



# Universidad Austral de Chile

---

Escuela de Ingeniería en Alimentos

## **Efecto de Dos Temperaturas y Dos Agitaciones Diarias en la Producción de Fitasa de *Aspergillus ficuum* por Fermentación en Estado Sólido.**

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Ciencia en Alimentos.

Milena Pía Tatiana Ríos Vega

Valdivia – Chile

2008

**PROFESOR PATROCINANTE:**

---

Sra Marcia Costa Lobo  
Ingeniero Civil Bioquímico  
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

**PROFESORES INFORMANTES:**

---

Sra. Maria Adela Martinez Sanguinetti  
Licenciada en Ciencias Biológicas  
Bioquímica  
Master en Nutrición y Dietética

---

Sr Fernando Figuerola Rivas  
Ingeniero Agrónomo, Master of Science en Food  
Science, Universidad de California.  
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Esta Tesis fue financiada y forma parte del proyecto DID S-2006-34 titulado “Producción a nivel prepiloto de enzima fitasa de *Aspergillus ficuum*, utilizando sistemas de fermentación en estado líquido y sólido”.

A mi madre, hermanos, y amigos...

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a Dios y a mi familia, a mi madre Liria, a mis hermanos Carolina y Boris, por su constante y gran apoyo desde el comienzo de mi vida universitaria, por no dejar que me rindiera en este largo camino, ayudar a levantarme siempre que lo necesite, ayudarme a que confié y crea mas en mi, siempre estar conmigo entregarme amor y comprensión.

A mi profesora patrocinante Sra. Marcia Costa por su constante apoyo, confianza, agradezco su paciencia y cariño.

A mis amigos con los que compartí todos estos años y que fueron un gran apoyo durante los años de estudio a Cristy, Xime, Mane, Pato y Clau, por darme animo para lograr mis metas. Además agradezco a Cristóbal responsable de que pudiera conocer y enamorarme de la carrera.

Agradezco también a la profesora Marcia Rojas por darme un espacio en su laboratorio y poder desarrollar mis ensayos, al personal del ICYTAL por su ayuda cada vez que la necesite.

## INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Objetivo general	1
1.2	Objetivos específicos	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
2.1	Ácido Fítico (AF)	2
2.1.1	Estructura química y propiedades del AF	2
2.1.2	Distribución, localización y contenido del AF	3
2.1.3	Hidrólisis del AF	3
2.1.3.1	Hidrólisis química	3
2.1.3.2	Hidrólisis enzimática	3
2.1.4	Significado nutricional y fisiológico del AF	4
2.2	Fitasa	5
2.2.1	Inclusión de fitasa en la dieta	5
2.2.2	Fitasas vegetales	6
2.2.3	Fitasas microbianas	6
2.2.3.1	Fitasas bacterianas	6
2.2.3.2	Fitasas Fúngicas	6
2.2.4	Empleo de enzimas comerciales en la industria alimentaria	7
2.2.5	¿Qué son las enzimas alimentarias?	7
2.2.6	¿Por qué son necesarias las enzimas alimentarias?	7
2.2.7	Factores que influyen en la eficiencia de las fitasas	8
2.2.7.1	Características fisiológicas	8
2.2.7.2	Calcio y relación Ca/P	8
2.2.7.3	Vitamina D	9
2.2.7.4	Procesamiento del alimento	9
2.3	Género <i>Aspergillus</i> , fuente productora de fitasa	9
2.4	Obtención de enzima fitasa	9
2.4.1	Aspectos generales de los procesos de fermentación	10

2.4.2	Fermentación en sustrato sólido (SSF)	10
2.4.3	Variables críticas de operación	11
2.4.3.1	Temperatura	11
2.4.3.2	Contenido de agua del lecho sólido	12
2.4.3.3	pH	12
2.4.3.4	Agitación	12
2.4.3.5	Aireación	13
2.4.3.6	Densidad del inóculo	13
2.4.3.7	Tamaño de partículas de los sustratos	13
3	MATERIAL Y MÉTODO	14
3.1	Microorganismo	14
3.2	Medio de cultivo	14
3.2.1	Inóculos	14
3.2.2	Medio base sustrato sólido	14
3.3	Modelo de reactor	15
3.3.1	Inoculación del equipo	15
3.3.2	Toma de muestras	15
3.3.3	Obtención del extracto crudo	16
3.3.4	Actividad enzimática	16
3.3.5	Curva de calibración para el ensayo enzimático	16
3.4	Recuento celular	16
3.5	Análisis estadístico	16
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	17
4.1	Tratamiento uno (T1), temperatura 25°C y 1 agitación diaria	17
4.2	Tratamiento dos (T2), temperatura 30°C y 1 agitación diaria	17
4.3	Tratamiento tres (T3), temperatura 25°C y 4 agitaciones diarias	18
4.4	Tratamiento cuatro (T4), temperatura 30°C y 4 agitaciones diarias	18
4.5	Producción de actividad enzimática respecto al tiempo	19
4.6	Producción de actividad enzimática respecto a las temperaturas	20
4.7	Producción de actividad enzimática respecto a las agitaciones diarias	20
5	CONCLUSIONES	22

6	RESUMEN SUMMARY	23 24
7	BIBLIOGRAFÍA	25
8	ANEXOS	29



**INDICE DE CUADROS**

Cuadro		Página
1	Composición del medio de cultivo para inóculos	14
2	Composición de medio de cultivo para SSF	14

**INDICE DE FIGURAS**

Figura		Página
1	Molécula de ácido fítico	2
2	Efectos antinutricionales de los altos niveles de AF en la dieta	4
3	Reactor de tambor estacionario de paletas planas rotatorias	15
4	Actividades enzimáticas resúmenes de los 4 tratamientos estudiados	19
5	Efecto del tiempo en la producción de actividad enzimática	20
6	Efecto de la temperatura en la producción de actividad enzimática	21
7	Efecto de las agitaciones diarias en la producción de actividad enzimática	21

**INDICE DE ANEXOS**

Anexo		Página
1	Medición de actividad de fitasa, con el método colorimétrico del reactivo de Taussky- Shorr	30
2	Preparación del reactivo de Taussky Shorr	32
3	Preparación de la curva de calibración	34
4	Curva de calibración	34
5	Presentación de los tubos para realizar la curva de calibración	35
6	Curva de calibración para el ensayo enzimático	35
7	Conteo de esporas cámara de Neubauer	36
8	Actividad enzimática resumen para los cuatro tratamientos realizados	37
9	Análisis de varianza, P-valor	37
10	Estadísticas de la influencia del tiempo en la actividad enzimática	37
11	Estadísticas de la influencia de la temperatura en la actividad enzimática	38
12	Estadísticas de la influencia del número de agitaciones en la actividad enzimática	38

## 1 INTRODUCCIÓN

El Ácido Fítico (AF) y sus sales fitatos constituyen la principal forma de almacenamiento de fósforo (P) en cereales y leguminosas, fuentes proteicas muy usadas en la alimentación animal de monogástricos. Lamentablemente este P no está disponible para animales monogástricos por carecer éstos de la enzima fitasa que libere los grupos fosfatos del AF, obligando a incorporar P adicional, lo que aumenta aún más la contaminación medioambiental, sumado al efecto del fitato que al ser excretado en las fecas y al lixiviarse produce severa polución y eutrofización en los cursos de agua.

Debido a los problemas que presenta el AF en estos tipos de alimentación, hay un considerable interés en producir fitasas para uso en alimentación animal.

### **Hipótesis:**

Si se cultiva *Aspergillus ficuum* DSM 932 en un fermentador de tambor estacionario sobre un sustrato con componentes vegetales que incluyen AF, sería posible detectar diferencias en los niveles de liberación de la enzima si se variaban algunos parámetros ambientales del proceso.

### **1.1 Objetivo general**

Estimar las mejores condiciones de producción de fitasa de *Aspergillus ficuum* DSM 932 en un fermentador de tambor estacionario sobre sustratos vegetales ricos en AF, a dos temperaturas y dos diferentes agitaciones diarias.

### **1.2 Objetivos específicos**

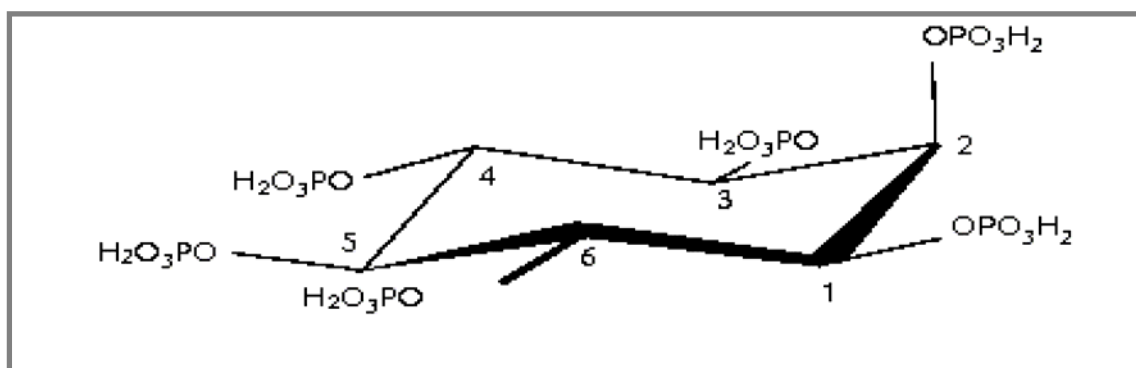
- Cultivar la cepa de *Aspergillus ficuum* DSM 932 en un fermentador de tambor estacionario con agitación interior de paletas planas sobre un sustrato sólido de componentes vegetales, a dos temperaturas y dos diferentes agitaciones diarias.
- Medición de la actividad enzimática para determinar indirectamente la producción de la enzima fitasa lograda con la fermentación del *Aspergillus ficuum* conforme lo señalado en el objetivo anterior.

## 2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Ácido Fítico (AF)

El ácido fítico, *mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis* dihidrógeno fosfato, es la principal reserva de fósforo de los vegetales.

**2.1.1 Estructura química y propiedades del AF.** Se han propuesto varios modelos para la estructura del AF. Según ANDERSON (1914), el AF sería una molécula de inositol esterificado con seis grupos ortofosfato (IP6) (FIGURA 1), de nombre químico *mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis* dihidrógeno fosfato (THOMPSON, 1987), fórmula empírica:  $C_6H_{18}O_{24}P_6$  y peso molecular 659,86 g/mol, está presente en algunos granos de cereales y leguminosas (LOVELL, 1998).



**FIGURA 1** Molécula de ácido fítico.

FUENTE: THOMPSON, 1987

Según la estructura que se muestra en la figura 1, el AF a pH neutro y al pH que normalmente presentan los alimentos, es una molécula cargada negativamente y por tanto muy reactiva, por lo que presenta una elevada capacidad para formar complejos o unirse a moléculas cargadas positivamente como cationes o proteínas (WANG, 1998). La interacción del AF con las proteínas es pH-dependiente, mientras que con los cationes la interacción es debida exclusivamente a sus numerosos grupos fosfato, ya que pueden unirse a un sólo grupo fosfato, a dos grupos fosfato de una misma molécula o a grupos fosfato de distintas moléculas de AF (THOMPSON, 1987). En la semilla el AF se encuentra como una mezcla de sales con varios cationes como K, Mg, Ca, Mn, Zn y Fe; el término fitina se ha empleado para designar una mezcla de sales de Ca y Mg del AF.

La "insolubilidad" del AF es la principal causa de su comportamiento antinutricional y de sus propiedades fisicoquímicas (WANG *et al.*, 1992). Sin embargo, es importante considerar que la solubilidad de las sales del AF varía con el pH, ya que el grado de protonación de los grupos fosfato que no se han unido a los metales está en función de dicho parámetro (NOLAN *et al.*, 1987). Aparentemente, en semillas el AF se encuentra como sales relativamente solubles de Na o K más que como fitina insoluble. Las sales de Ca y Mg son solubles a pH bajos e insolubles a pH elevados, por lo tanto a pH fisiológico serían insolubles, de ahí el descenso de la biodisponibilidad mineral. En general, las sales hidrogenadas y monovalentes del AF son solubles en agua, mientras que las sales metálicas divalentes y trivalentes son bastante insolubles.

**2.1.2 Distribución, localización y contenido de AF.** El fósforo fítico constituye la porción principal del fósforo total de las semillas de cereales y oleaginosas, representando el 60-80% de este fósforo. La concentración de fósforo fítico depende principalmente de la parte de la planta de donde procede, acumulándose fundamentalmente en la semilla. Existen también diferencias en cuanto a su riqueza entre cereales y oleaginosas. Así, los cereales y sus subproductos contienen grandes cantidades mientras que las harinas oleaginosas y los granos de leguminosas poseen niveles moderados (POINTILLART, 1994b).

**2.1.3 Hidrólisis del AF.** La hidrólisis del AF puede llevarse a cabo mediante dos procedimientos, la utilización de procesos químicos o enzimáticos.

**2.1.3.1 Hidrólisis química.** Las uniones fosfoester presentes en la estructura del AF se caracterizan por ser muy estables, sobre todo si el AF está bajo condiciones de pH básico, sin embargo, en el caso de encontrarse el AF en un medio ácido, se produce una hidrólisis lenta (ANDERSON 1980).

La hidrólisis no enzimática de los fitatos tiene lugar cuando éstos son tratados con un ácido fuerte. Aún así, si los fitatos son tratados bajo unas condiciones de reacción largas (6 h), con ácidos fuertes como ácido clorhídrico concentrado o ácido sulfúrico a una temperatura alta (100°C), no se logra que se produzca la hidrólisis completa del inositol hexafosfato (IP6) (COSGROVE, 1980).

La hidrólisis no enzimática de los fitatos también tiene lugar cuando la materia prima que lo contiene es sometida a tratamientos térmicos. Este efecto de la temperatura como un factor involucrado en la hidrólisis, se ha observado en tratamientos térmicos realizados a este tipo de materias vegetales, mediante el paso de esta materia prima por autoclavado en el enlatado y en la extrusión (PHILIPPY *et al.*, 1988).

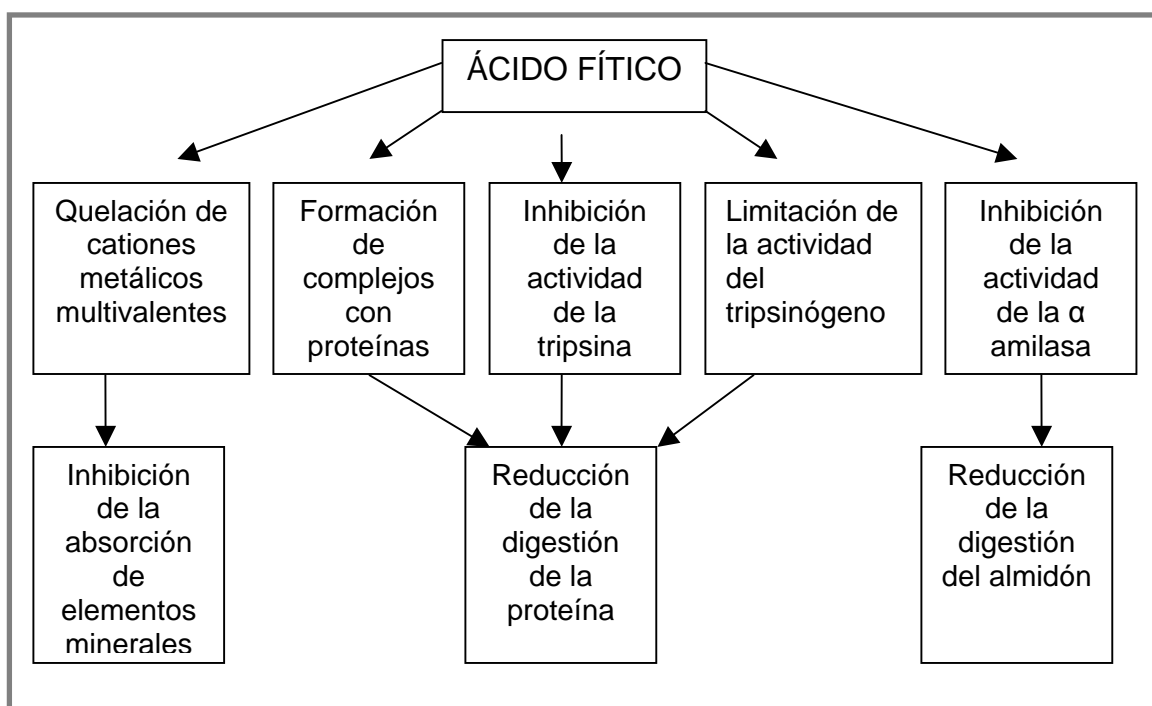
Aun así, respecto a lo anteriormente mencionado, los fitatos son ampliamente estables al calor; y su destrucción depende además de otros factores, como son el tipo de proteínas y cationes presentes en la materia prima.

**2.1.3.2 Hidrólisis enzimática.** La hidrólisis enzimática del AF es llevada a cabo mediante la acción de un grupo de enzimas denominadas fitasas. En la naturaleza estas enzimas se presentan en una gran variedad de especies, tanto en las especies

vegetales que producen el AF, como en los microorganismos que obtienen sus nutrientes a partir de los vegetales que poseen en su composición AF.

Las fitasas tienen como función el catalizar la hidrólisis de los fosfatos monoesterificados del ácido fítico dando lugar de forma progresiva a la formación de diversos fosfatos de inositol (BRENES *et al.*, 2002).

**2.1.4 Significado nutricional y fisiológico del AF.** Los fitatos reducen la biodisponibilidad mineral e inhiben enzimas proteolíticas y amilolíticas. A pesar de que la naturaleza exacta y el grado de unión del AF a minerales y proteínas son difíciles de determinar, y su papel en la nutrición es complejo, sí está claro que altos niveles de AF en la dieta están asociados a efectos antinutricionales (FIGURA 2) (SZKUDELSKI, 1997).



**FIGURA 2 Efectos antinutricionales de los altos niveles de AF en la dieta.**

FUENTE: SZKUDELSKI, 1997

Sin embargo, el ácido fítico no solo tiene efectos negativos en la salud humana; múltiples estudios indican que actúa como un antioxidante natural, debido a las propiedades quelantes del hierro, comportándose como un potente inhibidor de la formación de radicales hidroxilo de hierro, al bloquear el lugar de unión. Existen algunos estudios encaminados a explicar su papel en la prevención de ciertos cánceres, tales como el cáncer de colon. Las primeras pistas de su acción anticarcinogénica se observaron a través de estudios epidemiológicos, los cuales mostraban una menor incidencia en cáncer de colon dentro de poblaciones consumidoras de dietas vegetarianas. El mecanismo de acción no se conoce aún; sin embargo, se supone que el ácido fítico, por esa habilidad de quelar minerales, tiene un

efecto protector, al reducir por un lado, el riesgo de peroxidación lipídica (SZKUDELSKI, 1997), y por otro, la formación de radicales hidroxilo que se acomplejen al hierro en el colon (NELSON, 1976). Además el fítico disminuye los niveles séricos de colesterol y triglicéridos (efecto hipolipidémico).

## 2.2 Fitasa

Fitasa (mio-inositol hexofosfato hidrolasas) es un término genérico utilizado para describir una enzima que hidroliza los enlaces fosfomonoéster del AF, liberando ortofosfato inorgánico y mioinositol (MULLANEY y ULLAH, 2003).

Los animales monogástricos, tales como cerdos, aves y peces, no son capaces de utilizar el fósforo del ácido fítico puesto que presentan niveles muy bajos de actividad de fitasa en sus tractos digestivos. Por lo tanto, el alimento para estos animales comúnmente es suplementado ya sea con fosfato inorgánico o con alguna fitasa de origen fúngico (WYSS *et al.*, 1999).

Las fitasas son fosfatasas ácidas que catalizan el proceso de hidrólisis del AF liberando en forma secuencial hasta 6 grupos ortofosfatos libres plenamente disponibles para los monogástricos (POINTILLART, 1994b).

Las fitasas hidrolizan únicamente los fitatos en solución por lo que para actuar requieren humedad en el medio, condiciones de pH y temperatura determinadas que varían según el tipo de fitasa.

Las fitasas se encuentran ampliamente distribuidas en microorganismos, plantas y animales. Fitasas de tipo endógeno se han encontrado en el tracto gastrointestinal de cerdos, aves y otras especies monogástricas (POINTILLART, 1994b), aunque su actividad fitásica es muy escasa.

**2.2.1 Inclusión de fitasa en la dieta.** Los monogástricos digieren pobremente el fitato. La biodisponibilidad del fósforo en maíz y soya, principales ingredientes en dietas comerciales de cerdos y aves es sólo del 10 al 30%. Por lo tanto, la excreción del mismo fluctúa entre 90 y 70% (KORNEGAY, 1995). Por esto, las dietas de cerdos y aves deben ser suplementadas con fuentes minerales de alta biodisponibilidad de fósforo como fosfatos dicálcicos, monocálcico, etc.

El fósforo fítico puede ser absorbido como fosfato sólo después de ser hidrolizado por la enzima fitasa. La fitasa está presente en mínima cantidad en la pared intestinal y microflora bacteriana del cerdo (POINTILLART *et al.*, 1984). En granos de cereales y oleaginosas se encuentra en cantidades variables. Algunos hongos y levaduras son los mayores sintetizadores de la enzima (NELSON, 1967). Existen dos tipos: la 3-fitasa, que hidroliza primero el fosfato en posición 3 del mioinositol, y la 6-fitasa, que comienza hidrolizando el fosfato en posición 6. La 3-fitasa está presente en animales, mientras que la 6-fitasa está presente en plantas. La actividad de la fitasa vegetal es menor de 100 U/kg en casi todos los granos (maíz, soya, sorgo, arroz y avena). Una unidad de actividad de fitasa (U) equivale a 1  $\mu\text{mol}$  de fosfato liberado del fitato por minuto. La fitasa de origen animal tiene todavía menor actividad. Sólo trigo, cebada y

centeno tienen importante concentración de fitasa (POINTILLART, 1993). En trigo, dependiendo de la variedad, su actividad varía entre 450 y 850 U/Kg (BARRIER-GUILLOT *et al.*, 1996).

Según VOHRA y SATYANARAYANA (2003), la enzima fitasa puede ser obtenida a partir de diversas fuentes, las que se señalan en los siguientes puntos.

**2.2.2 Fitasas vegetales.** Este tipo de fitasas se conocen desde hace mucho tiempo, la primera fitasa de origen vegetal se encontró en el trigo (PEERS, 1953) y posteriormente en una gran cantidad de cereales y leguminosas. Se ha reportado la presencia de fitasa en arroz, trigo, maíz, soya, haba, centeno y otras legumbres y semillas de oleaginosa.

Pertencen al tipo 6-fitasa y se caracterizan por hidrolizar el AF comenzando por el grupo ortofosfato situado en posición 6 de la molécula, dando lugar como primer producto intermediario al D-mioinositol 1,2,3,4,5 pentaquisfosfato más una molécula de ortofosfato. Estas fitasas hidrolizan completamente el AF (WODZINSKI y ULLAH, 1996). El pH óptimo de las fitasas vegetales oscila entre 4,0 y 7,5, estando el de la mayoría entre 5,0 y 5,6; medios muy ácidos o alcalinos las inactivan de forma irreversible. Su temperatura óptima se encuentra entre 45 y 60°C, siendo inactivadas por el calor a partir de 70°C (POINTILLART, 1994; WODZINSKI y ULLAH, 1996). Las fitasas vegetales a veces son menos efectivas que las fúngicas. Esta menor efectividad se le ha atribuido al estrecho rango de pH y al mayor grado de inactivación de las fitasas vegetales en el estómago.

**2.2.3 Fitasas microbianas.** Las fitasas microbianas están divididas en los grupos:

- Fitasas bacterianas
- Fitasas fúngicas. Este tipo de fitasas han sido descubiertas en numerosas bacterias, levaduras y hongos, destacándose entre ellas las provenientes de los "*Aspergillus*", género de los hongos *ascomicetos*; siendo hoy en día este tipo de hongos los más utilizados en la producción industrial de fitasas (BRENES *et al.*, 2002).

**2.2.3.1 Fitasas bacterianas.** En relación a las fitasas producidas por bacterias, se han detectado que se producen en una gran variedad de estos microorganismos *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas sp.* (WODZINSKI y ULLAH 1996), *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. (NAGASHIMA *et al.*, 1999). Los inconvenientes de las fitasas bacterianas son su bajo rendimiento productivo y su pH neutro-alcalino que hacen prácticamente inútil su empleo como aditivos para piensos (WODZINSKI y ULLAH, 1996). Las fitasas de la flora microbiana del intestino grueso, aunque tienen actividad hidrolítica sobre los fitatos, no ejercen ningún efecto beneficioso para el animal porque el fósforo liberado no se absorbe y es totalmente excretado (BRENES *et al.*, 2002).

**2.2.3.2 Fitasas fúngicas.** En este tipo de fitasas, destacan las producidas por levaduras como *Schwanniomyces castellii* y *Saccharomyces cerevisiae* (NAGASHIMA *et al.*, 1999) y las producidas por hongos como *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus niger*,



*Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Emericella nidulans*, *Myceliophthora thermophila* y *Talaromyces thermophilus* (WYSS et al., 1999).

Para fines comerciales, las fitasas utilizadas son producidas principalmente por hongos del género *Aspergillus*. Estos hongos producen enzimas extracelulares del tipo 3-fitasa con capacidad hidrolítica del IP6 sobre el grupo ortofosfato situado en posición 3 de la molécula, dando lugar a D-mioinositol 1,2,4,5,6-pentaquisfosfato y una molécula de ortofosfato (BRENES et al., 2002). Estas fitasas no hidrolizan completamente el IP6, siendo incapaces de degradar el éster monofosfórico (IP1) (WODZINSKI y ULLAH, 1996). Los pH óptimos de este tipo de fitasas se encuentran entre 2,5 y 5,5 y su temperatura máxima de estabilidad es inferior a 80 °C. Cuando por razones de procesamiento del alimento se supera esta temperatura, las empresas comerciales recomiendan su aplicación en forma líquida una vez realizada la granulación o expansión de éste (POINTILLART, 1994a).

**2.2.4 Empleo de enzimas comerciales en la industria alimentaria.** El uso de enzimas en los procesos industriales permite frecuentemente evitar el empleo de altas temperaturas, solventes orgánicos y pH extremos, mientras que al mismo tiempo estimula la reacción específica, la pureza de los productos y reducen el impacto medioambiental. El incremento en el empleo de enzimas industriales depende de una constante innovación para mejorar el desarrollo y reducir costos. Esta innovación es llevada a cabo mediante un rápido incremento del conocimiento de una enorme diversidad de enzimas naturales, ADN recombinante y tecnologías de fermentación que permiten esta diversidad de producción a bajo costo, y la modificación de herramientas proteicas que permiten la incorporación de enzimas en el mercado industrial. Durante la última década, las enzimas alimentarias han supuesto un cambio significativo en los avances de la nutrición animal, particularmente en las especies monogástricas. Su utilización en la industria alimentaria animal es reciente, aunque está aumentando drásticamente en los últimos años con el objetivo de mejorar la calidad nutritiva de los materiales crudos (GÓMEZ-VILLALVA, 2005).

**2.2.5 ¿Qué son las enzimas alimentarias?.** Las enzimas son proteínas existentes en todas las células vivas aunque no se les considera nutrientes por sí mismos. Además de regular todos los procesos metabólicos y biológicos, son vitales en la digestión de alimentos. Al ser catalizadores aceleran las reacciones químicas en las que intervienen. Son sólo biológicamente activos bajo condiciones muy específicas de temperatura, pH y humedad. Las enzimas son muy específicas para sus sustratos y para las reacciones químicas que ellos catalizan. Son producidos por todos los organismos vivos tales como microorganismos, plantas y animales. Al ser proteínas, cuando son adicionadas al alimento, son digeridas en el tracto digestivo, del mismo modo que el resto de las proteínas, sin dejar ningún residuo en las heces u orina. La tecnología moderna hace que la extracción de enzimas procedente de bacterias u hongos sea factible. Es más, ésta permite la producción de enzimas alimentarias comerciales en gran escala y consecuentemente, hace que sean más asequibles y económicas para su uso en aplicaciones alimentarias (GÓMEZ-VILLALVA, 2005).

**2.2.6 ¿Por qué son necesarias las enzimas alimentarias?.** La necesidad de suplementar los alimentos con este tipo de enzimas se debe a numerosos factores ya

sean fisiológicos, biológicos, dietéticos y medioambientales. En animales jóvenes la producción de enzimas endógenas puede ser limitada, debido a que tienen un sistema enzimático inmaduro, por lo que el suplemento de enzimas alimentarias podría ser una necesidad fisiológica. Factores no nutritivos, tales como el ácido fítico, oligosacáridos y polisacáridos no amiláceos, se encuentran abundantemente en los ingredientes de origen vegetal. Como ya hemos comentado anteriormente, estos factores son capaces de acomplejarse con nutrientes dietéticos, afectando su digestibilidad. Sin embargo, los animales monogástricos no producen enzimas endógenas capaces de degradarlos. Por lo tanto, las enzimas alimentarias se adicionan para ayudar en la digestión y liberación de los nutrientes absorbibles y utilizables. Al eliminar los efectos no nutritivos, mejoramos la disponibilidad de los nutrientes alimentarios. Dirigir la excreción de nutrientes (particularmente fósforo, nitrógeno y minerales) en la producción de ganado es un hito importante para controlar la polución medioambiental. Así pues, las enzimas alimentarias son llaves básicas para mejorar la digestibilidad de nutrientes que no pueden ser digeridos por las enzimas endógenas (GÓMEZ-VILLALVA, 2005).

**2.2.7 Factores que influyen en la eficiencia de las fitasas.** Hay muchos factores que influyen en la eficacia de las fitasas, como por ejemplo:

**2.2.7.1 Características fisiológicas.** Las diferencias de las características fisiológicas del aparato digestivo que presentan los diferentes animales monogástricos, influyen también en la hidrólisis y absorción del fósforo fítico; así como en la actividad de las fitasas. Ejemplo de ello son las diferencias anatómicas y fisiológicas de los cerdos con respecto a las aves. El mayor tiempo de permanencia del alimento en el estómago en el cerdo y su bajo pH permiten una mejor efectividad de la actividad fitásica y, por ende, una mayor digestibilidad del P (BRENES *et al.*, 2002).

**2.2.7.2 Calcio y relación Ca/P.** Un exceso de Ca con relación al P de la dieta reduce la absorción de este último, al igual que la de otros minerales (Mg, Mn, Zn, etc), y resulta en menores crecimientos y peores índices de mineralización ósea. Además, una relación Ca:P alta disminuye la efectividad de las fitasas. El descenso de la actividad fitásica puede ser explicado en base a: 1) la utilización del P fítico está influenciada por el nivel de Ca y P de las dietas; 2) el Ca extra puede unirse a los fitatos formando complejos insolubles menos accesibles a las fitasas y 3) el Ca extra puede reprimir directamente la actividad de las fitasas compitiendo con ellas por los lugares de actuación de la enzima (KORNEGAY, 1995). El efecto negativo de altas relaciones Ca:P es mayor cuanto menores sean las dosis de fitasas añadidas y los niveles de P no fítico o total. En este caso la cantidad de P liberado de los fitatos, debido a la baja actividad fitásica, será menor acentuándose el efecto negativo de niveles bajos de P en la dieta sobre los rendimientos de los animales.

La importancia de mantener la relación Ca:P total (ó Ca:P disponible) de las dietas dentro de márgenes estrechos para mejorar la eficacia de las fitasas ha sido demostrada en ratas, broilers, pavos y cerdos (QUIAN *et al.*, 1996). Estos trabajos sugieren que la relación óptima Ca:P total es de 1,1:1 a 1,4:1 en broilers y pavos y de 1:1 a 1,1:1 en cerdos. Relaciones Ca:P total más altas (2:1 en broilers y pavos ó 1,5:1

en cerdos) reducen la utilización del P, la mineralización ósea y la velocidad de crecimiento.

**2.2.7.3 Vitamina D.** Se conoce que la vitamina D mejora la digestibilidad del P en dietas bajas y altas en fosfatos, existiendo una dosis respuesta lineal entre 0-3000 UI de vitamina D<sub>3</sub>/kg. Como se sabe que la vitamina D no altera la actividad fosfatásica de la mucosa intestinal en los cerdos, es probable que actúe indirectamente aumentando la absorción del Ca. Esto limita la formación de fosfato cálcico insoluble, disminuyendo así la cantidad de P no disponible en el tramo posterior del intestino delgado (POINTILLART, 1994b).

**2.2.7.4 Procesamiento del alimento.** La pérdida de la integridad estructural del grano puede modificar su actividad fitásica. La molienda del grano pone en contacto más estrecho sustrato y enzima, favoreciendo su acción. La alta presión a que se somete el pienso durante el proceso de granulación hace que su textura sea más fina, facilitando así aún más el acceso al sustrato de las enzimas y aumentando potencialmente su digestibilidad. (SUMMERS *et al.*, 1968).

### 2.3 Género *Aspergillus*, fuente productora de fitasa

Las especies del género *Aspergillus* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, pudiéndose aislar de una gran variedad de sustratos (ABARCA, 2000). Ello conlleva a que este género de hongo produzca una variedad de sustancias, las cuales el hombre ha aprovechado para su beneficio. Se debe destacar que los *Aspergillus* aunque también son reconocidos como patógenos oportunistas, los miembros pertenecientes a la sección *Nigri* normalmente se consideran como hongos benignos (ABARCA *et al.*, 2004). El uso que se ha dado a los hongos del género *Aspergillus* a nivel comercial tiene una historia muy larga. Así, los usos primarios de los *A. niger* son la producción de una variedad de enzimas y ácidos orgánicos mediante fermentación. Esto ha llevado a que sean usados desde hace mucho tiempo en la industria alimenticia sin que se haya demostrado hasta el momento algún efecto adverso claro en la salud humana (ABARCA *et al.*, 2004).

Muchos hongos filamentosos están naturalmente adaptados al crecimiento sobre superficies. Los hongos requieren un contacto cercano con el sustrato debido a su nutrición heterótrofa. Secretan enzimas extracelulares, absorben nutrientes a través de la pared celular y el crecimiento apical de sus hifas.

Una de las fitasas comercialmente disponibles y una de las primeras usadas (NELSON *et al.*, 1968); es extraída del hongo *Aspergillus ficcum* DSM 932, debido a su variación sufrida en su nomenclatura, también es nombrada y conocida como *A. niger* NRRL 3135, siendo éste el nombre más común usado en la actualidad. Es muy activa e hidroliza el fitato comenzando con el fosfato en posición 3.

### 2.4 Obtención de enzimas fitasas

Desde hace varios años que se ha estudiado y obtenido fitasa proveniente de hongos del género *Aspergillus*, además de otros productos. Por este motivo, se han creado y

adaptado una variedad de técnicas y métodos para la obtención y purificación de estas enzimas. Algunas de las técnicas y métodos utilizados en los últimos años se relacionan con producción mediante fermentación.

La producción de la enzima fitasa proveniente de hongos y en especial del género *Aspergillus*, ha sido llevada a cabo en variados tipos de sustratos y medios, utilizando para este propósito Fermentación Sumergida tradicional (SmF) y Fermentación en Sustrato Sólido (SSF).

En ambos tipos de fermentación los niveles de producción de fitasa se ven afectados por el tipo de inóculo usado, debido no sólo a la cantidad de biomasa, del inóculo y su origen, sino a un factor importante, la morfología fungal presente en el inóculo (PAPAGIANNI *et al.*, 2001).

**2.4.1 Aspectos generales de los procesos de fermentación.** Un proceso de fermentación típico es esencialmente un proceso que se lleva a cabo en un recipiente llamado fermentador o en general, biorreactor, mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo son transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa. El microorganismo va aumentando en su concentración en el transcurso del proceso al mismo tiempo que el medio se va modificando y se forman productos nuevos como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas. Los dos fenómenos crecimiento y formación de producto, tienen lugar durante el desarrollo del proceso simultáneamente o no, según los casos.

**2.4.2 Fermentación en Sustrato Sólido (SSF).** La definición más general y reciente fue formulada por VINIEGRA-GONZÁLEZ (1997), plantea que es un “proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos que tienen la propiedad de absorber y contener agua con o sin nutrientes solubles”.

Es el método más reciente para la producción de la enzima fitasa. El cultivo de *Aspergillus* se realiza en un sustrato sólido usando como base ingredientes naturales que son el sustrato natural del *Aspergillus* y para producir la enzima fitasa (BOGAR *et al.*, 2003).

Algunas ventajas de SSF con respecto a la SmF son:

- Los medios de cultivo son simples, generalmente subproductos agrícolas que presentan un alto contenido de los nutrientes.
- La baja actividad del agua es de gran ayuda para evitar las contaminaciones, especialmente de bacterias y levaduras.
- Es menos costoso, y entrega resultados productivos volumétricos más altos (CARTER *et al.*, 2004).
- En general para la producción de enzimas extracelulares se logran rendimientos muchísimos más altos que en SmF.
- El micelio no se disgrega.
- El equipamiento es de reducido tamaño.

No obstante, lo anterior se presentan también algunas desventajas como:

- Es aplicable sólo para microorganismos que pueden crecer a bajos niveles de humedad.
- La determinación de la biomasa y otros parámetros es muy difícil.
- La transferencia de masa limita a la difusión.
- Las esporas tienen un periodo lag mayor, debido a la germinación.
- Los tiempos de proceso son mayores.

SSF considera el cultivo de microorganismos como hongo filamentosos en un sustrato húmedo. Se usa en la producción de muchos alimentos fermentados tradicionales orientales (Ej. Koji) y también en la producción de ingredientes. Desafortunadamente tanto el diseño de equipos y procesos, y en particular su modelamiento, no han podido ser trabajados con éxito, dado que se requiere de muchísimo trabajo empírico por el gran número de variables involucradas en el proceso. Es así como mayores dificultades tienen relación con la comprensión del proceso, lo que conlleva a un escalamiento y control muy complicado.

Las variables involucradas en SSF y su importancia en el éxito del proceso tienen estrecha relación con el equipo usado, presentándose diversas configuraciones y geometrías.

### 2.4.3 Variables críticas de operación

Las variables de operación más críticas para el control de reactores SSF, lo constituyen la temperatura del lecho, pH y el contenido de agua del soporte sólido. Lo anterior resulta del hecho que los microorganismos pueden crecer y producir en un rango relativamente estrecho de condiciones de operación. La agitación y aireación del lecho sólido también constituyen factores relevantes. Además, la concentración de nutrientes y gases metabólicos afectan a la biomasa y las tasas de producción de metabolitos, aunque estas variables son muy difíciles de controlar (GELMI, 1999).

Considerando lo complejo del sistema, se han identificado las siguientes variables:

- Temperatura.
- Contenidos de humedad y  $a_w$ .
- pH.
- Aireación.
- Agitación/mezclamiento.
- Densidad del inóculo.
- Tamaño de partículas de los sustratos.

**2.4.3.1 Temperatura.** Gradientes importantes ( $3^\circ\text{C}/\text{cm}$ ) pueden ser observados en prácticamente todos los reactores estáticos de SSF (GELMI, 1999). El calor metabólico generado, producto del crecimiento del microorganismo, debe ser retirado con el fin de no alcanzar condiciones desfavorables de cultivo. El método más comúnmente utilizado en reactores piloto o de escala industrial es el flujo forzado de aire a través del lecho del reactor. En este caso, se puede manipular la temperatura de entrada y el flujo

de la corriente de aire. Sin embargo, probablemente el método más eficiente corresponde al de enfriamiento por evaporación del agua libre contenida en el lecho sólido. En esta técnica se regula la humedad relativa de la corriente de aire a la entrada del reactor. De esta manera, es posible modificar la tasa de evaporación desde el lecho sólido, logrando con ello la remoción del calor metabólico generado. La principal desventaja que presenta esta técnica es la utilización de aire muy seco, lo cual obliga el empleo de un sistema de control para el contenido de agua del reactor.

El aumento de la temperatura favorece tres aspectos negativos:

- La actividad microbiana se desacelera o se detiene.
- Se deshidrata el medio sólido.
- El metabolismo se desvía como un mecanismo de defensa ante el calor o ante la deshidratación.

**2.4.3.2 Contenido de agua del lecho sólido.** La regulación de la actividad de agua en el lecho sólido es crucial, dado que este factor determina directamente el crecimiento y la tasa de producción de metabolitos. El control del contenido de agua del lecho sólido es difícil, dado que los sensores en línea son escasos, caros y poco fiables. Sin embargo, esta limitación puede ser superada mediante mediciones secundarias en línea, tales como el peso del lecho sólido. La manera más fácil para controlar la humedad del lecho es mediante la adición directa de agua fresca. El agua también puede ser proporcionada a través de la corriente de aire en forma de vapor. Sin embargo, el método empleado dependerá del tipo de reactor utilizado y la manera en que el control de temperatura es manejado (GELMI, 1999).

**2.4.3.3 pH.** El control de pH se ve dificultado debido a la gran capacidad buffer del lecho sólido y a la falta de sensores apropiados para sustrato sólido (GELMI, 1999). Sin embargo, la regulación del pH puede ser realizada mediante la selección de nutrientes suplementarios, los cuales pueden ser alimentados periódicamente durante la fermentación.

El pH cambia por diferentes razones; normalmente disminuye por la secreción de ácidos orgánicos como acético y láctico durante el proceso. No obstante, la fuente de nitrógeno utilizada influye mucho en la tendencia que sigue el pH.

Estos conocimientos han sido utilizados por algunos investigadores para formular un medio de cultivo que permita mantener, de manera natural, el pH en un intervalo deseado durante el proceso. Así por ejemplo, RAIMBAULT y ALAZARD (1980) propusieron para el crecimiento de *Aspergillus niger* en harina de yuca una mezcla de sulfato de amonio, urea de 3:2 (calculado en base al nitrógeno) y se logró mantener el pH durante el proceso en el intervalo de 5 a 6.2 favorable para el crecimiento del microorganismo.

**2.4.3.4 Agitación.** La agitación en reactores de SSF cumple una serie de objetivos (GELMI, 1999):

- Mantener condiciones de operación homogéneas

- Permitir una distribución uniforme del agua y nutrientes
- Remover el aire ocluido entre las partículas
- Evitar la aglomeración de las partículas, crucial en el cultivo de hongos filamentosos
- Las políticas de agitación son fundamentalmente empíricas. Parámetros asociados con agitación son velocidad, sentido, y para reactores que emplean agitación intermitente lo son la frecuencia y la duración de ésta.

**2.4.3.5 Aireación.** Como se mencionó anteriormente, la aireación es un factor clave para la remoción del calor metabólico, CO<sub>2</sub> y metabolitos volátiles ocluidos entre las partículas, junto con regular la humedad del lecho. Además, la aireación del reactor permite que el crecimiento del microorganismo se realice en condiciones aeróbicas.

**2.4.3.6 Densidad del inóculo.** Otro factor que influye en los procesos de SSF lo representa el tipo de inóculo y la forma de inoculación. En la literatura se reconoce el uso de dos tipos fundamentales de inóculo en la producción de hongos, tanto a nivel de laboratorio como industrial: micelio o esporas. Las principales ventajas del uso de micelio como inóculo son: una mejor competitividad del hongo, una reducción de la posible colonización del sustrato por microorganismos contaminantes y la colonización más rápida debido a que se reducen los tiempos de incubación (la fase de latencia o de adaptación principalmente). Sin embargo, en diferentes trabajos se reporta el uso de suspensiones de esporas destacándose su principal ventaja en la reducción de los costos en la etapa de propagación del microorganismo (GELMI, 1999).

**2.4.3.7 Tamaño de partículas de los sustratos.** El tamaño de partícula está muy ligado a la transferencia de masa en el sistema de fermentación en estado sólido, otro aspecto que influye en la transferencia de masa durante el proceso, es el cambio de estructura de las partículas de sustrato resultado de la acción de los microorganismos.

Por otra parte, para el modelamiento se deben considerar aspectos tales como:

- Tamaño de partículas.
- Temperatura, gradiente en la masa sólida y en la fase gaseosa.
- Razón de volumen ocupado.
- Densidad aparente (porosidad).
- Materia seca.
- Compactación de la masa.
- Biomasa.
- Calor metabólico.
- Circulación de aire.
- Contenido de agua extracelular.
- Velocidad de rotación, etc.

### 3 MATERIAL Y MÉTODO

#### 3.1 Microorganismo

El microorganismo usado para la determinación de la cinética de producción de fitasa fue la cepa del hongo *Aspergillus ficuum* DSM 932, hongo del género *Aspergillus*.

#### 3.2 Medios de cultivo

La cepa DSM 932 de *Aspergillus ficuum* es mantenida en placas y tubos inclinados de Agar Papa Dextrosa (APD)

##### 3.2.1 Inóculos

Cada fermentación se preparó a partir de un cultivo líquido en matraces con el medio que se presenta en la CUADRO 1.

Se utilizaron dos matraces de 500 ml de capacidad, conteniendo 250 ml de medio líquido de cultivo cada uno (lográndose un total de 500 ml de inóculo) e incorporándole a cada matraz 20  $\mu$ l de concentrado de esporas del hongo *Aspergillus ficuum*, dichos matraces se dejaron germinar en un agitador orbital a 150 rpm por un periodo de dos días a 25°C.

#### CUADRO 1 Composición del Medio de cultivo para inóculos

Componente	Cantidad (g/L)
Dextrosa	20
Extracto de levadura	4

##### 3.2.2 Medio base sustrato sólido

Por otra parte, cada fermentación se llevó a cabo con el medio detallado en el CUADRO 2. La humedad inicial se logrará con la inoculación.

#### CUADRO 2 Composición del Medio de cultivo para SSF

Componente	Cantidad (g)
Maíz picado	300
Afrechillo de trigo	150
Harina integral de trigo	150
Sulfato de amonio, (NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> )	20



### 3.3 Modelo de reactor.

Se utilizó un reactor de tambor de material de vidrio, estacionario de paletas planas rotatorias de capacidad total 9 litros (FIGURA 3) en el experimento se utilizó un alto de cama constante que corresponde a 1/6 aproximadamente de la capacidad total. El reactor estaba dentro de una cama adiabática la cual tenía una fuente de calor y un termostato donde se controlaba la temperatura, además para verificar que la temperatura sea la correcta se constaba con un termómetro, la temperatura interior se controlaba y medía por medio de una termocupla, comprobando que el calor metabólico no era diferente al externo.



**FIGURA 3** Reactor de tambor estacionario de paletas planas rotatorias.

**3.3.1 Inoculación del equipo.** Se agregaron 620 gramos de la mezcla de cereales al reactor para posteriormente ser esterilizado, la inoculación se realizó con 500 ml de el medio líquido con las esporas ya germinadas del hongo *Aspergillus ficuum* (cada matraz contenía 7000 esporas en los 20  $\mu$ l de concentrado de esporas), mas 500 ml de agua destilada estéril para así obtener una humedad constante y definida de  $60\pm 1\%$  en el medio donde se realizó la fermentación.

**3.3.2 Toma de muestras.** Para tomar las muestras se utilizó una espátula estéril con la cual se tomó muestra de cada ensayo cada 24 horas, dichas muestras se guardaron en un frasco también estéril con tapa el cual es refrigerado a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

Se realizaron cuatro diferentes tratamientos cada uno en duplicado usando dos diferentes temperaturas de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  y  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  respectivamente, y dos diferentes agitaciones una cada 24 horas y la otra cada 6 horas; cada agitación corresponde a tres rotaciones del eje de paletas planas (3 vueltas), las cuales se realizaron en forma manual. Se llamo tratamiento uno (T1) a la temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  y 1 agitación por día, tratamiento dos (T2) a la temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$  y agitación por día, tratamiento tres (T3) a la temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  y 4 agitaciones por día, y finalmente tratamiento cuatro (T4) a la temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$  y 4 agitaciones por día.

Cada tratamiento se extendió por un periodo de 6 días, extrayéndose muestras en forma estéril diariamente a la misma hora.

**3.3.3 Obtención del extracto crudo.** De las muestras obtenidas diariamente del reactor, se pesaron 3 g de muestra correspondiente a cada día de fermentación, y se agregó 5 mL de Triton x 100 al 0,1% (estéril) por cada gramo de muestra; los tubos se dejaron en agitación orbital a 150 rpm por 2 horas a 25°C.

Posteriormente, para separar el extracto crudo de restos de medio y hongo, las muestras fueron centrifugadas a 9.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes de las muestras fueron refrigerados, para su posterior análisis de actividad, (ANEXOS 1 y 2).

**3.3.4 Actividad enzimática.** La actividad enzimática es la variable de respuesta esperada, ésta fue la indicativa de la producción de enzima y se midió con el método colorimétrico del reactivo de Taussky – Shorr (TAUSSKY *et al.*, 1953) que permite detectar el fósforo inorgánico (Pi) a través de la medición del ácido fosfomolibdico a partir del Pi en solución.

**3.3.5 Curva de calibración para el ensayo enzimático.** La curva se realizó por duplicado utilizando el rango de 1,00 a 0,04  $\mu\text{mol/mL}$  de Pi (ANEXO 3), y utilizando el promedio de las pendientes para el análisis.

La concentración de Pi se preparó a partir de una solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . En la preparación de la curva de calibración (ANEXO 4 y 5) las concentraciones se calcularon tomando en consideración lo indicado en el ANEXO 6.

**3.4 Recuento celular (esporas).** Se utilizó la técnica de conteo de esporas por medio de la cámara de Neubauer, contando las esporas contenidas en los 20 microlitros que se depositaron en cada matraz de inoculación, esto con el fin de estandarizar el método y conocer la cantidad exacta de esporas contenidas en el inóculo.

De una dilución de 1/100, se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y se depositaron en la cámara por capilaridad, para realizar el conteo de las esporas como se describe en el ANEXO 7.

### 3.5 Análisis Estadísticos

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando las siguientes herramientas estadísticas:

- Análisis de estadística descriptiva.
- Análisis de homogeneidad de varianza.
- Andeva y Tukey, cuando corresponda.

Las pruebas estadísticas descritas anteriormente se realizaron utilizando el software Statgraphics 5.1.

Se utilizó un diseño experimental multifactorial con 3 factores ( $2^{2*6^1}$ )\*2.

## 4 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De los cuatro tratamientos (FIGURA 4) llevados a cabo a fin de determinar indirectamente la producción de fitasa por SSF; a través unidades de actividad enzimática presente en 1 gramo de muestra por un periodo de fermentación de 6 días; los resultados obtenidos mostraron lo siguiente:

### 4.1 Tratamiento uno (T1), temperatura 25°C y 1 agitación diaria

En el tratamiento uno (T1) se puede observar una anomalía en el tiempo 72 horas (3 días) que no fue observada por CARTER *et al.* (2004), PAPAGIANNI *et al.* (2001) ni por AL-ASHEH *et al.* (1995) entre otros, por lo que no debería haber presentado una baja en la producción de unidades de actividad enzimática, esto se pudo deber a que la agitación (1 agitación diaria) no fue suficiente para dejar en contacto el hongo con el sustrato, no permite una distribución uniforme de agua y nutrientes, o la aireación no fue la adecuada, también pudo deberse a cambios importantes para la producción de algún factor ambiental durante el proceso de fermentación en estado sólido. Esta variación no sé apreció en el tratamiento dos (T2), el que consistía en la misma cantidad de agitación aunque a una diferente temperatura (30°C).

### 4.2 Tratamiento dos (T2), temperatura 30°C y 1 agitación diaria

En el tratamiento dos (T2) se aprecia una producción de unidades de actividad enzimática menor a las obtenidas a 25°C en el tratamiento uno (T1) FIGURA 4, aunque ambos ensayos constan con las mismas condiciones de producción, a excepción de la temperatura, CARTER *et al.* (2004) realizaron un estudio de la influencia de tres diferentes temperaturas (25, 30 Y 35°C) y humedades en la producción de fitasa en sustrato sólido, dando como resultado que el mayor efecto de temperaturas se apreció a las 72 y 120 horas de fermentación, el efecto de la temperatura a 30°C es estadísticamente la que entregó la mayor actividad fitasica, por otra parte, el efecto del contenido inicial de agua no presentó diferencias perceptibles, la diferencia puede estar en las condiciones de proceso, en diferente cepa de hongo e incluso en el medio utilizado, a mayor temperatura puede ocurrir una deshidratación del medio por lo que disminuye la producción.

El numero de agitaciones diarias pueden jugar un papel muy importante en el momento de la producción enzimática debido a que como fue mencionado anteriormente al ser agitaciones suaves y poco invasoras ayudan a que haya un mejor contacto entre sustrato y producto, extrae el aire ocluido y homogeniza la mezcla.

#### 4.3 Tratamiento tres (T3), temperatura 25°C y 4 agitaciones diarias

En el tratamiento tres (T3) se comprueba lo mencionado con anterioridad, que la mejor temperatura en los ensayos realizados fue de 25°C, ya que se obtienen valores de unidades enzimáticas mayores que los obtenidos en los tratamientos a 30°C (T2 y T4), y con respecto a el numero de agitación se pudo observar que los valores mas altos se obtenían cuando se agitaba más veces en el día.

Estudios realizados en matraces a diferentes agitaciones y viscosidades del hongo *Aspergillus niger* dieron como resultado que a 150 rpm se obtienen cantidades más altas de actividad de fitasa que el inóculo sometido a 300 rpm (PAPAGIANNI **et al.**, 2001), esto quiere decir que a mayor velocidad de agitación menor es la producción enzimática, no obstante esto se refiere a cuando son revoluciones por minuto (RPM), las cuales son mucho mas invasivas que agitar cada cierto tiempo debido a que son constantes y mucho mas fuertes lo que puede causar ruptura en las células del hongo y por ende una disminución en la producción enzimática.

#### 4.4 Tratamiento cuatro (T4), temperatura 30°C y 4 agitaciones diarias

El tratamiento cuatro (T4) se aprecia perfectamente una correcta producción de enzima ya que va aumentando con los días hasta llegar a una cima de producción y luego desciende AL-ASHEH **et al.** (1995) realizó un estudio en harina de canola y efectivamente donde también se presento un descenso en la producción después de que ésta llegara a un máximo, este comportamiento no es normal en actividades producidas por bacterias pero si es bastante común en la enzima fitasa.

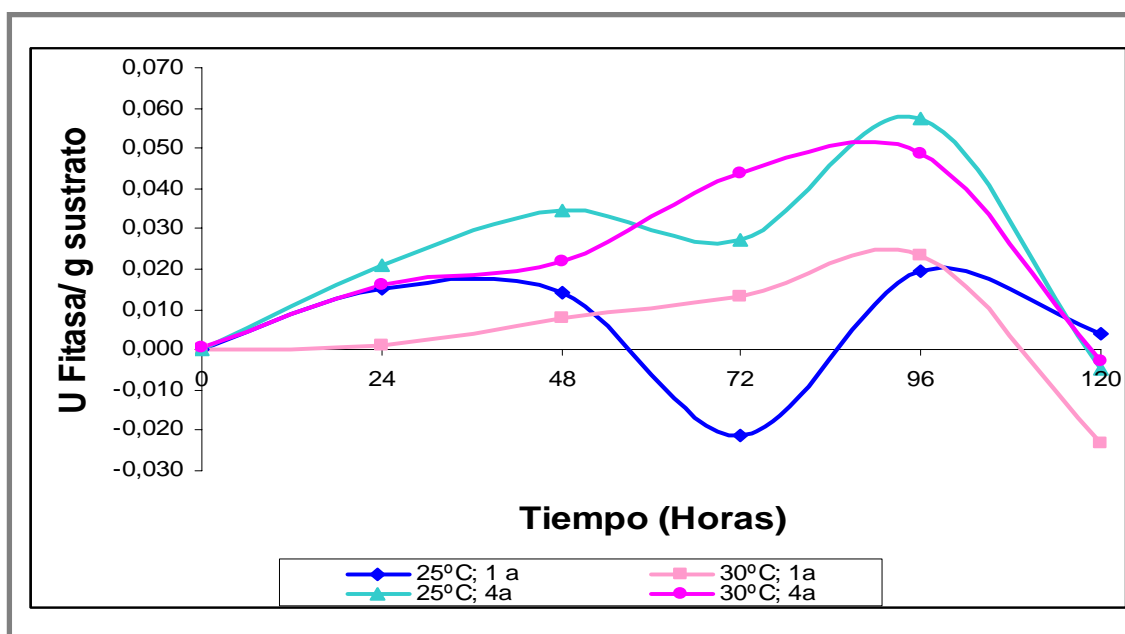
Lo anterior puede ser causado por un agotamiento del ácido fítico que provoque un cese de la producción de la enzima. No obstante ello, surge la inquietud de conocer qué es lo que realmente sucede con la enzima debido a que si se trabajó en un sistema cerrado, la enzima debió de haberse acumulado; tal vez habría sido conveniente medir la actividad específica (actividad/concentración de proteína), para concluir al respecto. Puede ser motivo de disminución de actividad; algún cambio conformacional, que la enzima presente un comportamiento rotativo o que exista la producción de algún componente que esté inhibiéndola.

Sin embargo, existe una similitud entre los cuatro diferentes tratamientos y es que el tiempo donde se presenta la mayor producción de unidades enzimáticas es a las 96 horas (4 días) de fermentación. El tiempo logrado para alcanzar el nivel máximo de producción de fitasa, fue el mismo obtenido en investigaciones previas por BOGAR **et al.** (2003), quien realizó un cultivo SSF de *Aspergillus ficuum* mediante la utilización de un medio a base de ingredientes vegetales similar al usado en la tesis para el cultivo.

En relación a los resultados obtenidos a partir de los Cultivos de la cepa *Aspergillus ficuum* DSM 932, para la producción y medición de actividad de fitasa, mostraron que la producción de fitasa llevada a cabo por fermentación en sustrato sólido (SSF), mediante un cultivo de *Aspergillus ficuum* en un medio sólido a base de una mezcla de cereales, mostró al cabo de seis días de cultivo, que en la cinética de producción

obtenida (actividad enzimática), el nivel máximo de enzima fitasa se alcanza al cabo del 4<sup>to</sup> día de fermentación en las condiciones de cultivo llevadas a cabo.

En la FIGURA 4 se pueden comparar claramente los cuatro tratamientos estudiados, observando cuales fueron los que entregaron resultados más altos y similitud entre ellos, con dicha gráfica se puede concluir que el mejor tratamiento fue el T3 de 25°C y con cuatro agitaciones por día, para verificar esto se realizaron análisis estadísticos como se puede apreciar en las FIGURAS 5,6 y 7.

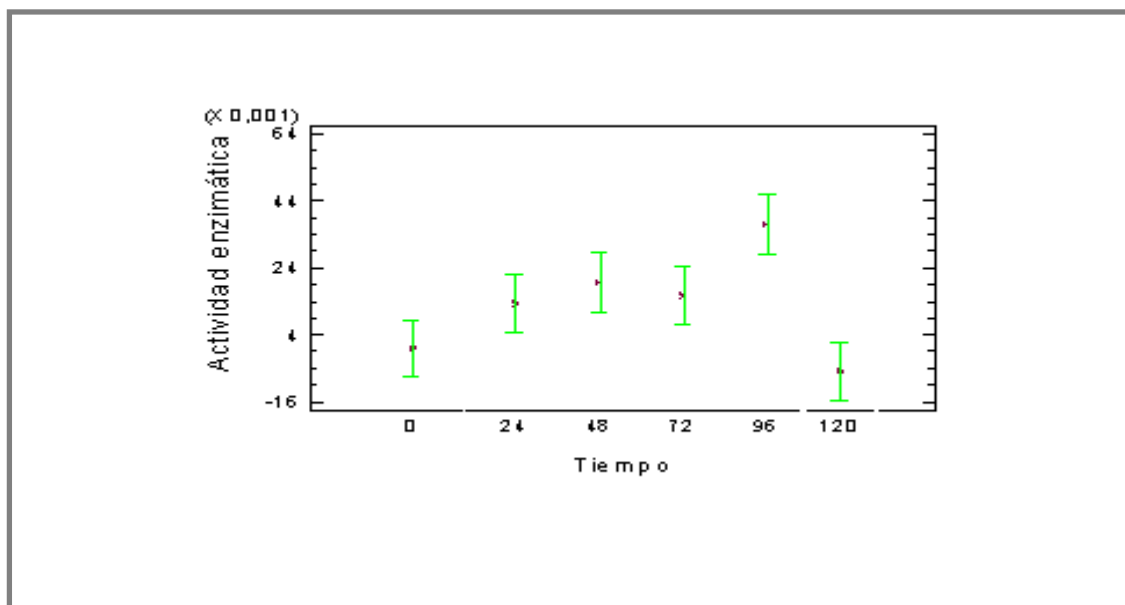


**FIGURA 4 Actividades enzimáticas resúmenes de los 4 tratamientos estudiados.**

**NOTA:** Los datos de la FIGURA 4 se adjuntan en el ANEXO 8.

#### 4.5 Producción de actividad enzimática respecto al tiempo

Al verificar estadísticamente cual fue el tiempo de fermentación que produjo la mayor cantidad de unidades enzimáticas por gramo de producto, el p-valor fue inferior a 0,05 (0,0002) ANEXO 9, por lo tanto existe diferencia significativa con un nivel de confianza de un 95,0%, es decir los tiempos son significativamente diferentes entre si, para determinar cual seria el mejor tiempo se aplicó el test de Tukey obteniéndose como resultado que el mejor tiempo para la producción enzimática fue a las 96 horas de fermentación FIGURA 5 y ANEXO 10.



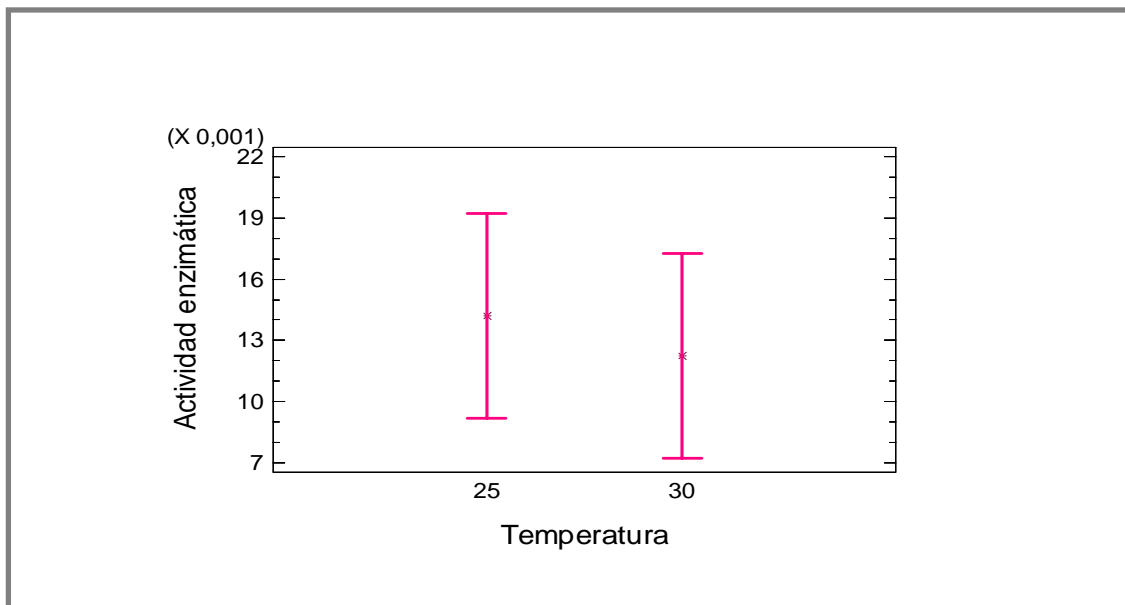
**FIGURA 5 Efecto del tiempo en la producción de actividad enzimática.**

#### **4.6 Producción de actividad enzimática respecto a las temperaturas**

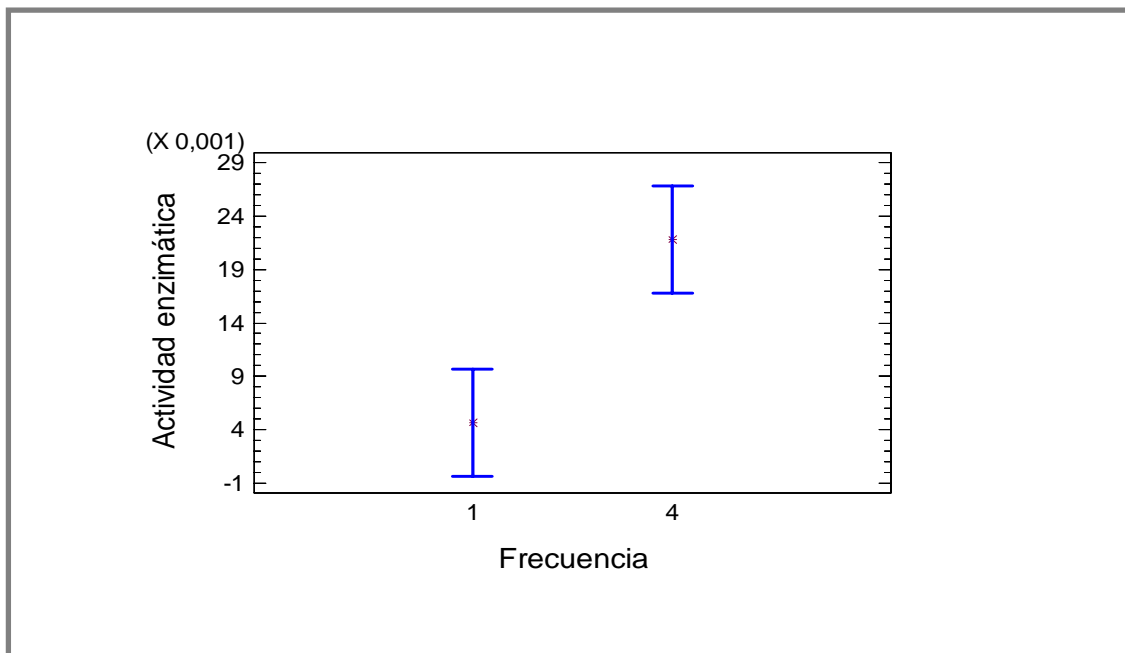
Los análisis estadísticos para verificar a que temperatura se produjo la mayor cantidad de unidades enzimáticas por gramo de producto, el p-valor fue inferior a 0,05 (0,6943) por lo tanto no existe diferencia estadísticamente significativa con un nivel de confianza de un 95,0%, es decir las temperaturas no son significativamente diferentes entre si, (FIGURA 6 y ANEXO 11).

#### **4.7 Producción de actividad enzimática respecto a las agitaciones diarias**

Los análisis estadísticos para verificar a que frecuencia de agitación se produjo la mayor cantidad de unidades enzimáticas por gramo de producto, el p-valor fue menor a 0,05 (0,0013) por lo tanto existe diferencia significativa con un nivel de confianza de un 95,0%, es decir las agitaciones diarias son significativamente diferentes entre si, para determinar cual es la mejor se aplicó el test de Tukey obteniéndose como resultado que a 4 agitaciones diarias es significativamente diferente a 1 agitación diaria considerándose mejor la producción de actividad enzimática con 4 agitaciones diarias, (FIGURA 7 y ANEXO 12).



**FIGURA 6** Efecto de las temperaturas en la producción de actividad enzimática.



**FIGURA 7** Efecto de las agitaciones diarias en la producción de actividad enzimática.

## 5 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- La producción de fitasa de *Aspergillus ficuum* DSM 932, es factible de llevar a cabo mediante una SSF, con un medio sólido a base de una mezcla de cereales ricos en AF.
- La máxima producción de fitasa se detectó a las 96 horas (4<sup>o</sup> día), para los cuatro ensayos, no obstante las diferentes condiciones de proceso.
- De las temperaturas ensayadas para producción de fitasa en SSF en las condiciones descritas, estas no presentaron diferencia estadística.
- El número de agitaciones para la producción de enzima fitasa presentaron diferencias estadísticas, por lo que 4 agitaciones diarias es mas conveniente para la producción que 1 agitación por día.
- También se realizó un análisis estadístico para comprobar si existía interacción entre las variables, dando como resultado que no existe relación entre variables.



## 6 RESUMEN

### **EFFECTO DE DOS TEMPERATURAS Y DOS FRECUENCIAS DE AGITACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE FITASA DE *ASPERGILLUS FICUUM* EN FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO.**

El objetivo de este trabajo plantea el estudio del efecto de factores físicos tales como temperatura (25°C y 30°C) y agitaciones por día (1 y 4 agitaciones en 24 horas), en la producción de enzima fitasa del hongo *Aspergillus ficuum* sobre sustratos sólidos vegetales ricos en ácido fitico, realizados en un reactor estacionario de paletas planas giratorias, el cual fue diseñado exclusivamente para efectuar esta tesis, y fue primera vez que se trabajó con él.

El ensayo con temperatura de 25°C y cuatro agitaciones por día resultaron ser las mejores condiciones para la producción de la enzima de los cuatro tratamientos realizados, alcanzando valores de 57 U/ kg a las 96 horas de fermentación.

**Palabras claves:** Fitasa, Fermentación en estado sólido, *Aspergillus ficuum*.

## SUMMARY

### **EFFECT OF TWO TEMPERATURES AND TWO AGITATION FREQUENCIES IN PHYTASE PRODUCTION OF OF *ASPERGILLUS FICUUM* IN SOLID STATE FERMENTATION.**

The aim of this work raises the study of the effect of physical factors such as temperature (25 ° C and 30 ° C) and agitation per day (1 and 4 agitation in 24 hours), on the production of phytase enzyme of the fungus *Aspergillus ficuum* in plant solid substrates rich in phytic acid conducted in a reactor stationary blades rotating flat, which was designed exclusively for this thesis, and it was the first time you worked with him.

The test temperature of 25 ° C and four frequencies per day proved to be the best conditions for the production of the enzyme reaching values of 57 U / kg to 96 hours of fermentation.

**Key words: Phytase, solid state fermentation, *Aspergillus ficuum*.**

## 7 BIBLIOGRAFÍA

- ABARCA, M.L. 2000. Taxonomy and identification of the species involved in nosocomial aspergillosis Rev. Iberoam. Micol., 17(3): 79-84.
- ABARCA, M.L; ACCENSI, F; CANO, J. y CABAÑES, F. J. 2004. Taxonomy y significance of *black aspergilli*. Antonie van Leeuwenhoek. 86: 33– 49.
- AL-ASHEH, S and DUVNJAK, Z. 1995. Phytase production and decrease of phytic acid content in canola meal by *Aspergillus carbonarius* in solid state fermentation. World J. Microb. Biot. 11(2): 228 - 231.
- ANDERSON, J. G; BLAIN, J. A. DIVERS, M. y TODD, J. R. 1980. Use of the disc fermenter to examine production of citric acid by *Aspergillus niger*. Biotechnology Letters 2: 99-104.
- ANDERSON, R.J. 1914. Contribution to the chemistry of phytin. J. Biol. Chem. 170 -171.
- BARRIER-GUILLOT. CASADO, B.P. MAUPETIT, P. JONDREVILLE, C. GATEL, F. y LARVIER M. 1996. Wheat phosphorus availability: 1. *In vitro* study; factors affecting the endogenous phytase activity and phytic phosphorus content of wheat. Relationship between different analytical characteristics; J. Sci. Food Agric., 70: 62-68.
- BOGAR, B. SZAKACS, G. LINDEN J.C. y PANDEY A. 2003. Optimization of phytase producción by substrate fermentation. J. Ind Microbiol. Biotechnol., 30: 183-189.
- BRENES, J. VIVEROS, A. y BRENES, A. 2002. Los enzimas en nutrición porcina (II) Producción Animal., 181: 4-18.
- CARTER, S.B. NOKES, S. E. y CROFCHEEK C.L. 2004. The Influence of Environmental Temperature and Substrate Initial Moisture Content on *Aspergillus Niger* Growth and Phytase Production in Solid – State Cultivation. American Society of Agricultural Engineers ISSN. 47(3): 945- 949.
- COSGROVE, D.J. 1980. En Inositol phosphates their chemistry, biochemistry and physiology. Elsevier Science Publishing, Co., New York.
- GELMI WESTON, C. 1999. Análisis modelación y simulación del crecimiento de *Gibberella fujikuroi* y producción de ácido giberélico sobre sustrato sólido inerte.

Tesis para optar al grado de Magíster en ciencias de la ingeniería. Pontificia Universidad Católica de Chile. 82 h.

- GÓMEZ-VILLALVA PELAYO, E. 2005. Transformación y mejora del valor nutritivo de la harina de guisantes mediante la adición de enzima fitasa. Tesis Doctoral, Facultad de farmacia, departamento de fisiología. Universidad de Granada. 222 h.
- KORNEGAY, E.T. 1995. Important considerations for using microbial phytase in swine diets. Proceedings BASF Technical Symposium, Pork Industry Conference. University of Illinois, Champaign, IL, November 8: 28-50.
- LOVELL, T. 1998. Nutrition and Feeding of Fish. Kluwer Academic Publishers. Estados Unidos. 267p.
- MULLANEY, E. y ULLAH, A. 2003. The term phytase comprises several different classes of enzymes. Biochemical and Biophysical Research Communications. 312: 179-184.
- NAGASHIMA, T., TANGE, T. y ANAZAWA, H 1999. Dephosphorylation of Phytate by Using the *Aspergillus niger* Phytase with a High Affinity for Phytate *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(10): 4682-4684.
- NAIR, V.C., LAFLAMME, J. y DUVNJAK, Z. 1991. Production of phytase by *Aspergillus ficcum* and reduction of phytic acid content in canola meal. *J. Sci. Food Agric.*, 54, 355-365.
- NELSON, T.S. 1967. The utilization of phytate phosphorus by poultry - a review. *Poult. Sci.*, 46: 862-871.
- NELSON, T.S. SHIEH, T.R. WODZINSKI, R.J. y WARE, J.H. 1968. The availability of phytate phosphorus in soybean meal before and after treatment with a mold phytase. *Poult. Sci.*, 47:1842-1848.
- NOLAN K.B., DUFFIN P.A. y MCWEENY D.J 1987. Effects of phytate on mineral bioavailability. *In vitro* studies on Mg, Ca, Fe, Cu, Zn, Cd. Solubilities in presence of phytate. *J Sci Food Agric*; 40: 79-85.
- 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.
- PEERS, F.G. 1953. The phytase of wheat. *Biochem. J.*, 53:102-110.
- PHILLIPY, B. JOHNSTON, M. TAO, S. y FOX, M. 1988. Inositol phosphates in processed foods. *J. AOAC.*, 74:32- 36.

- POINTILLART, A. N. FONTAINE M. y THASSET. 1984. Phytate phosphorus utilization and intestinal phosphatases in pigs fed low phosphorus: wheat or corn diets. *Nutr. Rep. Int.* 29:473.
- POINTILLART, A. 1993. Importance of cereal phytase activity for phytate phosphorus utilization by growing pigs fed diets containing triticale or corn. *J. Nutr.*, 29: 907-912.
- POINTILLART, A. 1994a. Phytates, phytases: leur importance dans l'alimentation des monogastriques. *INRA Prod. Anim. Nutr.*, 68: 1-9.
- POINTILLART, A. 1994b. The importance of cereal phytases. *Feed Mix.*, 2(3):12-15.
- RAIMBAULT, M. y ALAZARD, D. 1980. Culture Method to study fungal growth in solid state fermentation. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechn.*, 9: 199-209.
- QIAN, H., KORNEGAY, E.T. y CONNER, D.E.JR. 1996. Adverse effect of wide calcium: phosphorus ratios on supplemental phytase efficacy for weanling pigs fed two dietary phosphorus levels. *J. Anim. Sci.*, 74: 1288-1297.
- SUGIURA, S.H., RABOY, V., YOUNG, K.A., DONG, F.M. y HARDY, R.W. 1999. Availability of phosphorus and trace-elements in low-phytate varieties of barley and corn for rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 170: 285-96.
- SUMMERS, J.D., PEPPER, W.F., BAYLEY, H.S. y SLINGER, S.J. 1968. The effect of steam pelleting on the utilization of phosphorus in wheat bran. *Poult. Sci.*, 47, 1397.
- SZKUDELSKI, T. 1997. Phytic acid-its influence on organism. *J. Anim. Feed Sci.*, 6: 427-438.
- TAUSSKY, H. y SHORR, E. 1953. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus *J. Biol. Chem.*, 202(2): 675-685.
- THOMPSON, L.V. 1987. Reduction of phytic acid concentration in protein isolates by acylation techniques. *J. AOCS.*, 64: 1712-1717.
- VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORREZ, E.; AGUILAR, C.; ROMERO-GÓMEZ, S.; DÍAZ-GODINEZ, G. y AUGUR, C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid-state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal* 13:157- 167.
- VOHRA, A. y SATYANARAYANA, T. 2003. Phytases: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 23: 29–60.

- WANG, C.F., TSAY, S.M., LEE, C.Y., LIU, S.M. y ARAS, N.K. 1992. Phytate content in taiwanese diet determined by  $^{31}\text{P}$  Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. J. Agric. Food. Chem., 40: 1030-1033.
- WANG, J. 1998. Improvement of citric-acid production by *Aspergillus niger* with addition of phytate to beet molasses. Bioresource Technol., 65:243-245.
- WODZINSKI, R.J. y ULLAH, A.H.J. 1996. Phytase. Adv. Appl. Microbiol., 42: 263-302.
- WYSS, M.BRUGGER, R. KRONENBERG, A. REMY, R., FIMBEL, R. OESTERHELT, G. LEHMAN, M. y VAN LOON, A. P.G.M. 1999. Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. Appl. Environ. Microbiol., 65: 367-373.

## **ANEXOS**

## **ANEXO 1. Medición de actividad de fitasa, con el método colorimétrico del reactivo de Taussky – Shorr.**

El análisis realizado corresponde a un ensayo de tiempo fijo, en el que se mide la cantidad de fosfato inorgánico (Pi), presente en la solución, y cuya detección se basa en el uso del reactivo de Taussky-Shorr.

La reacción enzimática se realizará en tubos de ensayos por triplicado para cada muestra, siguiendo el siguiente protocolo:

### **Protocolo.** Preparación de condiciones de reacción enzimática

En un tubo de ensayo, se realiza la reacción enzimática en condiciones de reacción positiva (Rx. (+))

#### **Reacción positiva (Rx. (+)).**

Agregar:

1,0 mL MgSO<sub>4</sub> 0,1M en buffer acetato 0,2 M pH 5,15

0,6 mL de Extracto con la Enzima (muestra)

2,4 mL de solución de Ácido Fítico 6,82 mM en buffer acetato 0,2 M pH 5,15

Incubar por 1 h a 55°C

Agregar:

0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) AL 10% (para detener la reacción).

1,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y refrigerar por 20 min. (Para disminuir la temperatura).

Agregar:

2,4 mL del reactivo de Taussky-Shorr (ANEXO 1.1)

Esperar 30 minutos y medir absorbancia a 660 nm.

En otro tubo de ensayo, se realiza la reacción enzimática en condiciones de reacción negativa (Rx. (-))

#### **Reacción negativa (Rx. (-)).**

Agregar:

1,0 mL MgSO<sub>4</sub> 0,1M en buffer acetato 0,2 M pH 5,15



0,6 mL de Extracto con la Enzima (muestra)

0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) AL 10% (Para detener la reacción).

2,4 mL de solución de Ácido Fítico 6,82 mM en buffer acetato 0,2 M pH 5,15

Esperar por 1 h a T<sup>o</sup> ambiente.

Agregar:

1,0 mL de H<sub>2</sub>Od. (Para equiparar el volumen con la Rx. (+)).

Agregar:

2,4 mL del reactivo de Taussky-Shorr.

Esperar 30 minutos, medir absorbancia a 660 nm.

**ANEXO 2. Preparación del reactivo de Taussky-Shorr.****Solución Stock Molibdato de Amonio 10%**

(Para 100 mL)

10 g de Amonio Heptamolibdato (  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$  )

100 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10 N

Preparación de Ácido Sulfúrico 10 N

51 mL de ácido sulfúrico 96,1% p/p (19,596 N)

Aforar a 100 mL con  $\text{H}_2\text{O}$ .

Disolver el Amonio Heptamolibdato con agitación constante para prevenir solidificación.

Nota: Guardar en frasco oscuro.

**Reactivo de Taussky-Shorr**

(Para 200 mL)

La solución a usar en las mediciones debe ser fresca

20 mL de Solución Stock Molibdato de Amonio 10%

Diluir a 150 mL con  $\text{H}_2\text{O}$

10g de  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

Agitar hasta la disolución.

Aforar a 200 mL con  $\text{H}_2\text{O}$ .

En el tratamiento de los resultados, la medición de la absorbancia correspondiente a la cantidad de Pi liberado por la reacción enzimática, se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$AbsPi_{liberado} = [AbsRX(+)- AbsRX(-)]$$

Correspondiendo:

Abs = absorbancia

Rx.(+) y Rx.(-) = reacción enzimática en condiciones de reacción positiva y negativa respectivamente

La medición de la concentración del Pi liberado, que corresponde a la cantidad de Pi liberado por la reacción enzimática, se calculó en todas las muestras mediante la siguiente fórmula:

### Concentración del Pi liberado

$$[Pi]_{liberado} = \frac{ABS}{pendiente\ curva\ de\ calibración}$$

**Actividad de fitasa** La medición de actividad de fitasa, se calcula con la siguiente fórmula:

$$U / g = \frac{[Pi] * factor\ de\ dilución * Vol_{ensayo}}{Minutos\ de\ ensayo * Vol_{enzima} * (factor)}$$

Correspondiendo:

**U** = Unidad de actividad enzimática de la fitasa la cual corresponde a los μmoles de Pi liberado en 1 hora

**[Pi]** = Concentración del Pi liberado (μmol/ml)

**Volumen de Ensayo** = 3 mL; para equiparar con el volumen en que se calculó la concentración del fosfato inorgánico (Pi) en la curva de calibración.

**Volumen de Enzima** = 0,6 mL.

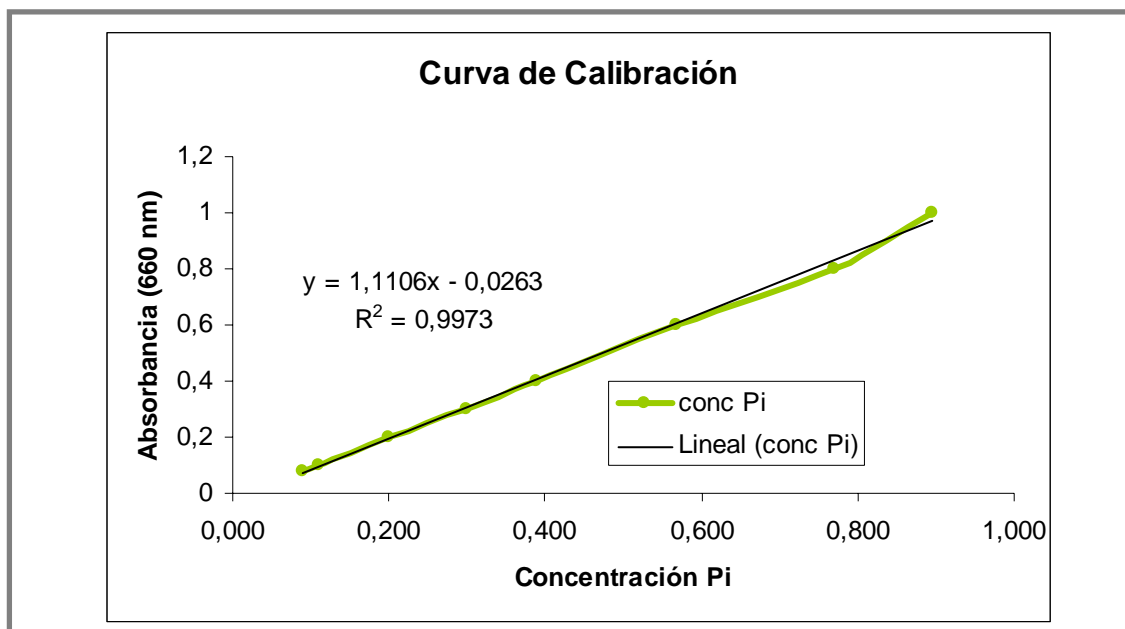
**Minutos del ensayo** = El tiempo en que se lleva a cabo el ensayo (60 minutos).

**Factor** = Corresponde a 3 gramos de muestras diluidos en 15 mL de Triton X100, de esta mezcla para análisis, dando como resultado un factor de 0,2 (g/ml)

### ANEXO 3. Preparación de Curva de calibración

Nº TUBO	CONCENTRACION Pi ( $\mu\text{mol/mL}$ )	VOLUMEN (mL) Pi 2 $\mu\text{mol/mL}$	VOLUMEN (mL) H <sub>2</sub> O	VOLUMEN (mL) TCA 10%	VOLUMEN (mL) MgSO <sub>4</sub> 0,1M en buffer acetato 0,2M pH 5,15
1	1,00	1,50	2,50	0,50	1,00
2	0,83	1,25	2,75	0,50	1,00
3	0,60	0,90	3,10	0,50	1,00
4	0,40	0,60	3,40	0,50	1,00
5	0,30	0,45	3,55	0,50	1,00
6	0,20	0,30	3,70	0,50	1,00
7	0,10	0,15	3,85	0,50	1,00
8	0,08	0,12	3,88	0,50	1,00
9	0,04	0,06	3,94	0,50	1,00
blanco	-	-	4,00	0,50	1,00

### ANEXO 4. Curva de calibración.



### ANEXO 5. Presentación de los tubos para realizar la curva de calibración.



### ANEXO 6. Curva de calibración para el ensayo enzimático

La curva se realizó por duplicado utilizando el rango de 1,00 a 0,04  $\mu\text{mol/mL}$  de Pi, y utilizando el promedio de las pendientes para el análisis.

La concentración de Pi se preparó a partir de una solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

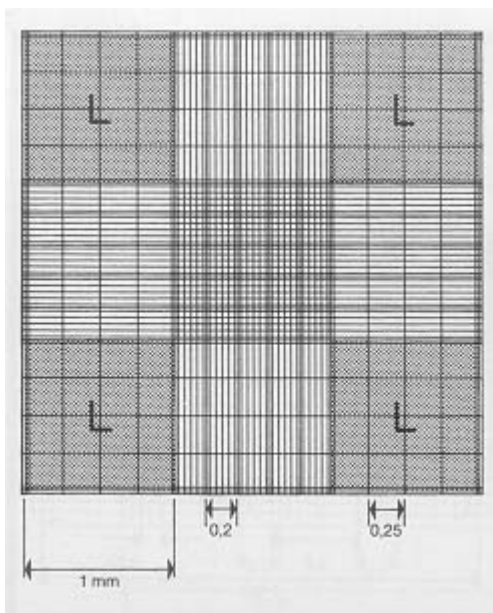
Las concentraciones están calculadas de acuerdo a: el volumen de Pi +  $\text{H}_2\text{O}$ , están en equivalencia a la suma de volúmenes de 2,4 mL de solución de Ácido Fítico 6,82 mM en buffer acetato 0,2 M pH 5,15 + 0,6 mL de Extracto con la enzima diluido adecuadamente (muestra) + 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ ; los que corresponden a los volúmenes de los reactivos que son usados en el ensayo enzimático (total 4).

De los 4 mL totales, 3 mL corresponden al volumen en que presenta la concentración del fosfato inorgánico (Pi) proveniente del  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (La molaridad del Pi esta calculada en relación a los 3 mL, el cual es tomado como volumen de ensayo).

El otro mL (1 mL), corresponde a 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , que se agrega para mantener la equivalencia con el mL (1 mL) de  $\text{H}_2\text{O}$  que es agregado a las muestras, en el ensayo enzimático.

### ANEXO 7. Conteo de esporas Cámara de Neubauer.

En la imagen puedes observar el aspecto de una de las regiones marcadas como L y que en el microscopio se ven como una cuadrícula de 16 pequeños cuadrados de 0.25 milímetros de lado.



**FUENTE:** <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/contajecelular.htm>

Al contar las cuatro áreas sombreadas (L) observando un total de x esporas entre las cuatro áreas, la concentración en la suspensión de esporas será:

Concentración en la suspensión (esporas / mL) = 10000 (x/4)

**NOTA:** La actividad enzimática fue calculada en unidades por gramo o kilo de sustrato fermentado. En el anexo 8 se muestran los promedios de los tratamientos que fueron realizados por duplicado.

**ANEXO 8. Actividad enzimática resumen para los cuatro tratamientos realizados.**

Tiempo (horas)	TRATAMIENTOS			
	T1 (U/g de extracto)	T2 (U/g extracto)	T3 (U/g extracto)	T4 (U/g extracto)
0	0,075	0,036	0,059	0,027
24	0,090	0,037	0,080	0,043
48	0,089	0,044	0,094	0,049
72	0,054	0,049	0,086	0,071
96	0,094	0,060	0,116	0,076
120	0,079	0,013	0,054	0,024

**ANEXO 9. Análisis de varianza, P- Valor.**

Análisis de la Varianza para Actividad enzimática - Sumas de Cuadrados de Tipo III					
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Frecuencia	0,00351919	1	0,00351919	11,98	0,0013
B:Tiempo	0,0095106	5	0,00190212	6,48	0,0002
C:Temperatura	0,0000460208	1	0,0000460208	0,16	0,6943
RESIDUOS	0,0117487	40	0,000293717		
TOTAL (CORREGIDO)	0,0248245	47			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

**ANEXO 10. Estadísticas de la influencia del tiempo en la actividad enzimática.**

Contraste Múltiple de Rangos para Actividad enzimática según Tiempo				
Método: 95,0 porcentaje LSD				
Tiempo	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	8	0,0	0,00605926	XX
24	8	0,0135	0,00605926	XX
48	8	0,01975	0,00605926	XX
72	8	0,015875	0,00605926	XX
96	8	0,037	0,00605926	X
120	8	-0,00675	0,00605926	X

**ANEXO 11. Estadísticas de la influencia de la temperatura en la actividad enzimática.**

Contraste Múltiple de Rangos para Actividad enzimática según Temperatura				
-----				
Método: 95,0 porcentaje LSD				
Temperatura	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
-----				
30	24	0,01225	0,00349831	X
25	24	0,0142083	0,00349831	X
-----				
Contraste	Diferencias		+/- Límites	
-----				
25 - 30	0,00195833		0,00999901	
-----				
* indica una diferencia significativa.				

**ANEXO 12. Estadísticas de la influencia del número de agitaciones en la actividad enzimática.**

Contraste Múltiple de Rangos para Actividad enzimática según Frecuencia				
-----				
Método: 95,0 porcentaje LSD				
Frecuencia	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
-----				
1	24	0,00466667	0,00349831	X
4	24	0,0217917	0,00349831	X
-----				
Contraste	Diferencias		+/- Límites	
-----				
1 - 4	*-0,017125		0,00999901	
-----				
* indica una diferencia significativa.				