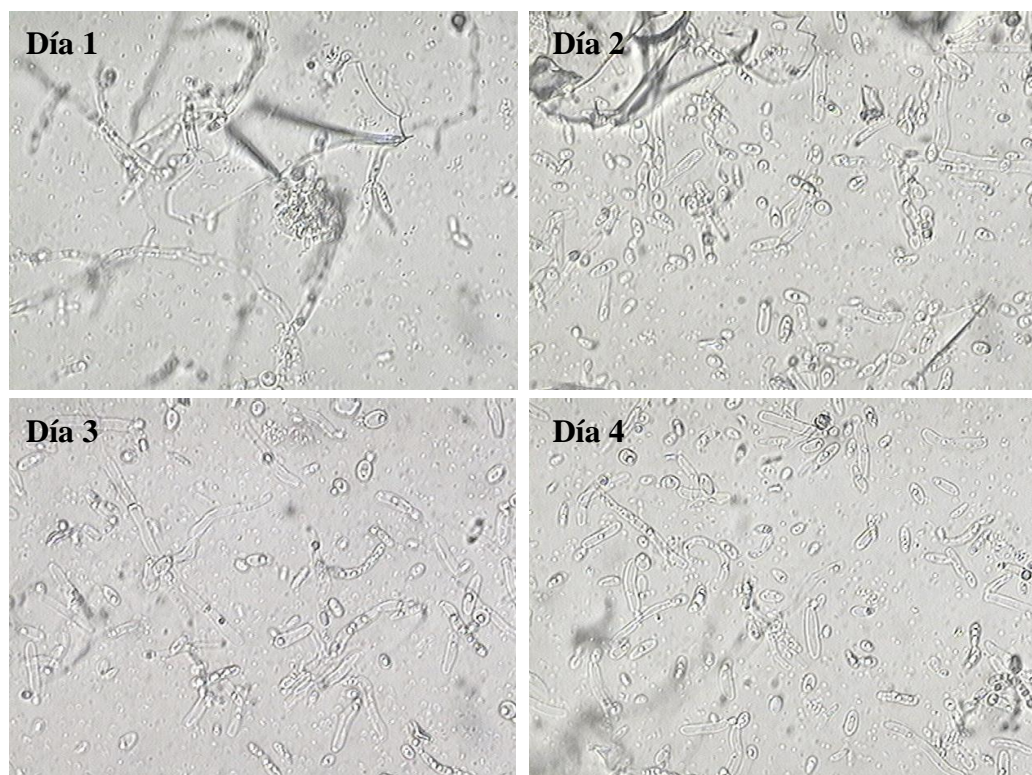


Figura 8.7 Microfotografías (objetivo 40 X) de *Yarrowia lipolytica* L0018 durante la FMS a 30°C.

A 40°C solo creció la cepa *Yarrowia lipolytica* PC, aunque los valores de actividad alcanzados están muy por debajo de los presentados por las otras dos cepas a 30°C. Los valores máximos de actividad alcanzados fueron de alrededor de 0.3 U/g_{si} a las 24 y 48 horas de fermentación (Fig. 8.8). El control negativo mostró valores de actividad inferiores a 0.1 U/g_{si} por lo tanto los valores bajos de actividad obtenidos por *Yarrowia lipolytica* PC no fueron por la presencia de contaminación bacteriana.

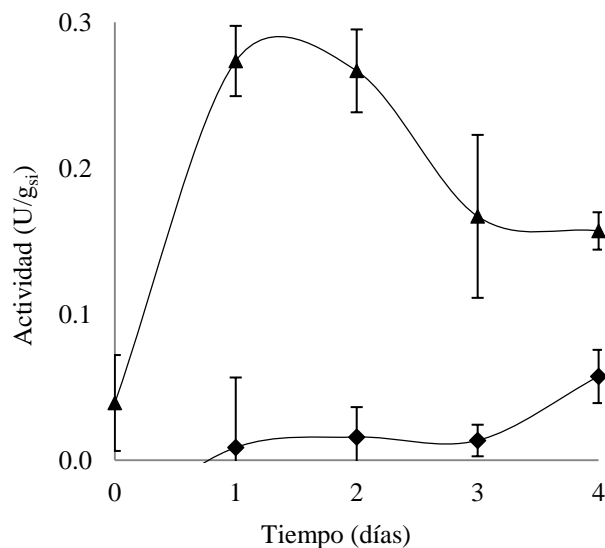


Figura 8.8 Cinética de producción de lipasa en fermentación en medio sólido a 40°C. *Yarrowia lipolytica* PC (▲), Control negativo (◆).

La evolución del pH del extracto de *Yarrowia lipolytica* PC a 40°C mostró un comportamiento muy similar al de las otras dos cepas a 30°C. Inicia el pH con un valor de alrededor de 6.9, baja ligeramente a las 24 horas de fermentación y en los últimos días analizados incrementa a un valor de alrededor de 8 (Fig. 8.9).

Las microfotografías de *Yarrowia lipolytica* PC a 40°C presentaron una mayor proporción de morfología tipo micelio (Fig.8.10), sin embargo, no se encontró una relación entre la producción de lipasa y la inducción de la formación de micelio ya que esta permaneció constante durante los días analizados en la fermentación.

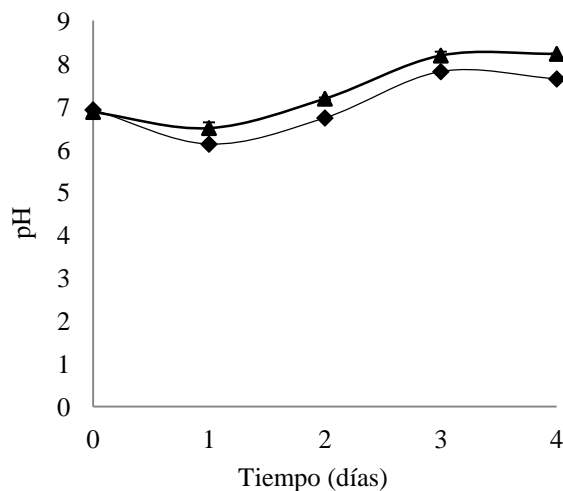


Figura 8.9 Evolución del pH durante la fermentación en medio sólido a 40°C. *Yarrowia lipolytica* PC (▲), Control negativo (◆).

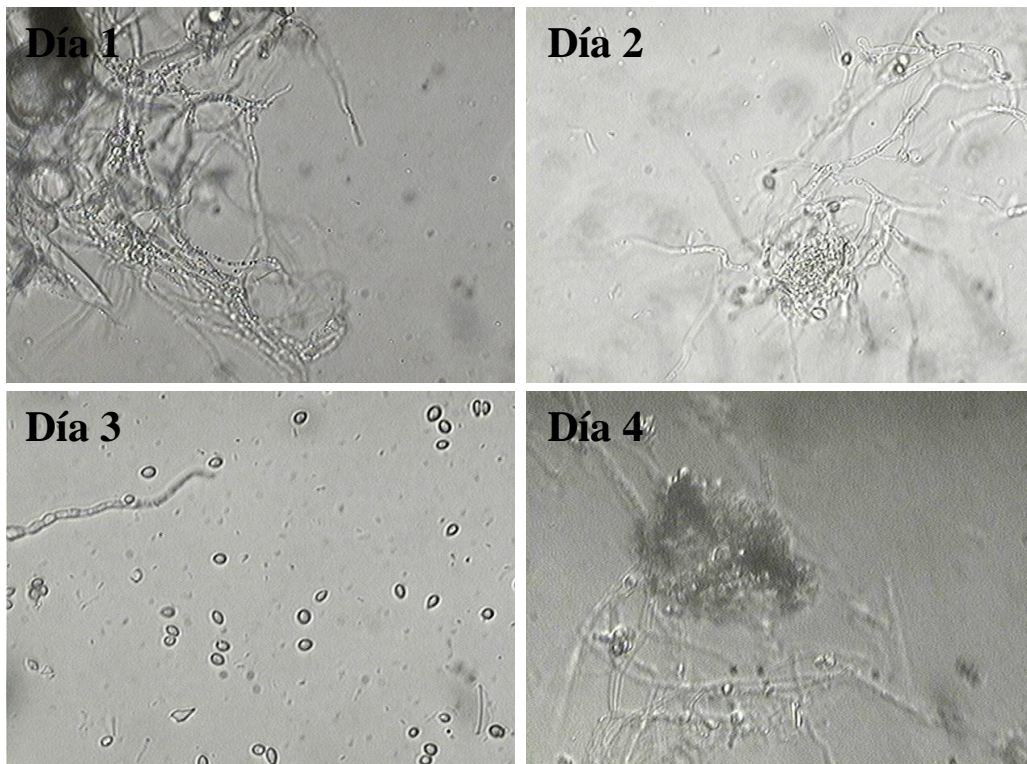


Figura 8.10 Microfotografías (objetivo 40 X) de *Yarrowia lipolytica* PC durante la FMS a 40°C.

Tanto la cepa *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 como *Yarrowia lipolytica* L0018 presentaron los mayores valores de actividad lipasa al ser incubadas a 30°C. Siendo este el criterio para la selección de estas dos cepas para realizar los siguientes estudios de extracción de lipasa de la materia fermentada empleando soluciones de detergentes. Por sus bajos niveles de producción de lipasa se descartó la cepa *Yarrowia lipolytica* PC.

A partir de estas cinéticas se pudo identificar el tiempo de máxima producción de lipasa para cada una de las cepas; el cual será usado para detener la fermentación en los estudios posteriores.

8.2.1 Conclusiones parciales

1. De las cepas de *Yarrowia lipolytica* probadas, la cepa *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 presenta la mayor producción de lipasa extracelular y en un menor tiempo de fermentación al ser incubada a 30°C.

2. Se seleccionaron las cepas *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 y *Yarrowia lipolytica* L0018 para realizar los estudios de extracción de lipasa de la materia fermentada empleando soluciones de detergentes.

8.3 Efecto de detergentes en la extracción de lipasa producida por *Yarrowia lipolytica* en fermentación en medio sólido

En el desarrollo de un proceso en FMS hay varios aspectos importantes, uno de ellos es la extracción del producto (Pandey 2003). Para establecer la metodología de obtención del extracto enzimático se realizaron estudios de extracción de lipasa de la materia fermentada con soluciones de detergentes. Esto con la finalidad de seleccionar un detergente a una concentración con la cual podamos extraer la mayor cantidad posible de lipasa. El método seleccionado será utilizado en los posteriores estudios de producción. Se seleccionó la extracción con detergentes principalmente por tres razones: la primera es que el método de determinación de actividad lipasa seleccionado requiere de un extracto líquido, la segunda es un método rápido y la tercera es por la reproducibilidad.

La estrategia seguida es la mostrada en la Fig. 8.11. El primer paso fue secar la materia fermentada, esto con la finalidad de poder conservar valores de actividad lipasa similares a los iniciales el tiempo suficiente para hacer los estudios de extracción. El tiempo de fermentación que tenía la materia fermentada empleada en estos estudios fue de 24 horas para *Yarrowia lipolytica* ATCC y 48 horas para *Yarrowia lipolytica* L0018 que corresponde al tiempo de máxima producción de lipasa determinado por las cinéticas de estas cepas que se mostraron en el apartado 8.2 de los resultados.

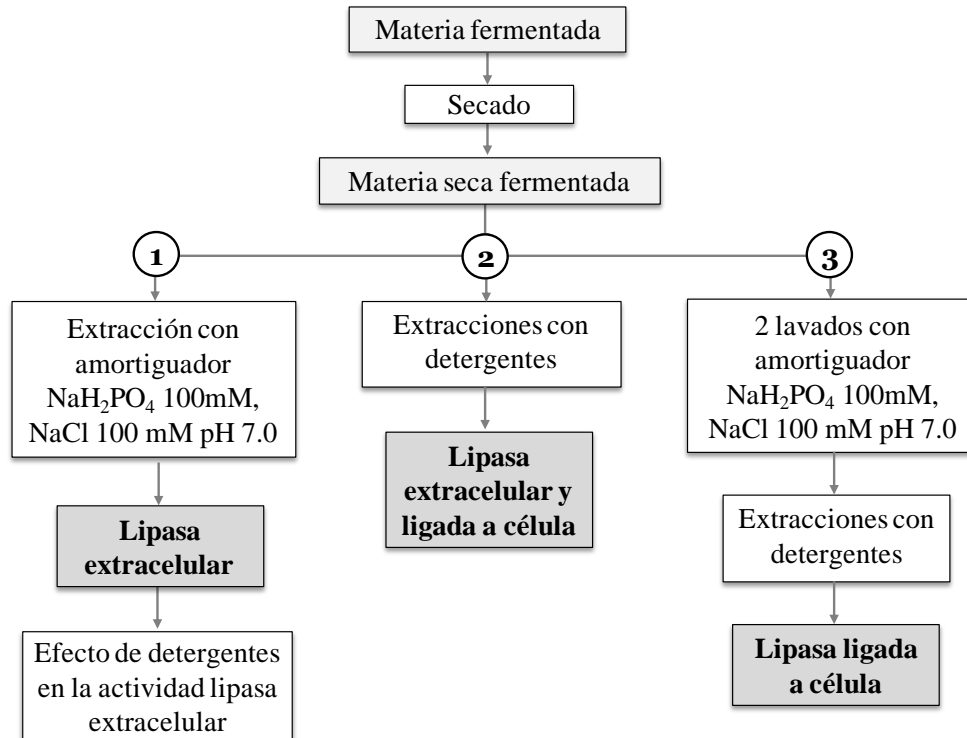


Figura 8.11 Estrategia utilizada en la extracción de lipasa de la materia seca fermentada.

Como se muestra en la Fig. 8.11 a la materia seca fermentada se le realizaron tres estudios diferentes:

1) Extracción de la lipasa extracelular con el amortiguador de NaH_2PO_4 100mM, NaCl 100 mM pH 7.0. Posteriormente, se le determinó al extracto de lipasa extracelular el efecto de detergentes en su actividad añadiendo los detergentes en el medio de reacción al momento de medir actividad lipasa. Esto con la finalidad de saber si los detergentes a las concentraciones empleadas en las extracciones tienen un efecto activador o inhibidor.

2) Extracción con soluciones de detergentes para determinar la cantidad de actividad lipasa obtenida con cada detergente a las diferentes concentraciones contempladas. Se considera que de esta manera debido a que ciertos detergentes ayudan a solubilizar enzimas ligadas a células (Novotný y Doležalová 1993), que se está extrayendo lipasa extracelular y ligada a la célula.

3) Para poder verificar que el aumento en los valores de actividad lipasa son debidos a la extracción de no solo la lipasa extracelular sino también de la ligada a la célula debido a la presencia de los detergentes. Se le realizaron dos lavados a la materia seca con amortiguador para eliminar la mayor cantidad posible de lipasa extracelular. Posterior a los lavados, a la

materia fermentada lavada se le realizaron extracciones con soluciones de detergentes, en caso de encontrar un aumento en la actividad lipasa podemos inferir que los detergentes realmente ayudan a solubilizar las enzimas ligadas a la célula.

Después de haber realizado los estudios mencionados anteriormente se seleccionó un detergente a una concentración con el cual se obtuvieron los mayores valores de actividad lipasa teniendo una idea del efecto activador o inhibidor que se tiene a esa concentración de detergente. La solución de extracción seleccionada se utilizará para hacer la extracción de lipasa en los estudios posteriores de optimización de la producción de esta enzima.

En seguida se obtuvo una cinética de producción de lipasa extrayéndola con dos soluciones de extracción: 1) amortiguador de NaH_2PO_4 100mM, NaCl 100 mM pH 7.0 y 2) solución de detergente NLS 3 mM en NaH_2PO_4 100mM, NaCl 100 mM pH 7.0. Esto con la finalidad de saber si la relación de lipasa extracelular y la ligada a la célula varían con el tiempo. Utilizando el amortiguador se hará la extracción de lipasa extracelular y con la solución de detergente se conocerá la relación de extracelular y la ligada a la célula.

A continuación se describen los resultados obtenidos con esta estrategia.

8.3.1 Efecto de detergentes en la actividad lipasa extracelular

Los detergentes son similares a los sustratos naturales de una lipasa, tanto en términos de estructura como en términos de la formación de agregados, por lo tanto se espera que los detergentes influyan en la actividad lipasa (Mogensen y col. 2005). Los detergentes y las lipasas pueden interactuar entre ellos, tanto en solución como en las interfaces. Con detergentes no iónicos y zwitterionicos las lipasas tienen interacciones principalmente hidrofóbicas, mientras que con detergentes aniónicos o catiónicos se promueven interacciones electrostáticas relacionadas con la carga de las proteínas. Cualquiera que sea el detergente empleado, las interacciones entre la proteína y las moléculas de detergente pueden tener varias consecuencias en la estructura y actividad de la proteína, pero también en la interacción entre la proteína y la interface lipídica (Delorme y col. 2011). La interacción detergente-lipasa es muy específica del detergente utilizado (Mogensen y col. 2005) ya que dependiendo de la naturaleza del surfactante y su concentración, pueden resultar ya sea en activación o desactivación (Delorme y col. 2011).

Los detergentes seleccionados para realizar los estudios de extracción fueron NLS (*N*-lauril sarcosina) un detergente aniónico y Tritón X-100 un detergente no iónico. La concentración miceliar crítica (CMC) de los detergentes NLS y Tritón X-100 son de 14.6 mM (20-25°C) y de 0.2-0.9 mM (20-25°C) respectivamente. La selección de estos detergentes fue en base a un reporte de Aloulou y col. 2007b, donde probaron el efecto de detergentes en la actividad de una lipasa de *Yarrowia lipolytica* (YLLIP2). En la presencia de detergentes no iónicos y aniónicos encontraron comportamientos similares; a bajas concentraciones de este tipo de detergentes hubo activación y conforme aumentaba la concentración comenzaban a disminuir los valores de actividad. Además, en este reporte encontraron que la enzima YLLIP2 no mostró actividad en presencia de detergentes catiónicos o zwitterionicos.

Como se mencionó, Aloulou y col. (2007b) demostraron que detergentes seleccionados en este trabajo pueden llegar a activar o inhibir la actividad de una de las lipasas que representa la mayor proporción de actividad extracelular en *Yarrowia lipolytica*. Por lo cual, se decidió además de hacer estudios de extracción con los dos detergentes a diferentes concentraciones hacer un estudio del efecto de las mismas concentraciones de los detergentes en la actividad de un extracto extracelular. Esto para poder verificar que el aumento en la actividad al hacer las extracciones con los detergentes no solo era debido a un efecto de activación sino que a su vez tuviéramos una mayor extracción de lipasa.

Los resultados obtenidos del efecto de ambos detergentes en la actividad del extracto extracelular de las cepas *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 y *Yarrowia lipolytica* L0018 se presentan en las Fig. 8.12A-B.

También se hicieron estudios de extracción con la materia seca fermentada obtenida con la cepa *Yarrowia lipolytica* PC pero los valores de actividad lipasa eran muy bajos aún en la presencia de los detergentes (resultados no mostrados) por lo cual se optó por no realizar estos estudios con esta cepa.

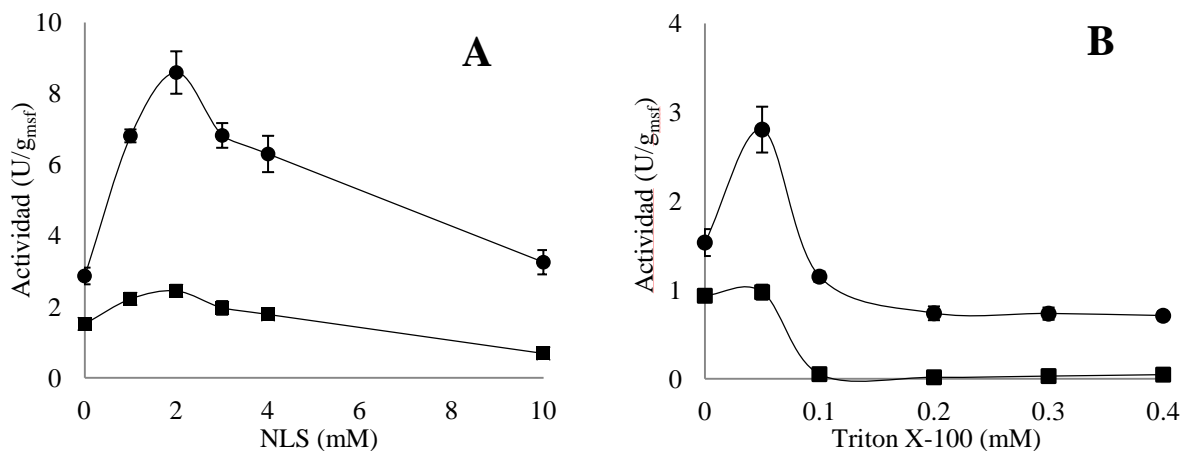


Figura 8.12 Efecto del detergente en la actividad del extracto extracelular. Detergentes probados: (A) NLS mM y (B) Tritón X-100. *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 (●), *Yarrowia lipolytica* L0018 (■).

En la Fig. 8.12A podemos observar que el NLS a las concentraciones probadas solo tiene efecto de activación, la única excepción fue a la concentración 10 mM con la cepa *Yarrowia lipolytica* L0018 donde se ve un pequeño efecto de inhibición. La concentración de NLS a la cual se da el mayor efecto de activación es 2 mM para ambas cepas. A esa concentración de detergente el valor de actividad del extracto de *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 es dos veces mayor con respecto a la actividad en ausencia del detergente y en el caso del extracto *Yarrowia lipolytica* L0018 aumenta su valor de actividad 0.6 veces.

En el caso del detergente Tritón X-100 (Fig. 8.12B) por arriba de la concentración 0.05 mM hay un efecto de inhibición en ambas cepas. Resultados similares fueron obtenidos por Aloulou y col. (2007b). El aumento de la concentración del a partir de 0.05 mM de Tritón X-100 provoca una disminución grande de la actividad lipasa. A la concentración de 0.05 mM de Tritón X-100 la actividad del extracto de *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 muestra un efecto de activación de casi el doble con respecto al valor de la actividad en ausencia del detergente. A esta misma concentración del detergente Tritón X-100 el extracto de *Yarrowia lipolytica* L0018 conserva el valor de actividad obtenido en ausencia del detergente.

El comportamiento de la actividad en presencia de los detergentes en ambas cepas fue similar. Un rápido ascenso de la actividad a un nivel más alto que en amortiguador, seguido de una disminución en la actividad enzimática, completando este comportamiento antes de la CMC de cada detergente. Este efecto inhibitorio por debajo de la CMC también fue observado en el reporte de Aloulou y col. 2007b al probar varios detergentes en YLLIP2. En un estudio

de Mogensen y col. (2005) se observó este mismo comportamiento con otros detergentes neutros (no iónicos y switterionicos) en una de las lipasas mejor estudiadas, la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TIL). Los detergentes no iónicos probados fueron: alquil maltósidos (de cadena de 8 y 12 átomos de carbono), octil glucósido (de cadena de 8 átomos de carbono), fosfatidilcolinas (de cadena de 6, 7 y 8 átomos de carbono), lisofosfatidilcolinas (de cadena de 12 y 14 átomos de carbono) y lisofosfatidilglicerol (de cadena de 14 átomos de carbono). En este mismo estudio al probar detergentes catiónicos (bromuros de alquil trimetilamonio de cadena de 12, 14 y 16 átomos de carbono) y aniónicos (SDS, dodecil sulfato de sodio; SDeS, decil sulfato de sodio; SDSulfonato, dodecil sulfonato de sodio). Se observó el mismo comportamiento que con los detergentes neutros solo que la concentración a la cual los detergentes se activaron e inhibieron se traslapa con la transición de los detergentes de monómeros a micela, la CMC.

Como se mencionó previamente, los detergentes y las lipasas pueden interactuar entre ellos tanto en solución como en las interfaces ocasionando ya sea inhibición o activación. Existen diversas explicaciones de la activación e inhibición de las lipasas en presencia de detergentes.

Mogensen y col. (2005) atribuyen la activación a que las moléculas de detergente se unen a la región del sitio activo, induciendo un cambio conformacional en la enzima, la apertura de la tapa, facilitando la unión del sustrato. La inhibición ocurre cuando moléculas de detergente adicionales se unen a la región del sitio activo, bloqueando el acceso del sustrato. Esta idea es apoyada por Delorme y col. (2011), los cuales hacen una revisión del efecto de los surfactantes en la estructura, actividad e inhibición de las lipasas. Mencionan que el surfactante β -octil glucósido ha sido empleado a concentraciones por arriba de la CMC para inducir y estabilizar la forma activa de varias lipasas fúngicas, incluyendo *Candida rugosa*, *Humicola lanuginosa* y *Rhizopus delemar*.

Los surfactantes pueden tener efectos inhibitorios alterando la adsorción de la lipasa en la interface lípido-agua. Procesos inhibitorios de este tipo pueden ser provocados de distintas manera. La primera, podría ser remplazando a la proteína en la superficie, esto puede ocurrir cuando los detergentes compiten con la lipasa por la adsorción en la interface, cuando las interfaces están saturadas por los monómeros de surfactantes, la lipasa es regresada a la fase acuosa, donde permanece inactiva. Una segunda explicación es por la unión del detergente a la

proteína, ocasionando su desorción o previniendo que alcance la interface (Delorme y col. 2011).

De igual manera Aloulou y col. (2007b) mencionan que la inhibición de YLLIP2 por los detergentes es debido a que los detergentes previnieron la unión de la enzima a la interface del sustrato lipídico. Además mencionan que los monómeros de detergente pueden formar complejos con la lipasa por la interacción con sus superficies hidrofóbicas y estos complejos pueden ser solubilizados en la fase acuosa.

Cuando se emplean a altas concentraciones, los detergentes iónicos pueden causar el desplegamiento parcial o completo de la estructura terciaria de las proteínas (Aloulou y col. 2007b y Delorme y col. 2011). Aunque se ha encontrado que las sales biliares, detergentes aniónicos, no perjudican la estructura de la lipasas digestivas (Delorme y col. 2011). Por lo tanto, los efectos de los detergentes en las lipasas son altamente variables y depende fuertemente tanto de la lipasa, como del detergente.

8.3.2 Extracción de lipasa de materia seca fermentada

En las Fig. 8.13A-B se muestran los resultados de la extracción de lipasa de la materia seca fermentada utilizando soluciones de ambos detergentes a diferentes concentraciones para ambas cepas.

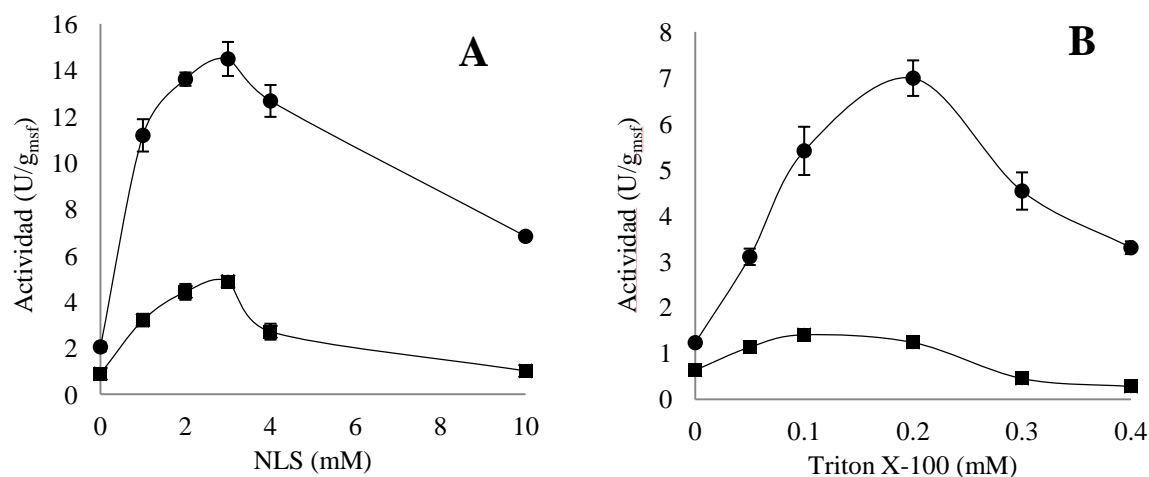


Figura 8.13 Extracción de lipasa de la materia seca fermentada con soluciones de detergentes. Detergentes probados: (A) NLS mM y (B) Tritón X-100. *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 (●), *Yarrowia lipolytica* L0018 (■).

Se tuvieron los valores más altos de actividad lipasa en los estudios de extracción (Fig. 8.13A-B) que en los de efecto del detergente sobre la actividad lipasa (Fig. 8.12A-B). A

concentraciones más altas de detergentes se obtuvieron los valores más altos de actividad lipasa en los estudios de extracción con respecto a las concentraciones a las cuales se tiene un mayor efecto de activación.

Podemos observar de las Fig. 8.13A-B que para ambas cepas se alcanzan los valores más altos de actividad lipasa al realizar la extracción con NLS 3.0 mM. En el caso de *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 hay un aumento de 6 veces en el valor de actividad lipasa que con respecto a los valores de actividad en ausencia de NLS. Como se mencionó previamente la máxima activación por este detergente es de dos veces con respecto a la actividad en ausencia de NLS, por lo tanto tenemos evidencias para inferir que la actividad adicional es debido a la extracción de más lipasa que también está activada. Algo similar ocurrió con la cepa *Yarrowia lipolytica* L0018. Por lo tanto se elige el detergente NLS a la concentración 3.0 mM para hacer la extracción de la lipasa de la materia seca fermentada en estudios posteriores de optimización de la producción de lipasa.

Como se mencionó previamente también se hicieron estudios de extracción con la materia seca fermentada lavada dos veces con amortiguador. En las Fig. 8.14A-B se muestran los valores de actividad lipasa obtenidos después de cada extracción o lavado con amortiguador de la materia seca fermentada de las dos cepas manejadas. Podemos observar que hay un descenso grande en el valor de actividad después del segundo lavado.

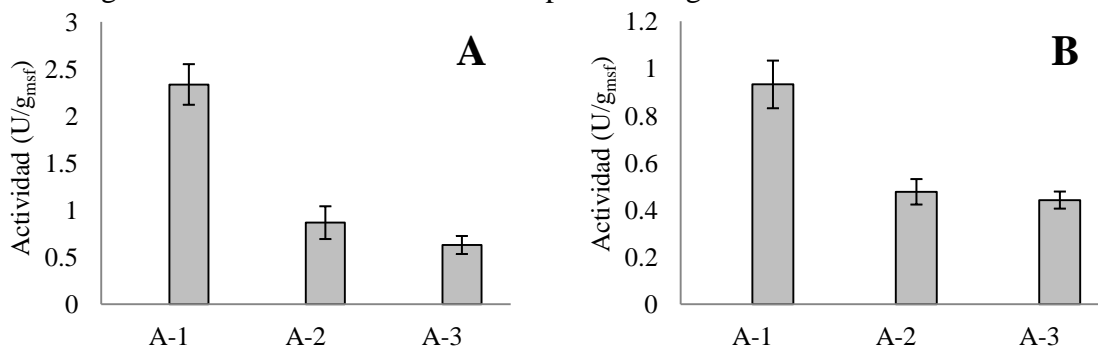


Figura 8.14 Valores de actividad lipasa posterior a lavados sucesivos de la materia seca fermentada con amortiguador de NaH_2PO_4 100mM, NaCl 100 mM pH 7.0 empleada en los estudios de extracción con la solución del detergente NLS. A-1, A-2 y A-3: primera, segunda y tercera extracción respectivamente. *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 (A), *Yarrowia lipolytica* L0018 (B).

Posterior a los lavados se hicieron extracciones con el detergente NLS utilizando la materia seca fermentada lavada dos veces esto se muestra en la Fig. 8.15 para las dos cepas. Cabe

resaltar de estas gráficas que los mayores valores de actividad lipasa se obtuvieron a la concentración 3 mM de NLS, misma concentración con la cual se obtuvieron los valores máximos de actividad al hacer las extracciones con la materia seca fermentada sin lavados.

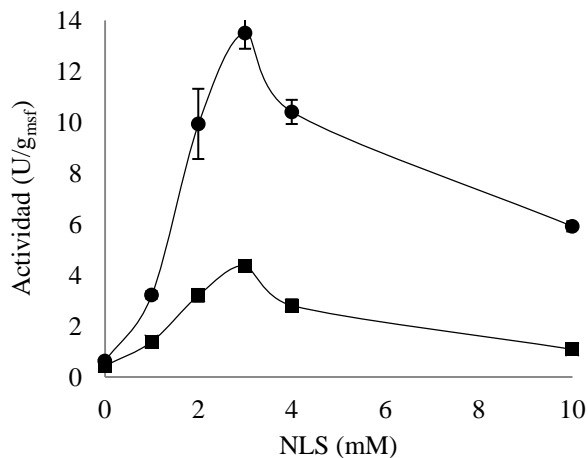


Figura 8.15 Extracción de lipasa de materia seca fermentada con la solución del detergente NLS posterior a los dos lavados con amortiguador de NaH_2PO_4 100mM, NaCl 100 mM pH 7.0. *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 (●), *Yarrowia lipolytica* L0018 (■).

En las Fig. 8.16A-B se muestran los valores de actividad lipasa obtenidos después de cada extracción o lavado con amortiguador de la materia seca fermentada de las dos cepas manejadas, esta materia seca fermentada lavada se utilizará para los estudios de extracción con soluciones del detergente Tritón X-100. Podemos observar que hay un descenso grande en el valor de actividad después del segundo lavado con amortiguador.

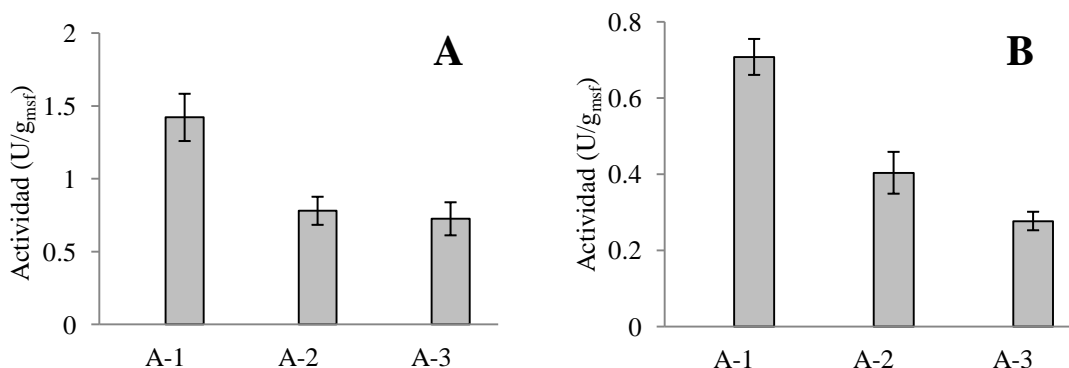


Figura 8.16 Valores de actividad lipasa posterior a lavados sucesivos de la materia seca fermentada con amortiguador de NaH_2PO_4 100mM, NaCl 100 mM pH 7.0 empleada en los estudios de extracción con la solución del detergente Tritón X-100. A-1, A-2 y A-3: primera, segunda y tercera extracción respectivamente. *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 (A), *Yarrowia lipolytica* L0018 (B).

Posterior a los lavados se hicieron extracciones con el detergente Tritón X-100 utilizando la materia seca fermentada lavada dos veces estos resultados se muestran en la Fig. 8.17 para las dos cepas. De estas gráficas podemos observar que los mayores valores de actividad lipasa no se obtienen a la misma concentración de Tritón X-100 como cuando se hicieron las extracciones de la materia secada fermentada sin lavados. Para la cepa *Yarrowia lipolytica* L0018 se movió el máximo de 0.1 a 0.05 mM de Tritón X-100 y para la cepa *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 se movió de 0.2 a 0.1 mM de Tritón X-100 de la materia seca fermentada sin y con lavados respectivamente.

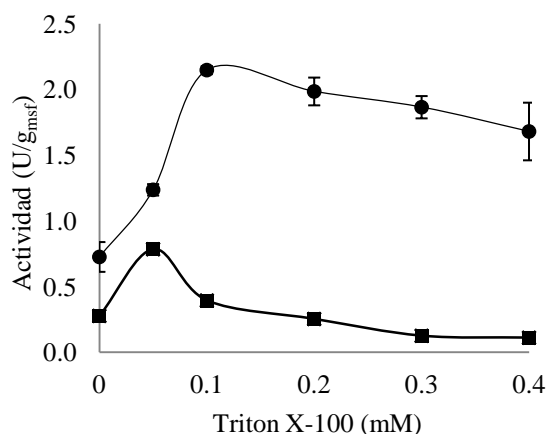


Figura 8.17 Extracción de lipasa de materia seca fermentada con la solución del detergente Tritón X-100 posterior a los dos lavados con amortiguador de NaH_2PO_4 100mM, NaCl 100 mM pH 7.0. *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 (●), *Yarrowia lipolytica* L0018 (■).

De las gráficas de los lavados sucesivos con amortiguador de NaH_2PO_4 100mM, NaCl 100 mM pH 7.0 podemos observar que, a pesar de que hay un descenso en la actividad posterior a cada lavado, esta no es nula. Fickers y col. (2005b) mencionan que en contraste con Lip2, la cual es secretada al final de la fase de crecimiento, Lip7 y Lip8 se asocian principalmente a la pared celular. Estas dos últimas podrían ser fácilmente liberadas al lavar la célula con amortiguador de fosfatos. Por lo tanto, que la actividad posterior a los lavados no sea nula se puede asociar a la liberación de estas enzimas o al efecto mecánico de choque de la agrolita con la biomasa y con esto la liberación de lipasa ligada a la célula o que la eficiencia de extracción de la lipasa extracelular con el amortiguador no es del 100%.

En las Tablas 12.7-12.10 (Anexo 12.3) se muestra un resumen de los estudios del efecto de los detergentes NLS y Tritón X-100 en la actividad y extracción con y sin lavados de la

materia seca fermentada para ambas cepas. En estas tablas se encuentra la resta de la activación por la extracción menos la activación del extracto extracelular a las diferentes concentraciones de detergentes evaluadas. En las Tablas 12.7 y 12.8 se observa que la resta de la activación por la extracción, de la materia seca fermentada con y sin lavados, a la activación del extracto extracelular empleando la solución de NLS a cualquiera de las concentraciones probadas para ambas cepas siempre genera valores positivos. Podemos inferir que el resto de la activación es debido a una mayor extracción de lipasa que está activada. Esto mismo ocurre para las soluciones de Tritón X-100 (Tablas 12.9 y 12.10), a excepción de la cepa de *Yarrowia lipolytica* L0018 para las concentraciones más altas de este detergente, estas restas generan valores negativos. Esto nos indica que este detergente inhibe la lipasa y no favorece la extracción a esas concentraciones de detergente.

El empleo de detergentes en la extracción de lipasa se ha estudiado en otras cepas de *Yarrowia lipolytica*. En el reporte de Corzo y Revah (1999) las células obtenidas fueron lavadas dos veces con una solución de NaCl 0.85% y fueron posteriormente resuspendidas en amortiguador de fosfatos 0.02 mM (pH 4.5) con y sin Tween 80 (0.5 mg/mL). Después de 3 horas de incubación a 37°C la actividad lipasa en presencia de Tween 80 fue tres veces superior a la obtenida en ausencia de este detergente. Al realizar la determinación de biomasa, esta no era significativamente diferente en estos dos medios. Por lo tanto, sugieren que el Tween 80 afecta la permeabilidad de la célula incrementando la secreción de la lipasa.

Rodríguez y col. (2006) evaluaron la extracción de lipasa de materia fermentada (empleando bagazo de caña como soporte impregnado con medio líquido) de *Rhizopus homothallicus* empleando diversas soluciones de extracción; con la solución de Tritón X-100 0.5% (p/v) obtuvieron los mejores resultados de actividad lipasa; aproximadamente dos veces más que la que se obtuvo de un extracto obtenido presionando mecánicamente los sólidos fermentados. Los autores sugieren que esto ocurre ya sea porque el rendimiento de extracción es mejor o porque probablemente ocurrió la activación de la enzima.

En el reporte de Najjar y col. (2011), las células obtenidas de la fermentación fueron lavadas con una solución de NaCl 0.85%, se incubaron 90 min en amortiguador de fosfatos (pH 6.8) con o en ausencia de varios detergentes. Posteriormente, las células se centrifugaron

y se estimó la actividad asociada a las células y en el sobrenadante. Con Tritón X-100 a una concentración de 1.5 mM se recuperó casi la totalidad de la actividad enzimática.

En el presente trabajo también se probó Tritón X-100 y con lo anterior se corrobora que este detergente ayuda a liberar la lipasa ligada a la célula sin afectar negativamente la actividad. Aunque el Tritón X-100 ayudó a extraer la lipasa, con el detergente NLS se obtuvieron mayores valores de actividad lipasa al realizar las extracciones.

Por lo tanto, a partir de los estudios de extracción se seleccionó la solución del detergente NLS 3 mM en amortiguador NaH_2PO_4 100mM, NaCl 100 mM pH 7.0 para realizar las extracciones de lipasa de la materia fermentada en los posteriores estudios de optimización de la producción de lipasa.

Para los siguientes estudios queda descartada la cepa *Yarrowia lipolytica* PC y solo se utilizarán las dos cepas restantes.

Cabe resaltar que en los estudios de extracción nos aseguramos que el medio de reacción para medir actividad lipasa tuviera la misma concentración de detergente que la solución con la cual se extrajo la enzima. De ahora en adelante en el medio de reacción solo habrá amortiguador como originalmente se estaba midiendo actividad. De esta manera tenemos que considerar que se va a diluir el detergente en el medio de reacción y de acuerdo a los estudios de efecto de detergentes en la actividad del extracto extracelular (Fig. 8.12A-B), habrá una disminución en los valores de actividad obtenidos en los estudios que continuarán.

8.3.3 Cinéticas de producción de lipasas

Se realizaron cinéticas de producción de lipasa utilizando las dos cepas seleccionadas previamente: *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 y *Yarrowia lipolytica* L0018. Para cada cepa se realizaron dos cinéticas. En una cinética se realizó la extracción de lipasa extracelular de la materia fermentada utilizando amortiguador NaH_2PO_4 100mM, NaCl 100 mM pH 7.0. En la segunda cinética se realizó la extracción de la lipasa con NLS 3 mM en NaH_2PO_4 100mM, NaCl 100 mM pH 7.0, la solución de detergente previamente seleccionada en los estudios de extracción de lipasa de la materia seca fermentada, con lo cual se realizó la extracción de lipasa extracelular y la ligada a la célula.

En la Fig. 8.18A-B se muestran las cinéticas de producción de lipasa mencionadas previamente. Se puede observar que para la cepa *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 (Fig. 8.18A)

la lipasa extracelular a partir de las 20 horas permanece más o menos constante alrededor de 0.7 U/gsi en el tiempo analizado. Al realizar la extracción con la solución de NLS 3 mM de igual manera a partir de las 20 horas el valor de actividad permanece más o menos constante alrededor de 6 U/gsi en el tiempo analizado. Por lo tanto, para esta cepa la actividad lipasa extraída con el detergente NLS, que incluye una suma de la extracelular y la ligada a la célula, permanece más o menos constante a partir de las 20 horas hasta las 48 horas analizadas.

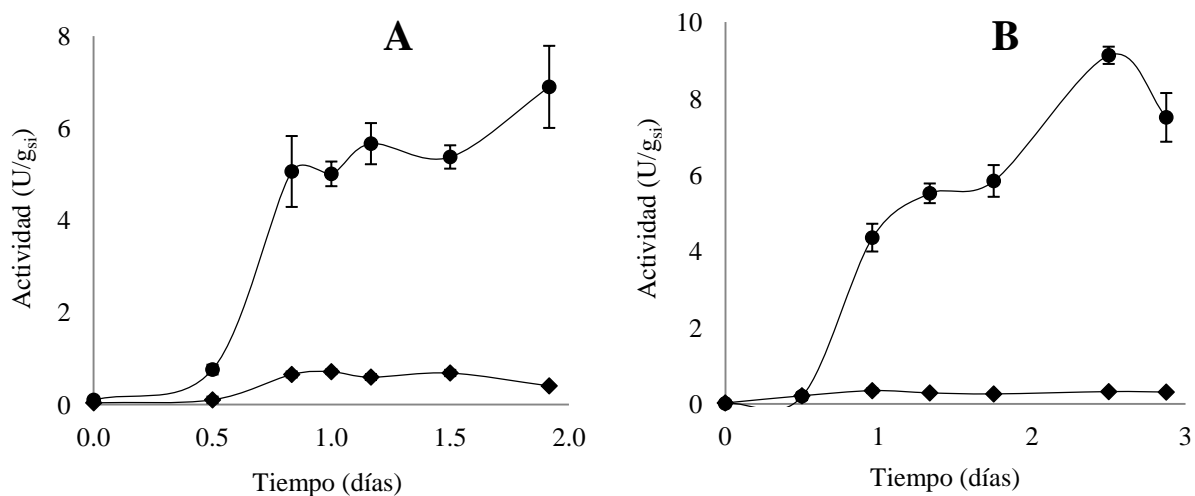


Figura 8.18 Cinética de producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* en fermentación en medio sólido. *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 (A), *Yarrowia lipolytica* L0018 (B). Extracción con: (◆) amortiguador de NaH₂PO₄ 100mM, NaCl 100 mM pH 7.0, (●) NLS 3 mM en amortiguador de NaH₂PO₄ 100mM, NaCl 100 mM pH 7.0.

Para la cepa *Yarrowia lipolytica* L0018 se observa un comportamiento similar a la otra cepa en la extracción de lipasa extracelular; esta permanece constante a partir de las 20 horas de fermentación pero con un valor de actividad de 0.3 U/gsi (Fig. 8.18B). Los valores de actividad lipasa extraída con el detergente no permanecen constantes como en el caso de la otra cepa, la actividad aumenta a partir de las 20 horas hasta llegar a un máximo a las 36 horas con un valor de 9 U/gsi.

Es importante mencionar el hecho de que en la producción de lipasa por diferentes cepas de *Yarrowia lipolytica*, gran parte de la lipasa se encuentra ligada a la célula (Pereira-Meirelles y col. 2000, Fickers y col. 2004, Fickers y col. 2005b, Deive y col. 2010, y Najjar y col. 2011). Por lo tanto, se justifica el establecimiento de una metodología de extracción de lipasa

empleando soluciones de detergentes que permeabilizan la membrana para así extraer la lipasa ligada a la célula y volver más eficiente la extracción.

En los reportes de Pereira-Meirelles y col. (2000) y Najjar y col. (2011) se observó un comportamiento muy similar de la distribución de la lipasa en los cultivos. En las primeras horas del cultivo la mayor proporción de la actividad total era ligada a las células. La lipasa ligada a las células llega a un máximo a partir del cual empieza a descender y al mismo tiempo aumenta la cantidad de lipasa extracelular. Fickers y col. (2004) observó lo mismo pero mediante un análisis de Western blot con el cual analizaron la ubicación de la lipasa Lip2 durante el crecimiento de una cepa mutante sobreproductora. Se percataron de que en la etapa temprana del cultivo, durante la fase de crecimiento exponencial, cuando el ácido oleico (la fuente de carbono) es abundante en el medio, las lipasas están principalmente localizadas en la membrana. Posteriormente, las lipasas son liberadas al caldo de cultivo conforme la concentración del ácido oleico comienza a disminuir. Encontrándose entonces localizadas principalmente en la fracción del citosol y del sobrenadante.

Se observó un comportamiento un poco distinto en los reportes de Fickers y col. (2005b) y Deive y col. (2010) con respecto al de los reportes anteriores, pero muy similar al encontrado en el presente estudio. Tanto la actividad extracelular como la total llegan a un máximo a partir del cual se mantienen constantes durante un determinado tiempo. Siendo los valores de actividad lipasa total muy superiores a los de la actividad de la lipasa extracelular. En el reporte de Deive y col. (2010) encontraron que la actividad intracelular, extracelular y la ligada a la membrana constituyen aproximadamente el 2, 10 y 88% de la cantidad total, respectivamente. Fickers y col. (2005b) evaluaron la producción de las lipasas Lip7 y Lip8 encontrando que estas se asocian principalmente a la pared celular.

Cabe resaltar que finalmente se seleccionó a la cepa *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 para los posteriores estudios de optimización de la producción de lipasa. Esto principalmente por dos razones. La primera razón es porque los valores de actividad son similares a los de la otra cepa, *Yarrowia lipolytica* L0018. La segunda es que los valores de actividad lipasa extraídos con la solución de NLS 3mM para la cepa *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en un lapso de un día son más o menos constantes, lo cual nos permite en los diseños experimentales

asegurarnos que la lipasa extraída con la solución de detergente es más o menos constante y no varía en función del tiempo de fermentación.

8.3.4 Conclusiones parciales

1. Se obtuvieron los mayores valores de actividad lipasa extrayendo de la materia seca fermentada de las dos cepas de *Yarrowia lipolytica* probadas con la solución del detergente NLS 3 mM.
2. Se seleccionó el detergente NLS 3 mM para realizar la extracción de lipasa de la materia fermentada en los posteriores estudios de optimización de la producción de lipasa en FMS.
3. La actividad lipasa obtenida mediante la extracción con la solución de NLS 3 mM es constante durante 1 día aproximadamente a partir de las 24 horas de fermentación para *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773.
4. Se seleccionó a la cepa *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 para los posteriores estudios de optimización de la producción de lipasa en FMS.

8.4 Optimización de la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en fermentación en medio sólido

La última parte de la tesis fue la optimización de la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en fermentación en medio sólido y tuvo por objetivo mejorar los niveles de actividad. El primer estudio que se realizó fue la comparación de dos inductores mediante una cinética. Posteriormente, se realizaron cinéticas de diferentes concentraciones del medio de cultivo basal. Para finalmente presentar los estudios de optimización empleando la metodología de superficie de respuesta.

8.4.1 Efecto del inductor sobre la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en fermentación en medio sólido

Un factor importante en la producción de lipasa es el tipo de inductor empleado. Generalmente, en la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* y en otros microorganismos se emplea como inductor el aceite de oliva. Sin embargo, existen diversos reportes en los que comparan este aceite con el aceite de girasol, resultando este último como mejor inductor para la producción de lipasa empleando *Yarrowia lipolytica* tanto en FSm (Domínguez y col. 2003b y Babu y Rao 2007a) como en FMS (Domínguez y col. 2003a). Para verificar que el aceite de girasol es mejor inductor se realizó una comparación de la producción de lipasa mediante

cinéticas empleando ambos aceites vegetales (Fig. 8.19). En la Fig. 8.19 podemos observar que la máxima producción de lipasa se alcanza a los 1.5 días de fermentación con ambos aceites. Sin embargo, el nivel de actividad obtenido empleando el aceite de girasol es alrededor de 10 U/g_{si} mayor que la actividad obtenida con aceite de oliva. Aun que es menor la producción empleando el aceite de oliva se observa que la producción se mantiene constante durante más tiempo.

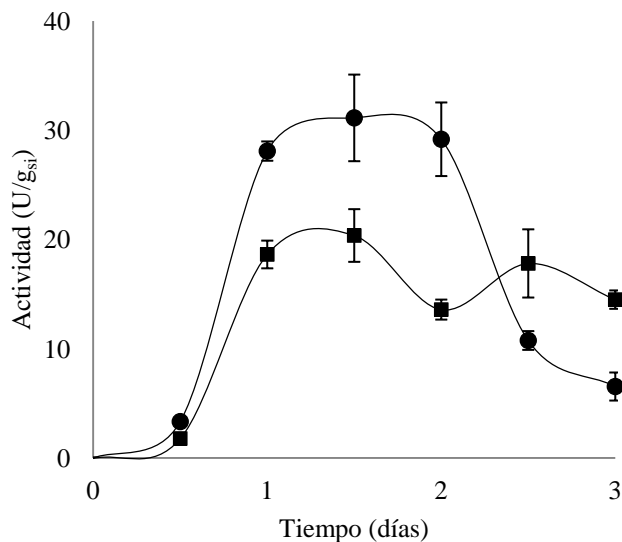


Figura 8.19 Cinética de comparación de los inductores: aceite de girasol (●) y aceite de oliva (■) sobre la producción de lipasa.

En la Tabla 8.2 se muestran algunos reportes en los cuales comparan diferentes inductores, incluido el aceite de girasol, empleando diferentes microorganismos tanto en FMS como en FSm. Resultando el aceite de girasol como el mejor inductor en los microorganismos: *Yarrowia lipolytica*, *Rhizopus delemar* y *Thermus thermophilus*.

Tabla 8.2 Estudios en los cuales comparan la producción de lipasa empelando diferentes tipos de inductores lipídicos.

Microorganismo	Tipo de fermentación	Inductores comparados	Referencia	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	FMS	*Aceite de girasol Aceite de oliva Aceite de maíz	Domínguez y col. 2003a	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	FSm	Ácido oleico Aceite de oliva *Aceite de girasol Tributirina	Domínguez y col. 2003b	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	FSm	*Aceite de girasol Aceite de oliva Tributirina	Babu y Rao 2007a	
<i>Rhizopus homothallicus</i>	FMS	Aceite de maíz Aceite de nuez Aceite de olivo Aceite de cacahuete Aceite de semilla de uva Aceite de girasol	Rodríguez y col. 2006	
<i>Rhizopus delemar</i>	FSm	Aceite de soya *Aceite de girasol Aceite de avellana Aceite de oliva Aceite de maíz	Açikel y col. 2011	
<i>Metarhizium anisopliae</i>	FSm	Aceite de babasu Aceite de oliva Aceite de girasol Aceite de linaza Aceite de soya Aceite de maíz Aceite de semilla de algodón	Aceite de canola *Aceite de arroz Aceite de palma Grasa de cerdo Aceite de sésamo Grasa de bovino Grasa de soya hidrogenada	Silva y col. 2005
<i>Thermus thermophilus</i>	FSm	Aceite de olivo *Aceite de girasol Aceite de coco Tributirina	Deive y col. 2009	
<i>Bacillus subtilis</i>	FSm	Aceite de oliva Aceite de girasol Aceite de soya *Aceite de sésamo Aceite de maíz	Takaç y Marul 2008	

* mejor inductor.

Es interesante observar que con la cepa de *Rhizopus homothallicus* en FMS se produjeron niveles similares de actividad lipasa al probar el efecto de seis diferentes aceites vegetales (Rodríguez y col. 2006). Siendo esto una ventaja ya que se puede elegir el aceite más barato o disponible para la producción de lipasa a escala industrial. Para los microorganismos *Metarhizium anisopliae* y *Bacillus subtilis* se encontró que el aceite de maíz y el de sésamo

fueron los mejores inductores respectivamente. A pesar de esto, los autores escogen emplear el aceite de soya y el de girasol, basado en la disponibilidad y el costo local, para producir lipasas con *Metarhizium anisopliae*. En el caso de *Bacillus subtilis* el aceite de sésamo se encontraba como mejor inductor y seguido de esta estaba el aceite de girasol.

En algunos de los estudios en los cuales se obtiene la mayor producción de lipasa empleando como inductor al aceite de girasol atribuyen esto a la composición en ácidos grasos del aceite de girasol (Domínguez y col. 2003a y Takaç y Marul 2008). En la Tabla 8.3 se muestra la composición en ácidos grasos de diversos aceites vegetales, incluido el aceite de girasol, según se ha encontrado en diversas referencias (Takaç y Marul 2008, Mittelbach 1990 y Noor Lida y col. 2002). El aceite de girasol tiene un alto contenido en ácido linoleico (C18:2) seguido de ácido oleico (C18:1), ácido palmítico (C16:0) y ácido esteárico (C18:0). En el reporte de Domínguez y col. (2003a) y en el de Takaç y Marul (2008) se considera que el alto contenido en ácido linoleico juega el papel más importante en la inducción de lipasa. Takaç y Marul (2008) corroboran esto al evaluar de manera independiente los ácidos grasos, siendo el mejor inductor de la producción de lipasa el ácido linoleico.

Tabla 8.3 Composición de ácidos grasos de algunos aceites vegetales (Takaç y Marul 2008, Mittelbach 1990 y Noor Lida y col. 2002).

Aceite vegetal	Ácido graso (%)							
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1
Aceite de girasol	7	0.09	4	25	64	0.08	0.14	0.13
Aceite de olivo	12	0.82	3	73	9	0.64	0.45	0.33
Aceite de sésamo	6	0.1	4	36	53	0.11	0.29	0.19
Aceite de soya	14	0.14	3	25	51	6	0.31	0.25
Aceite de maíz	12	0.17	2	28	57	0.86	0.30	0.19

Por lo tanto, en los siguientes estudios de este trabajo se usará aceite de girasol como inductor para la síntesis de lipasa.

8.4.2 Efecto de diferentes concentraciones del medio de cultivo basal sobre la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en fermentación en medio sólido

Como paso preliminar a la optimización se evaluó el efecto de diferentes concentraciones del medio de cultivo basal sobre la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en FMS mediante cinéticas. Este estudio se realizó para establecer los niveles de los

componentes del medio de cultivo basal del primer diseño experimental determinando un rango de la concentración de estos.

En la práctica se desconoce la ubicación del punto óptimo por lo que existe la posibilidad de que la metodología de superficie de respuesta lleve a un óptimo local, y no al óptimo (Gutiérrez-Pulido y De la Vara-Salazar 2008). Para tratar de evitar esto se evaluó un intervalo amplio de las concentraciones del medio de cultivo basal.

Se evaluaron las concentraciones 1, 2, 4, 6, y 8 veces concentrado (1X, 2X, 4X, 6X y 8X) del medio de cultivo basal empleado para la producción de lipasa reportado por Corzo y Revah (1999) con modificaciones. Las cinéticas obtenidas se muestran en el Anexo 12.4. De las cinéticas se obtuvo la productividad de cada uno de estos medios la cual se muestra en la Fig. 8.20. La productividad se calculó con el cociente de la actividad lipasa máxima entre el tiempo de fermentación con el cual se obtuvo la actividad lipasa máxima.

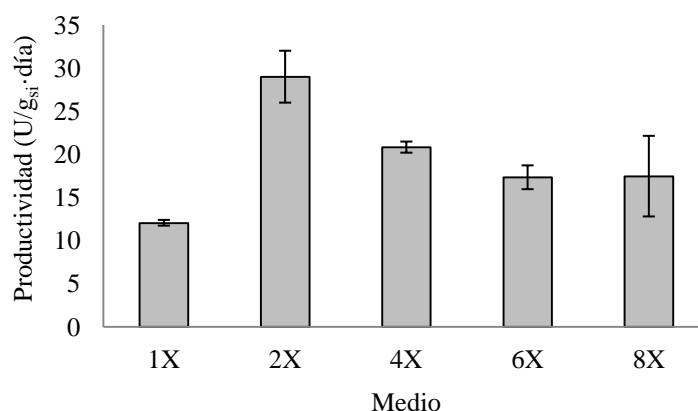


Figura 8.20 Productividad de lipasa empleando diferentes concentraciones del medio de cultivo basal.

Se realizó un análisis estadístico de la productividad de lipasa empleando diferentes concentraciones del medio de cultivo basal. A partir del análisis de varianza (Tabla 12.11, Anexo 12.4) sabemos que el valor-P = 0.0097, es menor al nivel de significancia ($\alpha=0.05$) lo que indica que la productividad de lipasa de al menos dos concentraciones del medio de cultivo basal son estadísticamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

Para saber entre cuales medios existe una diferencia significativa en cuanto a la productividad de lipasa se empleó el método de Tukey. El resultado de esta prueba se muestra en la Tabla 12.12, Anexo 12.4. Estadísticamente la productividad de lipasa empleando el

medio 2X es significativamente diferente a los medios 1X, 6X y 8X con un nivel de confianza del 95%. Por lo tanto hay evidencias estadísticas de que al emplear el medio 2X hay mayor productividad que los medio 1X, 6X y 8X. A partir de esto se seleccionó como nivel bajo la concentración 2X de los componentes del medio de cultivo basal. Como no se encontraron diferencias estadísticas entre la productividad de lipasa empleando los medios 4X, 6X y 8X se decidió elegir como nivel alto el medio 6X. De manera que el rango de las concentraciones de los componentes del medio no fuera demasiado amplio.

Concentraciones altas de los componentes del medio de cultivo basal (medios 6X y 8X) no inhibieron de manera significativa la productividad de lipasa con respecto a medios de menor concentración (Figura 8.20). En el reporte de Babu y col. (2007a), al evaluar la concentración de glucosa en la producción de lipasa empleando una cepa de *Yarrowia lipolytica* en FSm se observó una disminución de la actividad por arriba de la concentración de glucosa de 20g/L, concentración muy por debajo de las empleadas en los medios más concentrados en el presente trabajo. El hecho de que la productividad de lipasa no disminuyera de manera significativa en estos medios tan concentrados es probablemente debido a una o a estas dos posibles explicaciones que no fueron comprobadas: la primera es una disminución en la represión catabólica por emplear como sistema de cultivo la FMS (Hölker y col. 2004) o por la resistencia o adaptación de esta cepa mediante cambios en su morfología (dimorfismo). Se menciona esto último porque al evaluar la morfología de la levadura (resultados no mostrados), se observó que en los cultivos con los medios más concentrados había una mayor proporción de células muy alargadas que de células en forma de levadura (células ovaladas individuales).

8.4.3 Optimización

Para los estudios de optimización de la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en FMS se empleó la metodología de superficie de respuesta.

Se evaluaron factores correspondientes a la concentración de los componentes del medio de cultivo basal además de algunas condiciones de cultivo. Los cuales se desglosarán posteriormente.

En la Fig. 8.28 se muestran las etapas de los estudios de optimización. La primera es la etapa de “cribado” en la cual se empleó un diseño factorial fraccionado 2^{12-8} . Posteriormente,

siguió la etapa de “búsqueda I o de primer orden” en la cual se empleó el diseño factorial fraccionado 2^{6-2} con punto al centro. Finalmente, se prosiguió con la etapa de “búsqueda II o de segundo orden” en la cual se realizaron cuatro diseños de segundo orden.

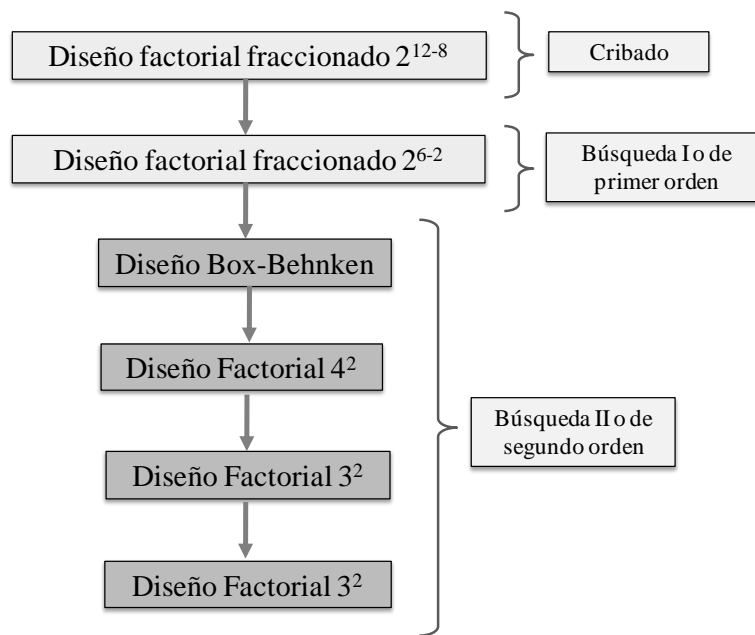


Figura 8.21 Estrategia de optimización de la producción de lipasa.

Antes de comenzar los diseños de los estudios de optimización de la producción de lipasa se realizó un diseño factorial 2^3 en el cual se evaluaron diversas condiciones de cultivo (pH inicial, humedad y tamaño de inóculo) y sirvió como antecedente a los estudios de optimización.

Todos los diseños excepto el primero (diseño factorial 2^3 con punto al centro) se realizaron conforme a la metodología descrita para la optimización de la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en FMS descrita en la sección 7.3.6. En esta metodología la base de cálculo para la preparación de los medios de cultivo fue un gramo de soporte inerte. La selección de esta base de cálculo permite ajustar los componentes del medio de cultivo, incluyendo el agua (humedad).

En cada diseño primero se describen las características del diseño y se muestra una tabla con los factores y niveles del diseño. Posteriormente, se muestra una tabla y una gráfica de

barras con los resultados de actividad lipasa obtenidos en cada uno de los tratamientos de los diseños. Posterior a esto siguió el análisis del diseño en el cual se muestra lo siguiente:

- a) Gráfica de Pareto estandarizada
- b) Gráfica de efectos principales
- c) Superficie de respuesta, en los diseños de segundo orden
- d) El factor de determinación (R^2) del modelo ajustado

Al realizar el análisis de los diseños se empleó un nivel de significancia de 5% ($\alpha = 0.05$). En el Anexo 12.5 se muestran algunos complementos del análisis del diseño tales como la tabla de análisis de varianza, gráfica de interacciones y la ecuación del modelo ajustado.

8.4.3.1 Diseño factorial 2^3 con punto al centro

Antes de realizar la optimización de la producción de lipasa se realizó un diseño factorial con la finalidad de evaluar el efecto de la humedad, pH y tamaño de inóculo sobre la presencia de contaminantes bacterianos durante el cultivo. Durante los estudios previos se detectó, a partir de las observaciones al microscopio de la FMS, la presencia de bacterias, ya que para la FMS no se esterilizó el medio. Se observó que las bacterias disminuyeron conforme transcurrió el tiempo de fermentación. Con el fin de disminuir esta contaminación bacteriana se propuso bajar el pH inicial del medio de cultivo, aumentar el tamaño de inóculo y disminuir la humedad. Todo esto sin que tenga efecto significativo sobre la producción de actividad lipasa. Para esto se planteó un diseño experimental 2^3 con punto al centro, teniendo como variables de respuesta: la actividad lipasa y microfotografías. En la Tabla 8.5 se presentan los factores y los niveles estudiados y a continuación se mencionan algunas características del diseño empleado:

Diseño: factorial 2^3 con punto al centro

Variable de respuesta: actividad lipasa (U/g_{si}) y microfotografías

Factores: 3 (Tabla 8.4)

Niveles: 2 y un punto al centro (Tabla 8.4)

Corridas: 9

Resolución: V

Por duplicado

Tabla 8.4 Factores y niveles empleados en el diseño factorial 2^3 con punto al centro.

Factores	Unidad	Niveles		
		-1	0	+1
1. pH inicial		5	6	7
2. Humedad	%	50	55	60
3. Tamaño de inóculo	No. células/mL	1×10^7	5×10^7	1×10^8

Cabe destacar que en este estudio se determinó la actividad lipasa extracelular ya que la extracción de la lipasa se realizó empleando amortiguador de NaH_2PO_4 100mM y NaCl 100 mM pH 7.0 (sección 7.3.3.5). Además, la preparación de la fermentación se realizó conforme a la metodología descrita en la sección 7.3.3.4.

En la Tabla 8.5 y Fig. 8.22 se muestran los resultados de actividad lipasa obtenidos para cada tratamiento. Podemos observar que los tratamientos con el nivel alto de tamaño de inóculo (1×10^8 células/mL) produjeron los niveles más altos de actividad.

Tabla 8.5 Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño factorial fraccionado 2^3 con punto al centro.

Tratamiento	pH	Humedad (%)	Tamaño de inóculo (No. células/mL)	Actividad (U/gsi)
1	5	50	1×10^7	3.1 ± 0.4
2	5	50	1×10^8	4.1 ± 0.1
3	5	60	1×10^7	4.4 ± 0.8
4	5	60	1×10^8	4.3 ± 0.3
5	7	50	1×10^7	3.1 ± 0.6
6	7	50	1×10^8	4.3 ± 0.3
7	7	60	1×10^7	3.1 ± 0.4
8	7	60	1×10^8	4.8 ± 0.3
9	6	55	5×10^7	4.4 ± 0.7

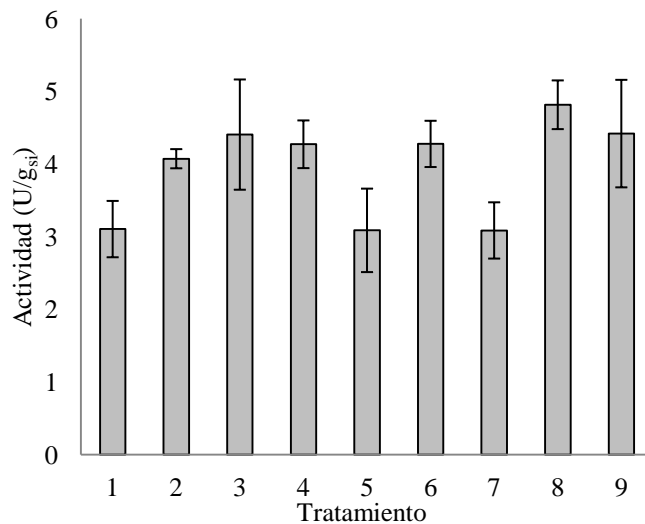


Figura 8.22 Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño factorial fraccionado 2^3 con punto al centro.

En la Fig. 8.23 se muestran las microfotografías de los tratamientos donde se observó menos contaminación, los cuales coinciden con los tratamientos de mayor actividad lipasa. Por lo tanto se utilizará un tamaño de inóculo de 1×10^8 células/mL en futuras fermentaciones ya que esto favorece la producción de lipasa y disminuye la contaminación.

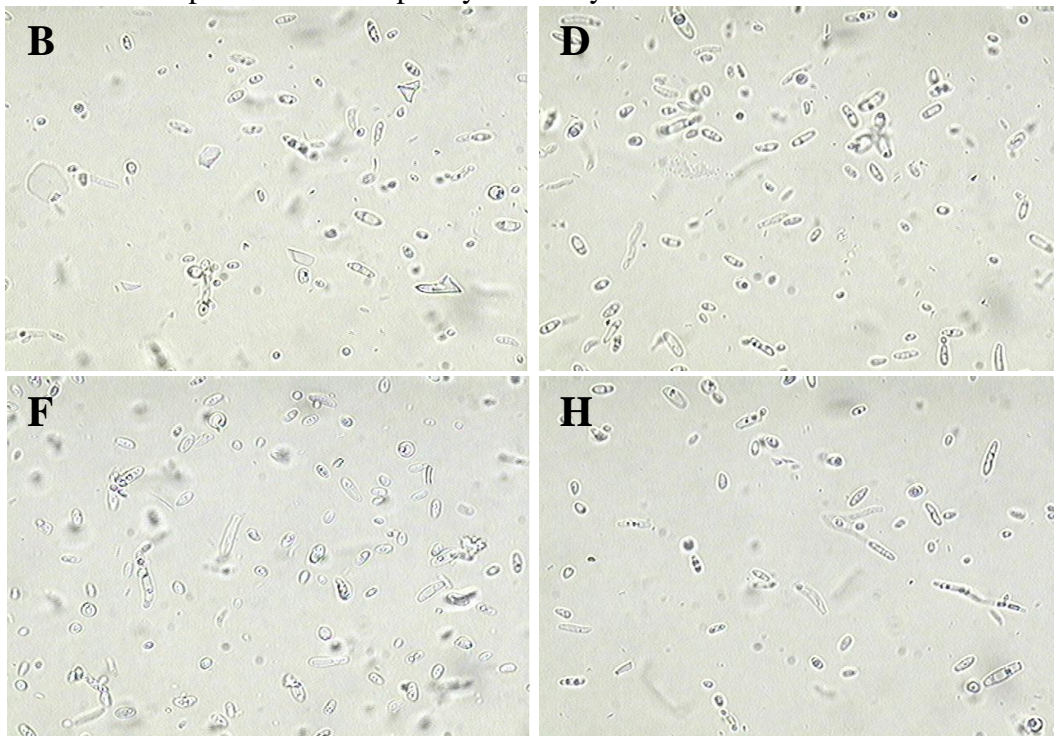


Figura 8.23 Microfotografías (objetivo 40 X) de *Yarrowia lipolytica* ATCC a una dilución 1:100 para los tratamientos con menos contaminación.

Al realizar el análisis del diseño, de la gráfica de Pareto estandarizada para actividad lipasa (Fig. 8.24) observamos que solo son significativos los factores tamaño de inóculo (valor P = 0.0019) y humedad (valor P = 0.0394), y de las interacciones la de pH·tamaño de inóculo (valor P = 0.0450).

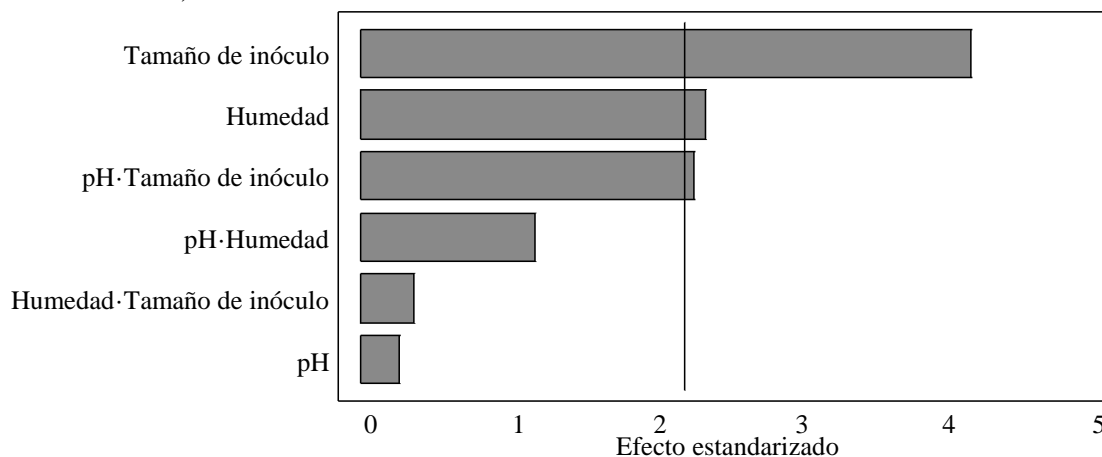


Figura 8.24 Gráfica de Pareto estandarizada para actividad lipasa del diseño 2^3 con punto al centro.

En la gráfica de efectos principales para actividad lipasa (Fig. 8.25), se observa que en los niveles más altos de tamaño de inóculo (1×10^8 células/mL) y humedad (60%) se alcanzan valores más altos en la producción de actividad lipasa, aunque el efecto del tamaño de inóculo es mayor. Además se observa que el efecto del pH no es significativo como ya se había mostrado en la gráfica de Pareto (Fig. 8.24).

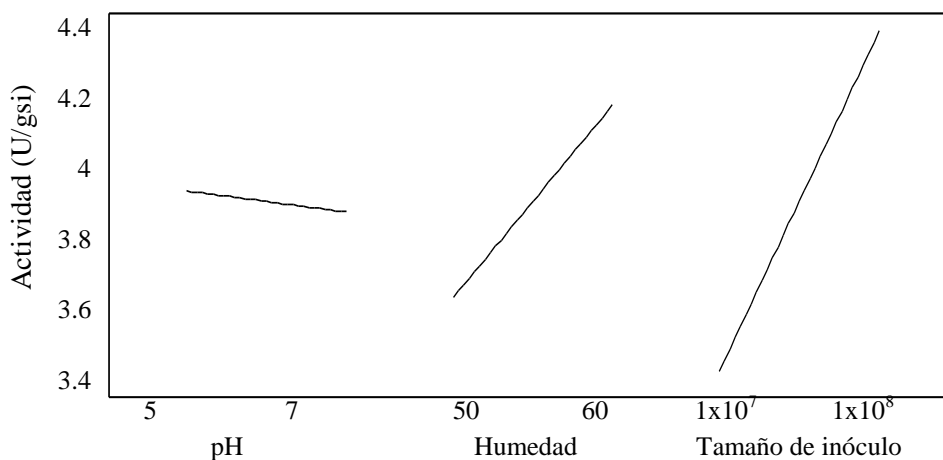


Figura 8.25 Efectos principales para actividad lipasa del diseño 2^3 con punto al centro.

La única interacción significativa fue la de pH-tamaño de inóculo, esto se muestra en la gráfica de interacciones para actividad lipasa (Fig. 8.26). Cuando el pH se encuentra en el

nivel alto (pH de 7), el tamaño de inóculo tiene un efecto considerable sobre la producción de actividad lipasa. Para maximizar la producción de actividad lipasa se utilizaría la combinación pH y tamaño de inóculo en sus niveles altos.

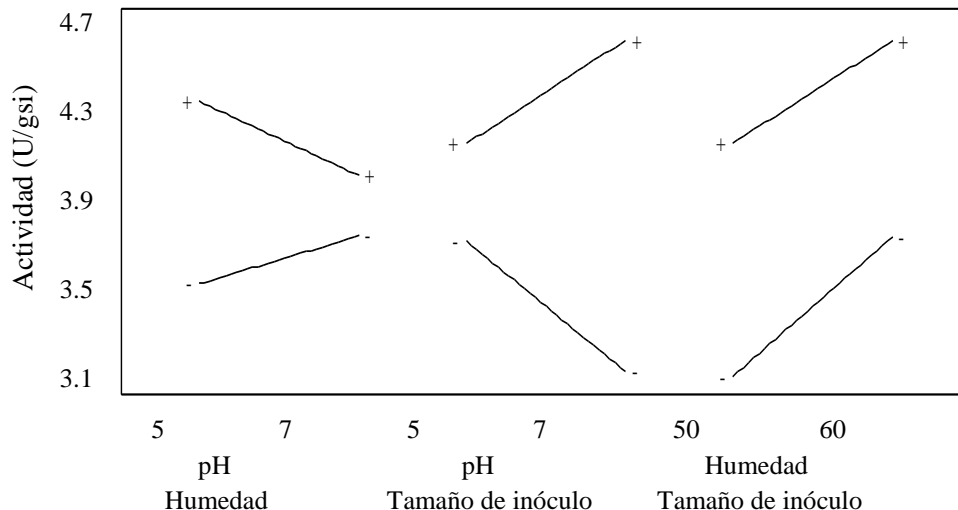


Figura 8.26 Interacciones para actividad lipasa del diseño 2^3 con punto al centro.

Del diseño 2^3 con punto al centro se concluye que los factores humedad y tamaño de inóculo en su nivel alto (60% y 1×10^8 células/mL respectivamente) favorecen la producción de lipasa. Mientras que el factor pH no tuvo un efecto significativo.

El tamaño de inóculo de 1×10^8 células/mL además de favorecer la producción de lipasa disminuye la contaminación. Por lo tanto, se decide emplear este tamaño de inóculo para los estudios posteriores.

Los otros factores, pH y humedad, se evaluarán en los posteriores diseños para conocer su efecto en interacción con la concentración de los componentes del medio de cultivo basal.

8.4.3.2 Diseño factorial fraccionado 2^{12-8}

Se comenzaron los estudios de optimización de la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* en FMS con la etapa de cribado. Para ello se empleó un diseño de primer orden del tipo factorial fraccionado 2^{k-p} . Se emplean este tipo de diseños cuando interesa estudiar muchos factores ya que reduce de manera importante el número de tratamientos experimentales, pero que al mismo tiempo se pierda el mínimo de información valiosa. En los cuales se elige adecuadamente una parte o fracción de los tratamientos de un factorial completo. Se emplean dos niveles de cada factor debido a que en esta etapa solo interesa detectar el efecto principal de cada factor (Gutiérrez-Pulido y De la Vara-Salazar 2008). En

esta etapa se determinará la significancia estadística del efecto de los factores seleccionados sobre la producción de lipasa.

Se evaluaron doce factores, diez corresponden a la evaluación de las concentraciones de los componentes del medio de cultivo basal, englobando a los oligoelementos en un solo factor. Los otros dos factores corresponden a condiciones de cultivo, pH inicial y humedad.

Como se mencionó previamente, los niveles de los componentes del medio de cultivo basal se establecieron en base al estudio del efecto de diferentes concentraciones del medio de cultivo basal sobre la producción de lipasa (sección 8.4.2). A partir de ese estudio se seleccionó el medio 2X como el nivel bajo y el 6X como el nivel alto. Aunque finalmente se hicieron ajustes de los niveles elegidos, se aumentó la concentración del nivel bajo (2X) de manera que los rangos de los niveles estuvieran proporcionados.

Los factores y los niveles empleados son los mostrados en la Tabla 8.6. Como se mencionó previamente en estos estudios la base de cálculo es un gramo de soporte inerte. Estos doce factores se evaluaron en un diseño 2^{12-8} . A continuación se describe el diseño empleado:

Diseño: factorial fraccionado 2^{12-8}

Variable de respuesta: actividad lipasa (U/g_{si})

Factores: 12 (Tabla 8.6)

Niveles: 2 (Tabla 8.6)

Tratamientos: 16

Resolución: III

Por duplicado

En la Tabla 8.7 y Fig. 8.27 se muestran los valores de actividad lipasa obtenidos para cada tratamiento. En la Tabla 8.7 en la columna de oligoelementos no se desglosan las concentraciones de todos los oligoelementos solo se muestra el nivel, para conocer la concentración de estos conforme al nivel se puede observar la Tabla 8.6. De los resultados de actividad lipasa obtenidos podemos observar que hay grandes diferencias de actividad lipasa entre determinados tratamientos. Los tratamientos con los niveles más bajos de actividad tenían alrededor de 5 U/g_{si} y los niveles más altos tenían valores que oscilaban por arriba de las 25 U/g_{si}.

Tabla 8.6 Factores y niveles empleados en el diseño factorial saturado 2^{12-8} .

Factores		Niveles	
		-1	+1
1. Glucosa	mg glucosa/g _{si}	100	200
2. Aceite de girasol	mg aceite de girasol/g _{si}	50	100
3. Urea	mg urea/g _{si}	10	20
4. Extracto de levadura	mg e. levadura/g _{si}	2.5	5
5. KH ₂ PO ₄	mg KH ₂ PO ₄ /g _{si}	5.0	10
6. MgSO ₄ ·7H ₂ O	mg MgSO ₄ ·7H ₂ O /g _{si}	2.5	5
7. CaCl ₂	mg CaCl ₂ /g _{si}	0.5	1
8. NaCl	mg NaCl /g _{si}	0.5	1
9. Polivinilalcohol	mg polivinilalcohol /g _{si}	4.5	9
10. Oligoelementos			
H ₃ BO ₃	μg H ₃ BO ₃ /g _{si}	2.5	5
CuSO ₄ ·5H ₂ O	μg CuSO ₄ ·5H ₂ O/g _{si}	0.2	0.4
KI	μg KI/g _{si}	0.5	1
FeCl ₃ ·4H ₂ O	μg FeCl ₃ ·4H ₂ O /g _{si}	1.0	2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	μg ZnSO ₄ ·7H ₂ O /g _{si}	2.0	4
MnSO ₄ ·H ₂ O	μg MnSO ₄ ·H ₂ O /g _{si}	2.0	4
11. pH		5.5	6.5
12. Humedad	g agua/g _{si}	1.5	2

Medio de cultivo

Condiciones de cultivo

Tabla 8.7 Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño factorial fraccionado 2¹²⁻⁸.

Tratamiento	Glucosa mg/gsi	Aceite de girasol mg/gsi	Urea mg/gsi	E. levadura mg/gsi	KH₂PO₄ mg/gsi	MgSO₄·7H₂O mg/gsi	CaCl₂ mg/gsi	NaCl mg/gsi	PVA mg/gsi	Oligoelementos µg/gsi	pH	Agua g/gsi	Actividad U/gsi
1	100	50	10	2.5	10	5	1	1	9	1	5.5	1.5	28.0 ± 1.2
2	200	50	10	2.5	5	2.5	0.5	1	9	1	6.5	2	22.5 ± 0.1
3	100	100	10	2.5	5	5	1	0.5	4.5	1	6.5	2	18.6 ± 1.1
4	200	100	10	2.5	10	2.5	0.5	0.5	4.5	1	5.5	1.5	18.3 ± 0.5
5	100	50	20	2.5	10	2.5	1	0.5	9	-1	6.5	1.5	5.0 ± 0.8
6	200	50	20	2.5	5	5	0.5	0.5	9	-1	5.5	2	18.0 ± 1.3
7	100	100	20	2.5	5	2.5	1	1	4.5	-1	5.5	2	5.7 ± 0.5
8	200	100	20	2.5	10	5	0.5	1	4.5	-1	6.5	1.5	15.7 ± 0.8
9	100	50	10	5	10	5	0.5	1	4.5	-1	5.5	2	31.2 ± 0.6
10	200	50	10	5	5	2.5	1	1	4.5	-1	6.5	1.5	26.0 ± 0.5
11	100	100	10	5	5	5	0.5	0.5	9	-1	6.5	1.5	28.2 ± 0.5
12	200	100	10	5	10	2.5	1	0.5	9	-1	5.5	2	21.8 ± 0.1
13	100	50	20	5	10	2.5	0.5	0.5	4.5	1	6.5	2	4.3 ± 0.4
14	200	50	20	5	5	5	1	0.5	4.5	1	5.5	1.5	25.7 ± 1.2
15	100	100	20	5	5	2.5	0.5	1	9	1	5.5	1.5	7.2 ± 1.1
16	200	100	20	5	10	5	1	1	9	1	6.5	2	18.0 ± 1.1

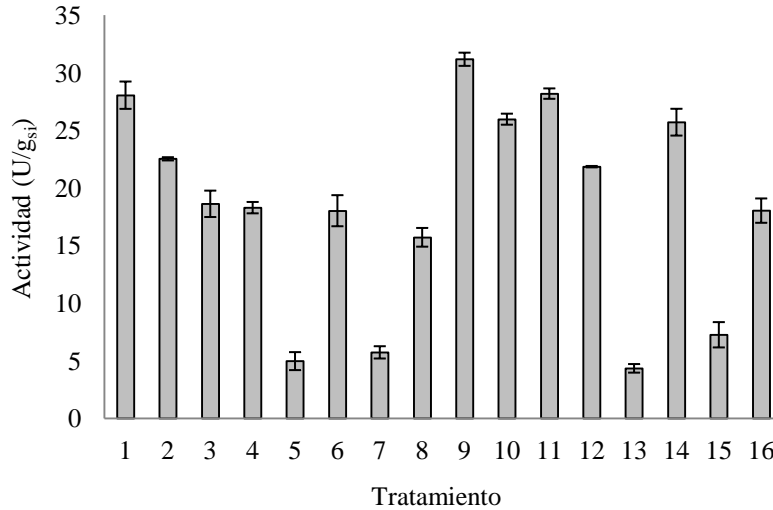


Figura 8.27 Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño factorial fraccionado 2^{12-8} .

De la gráfica de Pareto estandarizada para actividad lipasa (Fig. 8.28) se observa que ocho de los doce factores resultaron significativos en la producción de lipasa. Siendo urea, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, glucosa, extracto de levadura y aceite de girasol los componentes con mayor significancia (valor $P < 0.0000$). Seguidos en significancia fueron pH, NaCl y humedad. Los factores KH_2PO_4 , oligoelementos, polivinilalcohol y $CaCl_2$ no resultaron significativos.

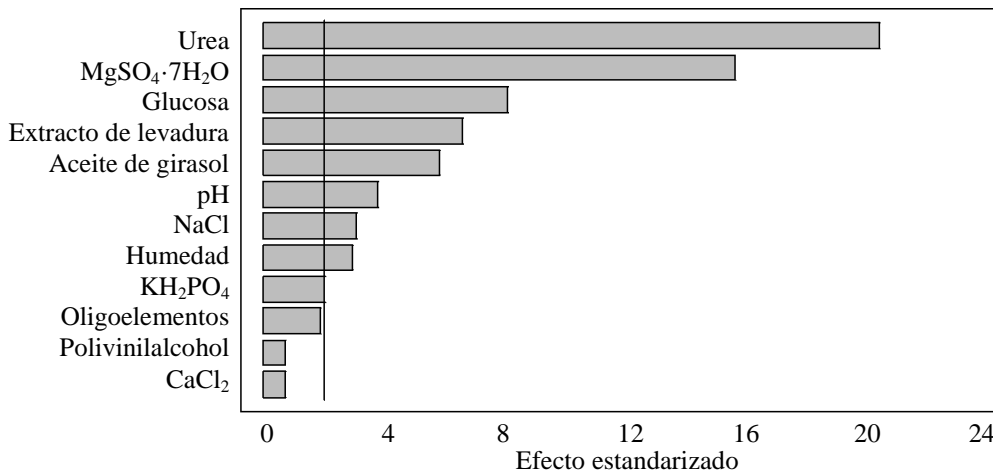


Figura 8.28 Gráfica de Pareto estandarizada para actividad lipasa del diseño 2^{12-8} .

De la gráfica de efectos principales (Fig. 8.29) podemos observar que los factores: aceite de girasol, urea, KH_2PO_4 , oligoelementos, pH y humedad en su nivel bajo favorecen la producción de lipasa. De manera contraria los factores: glucosa, extracto de levadura,

MgSO₄·7H₂O, CaCl₂, NaCl, polivinilalcohol favorecen la producción de lipasa en su nivel alto.

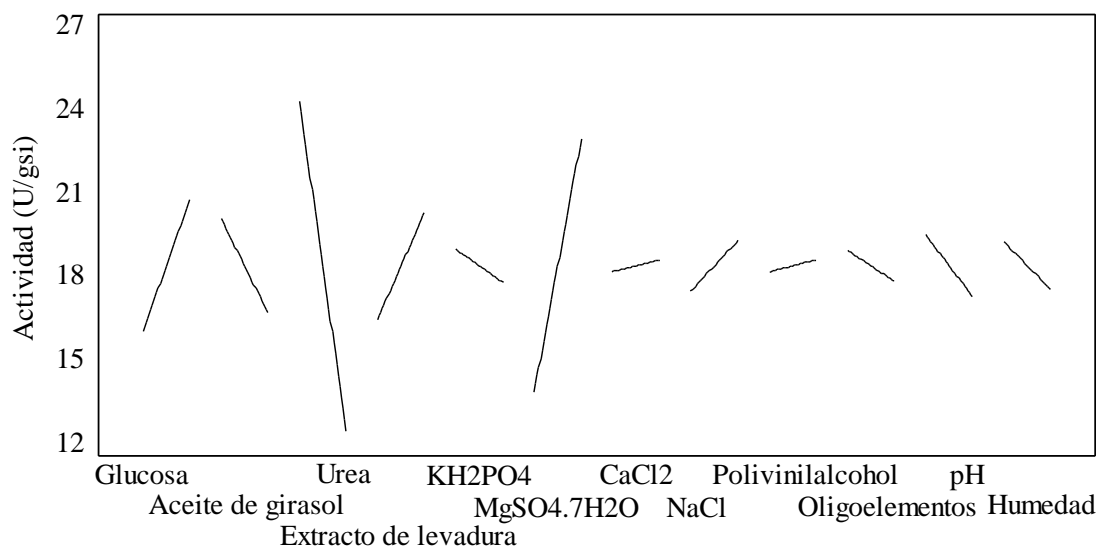


Figura 8.29 Efectos principales para actividad lipasa del diseño 2¹²⁻⁸.

Del ajuste del modelo de primer orden se obtuvo un coeficiente de determinación de 97.86%, esto indica que el modelo ajustado explica el 97.86% de la variabilidad de los resultados de actividad lipasa obtenidos.

Debido a que solo se corrió una fracción del diseño factorial completo el diseño no contaba con suficientes grados de libertad para poder evaluar las interacciones dobles. De cualquier manera en esta etapa solo interesaba conocer el efecto de los factores principales.

A partir de este diseño se seleccionan los factores, urea, MgSO₄·7H₂O, glucosa, extracto de levadura y aceite de girasol, los cuales tienen mayor significancia sobre la producción de lipasa (valor-P <0.0000) para ser evaluados en el siguiente diseño experimental. Se decidió incluir al pH, que sigue a estos factores en significancia; además, el pH contribuye a controlar la contaminación bacteriana a valores de pH ácidos.

Para seleccionar los niveles de los factores seleccionados que se emplearon en el siguiente diseño, se utilizó la información obtenido de la gráfica de efectos principales (Fig. 8.29). Los factores que favorecían la producción de lipasa en su nivel bajo (aceite de girasol, urea y pH) se seleccionó este nivel bajo como el nuevo punto central del nuevo diseño. En base al punto central se seleccionaron los nuevos niveles altos y bajos conservando la misma amplitud de los

niveles de cada factor de este diseño. Los que favorecían la producción de lipasa en su nivel alto (glucosa, extracto de levadura y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) se seleccionó este nivel alto como el nuevo punto central del nuevo diseño. De la misma manera, en base al nuevo punto central se seleccionaron los nuevos niveles altos y bajos conservando la misma amplitud del nivel de cada uno de estos factores evaluados en este diseño. Los niveles seleccionados para los componentes a evaluar en el siguiente diseño se muestran en la Tabla 8.8.

Los factores que no tuvieron un efecto significativo sobre la producción de lipasa (KH_2PO_4 , oligoelementos, polivinilalcohol y CaCl_2) además de NaCl y humedad se fijaron en el nivel que favorecía la producción de lipasa empleando la gráfica de efectos principales.

Los factores y niveles seleccionados fueron evaluados en el siguiente diseño experimental que se describe a continuación.

8.4.3.3 Diseño factorial fraccionado 2^{6-2}

De la etapa de cribado se continuó con la etapa I o de búsqueda de primer orden. Se volvió a emplear un diseño factorial fraccionado debido a que el número de factores seguía siendo grande como para evaluar un diseño factorial completo. Se incluyó un punto al centro para detectar la posible presencia de curvatura o falta de ajuste del modelo. Incluir las repeticiones al centro también proporciona más grados de libertad para el error aleatorio.

Se evaluó el efecto de los seis factores seleccionados en el diseño anterior. En la Tabla 8.8 se muestran los factores y niveles seleccionados para este diseño, en esa misma tabla se muestra en negritas la concentración de los factores que se fijaron a partir del diseño anterior. A continuación se describen algunas características del diseño:

Diseño: factorial fraccionado 2^{6-2}

Variable de respuesta: actividad lipasa (U/g_{si})

Factores: 6 (Tabla 8.8)

Niveles: 2 y un punto al centro (Tabla 8.8)

Tratamientos: 17 incluyendo un punto al centro

Resolución: IV

Por duplicado

Tabla 8.8 Factores y niveles empleados en el diseño factorial saturado 2^{6-2} .

Factores		Niveles		
		-1	0	+1
1. Glucosa	mg glucosa/g _{si}	150	200	250
2. Aceite de girasol	mg aceite de girasol/g _{si}	25	50	75
3. Urea	mg urea/g _{si}	5	10	15
4. Extracto de levadura	mg e. levadura/g _{si}	3.75	5	6.25
5. KH ₂ PO ₄	mg KH ₂ PO ₄ /g _{si}	5.0		
6. MgSO ₄ ·7H ₂ O	mg MgSO ₄ ·7H ₂ O /g _{si}	3.75	5	6.25
7. CaCl ₂	mg CaCl ₂ /g _{si}	0.5		
8. NaCl	mg NaCl /g _{si}	1		
9. Polivinilalcohol	mg polivinilalcohol /g _{si}	4.5		
10. Oligoelementos				
H ₃ BO ₃	µg H ₃ BO ₃ /g _{si}	2.5		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	µg CuSO ₄ ·5H ₂ O/g _{si}	0.2		
KI	µg KI/g _{si}	0.5		
FeCl ₃ ·4H ₂ O	µg FeCl ₃ ·4H ₂ O /g _{si}	1.0		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	µg ZnSO ₄ ·7H ₂ O /g _{si}	2.0		
MnSO ₄ ·H ₂ O	µg MnSO ₄ ·H ₂ O /g _{si}	2.0		
11. pH		5.0	5.5	6.0
12. Humedad	g agua/g _{si}	1.5		

En la Tabla 8.9 y Fig. 8.30 se muestran los resultados de actividad lipasa para cada tratamiento. De igual manera que en el diseño anterior existen grandes diferencias en los niveles de actividad de un tratamiento a otro.

Tabla 8.9 Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño factorial fraccionado 2^{6-2} .

Tratamiento	Glucosa mg/gsi	Aceite de girasol mg/gsi	Urea mg/gsi	E. levadura mg/gsi	MgSO4·7H2O mg/gsi	pH	Actividad Ug/gsi
1	150	25	5	3.75	3.75	5	18.5 ± 0.5
2	250	25	5	3.75	6.25	5	15.8 ± 0.9
3	150	75	5	3.75	6.25	6	24.6 ± 1.0
4	250	75	5	3.75	3.75	6	14.4 ± 0.1
5	150	25	15	3.75	6.25	6	35.4 ± 0.8
6	250	25	15	3.75	3.75	6	32.1 ± 0.7
7	150	75	15	3.75	3.75	5	33.0 ± 0.2
8	250	75	15	3.75	6.25	5	29.0 ± 1.6
9	200	50	10	5.00	5.00	5.5	23.7 ± 0.5
10	150	25	5	6.25	3.75	6	22.6 ± 0.2
11	250	25	5	6.25	6.25	6	15.0 ± 1.3
12	150	75	5	6.25	6.25	5	12.0 ± 0.9
13	250	75	5	6.25	3.75	5	9.0 ± 0.4
14	150	25	15	6.25	6.25	5	32.5 ± 4.1
15	250	25	15	6.25	3.75	5	33.4 ± 0.9
16	150	75	15	6.25	3.75	6	36.0 ± 1.3
17	250	75	15	6.25	6.25	6	27.6 ± 0.8

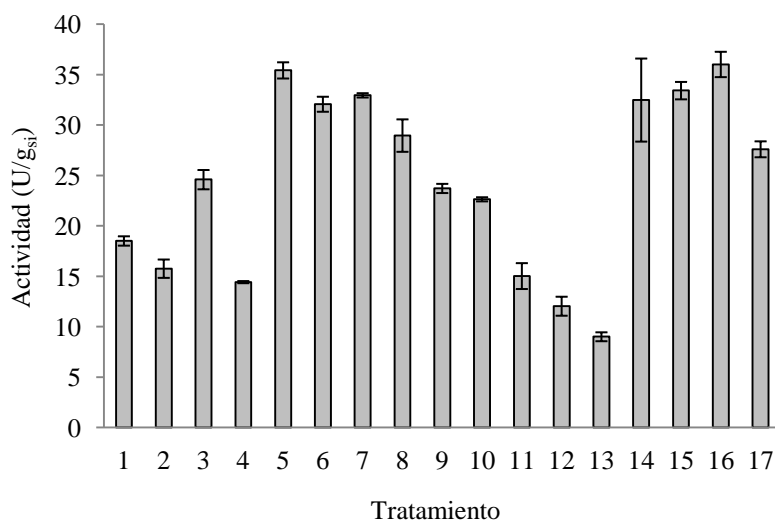


Figura 8.30 Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño factorial fraccionado 2^{6-2} .

Al realizar el análisis del diseño, en la gráfica de Pareto estandarizada para actividad lipasa (Fig. 8.31) podemos observar que cinco de los seis factores evaluados resultaron significativos en la producción de lipasa. Siendo los factores urea, glucosa y pH los que tuvieron mayor significancia (valor- $P < 0.0000$). Seguidos en significancia fueron aceite de girasol y extracto de levadura. El factor $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ no resultó significativo en este diseño.

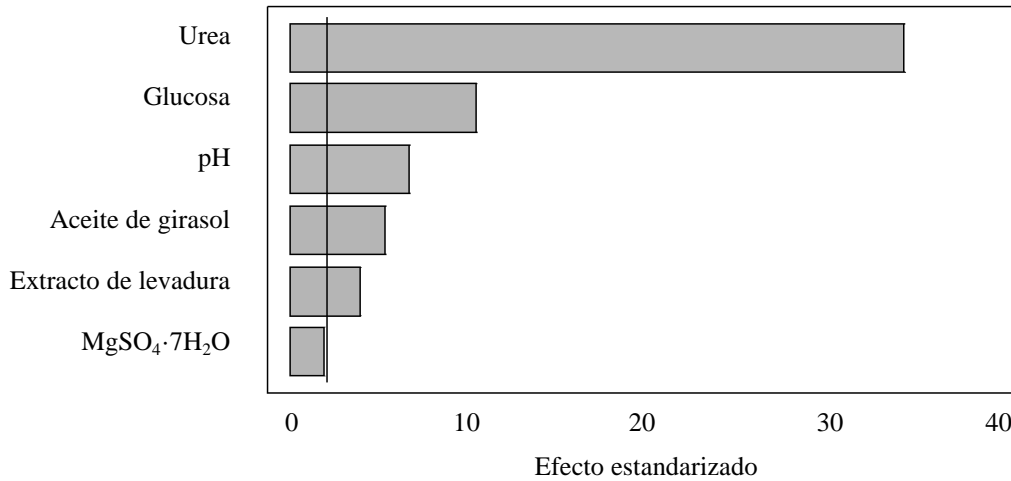


Figura 8.31 Gráfica de Pareto estandarizada para actividad lipasa del diseño 2^{6-2} .

De la grafica de efectos principales (Fig. 8.32) podemos observar que los factores: glucosa, aceite de girasol, extracto de levadura y $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ favorecen la producción de lipasa en su nivel bajo. De manera contraria los factores urea y pH en sus niveles altos favorecen la producción de lipasa.

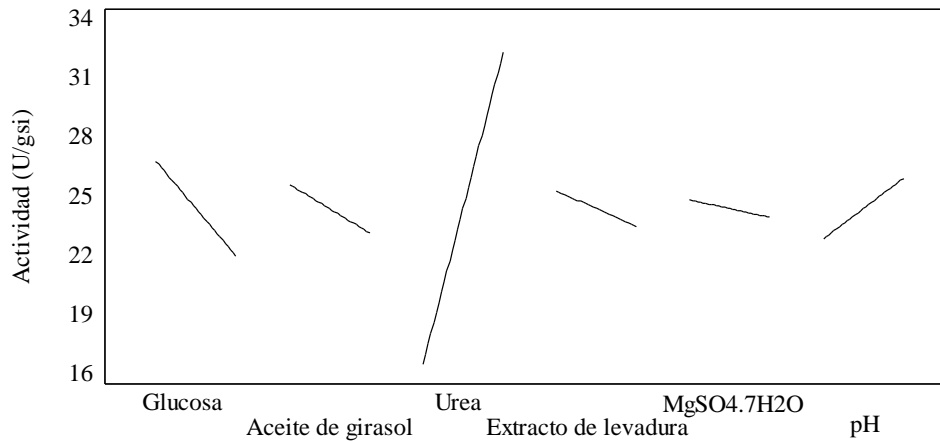


Figura 8.32 Efectos principales para actividad lipasa del diseño 2^{6-2} .

Del ajuste del modelo de primer orden se obtuvo un coeficiente de determinación de 92.71%, esto indica que el modelo ajustado explica el 92.71% de la variabilidad de los resultados de actividad lipasa obtenidos.

Debido a que solo se corrió una fracción del diseño factorial completo el diseño no contaba con suficientes grados de libertad para poder evaluar las interacciones dobles. El punto al centro que se incluyó solo permitió evaluar la presencia de curvatura o falta de ajuste del modelo.

Dado que el valor-P para la falta de ajuste, que se muestra en la tabla del análisis de varianza (Tabla 12.15), es menor que 0.05, existe una falta de ajuste estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95.0%. Esto indica que existe curvatura en alguno de los factores evaluados. Justificación del porque se decide emplear a continuación un diseño de segundo orden.

Para seleccionar los factores que se estudiaron en el siguiente diseño se consideró que los factores urea, glucosa y pH son los que tuvieron mayor significancia (valor- $P < 0.0000$). Seleccionando a partir del criterio de significancia solo los factores urea y glucosa. Se decide fijar el pH en su nivel bajo. A pesar de que el pH resultó ser significativo, y de la gráfica de efectos principales se indica que el pH en su valor alto ($pH=6$) favorece la producción de lipasa, se decide fijar este factor en su nivel bajo y no seguir su evaluación. Ya que de antemano sabemos que se busca emplear valores de pH ácidos para favorecer una disminución de la contaminación bacteriana y por consiguiente evitar la esterilización, ya que la esterilización a nivel producción implica mayores costos.

El factor que seguía en significancia era el aceite de girasol. El aceite de girasol es un factor importante a seguir evaluando ya que es inductor de la producción de lipasa. A pesar de que también resultó significativo el extracto de levadura, el peso de este factor en la producción de lipasa es menor que el del aceite de girasol y debido a que se decidió evaluar un diseño de segundo orden solo se evaluaron tres factores, más factores significaría demasiados tratamientos. Razón por la cual se decide fijar el extracto de levadura para el siguiente diseño, se fija en su nivel bajo ya que favorece la producción de lipasa. Por lo tanto los factores que se decidieron seguir evaluando fueron urea, glucosa y aceite de girasol.

A partir de este diseño el procedimiento para el establecimiento de los niveles fue diferente. El procedimiento seguido es el que se describe a continuación. Se partió de la gráfica de efectos principales del análisis de los diseños. De esta gráfica, para cada factor se tomó el valor de actividad en su nivel bajo y alto y se normalizaron, tomando el valor máximo de actividad de ese diseño como el 100%. Posteriormente se graficaron los valores de actividad lipasa normalizados en función del nivel alto y bajo de cada factor, esto se muestra en las Fig. 8.33A-C. Las rectas graficadas en las Fig. 8.33A-C se obtuvieron de los diseños factorial fraccionado 2^{12-8} y factorial fraccionado 2^{6-2} .

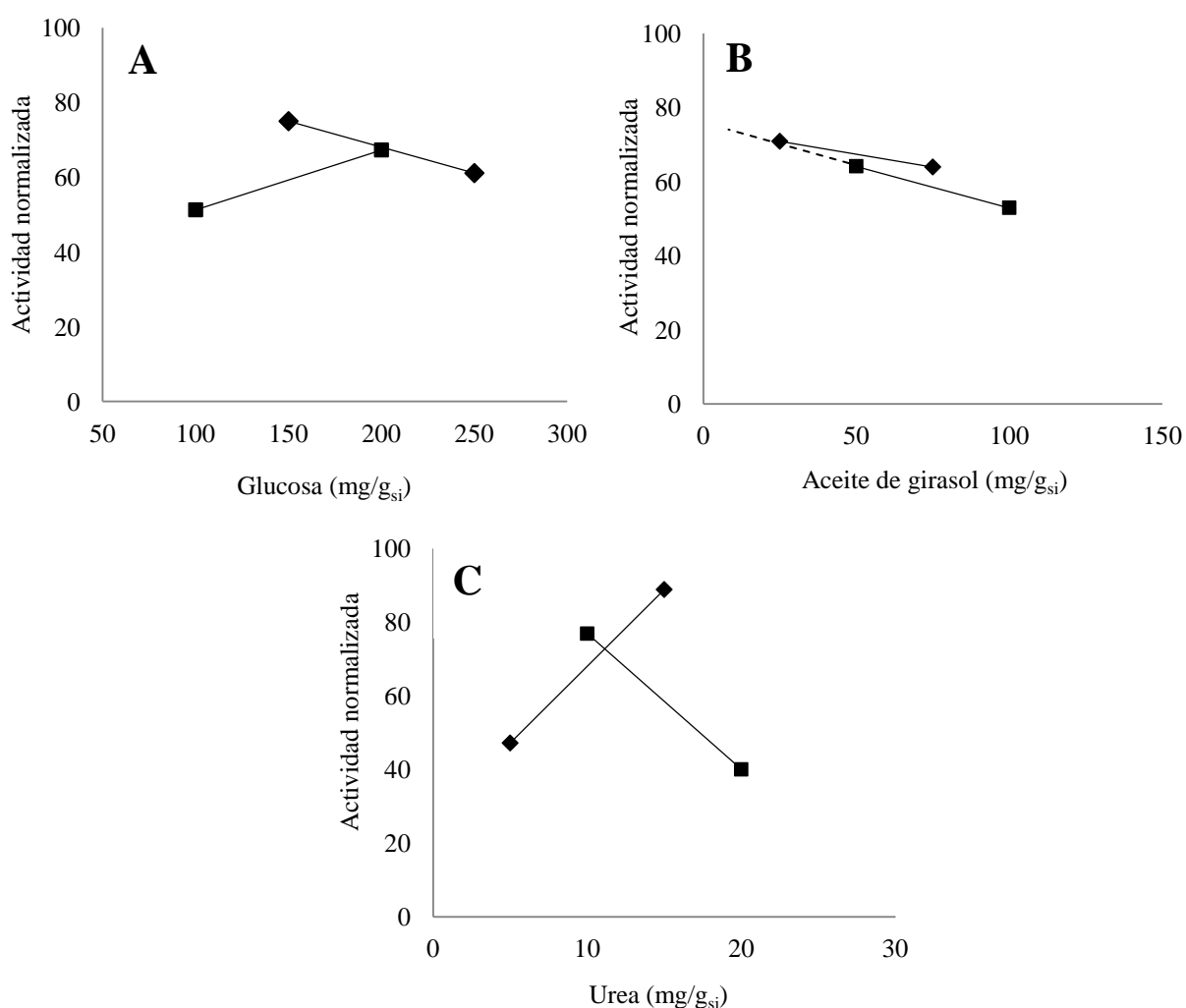


Figura 8.33 Efectos principales para actividad lipasa normalizada de los factores: (A) glucosa, (B) aceite de girasol y (C) urea. Diseños: factorial fraccionado 2^{12-8} (■), factorial fraccionado 2^{6-2} (◆).

A partir de la Fig. 8.33A-C podemos observar que para los factores urea y glucosa hay una intersección de las rectas. Las rectas del diseño factorial fraccionado 2^{12-8} para ambos factores nos indica que debemos aumentar la concentración de estos para favorecer la producción de lipasa. De manera contraria las rectas del diseño factorial fraccionado 2^{6-2} para estos dos factores tienen pendientes negativas indicando que disminuir la concentración de estos factores favorece la producción de lipasa. La intersección de estas dos rectas puede indicar un óptimo, razón por la cual se decide establecer los niveles para el siguiente diseño de manera que abarque dicha intersección. Fijando el punto central un valor cercano a la intersección. Para el factor aceite de girasol no se logra apreciar una intersección pero sí se amplía la recta del diseño factorial fraccionado 2^{12-8} se logra una intersección. De la misma manera que los otros dos factores, para la selección de los niveles de este factor para el siguiente diseño, se elige un rango que abarque esta intersección y el punto central un valor cercano a la intersección.

Los niveles seleccionados para los factores glucosa, aceite de girasol y urea se muestran en la Tabla 8.10 del siguiente diseño, un diseño Box-Behnken.

8.4.3.4 Diseño Box-Behnken

Se evaluaron los factores concentración de glucosa, aceite de girasol y urea empleando un diseño de segundo orden. Los diseños de segundo orden son los que permiten ajustar un modelo de segundo orden para así estudiar, además de los efectos lineales y de interacción, los efectos cuadráticos o de curvatura pura (Gutiérrez-Pulido y De la Vara-Salazar 2008).

El diseño de segundo orden elegido para esta etapa es el diseño Box-Behnken. El diseño Box-Behnken se aplica cuando se tienen tres o más factores y se distingue porque no incluye como tratamientos a los vértices de la región experimental (Gutiérrez-Pulido y De la Vara-Salazar 2008).

En la Tabla 8.10 se muestran los factores y niveles seleccionados para este diseño, en esa misma tabla se muestra en negritas la concentración de los factores que se fijaron a partir de los diseños anteriores. A continuación se describen algunas características del diseño:

Diseño: Box-Behnken

Variable de respuesta: actividad lipasa (U/g_{si})

Factores: 3 (Tabla 8.10)

Niveles: 3 (Tabla 8.10)

Tratamientos: 15

Por duplicado

Tabla 8.10 Factores y niveles empleados en el diseño Box Behnken.

Factores	Unidad	Niveles		
		-1	0	+1
1. Glucosa	mg glucosa/g _{si}	140	180	220
2. Aceite de girasol	mg aceite de girasol/g _{si}	15	20	25
3. Urea	mg urea/g _{si}	8	12	16
4. Extracto de levadura	mg e. levadura/g _{si}	3.75		
5. KH ₂ PO ₄	mg KH ₂ PO ₄ /g _{si}	5.0		
6. MgSO ₄ ·7H ₂ O	mg MgSO ₄ ·7H ₂ O /g _{si}	3.75		
7. CaCl ₂	mg CaCl ₂ /g _{si}	0.5		
8. NaCl	mg NaCl /g _{si}	1		
9. Polivinilalcohol	mg polivinilalcohol /g _{si}	4.5		
10. Oligoelementos				
H ₃ BO ₃	µg H ₃ BO ₃ /g _{si}	2.5		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	µg CuSO ₄ ·5H ₂ O/g _{si}	0.2		
KI	µg KI/g _{si}	0.5		
FeCl ₃ ·4H ₂ O	µg FeCl ₃ ·4H ₂ O /g _{si}	1.0		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	µg ZnSO ₄ ·7H ₂ O /g _{si}	2.0		
MnSO ₄ ·H ₂ O	µg MnSO ₄ ·H ₂ O /g _{si}	2.0		
11. pH		5.0		
12. Humedad	g agua/g _{si}	1.5		

En la Tabla 8.11 y en la Fig. 8.34 se muestran los resultados de actividad lipasa obtenidos para cada tratamiento. Podemos observar que las diferencias entre los valores de actividad de los tratamientos son menores a los de los diseños anteriores. Los valores más bajos de actividad oscilaban alrededor de 15 U/g_{si} y los niveles más altos alrededor de 40 U/g_{si}.

Tabla 8.11 Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño Box-Behnken.

Tratamiento	Glucosa mg/gsi	Aceite de girasol mg/gsi	Urea mg/gsi	Actividad U/gsi
1	180	20	12	29.9 ± 0.8
2	140	15	12	36.0 ± 0.3
3	220	15	12	27.6 ± 1.1
4	140	25	12	41.2 ± 1.5
5	220	25	12	30.0 ± 1.1
6	140	20	8	32.1 ± 1.2
7	220	20	8	24.7 ± 0.4
8	180	20	12	31.9 ± 0.9
9	140	20	16	15.4 ± 3.1
10	220	20	16	20.7 ± 1.9
11	180	15	8	14.6 ± 2.1
12	180	25	8	22.7 ± 0.2
13	180	15	16	34.6 ± 0.3
14	180	25	16	37.0 ± 1.2
15	180	20	12	34.9 ± 1.7

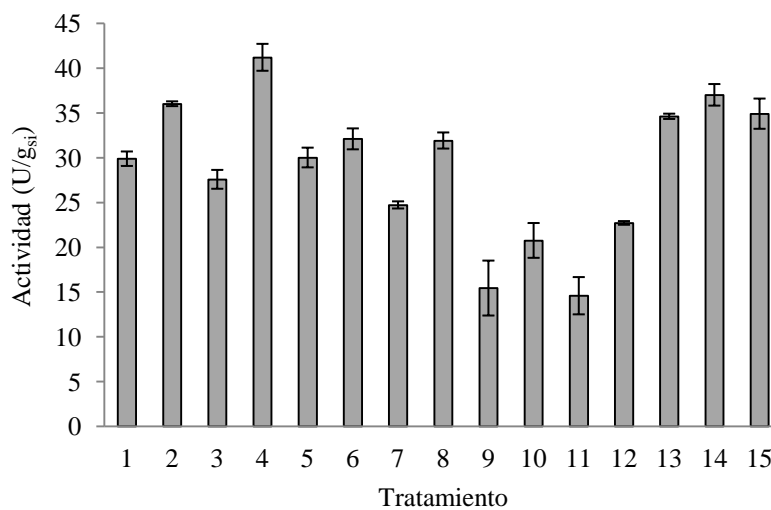


Figura 8.34 Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño Box-Behnken.

Al realizar el análisis del diseño, en la gráfica de Pareto estandarizada para actividad lipasa (Fig. 8.35) podemos observar que solo el efecto cuadrático de urea es significativo, tiene un valor-P de 0.0051, menor que el nivel de significancia (α) de 0.05.

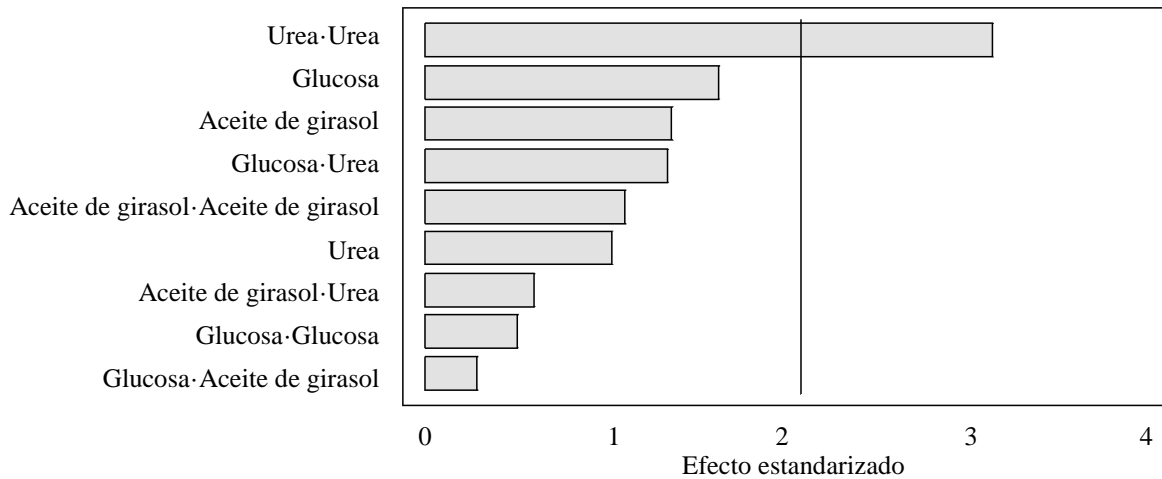


Figura 8.35 Gráfica de Pareto estandarizada para actividad lipasa del diseño Box-Behnken.

De la grafica de efectos principales (Fig. 8.36) podemos observar que se encontró el máximo del factor urea. Para el factor aceite de girasol se encontró un mínimo. En el caso del factor glucosa en su nivel bajo se favorece la producción de lipasa.

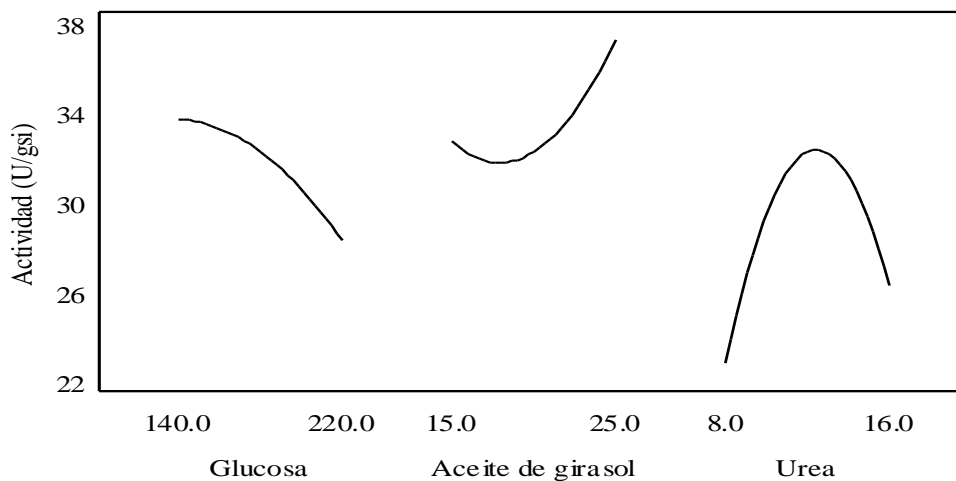


Figura 8.36 Efectos principales para actividad lipasa del diseño Box-Behnken.

En la Fig. 8.37 se muestra la superficie de respuesta estimada, la cual se ajustó a partir del modelo de segundo orden (Anexo 12.5). Están graficados los factores glucosa y urea, el factor aceite de girasol se fijó en el nivel alto (25 mg/g_{si}) ya que favorecía la producción de lipasa. El coeficiente de determinación de este modelo es de 49.62%, un valor muy bajo comparado con los obtenidos en los diseños anteriores. Por lo tanto el modelo solo explica el 49.62% de la variabilidad de los resultados de actividad lipasa.

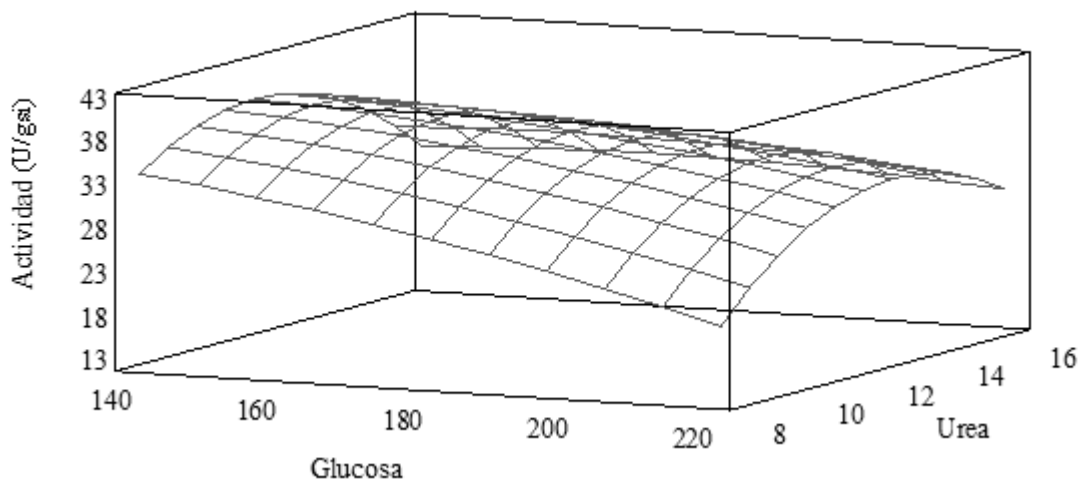


Figura 8.37 Superficie de respuesta estimada del diseño Box-Behnken. Aceite de girasol = 25mg/g_{si}.

El valor máximo de actividad lipasa obtenido con este diseño es de 39.64 U/g_{si}. La combinación de los niveles con los cuales se obtiene el valor máximo es: glucosa 140 mg/g_{si}, aceite de girasol 25 mg/g_{si} y urea 11.26 mg/g_{si}.

Al momento de realizar el análisis de este diseño en el trabajo experimental hubo una equivocación, se invirtieron los factores urea y aceite de girasol al momento de trabajar con el paquete estadístico, STATGRAPHICS® Plus (versión 4.0, 1999). Razón por la cual de manera equivocada en el desarrollo del trabajo experimental se creyó que en este diseño se había encontrado el óptimo del aceite de girasol en lugar del de la urea. Los diseños experimentales posteriores están bien realizados pero se debe tener en mente que se fijó el aceite de girasol a una concentración que no era la óptima (19 mg/g_{si}), incluso era la concentración cercana a un mínimo. Y que se prosiguió a buscar el óptimo de la urea el cual ya había sido encontrado en este diseño.

El valor-P del factor glucosa era el que le seguía al efecto cuadrático de urea aunque no resultó significativo. Razón por la cual se decidió evaluar en un siguiente diseño de segundo orden los factores concentración de urea y glucosa.

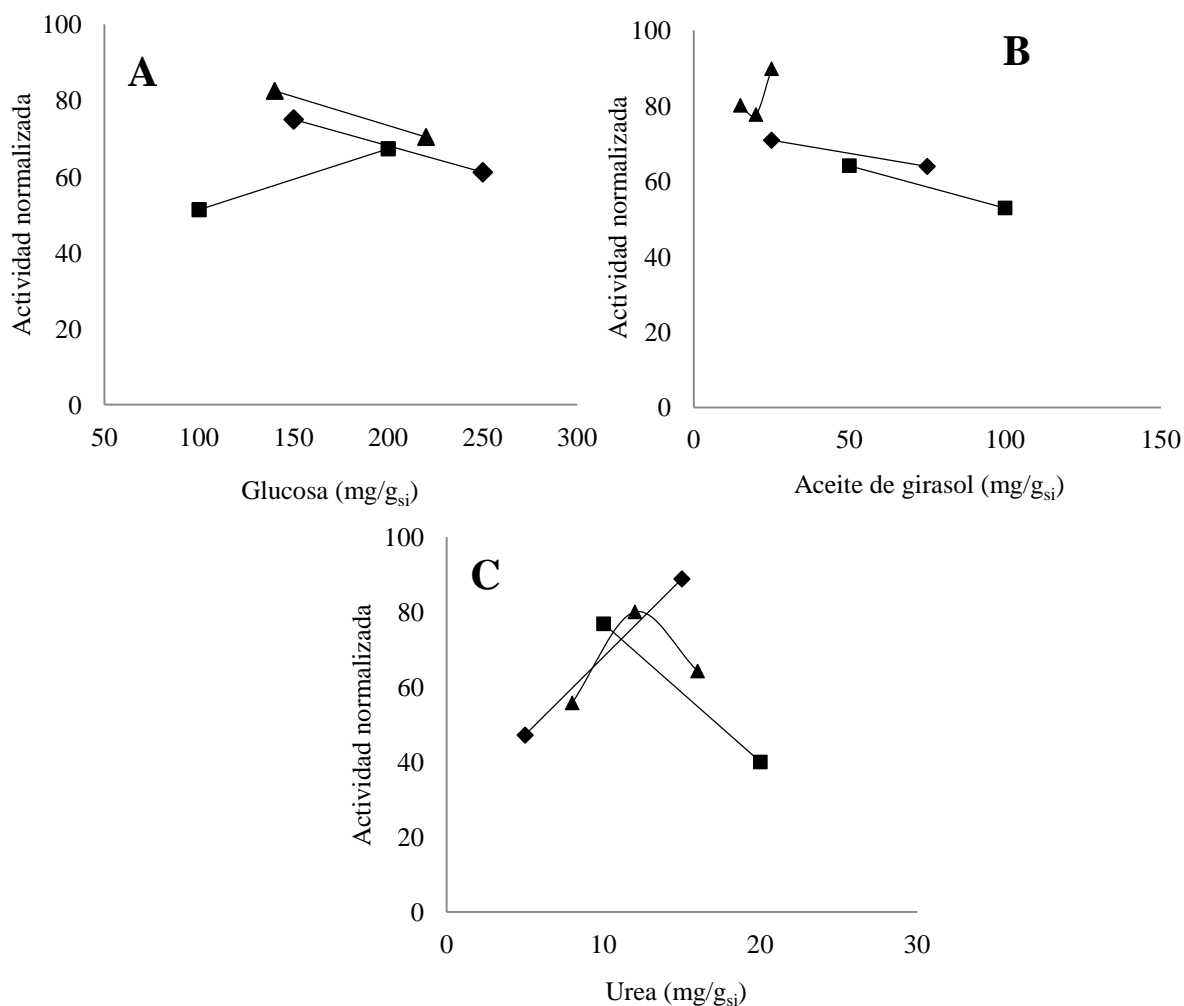


Figura 8.38 Efectos principales para actividad lipasa normalizada de los factores: (A) glucosa, (B) aceite de girasol y (C) urea. Diseños: factorial fraccionado 2¹²⁻⁸ (■), factorial fraccionado 2⁶⁻² (◆), Box-Behnken (▲).

Para establecer los niveles del siguiente diseño se prosiguió de la misma manera que en el diseño anterior. En la Fig. 8.38A-C podemos observar la gráfica de efectos principales para la actividad lipasa normalizada de los factores glucosa, aceite de girasol y urea. Las rectas graficadas corresponden a los diseños factorial fraccionado 2¹²⁻⁸, factorial fraccionado 2⁶⁻² y Box-Behnken.

Debido al error cometido, se tenía la idea de que en la gráfica de efectos principales la producción de lipasa era favorecida por un incremento en la concentración de urea. Se consideró entonces que dos de las tres rectas indicaban aumentar la concentración de urea. Razón por la cual se eligieron niveles con concentración de urea desde 14 mg/g_{si} hasta 26 mg/g_{si}. Ahora que se sabe que se había encontrado el óptimo de la urea podemos observar que este si se encontraba muy cercano a la intersección de las rectas de los dos diseños anteriores. Por lo tanto, hasta este diseño esta metodología del establecimiento de los niveles era adecuada.

Para establecer los niveles de glucosa se consideró que dos de las tres rectas de la gráfica de efectos principales para la actividad lipasa normalizada para este factor (Fig. 8.38A) indicaban que se tenía que disminuir la concentración de glucosa para favorecer la producción de lipasa. Por lo tanto se eligieron niveles con concentración de glucosa desde 80 hasta 200 mg/g_{si}.

8.4.3.5 Diseño factorial 4²

Se volvió a emplear un diseño de segundo orden, un diseño factorial 4² para evaluar los factores concentración de glucosa y urea. En la Tabla 8.12 se muestran los factores y niveles seleccionados para este diseño, en esa misma tabla se muestra en negritas la concentración de los factores que se fijaron a partir del diseño anterior. A continuación se describen algunas características del diseño:

Diseño: Factorial 4²

Variable de respuesta: actividad lipasa (U/g_{si})

Factores: 2 (mostrados en la Tabla 8.12)

Niveles: 4 (Tabla 8.12)

Tratamientos: 16 más un control

Por duplicado

A partir de este diseño se incluyó un control (Control-1), el cual tenía las concentraciones del medio de cultivo basal y las condiciones de fermentación empleadas al inicio de este trabajo en las cinéticas de producción de lipasa (sección 8.2). Las condiciones del Control-1 se

muestran en la Tabla 8.12 y este se incluyó para poder verificar que mediante los diseños estadísticos se estuvieran mejorando los niveles de actividad.

Tabla 8.12 Factores y niveles empleados en el diseño factorial 4^2 .

Factores		Niveles				Control-1
	Unidad	-1	-0.3333	0.3333	+1	
1. Glucosa	mg glucosa/g _{si}	80	120	160	200	66.67
2. Aceite de girasol	mg aceite de girasol/g _{si}	19				33.33
3. Urea	mg urea/g _{si}	14	18	22	26	6.67
4. Extracto de levadura	mg e. levadura/g _{si}	3.75				1.67
5. KH ₂ PO ₄	mg KH ₂ PO ₄ /g _{si}	5.0				3.33
6. MgSO ₄ ·7H ₂ O	mg MgSO ₄ ·7H ₂ O /g _{si}	3.75				1.67
7. CaCl ₂	mg CaCl ₂ /g _{si}	0.5				0.33
8. NaCl	mg NaCl /g _{si}	1				0.33
9. Polivinilalcohol	mg polivinilalcohol /g _{si}	4.5				2.78
10. Oligoelementos						
H ₃ BO ₃	µg H ₃ BO ₃ /g _{si}	2.5				1.67
CuSO ₄ ·5H ₂ O	µg CuSO ₄ ·5H ₂ O/g _{si}	0.2				0.13
KI	µg KI/g _{si}	0.5				0.33
FeCl ₃ ·4H ₂ O	µg FeCl ₃ ·4H ₂ O /g _{si}	1.0				0.67
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	µg ZnSO ₄ ·7H ₂ O /g _{si}	2.0				1.33
MnSO ₄ ·H ₂ O	µg MnSO ₄ ·H ₂ O /g _{si}	2.0				1.33
11. pH		5.0				6.2
12. Humedad	g agua/g _{si}	1.5				1.6

En la Tabla 8.13 y en la Fig. 8.39 se muestran los resultados de actividad lipasa obtenidos para cada tratamiento. Podemos observar que existen grandes diferencias entre los valores de actividad de los tratamientos. Los valores más bajos de actividad oscilaban alrededor de 5 U/g_{si} y los niveles más altos alrededor de las 30 U/g_{si}. La actividad lipasa obtenida con el Control-1 era superior a los valores de actividad obtenidos con cualquiera de los tratamientos.

Tabla 8.13 Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño 4². C1:

Control-1.

Tratamiento	Glucosa mg/gsi	Urea mg/gsi	Actividad U/gsi
1	80	14	7.1 ± 0.7
2	120	14	12.3 ± 1.0
3	160	14	33.8 ± 2.6
4	200	14	30.3 ± 0.4
5	80	18	4.3 ± 0.7
6	120	18	5.7 ± 0.6
7	160	18	9.9 ± 0.3
8	200	18	38.0 ± 1.7
9	80	22	4.6 ± 0.5
10	120	22	6.9 ± 0.1
11	160	22	6.7 ± 2.4
12	200	22	12.5 ± 0.5
13	80	26	3.0 ± 0.1
14	120	26	7.0 ± 2.2
15	160	26	6.9 ± 1.7
16	200	26	15.0 ± 0.7
17 ^{C1}	66.67	6.67	43.1 ± 0.1

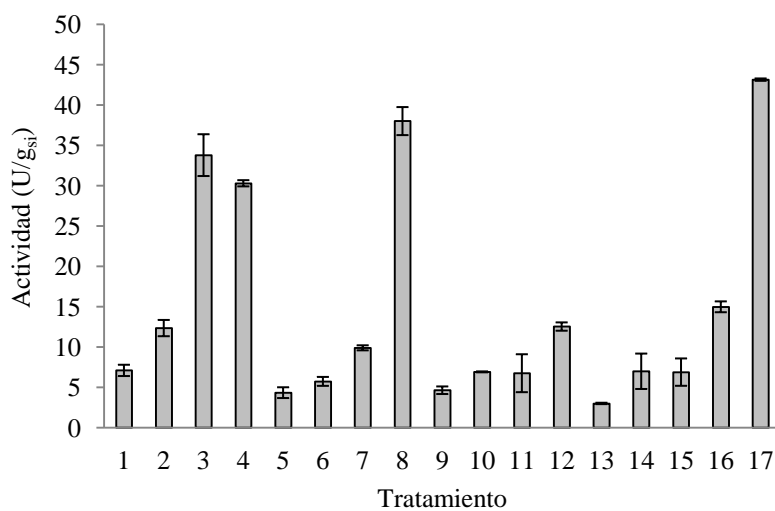


Figura 8.39 Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño 4². El tratamiento 17 corresponde al control-1.

En la gráfica de Pareto estandarizada para actividad lipasa (Fig. 8.40) podemos observar que los factores glucosa y urea son estadísticamente significativos (valor-P < 0.0000) al igual que la interacción de estos (valor-P = 0.0039). El efecto cuadrático de ambos factores no resultó significativo. Esto último lo podemos observar en la gráfica de efectos principales (Fig. 8.41), en la cual no se observa ni un máximo ni un mínimo para ambos factores.

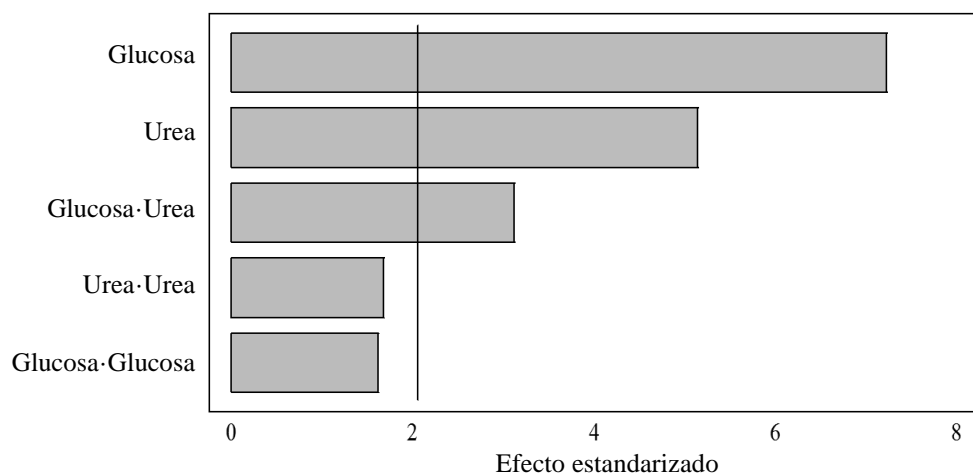


Figura 8.40 Gráfica de Pareto estandarizada para actividad lipasa del diseño factorial 4^2 .

En la gráfica de efectos principales (Fig. 8.41) podemos observar que la glucosa en su nivel alto (200 mg/g_{si}) favorece la producción de lipasa. De manera contraria la urea favorece la producción pero en su nivel bajo (14 mg/g_{si}).

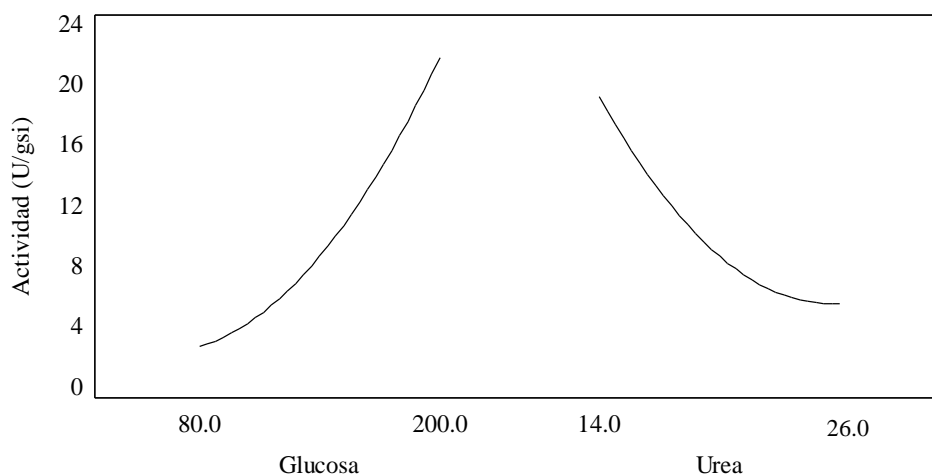


Figura 8.41 Efectos principales para actividad lipasa del diseño 4^2 .

En la Fig. 8.42 se muestra la superficie de respuesta estimada para urea y glucosa. Del modelo de segundo orden ajustado se obtuvo un coeficiente de determinación (R^2) de 78.76%. El coeficiente de determinación obtenido es mayor al del diseño anterior, por lo tanto, el modelo que contempla estos dos factores modela mejor el comportamiento de la producción de lipasa.

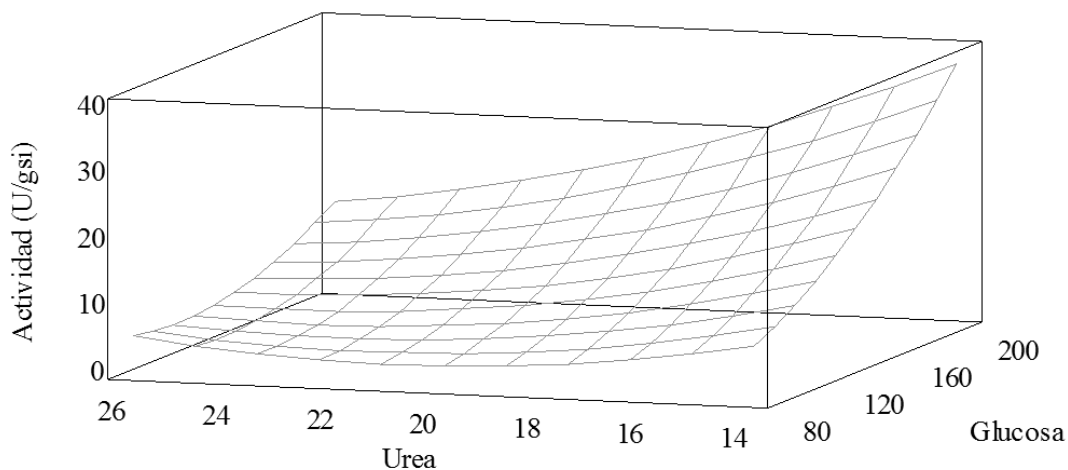


Figura 8.42 Superficie de respuesta estimada del diseño 4^2 .

El valor máximo de actividad lipasa obtenido con este diseño es de 38 U/g_{si}. Empleando las concentraciones de glucosa y urea de 200 mg/g_{si} y 14 mg/g_{si} respectivamente.

Para el establecimiento de los niveles del siguiente diseño se siguió con el mismo procedimiento. En la Fig. 8.43A-B podemos observar la gráfica de efectos principales para la actividad lipasa normalizada de los factores glucosa y urea. Las rectas graficadas corresponden a los diseños factorial fraccionado 2^{12-8} , factorial fraccionado 2^{6-2} , Box-Behnken y factorial 4^2 . Para el factor glucosa (Fig. 8.43A) se fijaron los niveles desde 160 hasta 240 mg/g_{si}, ya que en este rango era en el cual se encontraban las rectas de pendientes con signo contrario, incluyendo la intersección de dos de estas, sugiriendo que en esa zona, alrededor de los 200 mg/g_{si}, se encontraba el óptimo. Con el mismo planteamiento seguido para el factor glucosa se fijaron los niveles de la urea desde 8 hasta 16 mg/g_{si}.

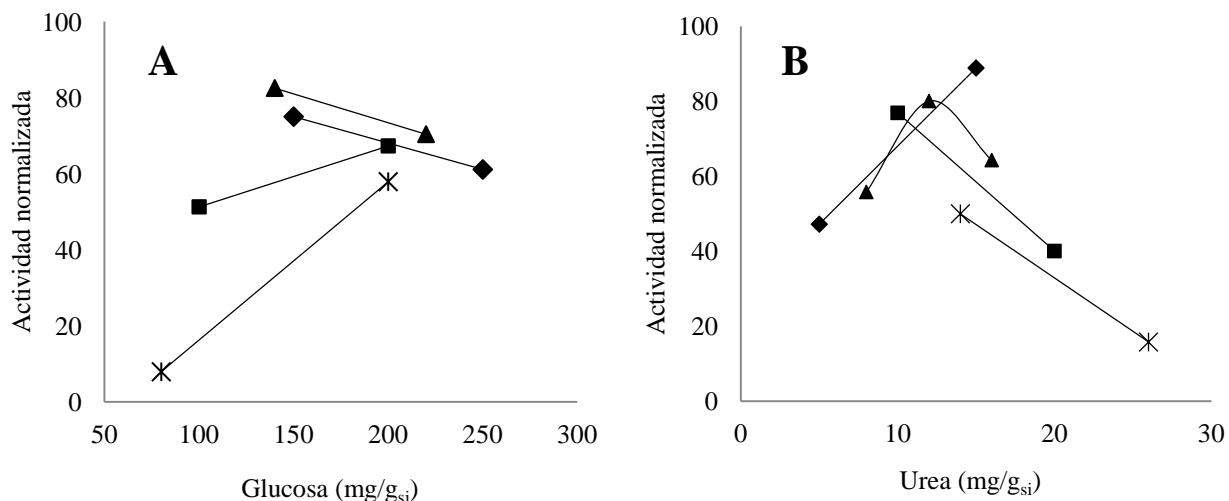


Figura 8.43 Efectos principales para actividad lipasa normalizada de los factores: (A) glucosa y (B) urea. Diseños: factorial fraccionado 2^{12-8} (■), factorial fraccionado 2^{6-2} (◆), Box-Behnken (▲), factorial 4^2 (✱).

Se decidió seguir evaluando los factores glucosa y urea en busca de encontrar un óptimo o mejorar la actividad con respecto al control. Razón por la cual a continuación se realizó otro diseño de segundo orden, en esta ocasión se eligió el diseño factorial 3^2 .

8.4.3.6 Diseño factorial 3^2A

En la Tabla 8.14 se muestran los factores y niveles seleccionados para el diseño factorial 3^2A , en esa misma tabla se muestra en negritas la concentración de los factores que se fijaron a partir de los diseños anteriores. A continuación se describen algunas características del diseño:

Diseño: Factorial 3^2

Variable de respuesta: actividad lipasa (U/g_{si})

Factores: 3 (Tabla 8.14)

Niveles: 3 (Tabla 8.14)

Corridas: 9 mas dos controles

Por duplicado

De antemano se sabe que cuando se fijó el pH de 5 esto nos ayudaba a tener un control bacteriano pero se sacrificaba un poco los niveles de actividad lipasa. Se incluyó un segundo

control (Control-2) para saber que tan en desventaja estaban los tratamientos de los diseños con respecto al Control-1. La única diferencia del Control-2 con respecto al Control-1 es que el valor de pH es el mismo al fijado a partir de los diseños estadísticos (pH 5). Las condiciones del Control-2 se muestran en la Tabla 8.14.

Tabla 8.14 Factores y niveles empleados en el diseño factorial 3²A. C1: Control-1; C2: Control-2.

Factores	Unidad	Niveles			Control-1	Control-2
		-1	0	+1		
1. Glucosa	mg glucosa/g _{si}	160	200	240	66.67	66.67
2. Aceite de girasol	mg aceite de girasol/g _{si}	19			33.33	33.33
3. Urea	mg urea/g _{si}	8	12	16	6.67	6.67
4. Extracto de levadura	mg e. levadura/g _{si}	3.75			1.67	1.67
5. KH ₂ PO ₄	mg KH ₂ PO ₄ /g _{si}	5.0			3.33	3.33
6. MgSO ₄ ·7H ₂ O	mg MgSO ₄ ·7H ₂ O /g _{si}	3.75			1.67	1.67
7. CaCl ₂	mg CaCl ₂ /g _{si}	0.5			0.33	0.33
8. NaCl	mg NaCl /g _{si}	1			0.33	0.33
9. Polivinilalcohol	mg polivinilalcohol /g _{si}	4.5			2.78	2.78
10. Oligoelementos						
H ₃ BO ₃	µg H ₃ BO ₃ /g _{si}	2.5			1.67	1.67
CuSO ₄ ·5H ₂ O	µg CuSO ₄ ·5H ₂ O/g _{si}	0.2			0.13	0.13
KI	µg KI/g _{si}	0.5			0.33	0.33
FeCl ₃ ·4H ₂ O	µg FeCl ₃ ·4H ₂ O /g _{si}	1.0			0.67	0.67
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	µg ZnSO ₄ ·7H ₂ O /g _{si}	2.0			1.33	1.33
MnSO ₄ ·H ₂ O	µg MnSO ₄ ·H ₂ O /g _{si}	2.0			1.33	1.33
11. pH		5.0			6.2	5.0
12. Humedad	g agua/g _{si}	1.5			1.6	1.6

En la Tabla 8.15 y en la Fig. 8.44 se muestran los resultados de actividad lipasa obtenidos para cada tratamiento. Las diferencias entre los valores de actividad lipasa entre los tratamientos no son muy grandes. La actividad lipasa obtenida con los controles era superior a los valores de actividad obtenidos con los tratamientos del diseño. La actividad del Control-1 era superior a la del Control-2 verificando que efectivamente aunque un pH más ácido nos ayuda a tener un control bacteriano se está sacrificando un poco las unidades de actividad lipasa obtenidas.

Tabla 8.15 Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño factorial 3^2 A. C1: Control-1; C2: Control-2.

Tratamiento	Glucosa mg/g _{si}	Urea mg/g _{si}	Actividad U/g _{si}
1	160	8	17.2 ± 1.4
2	200	8	17.3 ± 0.7
3	240	8	14.5 ± 0.7
4	160	12	25.9 ± 1.3
5	200	12	21.4 ± 1.7
6	240	12	18.3 ± 1.2
7	160	16	24.5 ± 4.3
8	200	16	28.4 ± 4.2
9	240	16	23.4 ± 1.7
10 ^{C1}	66.7	6.7	30.8 ± 0.7
11 ^{C2}	66.7	6.7	32.1 ± 1.2

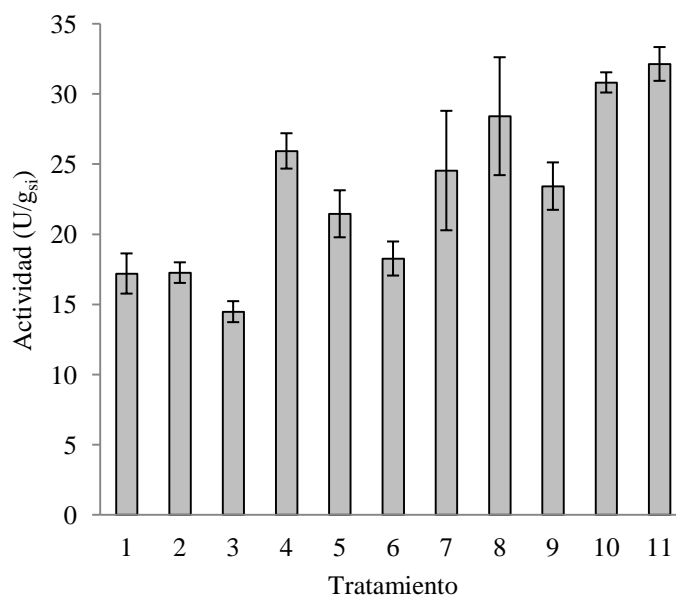


Figura 8.44 Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño factorial 3^2 A.

De la gráfica de Pareto estandarizada para actividad lipasa (Fig.8.45) podemos observar que son significativos los factores urea (valor-P = 0.0001) y glucosa (valor-P = 0.0297), pero no lo fueron la interacción doble o el término cuadrático de cualquiera de estos dos factores.

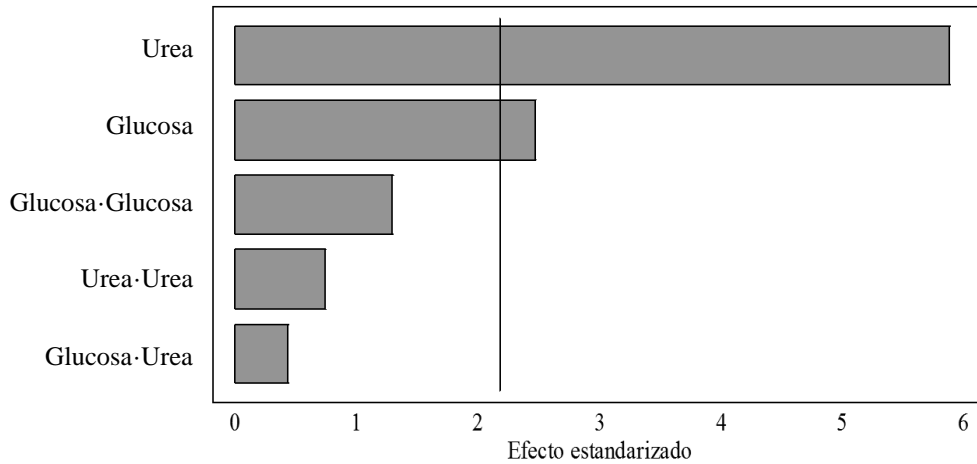


Figura 8.45 Gráfica de Pareto estandarizada para actividad lipasa del diseño factorial 3^2A .

En la gráfica de efectos principales (Fig. 8.46), se observa que la concentración de urea requiere aumentarse para favorecer la producción de lipasa. En el caso de la glucosa se encontró el óptimo, el cual se encuentra alrededor de 180 mg/g_{si}.

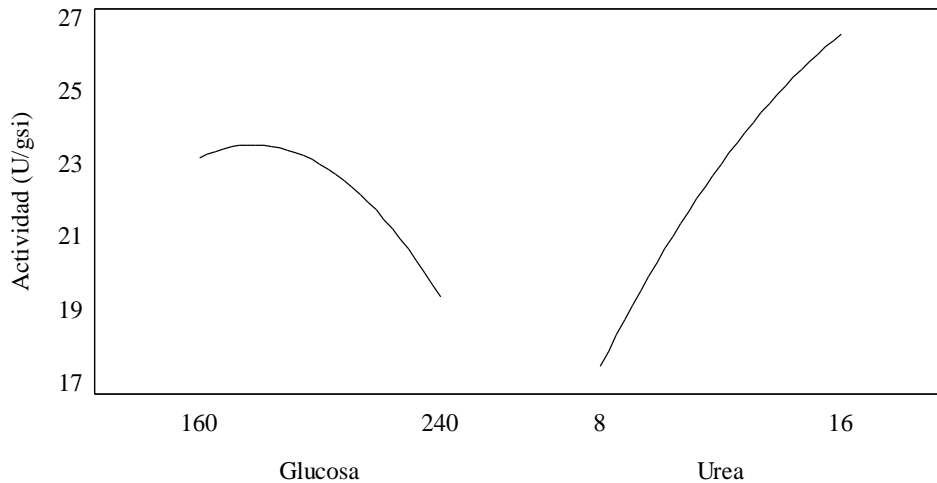


Figura 8.46 Efectos principales para actividad lipasa del diseño 3^2A .

En la Fig. 8.47 se muestra la superficie de respuesta estimada para urea y glucosa. Del modelo de segundo orden ajustado se obtuvo un coeficiente de determinación (R^2) de 78.18%. El coeficiente de determinación es prácticamente el mismo que el del diseño anterior.

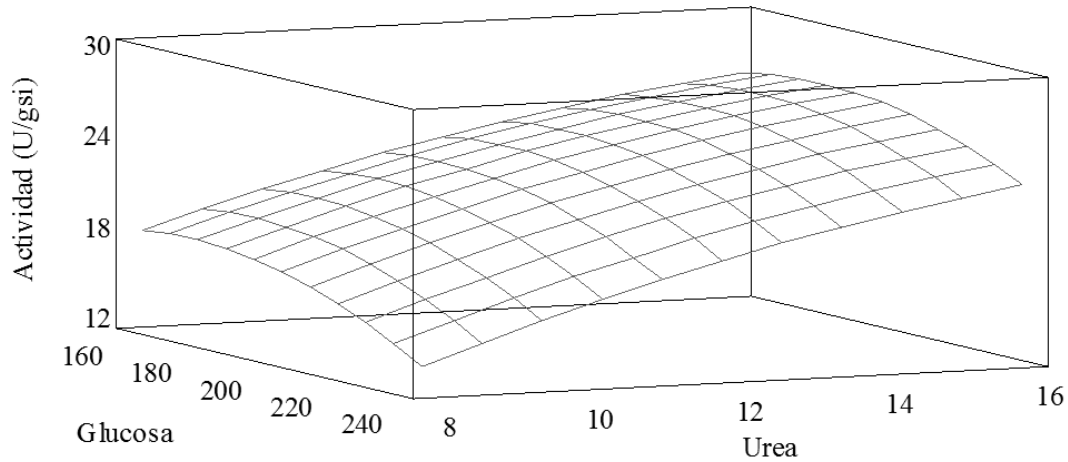


Figura 8.47 Superficie de respuesta estimada del diseño 3^2A .

El valor máximo de actividad lipasa obtenido con este diseño es de 26.92 U/g_{si}, empleando las concentraciones de glucosa y urea de 182.8 mg/g_{si} y 16 mg/g_{si} respectivamente.

En busca de mejorar los niveles de actividad obtenidos con los controles se decidió realizar un último diseño. En el cual se volvieron a evaluar las concentraciones de la glucosa y la urea.

Para el establecimiento de los niveles del siguiente diseño se volvió a emplear la gráfica de efectos principales para actividad lipasa normalizada (Fig. 8.48). Las rectas graficadas corresponden a los diseños factorial fraccionado 2^{12-8} , factorial fraccionado 2^{6-2} , Box-Behnken, factorial 4^2 y factorial 3^2A .

Podemos observar de la Fig. 8.48A que el óptimo de la glucosa efectivamente se encontraba en la zona en la cual las rectas tenían pendiente de signo contrario y donde había la intersección de dos de estas rectas. Razón por la cual se volvió a evaluar concentraciones cercanas a esta zona y el punto central fue el óptimo encontrado para este factor, esto lo podemos observar en la Tabla 8.16 del siguiente diseño.

Para el factor urea de igual manera se seleccionaron los niveles de manera que se abarcara la zona de intersección de las rectas.

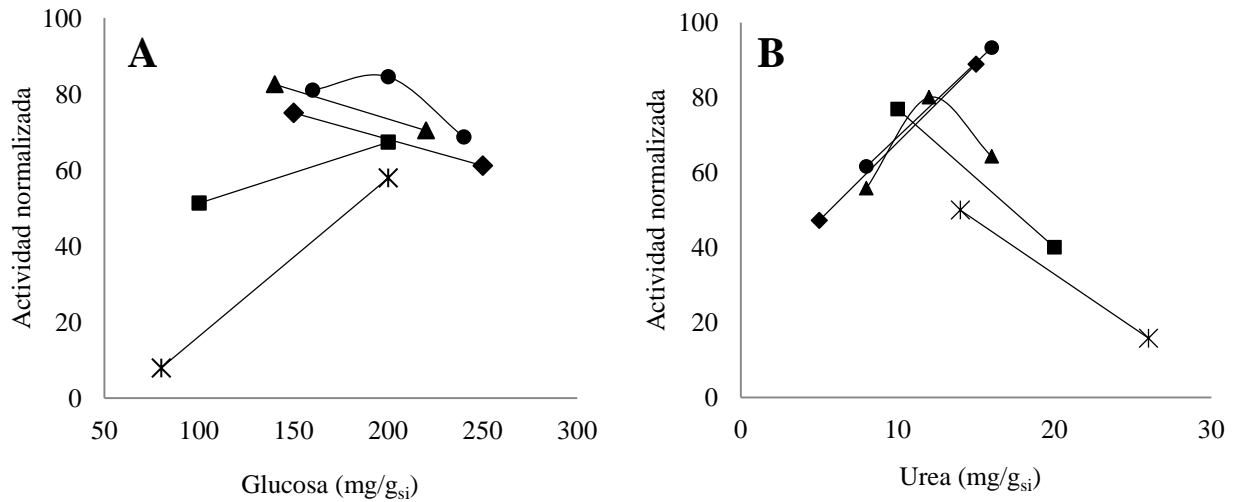


Figura 8.48 Efectos principales para actividad lipasa normalizada de los factores: (A) glucosa y (B) urea. Diseños: factorial fraccionado 2^{12-8} (■), factorial fraccionado 2^{6-2} (◆), Box-Behnken (▲), factorial 4^2 (×), factorial 3^2A (●).

8.4.3.7 Diseño factorial 3^2B

En el último diseño se volvieron a evaluar los factores concentración de glucosa y urea mediante un diseño factorial 3^2 . En la Tabla 8.16 se muestran los factores y niveles seleccionados para este diseño, en esa misma tabla se muestra en negritas la concentración de los factores que se fijaron a partir de los diseños anteriores. A continuación se describen algunas características del diseño:

Diseño: Factorial 3^2

Variable de respuesta: actividad lipasa (U/g_{si})

Factores: 3 (Tabla 8.16)

Niveles: 3 (Tabla 8.16)

Corridas: 9 mas dos controles

Por duplicado

Tabla 8.16 Factores y niveles empleados en el diseño factorial 3²B.

Factores		Niveles			Control-1	Control-2
		-1	0	+1		
1. Glucosa	mg glucosa/g _{si}	140	180	220	66.67	66.67
2. Aceite de girasol	mg aceite de girasol/g _{si}	19			33.33	33.33
3. Urea	mg urea/g _{si}	12	16	20	6.67	6.67
4. Extracto de levadura	mg e. levadura/g _{si}	3.75			1.67	1.67
5. KH ₂ PO ₄	mg KH ₂ PO ₄ /g _{si}	5.0			3.33	3.33
6. MgSO ₄ ·7H ₂ O	mg MgSO ₄ ·7H ₂ O /g _{si}	3.75			1.67	1.67
7. CaCl ₂	mg CaCl ₂ /g _{si}	0.5			0.33	0.33
8. NaCl	mg NaCl /g _{si}	1			0.33	0.33
9. Polivinilalcohol	mg polivinilalcohol /g _{si}	4.5			2.78	2.78
10. Oligoelementos						
H ₃ BO ₃	µg H ₃ BO ₃ /g _{si}	2.5			1.67	1.67
CuSO ₄ ·5H ₂ O	µg CuSO ₄ ·5H ₂ O/g _{si}	0.2			0.13	0.13
KI	µg KI/g _{si}	0.5			0.33	0.33
FeCl ₃ ·4H ₂ O	µg FeCl ₃ ·4H ₂ O /g _{si}	1.0			0.67	0.67
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	µg ZnSO ₄ ·7H ₂ O /g _{si}	2.0			1.33	1.33
MnSO ₄ ·H ₂ O	µg MnSO ₄ ·H ₂ O /g _{si}	2.0			1.33	1.33
11. pH		5.0			6.2	5.0
12. Humedad	g agua/g _{si}	1.5			1.6	1.6

En la Tabla 8.17 y Fig. 8.49 se muestran los resultados de actividad lipasa obtenidos con cada uno de los tratamientos del diseño. La actividad lipasa obtenida con los dos controles es mayor a los resultados de los tratamientos del diseño. La actividad obtenida con el Control-1 era superior a la del Control-2.

Tabla 8.17 Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño factorial 3^2 B. C1: Control-1; C2: Control-2.

Tratamiento	Glucosa mg/gsi	Urea mg/gsi	Actividad U/gsi
1	140	12	30.6 ± 2.4
2	180	12	31.6 ± 1.9
3	220	12	27.0 ± 0.9
4	140	16	17.2 ± 2.7
5	180	16	34.3 ± 0.0
6	220	16	33.0 ± 1.2
7	140	20	13.8 ± 2.9
8	180	20	25.8 ± 2.8
9	220	20	33.9 ± 1.5
10 ^{C1}	66.7	6.7	37.2 ± 0.2
11 ^{C2}	66.7	6.7	40.4 ± 1.8

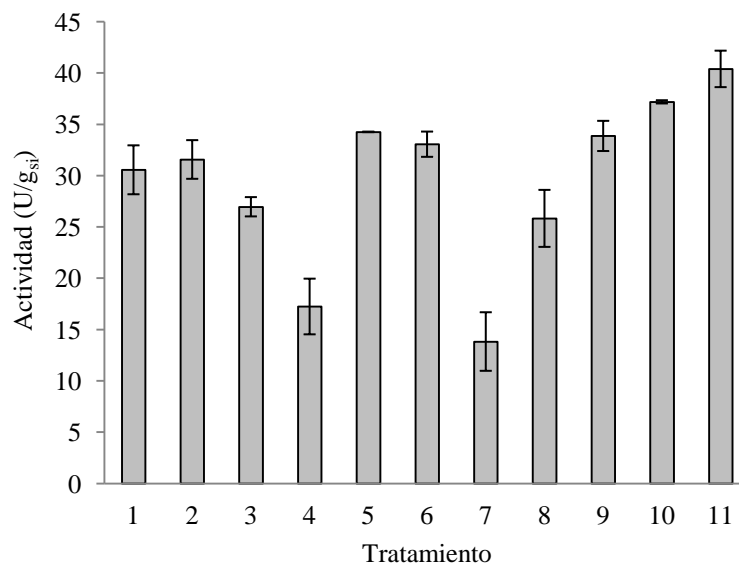


Figura 8.49 Resultados de actividad lipasa obtenidos en cada tratamiento del diseño factorial 3^2 B.

En la gráfica de Pareto estandarizada para actividad lipasa (Fig. 8.50) podemos observar que los más significativos fueron la glucosa (valor-P = 0.0001) y la interacción glucosa-urea (valor-P = 0.0002). En significancia siguieron el efecto cuadrático de la glucosa (valor P = 0.0111) y la urea (valor-P = 0.0134). El efecto cuadrático de urea no resultó ser significativo.

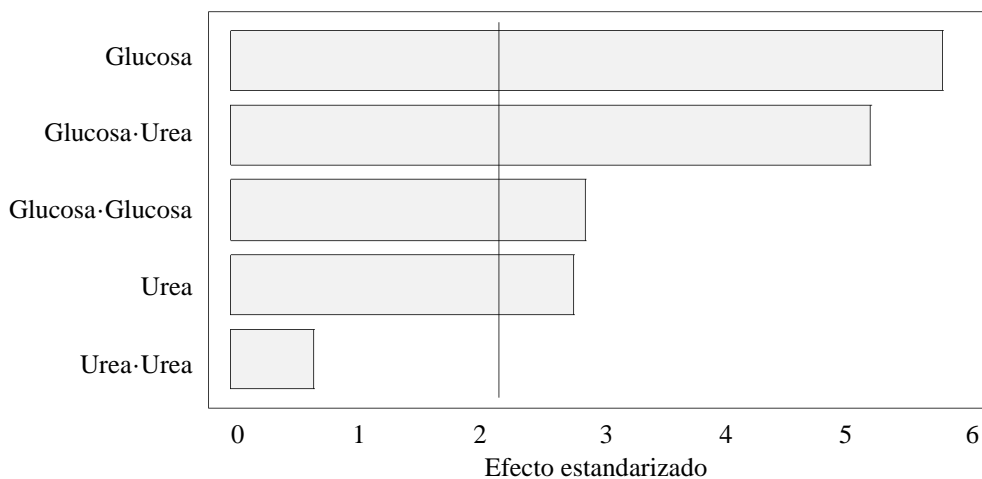


Figura 8.50 Gráfica de Pareto estandarizada para actividad lipasa del diseño factorial 3^2B .

De la gráfica de efectos principales para actividad lipasa (Fig. 8.51) podemos observar que se volvió a encontrar el óptimo de la glucosa pero no el de la urea. El óptimo de la glucosa se encontraba alrededor de los 200 mg/g_{si}.

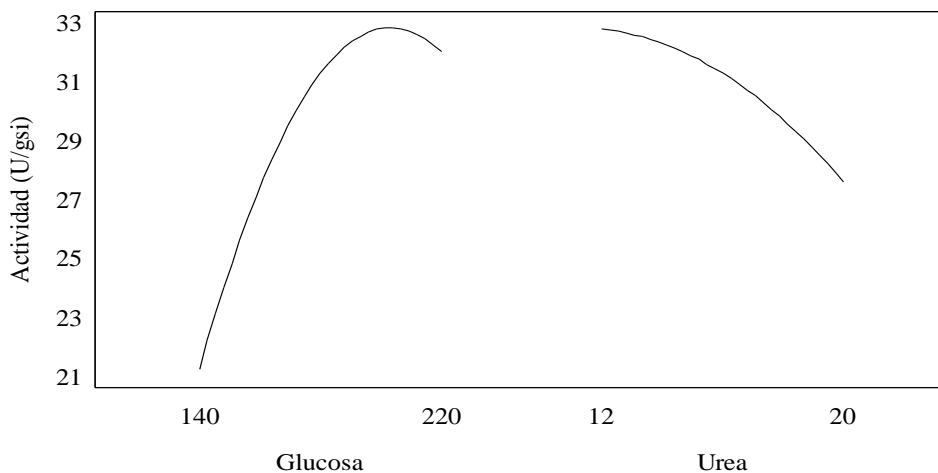


Figura 8.51 Efectos principales para actividad lipasa del diseño 3^2B .

En la Fig. 8.52 se muestra la superficie de respuesta estimada para urea y glucosa. Del modelo de segundo orden ajustado se obtuvo un coeficiente de determinación (R^2) de 87.38%.

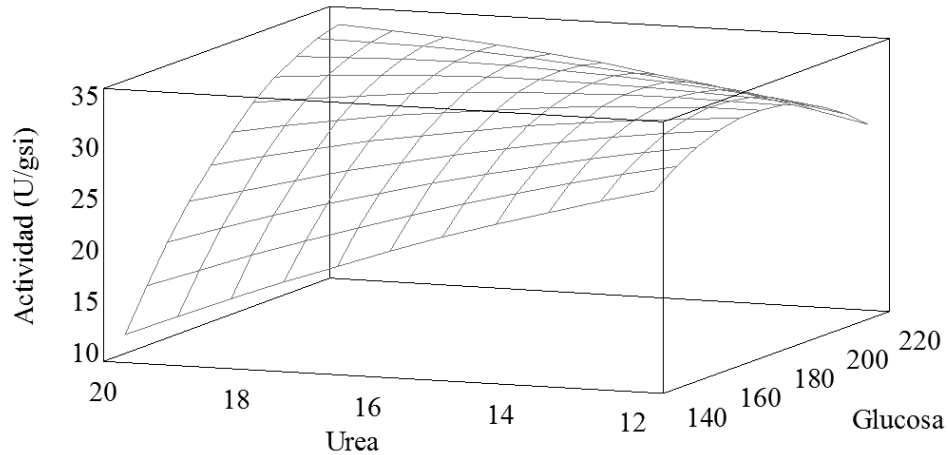


Figura 8.52 Superficie de respuesta estimada del diseño 3^2B .

El valor máximo de actividad lipasa obtenido con este diseño es de 34.77 U/g_{si}, empleando las concentraciones de glucosa y urea de 220 mg/g_{si} y 20 mg/g_{si} respectivamente.

De la última gráfica de efectos principales para actividad lipasa normalizada de los factores glucosa y urea (Fig. 8.53) en la cual se representan todas las rectas y los óptimos obtenidos. Podemos finalmente decir que esta metodología ayuda a poder establecer los niveles de los diseños consecuentes. Ya que como pudimos observar la zona donde se interceptan las rectas o en la cual hay rectas de signo contrario es un buen indicio de un posible óptimo para ese factor.

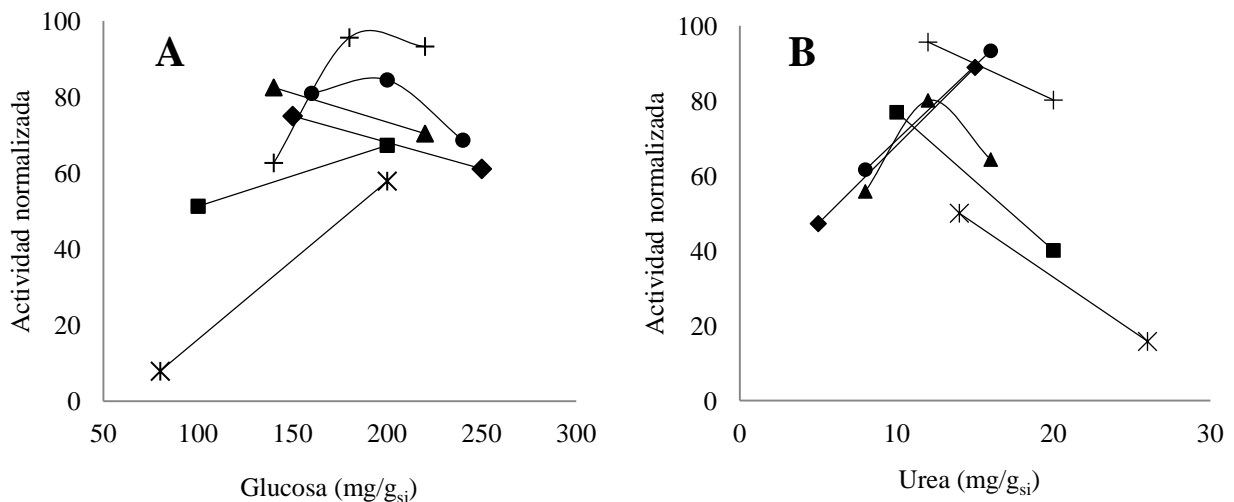


Figura 8.53 Efectos principales para actividad lipasa normalizada de los factores: (A) glucosa y (B) urea. Diseños: factorial fraccionado 2^{12-8} (■), factorial fraccionado 2^{6-2} (◆), Box-Behnken (▲), factorial 4^2 (×), factorial 3^{2a} (●), factorial 3^2B (+).

Se determinó la relación C/N de los tratamientos de los últimos tres diseños en los cuales solo se evaluaron los factores concentración de glucosa y urea. Se calculó la relación C/N considerando que el aporte de carbono era por la glucosa y el aceite de girasol y el aporte de nitrógeno era por el extracto de levadura y la urea. En el Anexo 12.6 se encuentran los cálculos realizados para obtener las relaciones C/N al igual que las tablas en las que se muestra la relación C/N para los tratamientos de estos diseños.

Se graficó la actividad de los tratamientos de los tres diseños en función de la relación C/N (Fig. 8.54). Se puede observar que la relación C/N que favorece la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* en FMS está en un rango de 10 a 16. Por abajo o arriba de este rango se ve afectada la producción de lipasa. La relación C/N de los controles es de 15.8 (no se graficó), entrando en el rango que favorece la producción de lipasa.

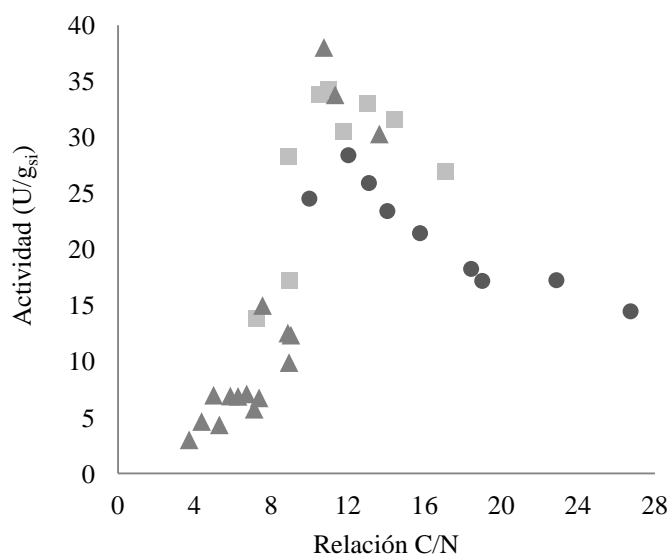


Figura 8.54 Efecto de la relación C/N sobre la producción de lipasa. Diseños: factorial 4² (▲), factorial 3²A (■), factorial 3²B (●).

En otros reportes también se ha estudiado el efecto de la relación C/N sobre la producción de lipasa con diferentes microorganismos tanto en FMS como en FSm.

La máxima producción de lipasa se encontró con una relación C/N de 6-6.5 en la producción de lipasa por *Candida rugosa* en FMS empleando salvado de arroz como sustrato y maltosa y urea como fuente de carbono y nitrógeno respectivamente (Rao y col. 1993b). De

igual manera en la producción de lipasa pero por *Staphylococcus xylosus* en FSm una relación C/N de 6 era la que más favorecía la producción de esta enzima (Ghribi y col. 2009).

Gombert y col. 1999 al comparar medios con diferente composición pero la misma relación C/N en la producción de lipasa por *Penicillium restrictum* en FSm, encontraron que el tipo nutrientes tiene más influencia en la producción de esta enzima que la relación C/N.

Al término de los estudios de optimización se sabe que no se logró optimizar la producción de lipasa. Los valores de actividad máxima obtenidos en los diseños no sobrepasaron las unidades de actividad lipasa obtenidas con los controles (Tabla 8.18), aunque no están muy alejadas. Esto a pesar de que se encontró el máximo del factor glucosa y el de la urea, aunque en diseños distintos.

Tabla 8.18 Actividad máxima obtenida con los diseños de optimización junto con la combinación de la concentración de los componentes glucosa, aceite de girasol y urea. nd: no determinado.

Diseño	Glucosa mg/g _{si}	Aceite de girasol mg/g _{si}	Urea mg/g _{si}	Actividad lipasa (U/g _{si})		
				Máxima	Control-1	Control-2
Factorial fraccionado 2 ¹²⁻⁸	100	50	10	31.1	nd	nd
Factorial fraccionado 2 ⁶⁻²	150	75	15	36.0	nd	nd
Box-Behnken	140	25	11.26	39.6	nd	nd
Factorial 4 ²	200	19	14	38.0	43.1	nd
Factorial 3 ² A	182.80	19	16	26.9	32.1	30.8
Factorial 3 ² B	220	19	20	34.7	40.4	37.2

Pero se debe recordar que se decidió fijar el pH de 5 lo cual nos ayuda a tener un control bacteriano pero sacrificando un poco la actividad lipasa.

Además, otra de las causas de esto se puede atribuir al error cometido en el diseño Box-Behnken a partir del cual se fijó el aceite de girasol en el mínimo encontrado en ese diseño. Se puede observar en la Tabla 8.18 que la actividad máxima obtenida en ese diseño es muy similar a la de los controles y es cuando se empleó el aceite de girasol en su nivel alto. E incluso en el análisis de ese diseño se indicaba que se requería aumentar las concentraciones de inductor para favorecer la producción de lipasa. Por lo tanto a partir del diseño Box-Behnken se buscó optimizar la producción de lipasa con un nivel bajo de aceite de girasol

razón por la cual los diseños indicaban que era necesario aumentar las concentraciones de glucosa y urea.

Otra causa de esto puede ser que modificando la concentración de los nutrientes la producción de lipasa alcance un máximo, el cual es muy cercano al obtenido con los controles (medio 2X), a partir del cual la producción ya no sea tan sensible al incremento o a la modificación de las concentraciones de los nutrientes. Esto se observó al evaluar el efecto de diferentes concentraciones del medio de cultivo basal sobre la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en FMS. La mejor productividad se encontró con el medio 2X, al emplear medios más concentrados (4X, 6X y 8X) disminuyó la productividad pero no existía diferencias significativas entre estos medios.

Al realizar una comparación del costo del medio del último diseño (Factorial 3²B) y el de los Controles, en base a los precios de los reactivos empleados en este trabajo. El medio de los Controles es dos veces más barato, ya que emplea menos glucosa y urea, reactivos que son más caros que el aceite de girasol.

Con base a los niveles de actividad y al costo se elige el medio de los Controles. Aunque se prefiere el Control-2 ya que en este se emplea un pH de 5 que nos ayuda a mantener un control bacteriano. Finalmente, se eligen las condiciones y el medio del Control-2 como las mejores para la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en FMS.

8.4.4 Conclusiones parciales

1. El aceite de girasol es mejor inductor que el aceite de oliva en la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en FMS.
2. Altas concentraciones del medio de cultivo basal (medio 4X, 6X y 8X) no tienen un efecto significativo sobre la productividad de lipasa por *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en FMS.
3. De los factores evaluados la concentración de glucosa, urea y aceite de girasol fueron los más significativos en la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en FMS.
4. La metodología empleada para el establecimiento de los niveles de los subsecuentes diseños, empleando la gráfica de efectos principales para actividad lipasa normalizada de los factores, es eficaz y ayuda en la búsqueda de los óptimos de los factores.

5. La relación C/N que favorece la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en FMS está en un intervalo de 10 a 16.
6. Se encontraron los óptimos de la glucosa y de la urea (alrededor de 200 mg/g_{si} y 11 mg/g_{si} respectivamente) pero no se logró optimizar la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en FMS mediante la MSR.
7. Se eligieron las condiciones y el medio del Control-2 como las mejores para la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en FMS.

8.5 Discusión general

Finalmente, se comparan los valores de actividad obtenidos en este trabajo con los de otras referencias en las cuales emplean *Yarrowia lipolytica* para la producción de lipasa tanto en FMS como en FSm (Tabla 8.19).

De la Tabla 8.19 podemos observar que el medio que emplean los diferentes estudios, incluido este, para la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* es muy similar ya que generalmente emplean el medio reportado por Corzo y Revah (1999) con ciertas modificaciones (Domínguez y col. 2003a, Domínguez y col. 2003b, Babu y col. 2007a, Babu y col. 2007b, Deive y col. 2010 y Darvishi y col. 2009) empleando glucosa y urea como fuente de carbono y nitrógeno respectivamente. Además las condiciones de fermentación son similares en los diversos estudios. Aunque el tiempo de fermentación para obtener la actividad máxima es muy diverso, va desde un día, similar a lo obtenido en este trabajo, hasta tiempos tan largos como 11 días (Domínguez y col. 2003a).

Pero no es posible hacer directamente la comparación de los valores de actividad obtenidos en estos estudios ya que se puede observar en la Tabla 8.19 que hay gran diversidad tanto de los métodos como los sustratos empleados en la determinación de actividad lipasa.

Para poder comparar los resultados de este trabajo con al menos algunos de los reportados en los cuales emplean como sustratos ester de *p*-nitrofenol se empleó la Fig. 8.55. En la Fig. 8.55 se muestra la actividad lipasa de un extracto crudo de enzima extracelular producido por una cepa de *Yarrowia lipolytica* empleando diferentes sustratos, ester de *p*-nitrofenol con ácidos grasos de diferente longitud de cadena, reportado por Deive y col. (2010). A partir de

esta gráfica se hará la conversión de la actividad que se tendría empleando los sustratos mostrados en la Fig. 8.55.

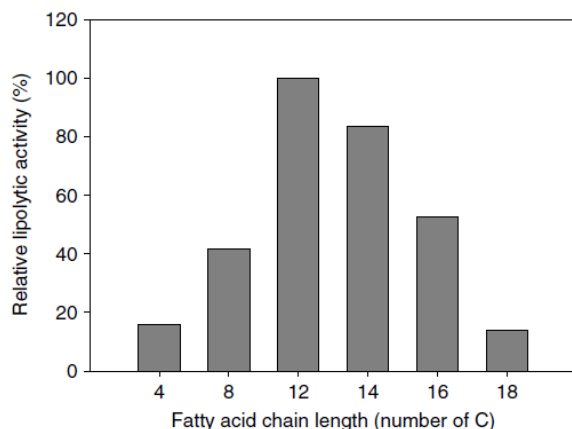


Figura 8.55 Actividad de enzimas lipolíticas de *Yarrowia lipolytica* en esteres de *p*-nitrofenol con ácidos grasos de diferente longitud de cadena (solución cruda de enzima extracelular concentrada, 100% actividad=406U/dm³). (Deive y col. 2010).

Considerando que la actividad máxima obtenida en este reporte con el Control-2 en el diseño factorial 2³B es de 37.2 U/g_{si} empleando como sustrato *p*-nitrofenil octanoato (*p*-NPO), se tendrían 15.9 U/g_{si}, 88.6 U/g_{si} y 48.7 U/g_{si} empleando como sustratos *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB) *p*-nitrofenil laurato (*p*-NPL) y *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP) respectivamente.

Por lo tanto, en este trabajo se obtuvo más actividad lipasa en un menor tiempo de fermentación que la reportada por Babu y col. (2007b) (Tabla 8.20) en el cual también producen esta enzima en FMS empleando como soporte bagazo de caña de azúcar y salvado de trigo y el medio reportado por Corzo y Revah 1999.

Además, se obtuvieron más unidades de actividad lipasa por gramo de soporte inerte que por mL de extracto de los reportes de: Babu y col. (2007a), Deive y col. (2010) y Darvishi y col. (2009). Pero se obtuvieron menos unidades que las reportadas por Fickers y col. (2005a) aunque la cepa empleada en ese estudio está modificada genéticamente.

9. CONCLUSIONES

Los niveles de producción de lipasa obtenidos en este trabajo sobrepasaron los niveles de actividad lipasa de algunos de los reportes de la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* en FMS y en FSm.

En los estudios de extracción de lipasa, se obtuvieron los mayores valores de actividad lipasa extrayendo de la materia seca fermentada de las dos cepas de *Yarrowia lipolytica* probadas con la solución del detergente NLS 3 mM.

El aceite de girasol es mejor inductor que el aceite de oliva en la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en FMS.

En los estudios de optimización, los factores concentración de glucosa, urea y aceite de girasol fueron los más significativos en la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en FMS.

Por primera vez se reporta la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* en FMS utilizando agrolita como soporte inerte. Además de estudios de extracción de lipasa de la materia fermentada producida por *Yarrowia lipolytica* mediante soluciones de detergentes.

10. RECOMENDACIONES

A partir de los estudios realizados surgen las siguientes recomendaciones para proseguir con el estudio de la producción de lipasas por *Yarrowia lipolytica* en FMS.

- 1) Plantear un diseño estadístico en búsqueda de un óptimo de los factores concentración de glucosa, urea y aceite de girasol. Considerando que el nivel que se empleó del aceite de girasol no favorecía la producción de lipasa.
- 2) Evaluar el efecto de las condiciones de cultivo: humedad, temperatura y aireación empleando el sistema de fermentación de columnas de vidrio. Teniendo como variables de respuesta: actividad lipasa, morfología y crecimiento.

Tabla 8.19 Diferentes actividades lipasa obtenidas en otras referencias utilizando *Yarrowia lipolytica*. FMS: fermentación en medio sólido, FSm: fermentación sumergida.

Actividad lipasa	Ensayo de Actividad lipasa			Fermentación			Referencia	
	Sustrato	Método	Unidad de actividad lipasa	Tipo de fermentación	Medio de cultivo	Condiciones de fermentación		Tiempo de fermentación (días)
37.2 U/g soporte inerte	<i>p</i> -nitrofenil octanoato	Espectrofotométrico. Se mide el incremento en la absorbancia a 405 nm producido por la hidrólisis del <i>p</i> -nitrofenil octanoato y la liberación del anión <i>p</i> -nitrofenolato.	Micromoles de ácido octanoico liberados por minuto bajo las condiciones de ensayo.	FMS	Corzo y Revah con modificaciones Tabla 8.18 (Control-2)	Soporte: Agrolita Humedad: 60% Temperatura: 30°C pH inicial medio: 5	1	En este trabajo
69 U/g materia seca o 23 U/mL	tributirina	Mediante titulación con pH-stat. Mezcla de reacción: 0.114M tributirina en mortiguador Tris-HCl 5mM pH7, CaCl ₂ 5mM y goma arábica 2% (p/v). Se adicionó 0.2 mL de muestra a 10 mL de sustrato, pH inicial de 7 y 30°C bajo agitación.	Cantidad de enzima que produce 1μmol de ácido butírico por minuto bajo las condiciones de ensayo.	FMS	Corzo y Revah 1999 Modificación: aceite de girasol como inductor	Soporte: Nuez triturada Humedad: aproximadamente 75% Temperatura: 30°C pH inicial medio: 6	11	Domínguez y col. 2003a
9.3 U/g materia seca	<i>p</i> -nitrofenil palmitato	Espectrofotométrico. Se mide el incremento en la absorbancia a 410 nm producido por la hidrólisis del <i>p</i> -nitrofenil palmitato y la liberación del anión <i>p</i> -nitrofenolato. Temperatura: 28°C 1mL de isopropanol (con 3mg <i>p</i> -nitrofenil Palmitato) + 9mL amortiguador Tris-HCl 0.05 M (pH 8), 40 mg Tritón X-100 y 10 mg goma arábica	1 micromol de <i>p</i> -nitrofenol liberado enzimáticamente del sustrato por minuto.	FMS	Glucosa 1g/10g sustrato Urea 1 g/10g sustrato + Solución salina (Corzo y Revah 1999)	Soporte: mezcla de bagazo de caña de azúcar y salvado de trigo Humedad: 80% Temperatura: 30°C	7	Babu y col. 2007b
1150 U/mL	Aceite de oliva	Se realizó en una emulsión de aceite de oliva (Nagaoka y col. 1963)	Cantidad de enzima que se requiere para producir 1 mmol de ácido	FSm	En %p/v: glucosa 1, suero de leche en polvo 3, (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.8. En % v/v: licor de maíz 1,	Temperatura: 29°C pH inicial medio: 7	1.125	Destain y col. 1997

			graso por minuto		aceite de oliva 0.5			
32 U/mL	tributirina	Mediante titulación con pH-stat. Medio de reacción: 6 mL de amortiguador Tris-Malato 0.2M (pH 7.4), 3 mL CaCl ₂ 0.03M, 15 mL agua bidestilada y 1mL de solución emulsificada de tributirina 17.9% p/p. El pH se ajustó a 7.4 con NaOH 0.01M. Se adicionó 1mL de muestra con lipasa. Temperatura: 37°C	Micromoles de ácido butírico liberados por minuto.	FSm	En g/L: glucosa 20, urea 2, aceite de oliva 10, KH ₂ PO ₄ 1, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5, CaCl ₂ 0.1, NaCl 0.1. En mg/L: H ₃ BO ₃ 0.5, CuSO ₄ ·5H ₂ O 0.04, KI 0.1, FeCl ₃ ·4H ₂ O 0.2, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.4, MnSO ₄ ·H ₂ O 0.4. En µg/L: myo-inositol 4, d-biotina 8 y tiamina 200.	Temperatura: 29.5°C pH inicial medio: 4.7	2.25	Corzo y Revah 1999
58 U/mL	aceite de oliva y tributirina	Mediante titulación con pH-stat. Mezcla de reacción: 0.114M tributirina en mortiguador Tris-HCl 5mM pH7, CaCl ₂ 5mM y goma arábica 2% (p/v). Se adicionó 0.2 mL de muestra a 10 mL de sustrato, pH inicial de 7 y 30°C bajo agitación.	Cantidad de enzima que produce 1µmol de ácido graso por minuto bajo las condiciones estándar de ensayo	FSm	Corzo y Revah 1999 Modificación: aceite de girasol como inductor	Temperatura: 30°C pH inicial medio: 6	8	Dominguez y col. 2003b
2.5 U/mL	<i>p</i> -nitrofenil palmitato	Espectrofotométrico. Se mide el incremento en la absorbancia a 410 nm producido por la hidrólisis del <i>p</i> -nitrofenil palmitato y la liberación del anión <i>p</i> -nitrofenolato. Temperatura: 28°C 1mL de isopropanol (con 3mg <i>p</i> -nitrofenil Palmitato) + 9mL amortiguador Tris-HCl 0.05 M (pH 8), 40 mg Tritón X-100 y 10 mg goma arábica.	1 micromol de <i>p</i> -nitrofenol liberado enzimáticamente del sustrato por minuto.	FSm	Corzo y Revah 1999 Modificación: aceite de girasol como inductor	Temperatura: 30°C	4	Babu y col. 2007a
700 U/L	<i>p</i> -nitrofenil laurato	Espectrofotométrico. Se empleó 2.5 mmol/dm ³ de <i>p</i> -nitrofenil laurato como sustrato a pH 7.2, 30°C y 20 minutos de tiempo de	Cantidad de enzima que produce 1µmol de <i>p</i> -nitrofenol por minuto bajo las condiciones	FSm	Corzo y Revah 1999	Temperatura: 30°C pH inicial medio: 4.5	6	Deive y col. 2010

		reacción.	estándar de ensayo					
102,760 U/mL	Aceite de girasol	Emulsión de sustrato en % p/v: aceite de girasol 40, polivinilalcohol 2 y goma arábica 50. 100-200 µL muestra pura o diluida + 5 mL emulsión de sustrato + 4.5 mL amortiguador de fosfatos 50 mM pH 8 a 30°C. Titulación de los ácidos grasos liberados con NaOH 50 mM (a un pH final de 9).	La cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 µmol de ácidos grasos por hora a 30°C.	FSm	En g/L: aceite de colza 20, (NH ₄) ₂ SO ₄ 5, KH ₂ PO ₄ 1, K ₂ HPO ₄ 0.1, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.7, Ca(NO ₃) ₂ 0.4, NaCl 0.5. En mg/L: tiamina-HCl 0.2, piridoxina-HCl 0.2, ácido nicotínico 0.2, biotina 0.02, calcio pantotenato 0.2, inositol 10.	Temperatura: 28°C pH del medio: 4.5-5.5	0.75	Kamzolova y col. 2005
158,246 U/mL	<i>p</i> -nitrofenil butirato	Se determinó monitoreando la hidrólisis de <i>p</i> -nitrofenilbutirato en <i>p</i> -nitrofenol y butirato a 405 nm	La cantidad de enzima que libera 1 µmol de ácido graso por minuto a 37°C y pH 7.2	FSm	En g/L: NH ₄ Cl 5.3, extracto de levadura 10, triptona de caseína 10, aceite de oliva 20	Temperatura: 29°C pH del medio: 6.5±0.1	3.33	Fickers y col. 2005a
34.6 U/mL	<i>p</i> -nitrofenil laurato	Espectrofotométrico. 100 µL de sobrenadante del medio de cultivo + solución de <i>p</i> -nitrofenil laurato en amortiguador de fosfato 50 mM pH 7. Se monitoreo la producción de <i>p</i> -nitrofenol a 410 nm durante el periodo lineal de la acumulación de producto. Temperatura: 37°C	Cantidad de enzima que produce 1 µmol de producto por minuto.	FSm	Corzo y Revah 1999 con modificaciones. En g/L: aceite de oliva 10, extracto de levadura 2, KH ₂ PO ₄ 0.5, K ₂ HPO ₄ 0.5, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5, CaCl ₂ 0.1, NaCl 0.1	Temperatura: 29°C pH inicial medio: 6	2	Darvishi y col. 2009
190.4 ± 2.1 U/L·h	<i>p</i> -nitrofenil laurato	0.1 mL de medio de cultivo se adicionó a una solución de <i>p</i> -nitrofenil laurato en amortiguador de fosfatos pH 7. Se incubó la solución a 37°C. Se monitoreo la producción de <i>p</i> -nitrofenol a 410 nm durante el periodo lineal de acumulación de producto.	La cantidad de enzima que produce 1 µmol de producto por minuto bajo las condiciones de ensayo.	FSm	Medio YPD, en % p/v: extracto de levadura 1, peptona 0.64, glucosa 2, perfluorodecalina 20	Temperatura: 28°C	-	Fonseca y col. 2007

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Abdel-Fattah Y.R. (2002). Optimization of thermostable lipase production from a thermophilic *Geobacillus* sp using Box-Behnken experimental design. *Biotechnology Letters* 24(14): 1217-1222.
- 2) Açikel U., Erşan M. y Sag Açikel Y. (2011). The effects of the composition of growth medium and fermentation conditions on the production of lipase by *R. delemar*. *Turkish Journal of Biology* 35(1): 35-44.
- 3) Aloulou, A., Rodríguez J.A., Puccinelli D., Mouz N., Leclaire J., Leblond Y. y Carrière F. (2007a). Purification and biochemical characterization of the LIP2 lipase from *Yarrowia lipolytica*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1771(2007): 228-237.
- 4) Aloulou A., Puccinelli D., De Caro A., Leblond Y. y Carrière F. (2007b). A comparative study on two fungal lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Yarrowia lipolytica* shows the combined effects of detergents and pH on lipase adsorption and activity. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1771(2007): 1446-1456.
- 5) Ateslier Z.B.B. y Metin K. (2006). Production and partial characterization of a novel thermostable esterase from a thermophilic *Bacillus* sp. *Enzyme and Microbial Technology* 38(5): 628-635.
- 6) Babu I.S. y Rao G.H. (2007a). Optimization of process parameters for the production of lipase in submerged fermentation by *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Research Journal of Microbiology* 2(1): 88-93.
- 7) Babu I.S. y Rao G.H. (2007b). Lipase production by *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 in solid state fermentation using mixed substrate. *Research Journal of Microbiology* 2(5): 469-474.
- 8) Barth G. y Gaillardin C. (1997). Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *Fems Microbiology Reviews* 19(4): 219-237.
- 9) Benjamin S. y Pandey A. (1998). Mixed-solid substrate fermentation - A novel process for enhanced lipase production by *Candida rugosa*. *Acta Biotechnologica* 18(4): 315-324.

- 10) Bhushan B., Dosanjh N.S., Kumar K. y Hoondal G.S. (1994). Lipase production from an alkalophilic yeast sp. by solid-state fermentation. *Biotechnology Letters* 16(8): 841-842.
- 11) Bhushan B., y Hoondal G.S. (1997). Short communication: Relationship between lipase production and pseudomycelia formation in a dimorphic *Candida* sp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 13(1): 129-130.
- 12) Bordes F., Barbe S., Escalier P., Mourey L., André I., Marty A. y Tranier S. (2010). Exploring the Conformational States and Rearrangements of *Yarrowia lipolytica* Lipase. *Biophysical Journal* 99(7): 2225-2234.
- 13) Corzo G. y Revah S. (1999). Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. *Bioresource Technology* 70(2): 173-180.
- 14) Cottrell S.F., Rabinowitz M. y Getz G.S. (1975). Cytochrome synthesis in synchronous cultures of yeast, *Saccharomyces-cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 250(11): 4087-4094.
- 15) Darvishi F., Nahvi I., Zarkesh-Esfahani H. y Momenbeik F. (2009). Effect of plant oils upon lipase and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.
- 16) Davidson H., Mecklenburg R. y Peterson C. (1988). Nursery Management, Administration and Culture. *Prentice Hal*, New Jersey E.U.A, 2da edición, pp. 232.
- 17) Deive F.J., Carvalho E., Pastrana L., Rúa M.L., Longo M.A. y Sanroman M.A. (2009). Strategies for improving extracellular lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27. *Bioresource Technology* 100(14): 3630-3637.
- 18) Deive F.J., Sanroman M.A. y Longo M.A. (2010). A comprehensive study of lipase production by *Yarrowia lipolytica* CECT 1240 (ATCC 18942): from shake flask to continuous bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 85(2): 258-266.
- 19) Delorme V., Dhouib R., Canaan S., Fotiadu F., Carrière F. y Cavalier J.F. (2011). Effects of Surfactants on Lipase Structure, Activity, and Inhibition. *Pharmaceutical Research* 28(8): 1831-1842.
- 20) Destain J., Roblain D. y Thonart P. (1997). Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters* 19(2): 105-107.

- 21) Domínguez A., Costas M., Longo M.A. y Sanromán A. (2003a). A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters* 25(15): 1225-1229.
- 22) Domínguez A., Deive F.J., Sanromán M.A. y Longo M.A. (2003b). Effect of lipids and surfactants on extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 78(11): 1166-1170.
- 23) Fickers P., Nicaud J.M., Gaillardin C., Destain J. y Thonart P. (2004). Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Applied Microbiology* 96(4): 742-749.
- 24) Fickers P., Fudalej F., Nicaud J.M., Destain J. y Thonart P. (2005a). Selection of new over-producing derivatives for the improvement of extracellular lipase production by the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biotechnology* 115(4): 379-386.
- 25) Fickers P., Fudalej F., Le Dall M.T., Casaregola S., Gaillardin C., Thonart P. y Nicaud J.M. (2005b). Identification and characterisation of LIP7 and LIP8 genes encoding two extracellular triacylglycerol lipases in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Fungal Genetics and Biology* 42(3): 264-274.
- 26) Fonseca-Amaral P.F., R. de Almeida A.P., Peixoto T., Rocha-Leão M.H.M., Coutinho J.A.P. y Coelho M.A.Z. (2007). Beneficial effects of enhanced aeration using perfluorodecalin in *Yarrowia lipolytica* cultures for lipase production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 23(3): 23 (23) 339-344.
- 27) Ghanem, A. (2007). Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron* 63(8): 1721-1754.
- 28) Ghribi D., Sayari A., Gargouri Y. y Bezzine S. (2009). Improvement of *Staphylococcus xylosus* lipase production through optimization of the culture conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111(10): 967-971.
- 29) Gognies S. y Belarbi A. (2010). Use of a new gelling agent (EladiumA (c)) as an alternative to agar-agar and its adaptation to screen biofilm-forming yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88(5): 1095-1102.

- 30) Gombert A.K., Pinto A.L., Castilho L.R. y Freire D.M.G. (1999). Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochemistry* 35(1-2): 85-90.
- 31) Guerzoni M.E., Lanciotti R., Vannini L., Galgano F., Favati F., Gardini F. y Suzzi G. (2001). Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology* 69(1-2): 79-89.
- 32) Gupta R., Gupta N. y Rathi P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64(6): 763-781.
- 33) Gutiérrez-Pulido H. y De la Vara-Salazar R. (2008). Análisis y diseño de experimentos. *Mc Graw Hill*, México, D.F., 2da edición.
- 34) Hasan F., Shah A.A. y Hameed A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 39(2): 235-251.
- 35) Hernández-Martínez R., Sancho-Solano A., Loera-Corral O., Rojo-Domínguez A., Regalado-González C., Huerta-Ochoa S. y Prado-Barragan L.A. (2011). Purification and characterization of a thermostable alkaline protease produced by *Yarrowia lipolytica*. *Revista Mexicana De Ingenieria Quimica* 10(2): 333-341.
- 36) Hernández-Rodríguez B., Córdova J., Bárzana E. y Favela-Torres E. (2009). Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant fungi in solid-state fermentation. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 61(3-4): 136-142.
- 37) Hölker U., Höfer M. y Lenz J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64(2): 175-186.
- 38) Hölker U. y Lenz J. (2005). Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology* 8: 301-306
- 39) Kamzolova S.V., Morgunov I.G., Aurich A., Perevoznikova O.A., Shishkanova N.V., Stottmeister U. y Finogenova T.V. (2005). Lipase secretion and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast grown on animal and vegetable fat. *Food Technology and Biotechnology* 43(2): 113-122.

- 40) Kawasse F.M., Amaral P.F., Rocha-Leão M.H.M. Amaral A.L., Ferreira E.C. y Coelho M.A.Z. (2003). Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 25(6): 371-375.
- 41) Kocková-Kratochvílová A. (1990) Yeast and yeast-like organisms. *VCH Publishers*, Nueva York E.U.A., pp. 63-65.
- 42) Landis T.D., Tinus R.W., McDonald S.E. y Barnett J.P. (1990). Containers and Growing Media. 2. The Container Tree Nursery Manual. Agriculture Handbook 674. *Department of Agriculture, Forest Service*, Washington D.C. E.U.A., pp. 64-65.
- 43) Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. (2004). Brock. Biología de los microorganismos. *Pearson Educación*, décima edición, pp. 145-148.
- 44) Martínez-Ruiz A., García H.S., Saucedo-Castañeda G. y Favela-Torres E. (2008). Organic Phase Synthesis of Ethyl Oleate Using Lipases Produced by Solid-state Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 151(2-3): 393-401.
- 45) Mingrui Y., Shaowei Q. y Tan T. (2007). Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry* 42(3): 384-391.
- 46) Mittelbach M. (1990). Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. *Journal of the American Oil Chemists Society* 67(3): 168-170.
- 47) Mogensen J.E., Sehgal P. y Otzen D.E. (2005). Activation, inhibition, and destabilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by detergents. *Biochemistry* 44(5): 1719-1730.
- 48) Najjar A., Robert S., Guérin C., Violet-Asther M. y Carrière F. (2011). Quantitative study of lipase secretion, extracellular lipolysis, and lipid storage in the yeast *Yarrowia lipolytica* grown in the presence of olive oil: analogies with lipolysis in humans. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89(6): 1947-1962.
- 49) Noor Lida H.M.D., Sundram K., Siew W.L., Aminah A. y Mamot S. (2002). TAG composition and solid fat content of palm oil, sunflower oil, and palm kernel olein blends before and after chemical interesterification. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79(11): 1137-1144.
- 50) Novotny C. y Dolezalova L. (1993). Effect of lipids and detergents on the production and solubilization of extracellular lipase in *Yarrowia lipolytica*. *Folia Microbiologica* 38(1): 49-54.

- 51) Novotný C., Dolezalová L. y Lieblová J. (1994). Dimorphic growth and lipase production in lipolytic yeasts. *Folia Microbiologica* 39(1): 71-73.
- 52) Ooijkaas L.P., Weber F.J., Buitelaar R.M. Tramper J. y Rinzema A. (2000). Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends in Biotechnology* 18(8): 356-360.
- 53) Pandey A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13(2-3): 81-84.
- 54) Pandey A., Benjamin S., Soccol C.R., Nigam P., Krieger N. y Soccol V.T. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 29: 119-131.
- 55) Pereira-Meirelles F.V., Rocha-Leão M.H.M. y Sant'Anna Jr. G.L. (2000). Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. *Biotechnology Letters* 22(1): 71-75.
- 56) Pignède G., Wang H., Fudalej F., Gaillardin C., Seman M. y Nicaud J.M. (2000). Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Bacteriology* 182(10): 2802-2810.
- 57) Ramírez-Coronel A. (2010), comunicación personal.
- 58) Rao P.V., Jayaraman K. y Lakshmanan C.M. (1993a). Production of lipase by *Candida rugosa* in solid-state fermentation. 1. Determination of significant process variables. *Process Biochemistry* 28(6): 385-389.
- 59) Rao P.V., Jayaraman K. y Lakshmanan C.M. (1993b). Production of lipase by *Candida rugosa* in solid-state fermentation. 2. Medium optimization and effect of aeration. *Process Biochemistry* 28(6): 391-395.
- 60) Reetz, M. T. (2002). Lipases as practical biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology* 6(2): 145-150.
- 61) Rodríguez J.A., Mateos J.C., Nungaray J., González V., Bhagnagar T., Roussos S., Cordova J. y Baratti J. (2006). Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. *Process Biochemistry* 41(11): 2264-2269.
- 62) Ruiz-Herrera J. y Sentandreu R. (2002). Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Archives of Microbiology* 178(6): 477-483.

- 63) Sandoval-Fabián G.B. (2010), comunicación por correo electrónico.
- 64) Silva W.O.B., Mitidieri S., Schrank A. y Vainstein M.H. (2005). Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisophae*. *Process Biochemistry* 40(1): 321-326.
- 65) Takac S. y Marul B. (2008). Effects of lipidic carbon sources on the extracellular lipolytic activity of a newly isolated strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 35(9): 1019-1025.
- 66) Treichel H., de Oliveira D., Mazutti M.A., Di Luccio M. y Oliveira J.V. (2010). A Review on Microbial Lipases Production. *Food and Bioprocess Technology* 3(2): 182-196.
- 67) Velasco-Lozano S. (2010), comunicación personal.
- 68) Viniegra-Gonzalez G., Favela-Torres E., Aguilar C.N., Romero-Gomez S.J. Díaz-Godínez G. y Augur C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal* 13(2-3): 157-167.

12. ANEXOS

12.1 Curva estándar de *p*-nitrofenol

Se muestra a continuación la curva estándar de *p*-nitrofenol, del cual se derivó el coeficiente de extinción molar que se utilizó de 4024 absorbancia mol L⁻¹cm⁻¹.

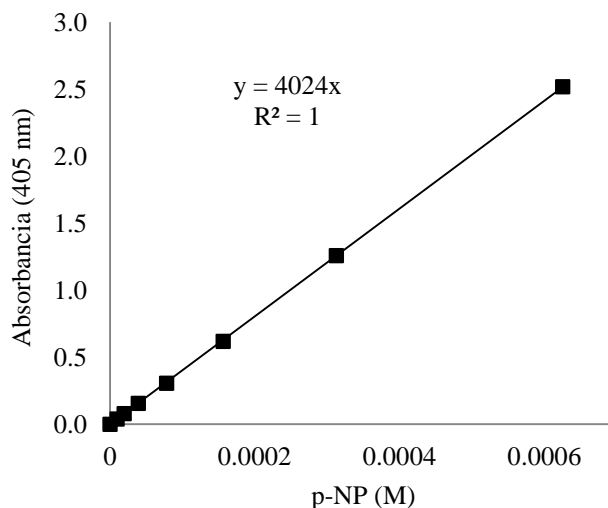


Figura 12.1 Curva estándar de *p*-nitrofenol.

12.2 Diseños estadísticos

Se muestran las tablas empleadas al momento de preparar los medios de los diseños estadísticos. Se muestra el volumen adicionado de cada una de las soluciones concentradas, de inóculo, las aportaciones de agua por las soluciones, y todo lo necesario para tener las condiciones requeridas en cada uno de los tratamientos. La base de cálculo de estas tablas es un gramo de soporte inerte pero al final de estas se muestra la cantidad de medio adicionado a cada matraz Erlenmeyer de 125 mL. En negritas se muestra la cantidad adicionada de las soluciones concentradas y la cantidad a la derecha es la aportación de agua por la adición de dicha solución.

Diseño 2. Factorial fraccionado 2¹²⁻⁸

El inóculo empleado en este diseño tenía una concentración de 7.5x10⁸ células/mL

Tabla 12.1 Preparación de los medios correspondientes a cada tratamiento del diseño factorial fraccionado 2¹²⁻⁸.

Tratamiento	Glucosa mL		Aceite de girasol mL		Urea mL		E. levadura mL		KH ₂ PO ₄ mL		MgSO ₄ ·7H ₂ O mL		CaCl ₂ mL		NaCl mL	
1	0.30	0.23	0.05		0.098	0.09	0.0245	0.02	0.096	0.09	0.049	0.045	0.0098	0.009	0.0095	0.009
2	0.59	0.47	0.05		0.098	0.09	0.0245	0.02	0.048	0.05	0.024	0.023	0.0049	0.005	0.0095	0.009
3	0.30	0.23	0.11		0.098	0.09	0.0245	0.02	0.048	0.05	0.049	0.045	0.0098	0.009	0.0048	0.005
4	0.59	0.47	0.11		0.098	0.09	0.0245	0.02	0.096	0.09	0.024	0.023	0.0049	0.005	0.0048	0.005
5	0.30	0.23	0.05		0.196	0.18	0.0245	0.02	0.096	0.09	0.024	0.023	0.0098	0.009	0.0048	0.005
6	0.59	0.47	0.05		0.196	0.18	0.0245	0.02	0.048	0.05	0.049	0.045	0.0049	0.005	0.0048	0.005
7	0.30	0.23	0.11		0.196	0.18	0.0245	0.02	0.048	0.05	0.024	0.023	0.0098	0.009	0.0095	0.009
8	0.59	0.47	0.11		0.196	0.18	0.0245	0.02	0.096	0.09	0.049	0.045	0.0049	0.005	0.0095	0.009
9	0.30	0.23	0.05		0.098	0.09	0.049	0.05	0.096	0.09	0.049	0.045	0.0049	0.005	0.0095	0.009
10	0.59	0.47	0.05		0.098	0.09	0.049	0.05	0.048	0.05	0.024	0.023	0.0098	0.009	0.0095	0.009
11	0.30	0.23	0.11		0.098	0.09	0.049	0.05	0.048	0.05	0.049	0.045	0.0049	0.005	0.0048	0.005
12	0.59	0.47	0.11		0.098	0.09	0.049	0.05	0.096	0.09	0.024	0.023	0.0098	0.009	0.0048	0.005
13	0.30	0.23	0.05		0.196	0.18	0.049	0.05	0.096	0.09	0.024	0.023	0.0049	0.005	0.0048	0.005
14	0.59	0.47	0.05		0.196	0.18	0.049	0.05	0.048	0.05	0.049	0.045	0.0098	0.009	0.0048	0.005
15	0.30	0.23	0.11		0.196	0.18	0.049	0.05	0.048	0.05	0.024	0.023	0.0049	0.005	0.0095	0.009
16	0.59	0.47	0.11		0.196	0.18	0.049	0.05	0.096	0.09	0.049	0.045	0.0098	0.009	0.0095	0.009

Tabla 12.1 Preparación de los medios correspondientes a cada tratamiento del diseño factorial fraccionado 2^{12-8} .

PVA mL	Oligoelementos mL	pH	Inóculo mL	Agua (g)			* Peso del medio	Volumen del medio	Densidad del medio	mL de medio por matraz		
				Total por soluciones e inóculo	Por agregar	Total						
0.18	0.171	0.02	0.02	5.5	0.13	0.82	0.68	1.5	1.69	1.66	1.01	5
0.18	0.171	0.02	0.02	6.5	0.13	0.98	1.02	2	2.28	2.25	1.01	6.75
0.09	0.086	0.02	0.02	6.5	0.13	0.69	1.31	2	2.23	2.16	1.03	6.5
0.09	0.086	0.02	0.02	5.5	0.13	0.94	0.56	1.5	1.83	1.83	1.00	5.5
0.18	0.171	0.01	0.01	6.5	0.13	0.88	0.62	1.5	1.70	1.66	1.02	5
0.18	0.171	0.01	0.01	5.5	0.13	1.08	0.92	2	2.29	2.16	1.06	6.5
0.09	0.086	0.01	0.01	5.5	0.13	0.75	1.25	2	2.24	2.16	1.03	6.5
0.09	0.086	0.01	0.01	6.5	0.13	1.05	0.45	1.5	1.84	1.83	1.01	5.5
0.09	0.086	0.01	0.01	5.5	0.13	0.74	1.26	2	2.19	2.08	1.05	6.25
0.09	0.086	0.01	0.01	6.5	0.13	0.92	0.58	1.5	1.78	1.66	1.07	5
0.18	0.171	0.01	0.01	6.5	0.13	0.78	0.72	1.5	1.74	1.66	1.04	5
0.18	0.171	0.01	0.01	5.5	0.13	1.04	0.96	2	2.34	2.25	1.04	6.75
0.09	0.086	0.02	0.02	6.5	0.13	0.82	1.18	2	2.19	2.08	1.05	6.25
0.09	0.086	0.02	0.02	5.5	0.13	1.03	0.47	1.5	1.79	1.66	1.07	5
0.18	0.171	0.02	0.02	5.5	0.13	0.86	0.64	1.5	1.74	1.83	0.95	5.5
0.18	0.171	0.02	0.02	6.5	0.13	1.17	0.83	2	2.35	2.33	1.01	7

* Peso del medio = total sólidos + total agua.

Diseño 3. Factorial fraccionado 2⁶⁻²

El inóculo empleado en este diseño tenía una concentración de 1.1x10⁹ células/mL

Tabla 12.2 Preparación de los medios correspondientes a cada tratamiento del diseño factorial fraccionado 2⁶⁻².

Tratamiento	Glucosa mL		Aceite de girasol g	Urea mL		E. levadura mL		KH ₂ PO ₄ mL		MgSO ₄ ·7H ₂ O mL		CaCl ₂ mL		NaCl mL	
1	0.45	0.35	0.03	0.049	0.05	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
2	0.74	0.58	0.03	0.049	0.05	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.061	0.056	0.0049	0.005	0.0095	0.009
3	0.45	0.35	0.08	0.049	0.05	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.061	0.056	0.0049	0.005	0.0095	0.009
4	0.74	0.58	0.08	0.049	0.05	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
5	0.45	0.35	0.03	0.147	0.14	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.061	0.056	0.0049	0.005	0.0095	0.009
6	0.74	0.58	0.03	0.147	0.14	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
7	0.45	0.35	0.08	0.147	0.14	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
8	0.74	0.58	0.08	0.147	0.14	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.061	0.056	0.0049	0.005	0.0095	0.009
9	0.59	0.47	0.05	0.098	0.09	0.049	0.05	0.048	0.05	0.049	0.045	0.0049	0.005	0.0095	0.009
10	0.45	0.35	0.03	0.049	0.05	0.06125	0.06	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
11	0.74	0.58	0.03	0.049	0.05	0.06125	0.06	0.048	0.05	0.061	0.056	0.0049	0.005	0.0095	0.009
12	0.45	0.35	0.08	0.049	0.05	0.06125	0.06	0.048	0.05	0.061	0.056	0.0049	0.005	0.0095	0.009
13	0.74	0.58	0.08	0.049	0.05	0.06125	0.06	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
14	0.45	0.35	0.03	0.147	0.14	0.06125	0.06	0.048	0.05	0.061	0.056	0.0049	0.005	0.0095	0.009
15	0.74	0.58	0.03	0.147	0.14	0.06125	0.06	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
16	0.45	0.35	0.08	0.147	0.14	0.06125	0.06	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
17	0.74	0.58	0.08	0.147	0.14	0.06125	0.06	0.048	0.05	0.061	0.056	0.0049	0.005	0.0095	0.009

Tabla 12.2 Preparación de los medios correspondientes a cada tratamiento del diseño factorial fraccionado 2^{6-2} .

PVA mL	Oligoelementos mL	pH	Inóculo mL	Agua (g)			*Peso del medio	Volumen del medio	Densidad del medio	mL de medio por matraz		
				total por soluciones e inóculo	por agregar	total						
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.09	0.70	0.80	1.5	1.70	1.58	1.07	4.75
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.09	0.96	0.54	1.5	1.80	1.66	1.08	5
0.09	0.086	0.01	0.01	6	0.09	0.73	0.77	1.5	1.75	1.75	1.00	5.25
0.09	0.086	0.01	0.01	6	0.09	0.94	0.56	1.5	1.85	1.75	1.06	5.25
0.09	0.086	0.01	0.01	6	0.09	0.82	0.68	1.5	1.71	1.58	1.08	4.75
0.09	0.086	0.01	0.01	6	0.09	1.03	0.47	1.5	1.81	1.66	1.09	5
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.09	0.79	0.71	1.5	1.76	1.66	1.06	5
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.09	1.05	0.45	1.5	1.86	1.75	1.06	5.25
0.09	0.086	0.01	0.01	5.5	0.09	0.89	0.61	1.5	1.78	1.66	1.07	5
0.09	0.086	0.01	0.01	6	0.09	0.73	0.77	1.5	1.70	1.66	1.02	5
0.09	0.086	0.01	0.01	6	0.09	0.98	0.52	1.5	1.80	1.66	1.08	5
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.09	0.75	0.75	1.5	1.75	1.66	1.05	5
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.09	0.96	0.54	1.5	1.85	1.66	1.11	5
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.09	0.84	0.66	1.5	1.71	1.58	1.08	4.75
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.09	1.05	0.45	1.5	1.81	1.66	1.09	5
0.09	0.086	0.01	0.01	6	0.09	0.82	0.68	1.5	1.76	1.66	1.06	5
0.09	0.086	0.01	0.01	6	0.09	1.07	0.43	1.5	1.86	1.75	1.06	5.25

* Peso del medio = total sólidos + total agua.

Diseño 4. Box Behnken

El inóculo empleado en este diseño tenía una concentración de 1.5×10^9 células/mL

Tabla 12.3 Preparación de los medios correspondientes a cada tratamiento del diseño Box Behnken.

Tratamiento	Glucosa mL		Aceite de girasol g	Urea mL		E. levadura mL		KH ₂ PO ₄ mL		MgSO ₄ ·7H ₂ O mL		CaCl ₂ mL		NaCl mL	
1	0.53	0.42	0.02	0.1176	0.11	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
2	0.42	0.33	0.02	0.1176	0.11	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
3	0.65	0.51	0.02	0.1176	0.11	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
4	0.42	0.33	0.03	0.1176	0.11	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
5	0.65	0.51	0.03	0.1176	0.11	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
6	0.42	0.33	0.02	0.0784	0.07	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
7	0.65	0.51	0.02	0.0784	0.07	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
8	0.53	0.42	0.02	0.1176	0.11	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
9	0.42	0.33	0.02	0.1568	0.14	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
10	0.65	0.51	0.02	0.1568	0.14	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
11	0.53	0.42	0.02	0.0784	0.07	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
12	0.53	0.42	0.03	0.0784	0.07	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
13	0.53	0.42	0.02	0.1568	0.14	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
14	0.53	0.42	0.03	0.1568	0.14	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
15	0.53	0.42	0.02	0.1176	0.11	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009

Tabla 12.3 Preparación de los medios correspondientes a cada tratamiento del diseño Box Behnken.

PVA mL	Oligoelementos mL		pH	Inóculo mL	Agua (g)			*Peso del medio (g)	Volumen del medio (mL)	Densidad del medio (g/mL)	mL de medio medio por matraz	
					total por soluciones e inóculo	por agregar	total					
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.07	0.82	0.68	1.5	1.73	1.58	1.09	4.75
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.07	0.72	0.78	1.5	1.69	1.58	1.06	4.75
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.07	0.91	0.59	1.5	1.77	1.67	1.06	5
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.07	0.72	0.78	1.5	1.70	1.58	1.07	4.75
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.07	0.91	0.59	1.5	1.78	1.67	1.07	5
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.07	0.69	0.81	1.5	1.69	1.58	1.07	4.75
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.07	0.88	0.62	1.5	1.77	1.67	1.06	5
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.07	0.82	0.68	1.5	1.73	1.67	1.04	5
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.07	0.76	0.74	1.5	1.69	1.58	1.07	4.75
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.07	0.95	0.55	1.5	1.77	1.67	1.06	5
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.07	0.78	0.72	1.5	1.72	1.58	1.09	4.75
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.07	0.78	0.72	1.5	1.73	1.67	1.04	5
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.07	0.85	0.65	1.5	1.73	1.67	1.04	5
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.07	0.85	0.65	1.5	1.74	1.67	1.04	5
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.07	0.82	0.68	1.5	1.73	1.58	1.09	4.75

* Peso del medio = total sólidos + total agua.

Diseño 5. Factorial 4²

El inóculo empleado en este diseño tenía una concentración de 9.1×10^8 células/mL

Tabla 12.4 Preparación de los medios correspondientes a cada tratamiento del diseño factorial 4².

Tratamiento	Glucosa mL		Aceite de girasol g	Urea mL		E. levadura mL		KH ₂ PO ₄ mL		MgSO ₄ ·7H ₂ O mL		CaCl ₂ mL		NaCl mL	
1	0.24	0.19	0.02	0.1372	0.13	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
2	0.36	0.28	0.02	0.1372	0.13	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
3	0.47	0.37	0.02	0.1372	0.13	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
4	0.59	0.47	0.02	0.1372	0.13	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
5	0.24	0.19	0.02	0.1764	0.16	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
6	0.36	0.28	0.02	0.1764	0.16	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
7	0.47	0.37	0.02	0.1764	0.16	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
8	0.59	0.47	0.02	0.1764	0.16	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
9	0.24	0.19	0.02	0.2156	0.2	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
10	0.36	0.28	0.02	0.2156	0.2	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
11	0.47	0.37	0.02	0.2156	0.2	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
12	0.59	0.47	0.02	0.2156	0.2	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
13	0.24	0.19	0.02	0.2548	0.23	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
14	0.36	0.28	0.02	0.2548	0.23	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
15	0.47	0.37	0.02	0.2548	0.23	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
16	0.59	0.47	0.02	0.2548	0.23	0.03675	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
17	0.20	0.16	0.04	0.065	0.06	0.0163	0.02	0.032	0.03	0.016	0.015	0.0033	0.003	0.0032	0.003

Tabla 12.4 Preparación de los medios correspondientes a cada tratamiento del diseño factorial 4².

PVA mL	Oligoelementos mL	pH	Inóculo mL	Agua (g)			*Peso del medio	Volumen del medio	Densidad del medio	mL de medio por matraz		
				total por soluciones e inóculo	por agregar	total						
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.11	0.64	0.86	1.5	1.63	1.50	1.09	4.5
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.11	0.74	0.76	1.5	1.67	1.58	1.06	4.75
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.11	0.83	0.67	1.5	1.71	1.58	1.08	4.75
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.11	0.92	0.58	1.5	1.75	1.67	1.05	5
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.11	0.68	0.82	1.5	1.64	1.58	1.03	4.75
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.11	0.77	0.73	1.5	1.68	1.58	1.06	4.75
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.11	0.87	0.63	1.5	1.72	1.58	1.08	4.75
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.11	0.96	0.54	1.5	1.76	1.67	1.05	5
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.11	0.72	0.78	1.5	1.64	1.58	1.04	4.75
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.11	0.81	0.69	1.5	1.68	1.58	1.06	4.75
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.11	0.90	0.60	1.5	1.72	1.58	1.09	4.75
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.11	1.00	0.50	1.5	1.76	1.67	1.06	5
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.11	0.75	0.75	1.5	1.64	1.58	1.04	4.75
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.11	0.84	0.66	1.5	1.68	1.58	1.06	4.75
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.11	0.94	0.56	1.5	1.72	1.58	1.09	4.75
0.09	0.086	0.01	0.01	5	0.11	1.03	0.47	1.5	1.76	1.67	1.06	5
0.06	0.053	0.01	0.01	6.2	0.11	0.45	1.15	1.6	1.72	1.67	1.03	5

* Peso del medio = total sólidos + total agua.

Diseño 6. Factorial 3²A

El inóculo empleado en este diseño tenía una concentración de 8.5×10^8 células/mL

Tabla 12.5 Preparación de los medios correspondientes a cada tratamiento del diseño factorial 3²A.

Tratamiento	Glucosa mL		Aceite de girasol g	Urea mL		E. levadura mL		KH ₂ PO ₄ mL		MgSO ₄ ·7H ₂ O mL		CaCl ₂ mL		NaCl mL	
1	0.47	0.37	0.02	0.08	0.07	0.037	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
2	0.59	0.47	0.02	0.08	0.07	0.037	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
3	0.71	0.56	0.02	0.08	0.07	0.037	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
4	0.47	0.37	0.02	0.12	0.11	0.037	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
5	0.59	0.47	0.02	0.12	0.11	0.037	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
6	0.71	0.56	0.02	0.12	0.11	0.037	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
7	0.47	0.37	0.02	0.16	0.14	0.037	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
8	0.59	0.47	0.02	0.16	0.14	0.037	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
9	0.71	0.56	0.02	0.16	0.14	0.037	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
10	0.20	0.16	0.04	0.07	0.06	0.016	0.02	0.032	0.03	0.016	0.015	0.0033	0.003	0.0032	0.003
11	0.20	0.16	0.04	0.07	0.06	0.016	0.02	0.032	0.03	0.016	0.015	0.0033	0.003	0.0032	0.003

Tabla 12.5 Preparación de los medios correspondientes a cada tratamiento del diseño factorial 3²A.

PVA mL	Oligoelementos mL	pH	Inóculo mL	Agua (g) total por soluciones e inóculo		por agregar	total	*Peso del medio	volumen del medio	Densidad del medio	mL de medio por matraz	
0.090	0.086	0.01	0.01	5	0.12	0.78	0.72	1.5	1.71	1.58	1.08	4.75
0.090	0.086	0.01	0.01	5	0.12	0.88	0.62	1.5	1.75	1.67	1.05	5
0.090	0.086	0.01	0.01	5	0.12	0.97	0.53	1.5	1.79	1.67	1.07	5
0.090	0.086	0.01	0.01	5	0.12	0.82	0.68	1.5	1.71	1.58	1.08	4.75
0.090	0.086	0.01	0.01	5	0.12	0.91	0.59	1.5	1.75	1.58	1.10	4.75
0.090	0.086	0.01	0.01	5	0.12	1.01	0.49	1.5	1.79	1.67	1.07	5
0.090	0.086	0.01	0.01	5	0.12	0.86	0.64	1.5	1.71	1.58	1.08	4.75
0.090	0.086	0.01	0.01	5	0.12	0.95	0.55	1.5	1.75	1.67	1.05	5
0.090	0.086	0.01	0.01	5	0.12	1.04	0.46	1.5	1.79	1.67	1.08	5
0.056	0.053	0.0067	0.01	5	0.12	0.46	1.14	1.6	1.72	1.67	1.03	5
0.056	0.053	0.0067	0.01	6.2	0.12	0.46	1.14	1.6	1.72	1.67	1.03	5

* Peso del medio = total sólidos + total agua.

Diseño 7. Factorial 3²B

El inóculo empleado en este diseño tenía una concentración de 3.03×10^9 células/mL

Tabla 12.6 Preparación de los medios correspondientes a cada tratamiento del diseño factorial 3²B.

Tratamiento	Glucosa mL		Aceite de girasol g	Urea mL		E. levadura mL		KH ₂ PO ₄ mL		MgSO ₄ ·7H ₂ O mL		CaCl ₂ mL		NaCl mL	
1	0.42	0.33	0.02	0.12	0.11	0.037	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
2	0.53	0.42	0.02	0.12	0.11	0.037	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
3	0.65	0.51	0.02	0.12	0.11	0.037	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
4	0.42	0.33	0.02	0.16	0.14	0.037	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
5	0.53	0.42	0.02	0.16	0.14	0.037	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
6	0.65	0.51	0.02	0.16	0.14	0.037	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
7	0.42	0.33	0.02	0.20	0.18	0.037	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
8	0.53	0.42	0.02	0.20	0.18	0.037	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
9	0.65	0.51	0.02	0.20	0.18	0.037	0.03	0.048	0.05	0.037	0.034	0.0049	0.005	0.0095	0.009
10	0.20	0.16	0.04	0.07	0.06	0.016	0.02	0.032	0.03	0.016	0.015	0.0033	0.003	0.0032	0.003
11	0.20	0.16	0.04	0.07	0.06	0.016	0.02	0.032	0.03	0.016	0.015	0.0033	0.003	0.0032	0.003

Tabla 12.6 Preparación de los medios correspondientes a cada tratamiento del diseño factorial 3²B.

PVA mL	Oligoelementos mL	pH	Inóculo mL	Agua (g)			*Peso del medio	Volumen del medio	Densidad del medio	mL de medio por matraz		
				total por soluciones	por agregar	total						
0.090	0.086	0.01	0.01	5	0.03	0.69	0.81	1.5	1.69	1.58	1.07	4.75
0.090	0.086	0.01	0.01	5	0.03	0.78	0.72	1.5	1.73	1.58	1.09	4.75
0.090	0.086	0.01	0.01	5	0.03	0.88	0.62	1.5	1.77	1.67	1.06	5
0.090	0.086	0.01	0.01	5	0.03	0.73	0.77	1.5	1.69	1.58	1.07	4.75
0.090	0.086	0.01	0.01	5	0.03	0.82	0.68	1.5	1.73	1.58	1.09	4.75
0.090	0.086	0.01	0.01	5	0.03	0.91	0.59	1.5	1.77	1.58	1.12	4.75
0.090	0.086	0.01	0.01	5	0.03	0.76	0.74	1.5	1.70	1.58	1.07	4.75
0.090	0.086	0.01	0.01	5	0.03	0.85	0.65	1.5	1.74	1.58	1.10	4.75
0.090	0.086	0.01	0.01	5	0.03	0.95	0.55	1.5	1.78	1.67	1.07	5
0.056	0.053	0.0067	0.01	5	0.03	0.37	1.23	1.6	1.72	1.67	1.03	5
0.056	0.053	0.0067	0.01	6.2	0.03	0.37	1.23	1.6	1.72	1.67	1.03	5

* Peso del medio = total sólidos + total agua.

12.3 Efecto de detergentes en la actividad y en la extracción de lipasa de materia seca fermentada de *Yarrowia lipolytica*.

Tabla 12.7 Efecto del NLS en la actividad y en la extracción de lipasa de materia seca fermentada de *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773. Msf: materia seca fermentada.

NLS (mM)	Efecto en la actividad		Efecto en la extracción de msf		Activación por extracción – activación del extracto extracelular	Efecto en la extracción de msf lavada		Activación por extracción con lavados – activación del extracto extracelular
	Actividad	Activación (veces)	Actividad	Activación (veces)		Actividad	Activación (veces)	
0	2.9 ± 0.2	0.0	2.1 ± 0.2	0.0	0.0	0.6 ± 0.1	0.0	0.0
1	6.8 ± 0.2	1.4	11.2 ± 0.7	4.5	3.1	3.2 ± 0.2	4.1	2.7
2	8.6 ± 0.6	2.0	13.6 ± 0.3	5.6	3.6	9.9 ± 1.4	14.8	12.8
3	6.8 ± 0.3	1.4	14.5 ± 0.7	6.1	4.7	13.5 ± 0.6	20.5	19.1
4	6.3 ± 0.5	1.2	12.7 ± 0.7	5.2	4.0	10.4 ± 0.5	15.6	14.4
10	3.2 ± 0.3	0.1	6.8 ± 0.1	2.3	2.2	5.9 ± 0.2	8.4	8.3

Tabla 12.8 Efecto del NLS en la actividad y en la extracción de lipasa de materia seca fermentada de *Yarrowia lipolytica* L0018. Msf: materia seca fermentada.

NLS (mM)	Efecto en la actividad		Efecto en la extracción de msf		Activación por extracción – activación del extracto extracelular	Efecto en la extracción de msf lavada		Activación por extracción con lavados – activación del extracto extracelular
	Actividad	Activación (veces)	Actividad	Activación (veces)		Actividad	Activación (veces)	
0	1.5 ± 0.1	0.0	0.9 ± 0.0	0.0	0.0	0.4 ± 0.0	0.00	0.00
1	2.2 ± 0.2	0.5	3.2 ± 0.3	2.6	2.1	1.4 ± 0.1	2.1	1.7
2	2.4 ± 0.2	0.6	4.4 ± 0.3	3.9	3.3	3.2 ± 0.2	6.3	5.6
3	2.0 ± 0.2	0.3	4.9 ± 0.1	4.5	4.2	4.4 ± 0.1	8.9	8.6
4	1.8 ± 0.1	0.2	2.7 ± 0.3	2.0	1.9	2.8 ± 0.2	5.3	5.2
10	0.7 ± 0.1	-0.5	1.0 ± 0.2	0.1	0.7	1.1 ± 0.0	1.5	2.0

Tabla 12.9 Efecto del tritón X-100 en la actividad y en la extracción de lipasa de materia seca fermentada de *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773. Msf: materia seca fermentada.

NLS (mM)	Efecto en la actividad			Efecto en la extracción de msf			Activación por extracción – activación del extracto extracelular	Efecto en la extracción de msf lavada			Activación por extracción con lavados – activación del extracto extracelular
	Actividad		Activación (veces)	Actividad		Activación (veces)		Actividad		Activación (veces)	
0	1.53	0.15	0.00	1.23	0.08	0.00	0.00	0.73	0.11	0.00	0.00
0.05	2.81	0.26	0.83	3.10	0.18	1.52	0.69	1.24	0.04	0.70	-0.12
0.1	1.15	0.06	-0.25	5.41	0.53	3.40	3.15	2.15	0.03	1.96	1.71
0.2	0.74	0.08	-0.52	6.99	0.39	4.69	4.17	1.98	0.11	1.74	1.22
0.3	0.73	0.07	-0.52	4.53	0.41	2.69	2.16	1.86	0.08	1.57	1.05
0.4	0.71	0.05	-0.54	3.30	0.14	1.68	1.14	1.68	0.22	1.32	0.78

Tabla 12.10 Efecto del tritón X-100 en la actividad y en la extracción de lipasa de materia seca fermentada de *Yarrowia lipolytica* L0018. Msf: materia seca fermentada.

NLS (mM)	Efecto en la actividad			Efecto en la extracción de msf			Activación por extracción – activación del extracto extracelular	Efecto en la extracción de msf lavada			Activación por extracción con lavados – activación del extracto extracelular
	Actividad		Activación (veces)	Actividad		Activación (veces)		Actividad		Activación (veces)	
0	0.94	0.06	0.00	0.63	0.03	0.00	0.00	0.28	0.02	0.00	0.00
0.05	0.98	0.08	0.04	1.13	0.07	0.79	0.75	0.78	0.02	1.83	1.79
0.1	0.05	0.05	-0.94	1.40	0.07	1.22	0.28	0.39	0.04	0.42	-0.52
0.2	0.02	0.01	-0.98	1.24	0.03	0.95	-0.03	0.25	0.02	-0.09	-1.07
0.3	0.03	0.01	-0.97	0.45	0.02	-0.29	-1.26	0.13	0.01	-0.55	-1.51
0.4	0.05	0.01	-0.95	0.28	0.02	-0.57	-1.51	0.11	0.01	-0.60	-1.55

12.4 Efecto de diferentes concentraciones del medio de cultivo basal sobre la producción de lipasa por *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 en fermentación en medio sólido

Las cinéticas de las diferentes concentraciones del medio de cultivo basal (1X, 2X, 4X, 6X, 8X) son las mostradas en la Fig. 12.2.

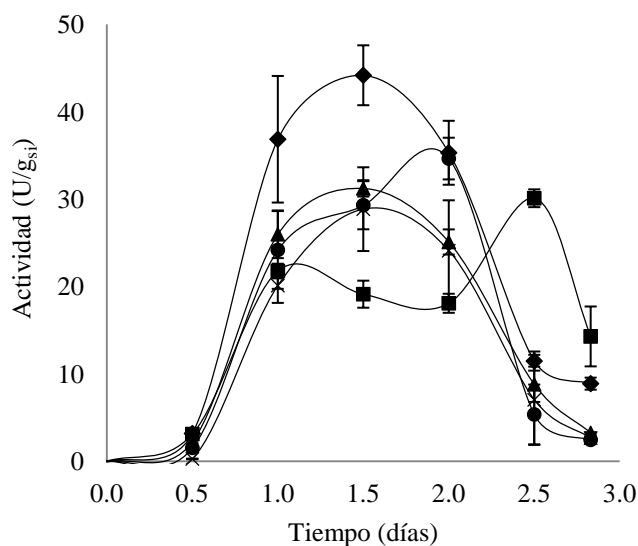


Figura 12.2 Cinéticas empleando las diferentes concentraciones del medio de cultivo basal. Medios: 1X (■), 2X (◆), 4X (▲), 6X (●) y 8X (×).

Tabla 12.11 Análisis de varianza de la productividad de lipasa empleando diferentes concentraciones del medio de cultivo basal. Gl: grados de libertad.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	311.09	4	77.7725	11.56	0.0097
Dentro de grupos	33.65	5	6.73		
Total	344.74	9			

Tabla 12.12 Resultados del método de Tukey de la productividad de lipasa empleando diferentes concentraciones del medio de cultivo basal.

Contraste de las concentraciones del medio de cultivo basal	Decisión	Diferencia	+/- Límites
1X – 2X	Significativa	-16.9	10.3591
1X – 4X	No significativa	-8.75	10.3591
1X – 6X	No significativa	-5.25	10.3591
1X – 8X	No significativa	-5.35	10.3591
2X – 4X	No significativa	8.15	10.3591
2X – 6X	Significativa	11.65	10.3591
2X – 8X	Significativa	11.55	10.3591
4X – 6X	No significativa	3.5	10.3591
4X – 8X	No significativa	3.4	10.3591
6 X– 8X	No significativa	-0.1	10.3591

12.5 Análisis de los diseños estadísticos

Diseño 1. Factorial 2^3 con punto al centro

Tabla 12.13 Análisis de varianza del diseño factorial 2^3 con punto al centro. Gl: grados de libertad.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:pH	0.0138063	1	0.0138063	0.07	0.7997
B:Humedad	1.13956	1	1.13956	5.61	0.0394
C:Tamaño de inóculo	3.56266	1	3.56266	17.53	0.0019
AB	0.288906	1	0.288906	1.42	0.2607
AC	1.06606	1	1.06606	5.24	0.0450
BC	0.0264062	1	0.0264062	0.13	0.7260
bloques	2.07401	1	2.07401	10.20	0.0096
Error total	2.0327	10	0.20327		
Total (corr.)	10.2041	17			

Diseño 2. Factorial fraccionado 2^{12-8}

Tabla 12.14 Análisis de varianza del diseño factorial saturado 2^{12-8} . Gl: grados de libertad.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Glucosa	178.133	1	178.133	67.57	0.0000
B: Aceite de girasol	92.1403	1	92.1403	34.95	0.0000
C:Urea	1124.57	1	1124.57	426.58	0.0000
D:Extracto de levadura	118.195	1	118.195	44.83	0.0000
E:KH ₂ PO ₄	11.4003	1	11.4003	4.32	0.0514
F:MgSO ₄ .7H ₂ O	661.57	1	661.57	250.95	0.0000
G:CaCl ₂	1.40281	1	1.40281	0.53	0.4746
H:NaCl	26.1003	1	26.1003	9.90	0.0053
I:Polivinilalcohol	1.48781	1	1.48781	0.56	0.4617
J:Oligoelementos	9.79031	1	9.79031	3.71	0.0691

K:pH	39.3828	1	39.3828	14.94	0.0010
L:Humedad	23.6328	1	23.6328	8.96	0.0075
Total error	50.0884	19	2.63623		
Total (corr.)	2337.89	31			

La ecuación del modelo de primer orden ajustado es:

$$\text{Actividad} = 31.9219 + 0.0471875 * \text{Glucosa} - 0.067875 * \text{Aceite de girasol} - 1.18563 * \text{Urea} + 1.5375 * \text{Extracto de levadura} - 0.23875 * \text{KH}_2\text{PO}_4 + 3.6375 * \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + 0.8375 * \text{CaCl}_2 + 3.6125 * \text{NaCl} + 0.0958333 * \text{Polivinilalcohol} - 0.553125 * \text{Oligoelementos} - 2.21875 * \text{pH} - 3.4375 * \text{Humedad}$$

Diseño 3. Factorial fraccionado 2^{6-2}

Tabla 12.15 Análisis de varianza del diseño factorial saturado 2^{6-2} . Gl: grados de libertad.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Glucosa	185.281	1	185.281	109.90	0.0000
B:Aceite de girasol	48.5113	1	48.5113	28.77	0.0001
C:Urea	2012.95	1	2012.95	1194.00	0.0000
D:Extracto de levadura	26.2813	1	26.2813	15.59	0.0010
E:MgSO ₄ ·7H ₂ O	6.30125	1	6.30125	3.74	0.0700
F:pH	76.2613	1	76.2613	45.24	0.0000
Falta de ajuste	156.628	10	15.6628	9.29	0.0000
Error puro	28.66	17	1.68588		
Total (corr.)	2540.88	33			

La ecuación del modelo de primer orden ajustado es:

$$\text{Actividad} = 9.03199 - 0.048125 * \text{Glucosa} - 0.04925 * \text{Aceite de girasol} + 1.58625 * \text{Urea} - 0.725 * \text{Extracto de levadura} - 0.355 * \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + 3.0875 * \text{pH}$$

Diseño 4. Box Behnken

Tabla 12.16 Análisis de varianza del diseño Box Behnken. Gl: grados de libertad.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Glucosa	118.266	1	118.266	2.66	0.1188
B:Aceite de girasol	83.2656	1	83.2656	1.87	0.1866
C:Urea	47.61	1	47.61	1.07	0.3134
AA	11.577	1	11.577	0.26	0.6157
AB	3.78125	1	3.78125	0.08	0.7737
AC	80.645	1	80.645	1.81	0.1934
BB	54.7516	1	54.7516	1.23	0.2806
BC	16.245	1	16.245	0.36	0.5526
CC	439.494	1	439.494	9.87	0.0051
Error total	890.44	20	44.522		
Total (corr.)	1767.43	29			

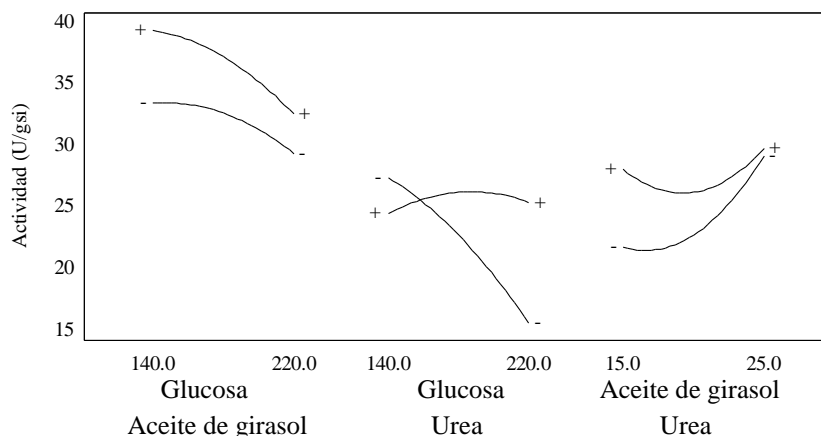


Figura 12.3 Gráfica de interacciones para actividad del diseño Box-Behnken.

La ecuación del modelo de segundo orden ajustado es:

$$\text{Actividad} = -7.68073 + 0.044375 \cdot \text{Glucosa} - 2.42667 \cdot \text{Aceite de girasol} + 9.85625 \cdot \text{Urea} - 0.000782552 \cdot \text{Glucosa}^2 - 0.0034375 \cdot \text{Glucosa} \cdot \text{Aceite de girasol} + 0.0198437 \cdot \text{Glucosa} \cdot \text{Urea} + 0.108917 \cdot \text{Aceite de girasol}^2 - 0.07125 \cdot \text{Aceite de girasol} \cdot \text{Urea} - 0.482161 \cdot \text{Urea}^2$$

Diseño 5. Factorial 4²

Tabla 12.17 Análisis de varianza del diseño factorial 4². Gl: grados de libertad.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Glucosa	1633.92	1	1633.92	53.62	0.0000
B:Urea	829.466	1	829.466	27.22	0.0000
AA	82.2403	1	82.2403	2.70	0.1125
AB	304.922	1	304.922	10.01	0.0039
BB	88.1128	1	88.1128	2.89	0.1010
Error total	792.269	26	30.4719		
Total (corr.)	3730.93	31			

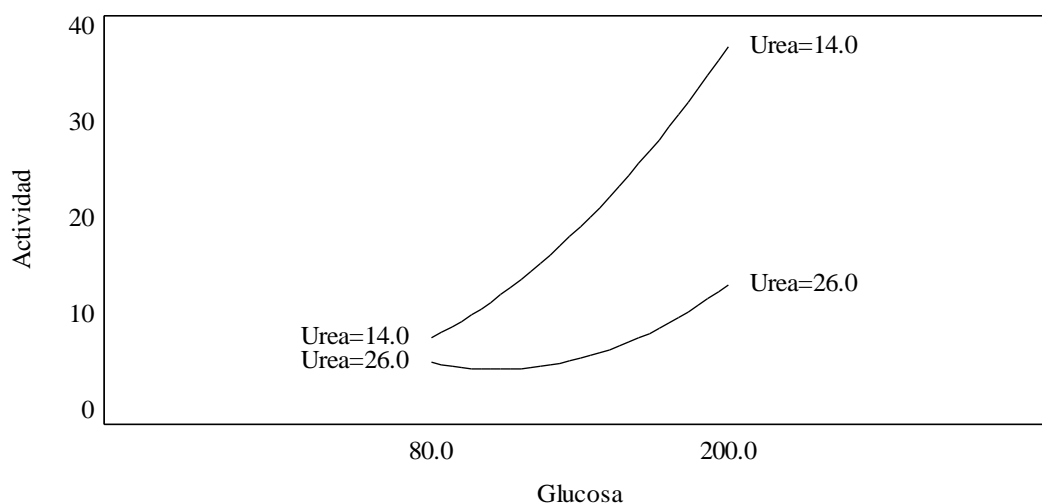


Figura 12.4 Gráfica de interacciones para actividad del diseño factorial 4².

La ecuación del modelo de segundo orden ajustado es:

$$\text{Actividad} = 26.9933 + 0.187922*\text{Glucosa} - 3.12606*\text{Urea} + 0.00100195*\text{Glucosa}^2 - 0.0154344*\text{Glucosa}*\text{Urea} + 0.103711*\text{Urea}^2$$

Diseño 6. Factorial 3²A

Tabla 12.18 Análisis de varianza del diseño factorial 3²A. Gl: grados de libertad.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Glucosa	44.0833	1	44.0833	6.08	0.0297
B:Urea	250.253	1	250.253	34.50	0.0001
AA	12.25	1	12.25	1.69	0.2181
AB	1.36125	1	1.36125	0.19	0.6725
BB	4.0	1	4.0	0.55	0.4720
Error total	87.0321	12	7.25267		
Total (corr.)	398.98	17			

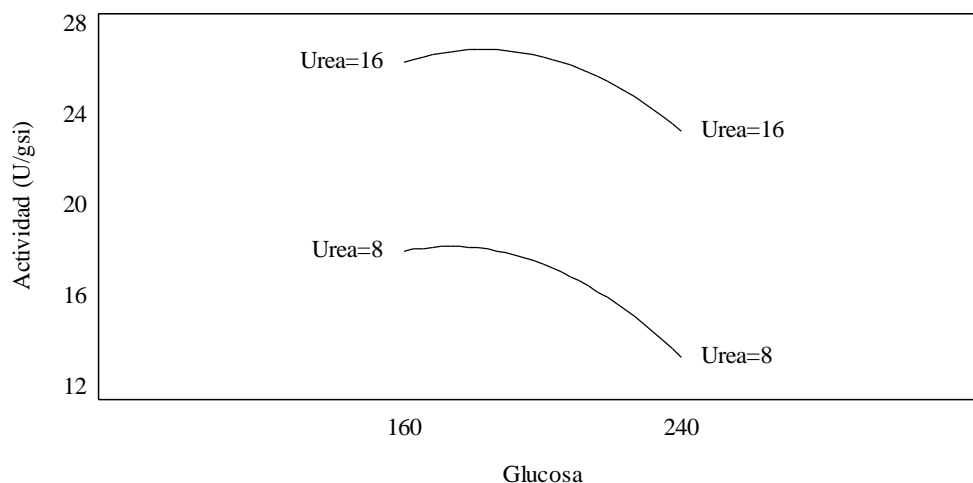


Figura 12.5 Gráfica de interacciones para actividad del diseño factorial 3²A.

La ecuación del modelo de segundo orden ajustado es:

$$\text{Actividad} = -27.6458 + 0.358646*\text{Glucosa} + 2.12604*\text{Urea} - 0.00109375*\text{Glucosa}^2 + 0.00257813*\text{Glucosa}*\text{Urea} - 0.0625*\text{Urea}^2$$

Diseño 6. Factorial 3²B

Tabla 12.19 Análisis de varianza del diseño factorial 3²B. Gl: grados de libertad.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Glucosa	346.688	1	346.688	36.11	0.0001
B:Urea	80.6008	1	80.6008	8.40	0.0134
AA	86.1803	1	86.1803	8.98	0.0111
AB	279.661	1	279.661	29.13	0.0002

BB	4.76694	1	4.76694	0.50	0.4945
Error total	115.208	12	9.60064		
Total (corr.)	913.104	17			

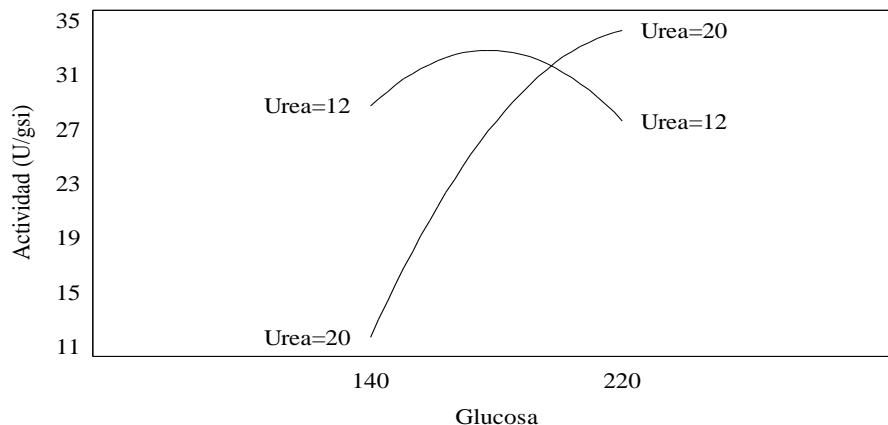


Figura 12.6 Gráfica de interacciones para actividad del diseño factorial 3^B.

La ecuación del modelo de segundo orden ajustado es:

$$\text{Actividad} = 12.4215 + 0.5875 \cdot \text{Glucosa} - 5.11615 \cdot \text{Urea} - 0.00290104 \cdot \text{Glucosa}^2 + 0.0369531 \cdot \text{Glucosa} \cdot \text{Urea} - 0.0682292 \cdot \text{Urea}^2$$

12.6 Relación C/N de los medios de cultivo

Primero se muestra la manera en la que se calculó la relación C/N y posteriormente se muestran las tablas de la relación C/N de los tratamientos de los diseños factorial 4², factorial 3² y factorial 3².

Cálculo de la relación C/N de los medios de cultivo

El cálculo de la relación C/N de los medios de cultivo se ejemplificará con el cálculo de esta relación para el medio de cultivo basal 2X el cual se realizó de la siguiente manera:

1. Se consideró que el aporte principal de carbono (C) y nitrógeno (N) fue por los siguientes componentes del medio de cultivo basal:

Componentes con Carbono

- Glucosa
- Aceite de girasol

Componentes con Nitrógeno

- Urea
- Extracto de levadura

2. Se desglosó el aporte de carbono y nitrógeno por cada componente:

Componentes con carbono

- Glucosa

$$\frac{66.7\text{mg glucosa}}{\text{g}_{\text{si}}} \left| \frac{1\text{g}}{100\text{mg}} \right| \left| \frac{\text{mol}}{180\text{g glucosa}} \right| \left| \frac{72\text{g C}}{\text{mol}} \right| = \frac{0.2668\text{g C}}{\text{g}_{\text{si}}}$$

- Aceite de girasol

Se ha encontrado en diversas referencias (Takaç y Marul 2008, Mittelbach 1990 y Noor Lida y col. 2002) que la composición de ácidos grasos del aceite de girasol es aproximadamente: ácido palmítico (C16:0) 7%, ácido esteárico (C18:0) 4%, ácido oleico (C18:1) 25% y ácido linoleico (C18:2) 64%. El aporte de carbono por cada uno de estos ácidos grasos es:

✓ ácido palmítico

$$\frac{33.3\text{mg aceite de girasol}}{\text{g}_{\text{si}}} \left| \frac{1\text{g}}{100\text{mg}} \right| \left| \frac{7\text{g ácido palmítico}}{100\text{g aceite de girasol}} \right| \left| \frac{\text{mol}}{256\text{g ácido palmítico}} \right| \left| \frac{192\text{g C}}{\text{mol}} \right| = \frac{0.017\text{g C}}{\text{g}_{\text{si}}}$$

✓ ácido esteárico

$$\frac{33.3\text{mg aceite de girasol}}{\text{g}_{\text{si}}} \left| \frac{1\text{g}}{100\text{mg}} \right| \left| \frac{4\text{g ácido esteárico}}{100\text{g aceite de girasol}} \right| \left| \frac{\text{mol}}{284\text{g ácido esteárico}} \right| \left| \frac{216\text{g C}}{\text{mol}} \right| = \frac{0.010\text{g C}}{\text{g}_{\text{si}}}$$

✓ ácido oleico

$$\frac{33.3\text{mg aceite de girasol}}{\text{g}_{\text{si}}} \left| \frac{1\text{g}}{100\text{mg}} \right| \left| \frac{25\text{g ácido oleico}}{100\text{g aceite de girasol}} \right| \left| \frac{\text{mol}}{282\text{g ácido oleico}} \right| \left| \frac{216\text{g C}}{\text{mol}} \right| = \frac{0.063\text{g C}}{\text{g}_{\text{si}}}$$

✓ ácido linoleico

$$\frac{33.3\text{mg aceite de girasol}}{\text{g}_{\text{si}}} \left| \frac{1\text{g}}{100\text{mg}} \right| \left| \frac{64\text{g ácido linoleico}}{100\text{g aceite de girasol}} \right| \left| \frac{\text{mol}}{280\text{g ácido linoleico}} \right| \left| \frac{216\text{g C}}{\text{mol}} \right| = \frac{0.164\text{g C}}{\text{g}_{\text{si}}}$$

Se suman todos los aportes de carbono por la glucosa y el aceite de girasol para tener el carbono total:

$$C_{\text{Total}} = \frac{0.2668\text{g C}}{\text{g}_{\text{si}}} + \frac{0.017\text{g C}}{\text{g}_{\text{si}}} + \frac{0.010\text{g C}}{\text{g}_{\text{si}}} + \frac{0.063\text{g C}}{\text{g}_{\text{si}}} + \frac{0.164\text{g C}}{\text{g}_{\text{si}}} = \frac{0.523\text{g C}}{\text{g}_{\text{si}}}$$

Componentes con Nitrógeno

- Urea

$$\frac{6.7\text{mg urea}}{\text{g}_{\text{si}}} \left| \frac{1\text{g}}{100\text{mg}} \right| \left| \frac{\text{mol}}{60\text{g urea}} \right| \left| \frac{28\text{g N}}{\text{mol}} \right| = \frac{0.031\text{g N}}{\text{g}_{\text{si}}}$$

- Extracto de levadura

El extracto de levadura empleado tiene un promedio de nitrógeno total del 10.75%.

$$\frac{1.7\text{mg extracto de levadura}}{\text{g}_{\text{si}}} \left| \frac{1\text{g}}{100\text{mg}} \right| \frac{10.75\text{g N}}{100\text{g extracto de levadura}} = \frac{0.002\text{g N}}{\text{g}_{\text{si}}}$$

Se suma el aporte de nitrógeno por la urea y el extracto de levadura para obtener el nitrógeno total:

$$N_{\text{Total}} = \frac{0.031\text{g N}}{\text{g}_{\text{si}}} + \frac{0.002\text{g N}}{\text{g}_{\text{si}}} = \frac{0.033\text{g N}}{\text{g}_{\text{si}}}$$

La relación C/N se obtiene del cociente del C_{Total} entre el N_{Total}:

$$\text{Relación C/N} = \frac{\frac{0.523\text{g C}}{\text{g}_{\text{si}}}}{\frac{0.033\text{g N}}{\text{g}_{\text{si}}}} = 15.9$$

La relación C/N del medio de cultivo basal 2X es de 15.9.

Se prosiguió de la misma manera para obtener la relación C/N de cada uno de los medios empleados en los diseños experimentales.

Relación C/N de los medios de cultivo

Se muestra la relación C/N de los tratamientos de los diseños factorial 4², factorial 3² y factorial 3². La actividad lipasa está ordenada de manera ascendente.

Tabla 12.20 Relación C/N de los tratamientos del diseño factorial 4².

Actividad lipasa	Glucosa (mg/gsi)	Aceite de girasol (mg/gsi)	Urea (mg/gsi)	Extracto de levadura (mg/gsi)	Relación C/N
3.0	80	19	26	3.75	3.7
4.3	80	19	18	3.75	5.3
4.6	80	19	22	3.75	4.4
5.7	120	19	18	3.75	7.1
6.7	160	19	22	3.75	7.4
6.9	120	19	22	3.75	5.9
6.9	160	19	26	3.75	6.3
7.0	120	19	26	3.75	5.0
7.1	80	19	14	3.75	6.7
9.9	160	19	18	3.75	8.9
12.3	120	19	14	3.75	9.0
12.5	200	19	22	3.75	8.9
15.0	200	19	26	3.75	7.5
30.3	200	19	14	3.75	13.6
33.8	160	19	14	3.75	11.3
38.0	200	19	18	3.75	10.7

Tabla 12.21 Relación C/N de los tratamientos del diseño factorial 3²A.

Actividad lipasa	Glucosa (mg/gsi)	Aceite de girasol (mg/gsi)	Urea (mg/gsi)	Extracto de levadura (mg/gsi)	Relación C/N
14.5	240	19	8	3.75	26.7
17.2	200	19	8	3.75	22.9
17.2	160	19	8	3.75	19.0
18.3	240	19	12	3.75	18.4
21.4	200	19	12	3.75	15.8
23.4	240	19	16	3.75	14.1
24.5	160	19	16	3.75	10.0
25.9	160	19	12	3.75	13.1
28.4	200	19	16	3.75	12.0

Tabla 12.22 Relación C/N de los tratamientos del diseño factorial 3²B.

Actividad lipasa	Glucosa (mg/gsi)	Aceite de girasol (mg/gsi)	Urea (mg/gsi)	Extracto de levadura (mg/gsi)	Relación C/N
13.8	140	19	12	3.8	7.3
17.2	180	19	12	3.8	9.0
27.0	220	19	12	3.8	17.1
28.3	140	19	16	3.8	8.9
30.6	180	19	16	3.8	11.8
31.6	220	19	16	3.8	14.4
33.0	140	19	20	3.8	13.0
33.9	180	19	20	3.8	10.5
34.3	220	19	20	3.8	11.0