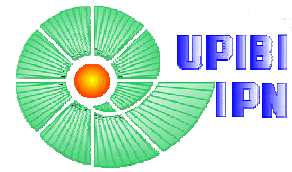


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

TESIS

Presentada para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

por

Claudia Imelda Franco Arteaga
Ingeniero Bioquímico

Optimización de la producción
de fitasa por *Aspergillus niger* en
Fermentación en Estado Sólido
utilizando métodos estadísticos.

Dirigida por

Dr. Edgar Salgado Manjarrez

México, D.F., a 1 de octubre de 2007



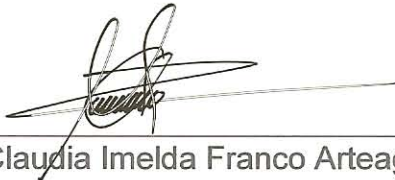
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 1 del mes de octubre del año 2007, la que suscribe Claudia Imelda Franco Arteaga alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos con número de registro B051601, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Edgar Salgado Manjarrez y cede los derechos del trabajo intitulado Optimización de la producción de fitasa por *Aspergillus niger* en Fermentación en Estado Sólido utilizando métodos estadísticos, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, las gráficas o los datos del trabajo sin el permiso expreso del autor o del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección claudia_imelda@yahoo.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Claudia Imelda Franco Arteaga



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 13:00 horas del día 17 del mes de septiembre del 2007 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de UPIBI para examinar la tesis de grado titulada:

Optimización de la producción de fitasas por *Aspergillus niger* en Fermentación en Estado Sólido utilizando métodos estadísticos

presentada por la alumna:

Franco	Arteaga	Claudia Imelda							
Apellido paterno	materno	nombre							
con registro: <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse; text-align: center; width: 150px;"><tr><td>B</td><td>0</td><td>5</td><td>1</td><td>6</td><td>0</td><td>1</td></tr></table> aspirante al grado de Maestro en Ciencias en Bioprocesos.			B	0	5	1	6	0	1
B	0	5	1	6	0	1			

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA


Director de tesis




 Dr. Edgar Salgado Manjarrez



 Dr. Juan S. Aranda Barradas



 Dr. Agustín I. Cabrera Llanos




 Dr. Antonio R. Jiménez Aparicio



 M. en C. Rogelio Ulises Gaona
 Ramírez

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO



 Dr. Edgar Salgado Manjarrez.

Agradecimientos

*Doy gracias a Dios por prestarme
la vida y permitirme concluir esta
etapa profesional.*

*Tengo la fortuna de ser parte de una familia unida.
A mis padres les agradezco el creer en mis ilusiones
y ser siempre participes de ellas. Por sus visitas
detalles y ánimos brindados gracias Marco y
Brenda, ya que después del tiempo que llevo lejos de
casa, jamás me he sentido apartada de mi hogar.*

*Mi mejor amigo y compañero
en estos últimos siete años
ayudándome a recobrar la
confianza en los tiempos de
desesperación y duda. Tú
mejor que nadie conoces el lugar
que tienes en mi corazón,
gracias Hiram.*

Siempre respetando mi punto de vista, me brindó su confianza y un muy buen ejemplo a seguir, gracias Dr. Edgar. Fue un placer trabajar con usted.

Su buen humor en equilibrio con el consejo certero gracias Dr. Juan

Gracias al Dr. Agustín por las facilidades y sugerencias, acompañadas siempre de un comentario de superación.

Le agradezco al M en C Ulises por acceder a pertenecer a mi comité evaluador y por sus sugerencias bien intencionadas.

Agradezco a las buenas amistades que hice en este tiempo, enseñándome a no hacer estereotipos de las personas, hicieron mi camino muy agradable. Por tus consejos de vida Elizabeth, por su franqueza y la confianza depositada en mi Diana y Paola, por las sugerencias académicas Aurora, por mostrarme una fortaleza digna de imitar Dra. Inés y por brindar conversaciones sinceras Nadia.

Por su calidez como ser humano, gracias Dra. Carmen.

A la UPIBI, por hacerme sentir que pertenecía a un lugar en una ciudad extraña.

Índice

Resumen.....	I
Abstract.....	III
Agradecimientos.....	V
Índice.....	IX
Índice de Figuras.....	XI
Índice de Tablas.....	XII
1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	3
2.1 Objetivo general.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3. Marco teórico.....	5
3.1.1 Interacciones del ácido fítico.....	5
3.1.2 Problemas ambientales asociados al fitato.....	6
3.2 Fitasas.....	6
3.2.1 Clasificación de las fitasas.....	7
3.2.2 Fuentes de fitasa.....	8
3.3 Fermentación en estado sólido (FES).....	8
3.3.1 Usos de la fermentación en estado sólido.....	9
3.3.2 Crecimiento de los hongos filamentosos en la FES.....	10
3.4 Diseño de experimentos.....	10
3.4.1 Estrategias de experimentación.....	13
3.4.2 Diseño factorial.....	14
3.4.3 Diseño factorial fraccional.....	20
3.4.4 Diseño experimental Plackett-Burman.....	24
3.4.5 Superficies de respuesta.....	25
3.4.6 Diseño experimental Box-Behnken.....	27
3.4.7 Modelos de regresión.....	29
4. Antecedentes.....	31
5. Justificación.....	35
6. Materiales y métodos.....	37
6.1 Medios de cultivo.....	37
6.1.1 Cajas de aislamiento.....	37
6.1.2 Tubos inclinados Semilla 1.....	37
6.1.3 Matraces de inoculación Semilla 2.....	37
6.1.4 Sustrato para matraces KOJI.....	38
6.2 Inoculación.....	38
6.2.1 Cajas de aislamiento.....	38
6.2.2 Tubos inclinados Semilla 1.....	38
6.2.3 Matraces de incubación Semilla 2.....	38
6.2.4 Matraces KOJI.....	38
6.3 Ensayo enzimático.....	39
6.3.1 Extracción de la enzima.....	39
6.3.2 Determinación enzimática.....	39
6.3.3 Blancos de la reacción enzimática.....	40
6.3.4 Curva tipo.....	40
6.4 Cálculos de las unidades de actividad.....	41

6.5	Diseño experimental.....	41
6.5.1	Efecto de la humedad y el tiempo de Incubación	41
6.5.2	Efecto de reactivos adicionales	42
6.6	Monitoreo de oxígeno y dióxido de carbono.....	42
7.	Resultados y discusión.....	43
7.1	Efecto de la humedad y tiempo de incubación.....	43
7.2	Efecto de reactivos adicionales.....	46
7.2.1	Barrido primario.....	46
7.2.2	Barrido secundario	50
7.2.3	Determinación de factores relevantes.....	52
7.2.4	Determinación de concentraciones óptimas.....	55
7.3	Monitoreo del oxígeno y del dióxido de carbono	63
8.	Conclusiones y perspectivas.....	65
	Referencias	66
	Referencias	67
	Anexos	71
	Balance de carbono	71

Índice de Figuras

Figura 1.- Estructura tridimensional del ácido fítico [2].....	5
Figura 2.- Reacción catalizada por la fitasa [2]	8
Figura 3.- Forma de crecimiento de los hongos filamentosos en estado sólido [44].....	10
Figura 4.- Modelo general de un proceso o sistema [23]	11
Figura 5.- Experimento factorial de 3 factores a 2 niveles	13
Figura 6.- Experimento factorial de 4 factores a 2 niveles	13
Figura 7.- Experimento factorial Fraccionado de 4 factores a dos niveles.....	14
Figura 8.- Experimento factorial de 2 factores con la respuesta (y) indicada en los vértices.....	14
Figura 9.- Experimento factorial sin interacción	16
Figura 10.- Experimento factorial de 2 factores con interacción	16
Figura 11.- Experimento factorial con interacción	17
Figura 12.- a) Superficie de respuesta y b) gráfica de contorno para el modelo $\hat{y} = 35.5 + 10.5x_1 + 5.5x_2$	18
Figura 13.- a) Superficie de respuesta y b) gráfica de contorno para el modelo $\hat{y} = 35.5 + 10.5x_1 + 5.5x_2 + 8x_1x_2$	19
Figura 14.- Las dos fracciones un medio del diseño 2^3	22
Figura 15.- Superficie de respuesta 3D: Rendimiento esperado $m(x_1, x_2)$	26
Figura 16.- Forma gráfica de las funciones	26
Figura 17.- Formas generales de superficies cuadráticas que pueden encontrarse.....	27
Figura 18.- Diseño de Box-Behnken para tres factores (rojo, azul y verde) y tres niveles (+, 0 y -) [23]	28
Figura 19.- Esquemización de los diferentes medios empleados en la investigación.....	37
Figura 20.- Esquemización de la reacción enzimática.	39
Figura 21.- Esquemización de la preparación de los blancos para la reacción enzimática	40
Figura 22.- Esquemización de la preparación de la curva tipo para el ensayo enzimático.....	40
Figura 23.- Efecto del contenido de humedad y los días de incubación en la FES (1 ^{er} barrido). Vista a) 3D y b) superior	43
Figura 24.- Probabilidad normal del error.....	44
Figura 25.- Distribución de la probabilidad normal de los residuales	44
Figura 26.- $y_{estimada}$ con el modelo elegido contra $y_{observada}$	45
Figura 27.- Efecto del contenido de humedad y los días de incubación en la FES (2 ^o barrido). Vista a) 3D y b) superior.....	46
Figura 28.- UF relativas de los 32 experimentos de barrido comparadas con el matraz control "KOJI"	49
Figura 29.- Gráfica de efecto de los 31 factores sobre la actividad de la fitasa	50
Figura 30.- UF relativas de los 12 experimentos de barrido comparadas con el matraz control "KOJI"	51
Figura 31.- Gráfica de efecto de los 11 factores sobre la actividad de la fitasa	52
Figura 32.- UF relativas de los 8 experimentos de barrido comparadas con el matraz control "KOJI"	54
Figura 33.- Gráfica de efecto de los 7 factores sobre la actividad de la fitasa	54
Figura 34.- UF relativas del diseño BB comparadas con el matraz control "KOJI"	56
Figura 35.- Gráfica de efecto sobre la actividad de la fitasa de los 3 factores y sus interacciones	56
Figura 36.- Respuesta observada contra los niveles de cada factor.....	57
Figura 37.- Probabilidad normal de los residuales	59
Figura 38.- Distribución del error porcentual entre y_{est} y y_{obs} para el modelo	59
Figura 39.- Distribución del error en cada uno de los experimentos para el modelo sin interacciones	60
Figura 40.- $y_{estimada}$ con el modelo elegido contra $y_{observada}$	60
Figura 41.- SR con glucosa y Tween 80 con el modelo sin interacciones	61
Figura 42.- SR con glucosa y extracto de levadura con el modelo sin interacciones	62
Figura 43.- SR con extracto de levadura y Tween 80 con el modelo sin interacciones	62
Figura 44.- Gráfica de consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono en la cámara de incubación	64

Índice de Tablas

Tabla 1.- Matriz de Diseño de un experimento de 2 factores a dos niveles con sus interacciones	12
Tabla 2.- Guía para la selección del Diseño de Experimentos [31].....	12
Tabla 3.- Codificación de experimentos para un diseño factorial de 2 factores y 2 niveles	14
Tabla 4.- Número de experimentos para un diseño factorial 2^k	21
Tabla 5.- Niveles positivos y negativos del diseño factorial 2^3	21
Tabla 6.- Diseño Plackett-Burman para 7 factores con 8 experimentos [31]	24
Tabla 7.- Signos positivos y negativos para los Diseños PB [23, 31].....	25
Tabla 8.- Box-Behnken para tres variables o factores [23]	28
Tabla 9.- Parámetros de la estimación lineal considerando el modelo sin el término x_2^2	45
Tabla 10.- Concentraciones asignadas de los reactivos adicionados para PB 31 factores	47
Tabla 11.- Matriz de Diseño Plackett-Burman para 31 factores.....	48
Tabla 12.- Matriz de Diseño Plackett-Burman para 11 factores.....	50
Tabla 13.- Concentraciones asignadas de los reactivos adicionados para PB 11 factores.-	51
Tabla 14.- Matriz de Diseño Plackett-Burman para 7 factores.....	53
Tabla 15.- Concentraciones asignadas de los reactivos adicionados para PB 7 factores	53
Tabla 16.- Concentraciones asignadas a los reactivos adicionados para BB 3 factores a 3 niveles	55
Tabla 17.- Matriz de Diseño Box-Behnken para 3 factores a 3 niveles.....	55
Tabla 18.- Comparación de los modelos de regresión.....	58
Tabla 19.- Parámetros de la estimación lineal considerando una interacción	61

Resumen

El fósforo es almacenado en cereales, leguminosas, semillas, etc. en forma de fitato (mio-inositol hexa cis fosfato), sin embargo, este compuesto no puede ser absorbido por los animales monogástricos, por lo que es necesario adicionar fósforo inorgánico en la dieta de los animales para cubrir la demanda de este nutriente. El fitato no absorbido es excretado en las heces causando un problema ambiental. La razón por la que los animales monogástricos no asimilen el fitato, es debido a la ausencia de fitasa (mio-inositol hexa-cis-fofato fosfohidrolasa, EC 3.1.3.8), enzima que cataliza la liberación del fósforo de la molécula de fitato. Si se adicionan fitasas en la dieta animal, no es necesaria la adición de fósforo inorgánico y la excreción de éste disminuye, controlándose así la contaminación por este mineral.

En el presente trabajo, se llevó a cabo la optimización de la producción de fitasa por *Aspergillus niger* en Fermentación en Estado Sólido (FES). Este tipo de fermentación ofrece ventajas económicas y prácticas, como altas concentraciones de producto, bajos costos de recuperación y purificación, equipos de fermentación simples, reduce las salidas de agua de desecho, bajos costos en el capital invertido y bajos costos de operación

Se determinaron por medio de la metodología de superficie de respuesta, las condiciones de operación óptimas para el contenido de humedad de la matriz sólida y el tiempo de incubación, 60% y 7 días respectivamente; se identificaron los aditivos óptimos para la matriz a través de los diseños experimentales Plackett-Burman y Box-Benhken. De 31 aditivos estudiados, la glucosa y el Tween 80 se seleccionaron por ser los de mayor efecto positivo sobre la producción de enzima. Concentraciones de 12.21 % para glucosa y 0.25% para Tween 80 fueron determinadas como las óptimas.

Abstract

Several cereal grains, legumes and oilseeds, etc., store phosphorus as phytate (myo-inositol hexakisphosphate), a substance that is not absorbed by monogastric animals so inorganic phosphorus has to be added to the feed for meeting the animal demands, while phytate is excreted in the manure causing environmental pollution. Monogastric animals cannot assimilate the phytate due to the absence of the required enzymes in their intestines: the phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase, EC 3.1.3.8), which catalyze the release of phosphate from phytate. If phytases are added to animal feed, phytate can be absorbed, inorganic phosphorous is no longer required and phosphorous excretion is lower so phytases have significant value in effectively controlling phosphorus pollution.

In this work, the optimization of the production of this enzyme by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation (SSF) was addressed. SSF systems offer several economical and practical advantages over more traditional, submerged fermentations, including higher product concentration, improved product recovery, very simple cultivation equipment, reduced wastewater output, lower capital investment, and lower plant operation cost.

Optimal moisture content and optimal incubation time in solid matrix was determined as 60% and 7 days, by a surface response methodology; identification and optimization of supplements were carried out by Plackett-Burman and Box-Benhken experimental designs. From 31 different factors evaluated, Glucose and Tween 80 were selected and the optimal concentration of these supplements was found to be 12.21 % for glucose and 0.25% for Tween 80.

1. Introducción

El fósforo es un macronutriente que forma parte de gran número de compuestos que participan en diversos procesos metabólicos. Por esta razón, su consumo en la dieta de los animales domésticos (caballos, vacas, etc.), así como en los humanos es de gran importancia. El fósforo principalmente se obtiene de plantas y semillas, en las cuales no se encuentra en su forma libre sino como una mezcla de ácido fítico y sales, comúnmente denominada fitato.

Debido a esta forma de almacenamiento del fósforo, los animales monogástricos no pueden degradar al fitato para el aprovechamiento del macronutriente. Por lo que para cumplir con los requerimientos nutricionales, la industria ganadera invierte fuertes cantidades de dinero en la inclusión de fósforo en la dieta de animales de granja. El fitato no degradado, es excretado en las heces, provocando fuertes problemas de contaminación en las tierras donde el pastoreo es abundante.

Una estrategia recientemente empleada para atacar los problemas mencionados, la deficiencia de fósforo en la dieta animal y la contaminación del suelo, es la adición de **fitasa**, una enzima que libera progresivamente los grupos fosfato de la molécula del ácido fítico produciendo compuestos fácilmente asimilables e inoocuos para los organismos consumidores. De esta manera, la adición de fósforo en la dieta es menos necesaria y se reduce su excreción. La fitasa es producida por diferentes microorganismos, entre otros *Aspergillus niger* mediante una Fermentación Sumergida (FSm) o en Estado Sólido (FES). Esta última redonda en procesos más económicos por lo que su uso es cada vez más amplio.

El objetivo de la investigación desarrollada fue incrementar la producción de fitasa producida por *Aspergillus niger* en FES, a través de un estudio de optimización estadística.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Incrementar la producción de fitasa por *Aspergillus niger* en fermentación en estado sólido a través de la modificación de los componentes de medio de cultivo o de las condiciones de fermentación.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar la humedad del sustrato sólido que incremente la actividad de la fitasa producida por *Aspergillus niger* en Fermentación en estado sólido, utilizando la metodología de Superficie de respuesta para encontrar el punto óptimo.
- Determinar el tiempo de incubación óptimo que refleje un incremento en la actividad de la enzima producida por *Aspergillus niger* en Fermentación en Estado Sólido.
- Efectuar experimentos de barrido para definir complementos que afecten positivamente la actividad de la fitasa producida por *Aspergillus niger* en Fermentación en Estado Sólido, utilizando un diseño experimental Plackett Burman.
- Establecer las concentraciones óptimas de los complementos relevantes empleando la metodología de Superficie de respuesta.

3. Marco teórico

El fósforo forma parte de gran número de compuestos, de los cuales los más importantes biológicamente son los fosfatos, quienes participan en diversos procesos metabólicos: desempeñan un papel esencial en los procesos de intercambio de energía (las moléculas de ATP y ADP); son componentes esenciales de los esqueletos y de la dentadura de los animales; forman parte de reacciones en la fotosíntesis, en las funciones nerviosas y en la acción muscular; forman parte de cierto número de coenzimas; intervienen en el mantenimiento osmótico y en el equilibrio ácido-base dentro de los organismos; y también son componentes esenciales en la estructura de los ácidos nucleicos (los cuales representan el material genético hereditario, en los cromosomas) [21, 22].

Las plantas almacenan al fósforo en sus semillas, comúnmente como una mezcla de sales catiónicas del ácido mio-inositol-hexa-cis-fosfato o fitato [4, 12 y 28]. Existen tres terminologías con las que se conoce al compuesto cíclico de la **Figura 1**: fitato, fitin y ácido fítico, estas denominaciones son utilizadas en la literatura para describir su función como sustrato de la enzima fitasa. El término más empleado es fitato, que propiamente se refiere a la mezcla de sales de ácido fítico (mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexa-cis-fosfato, IP6). El término fitin se refiere específicamente al complejo formado entre el fitato y los iones de potasio, magnesio o calcio y por último a la forma libre del mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexa-cis-fosfato se le conoce como ácido fítico [35, 37].

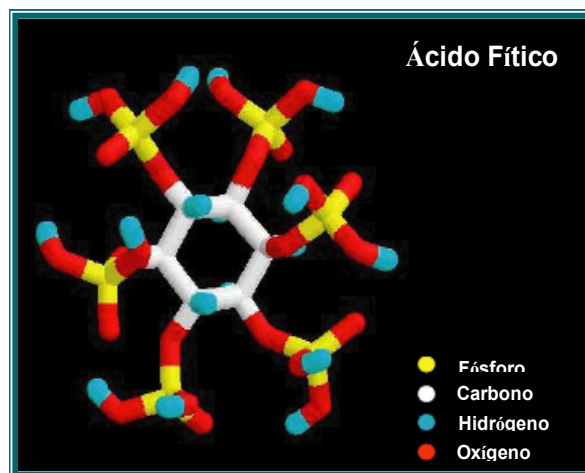


Figura 1.- Estructura tridimensional del ácido fítico [2]

3.1.1 Interacciones del ácido fítico

La ingesta de ácido fítico en algunos animales herbívoros, les ocasiona problemas nutricionales, ya que se une fácilmente con cationes multivalentes, produciendo una reducción en la disponibilidad de estos iones. Además, también inhibe enzimas como la α -amilasa, la tripsina y la tirosina [4, 41].

A pesar de estos efectos adversos, el ácido fítico y sus intermediarios están implicados de forma positiva en: el control de colesterol y los triglicéridos en sangre; en el control de tumores; en el tratamiento de enfermedades como el mal del Parkinson y Alzheimer y en la prevención de la formación de cálculos renales [15, 40]. Para producir suficientes cantidades de estos intermediarios en su forma pura, de los cuales su diferencia radica principalmente en la posición de la liberación del fosfato en anillo del ácido fítico (ver sección 3.2.1), son utilizadas enzimas como las fitasas que escinden las moléculas en sitios específicos.

Al ácido fítico se le considera un factor antinutricional por los efectos que tiene sobre la biodisponibilidad de diversos nutrimentos; por ejemplo [41]:

- a) Seis grupos reactivos en la molécula de IP6 lo hacen un fuerte agente quelante, por lo que con facilidad se une a cationes como el Calcio (Ca^{2+}), Magnesio (Mg^{2+}), Hierro (Fe^{2+}) y Zinc (Zn^{2+}). Bajo condiciones de pH gastrointestinales, se forman estos complejos insolubles (metal-fitato) lo que disminuye la biodisponibilidad de estos metales, para que sean absorbidos por animales y humanos.
- b) Los fitatos reducen la digestibilidad de las proteínas, del almidón y de los lípidos. Los complejos de fitato con las proteínas hacen que estas últimas sean menos solubles haciéndolas más resistentes a la proteólisis. Cuando los polifenoles se unen al ácido fítico, la digestibilidad del almidón es afectada a través de la interacción de la enzima amilasa [6].
- c) Vohra y Satyanarayana (2003) comentaron que ciertas enzimas como la amilasa, la tripsina, la ácido fosfatasa y la tirosinasa son inhibidas como resultado de la presencia del ácido fítico así como por el inositol penta-cis-fosfato [41].

3.1.2 Problemas ambientales asociados al fitato.

Los animales monogástricos, como los cerdos y las aves de granja no asimilan el fósforo que se encuentra dentro de las semillas, granos y plantas ya que carecen de las enzimas capaces de liberar el fósforo del fitato; por lo que los productores se ven en la necesidad de adicionar fósforo de manera sintética en la dieta de los animales [4, 35, 37, 38].

El fósforo adicionado y el fitato no asimilados causan fuertes problemas de contaminación debido a las altas concentraciones de ácido fítico en el excremento, lo que resulta en una acumulación de éste en las tierras de pastoreo y principalmente en los mantos acuíferos [27, 28]. Además cuando el ácido fítico entra a los ríos favorece la proliferación de cianobacterias, las cuales provocan hipoxia y como consecuencia la muerte de animales acuáticos [35, 40].

El peligro de contaminación ambiental es de primordial interés en el mundo; en la Unión Europea las leyes limitan la concentración de fósforo en los excrementos de animales de granja. La inclusión de menores cantidades de fósforo en las dietas es una de las maneras de reducir la excreción de fósforo en las heces; otra alternativa para evitar este tipo de contaminación es adicionar enzimas específicas en la dieta del animal; como la fitasa, que disminuye las concentraciones de ácido fítico y de fósforo en las heces. La FDA (Food and Drugs Administration) en Estados Unidos recomienda reemplazar entre el 0.1 y 0.12 % del fósforo inorgánico adicionado al alimento del ganado por fitasa. También es posible utilizar métodos químicos pero estos son muy costosos y afectan la calidad nutricional del alimento al que es adicionado [4, 28].

3.2 Fitasas

Son enzimas monoméricas, descubiertas en 1907 por Suzuki [4, 5]; tienen una masa molecular aproximada de entre 40 y 700 kDa. Dependiendo de su origen, su temperatura y pH óptimos se encuentran entre 45-60 °C y 4.5-6.0 respectivamente. Las fitasas están clasificadas como parte de la familia de las histidina ácido fosfatasas (HAF), las cuales catalizan la hidrólisis de fosfato del ácido fítico a fosfato inorgánico y derivados de mio-inositol fosfato [4, 37, 38]. Estas enzimas liberan el fósforo del fitato, el cual es la forma de almacenamiento de fósforo en varias semillas y granos.

Las fitasas han sido utilizadas como suplemento, para incrementar el fósforo en la nutrición de los animales de granja y de esta manera reducir el fósforo excretado. Al ser hidrolizado el fitato:

- a) Los intermediarios formados transportan minerales hacia el interior de la célula. Además, estos intermediarios pueden participar como segundos mensajeros o moléculas que interaccionan de manera específica con sustancias del medio, capaces de sufrir transformaciones en su estructura tridimensional. Como consecuencia de esta modificación, se originan cambios en la concentración de ciertas moléculas en el interior de la célula.
- b) Previene la formación de los complejos mencionados en la sección 3.1.1, permitiendo la biodisponibilidad de iones metálicos y proteínas para que sean digeridos y absorbidos por el animal para su crecimiento [6, 41].

3.2.1 Clasificación de las fitasas

Las fitasas en la naturaleza existen clasificadas en dos categorías; la EC 3.1.3.8 y la EC 3.1.3.26, las cuales fueron clasificadas en 1976 por el Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB); esta clasificación depende del sitio en donde se inicie la hidrólisis de la molécula de fosfato [35, 37, 41].

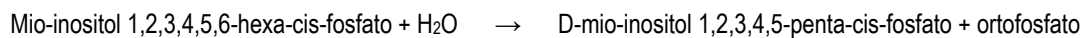
Las enzimas que catalizan la hidrólisis de la unión éster del fosfato en la posición 3 del fitato, reciben los nombres de 3-Fitasa o mio-inositol-hexa-cis-fosfato-3-fosfohidrolasa (también conocida como fitasa 3-fosfatasa), clave EC 3.1.3.8. La mayor parte de estas enzimas son de origen microbiano.

Por otra parte, las enzimas que catalizan la hidrólisis de la unión éster del fosfato en la posición 6 del fitato reciben los nombres de 6-fitasa o mio-inositol-hexa-cis-fosfato 6 fosfohidrolasa (también conocida como fitasa 6-fosfatasa), clave EC 3.1.3.26 y se encuentran principalmente en vegetales. A continuación se presentan las reacciones catalizadas por ambas enzimas:

En la primer lisis de la enzima EC 3.1.3.8:



En la primer lisis de la enzima EC 3.1.3.26:



Según Roopesh y col (2006), Selle y col (2006) y Vohra y col (2003), el inositol penta-cis-fosfato (IP₅), resultante de las reacciones anteriores, puede volver a reaccionar con la enzima, liberando otro grupo fosfato quedando como producto de reacción un inositol tetra-cis-fosfato (IP₄) y así progresivamente (IP₄→IP₃→IP₂→IP₁) [35, 37, 41].

El o los grupos fosfato liberados por acción de la fitasa, producen un compuesto de color azul (fosfomolibdeno) al unirse con molibdato lo que permite detectarlos colorimétricamente, característica empleada para la cuantificación de la actividad de la fitasa [35, 41]. Una forma general de la reacción que cataliza la fitasa es esquematizada en la [Figura 2](#).

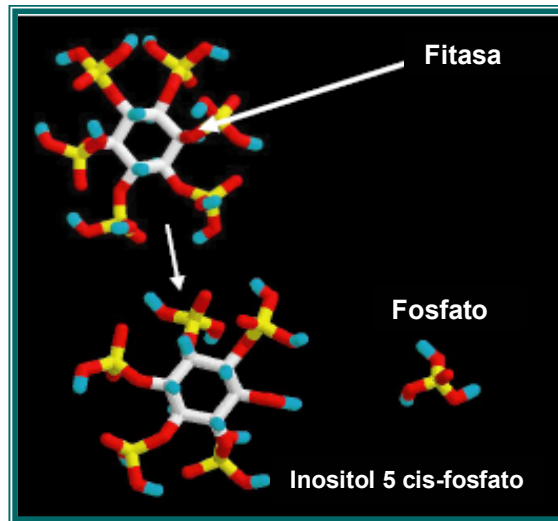


Figura 2.- Reacción catalizada por la fitasa [2]

3.2.2 Fuentes de fitasa

Aunque existe evidencia de fitasa en plantas, animales y microorganismos, solo los últimos pueden ser considerados productores con fines comerciales, en los primeros la fitasa únicamente existe para cubrir las propias necesidades del organismo (animal o vegetal) [41].

En el caso de microorganismos productores de fitasa, algunos ejemplos de bacterias productoras de fitasa; la enzima por lo general es intracelular con excepción de la producida por *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus amylovorus* y *Enterobacter* sp. En el caso de las fitasas de origen fúngico, hay reportes de más de 200 cepas pertenecientes a los géneros de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* y *Rhizopus* para la producción de fitasas; de éstas, *Aspergillus niger* está identificada como la que produce la fitasa con mayor actividad enzimática. Existen también reportes de levaduras productoras de fitasa; como *Schwanniomyces castellii*, *Pichia spartinae* y *Pichia rhodanensis*; y dentro de las levaduras *Arxula adenivorans* fue reportada como una de las levaduras capaces de asimilar el fitato como única fuente de carbono y como fuente de fósforo [41].

3.3 Fermentación en estado sólido (FES)

Los hongos filamentosos crecen naturalmente sobre medios como la superficie terrestre, residuos vegetales, frutos u otra materia orgánica que presentan cierto grado de humedad pero no están inundados, esto es, tienen una actividad de agua relativamente baja. Sin embargo, industrialmente la mayor parte de los hongos filamentosos son cultivados en medios líquidos donde la fracción sólida es relativamente pequeña. Dada la gran diferencia de contenido de agua, las fermentaciones sobre medios con poca humedad se denominan Fermentaciones en Estado Sólido (FES), mientras que aquellas con gran contenido de agua y pocos sólidos se denominan sumergidas (FSm) [25].

En el mundo occidental tradicionalmente la industria de la fermentación cultiva los hongos en caldos nutritivos (FSm); en comparación con los países asiáticos en donde los hongos son cultivados en ausencia de flujos de agua; es decir usan sustratos sólidos como granos de cereales o frijoles (FES). En las últimas décadas, la FES ha sido utilizada, para producir alimentos fermentados de manera que nuevos productos de la FES han sido introducidos al mercado; algo similar se observa en los productos agroindustriales y en los productos farmacéuticos, ejemplos al respecto serán descritos dentro de esta sección.

A pesar de que este tipo de fermentación ha tomado importancia económica en los últimos años, la FES ha recibido poca atención en comparación con la fermentación sumergida y consecuentemente muchos aspectos de la ingeniería bioquímica de las FES siguen siendo poco comprendidos. Las dificultades en el control del proceso y el escalamiento provocan que su desarrollo sea incipiente comparado con la FSm.

En FSm, la biomasa del microorganismo, el oxígeno suministrado mecánicamente y el sustrato están distribuidos homogéneamente en la fase líquida, mientras que en la FES se involucran interacciones heterogéneas de la biomasa con el sustrato húmedo. El azúcar y otros nutrientes son suministrados por la matriz del sustrato húmedo, mientras que el oxígeno está disponible en la continua capa gaseosa. A pesar de estas dificultades, los mayores rendimientos [4, 26, 27] y el ahorro en los procesos de purificación son tales que hacen que la FES sea no sólo competitiva con la FSm en varios productos, sino definitivamente superior [44].

Una de las problemáticas de este tipo de fermentaciones es la generación de calor en la matriz sólida. Este calor puede, además de alejar a la fermentación de su temperatura óptima, reducir drásticamente la poca humedad de la que dispone el microorganismo para sus funciones vitales. Mantener una humedad adecuada en la matriz de crecimiento, es un aspecto que hay que tener en cuenta para contrarrestar los problemas de generación de calor [44].

3.3.1 Usos de la fermentación en estado sólido.

En la naturaleza, los hongos producen diferentes enzimas, varias de ellas son hidrolíticas para poder degradar sustratos que de otra forma no podrían ser asimilados. El empleo industrial de enzimas para la conversión de moléculas, es de alto interés debido a que sus reacciones son altamente específicas y las condiciones de operación no son tan severas como en los procesos netamente químicos. Algunas de estas enzimas son producidas por FES, ejemplos de aplicaciones de este tipo de fermentación son presentados a continuación [24]:

- En la industria de los alimentos la FES puede ser utilizada para la producción de enzimas, ácidos orgánicos, aromatizantes, saborizantes y otros productos de interés. Por ejemplo, para la elaboración de la salsa de soya, ciertas proteasas producidas por *Aspergillus oryzae* en una mezcla de salvado de trigo con hojuelas de soya convierten a la proteína insoluble en pequeños péptidos solubles y aminoácidos los cuales constituyen a la salsa de soya. Otro ejemplo es el ácido cítrico, el cual es un producto importante para la industria de los alimentos como conservador y que recientemente está siendo producido en un proceso por FES, de forma más económica que en FSm, ya que emplea desechos agroindustriales. Algunos otros ejemplos son; la obtención de aroma a piña con *Ceratocystis fimbriata* en FES empleando granos de café como matriz sólida, la producción de ácido glutámico, un poderoso potenciador de sabor por *Brevibacterium* sp. utilizando bagazo de caña como sustrato.
- En la industria farmacéutica algunos ejemplos del uso de la FES son la obtención de penicilina y otros productos secundarios provenientes de hongos, actinomicetos y bacterias quienes tradicionalmente han proporcionado metabolitos para combatir las infecciones fúngicas y bacterianas. Numerosas patentes describen el uso de la FES para la producción de nuevos antibióticos contra *Cryptococcus* sp., *Candida* sp. y *Streptomyces* sp. Un ejemplo en particular es la surfactina, un antibiótico lipopeptídico, que inhibe la coagulación de las redes fibrosas en la sangre y que es producido por *Bacillus* sp en Okara, un residuo sólido del Tofu, un platillo asiático típico derivado de la soya.
- En la industria agropecuaria, los biopesticidas fúngicos son una alternativa amigable para el medio ambiente en comparación con los pesticidas químicos. Por ejemplo, *Coniothyrium minitans*, un antagonista natural del hongo *Sclerotinia sclerotiorum*, patógeno que ataca a más de 360 especies de plantas. Al ser producido por

FES es mejor biopesticida que por FSm, debido a que genera un mayor número de esporas, lo que implica mayor cantidad de biopesticida. Esto mismo se aplica para varios otros biopesticidas.

- Ciertos residuos agroindustriales contienen componentes tóxicos como cianuro de hidrógeno, cafeína, taninos, aflatoxinas, etc. Estos componentes hacen que estos residuos no puedan ser reutilizados, por lo que su disposición es un problema para las industrias que procesan estos residuos, lo que provoca un serio problema ambiental. La FES se ha empleado recientemente para la destoxificación biológica de residuos como las cáscaras de casava, los granos de café, la canola, la pulpa de café, etc. Por ejemplo, la FES de cáscaras de casava ha mostrando una reducción del 95% en los niveles de cianuro de hidrogeno y un 42% menos en los niveles de taninos [24].

3.3.2 Crecimiento de los hongos filamentosos en la FES

Aunque tanto los hongos como las bacterias pueden ser cultivados en FES para producir fitasas, este trabajo sólo se enfocó a la producción de la enzima con hongos filamentosos. Estos, son comúnmente utilizados en las FES, debido a su tolerancia relativa a las bajas actividades de agua, su alto potencial para excretar enzimas (que en este caso es el producto de interés) y por su morfología característica, que les permite el crecimiento sobre y a través de la matriz sólida (ver Figura 3) [42].

Los hongos filamentosos se caracterizan por ser organismos modulares, ya que su crecimiento sigue un patrón de segmentos bien diferenciados, los cuales crecen por iteraciones repetidas dando lugar a estructuras ramificadas. Esta morfología característica, permite que el micelio atraviese la matriz sólida (cereales, granos, semillas sustratos de la FES) y se propague a través de ésta. Lo anterior puede ser apreciado en la Figura 3, la cual muestra el crecimiento característico de estos hongos [42, 44].

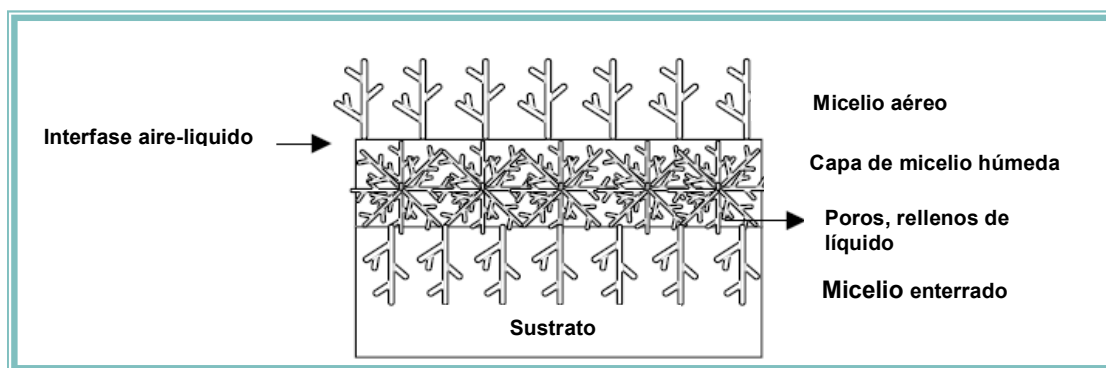


Figura 3.- Forma de crecimiento de los hongos filamentosos en estado sólido [44]

3.4 Diseño de experimentos

Para el desarrollo adecuado de una investigación, siempre es necesario planear de qué forma se van a abordar las problemáticas planteadas, el uso de diseños experimentales facilita el desarrollo y análisis de los resultados obtenidos.

Un proceso o sistema se puede representar como una combinación de fenómenos (ver Figura 4); éste es una combinación de métodos, máquinas, personas u otros recursos que transformen cierta entrada en una salida que tiene una o más respuestas observables; algunas variables del proceso son controlables, mientras que otras no lo son [7, 11, 23]. Un experimento es una prueba o serie de pruebas, en las que se hacen cambios deliberados en las

variables de entrada de un proceso o sistema para visualizar e identificar las razones de los cambios que pudieran observarse en la respuesta de salida [7, 11, 23]. Los objetivos de un experimento pueden ser:

1. Determinar las variables de mayor influencia sobre la respuesta.
2. Determinar cuál es el valor de los factores controlables que tienen mayor influencia para que la respuesta esté lo más cercana a cierto valor deseado.
3. Determinar cuál es el valor de los factores controlables que tienen mayor influencia para que la variabilidad de la respuesta sea reducida.
4. Determinar cuál es el valor de los factores controlables que tienen mayor influencia para que los efectos de las variables no controlables sean mínimos.

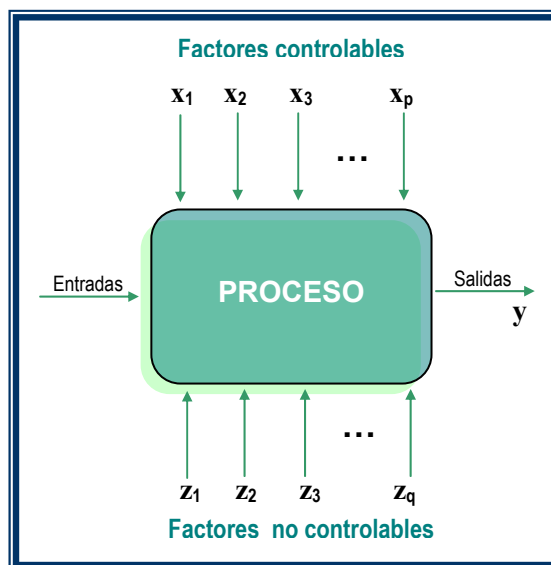


Figura 4.- Modelo general de un proceso o sistema [23]

Para alcanzar los objetivos mencionados, es necesario especificar el tipo de experimento requerido, en función de esto existen cuatro categorías de los diseños de experimentos [7, 23, 31]:

- a) **Diseños comparativos:** Útiles para elegir una opción dentro de varias alternativas existentes, ya sea que éstas tengan un espectro amplio o no, característica que los hace adecuados para comparaciones iniciales y para comparaciones confirmatorias respectivamente.
- b) **Diseños de barrido:** Funcionales para la identificación de factores o efectos importantes, su selección dependerá del número de factores o efectos a analizar.
- c) **Superficie de respuesta:** Modelan el comportamiento del fenómeno para maximizar o minimizar una respuesta, aumentar la exactitud o la precisión, reducir la variación y hacer un proceso robusto o poco sensible a las fuentes de variabilidad externas.
- d) **Modelos de Regresión:** Útiles si se desea modelar una respuesta como una función matemática (ya sea conocida o empírica) de datos continuos y se quiere elegir un buen modelo de estimación de parámetros.

Una vez definidos los objetivos se definen cuales serán las variables relevantes del proceso (esto está en función del efecto supuesto o conocido sobre la respuesta y la posibilidad de control, de la variable), estas incluyen las de entrada al proceso y las de salida (factores y repuestas). Debe procurarse incluir todos los factores importantes y

todas las respuestas relevantes, haciendo uso del conocimiento técnico y teórico previo del proceso, para hacer una mejor elección.

También se deben elegir los niveles de cada factor, por lo general dos niveles y algunos puntos centrales, son los más utilizados ya que son ideales para diseños de barrido o tamizado, son simples y económicos además de que proporcionan la información requerida para experimentos de superficie de respuesta (ver sección 0). Comúnmente los niveles son codificados para su facilidad de manejo, +1 es utilizado como codificación para el nivel superior, -1 para el nivel inferior y 0 para los puntos centrales (estos se agregan para adicionar estabilidad al proceso y observar la curvatura). Algunos autores utilizan la codificación sin colocar el uno, es decir para el nivel superior “+” y para el nivel inferior “-”. En el presente documento se hará uso de esta última notación. Con esta codificación puede representarse al diseño como la matriz que se muestra en la **Tabla 1**, la cual ilustra un experimento de dos factores (x_1 y x_2) a dos niveles cada factor, es decir superior e inferior (+ y -).

Tabla 1.- Matriz de Diseño de un experimento de 2 factores a dos niveles con sus interacciones

<i>I</i>	x_1	x_2	$x_1 \cdot x_2$
+1	-1	-1	+1
+1	+1	-1	-1
+1	-1	+1	-1
+1	+1	+1	+1

Los encabezados de las columnas en la **Tabla 1** se refieren a: los efectos principales, columna x_1 y x_2 , la interacción entre los factores, columna $x_1 \cdot x_2$ y el total de las columnas o promedio del experimento completo, columna *I*. Esta última columna incluye únicamente signos positivos, este vector es particularmente útil cuando se están diseñando experimentos factoriales fraccionados y para hacer la estimación de parámetros (ver apartado 3.4.3 y 3.4.7, páginas 20 y 29).

La codificación también es llamada codificación ortogonal, ya que todas las columnas de la matriz de diseño vistas en forma vectorial, con excepción de la *I* son ortogonales; es decir que el producto punto para cualquier par de vectores debe ser cero (para x_1 y x_2 : $(-1)(-1) + (+1)(-1) + (-1)(+1) + (+1)(+1) = 0$).

Teniendo una idea de los objetivos y del número de factores que se van a estudiar se procede a seleccionar el diseño a utilizar, en la **Tabla 2** se ilustra que se debe de tener en cuenta para la selección adecuada [31].

Tabla 2.- Guía para la selección del Diseño de Experimentos [31]

Número de factores	Objetivo		
	Comparar	Barrido	Superficie de respuesta
1	Diseño de 1 factor completamente aleatorio	-	-
2 - 4	Diseño en bloques completamente aleatorio	Diseño factorial Completo (sección 3.4.2) o Fraccional(sección 3.4.3)	Diseño Central compuesto o Box-Behnken (sección 3.4.6)
5 o más	Diseño en bloques completamente aleatorio	Diseño factorial Fraccional o Plackett-Burman (sección 3.4.4)	Diseños de Barrido

En el siguiente apartado se muestran diferentes formas en las que se puede resolver un problema experimental tomando en cuenta los objetivos planteados, el número de experimentos a desarrollar y la disponibilidad de recursos del experimentador.

3.4.1 Estrategias de experimentación

Los experimentos pueden llevarse a cabo moviendo una variable a la vez; pero esta manera de trabajar implica mayor cantidad de experimentos, que no necesariamente proporcionan información relevante. Con el empleo de un diseño de experimentos se puede obtener la información más relevante, como interacciones entre variables, se ahorra trabajo, en términos del número de experimentos, y se evita la redundancia.

Una estrategia común para trabajar con varios, es el uso de un experimento factorial (sección 3.4.2), estrategia experimental en la que los factores se hacen variar simultáneamente en combinaciones tales que se hace el mejor uso de la información obtenida; por ejemplo la [Figura 5](#) ilustra un diseño 2^3 , en el que cada uno de los ejes representa un factor (líneas de colores) y los extremos de cada línea representan los niveles probados, haciendo un total de 8 experimentos. Si se deseara investigar el efecto de cuatro factores, la representación geométrica de este arreglo es un hipercubo con 16 experimentos (ver [Figura 6](#)). De forma general, si hay k factores, cada uno con dos niveles, el diseño factorial requeriría 2^k corridas, es decir conforme se incrementa el número de factores aumenta exponencialmente el número de corridas, volviéndose cada vez más difícil de realizar por la cantidad de experimentos y recursos utilizados.

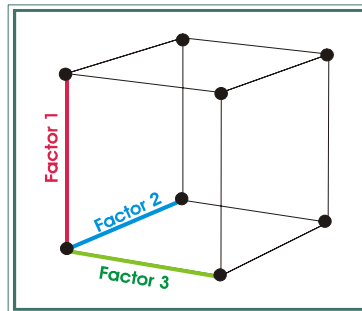


Figura 5.- Experimento factorial de 3 factores a 2 niveles

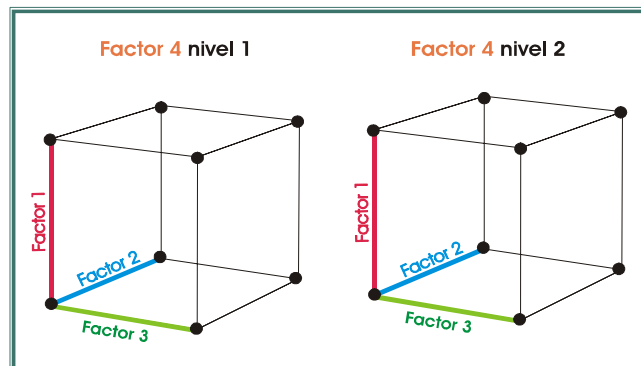


Figura 6.- Experimento factorial de 4 factores a 2 niveles

Cuando se trabaja con cuatro, cinco o más factores, con frecuencia no es estrictamente necesario probar todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores; en este punto se puede hacer uso de los diseños factoriales fraccionados (ver sección 3.4.3), los cuales son una variación de los diseños factoriales básicos, en la que se realiza solo un subconjunto de las corridas. En la [Figura 7](#) se ilustra un diseño factorial fraccionado para la versión de cuatro factores del experimento anterior; este diseño requiere solo 8 corridas (puntos blancos) en lugar de las 16 originales. Estos diseños proporcionan la información adecuada acerca de los efectos principales y solo cierta información acerca de la forma en la que estos factores interactúan. Los diseños factoriales completos y fraccionados, así como algunas de sus variantes serán abordados con más detalle en los siguientes puntos de esta sección.

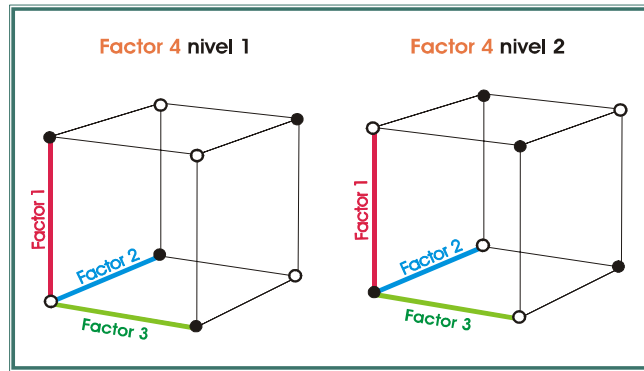


Figura 7.- Experimento factorial Fraccionado de 4 factores a dos niveles

3.4.2 Diseño factorial

En muchos experimentos interviene el estudio de los efectos de dos o más factores. En general los diseños factoriales son los más eficientes para este tipo de experimentos. Por diseño factorial se entiende que cada ensayo o replica completa del experimento se investiga en todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores [7, 23, 31]. Por ejemplo si el factor *A* tiene *a* niveles y el factor *B* tiene *b* niveles, cada réplica tiene todas las *ab* combinaciones de los tratamientos (ver Tabla 3).

Tabla 3.- Codificación de experimentos para un diseño factorial de 2 factores y 2 niveles

Experimento	Codificación	
	Factor A	Factor B
1	A^-	B^-
2	A^+	B^-
3	A^-	B^+
4	A^+	B^+

El efecto de un factor se define como el cambio en la respuesta producida por un cambio en el nivel del factor. Con frecuencia se le llama **efecto principal** porque se refiere a los factores de interés primario en el experimento. Por ejemplo considere el experimento de la Figura 8, en el que dos factores se manejan a dos niveles a estos niveles denominados nivel “inferior” y “superior” (- y +).

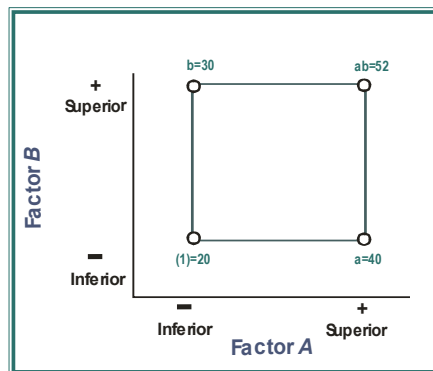


Figura 8.- Experimento factorial de 2 factores con la respuesta (*y*) indicada en los vértices

El efecto principal del factor *A* de este diseño de dos niveles pueden visualizarse como la diferencia entre la repuesta promedio con el nivel inferior de *A* y la respuesta promedio con el nivel superior de *A*. esto es:

$$A = \frac{1}{2n} \{[ab - b] + [a - (1)]\} = \frac{1}{2n} [ab + a - b - (1)] \quad (01)$$

donde n son las réplicas, que para este ejemplo $n = 1$ y (1) , a , b y ab son una forma de notación para la sumatoria de las respuestas de las réplicas en cada combinación; de nuevo, en este caso sólo hay un experimento, es decir no hay replicas. Sustituyendo los valores de las respuestas en la ecuación (01) el efecto de A sería:

$$A = \frac{40 + 52}{2} - \frac{20 + 30}{2} = 21$$

es decir, cuando el factor A se incrementa del nivel inferior al nivel superior se produce un incremento de la respuesta promedio de 21 unidades. También el efecto de A puede deducirse como la diferencia en la respuesta promedio de las dos combinaciones de tratamientos situadas a la derecha del cuadrado de la [Figura 8](#) y las dos combinaciones de tratamientos situadas a la izquierda del cuadrado de esta misma figura; es decir:

$$A = \bar{y}_{A^+} - \bar{y}_{A^-} \quad (02)$$

$$= \frac{ab + a}{2n} - \frac{b + (1)}{2n} = \frac{1}{2n} [ab + a - b - (1)] \quad (03)$$

De manera similar, para el efecto principal de B se calcula como:

$$B = \frac{1}{2n} \{[ab - a] + [b - (1)]\} = \frac{1}{2n} [ab + b - a - (1)] \quad (04)$$

Sustituyendo los valores numéricos del ejemplo en la ecuación (04) se tiene:

$$B = \frac{30 + 52}{2} - \frac{20 + 40}{2} = 11$$

Al igual que con el factor A el efecto de B puede deducirse como la diferencia entre el promedio de las dos combinaciones de tratamientos de la parte superior del cuadrado de la [Figura 8](#) y el promedio de las dos combinaciones de tratamientos de la parte inferior:

$$B = \bar{y}_{B^+} - \bar{y}_{B^-} \quad (05)$$

$$= \frac{ab + b}{2n} - \frac{a + (1)}{2n} = \frac{1}{2n} [ab + b - a - (1)] \quad (06)$$

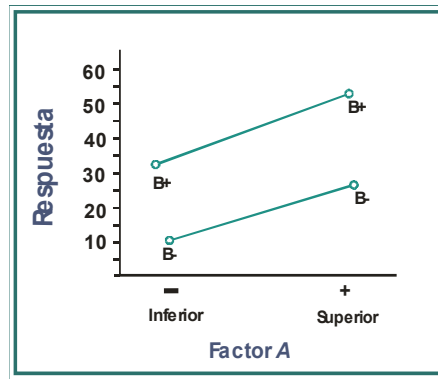


Figura 9.- Experimento factorial sin interacción

En algunos experimentos puede encontrarse que la diferencia en la respuesta entre los niveles de un factor no es la misma para todos los niveles de los otros factores. Cuando esto ocurre, existe una interacción entre los factores. Por ejemplo en la [Figura 10](#) se observa un experimento factorial de dos factores con el nivel inferior de B (o B^-), el efecto de A es:

$$A = 50 - 20 = 30$$

y con el nivel superior de B (o B^+), el efecto de A es:

$$A = 12 - 40 = -28$$

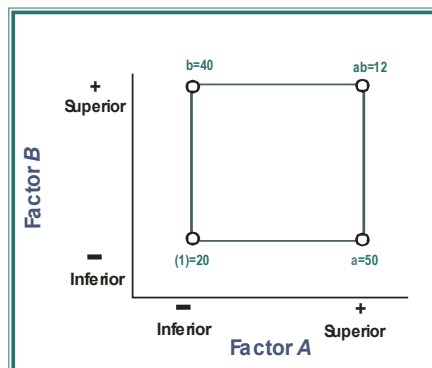


Figura 10.- Experimento factorial de 2 factores con interacción

puesto que el efecto de A depende del nivel que se elige para el factor B , se observa que existe una interacción entre A y B . La magnitud de efecto de la interacción es la diferencia promedio de estos dos efectos de A , o AB

$$A = \frac{-28 - 30}{2} = -29$$

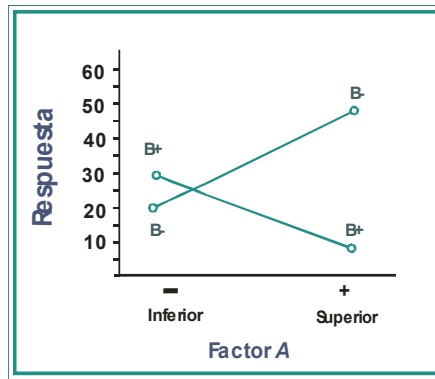


Figura 11.- Experimento factorial con interacción

Si se observan los datos de la [Figura 8](#) graficados en la [Figura 9](#), se tiene que el factor *A* para ambos niveles del factor *B*. las rectas *B*⁻ y *B*⁺ las líneas son aproximadamente paralelas, lo que indica la ausencia de interacción entre los factores *A* y *B*. En contraste, en la [Figura 11](#) se grafican los datos de las respuestas de la [Figura 10](#). En este caso las rectas *B*⁻ y *B*⁺ se cortan lo que indica una interacción entre los factores *A* y *B*.

El concepto de interacción puede ilustrarse de otra manera; suponga que los dos factores del diseño tratado son cuantitativos, es decir pueden medirse. Entonces una representación de un modelo de regresión (ver sección 3.4.7, en la pág. 29) del experimento factorial de dos factores podría escribirse como:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \varepsilon$$

donde *y* es la respuesta, β son los parámetros cuyos valores deben determinarse, *x*₁ es una variable que representa al factor *A*, *x*₂ representa al factor *B*, y ε es un término del error aleatorio. Las variables *x*₁ y *x*₂ se definen en una escala codificada de -1 a +1 (o nivel inferior y superior de *A* y *B*), y *x*₁*x*₂ representan la interacción entre los factores *A* y *B*.

Las estimaciones de los parámetros en este modelo de regresión están relacionadas con las estimaciones de los efectos. Para el experimento ejemplificado en la [Figura 8](#) se encuentra que los efectos principales de *A* y *B* son *A*=21 y *B*=11. Las estimaciones de β_1 y β_2 son la mitad del valor del efecto principal correspondiente:

$$\hat{\beta}_1 = \frac{21}{2} = 10.5 \quad \hat{\beta}_2 = \frac{11}{2} = 5.5$$

El efecto de la interacción de la [Figura 8](#) se calcula como:

$$AB = \frac{ab + (1)}{2n} - \frac{a + b}{2n} = \frac{1}{2n} [ab + (1) - a - b] \tag{07}$$

Sustituyendo en la ecuación (07) sería:

$$AB = \frac{1}{2} [52 + 20 - 40 - 30]$$

AB=1, por lo que el valor del coeficiente de la interacción en el modelo de regresión es:

$$\hat{\beta}_{12} = \frac{1}{2} = 0.5$$

El parámetro β_0 se estima con el promedio de las cuatro respuestas:

$$\hat{\beta}_0 = \frac{20 + 40 + 30 + 52}{4} = 35.5$$

El modelo de regresión ajustado es:

$$\hat{y} = 35.5 + 10.5x_1 + 5.5x_2 + 0.5x_1x_2$$

Las estimaciones de los parámetros obtenidas de esta manera para el diseño factorial en el que todos los factores tienen dos niveles resultan ser estimaciones de mínimos cuadrados. En el caso ejemplificado, la contribución del coeficiente de la interacción $\hat{\beta}_{12} = 0.5$ es pequeño en comparación con los coeficientes de los efectos principales $\hat{\beta}_1$ y $\hat{\beta}_2$; claro que esto depende del valor del nivel empleado para cada factores. Si se considera que la interacción es pequeña, ésta puede ignorarse, por lo que al eliminar el término $0.5x_1x_2$ el modelo de regresión queda de la siguiente manera:

$$\hat{y} = 35.5 + 10.5x_1 + 5.5x_2$$

En la [Figura 12](#) se muestra la representación gráfica de este modelo; en el inciso a) de esta figura se tiene una gráfica del plano de los valores de y generados por las diferentes combinaciones de x_1 y x_2 ; este tipo de representación tridimensional se les conoce como gráfica de superficie de respuesta (ver sección 0). En el inciso b) de la misma figura se muestran las líneas de contorno para las respuestas constantes en el plano x_1, x_2 observe como la superficie de respuesta es un plano, y la gráfica de contorno tiene líneas paralelas.

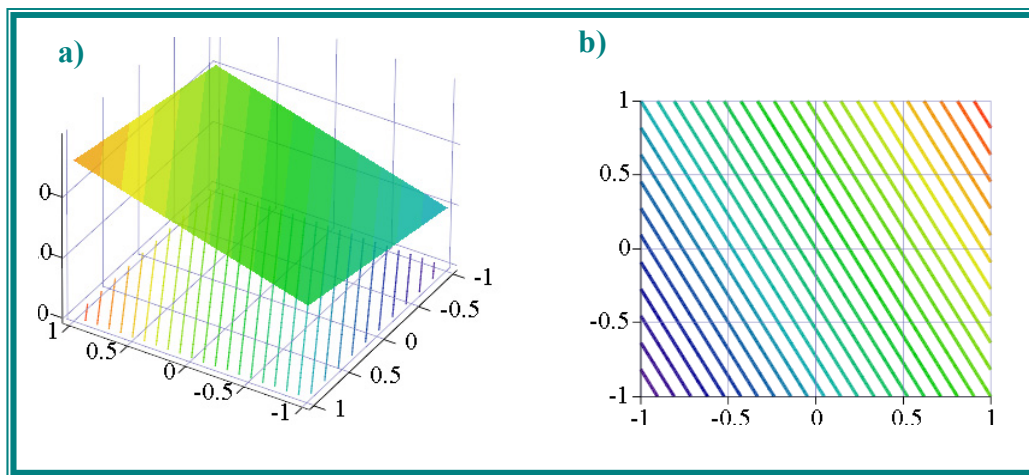


Figura 12.- a) Superficie de respuesta y b) gráfica de contorno para el modelo $\hat{y} = 35.5 + 10.5x_1 + 5.5x_2$

Si ahora, por ejemplo, se considera que la contribución de la interacción resulto ser significativa, es decir que el coeficiente β_{12} no fuera pequeño. En la [Figura 13](#) se presenta la superficie de respuesta y la gráfica de contorno del modelo:

$$\hat{y} = 35.5 + 10.5x_1 + 5.5x_2 + 8x_1x_2$$

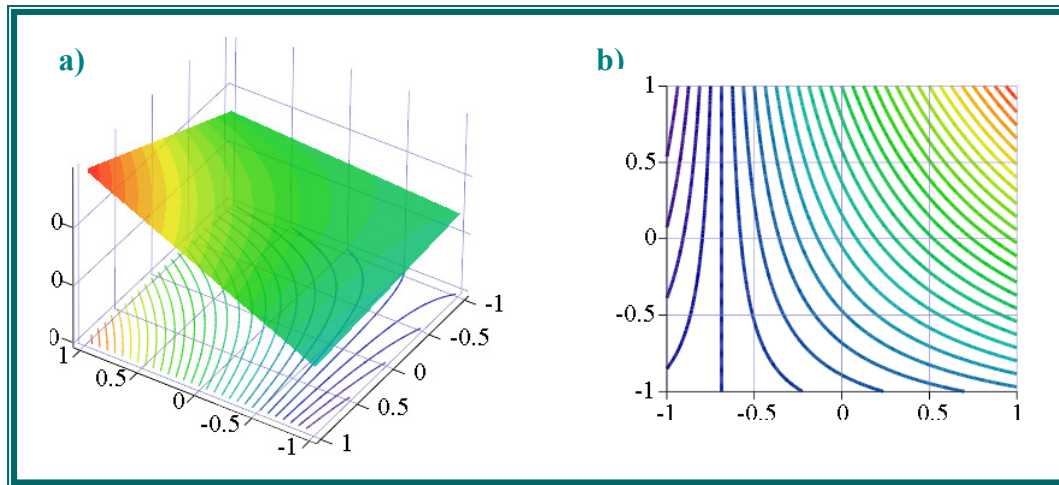


Figura 13.- a) Superficie de respuesta y b) gráfica de contorno para el modelo $\hat{y} = 35.5 + 10.5x_1 + 5.5x_2 + 8x_1x_2$

Si se observa, el efecto significativo de la interacción provoca una deformación del plano de la [Figura 13 a](#). Este torcimiento de la superficie de respuesta produce líneas de contorno curvas para las respuestas constantes en el plano x_1, x_2 como se muestra en la [Figura 13 b](#). Con lo anterior se concluye que una interacción es una forma de curvatura en el modelo de superficie de respuesta; en general cuando una inflexión es grande, los efectos principales correspondientes tienen escaso significado práctico. En el ejemplo de la [Figura 10](#), la estimación del efecto principal de A sería:

$$A = \frac{50 + 12}{2} - \frac{20 + 40}{2} = 1$$

El cual es muy pequeño y se llegaría a concluir que no hay ningún efecto debido al factor A . Sin embargo cuando se examinan los efectos de A con niveles diferentes del factor B se aprecia que no es este el caso. El factor A tiene un efecto pero depende del nivel del factor B , es decir, el conocimiento de la interacción AB es más útil que el conocimiento del efecto principal. Una interacción significativa suele enmascarar la importancia de los efectos principales. Esto se pone de manifiesto en la gráfica de interacción de la [Figura 11](#). En presencia de una interacción significativa, se deben examinar los niveles de uno de los factores, por ejemplo del factor A , manteniendo fijos los niveles de los otros factores para concluir acerca del efecto de A (es decir: si tenemos a, b y c factores, sólo mover por ejemplo a y c con $b=0$)

Resulta útil ajustar una curva de respuesta a los niveles de un factor cuantitativo para que el experimento cuente con una ecuación que relacione la respuesta con el factor. Esta ecuación puede ser utilizada para hacer interpolaciones, es decir, para predecir la respuesta en niveles intermedios entre los factores, respecto de los que se utilizaron realmente en el experimento. Cuando al menos dos de los factores son cuantitativos, puede ajustarse una superficie de respuesta para predecir y con varias combinaciones de los factores del diseño.

En resumen, los diseños factoriales ofrecen varias ventajas:

- Son más eficientes que los experimentos de un factor a la vez.
- Son útiles para detectar interacciones entre factores.
- Permiten la estimación de los efectos de un factor con varios niveles de los factores restantes válidos para un intervalo de condiciones experimentales.

Como se mencionó en la sección 3.4, los diseños factoriales pueden ampliarse para un mayor número de factores; los ejemplos planteados con anterioridad son diseños 2^2 (sin réplicas) ya que manejan dos factores y cada uno de estos a dos niveles. Los diseños factoriales se usan ampliamente en experimentos que incluyan varios factores cuando es necesario estudiar el efecto de los factores sobre una respuesta. El diseño 2^k es de particular utilidad en las etapas iniciales del trabajo experimental, cuando se están investigando muchos factores (k); estos diseños suelen emplearse en experimentos de tamizado o de selección de factores [23, 31].

Para la elección de los niveles en un diseño experimental de cualquier tipo, los siguientes son criterios a considerar [31]:

- El intervalo del factor debe ser lo suficientemente amplio para que incluya la respuesta óptima para ese factor.
- El intervalo debe ser lo suficientemente amplio para cualquier efecto sea observado.
- El intervalo debe evitar combinaciones de los factores superiores e inferiores ya fijados.

Sin embargo, estos criterios no siempre son evidentes y con frecuencia el óptimo queda fuera del intervalo estudiado.

En el siguiente punto, se abordarán generalidades de los diseños factoriales fraccionados, los cuales se derivan de los diseños factoriales completos.

3.4.3 Diseño factorial fraccional

Cuando el número de factores de un diseño factorial 2^k es elevado, el número de corridas necesarias para realizar una replica completa del diseño rebasa fácilmente los recursos de la investigación. Por ejemplo, una replica completa de un diseño 2^6 requiere 64 corridas (ver Tabla 4). En este diseño, sólo 6 de los 63 grados de libertad corresponden a los efectos principales, y sólo 15 a las interacciones de dos factores. Los 42 grados de libertad restantes se asocian con las interacciones de tres o más factores. Si el experimentador puede suponer razonablemente que ciertas interacciones de orden superior son insignificantes, es posible obtener información de los efectos principales y las interacciones de orden inferior, corriendo únicamente una fracción del experimento factorial completo.

Una de las principales aplicaciones de los diseños factoriales fraccionados, al igual que los factoriales completos, es en los experimentos de tamizado o exploración. Se trata de experimentos en los que se consideran muchos factores y el objetivo es identificar aquellos factores que tiene efectos grandes, cuando es posible que muchos de los factores considerados en un principio tengan un efecto reducido o nulo sobre la respuesta. Entonces los factores que se identifican como importantes se investigan con mayor detalle en experimentos subsecuentes [7, 23, 31]. El uso exitoso de los diseños factoriales fraccionados se basan en tres ideas clave:

1. El principio de efectos esparcidos o escasez de efectos. Cuando hay varias variables, es posible que el sistema o proceso esté dominado principalmente por alguno de los efectos principales y las interacciones de orden inferior.
2. La propiedad de proyección. Los diseños factoriales fraccionados pueden proyectarse en diseños más grandes, empleando alguno de los subconjunto de los factores significativos.
3. Experimentación secuencial. Es posible combinar las corridas de dos o más diseños factoriales fraccionados para ensamblar progresivamente un diseño más grande que permita estimar los efectos de los factores y de las interacciones de interés.

Tabla 4.- Número de experimentos para un diseño factorial 2^k

Factores	Experimentos
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128

Considérese por ejemplo, una situación en la que tres factores, cada uno con dos niveles, son de interés pero no se está en posición de correr las $2^3 = 8$ combinaciones de tratamientos. Sin embargo pueden llevarse a cabo 4 corridas. Esto sugiere una fracción $\frac{1}{2}$ de un diseño 2^3 . Puesto que el diseño tiene $2^{3-1} = 4$ combinaciones de tratamientos, es común llamarlos diseño 2^{3-1} a una fracción un medio del diseño completo 2^3 .

En la **Tabla 5** se muestra la agrupación de niveles positivos y negativos del diseño 2^3 . Supóngase que se seleccionan las cuatro primeras combinaciones de tratamientos *a*, *b*, *c* y *abc* como la fracción un medio con la que se trabajará. Estas corridas se muestran en la parte superior de la **Tabla 5** y la **Figura 14** inciso a.

Tabla 5.- Niveles positivos y negativos del diseño factorial 2^3

Combinación de tratamientos	Efecto factorial							
	<i>I</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>AB</i>	<i>AC</i>	<i>BC</i>	<i>ABC</i>
<i>a</i>	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>b</i>	+	-	+	-	-	+	-	+
<i>c</i>	+	-	-	+	+	-	-	+
<i>abc</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>ab</i>	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>ac</i>	+	+	-	+	-	+	-	-
<i>bc</i>	+	-	+	+	-	-	+	-
<i>(I)</i>	+	-	-	-	+	+	+	-

Observe que el diseño 2^{3-1} se forma seleccionando solo las combinaciones de tratamientos que tienen signo positivo en la columna *ABC*. Por lo tanto a *ABC* se le llama “generadores” de esta fracción en particular. Nótese que la columna *I* de la matriz identidad es siempre positiva, la cual coincide con los signos de la columna *ABC* por lo que: $I = ABC$

A esta relación se le llama relación de definición del diseño. En general, la relación de definición de un diseño factorial fraccionado será, el conjunto de todas las columnas (efecto factorial) que son positivas o iguales a la columna identidad *I*.

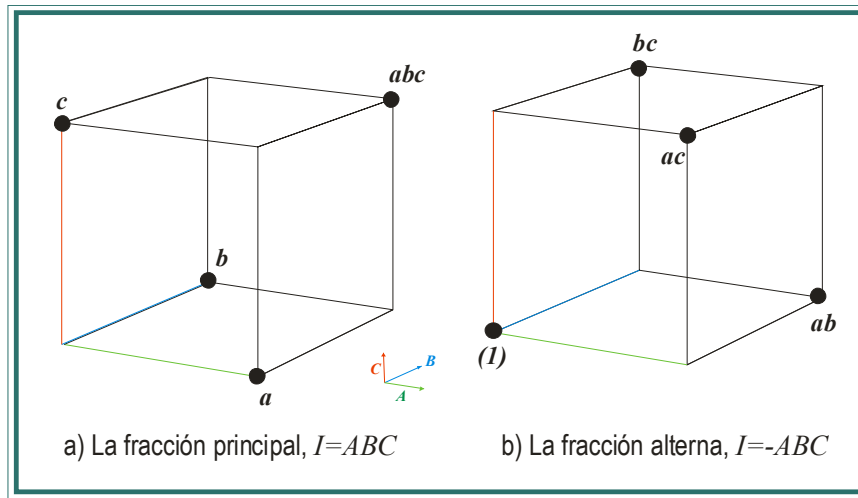


Figura 14.- Las dos fracciones un medio del diseño 2^3

Las combinaciones de tratamientos del diseño 2^{3-1} producen tres grados de libertad que pueden usarse para estimar los efectos principales. Con referencia a la [Tabla 5](#), se observa que las combinaciones lineales de las observaciones usadas para estimar los efectos principales de A , B y C son:

$$l_A = \frac{1}{2}(a - b - c + abc) \tag{08}$$

$$l_B = \frac{1}{2}(-a + b - c + abc) \tag{09}$$

$$l_C = \frac{1}{2}(-a - b + c + abc) \tag{10}$$

Al verificar las combinaciones lineales de las observaciones usadas para estimar las interacciones de dos factores éstas son:

$$l_{BC} = \frac{1}{2}(a - b - c + abc) \tag{11}$$

$$l_{AC} = \frac{1}{2}(-a + b - c + abc) \tag{12}$$

$$l_{AB} = \frac{1}{2}(-a - b + c + abc) \tag{13}$$

Por lo tanto, $l_A = l_{BC}$, $l_B = l_{AC}$ y $l_C = l_{AB}$; en realidad cuando se estima A , B y C , se está estimando en realidad $A + BC$, $B + AC$ y $C + AB$. A dos o más efectos que tienen esta propiedad se les conoce como "alias"; en este caso A y BC son alias, B y AC son alias y C y AB son alias, esto también puede indicarse con la notación:

$$l_A \rightarrow A + BC \tag{14}$$

$$l_B \rightarrow B + AC \tag{15}$$

$$l_C \rightarrow C + AB \tag{16}$$

La estructura de los alias para este ejemplo puede determinarse con facilidad, utilizando la relación de definición $I = ABC$, al multiplicar cualquier columna (o efecto) por la relación de definición se obtienen los alias de esa columna (o efecto). Para este caso el alias del factor A es:

$$A \cdot I = A \cdot ABC = A^2BC \tag{17}$$

Resolviendo la ecuación (17) y recordando que el cuadrado de cualquier columna es la identidad I , se tiene que:

$$A = BC \quad (18)$$

De forma análoga, se pueden encontrar los alias de los factores B y C , ver ecuaciones (19) a la (22).

$$B \cdot I = B \cdot ABC \quad (19)$$

$$B = AB^2C = AC \quad (20)$$

$$C \cdot I = C \cdot ABC \quad (21)$$

$$C = ABC^2 = AB \quad (22)$$

Recuérdese que se está trabajando con la fracción un medio positiva o también llamada fracción principal, con $I = ABC$. Si en lugar de tomar la fracción principal se tomara la otra fracción un medio, es decir, las combinaciones de tratamientos de la [Tabla 5](#) asociadas con los niveles negativos de la columna ABC , la fracción un medio complementaria quedaría compuesta por las corridas identificadas como (I) , ab , ac y b . (ver [Figura 14](#) inciso b). La relación de definición de este diseño es:

$$I = -ABC \quad (23)$$

De la combinación lineal de las observaciones, por ejemplo ℓ'_A , ℓ'_B y ℓ'_C de la fracción alterna, ecuación (23) se obtiene:

$$\ell'_A \rightarrow A - BC \quad (24)$$

$$\ell'_B \rightarrow B - AC \quad (25)$$

$$\ell'_C \rightarrow C - AB \quad (26)$$

Por lo tanto, cuando se estima A , B y C con esta fracción particular, en realidad se están estimando $A-BC$, $B-AC$ y $C-AB$. En la práctica, no importa cual de las fracciones se usa; ambas fracciones forman parte del diseño 2^3 completo (ver [Figura 14](#)).

Suponiendo que se hubieran corrido las dos fracciones, una después de la otra, se contaría con las ocho corridas asociadas al diseño 2^3 completo; en este punto pueden observarse entonces las estimaciones sin alias de todos los efectos analizados en las ocho corridas como un diseño 2^3 en bloques de cuatro corridas cada uno [[14](#), [23](#), [31](#)]. Esto también podría hacerse sumando y restando la combinación lineal de los efectos de las dos fracciones individuales, es decir:

$$\ell_A \rightarrow A + BC \quad (27)$$

$$\ell'_A \rightarrow A - BC \quad (28)$$

Sumando y simplificando las ecuaciones (27) y (28) se tiene:

$$\frac{1}{2}(\ell_A + \ell'_A) = \frac{1}{2}(A + BC + A - BC) \rightarrow A \quad (29)$$

Restando y simplificando las ecuaciones (27) y (28) se tiene:

$$\frac{1}{2}(\ell_A - \ell'_A) = \frac{1}{2}(A + BC - A + BC) \rightarrow BC \quad (30)$$

Por lo tanto, para los tres pares de combinaciones se obtendría lo siguiente:

i	$\frac{1}{2}(\ell_i + \ell'_i)$	$\frac{1}{2}(\ell_i - \ell'_i)$
A	A	BC
B	B	AC
C	C	AB

Cuando se tiene un gran número de factores puede hacerse un diseño fraccional, conservando los experimentos necesarios para evaluar las interacciones esperadas, si no hay interacciones o se desea simplemente identificar a los factores más relevantes, se pueden eliminar los experimentos para interacciones. Plackett y Burman (1946) desarrollaron un método óptimo para hacer este tipo de experimentos, el cual está explicado en el siguiente apartado.

3.4.4 Diseño experimental Plackett-Burman

El diseño Plackett-Burman (PB), es un diseño factorial fraccionado de dos niveles, con capacidad de evaluar múltiples variables independientes y detectar las variables significativas en un solo experimento. Este diseño permite el estudio de n factores con $n+1$ con pruebas. El diseño PB tradicional consiste en: 8, 12, 16, 20, 24, etc. pruebas, es decir sólo corridas múltiplos de 4. El patrón de codificación de las matrices es necesario consultarlo en la literatura, ya que no se construye sólo con adición de términos. En el artículo de los creadores de este diseño, se explica cómo se construye la matriz y se presenta el patrón del primer renglón de las matrices hasta para 100 pruebas o bien 99 factores [31, 32].

En este diseño los niveles superior e inferior de cada factor son codificados como se mencionó con anterioridad (ver sección 3.4), + y - respectivamente. Este diseño no requiere incluir puntos centrales. La **Tabla 6** muestra una matriz de codificación para 7 factores (x_1, x_2, \dots, x_7) con 8 experimentos. Nótese que cada factor es probado el mismo número de veces tanto en su valor superior como en el inferior, esto provee un balance entre los niveles de cada factor (así el arreglo de experimentos no se ve afectado porque un factor se pruebe en mayores o menores concentraciones) y permite una estimación lineal eficiente para cada uno de éstos [31].

Tabla 6.- Diseño Plackett-Burman para 7 factores con 8 experimentos [31]

Experimentos	Patrón	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	x_7
1	+++ - + - -	+	+	+	-	+	-	-
2	- + + + - + -	-	+	+	+	-	+	-
3	- - + + + - +	-	-	+	+	+	-	+
4	+ - - + + + -	+	-	-	+	+	+	-
5	- + - - + + +	-	+	-	-	+	+	+
6	+ - + - - + +	+	-	+	-	-	+	+
7	+ + - + - - +	+	+	-	+	-	-	+
8	- - - - - - -	-	-	-	-	-	-	-

Los diseños PB en general se obtienen escribiendo el primer renglón, dependiendo del número de factores a estudiar según la codificación de la **Tabla 7**, como una columna o renglón. Entonces se genera una segunda columna o renglón a partir de la primera moviendo los elementos de la columna o renglón hacia abajo o hacia la derecha una posición y colocando el último elemento en la primera posición. Una tercera columna o renglón se produce a partir de la segunda de manera similar, y el proceso continúa hasta que se genera la columna o renglón n . Después se agrega un renglón de signos negativos, completándose así el diseño (ver **Tabla 6**).

Tabla 7.- Signos positivos y negativos para los Diseños PB [23, 31]

Factores <i>n</i>	Experimentos <i>n+1</i>	Codificación del primer renglón
11	12	+ + - + + + - - - + -
19	20	+ + - - + + + + - + - - - - + + -
23	24	+ + + + + - + - + + - - + + - - + - + - - - -
27	28	+ - + + + + - - - - + - - - + - - + + + - + - + - +
35	36	- + - + + + - - - + + + + + - + + + - - + - - - - + - + - + + - - + -

Si el objetivo de la experimentación no es solo la identificación de los factores relevantes, sino también el nivel óptimo de éstos; se pueden realizar experimentos factoriales ya sea completos o fraccionados dependiendo del número de factores con que se esté trabajando; si el número de factores a estudiar no es muy grande (3 o 4) y se desea ahorrar en insumos disminuyendo condiciones extremas en la experimentación, el diseño Box-Behnken es una muy buena opción, éste también permite ajustar curvas de respuesta a los niveles de un factor cuantitativo para visualizar de forma gráfica las condiciones óptimas a las cuales se obtiene la respuesta más alta. El diseño Box-Behnken será explicado en el siguiente apartado [23, 31].

3.4.5 Superficies de respuesta

La Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) son un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas para modelar y analizar problemas en los que una variable de interés es influenciada por otra. El objetivo es optimizar la variable de interés; lo que se logra al determinar las condiciones óptimas de operación del sistema. Estos experimentos están particularmente diseñados para estimar la interacción, el efecto cuadrático y proporciona una idea local de la forma espacial de la respuesta que se está investigando.

Supóngase que se desea encontrar los niveles de glucosa (x_1) días de incubación (x_2) que maximicen el rendimiento del proceso, y . El rendimiento del proceso es una función de los niveles de la glucosa y de los días de incubación, ver ecuación (31) :

$$y = m(x_1, x_2) + \varepsilon \tag{31}$$

Donde ε representa el ruido o error observado en la respuesta y . Entonces, la ecuación de la superficie está representada por $E(y) = m(x_1, x_2)$, por lo general la superficie de respuesta se representa gráficamente como se muestra en la Figura 15 donde se grafica $E(y)$ o el rendimiento del proceso, contra los niveles de x_1 y x_2 . Para ayudar a visualizar la forma de una superficie de respuesta, con frecuencia se grafican los contornos de la superficie, estas gráficas por lo general se proyectan en la base de los cuadrantes (ver Figura 15), cada contorno indica la altura particular de la superficie.

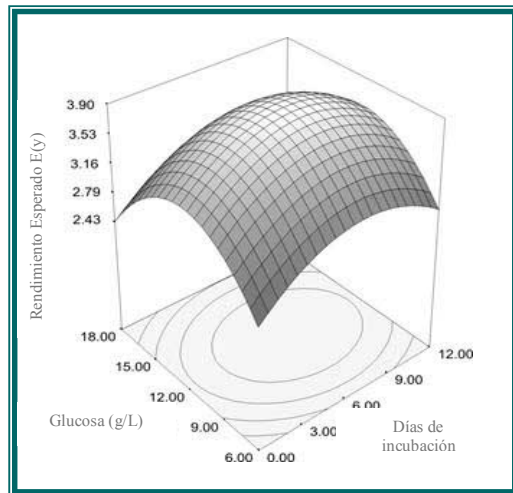


Figura 15.- Superficie de respuesta 3D: Rendimiento esperado $m(x_1, x_2)$

El primer paso de las MSR es encontrar una aproximación adecuada de la relación entre la respuesta (y) y el conjunto de variables independientes mediante la adecuación de un modelo; los modelos de superficie de respuesta pueden involucrar sólo al efecto principal, a las interacciones y también a los términos cuadráticos y cúbicos dependiendo de la curvatura que presente. La descripción completa del comportamiento de un proceso puede requerir un modelo cuadrático o cúbico:

Modelo cuadrático (M^2):

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2$$

Modelo Cúbico:

$$\hat{y} = M^2 + \beta_{123}x_1x_2x_3 + \beta_{113}x_1^2x_3 + \beta_{122}x_1x_2^2 + \beta_{133}x_1x_3^2 + \beta_{223}x_2^2x_3 + \beta_{233}x_2x_3^2 + \beta_{111}x_1^3 + \beta_{222}x_2^3 + \beta_{333}x_3^3$$

Los anteriores son los modelos completos, con todos los términos posibles; pero en la aplicación del modelo raras ocasiones todos los términos son necesarios. El posible comportamiento de las respuestas como función de los factores seleccionados, se ilustra en la **Figura 16**, en cada caso, el valor de la respuesta se incrementa de arriba a bajo y los niveles de cada factor se incrementan de izquierda a derecha. Es decir, si la respuesta se comporta como en el inciso a), para cuantificar ese comportamiento la matriz de diseño necesita tener sólo dos niveles, superior e inferior. Este modelo es una suposición básica de un diseño factorial simple de dos niveles o un factorial fraccionado.

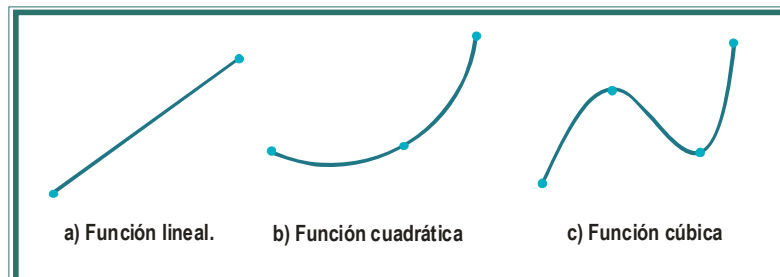


Figura 16.- Forma gráfica de las funciones

Si la respuesta se comporta como en el inciso b) para poder cuantificar la respuesta, el número mínimo de niveles requerido para cada factor es tres. En este comportamiento por lo general se añaden puntos centrales (en otras palabras +, 0 y -). Finalmente, en los casos más complejos como en el que ilustra en el inciso c) la matriz de diseño debe contener al menos cuatro niveles para cada factor. Por lo general un modelo cuadrático es más que suficiente

para describir el comportamiento de un proceso, la forma gráfica de estos puede ser de varios tipos los más comunes que se pueden presentar son los ejemplificados en la [Figura 17](#):

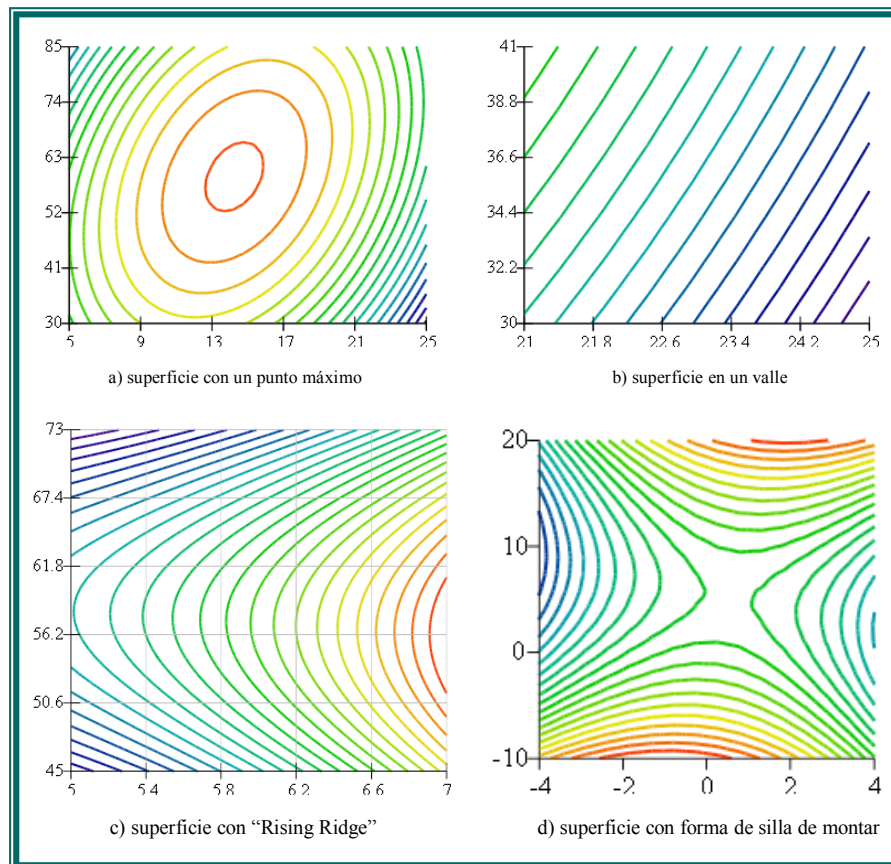


Figura 17.- Formas generales de superficies cuadráticas que pueden encontrarse.

Es importante tener en cuenta que se requieren al menos de tres niveles y dos factores o un factorial 3^2 para poder construir una superficie de respuesta. Los modelos cuadráticos clásicos caen en dos categorías; Los diseños compuestos centrales Box-Wilson y el diseño Box-Behnken; este último será explicado en el siguiente punto.

3.4.6 Diseño experimental Box-Behnken

Estos diseños de tres niveles para 3 ó 4 factores, fueron propuestos por Box y Behnken, los cuales proporcionan información suficiente para obtener de manera confiable el óptimo de un proceso de manera equivalente a una superficie de respuesta, sólo que no se trata de superficies porque al tener más de dos factores no puede representarse el relieve de la respuesta a todos los factores de manera simple; estrictamente se hablaría de volúmenes e hiper-volúmenes.

Estos diseños se forman combinando factoriales 2^k con diseños de bloques incompletos. Los diseños resultantes implican un menor número de corridas o experimentos, la [Tabla 8](#) y la [Figura 18](#) muestran el diseño Box-Behnken en su forma matricial y su forma geométrica respectivamente.

Este diseño es esférico o rotable, lo que permite que la codificación de los factores se conserve aunque éstos cambien de cuadrante, con todos los puntos localizados en una esfera de radio $\sqrt{2}$. Además tiene la característica de no tener ningún punto en los vértices de la región cúbica creada por los límites superior e inferior de cada variable

[23, 31]. Lo anterior es una ventaja cuando los puntos de los vértices del cubo representan combinaciones de los niveles de los factores cuya prueba es costosa o imposible por las restricciones físicas del proceso. En otras palabras, el diseño permite eliminar los experimentos con condiciones extremas (vértices del cubo) que en el laboratorio implicarían una mayor presión, temperatura o cantidad de reactivo, dependiendo de lo que se esté probando.

Tabla 8.- Box-Behnken para tres variables o factores [23]

		Factores		
		x_1	x_2	x_3
Experimentos	1	-	0	-
	2	+	0	-
	3	-	0	+
	4	+	0	+
	5	-	-	0
	6	+	-	0
	7	-	+	0
	8	+	+	0
	9	0	-	-
	10	0	-	+
	11	0	+	-
	12	0	+	+
	13	0	0	0
	14	0	0	0
	15	0	0	0

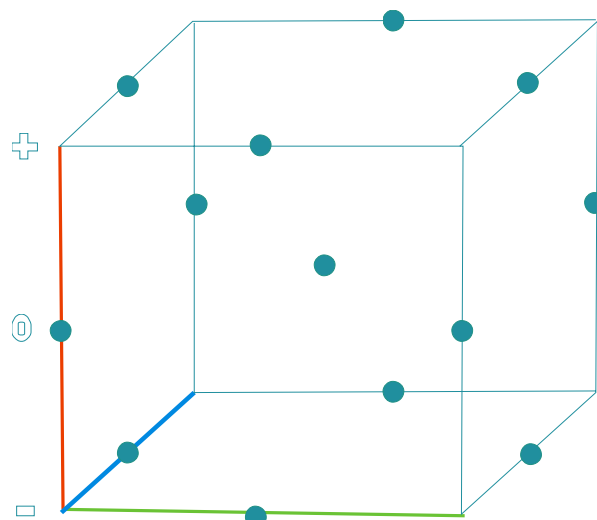


Figura 18.- Diseño de Box-Behnken para tres factores (rojo, azul y verde) y tres niveles (+, 0 y -) [23]

El siguiente apartado aborda la forma matemática para construir los modelos de regresión, en su forma matricial y vectorial

3.4.7 Modelos de regresión

Los modelos de regresión estudian la relación estocástica cuantitativa entre una variable de interés y un conjunto de variables explicativas. Sea Y la variable de interés, variable respuesta o dependiente y sean x_1, x_2, \dots, x_k las variables independientes o regresoras [14, 23, 31]. La forma matemática de estos modelos es la siguiente, ver ecuación (32):

$$Y = m(x_1, x_2, \dots, x_k) + \varepsilon \quad (32)$$

donde ε es el error de observación debido a variables no controladas. En la ecuación (32), la función de regresión $m(x_1, x_2, \dots, x_k)$ es lineal en los parámetros. Por tanto, la expresión matemática del modelo de regresión lineal general es:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon \quad (33)$$

Un primer objetivo en el estudio de este modelo es el de estimar los parámetros $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$. De la expresión matemática del modelo de regresión lineal general, ecuación (33), se deduce que para $i = 1, 2, \dots, n$ se tiene la siguiente igualdad:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \beta_2 x_{i2} + \dots + \beta_k x_{ik} + \varepsilon_i \quad i = 1, 2, 3, \dots, n, \quad (34)$$

donde ε_i es el error aleatorio o perturbación de la observación i -ésima. Al escribir el modelo de regresión lineal general en forma vectorial. De la ecuación (34) se obtiene:

$$\mathbf{Y} = \beta_0 \mathbf{1} + \beta_1 \mathbf{x}_1 + \beta_2 \mathbf{x}_2 + \dots + \beta_k \mathbf{x}_k + \boldsymbol{\varepsilon} \quad (35)$$

La ecuación (35) en forma matricial es:

$$\mathbf{Y} = X\boldsymbol{\beta} + \boldsymbol{\varepsilon} \quad (36)$$

donde \mathbf{Y} es un vector n -dimensional (matriz $n \times 1$) de la variable de respuesta o dependiente, X es la matriz del diseño de las variables regresoras (matriz $n \times (k+1)$). La primera columna de esta matriz está formada por unos y es la columna asociada con el parámetro β_0 ; la columna $j+1$ contiene la información relativa a la variable x_j , $j = 1, \dots, k$, es la columna asociada al parámetro β_j . $\boldsymbol{\beta}$ es el vector $(k+1)$ -dimensional (matriz $(k+1) \times 1$) de los parámetros del modelo, $\boldsymbol{\varepsilon}$ es el vector n -dimensional (matriz $n \times 1$) de las perturbaciones aleatorias. Desarrollando la ecuación (36) se tiene:

$$\begin{pmatrix} y_1 \\ y_1 \\ \vdots \\ y_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1k} \\ 1 & x_{21} & x_{22} & \cdots & x_{2k} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & x_{n1} & x_{n2} & \cdots & x_{nk} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \\ \vdots \\ \beta_k \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \varepsilon_1 \\ \varepsilon_2 \\ \vdots \\ \varepsilon_n \end{pmatrix} \quad (37)$$

La fila i -ésima de la matriz X , $\mathbf{x}_i = (x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{ik})$ se corresponde con los datos de las variables regresoras en el individuo i -ésimo, $i = 1, 2, \dots, n$. Por tanto, la información acerca del individuo i -ésimo está contenida en el vector \mathbf{x}_i . La columna j -ésima de la matriz X , $\mathbf{x}_j = (x_{1j}, x_{2j}, \dots, x_{nj})$ se corresponde con los datos de la variable regresora x_j , $j = 1, 2, \dots, k$. La información acerca de la variable j -ésima está contenida en el vector \mathbf{x}_j [14, 23, 31].

4. Antecedentes.

Los trabajos más relevantes que influyeron en el desarrollo de esta investigación fueron colocados dentro de esta sección para facilitar su ubicación al momento de la discusión:

Experimentos durante el ensayo enzimático:

- Dvorakova, J. y col (1997) realizaron experimentos sobre la adición de iones metálicos durante el ensayo enzimático utilizando *Aspergillus niger*. Ellos determinaron que la actividad de la fitasa se ve inhibida con Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Sn^{2+} , Cd^{2+} y activada con Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} [9].
- Chantasartramee K. y col (2005) realizaron experimentos en *Aspergillus oryzae* sobre la incorporación de metales como Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} y EDTA, durante la determinación de fitasa. Se sabe que las enzimas en su sitio catalítico pueden ser inhibidas por iones metálicos, afectando así la actividad enzimática. Ellos observaron que la actividad fue drásticamente disminuida con el EDTA y el Zn^{2+} . Mientras que con el Fe^{2+} la actividad se incremento un 40 % y con los otros iones la actividad se mantuvo [6].

Experimentos en FES para producción de fitasa:

- Utilizando *Aspergillus carbonarius* en canola, Halase y Duvnjak (1994) encontraron una humedad de entre 53 y 60 % como óptima; además, la adición de glucosa a bajas concentraciones (6 g/L) y surfactantes como oleato de sodio o Tween 80 en el medio incrementaron la síntesis de biomasa y la síntesis de la enzima.
- Ebune y col (1995) utilizaron la fermentación en estado sólido para la producción de fitasa usando *Aspergillus ficuum* sobre canola como sustrato y determinaron una humedad óptima de 64% [10].
- Papagianni y col. (1999) investigaron la relación cualitativa entre la composición de medio, la morfología de *Aspergillus niger* y la producción de fitasa en Fermentación Sumergida así como en Fermentación en Estado Sólido. Ellos reportan que la composición del medio y la morfología del hongo afectan en gran medida la producción de fitasa en Fermentación Sumergida. La adición de salvado de trigo incrementó el crecimiento de *Aspergillus niger* y la producción de fitasa tanto en la Fermentación Sumergida como en la Fermentación en Estado Sólido [29].
- Experimentos similares fueron realizados por Mandviwala y Khire (2000) quienes evaluaron el uso de diferentes residuos agroindustriales a modo de sustratos, tales como el salvado de trigo, los residuos de coco, de algodón, de mostaza, de arroz, la harina de frijol negro; siendo el salvado de trigo con el que se obtuvo una mayor actividad enzimática. Adicionalmente, estudiaron el efecto de:
 - Diferentes humedades en la matriz sólida, 50 % de humedad resulto ser la óptima.
 - La adición de fosfato (KH_2PO_4 , 0–50 mg/100 g de sustrato) en la producción de la enzima el cual presentó un efecto positivo.
 - La adición de surfactantes (Tween 80 y Triton X-100) los cuales incrementaron la actividad de la fitasa en un 14% y 30% más respectivamente.

- La adición de sales ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CaCO_3 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl y KCl) durante la extracción de la enzima de las cuales las sales de zinc retienen en un 50% la actividad de la enzima y las demás no reflejaron ningún efecto en comparación con las pruebas sin adición de sales.

En cuanto a los días y temperatura de incubación ellos obtuvieron la máxima actividad de la enzima después 7 días y a 30°C [20].

- El Batal y col (2001) investigaron el efecto del contenido de humedad en el medio, la concentración de glucosa, fosfato, surfactantes y la radiación gama en la producción de fitasa por *Aspergillus niger*, encontrando que el 60 % de humedad es el valor óptimo. Concentraciones de glucosa superiores al 6% incrementa la producción de fitasa; mientras que del 10 al 20% tiene un efecto adverso. El fosfato a concentraciones de 0.5 mg/g de sustrato sólido favorecen la producción de la enzima. Todos los surfactantes probados a una concentración de 0.5 % v/w (Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, Ácido oleico y Triton X-100) incrementaron la producción de enzima [12].
- El efecto de la edad del inóculo, la composición del medio para la producción de biomasa y el tiempo de fermentación de *Aspergillus niger* en FES fueron investigados mediante un diseño factorial completo por Krishna y col (2001). La combinación de los tratamientos óptimos para la producción de fitasa fue determinada haciendo comparaciones estadísticas entre todos tratamientos, tomando como referencia un tiempo específico de la FES [16].
- En el 2003 Bogar y col determinaron para *Mucor racemosus* como condiciones óptimas 71 % de humedad del sustrato (humedades probadas 38, 55, 64,71 y 75 %), 5.5 de pH (probaron 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 7, 7.8 de pH) y 25°C temperatura de incubación para el ensayo enzimático. Estas condiciones fueron establecidas para un estudio posterior de optimización de suplementos al sustrato, los estudios para la determinación de factores relevantes emplearon un diseño PB para 11 factores, en donde la glucosa, la caseína y el sulfato de amonio presentaron efecto positivo. Para localizar las concentraciones óptimas de estos factores, hicieron uso de diseños compuestos centrales [4].
- Roopesh K y col (2006) encontraron que la máxima producción de fitasa, sobre una mezcla de salvado y semillas de sésamo por *Mucor racemosus* fue obtenida a los 8 días de incubación; mayor tiempo de incubación implicaba un decremento en la actividad de la enzima, probablemente debido a una reducción de los nutrientes, ya que la producción de enzima está asociada al crecimiento. Determinaron que 60 % de humedad en el sustrato es la óptima; ellos suponen que humedades superiores disminuían la actividad de la enzima, ya que mayor agua en el sistema se dificulta la liberación de la enzima. Investigaron el efecto de fuentes adicionales de carbono, que en orden de efectividad son las siguientes: almidón > glucosa > lactosa > sacarosa > manitol en concentraciones del 1%. Ninguna de las fuentes de nitrógeno estudiadas (nitrato de amonio, sulfato de amonio, nitrato de sodio, extracto de levadura peptona) incrementó la producción de enzima [35].

Artículos con diseños de experimentos:

Annadurai G. y Sheeja R. Y. (1998) emplearon un diseño de la Box-Behnken con tres variables; temperatura, pH y tamaño de partícula a tres diferentes niveles, para identificar una correlación significativa entre el efecto de estas variables a la cantidad de colorante fijado por adsorción. Ellos identificaron las principales variables experimentales, que tienen una mayor influencia en el proceso de adsorción [1].

Salo J. P. y col. (1998) emplearon un diseño de Plackett-Burman y un diseño central compuesto con la ayuda del método de mínimos cuadrados parciales para encontrar el valor óptimo de los parámetros para cualquier programa de

computadora que haga estudios de barrido de moléculas de fármacos activas. La localización de estos parámetros implica mucho tiempo. Estos programas computacionales fueron empleados para realizar barridos en las bases de datos de moléculas, para localizar los inhibidores de la proteína putativa quinasa C [36]

Lavilla y col (1999) emplearon un diseño de Plackett-Burman para identificar lo significativo de los factores con influencia en la incineración y para seleccionar las condiciones óptimas de disolución, lo son métodos para determinar los metales traza que tienen repercusión en la salud humana en muestras de plantas. Ellos compararon estadísticamente (ANOVA) los tres métodos empleados [17].

Los trabajos anteriores son relevantes ya que a partir de ellos se seleccionaron los reactivos adicionados a la matriz sólida, así como también dieron la pauta para fijar las condiciones iniciales en los experimentos de tamizado. Cabe mencionar que solo se encontró un trabajo en el que se emplee un diseño Plackett-Burman para los experimentos de barrido, ya que todos los otros trabajos realizaron los estudios de forma evolutiva; es decir probando una variable a la vez.

5. Justificación

La Fermentación en Estado Sólido ofrece alternativas de obtención de productos derivados de microorganismos mediante el aprovechamiento de deshecho agroindustriales, los cuales son adecuados para utilizarse como matrices de crecimiento de los hongos filamentosos, como *Aspergillus niger*, para la producción de fitasa. Hay evidencia suficiente para creer que los rendimientos de fitasa obtenidos en FES sin aditivos con la cepa disponible pueden ser mejorados modificando las condiciones de operación y adicionando suplementos a la matriz sólida; por lo que se justifica un estudio formal de optimización.

6. Materiales y métodos

6.1 Medios de cultivo

Para mayor comprensión de la metodología empleada para el desarrollo de esta investigación en la [Figura 19](#) se ilustra el orden cronológico para la inoculación de los matraces KOJI. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado para tener una mayor certeza de las respuestas obtenidas.

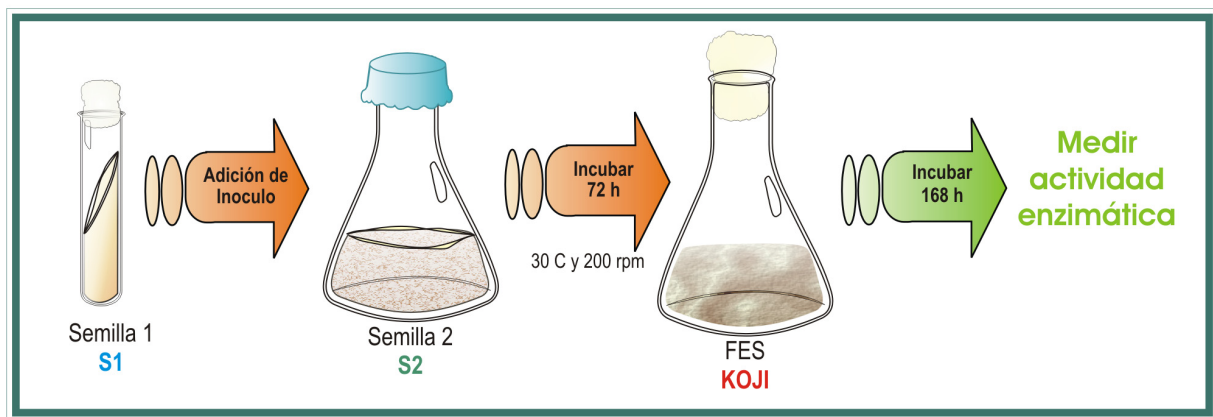


Figura 19.- Esquematización de los diferentes medios empleados en la investigación

6.1.1 Cajas de aislamiento

Para el aislamiento de microorganismos se utilizaron cajas petri con agar papa dextrosa al 3.9% (39 g con agua tridestilada suficiente para alcanzar 1000 mL). El agar fue esterilizado durante 20 min a 1 atm manométrica de presión. Para vaciar las placas se esperó hasta que alcanzaran aproximadamente 40°C con el fin de evitar que mataran a los microorganismos de la suspensión que habían sido previamente (ver sección 6.2.1) colocados en la caja.

6.1.2 Tubos inclinados Semilla 1

Para conservar cepa, se prepararon tubos inclinados (S1) con 10 mL agar papa dextrosa al 3.9 % (39 g con agua tridestilada suficiente para alcanzar 1000 mL), se cerraron con tapones de algodón natural y se esterilizaron en autoclave durante 20 min a 1 atm manométrica de presión; se inclinaron (aproximadamente 1 cm) y se dejaron enfriar.

6.1.3 Matraces de inoculación Semilla 2

Se midieron 2,800 mL de agua tridestilada, se calentó, y se le agregó CaCl_2 se agitó hasta disolver completamente, posteriormente se agregaron las sales restantes (KCl , MgSO_4 , KH_2PO_4), al final se le adicionó el extracto de levadura y se agito hasta disolver completamente. En otro recipiente se calentaron 1,200 mL de agua tridestilada aproximadamente hasta 40°C a la cual se le añadió el almidón, cuando este estuvo completamente disuelto fue adicionado lentamente a la solución preparada con anterioridad; se agitó continuamente y se calentó a fuego lento cuidando que el medio no se quemara; se llevó hasta ebullición y se dejó que éste espesara un poco, se apartó del fuego y se le incorporaron 10 g de salvado de trigo mezclando vigorosamente para homogenizar el medio. Se vertieron aproximadamente 250 mL del medio anterior en matraces de 500 mL, esto con ayuda de un vaso para

evitar derramarlo en la boca del matraz; se taparon con papel manto de cielo sujetándolo con dos ligas, finalmente se cubrió con papel cera sujetándolo también con dos ligas. El tiempo de esterilización fue de 40 min a 1 atm manométrica de presión, posteriormente se deshidrató en un horno (Cole Parmer, 05015-51) a 100°C durante 4 h.

6.1.4 Sustrato para matraces KOJI

La mezcla de salvado de trigo para los KOJI se preparó con una combinación del 70 % de partículas “medianas” (obtenidas entre los tamices de 25 y 60), 25 % de partículas “grandes” (utilizando tamices entre 18 y 14) y 5 % de partículas “pequeñas” (recolectadas con tamices > 80). Posteriormente 10 g de esta mezcla fue colocada en matraces Erlenmeyer de 500 mL y se taparon con tapones de algodón natural y se esterilizaron en una autoclave vertical por 20 min a 1 atm manométrica de presión.

6.2 Inoculación

6.2.1 Cajas de aislamiento

Las cajas de aislamiento se prepararon partiendo de un tubo inclinado con *Aspergillus niger*; se transfirió una colonia completa a un tubo con 10 mL de agua estéril, se agitó con ayuda del Vortex marca Thermolyne modelo max-imix II de 4 a 5 min, se filtró con ayuda de un embudo con algodón estéril; de este filtrado se tomó 1 mL y se colocó en cajas petri, se les adicionó el agar papa dextrosa y se mezcló perfectamente para que el crecimiento de las colonias fuera homogéneo. Las cajas fueron incubadas a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por 5 días.

6.2.2 Tubos inclinados Semilla 1

De las cajas de aislamiento, se eligieron y separaron colonias de *Aspergillus niger* con ayuda de un asa micológica (punta en “L”) estéril, evitando la mayor cantidad posible de agar, posteriormente se transfirió esa colonia a un tubo inclinado (S1). Este proceso se repitió varias veces para tener suficientes tubos con cepa, se incubaron a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por 15 días. Los tubos se almacenaron a 4°C para su uso posterior.

6.2.3 Matraces de incubación Semilla 2

Se realizó una inoculación masiva transfiriendo la mitad de una colonia de *Aspergillus niger* (tubo inclinado, S1) a un medio para segunda semilla, procurando que la cepa quedara dentro del medio, se adicionaron 4 gotas de cloranfenicol, se incubó en una incubadora orbital (INO-650 M Marca SEV) operada durante 72 h a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ a 200 r/min. Estos matraces sirvieron de inóculo de los matraces KOJI [16].

6.2.4 Matraces KOJI

Del matraz semilla 2 se preparó una dilución 1:20, adicionando 5 mL de este medio ya hidrolizado en 100 mL de agua estéril; se mezcló para obtener una mezcla homogénea y 8 mL de esta dilución sirvieron como inóculo de los matraces de 500 mL que contenían 10 g de salvado de trigo (sustrato para KOJI) estéril (con este volumen de inóculo se tiene una humedad en la matriz sólida de 44.4 %). Después de inocular, los matraces se golpearon vigorosamente para procurar que el salvado estuviera repartido uniformemente en el fondo del matraz, se incubaron en una incubadora NAPCO Modelo 6100 operada a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 5 días. La humedad, 44.4 % y el tiempo de incubación, 5 días son las condiciones de operación iniciales; la descripción del diseño experimental para la optimización de éstas está descrito en el apartado 6.5.1 en la pág. 41.

6.3 Ensayo enzimático

6.3.1 Extracción de la enzima

La enzima fue extraída de los KOJIS fermentados adicionando 200 mL a 40°C de solución amortiguadora de acetatos (5 mM a pH 5.5, adecuado para no retener actividad enzimática [20, 43]), el contenido de los matraces se molió con ayuda de una batidora de inmersión Oster, Modelo 2614 de 250 vatios, por aproximadamente 30 s, se dejó reposar por 90 min agitando cada 30 min y posteriormente se filtró el contenido de cada matraz con ayuda de un embudo con algodón. El extracto crudo de la enzima obtenida, se diluyó de forma serial para obtener una relación 1:14,000; ésta es la muestra a la que se le determinó la actividad enzimática.

6.3.2 Determinación enzimática

El método para determinar la actividad de fitasa microbiana consiste en cuantificar el ortofosfato liberado de la hidrólisis de ácido fítico a pH 5.5, esta reacción es colorida lo que permite que sea detectable espectrofotométricamente [13, 28]. Para evitar interferencia en la determinación, todo el material ocupado en esta prueba fue lavado meticulosamente con jabón libre de fosfatos y con doble enjuague de una solución al 2 % de H₂SO₄.

Para la reacción, 0.5 mL de una solución sustrato (2.71 g de ácido fítico por litro de solución amortiguadora de acetatos 5 mM a pH 5.5) fueron trasladados con ayuda de una pipeta a tubos de ensaye con capacidad de 10 mL y se colocaron en un baño de 37°C durante 5 min para homogenizar su temperatura. Al tiempo cero se adicionó 0.5 mL de la muestra diluida (dilución 1:14,000) a los tubos con sustrato y se incubaron por 10 min más. Una vez que transcurrieron los 10 min de incubación, se adicionaron 2 mL de solución de paro (en una relación 1:1:2 partes de solución de molibdato de amonio 10 mM, ácido sulfúrico 5 N y acetona grado analítico); esta solución se mantuvo dentro de un baño de hielo para evitar la evaporación de la acetona. Después 30 s de adicionar solución de paro se le adicionó 0.1 mL de ácido cítrico 1 M (esto evita que se evapore la acetona mientras se hacen las lecturas). La densidad óptica del ensayo fue determinada en un espectrofotómetro UV/Vis. S-22 Marca BOECO a 380 nm, utilizando agua como blanco (Ver Figura 20). Esta lectura se identificó como la DOE (Densidad Óptica del Ensayo).

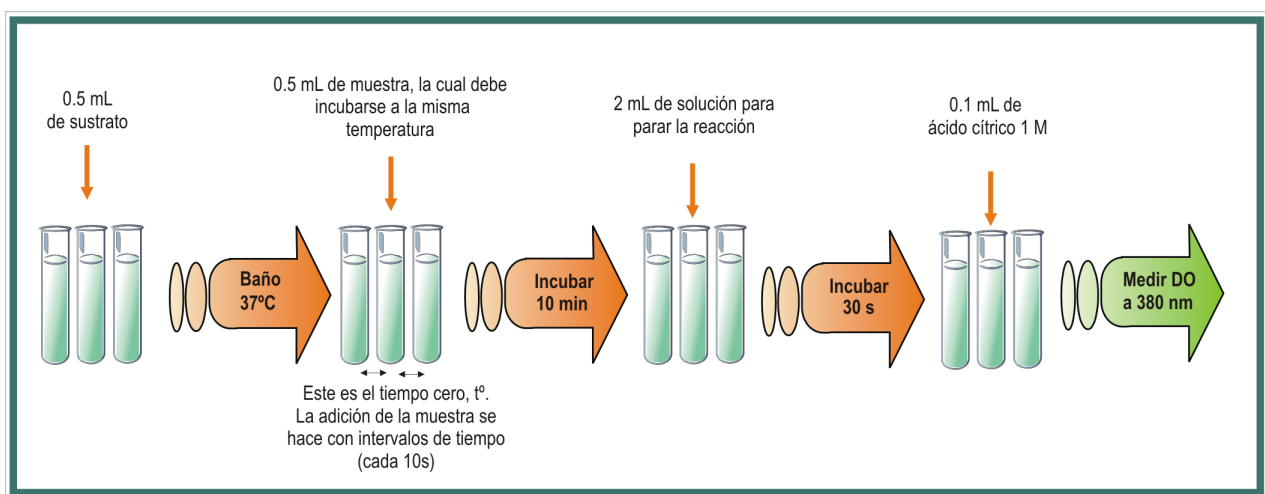


Figura 20.- Esquematización de la reacción enzimática.



6.3.3 Blancos de la reacción enzimática

En tubos de ensaye de 10 mL se adicionaron 0.5 mL de la muestra diluida (dilución 1:14,000), se incubaron durante 15 min, después de este tiempo se les adicionó 2 mL de solución de paro a cada tubo posteriormente se adicionó 0.5 mL de solución de sustrato; después de 30 s se le adicionó 0.1 mL de ácido cítrico 1 M. Se determinó la densidad óptica de los blanco del ensayo (Ver Figura 21).

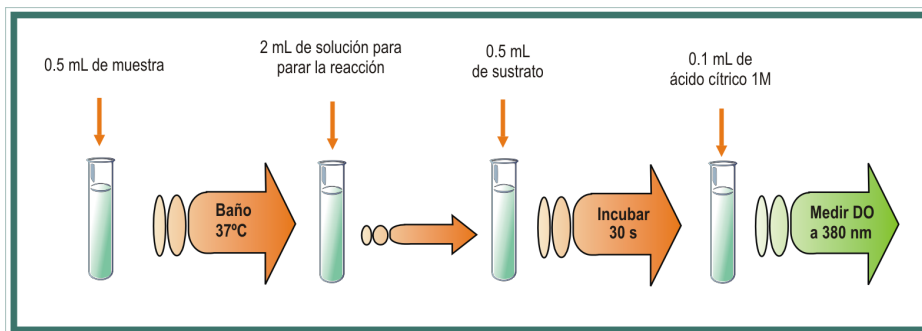


Figura 21.- Esquemización de la preparación de los blancos para la reacción enzimática

6.3.4 Curva tipo

Se preparó una solución madre de fosfato de potasio dihidrógeno (KH_2PO_4) a una concentración de 0.68 g/L, de ésta se prepararon 4 soluciones, tomando 1, 2, 3, y 4 mL agregando agua hasta completar un volumen de 50 mL; estas soluciones estándar contienen respectivamente 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 $\mu\text{mol/mL}$ de fosfato. Con estas soluciones se preparó la curva tipo adicionando 1 mL de cada solución, más los 2 mL de la solución de paro y 0.1 mL de ácido cítrico 1 M. Posteriormente se determinó la absorbancia de la muestra (380 nm). Como blanco de las soluciones estándares, se utilizó 1 mL de agua tridestilada y se trató de igual forma que las soluciones estándar (Ver Figura 22). Las lecturas obtenidas de cada solución estándar se identificaron como DOE1, DOE2, DOE3 y DOE4 (Densidad Óptica del Estándar respectivamente); la lectura del blanco se identificó como DOBES (Densidad Óptica del Blanco de los Estándares).

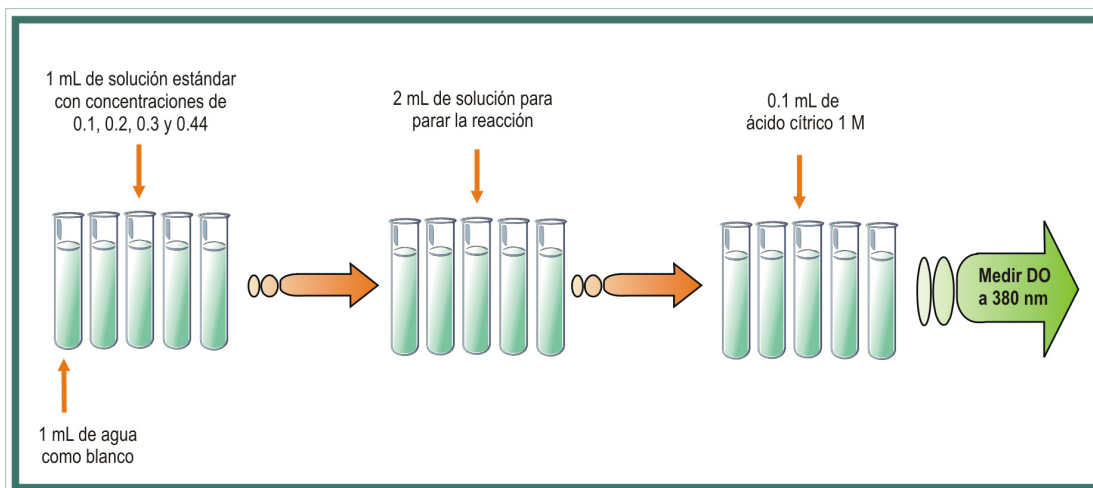


Figura 22.- Esquemización de la preparación de la curva tipo para el ensayo enzimático

6.4 Cálculos de las unidades de actividad

Una unidad de fitasa micromolar (UF) es la cantidad de enzima que libera 1 μmol de fosfato inorgánico por minuto a partir de una solución 2.5 mM de fitato de sodio a 37°C y pH 5.5.

Los cálculos se realizaron restando el valor de absorbancia del blanco de los estándares (DOBES) de cada uno de los valores de absorbancia de los estándares de la curva tipo (DOE1, DOE2, DOE3, DOE4). Se graficaron las diferencias de absorbancia contra la concentración de cada una de las soluciones estándar en $\mu\text{mol/mL}$. Se calculó la pendiente de la recta obtenida en términos de $\mu\text{mol/mL}$ de fosfato al valor de 1.000 de absorbancia a 380 nm. A este valor de la pendiente se le denomina F (Pendiente de Curva Estándar de fitasa).

La actividad de fitasa por gramo, esta dada por:

$$\text{UF} = (\text{DOE} - \text{DOBE}) \times F \times 2 \times 1/10 \times 1/P \times \text{Dilución}$$

Donde:

UF = Unidades de fitasa

DOE: Densidad Óptica de Ensayo.

DOBE: Densidad Óptica del Blanco del Ensayo.

F: Pendiente de la Curva Estándar de fitasa a un valor de absorbancia de 1.000.

x 2: Corrección de volumen, ya que en el ensayo se utilizan 0.5 mL de muestra y el resultado se reporta por mL.

x 1/10: Corrección de tiempo, ya que el ensayo se deja incubar por 10 minutos y la definición de unidad de fitasa es por minuto.

x 1/P: P es el peso original de la muestra, antes de la extracción y la dilución. 1/P es la corrección de peso para poder reportar la actividad en unidades de fitasa por gramo.

Dilución: Es la usada para diluir la muestra hasta lograr un valor de unidades de fitasa entre 0.4 y 0.6 UF/mL.

6.5 Diseño experimental

6.5.1 Efecto de la humedad y el tiempo de Incubación

Para determinar la humedad óptima en los matraces KOJI, la fermentación se llevo a cabo con 48, 53, 55, 57, 60, 64 y 71 % de humedad [4]; ésta se ajusto adicionando el volumen necesario de agua tridestilada estéril a cada matraz que contenía 10 g de salvado de trigo previamente esterilizado y fueron inoculados con 8 mL de la dilución del matraz semilla 2 (ver sección 6.2.4). El cálculo de la humedad adicionada a la matriz sólida se realizó de la siguiente manera:

$$\% \text{ que representa el volumen agregado} = \frac{\text{Peso del volumen de H}_2\text{O adicionado (g)*} + \text{Peso del inoculo (g)*}}{\text{Peso de la matriz sólida (g)} + \text{Peso del inoculo (g)*} + \text{Peso del volumen de H}_2\text{O adicionado (g)*}} * 100 \%$$

Para el estudio del tiempo óptimo de incubación se probaron 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 días de a incubación en una incubadora NAPCO Modelo 6100 operada a 30±2°C. La humedad dentro de la cámara se mantuvo a 99±1 % de Humedad, colocando recipientes con agua dentro de ésta [3].

Los niveles empleados en este trabajo tanto de humedad como del tiempo de incubación están basados en los antecedentes estudiados sobre este tipo de fermentaciones (ver sección 0).

6.5.2 Efecto de reactivos adicionales

El diseño experimental utilizado para desarrollar las pruebas de barrido fue el Diseño Plackett-Burman (ver sección 3.4.4) para 31, 11 y 7 factores (ver la [Tabla 10](#), [Tabla 11](#), [Tabla 12](#), [Tabla 13](#), [Tabla 14](#), [Tabla 15](#)) este diseño permitió examinar múltiples variables independientes con solo un arreglo de experimentos. Las concentraciones de los factores relevantes para incrementar la actividad de la fitasa, fueron determinados mediante el uso de un Diseño Box-Behnken (ver sección 3.4.6), este evalúa los tres factores a tres niveles diferentes entre sí; con estos resultados se construyó la superficie de respuesta.

6.6 Monitoreo de oxígeno y dióxido de carbono.

Para el monitoreo de oxígeno (O_2) y dióxido de carbono (CO_2) se instaló una manguera MASTERFLEX L/S 25 de silicón (peróxido) en el centro de la incubadora para permitir el muestreo sin necesidad de estar abriendo la cámara de incubación y perder parte del gas dentro de ella. El análisis se realizó conectando directamente a la manguera un analizador de gases portátil TESTO 350-S, el cual operó a un flujo de 1 L/min.

La primer lectura fue para conocer con que cantidad de oxígeno iniciaba la fermentación y posteriormente se tomaron muestras cada 24 h. Estas lecturas fueron comparadas con el balance de carbono.

7. Resultados y discusión

7.1 Efecto de la humedad y tiempo de incubación

Para la determinación de la humedad y tiempo de incubación óptimos en los matraces KOJI, se realizó un primer diseño experimental ²³, utilizando intervalos de humedad de 48 a 71 % y de 5 a 7 días de incubación. En la [Figura 23](#) se observa que la humedad óptima de la matriz se encuentra entre un 50 y 60 %. Con respecto al tiempo de incubación, este primer experimento no arrojó datos suficientes para determinar el tiempo de incubación óptimo; puesto que al parecer el óptimo se encuentra fuera del intervalo estudiado. Por esta razón se procedió a realizar segundo experimento con intervalos de humedad y tiempo de incubación de 50 - 60 % y 5-10 días respectivamente. Se decidió trabajar con márgenes menores de humedad, ya que el primer barrido sugirió que humedades mayores al 60% no incrementan la producción de enzima.

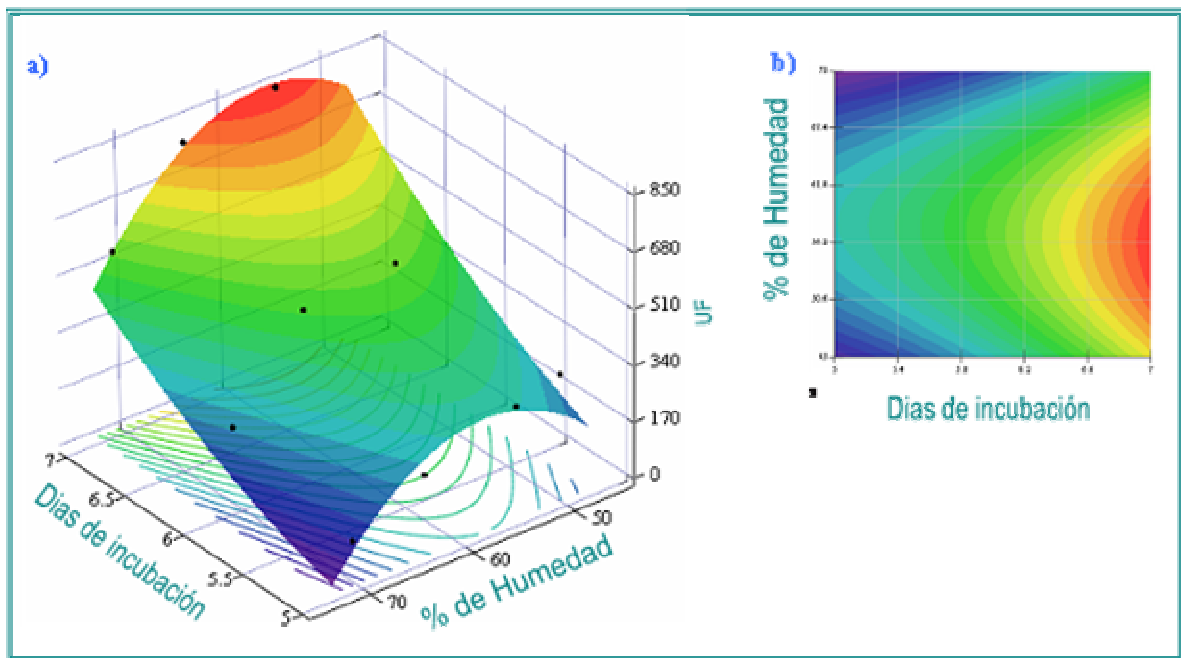


Figura 23.- Efecto del contenido de humedad y los días de incubación en la FES (1^{er} barrido). Vista a) 3D y b) superior

Para la elección del modelo de regresión del segundo barrido, se verificó el ajuste de los datos. Este análisis fue realizado mediante la comparación del modelo de regresión que contenía todos los términos, con los modelos en los cuales alguno de los parámetros parecía ser poco relevante.

En la [Figura 24](#) y [Figura 25](#) se muestra la gráfica de probabilidad normal del error y la distribución de la probabilidad normal de los residuales. En la primera de estas gráficas la linealidad de los datos indica normalidad de los residuos. Algo similar también se aprecia en la [Figura 25](#), en donde se observa que los residuales no están muy alejados de la normalidad. En el caso de la [Figura 26](#), donde se compara el valor calculado con el modelo contra el experimental, se observa que la línea de tendencia es de 45° y que los datos se ajustan bien, puesto que no presentan ninguna tendencia en particular. Además los intervalos de confianza (líneas roja y azul calculadas con una significancia de 0.1) no se encuentran demasiado separados lo que indica que los datos no están tan dispersos.

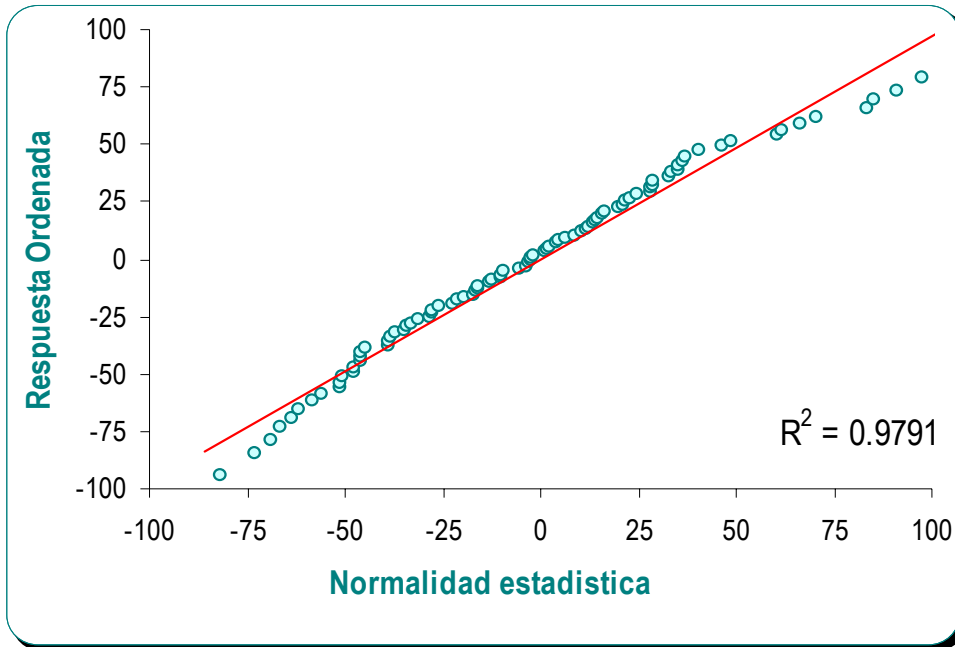


Figura 24.- Probabilidad normal del error

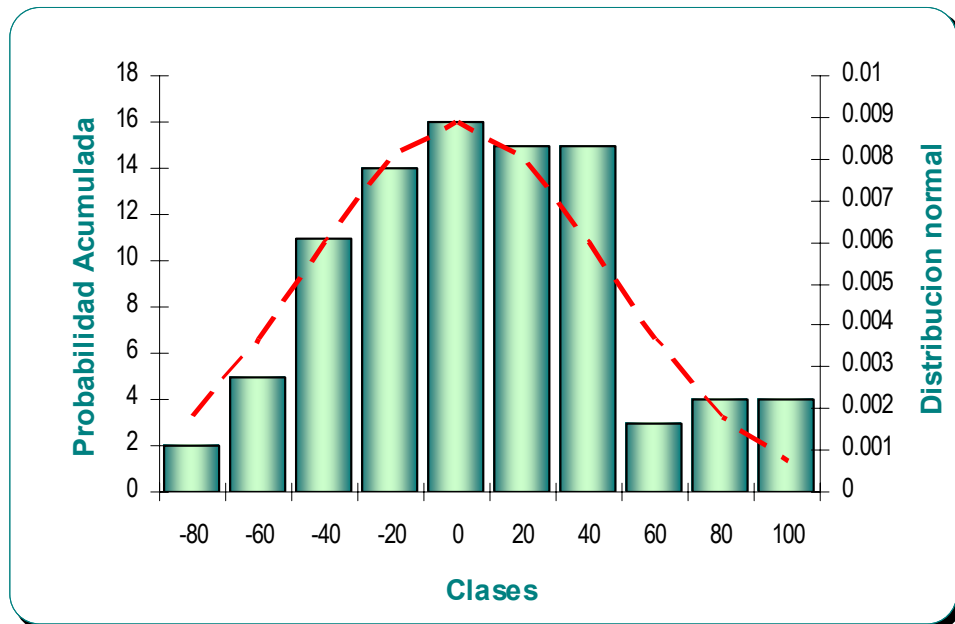


Figura 25.- Distribución de la probabilidad normal de los residuales

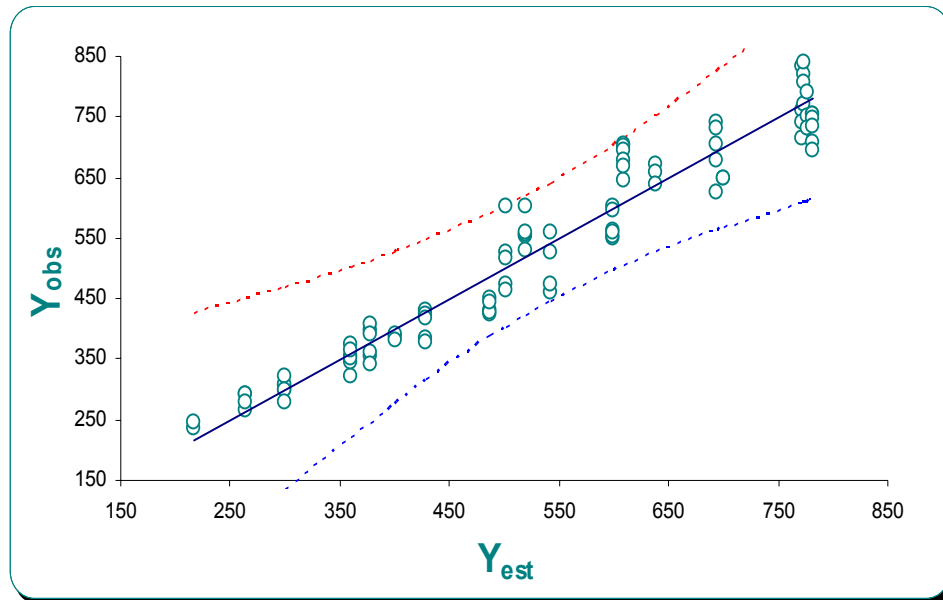


Figura 26.- $y_{estimada}$ con el modelo elegido contra $y_{observada}$.

Lo anterior sugiere que el modelo de regresión sin el término cuadrático para el factor x_2 , ecuación (39), es el modelo que se ajusta mejor a los datos:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{12} x_1 x_2 \tag{38}$$

El modelo seleccionado considera los términos y coeficientes de los efectos principales, solo uno de los términos cuadráticos y la interacción del tiempo de incubación-humedad de la matriz sólida.

Los valores de los coeficientes de la ecuación (38) y los parámetros de la estimación lineal se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9.- Parámetros de la estimación lineal considerando el modelo sin el término x_2^2

	β_{12}	β_{11}	β_2	β_1	β_0
	1.23	-8.28	-13.09	161.58	31.72
ε	0.58	1.97	4.48	40.53	245.92
R^2	0.937	F_{cal}	323.68	GL	87
SCE	2659866.27				

En esta tabla ε representa el error estándar asociado a cada β estimada, el cual indica la probabilidad de que el término sea cero. R^2 es el coeficiente de determinación, compara los valores y estimados, y reales, y los rangos con valor de 0 a 1. Si es 1, hay una correlación perfecta en la muestra, es decir, no hay diferencia entre el valor y estimado y el valor y real. En el otro extremo, si el coeficiente de determinación es 0, la ecuación de regresión no es útil para predecir un valor y . El estadístico F o valor F observado, es útil para determinar si la relación observada entre las variables dependientes e independientes se produce por azar. Los grados de libertad (GL), son empleados para encontrar valores F críticos en una tabla estadística; estos valores encontrados se comparan con los arrojados por la estimación lineal para determinar un nivel de confianza para el modelo. Por último, SCE es la suma de cuadrados del error. Los parámetros R^2 , SCE y F_{cal} sirvieron para evaluar si el modelo seleccionado ajusta bien a los

datos en comparación con aquel que contenía todos los términos; en general no hay gran diferencia en estos parámetros; la principal diferencia radica en el comportamiento de los residuales, el modelo seleccionado es más normal que el modelo de regresión completo.

Con el modelo elegido se construyó la superficie de respuesta. En la **Figura 27** se expone que 14 días de incubación y 60 % de humedad son las condiciones óptimas para incrementar la actividad de la enzima, alcanzando presumiblemente actividades superiores a las 900 UF, las cuales comparadas con las condiciones originales, implican un incremento de 4.5 veces. Aparentemente, la adición de agua a la matriz sólida en la FES provoca que el sustrato se humedezca; lo que facilita el aprovechamiento del sustrato por el microorganismo. De acuerdo a Mandviwala [20], humedades superiores a las óptimas causarían un decremento en la porosidad, alterarían la estructura del salvado, limitan la transferencia de oxígeno y favorecerían la formación del micelio aéreo (incrementándose la esporulación). Por otro lado y según los mismos autores, humedades menores a la óptima reducirían la solubilidad de los nutrientes del sustrato afectando también la producción de la enzima. Es posible asumir que la difusión de la enzima producida, haya sido favorecida por el incremento de agua en el salvado de trigo como comentan El-Batal y col (2001) [12].

Aún cuando los resultados sitúan al tiempo óptimo en 14 días, para la determinación de los aditivos óptimos se utilizaron 7 días dado que después de este tiempo comienza la formación de esporas, lo que no es conveniente para el manejo en la industria por seguridad de los operarios. Además de que el hecho de esperar el doble de tiempo no duplica las UF alcanzadas; así que para fines comerciales muy probablemente es preferible trabajar con dos lotes que esperar 7 días más.

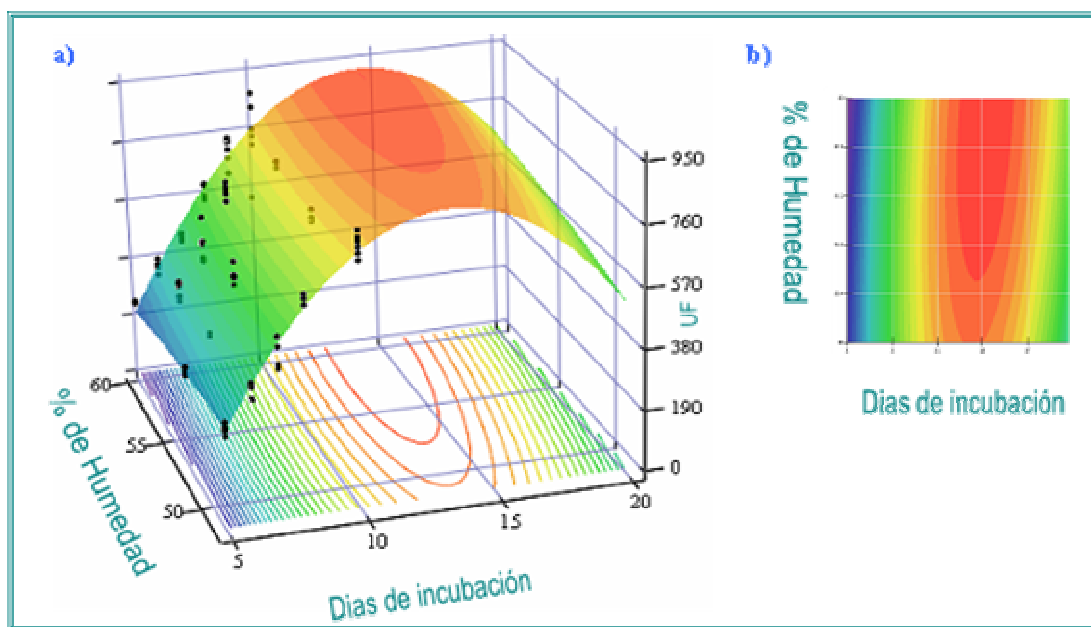


Figura 27.- Efecto del contenido de humedad y los días de incubación en la FES (2º barrido). Vista a) 3D y b) superior

7.2 Efecto de reactivos adicionales

7.2.1 Barrido primario

Conforme a los objetivos planteados (ver sección 2.1), se examinaron diversos reactivos, para encontrar aquellos que presentan efecto positivo. Analizando los diseños mostrados **Tabla 2**, el diseño recomendado para iniciar una optimización de este tipo (por la cantidad de factores a analizar y por lo económico del experimento) es el diseño

Plackett-Burman (PB) ya que, para las 31 sustancias probadas se requerirían, con el diseño factorial completo, 2^{31} experimentos, es decir 2,147,483,648. Un número de experimentos imposible de manejar en el laboratorio. Se estudió la adición de 6 fuentes de carbono, 6 de nitrógeno, 4 metales, 7 ácidos, 2 quelantes, 3 surfactantes, 2 vitaminas y un mineral utilizando las condiciones de operación establecidas en el punto anterior, 7 días de incubación y 55% de humedad. En la **Tabla 10** se muestra la codificación de los reactivos empleados así como las concentraciones utilizadas para cada nivel y la **Tabla 11** proporciona la matriz de diseño de Plackett-Burman.

Tabla 10.- Concentraciones asignadas de los reactivos adicionados para PB 31 factores

No factor	Reactivo	Nivel	
		+1	-1
1	Lactosa	50 g/L	5 g/L
2	Glucosa	50 g/L	5 g/L
3	Sacarosa	50 g/L	5 g/L
4	Manitol	50 g/L	5 g/L
5	Almidón de Maíz	50 g/L	5 g/L
6	Maltosa	50 g/L	5 g/L
7	Nitrato de Amonio	50 g/L	5 g/L
8	Sulfato de Amonio	5 g/L	0.5 g/L
9	Nitrato de Sodio	5 g/L	0.5 g/L
10	Extracto de Levadura	5 g/L	0.5 g/L
11	Peptona	5 g/L	0.5 g/L
12	Urea	5 g/L	0.5 g/L
13	Ácido Láctico	1 mL/L	500 µL/L
14	Ácido Fórmico	1 mL/L	500 µL/L
15	Ácido Cítrico	5 g/L	0.5 g/L
16	Ácido Sulfúrico	1 mL/L	500 µL/L
17	Ácido Fosfórico	1 mL/L	500 µL/L
18	Ácido Fitico	5 g/L	0.5 g/L
19	Ácido Oleico	1 mL/L	500 mL/L
20	STTP	5 g/L	0.5 g/L
21	EDTA	5 g/L	0.5 g/L
22	Tween 20	1 mL/L	500 µL/L
23	Tween 80	1 mL/L	500 µL/L
24	Triton X-100	1 mL/L	500 µL/L
25	Cloruro de Ca	5 g/L	0.5 g/L
26	Sulfato de Cu	5 g/L	0.5 g/L
27	Sulfato de Mg	5 g/L	0.5 g/L
28	Cloruro Fe ³	5 g/L	0.5 g/L
29	Biotina	0.2 g/L	0.02 g/L
30	Tiamina	0.2 g/L	0.02 g/L
31	Fosfato de Potasio	5 g/L	0.5 g/L

efecto positivo en las UF. Los factores restantes, 77.41% tienen una repercusión negativa sobre las unidades de fitasa obtenidas en cada matraz, lo anterior permite entender por qué los experimentos se encuentran por debajo del control.

El comparar los aditivos con efecto positivo, con experimentos previos reportados en bibliografía (ver sección 0) permitió tener un criterio para diseñar los experimentos posteriores. Los aditivos como la Lactosa, el Extracto de Levadura y el Triton X-100 coinciden con la literatura en tener un efecto positivo sobre la producción de fitasa [20, 35, 41]. Lo mismo ocurre en el caso de la Glucosa, el Ácido Oleico, el Cloruro de calcio, el Tween 20, el Tween 80 y el Fosfato de potasio que habían sido probados en el género *Aspergillus* [4, 10, 12, 20, 29, 35]. Sin embargo, se decidió conservar el EDTA a pesar de que los resultados reportados muestran que tiene un efecto inhibitorio; porque la evaluación fue realizada en otros microorganismos y la respuesta obtenida varía de cepa a cepa [6, 41].

Una posible justificación del efecto negativo del fosfato de potasio es porque los niveles iniciales de fósforo en el medio de crecimiento (salvado de trigo) son importantes para la producción de fitasa; un incremento en los niveles del fósforo inorgánico en el medio de crecimiento suprime la síntesis de la enzima [10, 12]; resultados similares fueron obtenidos por El-Batal A.I. y Karem H. A. en 2001 por esta razón para los experimentos subsecuentes los intervalos de fosfato de potasio empleados fueron de 0.5- 5 mg (ver Tabla 13).

Los surfactantes, de acuerdo con la literatura [10, 12], provocan una alteración en la permeabilidad de la célula, lo que resulta en una mayor liberación de la enzima al exterior. Según estos autores, el efecto de la adición de surfactantes al sustrato sólido, de forma general incrementa la liberación de enzima aunque esto varía de microorganismo a microorganismo. Si la concentración del surfactante excede el nivel óptimo, el efecto de estimulación cambia por un efecto inhibitorio. Por esta razón, al comparar lo obtenido experimentalmente con la literatura se decidió bajar los intervalos de concentraciones a 0.15 – 0.3% v/w.

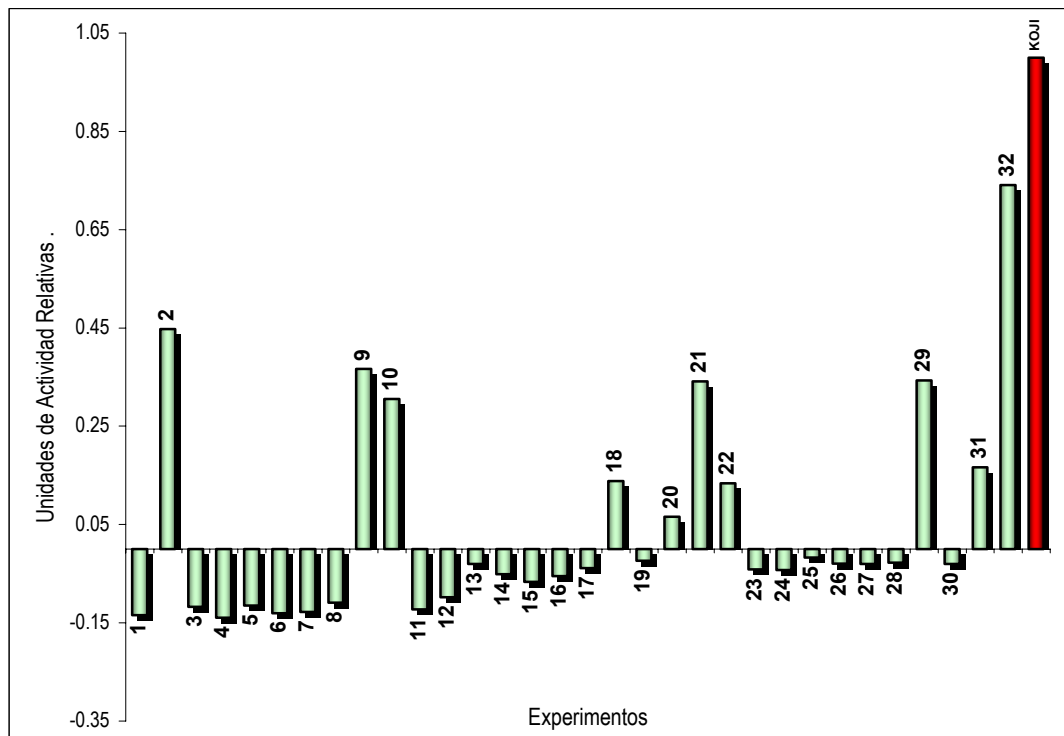


Figura 28.- UF relativas de los 32 experimentos de barrido comparadas con el matraz control "KOJI"

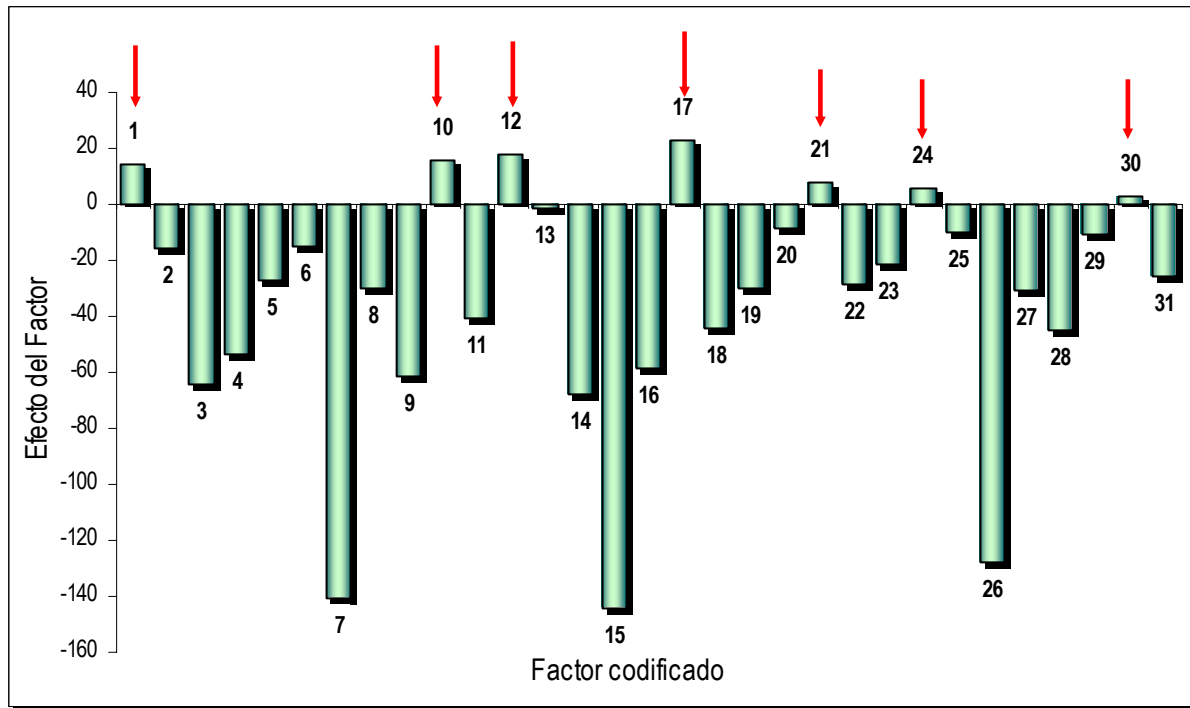


Figura 29.- Gráfica de efecto de los 31 factores sobre la actividad de la fitasa

7.2.2 Barrido secundario

Haciendo las consideraciones anteriores, la matriz de diseño para un experimento de barrido es mostrada en la [Tabla 12](#). Éste es un diseño PB para 11 factores con 12 experimentos; el listado de los reactivos adicionados, su codificación y las concentraciones destinadas para cada nivel están descritas en la [Tabla 13](#).

Tabla 12.- Matriz de Diseño Plackett-Burman para 11 factores

		Factores										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Experimentos	1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
	2	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
	3	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
	4	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
	5	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
	6	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
	7	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
	8	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
	9	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
	10	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
	11	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 13.- Concentraciones asignadas de los reactivos adicionados para PB 11 factores.-

No factor	Reactivo	Nivel	
		+1	-1
1	Lactosa	6 %	0.6 %
2	Glucosa	6 %	0.6 %
3	Extracto de levadura	1 %	0.1 %
4	Peptona	1 %	0.1 %
5	EDTA	1 mM	0.5 mM
6	Ac. Oleico	0.3 % v/w	0.15 % v/w
7	Tween 20	0.3 % v/w	0.15 % v/w
8	Tween 80	0.3 % v/w	0.15 % v/w
9	Triton X-100	0.3 % v/w	0.15 % v/w
10	Cloruro de Ca	1 mM	0.5 mM
11	Fosfato de potasio	0.5 mg/SSC	0.25 mg/SSC

Las UF relativas al control (KOJI sin aditivos y con 44 % de humedad) de este segundo barrido son mostradas en la [Figura 30](#), en esta gráfica se observa que de las 12 combinaciones empleadas sólo el 16.7 % de éstas se encuentra por debajo del control lo que representa una mejoría con respecto al primer barrido. El que los experimentos se encuentren por debajo del control se debe la presencia de reactivos que efectivamente tenían efecto adverso sobre la actividad de la enzima. La [Figura 31](#) muestra los efectos de cada factor; en ésta se aprecia que el efecto negativo de los factores 1, 4, 5, 6 y 10 es hasta de -150 unidades lo que provoca que en combinación con los otros factores reflejen UF menores a las del control; como es el caso de los experimentos 1 y 5 de la [Figura 30](#).

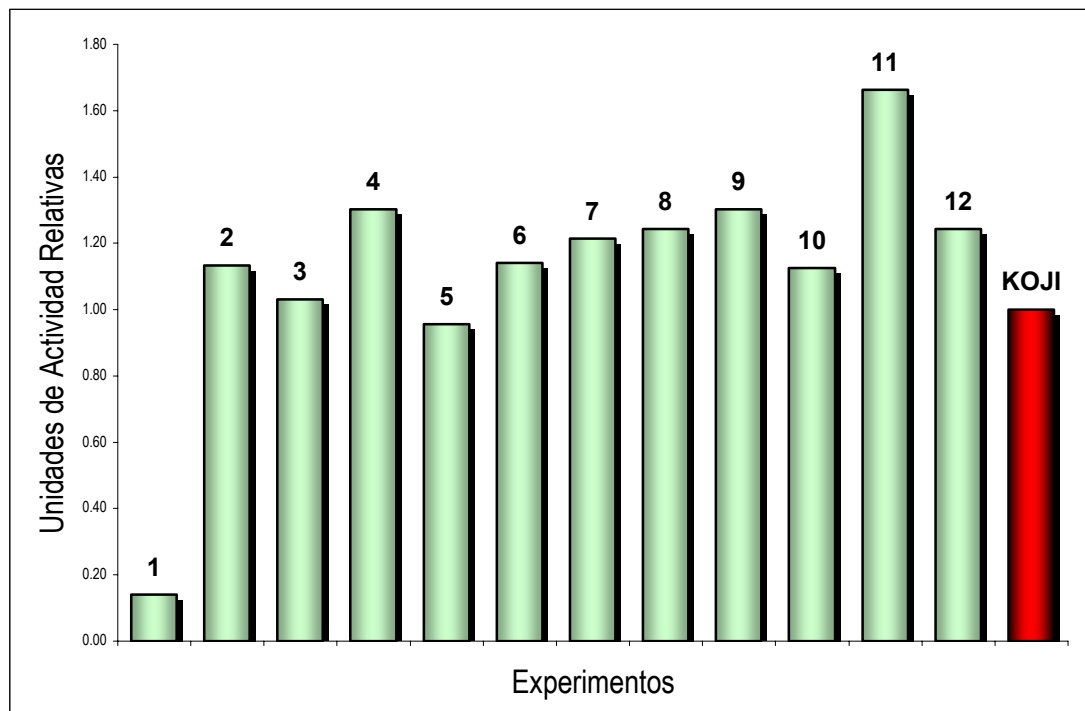


Figura 30.- UF relativas de los 12 experimentos de barrido comparadas con el matraz control "KOJI"

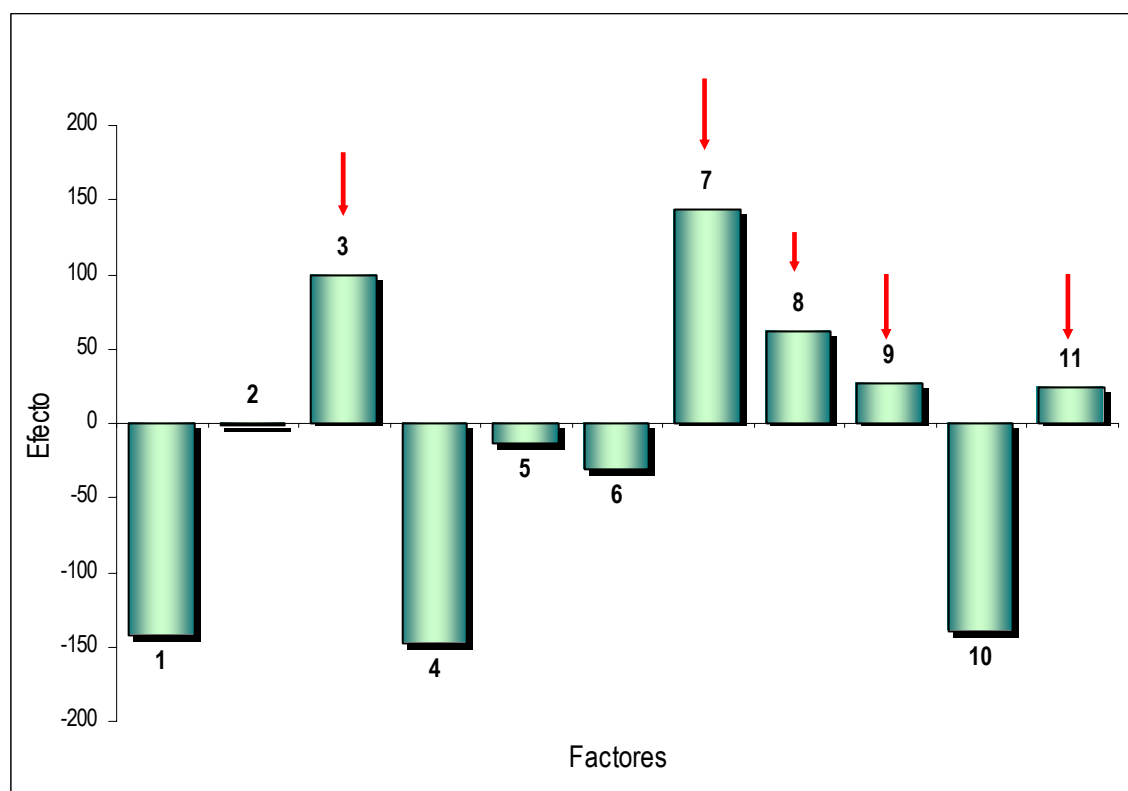


Figura 31.- Gráfica de efecto de los 11 factores sobre la actividad de la fitasa

Los factores que indujeron la producción de la enzima fueron el extracto de levadura, los tres surfactantes y el fosfato de potasio. Aparentemente, la glucosa aparentemente no afectó la actividad enzimática (ver Figura 31).

7.2.3 Determinación de factores relevantes

Para hacer la determinación de los factores más relevantes, fue necesario construir un tercer experimento con un diseño PB para 7 factores y 8 experimentos; en éste, los reactivos utilizados fueron los que en el experimento anterior revelaron un efecto inductor en la producción de enzima (factores Extracto de levadura, Tween 20, Tween 80, Triton X-100, fosfato de Potasio de la sección 7.2.2) y las dos fuentes de carbono (factores 1 y 2 de la sección 7.2.2); éstas fueron incluidas ya que en la bibliografía existente en *Aspergillus niger* tanto la glucosa como la lactosa incrementan la actividad enzimática y la producción de biomasa [4, 12, 35].

Es posible que en el segundo barrido como en el primero, el efecto de las fuentes de carbono haya sido mermado por alguno de los reactivos presentes en la FES. Diferentes autores sugieren que las fuentes de carbono tienen un efecto positivo en la actividad enzimática [4, 12, 35], además, de acuerdo con el balance de carbono realizado en la sección 7.3, el sistema requiere de una fuente de este tipo.

Con las consideraciones mencionadas se construyó la matriz de diseño presentada en la **Tabla 14**. La **Tabla 15** contiene la codificación utilizada para cada factor, así como las concentraciones correspondientes para cada nivel empleado.

Tabla 14.- Matriz de Diseño Plackett-Burman para 7 factores

		Factores						
		1	2	3	4	5	6	7
Experimentos	1	+	+	+	-	+	-	-
	2	+	+	-	+	-	-	+
	3	+	-	+	-	-	+	+
	4	-	+	-	-	+	+	+
	5	+	-	-	+	+	+	-
	6	-	-	+	+	+	-	+
	7	-	+	+	+	-	+	-
	8	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 15.- Concentraciones asignadas de los reactivos adicionados para PB 7 factores

No factor	Reactivo	Nivel	
		+1	-1
1	Lactosa	6 %	0.6 %
2	Glucosa	6 %	0.6 %
3	Extracto de levadura	1 %	0.1 %
4	Tween 20	0.3 % v/w	0.15 % v/w
5	Tween 80	0.3 % v/w	0.15 % v/w
6	Triton X-100	0.3 % v/w	0.15 % v/w
7	Fosfato de potasio	0.5 mg/SSC	0.25 mg/SSC

Las respuestas obtenidas con el diseño anterior se presentan en la **Figura 32** en forma relativa, tomando como referencia al matraz control (KOJI sin aditivos y con 44 % de humedad). En esta gráfica se observa que solamente 3 de 8 matraces están por debajo del matraz control y que algunos de ellos lo superan hasta por un 80%. Al realizar el análisis de efectos de los factores probados (ver sección 7.2.1) se obtuvo que todos los factores (Lactosa, Glucosa, extracto de Levadura, Tween 20, Tween 80 y Fosfato de potasio) excepto uno (Triton X-100) tienen efecto inductor de la producción de la enzima. Esto se aprecia en la **Figura 33**.

Los resultados de este experimento coinciden por lo reportado por Bogar y col (2003), Roopesh K y col (2006), Halase y Duvnjak (1994), Mandviwala y Khire (2000) y Krishna y col (2001) a pesar de que ninguno de estos autores había probado todos estos reactivos al mismo tiempo; específicamente para Triton X-100, El Batal y col (2001) que probaron también los otros surfactantes, obtuvieron que con éste surfactante la inducción de la enzima es mínima, en comparación con el Tween 80 y Tween 20. [4, 12, 16, 20, 35].

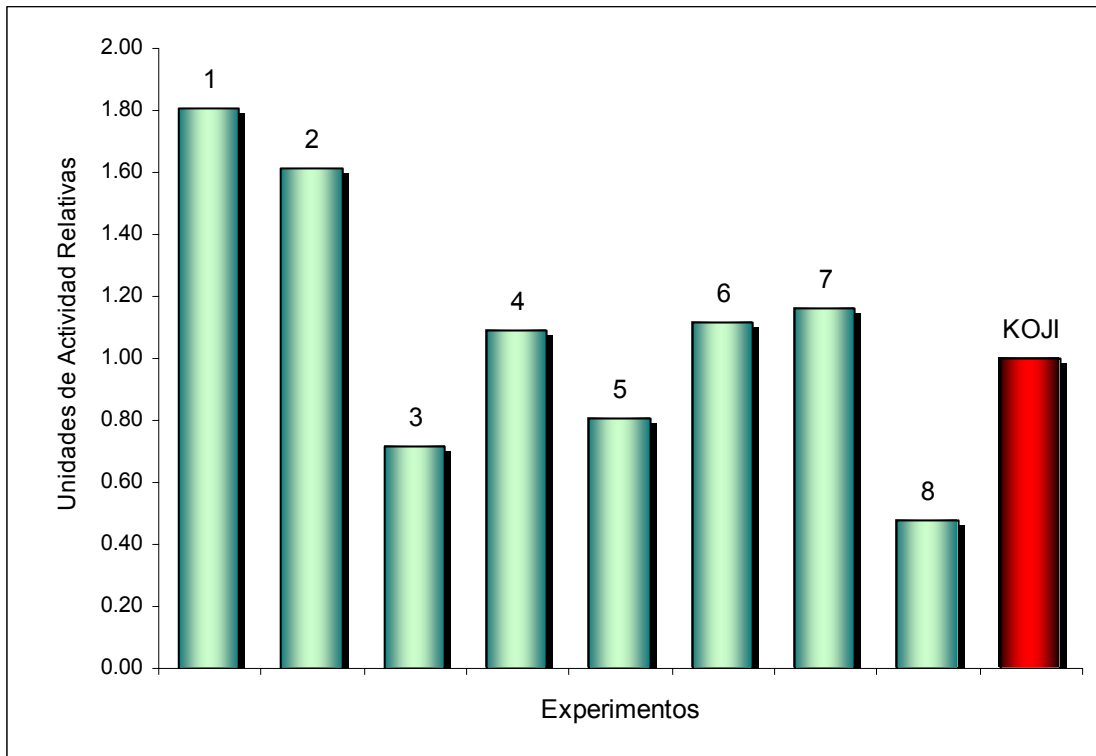


Figura 32.- UF relativas de los 8 experimentos de barrido comparadas con el matraz control "KOJI"

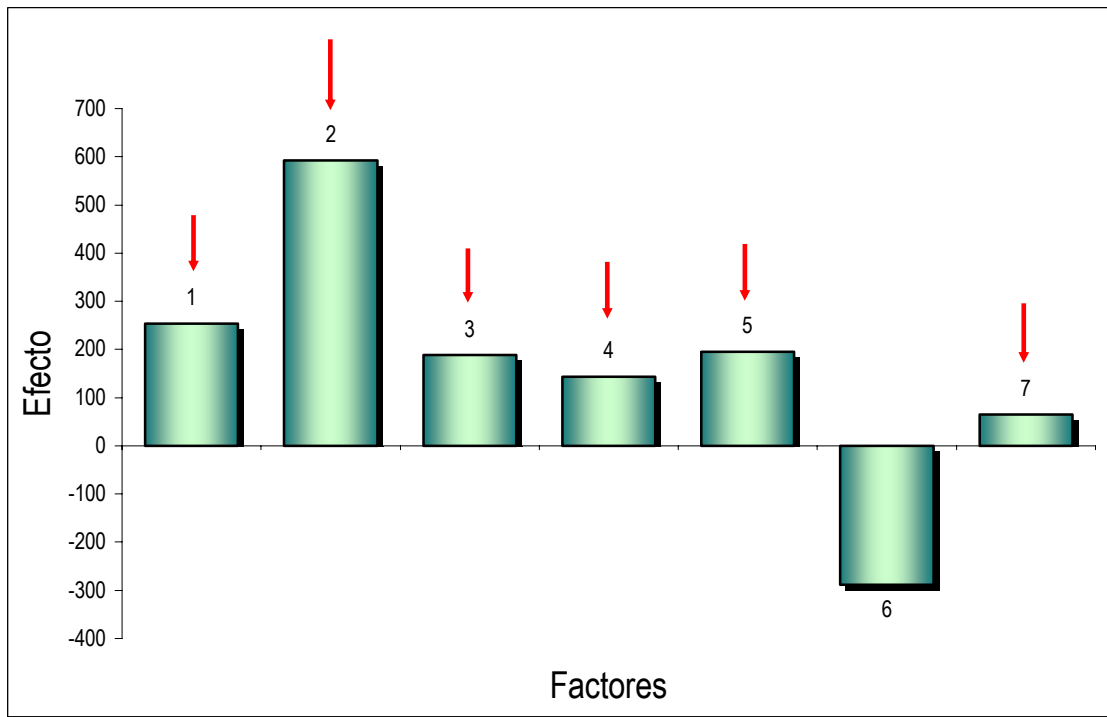


Figura 33.- Gráfica de efecto de los 7 factores sobre la actividad de la fitasa

7.2.4 Determinación de concentraciones óptimas

En este punto de los 31 factores probados, 6 de estos revelaron tener un efecto positivo sobre la producción de fitasa; de entre éstos reactivos se tiene fuentes de carbono (lactosa y glucosa), una fuente de nitrógeno, surfactantes (Tween 80 y Tween 20) y el Fosfato de potasio. De los factores resultantes se eligió trabajar con los que presentaron un efecto mayor, considerando mantener un miembro de cada grupo; es decir una fuente de carbono (glucosa con un efecto de 600 unidades), un surfactante (Tween 80 con un efecto de 200 unidades) y se eligió el extracto de levadura sobre el fosfato de potasio ya que el efecto del primero es mayor (con un efecto de aproximadamente 200 unidades).

El empleo de 3 niveles es necesario, ya que para ajustar datos a curvas de respuesta se requieren por lo menos tres niveles; evaluar 6 factores a tres niveles implicaría un diseño factorial $3^6= 729$. Aun si se hubiera elegido un diseño factorial fraccional el número de experimentos a desarrollar era demasiado grande.

Para la determinación de las concentraciones óptimas de estos tres factores seleccionados, se empleó un diseño de Box-Behnken, el cual con un número mínimo de experimentos permite evaluar 3 factores a tres niveles diferentes. La **Tabla 16** presenta las concentraciones manejadas para cada nivel; los intervalos para los niveles fueron ampliados para asegurar que en el ajuste de la superficie la construcción de ésta comprenda las condiciones óptimas de cada factor. La matriz de con la codificación de los experimentos se presenta en la **Tabla 17**.

Tabla 16.- Concentraciones asignadas a los reactivos adicionados para BB 3 factores a 3 niveles

No factor	Reactivo	Niveles		
		+1	0	-1
1	Glucosa	7.5 %	5 %	2.5 %
2	Extracto de levadura	1.5 %	1 %	0.5 %
3	Tween 80	0.5 % v/w	0.3 % v/w	0.1 % v/w

Tabla 17.- Matriz de Diseño Box-Behnken para 3 factores a 3 niveles

		Factores		
		Glucosa	Extracto de levadura	Tween 80
Experimentos	1	-	0	-
	2	+	0	-
	3	-	0	+
	4	+	0	+
	5	-	-	0
	6	+	-	0
	7	-	+	0
	8	+	+	0
	9	0	-	-
	10	0	-	+
	11	0	+	-
	12	0	+	+
	13	0	0	0
	14	0	0	0
	15	0	0	0

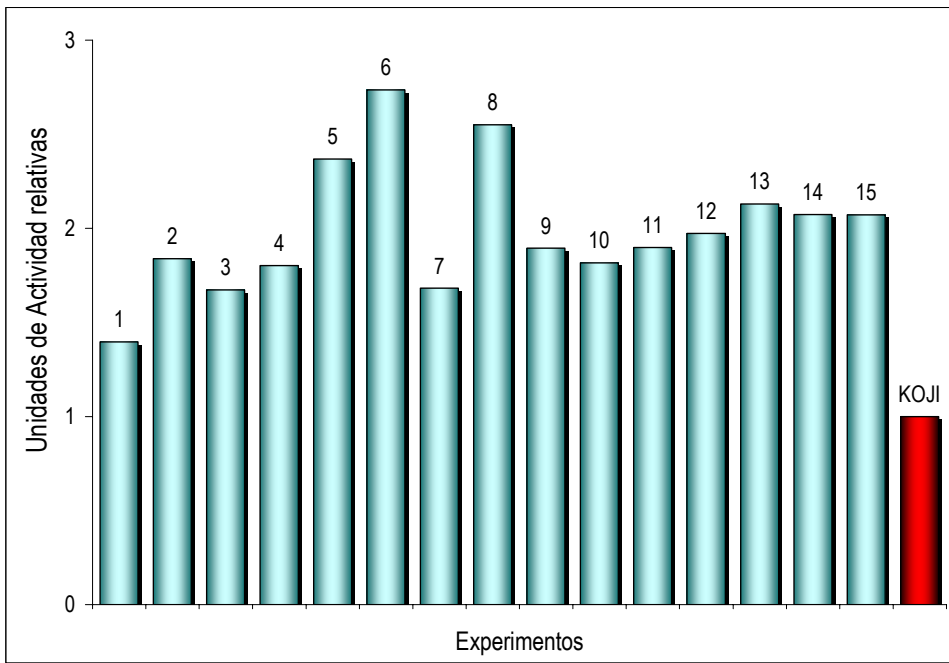


Figura 34.- UF relativas del diseño BB comparadas con el matraz control "KOJI"

En la **Figura 34** se muestran las UF relativas al control, obtenidas con el diseño experimental Box-Behnken, en ésta se puede observar que todos los experimentos, incluso los que tiene condiciones centrales (13, 14 y 15) se encuentran con actividades superiores a los controles, también algunos de los experimentos son hasta 2.5 veces mayores que el KOJI.

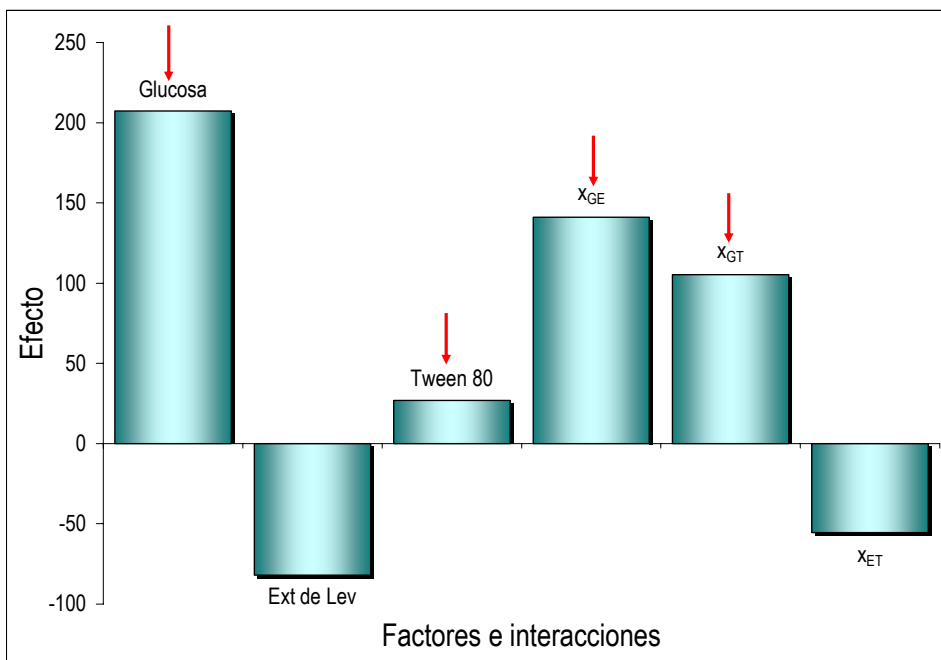


Figura 35.- Gráfica de efecto sobre la actividad de la fitasa de los 3 factores y sus interacciones

Al hacer el análisis de efectos (ver Figura 35) de los factores principales y de sus interacciones se encontró que la glucosa es uno de los factores con mayor influencia positiva sobre la actividad de la enzima, con un poco más de 200 unidades de efecto. En el caso del extracto de levadura, este tiene un efecto negativo sobre la actividad de la enzima, con -75 unidades y se observa que el Tween 80 tiene una contribución ligeramente positiva en la actividad de la enzima. En el caso de las interacciones entre los factores, pareciera ser que las interacciones más relevantes son las de glucosa-extracto de levadura (X_{GE}) y glucosa-Tween 80 (X_{GT}). La de extracto de levadura-Tween 80 (X_{ET}) se ve desfavorecida al parecer por el gran efecto negativo del extracto de levadura en comparación con el efecto positivo del Tween 80.

En la Figura 36 se presentan las gráficas de respuestas contra los niveles empleados para cada uno de los factores en el diseño experimental Box-Behnken, en ésta se puede observar que en el caso de la glucosa, inciso a), aparentemente presenta un máximo pero éste se encontraría fuera del intervalo de concentraciones muestreadas. Para el extracto de levadura, inciso b), se observa que a concentraciones bajas, menores de 0.75%, la actividad de la enzima se incrementa conforme se acerca al cero de concentración, lo que podría indicar que el sistema no requiere de este factor, además, esto podría ayudar a justificar el efecto negativo de este reactivo observado en la Figura 35. Con respecto al Tween 80, inciso c), este es el único que presumiblemente si muestra un máximo en 0.3 %, el cual si está en el intervalo de concentraciones empleadas.

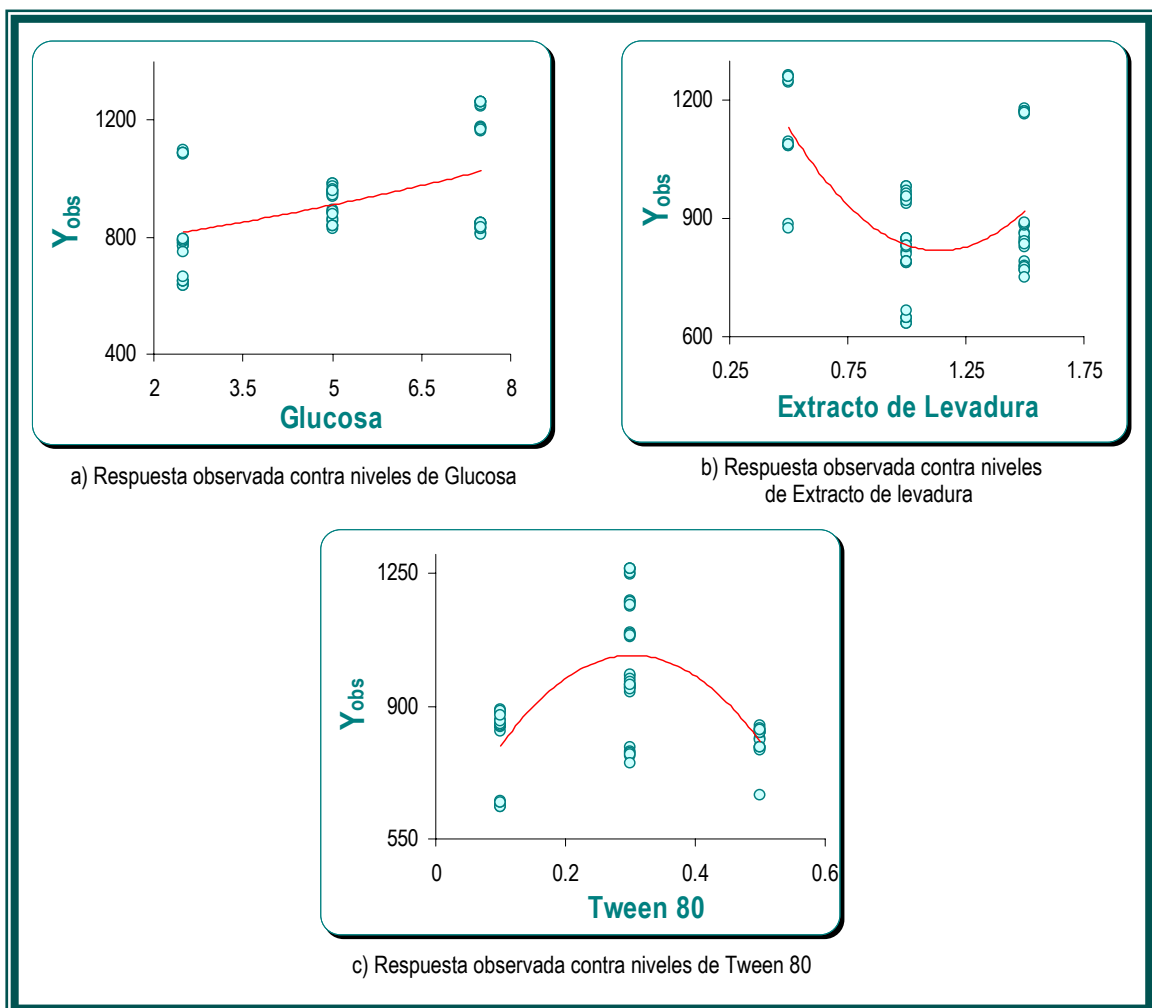
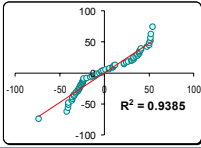
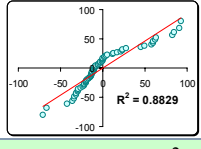
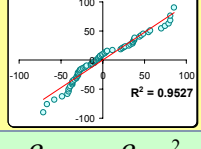
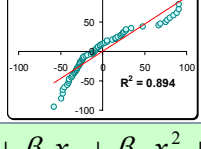
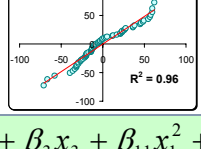
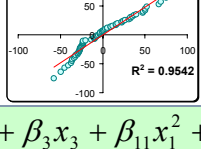
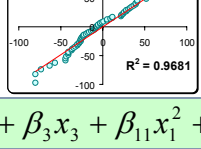
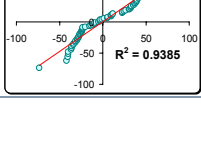


Figura 36.- Respuesta observada contra los niveles de cada factor

Tabla 18.- Comparación de los modelos de regresión

SCE	Distribución de residuales	F _{cal}	F _{tab}
1. $y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3$			
98,682.48		141.69	1.98
2. $y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2$			
169,418.40		105.72	2.15
3. $y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{13}x_1x_3$			
217,694.66		80.25	2.15
4. $y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{23}x_2x_3$			
209,415.81		83.78	2.15
5. $y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3$			
138,189.87		113.42	2.08
6. $y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{23}x_2x_3$			
129,911.02		121.15	2.08
7. $y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{23}x_2x_3 + \beta_{13}x_1x_3$			
178,187.27		86.19	2.08
8. $y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2$			
248,923.19		81.80	2.24

La elección del modelo para el ajuste fue hecha comparando los valores obtenidos en la estimación lineal de cada uno de los modelos propuestos. En la **Tabla 18** se presentan las ecuaciones de los modelos planteados, se consideraron principalmente cuatro criterios; el valor de la suma de cuadrados del error, la normalidad de los errores, el coeficiente de determinación, R^2 , y la diferencia entre el estadístico F de Fisher calculado y F de las tablas (se acepta si $F_{cal} \gg F_{tab}$).

En la **Figura 37**, **Figura 38** y **Figura 39** se muestra la probabilidad normal del error, la distribución de la probabilidad normal de los residuales y la distribución del error porcentual respectivamente. La linealidad de los datos en la primera de estas gráficas indica normalidad mientras que en la **Figura 39** se observa que los residuales no están muy alejados de la normalidad. En el caso de la **Figura 40**, se observa que la línea de tendencia es de 45° y que los datos no presentan alguna tendencia en particular. Además los intervalos de confianza (líneas roja y azul construidas empleando una significancia de 0.1) no se encuentran demasiado separados lo que indica que los datos no se encuentran tan dispersos.

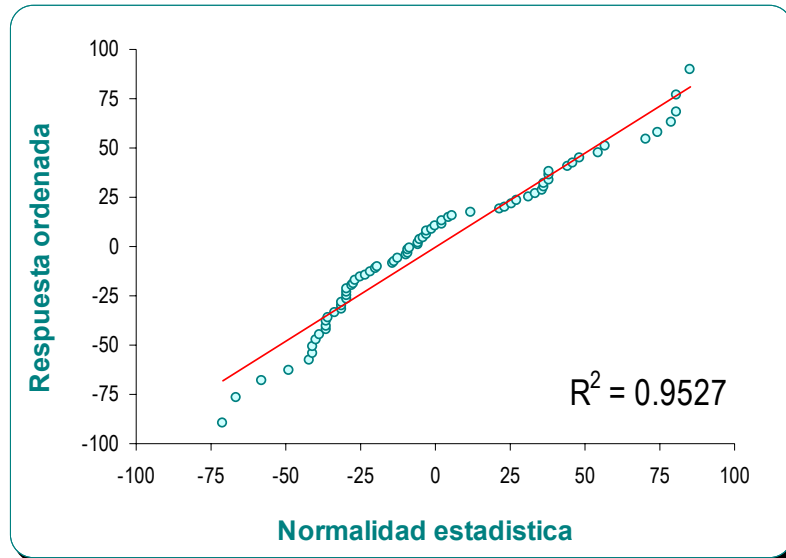


Figura 37.- Probabilidad normal de los residuales

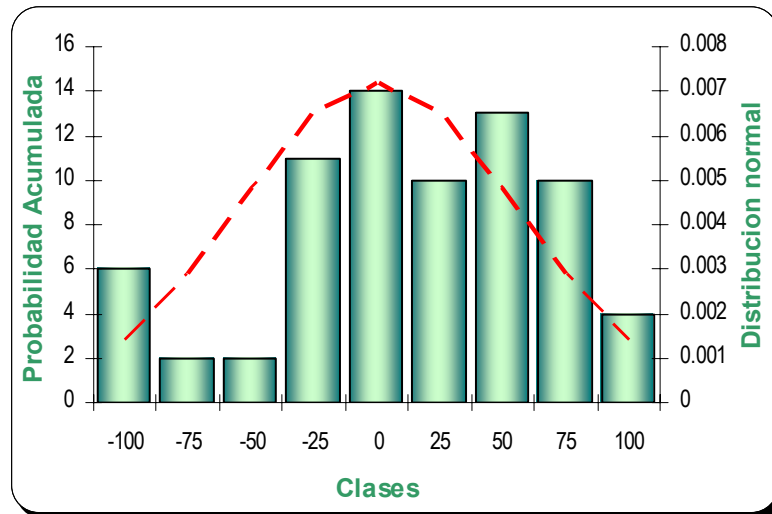


Figura 38.- Distribución del error porcentual entre y_{est} y y_{obs} para el modelo

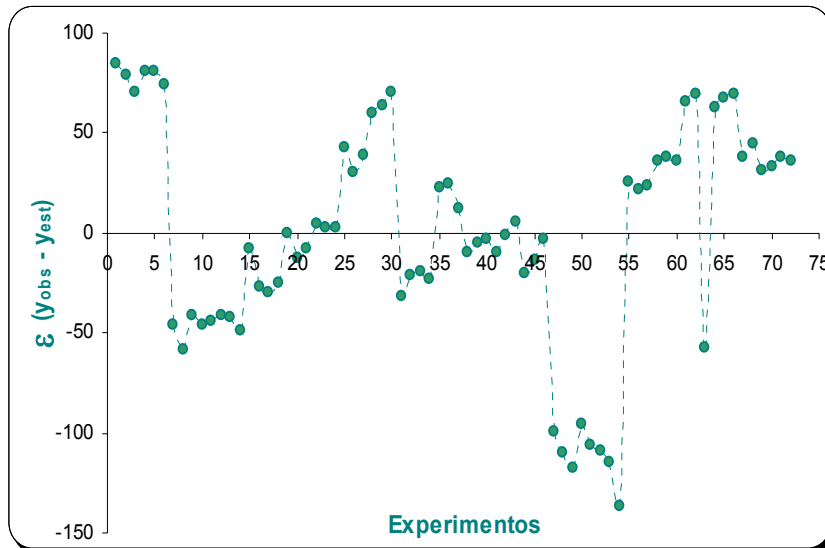


Figura 39.- Distribución del error en cada uno de los experimentos para el modelo sin interacciones

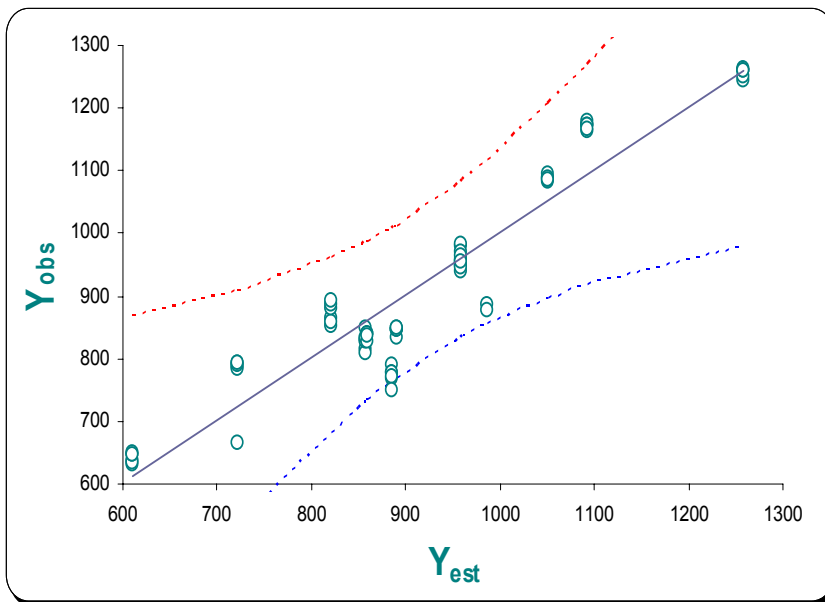


Figura 40.- $y_{estimada}$ con el modelo elegido contra $y_{observada}$.

Con base en el análisis estadístico mostrado y de acuerdo a lo mostrado en la **Tabla 18**, el modelo de regresión al que se ajustan mejor los datos es el etiquetado con el número 3:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{13} x_1 x_3 \tag{41}$$

La ecuación (41) considera los coeficientes y los términos cuadráticos de los efectos principales y la interacción de la glucosa-Tween 80. Este modelo de regresión presenta una distribución del error más normal en comparación con los otros modelos propuesto y una diferencia entre los valores del estadístico F más grande.

Los valores de los coeficientes de la ecuación (41) y los parámetros de la estimación lineal se muestran en la **Tabla 19**.

Tabla 19.- Parámetros de la estimación lineal considerando una interacción

	β_{13}	β_{33}	β_{22}	β_{11}	β_3	β_2	β_1	β_0
	-72.14	-4206.29	533.28	-3.13	2981.40	-1232.03	94.36	855.28
ϵ	23.81	378.07	60.49	2.42	255.34	127.75	25.45	94.91
R^2	0.9	F_{cal}	80.25	GL	64			
SCE	217694.66							

Con el modelo elegido, se realizaron las curvas de superficie para observar de manera gráfica en donde se encuentra el punto óptimo y cuales son los valores de las variables para dicho punto. Recordemos que el número de variables que se esta analizando son tres (glucosa, extracto de levadura y Tween 80) y que en las superficies de respuesta solo es posible visualizar dos de ellas y la respuesta que producen, por lo que las figuras muestran la respuesta de las combinaciones de un par de estas variables a la vez.

En la **Figura 41** se presenta la respuesta obtenida con la combinación de niveles de la glucosa y del Tween 80, en ella se puede observar que las unidades de actividad máxima se obtienen con una concentración de glucosa del 12 % y con una concentración de Tween 80 del 0.25 %.

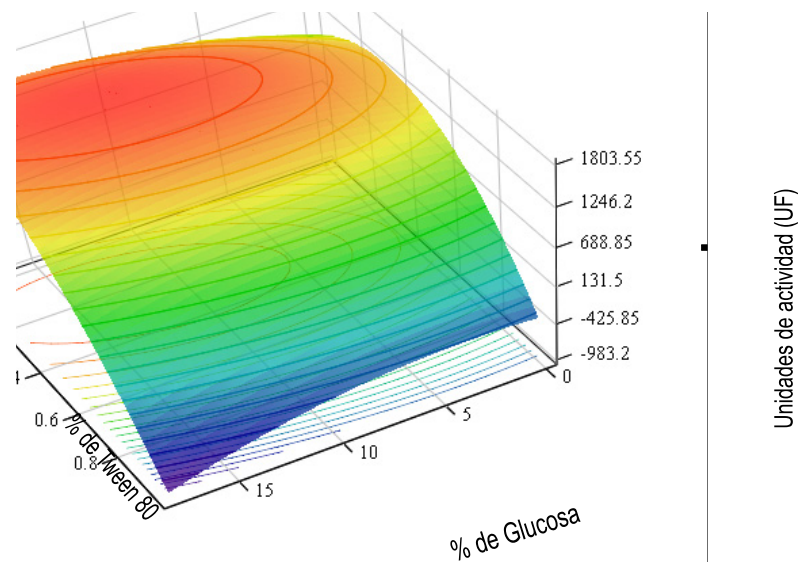


Figura 41.- SR con glucosa y Tween 80 con el modelo sin interacciones

La **Figura 42** es la forma gráfica de la respuesta en la que se presentan los niveles empleados para glucosa y extracto de levadura, la forma de esta superficie es de una silla. Se observa de nuevo que la glucosa presenta un máximo en los intervalos de 10 a 15%, pero con el extracto de levadura se presentan un mínimo, uno de los extremos refleja que el incremento en la actividad está en función de la concentración de éste, pero se extiende indefinidamente, lo cual es poco probable. I otro extremo del intervalo parece indicar que no requiere de este factor, ya que conforme se aproxima a cero las unidades de fitasa reflejadas se incrementan. Algo similar se presentó en la **Figura 36**, incisos a y b.

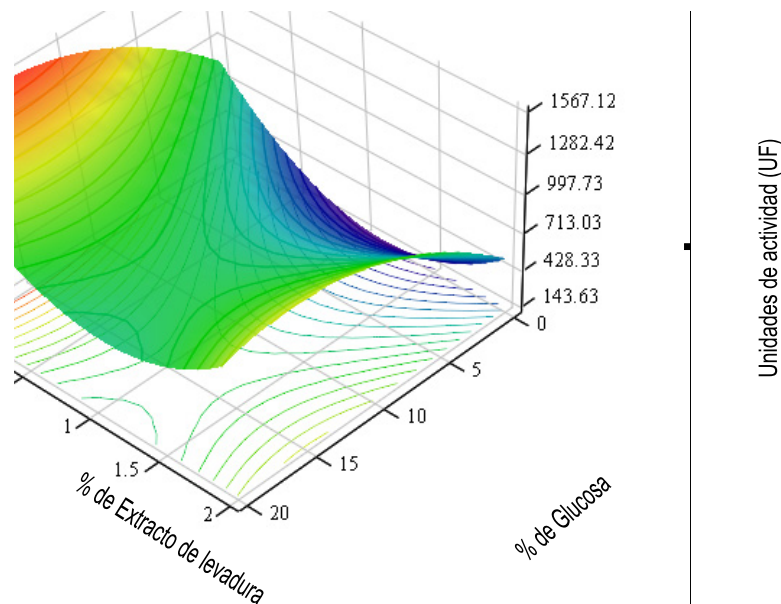


Figura 42.- SR con glucosa y extracto de levadura con el modelo sin interacciones

Este comportamiento del extracto de levadura, se vuelve a reflejar en la [Figura 43](#) con la existencia de una superficie en forma de silla, sin mostrar la existencia de un punto óptimo para este factor; en cambio la gráfica sugiere nuevamente que el extracto de levadura parece no ser necesario en el sistema. El comportamiento del Tween 80 es el mismo que se ha observado en gráficas anteriores conservado un punto máximo en intervalos de 0.20 a 0.4%

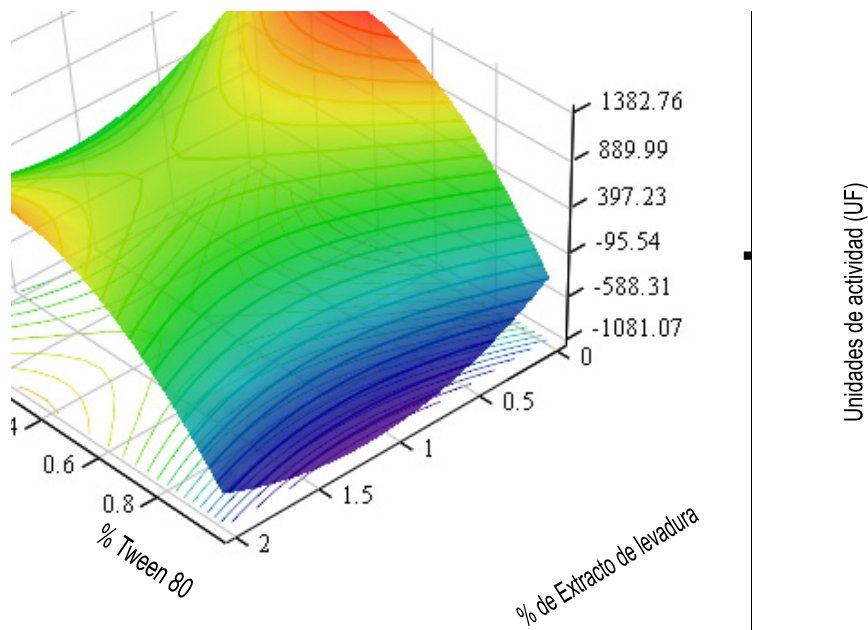


Figura 43.- SR con extracto de levadura y Tween 80 con el modelo sin interacciones

Los resultados, la falta de curvatura en las superficies y la indefinición del extracto de levadura hacen proponer la elaboración de un experimento confirmatorio utilizando los intervalos en los que las superficies reflejan la producción de fitasa más alta, es decir para glucosa rangos de entre 5 y 15 %, para el Tween 80 rangos de 0.1 a 0.5% y una

concentración de extracto de levadura igual a 0.0, 0.5 y 1.5 %, estas combinadas de forma independiente con los niveles de glucosa y Tween 80.

7.3 Monitoreo del oxígeno y del dióxido de carbono

A continuación se presenta el resultado del balance de carbono de la reacción que se lleva a cabo en el sustrato sólido. La primera situación planteada, es para el sistema que se tenía originalmente:



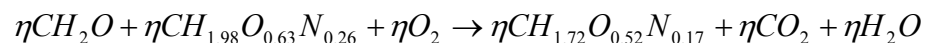
En donde $CH_{1.98}O_{0.63}N_{0.26}$ es la fórmula condensada del salvado de trigo, O_2 es el oxígeno consumido en la reacción, $CH_{1.72}O_{0.52}N_{0.17}$ es la biomasa producida expresada en su fórmula molecular para *Aspergillus niger*, CO_2 es el dióxido de carbono producido en la reacción junto con la molécula de agua H_2O .

Los rendimientos de la ecuación se presentan en el vector η_c , el cálculo del vector se puede encontrar en la sección de :

En η_c , el oxígeno y el dióxido de carbono tienen signos positivo y negativo respectivamente, es decir al producir una molécula de biomasa se producen 0.033 de oxígeno y se consumen 0.089 de dióxido de carbono. Esto sugiere que el salvado de trigo tiene la suficiente cantidad de nitrógeno; que el sistema no está limitado por el oxígeno y que lo que le hace falta al microorganismo es más carbono puesto que aparentemente “consume” el dióxido de carbono.

Los resultados de este primer balance coinciden con lo obtenido de forma experimental, ya que las fuentes de nitrógeno fueron eliminadas en los experimentos de barrido por no ser de impacto para la producción de fitasa, la cual está asociada al crecimiento de *Aspergillus niger*, o de otra forma, entre más biomasa más enzima producida. En contraste, las fuentes de carbono fueron conservadas, esto también se observa en las gráficas de superficie de respuesta, en las que la fuente de carbono parece tener un gran efecto en la producción de fitasa.

Ahora bien realizando el balance pero para el sistema con una fuente de carbono, que en este caso es glucosa se tiene la siguiente ecuación:



En donde la ecuación es básicamente la misma, solo que ésta adiciona el término CH_2O que es la fórmula condensada de la glucosa que se consume.

Los rendimientos de la ecuación con una fuente de carbono, se presentan en el vector η_c , el cálculo del vector se puede encontrar en la sección de Anexos:

En el vector η_c se obtiene que en el renglón correspondiente al oxígeno y el dióxido de carbono sus signos son negativo y positivo respectivamente o lo que en otras palabras indica que el oxígeno es consumido y el dióxido de carbono es producido. Entonces, al menos desde el punto de vista puramente estequiométrico parece claro que se requiere una fuente de carbono para incrementar la producción si está asociada al crecimiento.

La Figura 44 contienen los datos del muestreo que se realizó de oxígeno y dióxido de carbono en la cámara de incubación durante los siete días de incubación, en ella se puede observar que efectivamente el oxígeno es consumido hasta aproximadamente el 5%, mientras que el dióxido de carbono se produce hasta alcanzar un poco más del 8%. Es probable, que estas concentraciones o alguna limitación de transporte provoquen la esporulación. Esto, sin embargo no fue verificado.

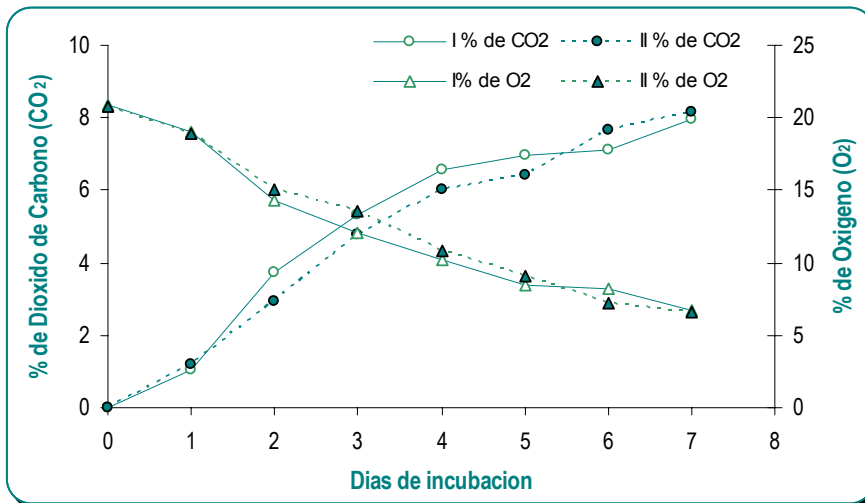


Figura 44.- Gráfica de consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono en la cámara de incubación

8. Conclusiones y perspectivas

Las estrategias de optimización en esta investigación consistieron principalmente en dos partes; la primera de ellas se encargó de determinar los puntos de operación óptimos para la humedad inicial del sistema y el tiempo de incubación en la FES. La segunda parte consistió en la discriminación de los aditivos relevantes y sus concentraciones óptimas para la producción de fitasa, bajo las condiciones de operación seleccionadas previamente como óptimas.

La humedad de la matriz sólida y el tiempo de incubación óptimos para la producción de fitasa por *Aspergillus niger* fue determinada por medio de la metodología de superficie de respuesta. El porcentaje de humedad que reflejó la mayor actividad enzimática en la FES fue de 60%.

El tiempo de incubación óptimo estimado fue de 14 días, en los cuales la producción de fitasa es 4.5 veces mayor que la obtenida en las condiciones originales. Cabe mencionar que no se hicieron los experimentos comprobatorios hasta dicha condición, ya que se observó que a partir del séptimo día comienza la formación de esporas en el sistema, condición desfavorable en los ambientes laborales. Además, a los 7 días de incubación se tienen unidades de actividad 4 veces mayores que las presentadas por el sistema original; por lo que probablemente no se justifica esperar el doble de tiempo para alcanzar actividades mayores.

Para la modificación del medio, los experimentos de selección primaria, fueron llevados a cabo con un diseño experimental Plackett-Burman, el cual permitió el análisis de numerosas variables, con un número de experimentos razonable. En particular, para el estudio de los factores que afectan la actividad de la fitasa, se logró descartar progresivamente 25 aditivos de los 31 empleados; quedando una cantidad manejable para un estudio de optimización más fino. La glucosa, el extracto de levadura y el Tween 80 fueron seleccionados de los seis aditivos que resultaron del tamizado por presentar el mayor efecto positivo sobre la actividad de la enzima. La determinación de las concentraciones óptimas de estos se realizó empleando un diseño experimental Box-Behnken. Desafortunadamente los niveles óptimos de estos tres factores no pudieron ser establecidos con seguridad, puesto que la glucosa y el Tween 80 parecen tener un máximo a concentraciones de 12.21 % y 0.25% respectivamente pero la concentración máxima de glucosa ensayada fue de 7%, por lo que el máximo estimado se encuentra fuera del intervalo estudiado. En el caso del extracto de levadura, los resultados parecen indicar que el sistema no requiere de éste; las respuestas observadas proporcionan una curva de repuesta en forma de silla. Por ello se sugiere explorar intervalos de concentración más amplios para el extracto de levadura, por ejemplo de 0 a 5 %, para comprobar si efectivamente la actividad baja y después se incrementa conforme aumenta la concentración de extracto, lo cual parece ser poco probable.

Adicionalmente se siguió el consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono, en la cámara de incubación en donde se lleva a cabo la FES. En ella se evidencia que la fermentación en cuestión no se encuentra limitada por el oxígeno, que cerca del séptimo día el porcentaje de oxígeno en el sistema es bajo, lo que podría justificar la formación de esporas después de este tiempo. Al parecer, de acuerdo con el balance de carbono realizado al sistema en sus condiciones originales, éste no requiere de fuentes de nitrógeno y el oxígeno presente es el necesario; en cambio, el análisis sugiere que el salvado de trigo como sustrato de *Aspergillus niger* no proporciona el carbono requerido por el microorganismo, por lo que se requiere de una fuente de carbono adicional. Lo evidenciado por el balance podría justificar la presencia de la glucosa conservada en las etapas finales de la optimización.

Referencias

- 1 Annadurai G. y Sheeja R. Y. 1998. Use of Box-Behnken design of experiments for the adsorption of verofix red using biopolymer. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. (18)6: 463-466
- 2 Applegate T. J.; Angel R. 2004. Phytase: Basics of Enzyme Function. Farm Animal Management@Purdue [publicación en línea]. Disponible desde www.ces.purdue.edu/extmedia/AS/AS-560-W.pdf. 28/02/2006.
- 3 Bapat P. M.; Kundu S. y Wangikar P.P. 2003. An Optimized Method for *Aspergillus niger* Spore Production on Natural Carrier Substrates. *Biotechnol. Prog.* (19): 1683-1688.
- 4 Bogar B.; Szakacs G.; Pandey A.; Abdulhameed S.; Linden J. C. y Tengerdy R. P. 2003. Production of Phytase by *Mucor racemosus* in Solid-State Fermentation. *Biotechnol. Prog.* (19): 312-319.
- 5 Casey A. y Walsh G. 2004. Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. *Journal of Biotechnology* (110): 313-322.
- 6 Chantasartrasamee K.; Na Ayuthaya D. I.; Intarareugsorn S. y Dharmsthiti S. 2005. Phytase activity from *Aspergillus oryzae* AK9 cultivated on solid state soybean meal medium. *Process Biochemistry*. (40): 2285-2289.
- 7 Cochran W. G. y Cox G. M. 1992. **Experimental Designs**. 2ª Edición. EUA. Wiley Interscience Publication. pp 5-49
- 8 Demain A. L. y Davies J. E. 1999. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 2ª Edición. Washington D.C. American Society for microbiology. pp 61-93.
- 9 Dvorakova J.; Volfova O. y Kopecky J. 1997. Characterization of phytase produced by *Aspergillus niger*. *Folia Microbiologica* 42 (4): 349-352.
- 10 Ebune A.; Al-Asheh S. y Duvnjak, Z. 1995. Effect of phosphate, surfactants and glucose on phytase production and hydrolysis of phytic acid in canola meal by *Aspergillus ficuum* during solid state fermentation. *Biores. Technol.* (54): 241-247.
- 11 Edgar T.F., Himmenblau D. M. y Lasdon L. S. 2001. **Optimization of chemical processes**. 2ª Edición. Mc. Graw Hill Higher Education. New York NY. pp 5-49.
- 12 El-Batal A.I. y Karem H. A. 2001. Phytase production and phytic acid reduction in rapeseed meal by *Aspergillus niger* during solid state fermentation. *Food Research International* (34): 715-720.
- 13 Engelen A. J.; Vander Heeft F.C. P.H.G. y Smit E.L.C. 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *Journal of the Association of Analytical Communities International*. (77): 760-764.
- 14 Fernández, J.M. 2003. Modelos Estadísticos Aplicados. Publicaciones de la UDC. http://www.udc.es/dep/mate/estadistica2/indice_gral.html
- 15 Greiner R.; Carlsson N. G. y Alminger M.L. 2000. Stereospecificity of myo-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* (84): 53-62.

- 16 Krishna C. y Nokes S. E. 2001. Predicting vegetative inoculum performance to maximize phytase production in solid-state fermentation using response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, (26): 161-170.
- 17 Lavilla I.; Filgueiras A. V. y Bendicho C. 1999. Comparison of Digestion Methods for Determination of Trace and Minor Metals in Plant Samples. *J. Agric. Food Chem.* (47): 5072-5077
- 18 Lehninger A. L. 1982. **Biochemistry**. 2ª Edición New York, N.Y. Worth Publishers. pp 369, 631, 189 y 285.
- 19 Mandel J. 1964. **The statistical analysis of experimental data**. 1ª Edición. New York, EUA. Dover Edition. pp: 286-288.
- 20 Mandviwala TN y Khire JM. 2000. Production of high activity thermostable phytase from thermotolerant *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. (24): 237-243.
- 21 Mathews C. K.; Van Holde K. E. y Ahern K. G. 2000. **Biochemistry**. 3ª Edición. Redwood, Calif Pearson Education. pp.95, 701-742
- 22 McDowell, L.R. 1992. **Minerals in Animals and Human Nutrition**. New York. L.R. McDowell. Academic Press pp 27-77.
- 23 Montgomery D.C. 2005. **Diseño y análisis de experimentos**. 2ª Edición. México. Limusa Wiley. pp: 1- 459.
- 24 Nagel F. J. I. 2002. Process control of solid-state fermentation; Simulation control of temperature and moisture content. Tesis doctoral, Universidad de Wageningen. Holanda.
- 25 Pandey A. Solid-state fermentation. 2003. *Biochemical Engineering Journal* (13): 81–84.
- 26 Pandey A.; Selvakumar P.; Soccol C.R. y Nigam P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*. 77(1): 149-162
- 27 Pandey A.; Soccol C. R. y Mitchell D. 2000. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry* (35): 1153–1169.
- 28 Pandey A.; Szakacs G.; Socclo C. L.; Rodríguez J. A. y Socclo V. T. 2001. Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technology*. (77): 203-214.
- 29 Papagianni M.; Nokes S. E.; Filer K. 1999. Production of phytase by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. (35): 397-402.
- 30 Papagianni M.; Nokes S. E. y Filer K. 2001. Submerged and Solid-State Phytase Fermentation by *Aspergillus niger*: Effects of Agitation and Medium Viscosity on Phytase Production, Fungal Morphology and Inoculum Performance. *Food Technol. Biotechnol.* 39 (4): 319–326.
- 31 Paul Tobias. Process Improvement. <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/index.htm> Consultado: 20/01/2006.
- 32 Plackett R. L. y Burman J. P. 1946. The Design of Optimal Multifactorial Experiments. *Biométrie*. (33): 305-325.

- 33 Ramachandran S.; Roopesh K.; Nampoothiri K. M.; Szakacs G. y Pandey A. 2005. Mixed substrate fermentation for the production of phytase by *Rhizopus* spp. using oilcakes as substrates. *Process Biochemistry* (40): 1749–1754.
- 34 Real Academia de la Lengua. 2001. Fósforo. <http://buscon.rae.es/draef/> Consultado: 12/13/2006.
- 35 Roopesh K.; Ramachandran S.; Nampoothiri K. M.; Szakacs G. y Pandey A. 2006. Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*. *Bioresource Technology*. (97): 506-511.
- 36 Salo J. P.; Yliniemela A. y Taskinen J. 1998. Parameter Refinement for Molecular Docking. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* (38), 832-839
- 37 Selle P. H. y Ravindran V. 2006. Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology*. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2006.06.010.
- 38 Selle P. H.; Ravindran V.; Caldwell R. A. y Bryden W. L. 2000. Phytate and phytase: consequences for protein utilization. *Nutrition Research Reviews*. (13): 255-278.
- 39 Steiner T.; Mosenthin R.; Zimmermann B.; Greiner R. y Roth S. 2007. Distribution of phytase activity, total phosphorus and phytate phosphorus in legume seeds, cereals and cereal by-products as influenced by harvest year and cultivar. *Animal. Feed Science and Technology*. (133): 320–334.
- 40 Vats P. y Banerjee U. C. 2004. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. *Enzyme and Microbial Technology*. (35): 3-14.
- 41 Vohra A. y Satyanarayana T. 2003. Phytases: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 23(1): 29-60.
- 42 Ward O. P.; Qin W. M.; Dhanjoon J.; Ye J. Y.; Singh A. 2006. Physiology and Biotechnology of *Aspergillus* Department of Biology, University of Waterloo. Waterloo, Ontario, Canada N2L 3G1.
- 43 Yin Q. Q.; Zheng Q.H. y Kang X.T. 2007. Biochemical characteristics of phytases from fungi and the transformed microorganism. *Animal Feed Science and Technology*. (132): 341–350.
- 44 Yovita Siti P. R. 2005. Fungal Mats in Solid-State Fermentation. Tesis doctoral, Universidad de Wageningen Holanda.

Anexos

Balance de carbono

• Balance sin fuente de carbono:



Procediendo con el balance de carbono se tiene lo siguiente:

salvado, O₂, biomasa, CO₂, agua

$$M := \begin{matrix} C \\ H \\ O \\ N \end{matrix} \begin{pmatrix} 1 & 0 & 1 & 1 & 0 \\ 1.98 & 0 & 1.72 & 0 & 1 \\ .63 & 2 & 0.52 & 2 & 2 \\ .26 & 0 & .17 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

M que es la matriz de los componentes en la reacción en su forma molecular. Cada columna corresponde a uno de los componentes de la reacción (salvado de trigo, oxígeno, biomasa, dióxido de carbono y agua respectivamente) y los renglones corresponden a los elementos (carbono, hidrogeno, oxígeno y nitrógeno respectivamente). Considerando el número sustancias $n=5$ y el número de elementos $k=4$, los grados de libertad $(GL) = n - k = 5 - 4 = 1$, lo que indica que con una sola sustancia que se muestre se pueden calcular los rendimientos de las demás sustancias.

$$\eta_{bio} := 1 \quad M_m := \begin{matrix} \text{biomasa} \\ \begin{pmatrix} 1 \\ 1.72 \\ 0.52 \\ 0.17 \end{pmatrix} \end{matrix}$$

η_{bio} es el rendimiento para la biomasa y M_m es el vector para biomasa con los valores de la fórmula molecular.

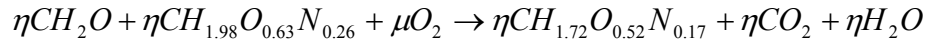
$$M_c := \begin{pmatrix} 1 & 0 & 1 & 1 & 0 \\ 1.98 & 0 & 0 & 1 & 1 \\ .63 & 2 & 2 & 2 & 2 \\ .26 & 2 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

$$\eta_c := -M_c^{-1} \cdot M_m \cdot \eta_{bio}$$

$$\eta_c = \begin{matrix} \begin{pmatrix} -0.911 \\ 0.033 \\ -0.089 \\ 0.083 \end{pmatrix} & \begin{matrix} \text{salvado} \\ \text{oxigeno} \\ CO_2 \\ \text{agua} \end{matrix} \end{matrix}$$

M_c es la matriz de las sustancias a las que se les va a calcular el rendimiento. El rendimiento de las sustancias no muestreadas η_c se calcula como menos la inversa de la matriz M_c por M_m y η_{bio} . El resultado es un vector η_c en el que cada renglón contiene el rendimiento de las sustancias no monitoreadas (salvado, oxígeno, CO₂ y agua) [24].

• **Balance con fuente de carbono:**



De forma análoga se procede con este nuevo balance de carbono en que se tiene lo siguiente:

glucosa , salvado , O₂, biomasa , CO₂, agua

$$M := \begin{matrix} C \\ H \\ O \\ N \end{matrix} \begin{pmatrix} 1 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 \\ 2 & 1.98 & 0 & 1.72 & 0 & 1 \\ 1 & .63 & 2 & .52 & 2 & 2 \\ 0 & .26 & 0 & .17 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

M es la matriz de los componentes en la reacción en su forma molecular. Cada columna corresponde a uno de los componentes de la reacción (glucosa, salvado de trigo, oxígeno, biomasa, dióxido de carbono y agua respectivamente) y los renglones se tienen los elementos (carbono, hidrogeno, oxígeno y nitrógeno respectivamente). Considerando el número sustancias $n=6$ y el número de elementos $k = 4$, los grados de libertad con los que se cuenta (GL) = $n - k = 6 - 4 = 2$, lo que indica que se deben medir por lo menos dos componentes de la reacción para calcular los rendimientos de las demás sustancias

glucosa , biomasa

$$\eta_{gb} := \begin{pmatrix} -1 \\ 1.16 \end{pmatrix} \quad M_m := \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ 2 & 1.72 \\ 1 & 0.52 \\ 0 & .17 \end{pmatrix}$$

η_{gb} es el rendimiento para la glucosa y la biomasa y M_m es el vector para glucosa y biomasa con los valores de la fórmula molecular correspondiente.

$$M_c := \begin{pmatrix} 1 & 0 & 1 & 0 \\ 1.98 & 0 & 0 & 2 \\ 0.63 & 2 & 2 & 1 \\ 0.26 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

$$\eta_c := -M_c^{-1} \cdot M_m \cdot \eta_{gb}$$

$$\eta_c = \begin{pmatrix} -0.758 \\ -0.538 \\ 0.598 \\ 0.753 \end{pmatrix} \begin{matrix} \text{salvado} \\ O_2 \\ CO_2 \\ \text{agua} \end{matrix}$$

M_c es la matriz de las sustancias a las que se les va a calcular el rendimiento. El rendimiento de las sustancias no muestreadas η_c se calcula como menos la inversa de la matriz M_c por M_m y η_{gb} . El resultado es un vector η_c en el que cada renglón contiene el rendimiento de las sustancias no monitoreadas (salvado, oxígeno, CO₂ y agua) [24].