

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Determinación de la Termoestabilidad de una Enzima
Fitasa Derivada de *Peniophora lycii*

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

Rodrigo Juan Pablo Segovia Oyarzún

VALDIVIA – CHILE

2005

Tendría que agradecer a una infinidad de personas y a una cantidad de sucesos el desarrollo de esta tesis, pero sólo a unos pocos les debo mis ganas de seguir y mis logros; a mi madre por su fuerza y alegría, a mi padre y hermanos y a mi Susan por su amor y apoyo incondicional.

PROFESOR PATROCINANTE:

MARCIA COSTA L.

Ingeniero Civil Bioquímico, Diploma Ingeniería Industrial

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

PROFESORES INFORMANTES:

KONG SHUN AH-HEN

Ingeniero de Alimentos, Doctor en Ingeniería

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

FERNANDO FIGUEROLA R.

Ingeniero Agrónomo, M.Sc

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Requerimientos nutricionales del salmón	3
2.1.1	Proteínas y aminoácidos	4
2.1.2	Minerales y consecuencias de su deficiencia	5
2.2	Alimento para peces	6
2.2.1	Materias primas	7
2.2.2	Proceso de elaboración	8
2.2.2.1	Pelletizado al vapor	8
2.2.2.2	Extrusión	10
2.3	Ácido fítico	10
2.4	Enzimas	12
2.4.1	Fitasa	13
2.4.2	Fitasa <i>Ronozyme P</i>	15
2.4.3	Factores que influyen la actividad enzimática	15
2.4.4	Efectos de la temperatura sobre la desnaturalización e inactivación de las enzimas	16
2.4.5	Cinética de inactivación térmica	17
3	MATERIAL Y MÉTODO	20
3.1	Cinética de inactivación térmica de la enzima fitasa líquida y granulada	20

3.1.1	Preparación de las muestras	20
3.1.2	Aplicación de tratamientos térmicos	21
3.1.3	Diseño experimental	21
3.1.4	Determinación de actividad enzimática	22
3.1.5	Cálculo de parámetros termocinéticos	23
3.1.6	Generación de un modelo matemático para ambas presentaciones enzimáticas	23
3.2	Determinación de actividad enzimática residual en alimento extruido para peces	23
3.2.1	Preparación de las muestras	24
3.2.2	Diseño experimental	24
3.2.3	Determinación de actividad enzimática	25
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	26
4.1	Determinación de actividad residual de fitasa en ambas presentaciones de enzima (líquida y granulada)	26
4.1.1	Cinética de inactivación térmica de la enzima fitasa en sus presentaciones líquida y granulada	27
4.1.2	Cálculo de los parámetros termocinéticos de la enzima fitasa en sus presentaciones líquida y granulada	30
4.1.3	Generación de un modelo matemático para ambas presentaciones enzimáticas	34
4.2	Determinación de actividad enzimática en muestras de alimento para salmones	34
5	CONCLUSIONES	37
6	RESUMEN	38
	SUMMARY	39

7	BIBLIOGRAFÍA	40
	ANEXOS	43

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Niveles recomendados de minerales en la dieta para Salmónidos	6
2	Consecuencias de la deficiencia de minerales en la dieta de salmónidos	7
3	Tratamientos térmicos a los cuales fueron sometidas las muestras de enzima fitasa líquida y granulada	22
4	Matriz de ensayos de las muestras de alimento con y sin extraer	24
5	Constantes termocinéticas obtenidas para ambas presentaciones enzimáticas	33

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Línea de flujo típica para la elaboración de alimento para peces	9
2	Estructura tridimensional del ácido fítico	11
3	Esquema del gránulo de la enzima <i>Ronozyme P</i> (CT)	16
4	Inactivación reversible e irreversible de una enzima	17
5	Efecto de la temperatura sobre la actividad residual (%) en función del tiempo de incubación para la presentación líquida de la enzima fitasa	28
6	Efecto de la temperatura sobre la actividad residual (%) en función del tiempo de incubación para la presentación granulada de la enzima fitasa	29
7	Gráfico del logaritmo de la actividad residual (%) en función del tiempo de incubación para la obtención de los valores k a distintas temperaturas para enzima líquida	31
8	Gráfico del logaritmo de la actividad residual (%) en función del tiempo de incubación para la obtención de los valores k a distintas temperaturas para enzima granulada	32
9	Actividad enzimática en muestras de alimento para salmón antes y después de ser sometidas a extrusión	35

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Determinación de actividad de fitasa en <i>tel quel</i> (<i>per se</i>) y muestras de alimento	44
2	Actividad residual obtenida para la enzima fitasa líquida (L) luego de los diferentes tratamientos térmicos	54
3	Actividad residual obtenida para la enzima fitasa granulada (CT) luego de los diferentes tratamientos térmicos	55
4	Análisis estadístico del diseño multifactorial para actividad residual en enzimas <i>per se</i>	56
5	Ejemplo de cálculo de la energía de activación (E_a) para la enzima fitasa líquida	60
6	Ejemplo de cálculo del modelo matemático de actividad residual para la enzima fitasa líquida	61
7	Análisis estadístico para muestras de alimento	62

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo sostenido de la acuicultura mundial y la tendencia negativa de las capturas silvestres, proyectan un incremento del valor de la harina de pescado, principal ingrediente de la dieta de salmones. Por consiguiente, el reemplazo de dicha fuente de proteínas por alternativas de origen vegetal resulta de gran interés para la industria elaboradora de alimento para peces.

Sin embargo, los ingredientes de origen vegetal utilizados en la formulación de dietas para peces presentan una variedad de sustancias definidas como antinutricionales tales como el ácido fítico, principal fuente de fósforo en granos; esto se traduce en una baja disponibilidad de este mineral y por consiguiente un aumento de excreción de dicho mineral al medio acuático. Por otra parte, el ácido fítico forma complejos con numerosos cationes minerales, lo que puede conducir a un crecimiento deficiente, trastornos de la salud y problemas digestivos en animales monogástricos, como los peces.

La enzima capaz de hidrolizar el ácido fítico liberando ortofosfato inorgánico se denomina fitasa y las investigaciones referentes a esta enzima en particular, apuntan al desarrollo de una variante más termoestable que permita su aplicación en etapas iniciales en la elaboración de alimento para animales, donde las temperaturas a las que ésta puede ser sometida superan los 70 °C. La fitasa derivada de *Peniophora lycii* se desarrolló para cumplir con esta finalidad y se encuentra disponible comercialmente en dos formatos; líquida (L) y granulada (CT), en la cual el concentrado enzimático se encuentra recubierto.

Hipótesis

Si se conocen los parámetros termocinéticos de la enzima fitasa, entonces será posible estimar el comportamiento de la enzima en condiciones definidas de temperatura y tiempo.

Objetivo general

- Determinar la estabilidad de la enzima fitasa al ser sometida a diferentes tratamientos térmicos

Objetivos específicos

- Implementar una metodología para la determinación de actividad enzimática de fitasa
- Determinar los parámetros cinéticos de la inactivación térmica de la enzima fitasa líquida (L) y granulada (CT) referidos a actividad enzimática residual
- Diseñar modelos matemáticos para la enzima fitasa líquida y granulada a partir de las constantes cinéticas obtenidas
- Determinar la actividad enzimática residual de fitasa granulada (CT) en mezclas de alimento para peces sometida a tratamientos de extrusión

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Requerimientos nutricionales del salmón

Como todos los animales, los peces deben consumir ciertos nutrientes esenciales y necesitan fuentes de energía para su crecimiento, reproducción y salud. Sin embargo, cada especie tiene sus propios requerimientos cuantitativos de aminoácidos, ácidos grasos, carbohidratos, vitaminas y minerales, los cuales varían de acuerdo a la etapa de desarrollo del animal (STEAD y LAIRD, 2002). En la actualidad los alimentos preparados comercialmente constituyen la fuente principal de nutrientes para la acuicultura (LOVELL, 1998).

El salmón requiere una dieta que contenga dichos nutrientes, no obstante, los requerimientos reales de carbohidratos son mínimos, debido a que los salmónidos y la mayoría de los peces tienen una importante capacidad para sintetizar este grupo de nutrientes. Los carbohidratos pueden ser utilizados por el pez como una fuente inmediata de energía y también pueden ser convertidos en grasa que se almacena proporcionando una fuente de energía a largo plazo (STEAD y LAIRD, 2002).

Los requerimientos de proteínas de la dieta son descritos como la cantidad mínima de proteína necesaria para alcanzar los requerimientos de aminoácidos y lograr el máximo crecimiento del pez. Estudios recientes muestran que el requerimiento de proteínas varía entre 35% y 55% como proporción de la dieta (STEAD y LAIRD, 2002).

Con respecto a los lípidos, el salmón requiere en su dieta de ciertos ácidos grasos esenciales poliinsaturados (PUFAs) para su crecimiento normal y desarrollo, éstos son: ácido docosahexanoico (DHA), eicosapentanoico (EPA) y araquidónico (AA), los cuales ayudan a mantener la integridad estructural

y funcional de las membranas celulares y también actúan como precursores de hormonas (STEAD y LAIRD, 2002).

Las vitaminas en la dieta del salmón aseguran un crecimiento rápido y una salud óptima. Pese a que estos micronutrientes se requieren en cantidades relativamente pequeñas, su deficiencia puede causar síntomas que van desde disminución del apetito hasta severas deformidades del tejido (LOVELL, 1998). Los salmónidos necesitan de 15 vitaminas, 11 hidrosolubles (STEAD y LAIRD, 2002). Las cuatro restantes A, D, E y K liposolubles (HEEN *et al.*, 1993).

La determinación de los requerimientos minerales en el pez es difícil debido a los problemas usuales encontrados en investigación con respecto a nutrición mineral, tales como formular dietas absolutamente libre de minerales y que los peces pueden absorber los minerales disueltos en el agua (STEAD y LAIRD, 2002).

2.1.1 Proteínas y aminoácidos. La proteína representa el componente principal del alimento del salmón, pero existe una gran heterogeneidad en los valores nutricionales y biológicos de las diferentes fuentes de proteínas (STEAD y LAIRD, 2002). Los peces utilizan eficientemente las proteínas como fuente de energía, sin embargo, teóricamente el salmón no requiere las proteínas de la dieta *per se*, sino los aminoácidos esenciales contenidos en las proteínas (LOVELL, 1998).

Pese a que el salmón es capaz de sintetizar ciertos aminoácidos, existen diez de ellos que no puede sintetizar, por lo que deben ser incluidos en la dieta; éstos son los denominados “aminoácidos esenciales”, leucina, isoleucina, valina, treonina, fenilalanina, metionina, triptofano, arginina, histidina y lisina. La dieta debe suministrar aminoácidos continuamente para reemplazar las proteínas que han sido deaminadas y eliminadas por el pez, y para la construcción de nuevas proteínas requeridas para la formación de nuevos tejidos, hormonas y enzimas. El requerimiento de aminoácidos en el pez varía

con la especie y depende de la edad, etapa de vida, tasa de crecimiento, composición de la dieta y condiciones medioambientales del lugar en que vive (STEAD y LAIRD, 2002). Los requerimientos cuantitativos de aminoácidos esenciales son obtenidos usualmente realizando una serie de estudios de la respuesta de crecimiento del pez con dietas formuladas con niveles determinados del aminoácido de interés (HEEN *et al.*, 1993).

De acuerdo a lo señalado por PARKER (2002), la deficiencia de proteínas o aminoácidos esenciales se observa como una reducción en la ganancia de peso; la deficiencia de aminoácidos específicos produce enfermedades en salmónidos tales como: cataratas debido a la deficiencia de metionina o triptofano, escoliosis por deficiencia de triptofano, entre otras.

2.1.2 Minerales y consecuencias de su deficiencia. Los salmónidos utilizan los minerales para propósitos estructurales, de osmorregulación y como co-factores en reacciones metabólicas (LOVELL, 1998).

El salmón requiere al igual que la mayoría de las especies animales de 22 minerales; aquellos requeridos en mayores cantidades (macroelementos) corresponden a: calcio, fósforo, magnesio, sodio, potasio, cloro y azufre, y los requeridos en pequeñas cantidades (elementos traza): hierro, cobre, zinc, manganeso, selenio, yodo, cobalto, fluor, molibdeno, aluminio, níquel, vanadio, silicio, estaño y cromo (LOVELL, 1998).

Los salmones obtienen la mayoría de sus minerales a través de la dieta. Los requerimientos dietarios de algunos minerales se presentan en el CUADRO 1.

En ocasiones se presentan deficiencias minerales en salmones cultivados, lo cual está ligado principalmente a una baja biodisponibilidad del mineral, asociada a un desbalance dietario, presentación del mineral en una forma inadecuada o interacciones con otros ingredientes de la dieta. Por ejemplo, el ácido fítico presente en ciertos ingredientes de origen vegetal puede ligar

elementos traza tales como hierro, cobre y zinc, reduciendo su biodisponibilidad (HEEN *et al.*, 1993).

CUADRO 1. Niveles recomendados de minerales en la dieta para salmónidos.

Mineral	Recomendaciones dietarias para salmónidos (mg de mineral/kg masa seca)
Calcio	3000
Fosforo	6000
Magnesio	500
Hierro	30 - 60
Cobre	5
Manganeso	20
Cobalto	5-10
Zinc	30 - 100
Yodo	0,3
Selenio	0,3

FUENTE: HEEN *et al.* (1993).

Las consecuencias asociadas a la deficiencia de los principales minerales necesarios en la dieta de salmónidos se presentan en el CUADRO 2.

2.2 Alimento para peces

El alimento puede comprender tanto como la mitad del costo de operación de un centro de cultivo de salmones. La determinación de los requerimientos nutricionales de proteínas, lípidos, carbohidratos, minerales y vitaminas de las dietas es de vital importancia para maximizar la eficiencia de la nutrición en especies cultivadas actualmente y en el desarrollo de dietas para especies con potencial de ser cultivadas (BARDACH, 1997).

CUADRO 2. Consecuencias de la deficiencia de minerales en la dieta de salmónidos.

Minerales	Señales de deficiencia
Fósforo	Disminución del crecimiento; bajos niveles de fósforo en piel y huesos
Magnesio	Bajo crecimiento; bajos niveles de magnesio en los tejidos, especialmente huesos, deformidad espinal
Hierro	Anemia
Manganeso	Tamaño pequeño; crecimiento disminuido
Cobre	Bajo crecimiento, bajos niveles de cobre en los tejidos
Yodo	Hiperplasia de la tiroides
Zinc	Cataratas; bajo crecimiento; baja concentración de zinc en los tejidos

FUENTE: LOVELL (1998).

2.2.1 Materias primas. La selección de materias primas para el desarrollo de alimento para peces depende de los requerimientos dietarios del salmón, la etapa de vida, el costo y disponibilidad de la materia prima, la aceptación pública y la legislación existente. Las materias primas pueden ser caracterizadas por su palatabilidad, digestibilidad y biodisponibilidad. Los dos nutrientes principales utilizados en dietas de salmón son las proteínas y lípidos (STEAD y LAIRD, 2002).

Actualmente la harina de pescado representa la principal fuente de proteínas (aminoácidos esenciales) para el desarrollo de alimento para peces, siendo

además una valiosa fuente de ácidos grasos esenciales y minerales. Los principales productores de harina de pescado se encuentran en Sudamérica y el norte de Europa (LOVELL, 1998).

La harina y aceite de pescado son recursos naturales. El potencial de sustitución de proteínas animales con proteínas de plantas es de gran interés para los fabricantes de alimentos. Investigaciones han mostrado que al menos 25% a 30% de la proteína de origen animal puede ser remplazada con proteínas vegetales en alimentos para peces, sin presentarse efectos negativos importantes sobre el crecimiento, eficiencia de conversión de alimento, calidad y salud del pez (STEAD y LAIRD, 2002).

2.2.2 Proceso de elaboración. Los alimentos para peces son elaborados en modernos molinos. Independiente de si el alimento esta diseñado para flotar o hundirse, el esquema general de elaboración es similar. Los granos enteros son molidos a través de un molino martillo antes de su almacenamiento. Posteriormente los ingredientes son pesados, mezclados y molidos nuevamente. Luego la mezcla de ingredientes es extruida o *pelletizada* al vapor y posteriormente enfriada o deshidratada, tamizada y cubierta por una capa de grasa que debe penetrar el *pellet* (LOVELL, 1998).

La línea de flujo de elaboración de alimento para peces se presenta en la FIGURA 1.

2.2.2.1 Pelletizado al vapor. Los alimentos *pelletizados* al vapor son elaborados por utilización de humedad, calor y presión para transformar los ingredientes molidos en partículas de alimentos homogéneas más grandes (PARKER, 2002). El vapor se adiciona para aumentar el nivel de humedad hasta 15 a 18% y la temperatura hasta 75 a 80 °C. El vapor ayuda a gelatinizar el almidón lo que permite la unión de las partículas. La masa caliente es forzada a pasar a través de una matriz en un molino, donde salen los *pellets* con aproximadamente un 10% de humedad, por lo cual deben ser deshidratados; y

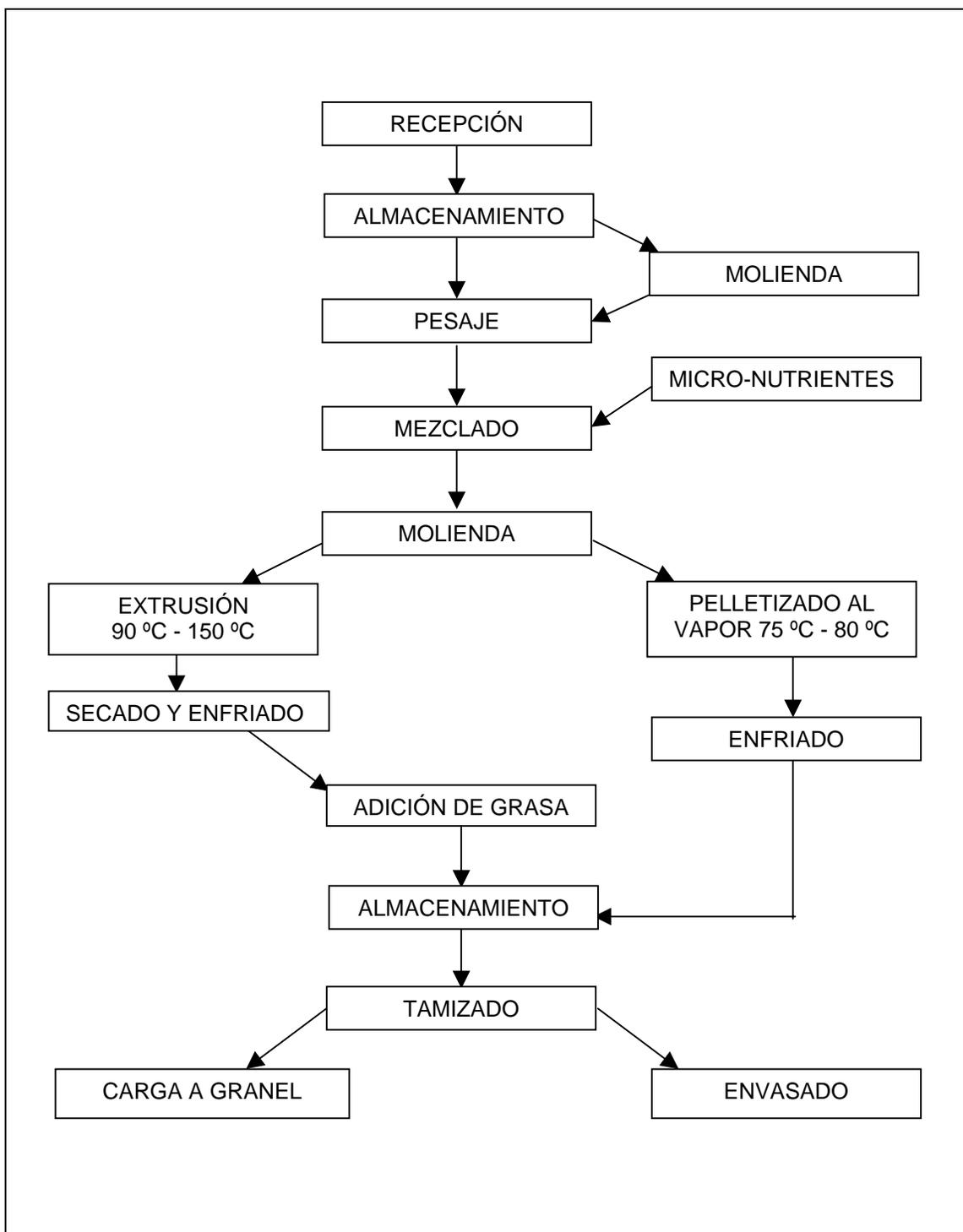


FIGURA 1. Línea de flujo típica para la elaboración de alimento para peces.

FUENTE: LOVELL (1998).

luego enfriados. Los alimentos *pelletizados* al vapor son generalmente más económicos que los alimentos extruidos, debido a que se utiliza menos energía en su proceso de elaboración y también ocurre una menor destrucción de nutrientes si se compara con la extrusión (LOVELL, 1998).

2.2.2.2 Extrusión. La cocción-extrusión consiste en forzar a un producto a pasar a través de un orificio de pequeño diámetro, bajo la presión obtenida gracias a uno o dos tornillos de Arquímedes (CASP y ABRIL, 1999). Es un proceso que involucra la plasticidad y cocción de los ingredientes del alimento en un tonel extrusor por una combinación de presión, calor y fricción (LOVELL, 1998).

Los ingredientes de los alimentos para peces son una mezcla de materiales de almidón y proteínas que son humedecidos para formar una masa, que puede ser preacondicionada en una cámara por 3 a 5 minutos durante los cuales la humedad se adiciona en forma de vapor para elevar el nivel de humedad de la masa a 25% aproximadamente. Durante este período la masa se cocina a medida que la humedad penetra las partículas del alimento (LOVELL, 1998).

Al entrar la masa al extrusor las temperaturas pueden variar de 90 °C a 150°C y son generadas a partir de la fricción en el extrusor, la mezcla es forzada a través de una matriz de 3 a 6 mm de diámetro ubicada al final del extrusor. El paso del producto a través de la matriz da la forma al producto y una repentina reducción en la presión produce la vaporización de parte del agua de la mezcla. El nivel de humedad de los pellet que abandonan el extrusor es más alta (18% a 21%) que la del alimento pelletizado al vapor por lo cual los pellet extruidos deben ser deshidratados a altas temperaturas por largos periodos de tiempo (LOVELL, 1998).

2.3 Ácido fítico

El ácido myoinositol – hexafosfórico (FIGURA 2), cuya fórmula empírica es

$C_6H_{18}O_{24}P_6$ y su peso molecular 659,86 está presente en los granos de mono- y dicotiledóneas, como son los cereales y las leguminosas (LOVELL, 1998).

El ácido fítico se considera como un agente de desasimilación mineral, pues durante la digestión forma complejos con numerosos cationes minerales, entre los cuales se encuentra, el calcio, magnesio, hierro, zinc (ADRIAN y FRANGNE, 1990). Además es considerado como la principal fuente orgánica de fósforo en plantas (VOHRA y SATYANARAYANA, 2003), dado que aproximadamente el 67% del fósforo en granos está en forma de fitato (LOVELL, 1998), que es la sal de ácido fítico (OATWAY *et al.*, 2001).

Los ingredientes derivados de plantas comúnmente utilizados y con potencial de uso en alimento para peces tales como harina de soya, harina de raps y harina de sésamo contienen 10-15, 50-75 y 24 g/kg de fitato, respectivamente (FRANCIS *et al.*, 2001).

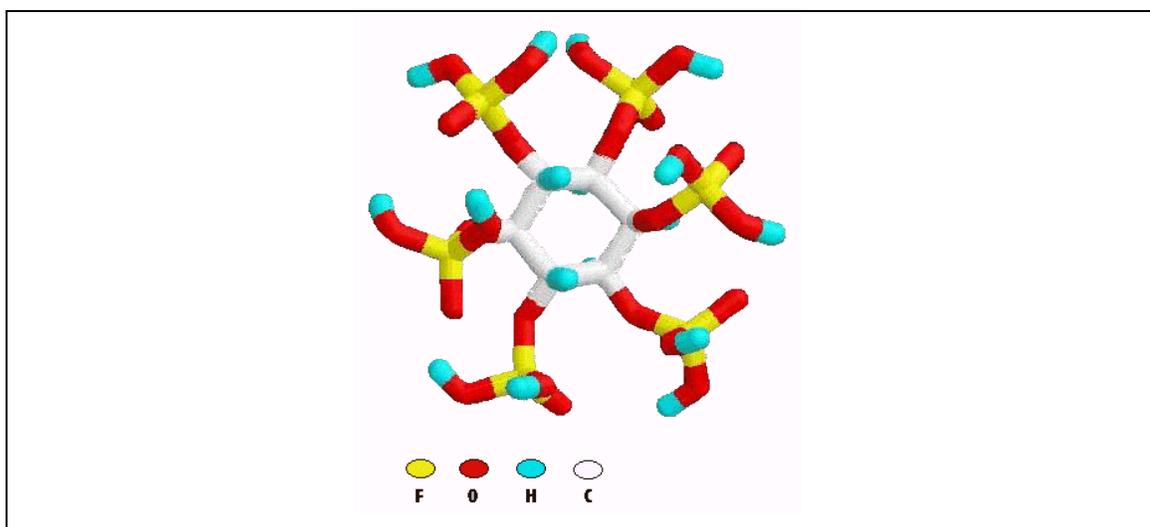


FIGURA 2. Estructura tridimensional del ácido fítico.

FUENTE: www.dep.state.pa.us/dep/deputate/watermgt/WSM/WSM_TAO/InnovTechForum/InnovTechForum-IE-Angel_65-78.pdf

Según VOHRA y SATYANARAYANA (2003), el ácido fítico interactúa con otros

ingredientes alimenticios, convirtiéndose en un factor antinutricional por diferentes vías, las que son descritas a continuación:

- Seis grupos reactivos en las moléculas de ácido fítico lo convierten en un fuerte agente quelante, uniendo cationes divalentes tales como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} y Zn^{2+} . Bajo condiciones de pH gastrointestinal, los fitatos forman complejos metálicos insolubles, haciendo que los metales no estén disponibles para la absorción en el tracto digestivo de animales y humanos.
- Los fitatos reducen la digestibilidad de las proteínas, almidones y lípidos. La formación de complejos con proteínas, las hace menos solubles, resistiendo la proteólisis. Por otro lado, pueden afectar la digestibilidad del almidón a través de una interacción con la enzima amilasa.
- La acción de ciertas enzimas, tales como tripsina, tirosinasa y amilasa se ha visto inhibida por la presencia de ácido fítico.

2.4 Enzimas

Las enzimas están constituidas por proteínas globulares (FENNEMA, 1993) y la mayoría de ellas está compuesta por más de 100 aminoácidos (HICKS, 2000). Aceleran la velocidad de las reacciones químicas respecto de las reacciones no catalizadas (FENNEMA, 1993), dado que disminuyen la energía de activación, facilitando el inicio de la reacción; es decir, son catalizadores que pueden ser definidos como agentes que afectan la velocidad de una reacción química, sin participar como reactantes y sin aparecer en los productos finales de la reacción (HICKS, 2000).

Unas de las principales características de las enzimas es su alta especificidad, la gran mayoría tiene la capacidad de catalizar reacciones más o menos específicas, es decir, su intervalo de acción se limita a un determinado tipo de compuesto que debe reunir ciertas características para que pueda ser utilizado como sustrato (BADUI, 1999).

En la catálisis sólo una región relativamente pequeña de la enzima entrará en contacto directo con el sustrato y se conoce como sitio activo (BELITZ y GROSCH, 1997), que corresponde a aquella porción de la proteína que participa directamente en la unión y la transformación de sustrato; generalmente existe uno por molécula de enzima (BADUI, 1999).

El sistema de nomenclatura utilizado actualmente para la identificación de enzimas es el de la Comisión de Enzima (EC), perteneciente a la Unión Internacional de Bioquímica (IUB), el cual consiste en una clasificación numérica que tiene la forma "EC i.j.k.l", donde "i", el primer dígito, indica a qué grupo pertenece con respecto al tipo de reacción catalizada: Oxidorreductasas, Transferasas, Hidrolasas, Liasas, Isomerasas y Ligasas. El segundo dígito "j", corresponde a la subclase de enzima, que por ejemplo, en el caso de las hidrolasas, se refiere al tipo de enlace que hidroliza. El tercer dígito es una subdivisión y ofrece más información con respecto al sustrato que utiliza la enzima. Finalmente, el cuarto dígito indica específicamente la acción de la enzima en cuestión (BADUI, 1999).

La potencia o actividad de una enzima no puede medirse en términos de su concentración, puesto que puede estar presente, pero en forma desnaturalizada y sin funcionalidad; por esta razón se emplea la Unidad Internacional de Actividad Enzimática, que se define como la cantidad de enzima requerida para transformar en producto un micromol de sustrato por minuto, en las condiciones óptimas de pH y temperatura (BADUI, 1999).

2.4.1 Fitasa. Fitasa es un término genérico utilizado para describir una enzima que hidroliza los enlaces fosfomonoéster del ácido fítico (myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexaquis dihidrógeno fosfato), liberando ortofosfato inorgánico (MULLANEY y ULLAH, 2003).

Dos clases de enzimas degradadoras de fitato son reconocidas por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada y la Unión Internacional de

Bioquímica (IUPAC-IUB); 3-fitasa (EC 3.1.3.8) y 6-fitasa (EC 3.1.3.26) (KONIETZNY y GREINER, 2002). La 3-fitasa hidroliza primero el grupo fosfato que se encuentra en posición 3 de la molécula de fitato, mientras que la 6-fitasa hidroliza primero el fosfato en posición 6 (ULLAH y SETHUMADHAVAN, 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).

Según VOHRA y SATYANARAYANA (2003), la enzima fitasa puede ser obtenida a partir de diversas fuentes, las que a continuación se señalan:

- Plantas: Se ha reportado la presencia de fitasa en arroz, trigo, maíz, soya, haba, centeno y otras legumbres y semillas de oleaginosa.
- Animales: La presencia de fitasa animal en hígado y sangre de ternero fue detectada por primera vez en 1908. Sin embargo, la investigación de fitasa sanguínea en mamíferos no tuvo éxito; sí se detectó fitasa en la sangre de vertebrados inferiores tales como aves, reptiles y tortugas marinas. Se ha observado actividad de fitasa en el intestino de ratas, cerdos, ovejas y humanos, siendo esta última 30 veces inferior comparada con la de una rata. Los rumiantes probablemente digieren el fitato a través de la flora microbiana del rumen.
- Microorganismos: Se ha detectado fitasa en un importante número de bacterias. La mayoría de las fitasas bacterianas están asociadas a la célula, con la excepción de *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus amylovorus*, y *Enterobacter* sp. Más de 200 fitasas aisladas de hongos pertenecen al género *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, y *Rhizopus*, presentando actividad extracelular. *Aspergillus niger* fue identificado como el hongo productor de la fitasa más activa.

Con respecto a la actividad enzimática, existen dos unidades utilizadas comercialmente para fitasa, FYT y FTU. Desde un punto de vista analítico, ambas son equivalentes y están definidas como “la cantidad de enzima que libera un μmol de fosfato inorgánico por minuto a partir de fitato de sodio 5 mM a pH 5,5 y 37 °C”. Como son equivalentes, ambas unidades pueden ser nombradas como “unidades” o “U”. La razón por la que existen dos unidades de actividad es para indicar qué reactivo (y que color) se ha usado para medir actividad. La reacción que mide FTU visualiza un color amarillo (por utilización de vanadato) y la que mide FYT se basa en la formación de una coloración azul (debido al sulfato de hierro)¹.

2.4.2 Fitasa *Ronozyme P*. Es una fitasa altamente activa derivada del hongo *Peniophora lycii*, el cual pertenece a la clase Basidiomicetes. Esta enzima es clasificada como una 6-fitasa (ULLAH y SETHUMADHAVAN, 2003). De acuerdo a BELITZ y GROSCH (1997), la clasificación de la Comisión de Enzima de la IUB para la 6-fitasa, EC 3.1.3.26, corresponde a una hidrolasa que participa en la hidrólisis de enlaces éster, siendo estos enlaces monoésteres del ácido fosfórico.

Ronozyme P (CT) fue desarrollada para mejorar la estabilidad al calor en alimentos *pelletizados*, evitando la necesidad de aplicar una fitasa líquida post-*pelleting*. En un estudio realizado en alimento *pelletizado* para aves, se concluyó que luego de someter esta enzima a tratamientos de *pelletizado* entre 73 y 99 °C por 20 a 35 s la actividad residual de fitasa varió entre 68 y 90% (WARD y WILSON, 2001).

La forma granulada CT (*coated thermostable*) es una formulación que minimiza la formación de polvo y protege la enzima de las condiciones a las que se somete durante el procesamiento del alimento, incluyendo calor y humedad². En la FIGURA 3 se muestra el esquema de la formulación del granulado.

2.4.3 Factores que influyen la actividad enzimática. La importancia de

1 Disponible en: http://www.greatvistachemicals.com/industrial_and_specialty_chemicals/phytase.html
Acceso: Diciembre 2004

2 http://www.dsm.com/en_US/downloads/dnp/51273_stabrelpr_ronp_.pdf. Acceso: Marzo 2005

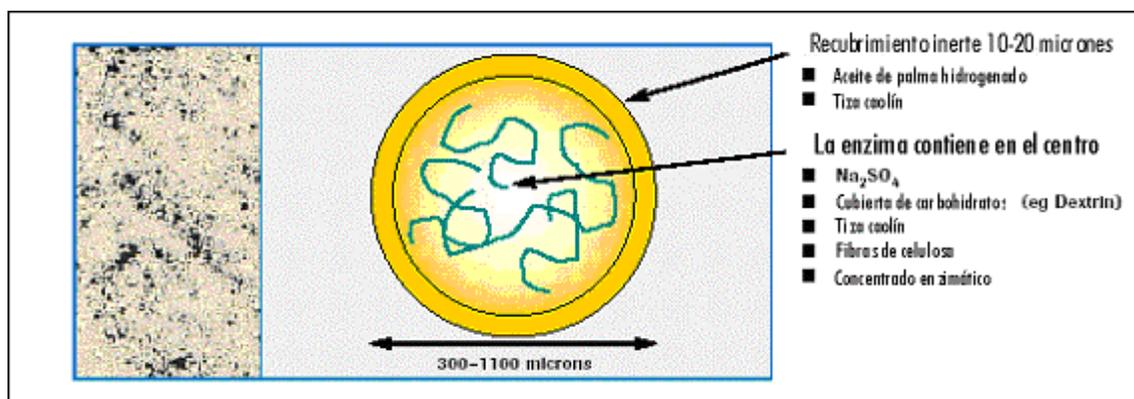


FIGURA 3. Esquema del gránulo de la enzima *Ronozyme P* (CT).

FUENTE: www.dsm.com/en_US/downloads/dnp/51273_stabrelpr_ronp_.pdf

las enzimas para la ciencia de los alimentos está, con frecuencia, determinada por las condiciones que prevalecen en el interior y el exterior del producto. Para regular la actividad enzimática durante la conservación y el procesamiento, es necesario controlar tales condiciones. Los principales factores que afectan la actividad enzimática son: temperatura, pH, actividad de agua, electrolitos y fuerzas iónicas, fuerzas de cizalladura y presión. La acción de estos factores produce la desnaturalización de la enzima, lo que se traduce en una pérdida de actividad (FENNEMA, 1993). Cuando el efecto del agente desnaturalizante no es muy intenso, se puede recuperar nuevamente su actividad al adquirir otra vez su estructura tridimensional de origen, regenerándose el sitio activo (BADUI, 1999). La inactivación reversible e irreversible de una enzima se presenta en la FIGURA 4.

2.4.4 Efectos de la temperatura sobre la desnaturalización e inactivación de las enzimas. Las enzimas operan muy lentamente a temperaturas de congelación y su actividad aumenta cuando lo hace la temperatura. La mayor parte de las enzimas presentan su actividad (actividad óptima) en el rango 30 - 40 °C y, por encima de 45 °C, comienzan a desnaturalizarse. Tienden también a tener una temperatura de resistencia máxima a la desnaturalización, por lo general claramente por debajo de la de máxima actividad (FENNEMA, 1993).

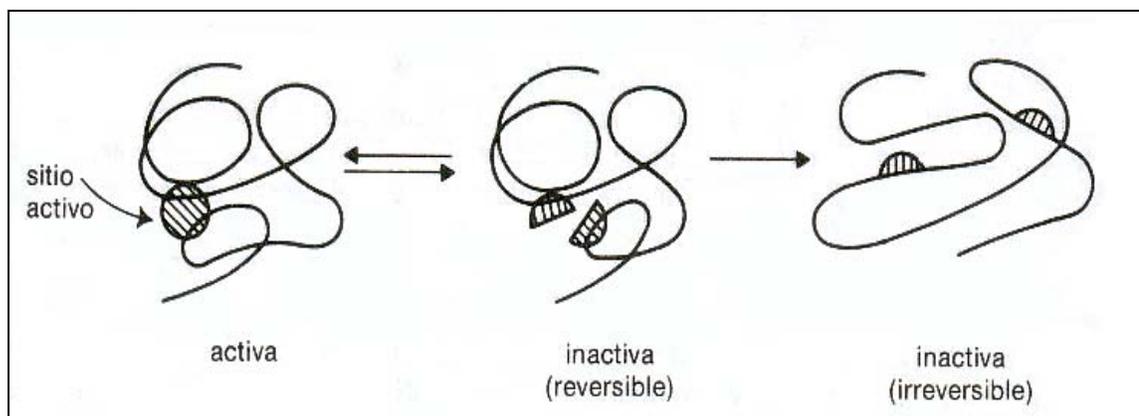


FIGURA 4. Inactivación reversible e irreversible de una enzima.

FUENTE: BADUI (1999)

Dado que la estructura proteica determina la actividad de una enzima, cualquier factor que modifique su configuración afectará su función. El proceso de desnaturalización proteica debida a un incremento en la temperatura conducirá a una modificación de la actividad. Las enzimas presentan una marcada fragilidad térmica, ya que por el calentamiento a temperaturas cercanas a los 50 °C tienen una pérdida de la estructura terciaria y, como consecuencia de la configuración de la proteína, se alteran los sitios isostérico y alostérico. Las enzimas sometidas a desnaturalización por altas temperaturas pierden su capacidad catalítica de manera irreversible debido a que las fuerzas débiles de unión se rompen al aumentar la vibración térmica, lo cual afecta la estructura terciaria (HICKS, 2000).

2.4.5 Cinética de inactivación térmica. El primer elemento esencial de información respecto de la cinética de inactivación térmica aplicada a enzimas, es la velocidad a que tiene lugar el proceso de inactivación de una enzima determinada a una temperatura dada (FENNEMA, 1993).

Según FENNEMA (1993), la denaturación proteica suele seguir cinéticas de primer orden, por lo que la inactivación de las enzimas sigue en general una cinética de primer orden.

Según Cheftel, citado por CHANDIA (2000), la inactivación enzimática por calor puede representarse por la siguiente ecuación:

$$-\frac{dA}{dt} = k \cdot A \quad (2.1)$$

Donde A es la actividad enzimática al tiempo t, k es la constante de velocidad de inactivación térmica (s^{-1}) y $\frac{dA}{dt}$ representa la variación de actividad enzimática con el tiempo.

Por integración de la ecuación (2.1) se obtiene:

$$A = A_0 \cdot e^{-kt} \quad (2.2)$$

que puede ser expresada como:

$$\log \left(\frac{A}{A_0} \right) = \frac{-kt}{2,303} \quad (2.3)$$

donde A_0 es la actividad enzimática inicial

Según FENNEMA (1993), la expresión matemática para exponer el efecto de la temperatura sobre la velocidad de un proceso químico, incluyendo reacciones enzimáticas, es la ecuación de Arrhenius:

$$k = k_0 e^{-E_a / RT} \quad (2.4)$$

en la que k_0 es el factor de Arrhenius, E_a la energía de activación, R es la constante universal de los gases y T la temperatura absoluta.

Según FENNEMA (1993), el modelo de Arrhenius no es el único utilizado para describir el efecto de la temperatura sobre las velocidades de los procesos químicos. Existen otros dos enfoques, el de los valores Q_{10} y el utilizado para construir las curvas de eficacia letal de un tratamiento térmico sobre los microorganismos (valor D).

El valor D de reducción decimal se define como el tiempo necesario para inactivar, a una temperatura constante, un 90% de la actividad enzimática original. Este término puede ser combinado con la ecuación (2.3).

$$\log\left(\frac{A}{A_0}\right) = -\frac{t}{D} \quad (2.5)$$

Por lo tanto, la relación entre k y D es:

$$\frac{1}{D} = \frac{k}{2,303} \quad (2.6)$$

obteniéndose:

$$D = \frac{2,303}{k} \quad (2.7)$$

De acuerdo a FENNEMA (1993), si se dispone de valores D a diferentes temperaturas se puede obtener el valor z, que representa el intervalo de temperatura necesario para que la curva de inactivación térmica atraviese un ciclo logarítmico.

$$\log\frac{D_2}{D_1} = -\frac{1}{z} \cdot (T_2 - T_1) \quad (2.8)$$

3. MATERIAL Y MÉTODO

Para la realización de este estudio se utilizó la enzima fitasa *Ronozyme P* en su forma líquida (L) y granulada (CT), producida y comercializada por ROCHE®. Además se utilizaron muestras de alimento para peces, con y sin extraer, en cuya formulación contenían la enzima en su forma granulada. Las muestras fueron proporcionadas por CETECSAL – SALMOFOOD, Castro.

Todos los ensayos fueron realizados en dependencias del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad Austral de Chile. Los materiales y equipos utilizados para la determinación de actividad enzimática tanto en muestras de enzima pura como en muestras de alimento para salmones se detallan en el ANEXO 1.

3.1 Cinética de inactivación térmica de la enzima fitasa líquida y granulada

Las muestras de enzima líquida y granulada fueron sometidas a una serie de tratamientos térmicos por intervalos de tiempo definidos, con el propósito de conocer su cinética de inactivación térmica. Luego de la aplicación de los diversos tratamientos se determinó la variación de actividad enzimática en relación a la muestra inicial (actividad residual) y se calcularon parámetros termocinéticos de ambas presentaciones enzimáticas a partir de estos resultados.

3.1.1 Preparación de las muestras. Como se consigna en el método analítico (ANEXO 1) la muestra líquida fue diluida con buffer pH 5,5 (Solución 7) para conseguir una actividad del orden de 0,1-0,5 U mL⁻¹, rango dentro del cual el método de determinación de actividad enzimática proporciona una lectura efectiva. Luego de esta dilución se tomaron 40 µL de muestra con micropipeta y este volumen fue depositado en pipetas *Pasteur* previamente

selladas a fuego de mechero.

Para las muestras de fitasa granulada se pesaron 0,1g en una cápsula de porcelana y mediante un embudo estas cantidades fueron depositadas en las pipetas *Pasteur*.

3.1.2 Aplicación de tratamientos térmicos. Para lograr la aplicación de distintos tratamientos térmicos en ambas presentaciones de la enzima a estudiar, se utilizaron baños de agua y aceite termorregulados, en los cuales, una vez alcanzada la temperatura de tratamiento, las muestras fueron sumergidas completamente por los intervalos de tiempo definidos.

Para detener el tratamiento térmico de las muestras, las pipetas fueron sumergidas en un baño con agua hielo a una temperatura promedio de 2 °C.

3.1.3 Diseño experimental. Se trabajó en un rango de temperaturas con inicio en los 70 °C para ambas muestras, la cual se incrementó gradualmente en 10 °C hasta alcanzar los 110 °C. Los tiempos de exposición fueron desde 0 a 120 segundos para ambas presentaciones. Las variables a estudiar corresponden a temperatura, tiempo y tipo de enzima. Para evaluar la influencia de estas variables sobre la actividad enzimática (variable respuesta), se aplicó un diseño experimental multifactorial. Los factores a analizar y sus niveles se resumen a continuación:

- Factor Temperatura: 5 niveles; 70, 80, 90, 100, 110 °C
- Factor Tiempo: 5 niveles; 0, 15, 30, 60, 120 s
- Factor Tipo de Enzima: 2 niveles; Enzima Líquida (L), Enzima Granulada (CT)

La matriz de ensayos se obtuvo utilizando el software estadístico *Statgraphics Plus versión 5.1* y en el CUADRO 3 se muestran los diferentes tratamientos realizados.

CUADRO 3. Tratamientos térmicos a los cuales fueron sometidas las muestras de enzima fitasa líquida y granulada.

Temperatura °C	Tiempo de exposición s	Repeticiones
Fitasa líquida (L)		
70	0, 15, 30, 60, 120	3
80	0, 15, 30, 60, 120	3
90	0, 15, 30, 60, 120	3
100	0, 15, 30, 60, 120	3
110	0, 15, 30, 60, 120	3
Fitasa granulada (CT)		
70	0, 15, 30, 60, 120	3
80	0, 15, 30, 60, 120	3
90	0, 15, 30, 60, 120	3
100	0, 15, 30, 60, 120	3
110	0, 15, 30, 60, 120	3

3.1.4 Determinación de actividad enzimática. Para determinar la actividad enzimática a las muestras se procedió de acuerdo al método PHY-101/04E de Roche “*Determination of Phytase Activity in Tel Quel (per se) and Feed samples*” (VOGEL y WAHL, 2002).

Principio del método: Al ser incubada la enzima fitasa libera fosfato a partir de fitato. El fosfato inorgánico liberado se determina por la formación de un complejo amarillo con un reactivo ácido molibdato/vanadato. El complejo amarillo es medido a una longitud de onda de 415 nm y el fosfato inorgánico liberado es cuantificado con una curva estándar de fosfato.

La metodología de análisis, para ambas muestras (presentaciones sólida y líquida de la enzima fitasa), se presenta en el ANEXO 1.

3.1.5 Cálculo de parámetros termocinéticos. Mediante las curvas de actividad enzimática residual obtenidas para ambos tipos de muestras en sus distintos intervalos de tiempo y temperatura, se logró determinar la cinética característica de la enzima y, a partir de esto, calcular una serie de parámetros termocinéticos: constante de velocidad de reacción (k), energía de activación (E_a), valores D y z , los cuales fueron previamente descritos en el punto 2.4.5.

Para el cálculo de la energía de activación se realizó un gráfico semilogarítmico de k versus $1/T$, del cual por medio de la pendiente se obtiene E_a .

Todos estos parámetros permiten comparar ambas presentaciones enzimáticas en función de su termoestabilidad.

3.1.6 Generación de un modelo matemático para ambas presentaciones enzimáticas. A partir del conocimiento de la cinética característica de la enzima y las constantes cinéticas obtenidas, se derivó una ecuación que permite estimar el comportamiento de la enzima fitasa en ambos formatos a cualquier temperatura y tiempo, utilizando las ecuaciones (2.2) y (2.4) que incluyen estas variables.

3.2 Determinación de actividad enzimática residual en alimento extruido para peces

Para evaluar el comportamiento de la enzima fitasa granulada (CT) en una matriz de alimento sometida a extrusión se tomaron muestras antes y después de extruir; éstas corresponden a las muestras de mezcla de ingredientes (masa) y de alimento ya elaborado que provienen del mismo *batch* de producción. Éstas fueron sometidas al proceso característico de elaboración de la planta y almacenadas por 15 días a temperatura ambiente. Luego se determinó el porcentaje de retención de actividad enzimática de las muestras extruidas en

relación a la actividad enzimática inicial de la masa sin tratamiento.

3.2.1 Preparación de las muestras. Se separaron las muestras de acuerdo al *batch* correspondiente, es decir, la muestra de mezcla de ingredientes y el alimento extruido del mismo *batch*. Se tomaron 50 g de la mezcla sin extruir y 50 g de alimento extruido, previamente triturado en un molino mecánico y se agitaron en matraces *Erlenmeyer* de 500 mL con agua destilada por 45 min para su posterior determinación de actividad enzimática.

3.2.2 Diseño experimental. El diseño experimental se obtuvo mediante el software estadístico *Statgraphics Plus versión 5.1* y consideró un diseño de factor categórico individual, donde la variable respuesta es la actividad enzimática y el factor a analizar corresponde al tipo de muestra, que incluye dos niveles: sin extruir (S/E) y extruido (C/E). Los ensayos realizados se presentan en el CUADRO 4.

CUADRO 4. Matriz de ensayos de las muestras de alimento con y sin extruir.

<i>Nº de ensayo</i>	<i>Nº de batch</i>	Tipo de muestra
1	1	S/E
2	1	C/E
3	2	S/E
4	2	C/E
5	3	C/E
6	3	S/E

Para cada determinación de actividad enzimática se realizaron tres repeticiones y el valor promedio fue ingresado en la matriz estadística.

3.2.3 Determinación de actividad enzimática. Para determinar la actividad enzimática de las muestras, se procedió de acuerdo al método PHY-101/04E de Roche *“Determination of Phytase Activity in Tel Quel (per se) and Feed samples”*.

La metodología de análisis para muestras de alimento se presenta en el ANEXO 1.

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La implementación del método de determinación de actividad de fitasa se llevó a cabo de acuerdo a lo siguiente: se procedió a una revisión de los métodos existentes actualmente considerando el método de VOGEL y WAHL (2002), ANEXO 1, como el más adecuado para la enzima a estudiar, puesto que describe la aplicación tanto en muestras de enzima *per se* como en muestras de alimento. Posteriormente, se aplicó esta metodología considerando los elementos disponibles en el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

4.1 Determinación de actividad residual de fitasa en ambas presentaciones de enzima (líquida y granulada)

La determinación de actividad enzimática luego de la serie de tratamientos térmicos a los que fueron sometidas las muestras (definidos en 3.1.3), se realizó con el fin de estimar parámetros cinéticos de la enzima en cuestión. Para lograr una presentación homogénea de los resultados de ambos formatos comerciales de la enzima, se determinó la actividad residual de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\text{Actividad residual (\%)} = \left[\frac{A}{A_0} \right] \times 100 \quad (4.1)$$

Donde: A corresponde a la actividad enzimática en el tiempo t y A_0 a la actividad enzimática inicial.

En los ANEXOS 2 y 3, se presentan los resultados obtenidos para ambos formatos comerciales de la enzima, correspondientes a los porcentajes de actividad enzimática residual en los intervalos de temperatura y tiempo definidos.

Las representaciones gráficas de estos resultados, FIGURA 5 y FIGURA 6, permiten observar claramente una mayor actividad residual en la presentación granulada para todas las series de temperaturas, en relación a la presentación líquida de la enzima, lo que es atribuible a las propiedades termorresistentes de la cubierta lipídica con que cuenta el formato CT. Por otro lado, a medida que aumenta la temperatura de tratamiento la actividad residual decae más rápidamente, lo que es válido para ambos formatos de la enzima.

Con respecto a la enzima líquida, al analizar la gráfica se observa que sobre los 90 °C la actividad residual de fitasa cae bajo un 60% a los 15 s de tratamiento, disminuyendo hasta alcanzar valores inferiores al 5%. Con respecto al tiempo de exposición, se puede apreciar que a los 120 s la actividad residual está por debajo del 50%, para todas las temperaturas aplicadas.

Por otro lado, para la enzima granulada las actividades residuales a los 15 s están por sobre el 60%, incluso a la temperatura máxima de tratamiento, a diferencia de lo obtenido para la enzima líquida.

En el ANEXO 4 se presenta el resumen del análisis estadístico del efecto de los factores tiempo, temperatura y tipo de enzima sobre la actividad residual, donde el Análisis de Varianza muestra que los tres factores aportan diferencias estadísticamente significativas a la variable respuesta actividad residual, con un 95% de confianza, dado que los valores p son inferiores a 0,05.

El análisis de Contrastes Múltiples LSD realizado, muestra que existen diferencias significativas entre las medias de actividad residual en los distintos niveles utilizados para los factores tiempo, temperatura y tipo de enzima, es decir, no existen grupos homogéneos en ninguno de los tres factores.

4.1.1 Cinética de inactivación térmica de la enzima fitasa en sus presentaciones líquida y granulada. Al representar gráficamente los logaritmos de actividad residual versus el tiempo de incubación para cada

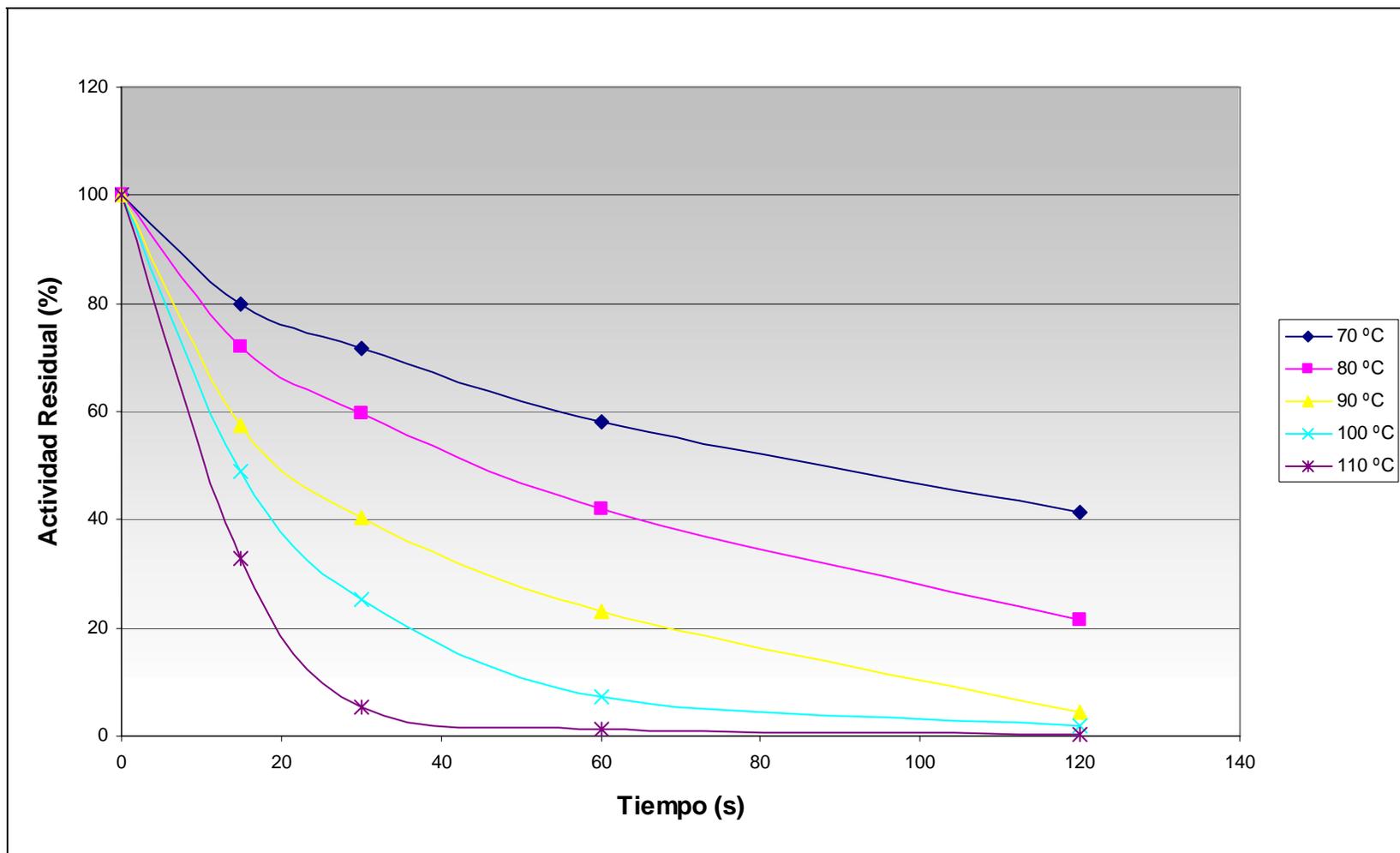


FIGURA 5. Efecto de la temperatura sobre la actividad residual (%) en función del tiempo de incubación para la presentación líquida de la enzima fitasa.

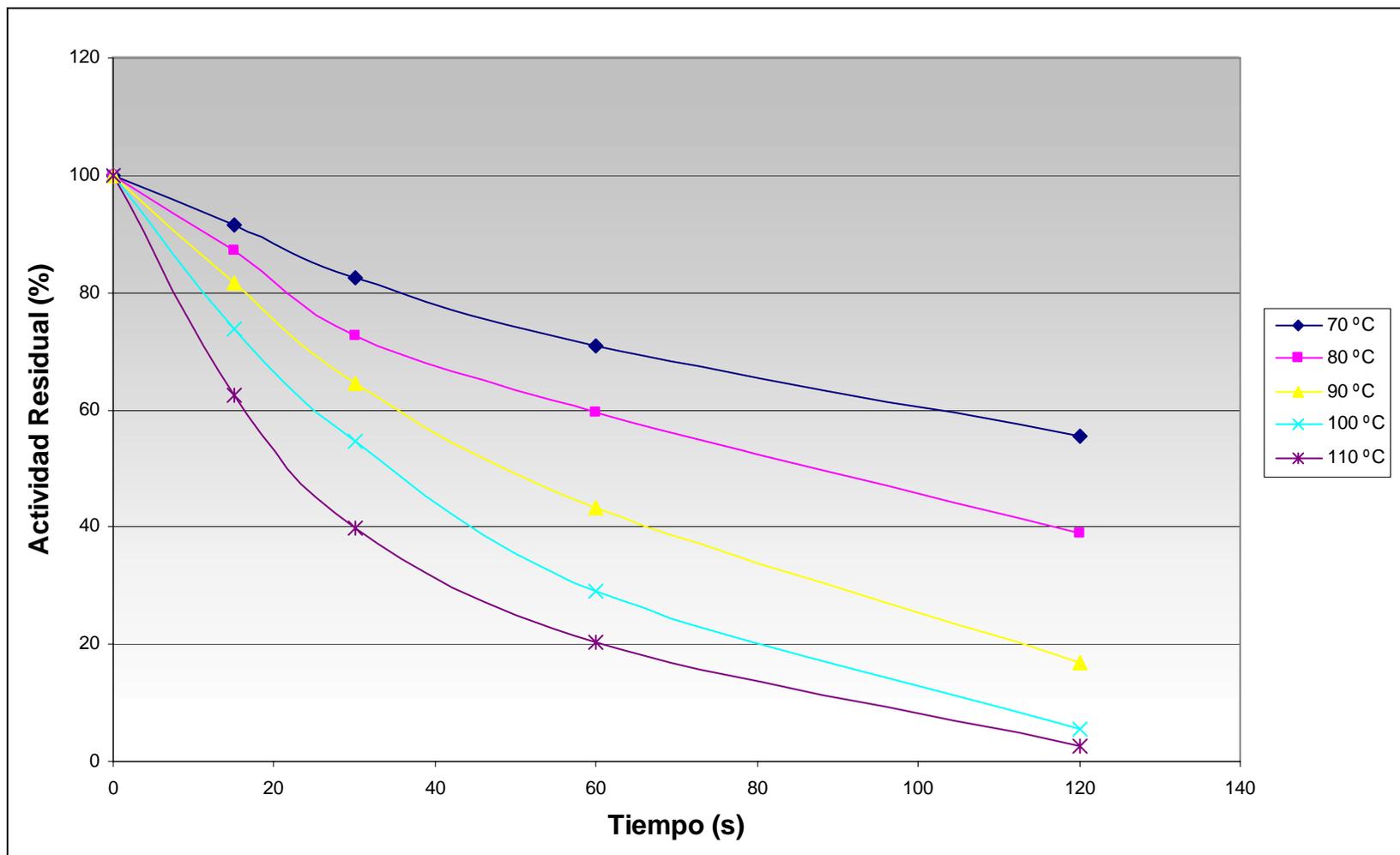


FIGURA 6. Efecto de la temperatura sobre la actividad residual (%) en función del tiempo de incubación para la presentación granulada de la enzima fitasa.

temperatura fue posible determinar que la cinética característica de esta enzima es de primer orden. Este resultado concuerda con el orden de reacción para una fitasa derivada de *Aspergillus Niger* determinado por WANG *et al.* (2004).

En las FIGURAS 7 y 8 se presentan las gráficas para ambas presentaciones enzimáticas.

4.1.2 Cálculo de los parámetros termocinéticos de la enzima fitasa en sus presentaciones líquida y granulada. Se utilizó la ecuación (2.3) para calcular los valores de las constantes de velocidad de la reacción (k) para cada temperatura, que se obtienen a partir de las pendientes de las rectas semilogarítmicas de actividad residual en función del tiempo.

A partir de los valores de k para cada temperatura, se procedió al cálculo de las constantes restantes; valores D , E_a y z para ambas presentaciones enzimáticas, de acuerdo a las ecuaciones citadas en 2.4.5. Las constantes obtenidas se presentan en el CUADRO 5.

La energía de activación (E_a) fue determinada utilizando la ecuación de Arrhenius, graficando el logaritmo natural de la constante de velocidad de la reacción (k) en función de la inversa de la temperatura absoluta, donde la pendiente corresponde a E_a/R , y R es la constante universal de los gases. En el ANEXO 5 se muestra un ejemplo del cálculo de esta constante.

Con respecto a la termoestabilidad de ambos tipos de enzima, si se comparan las constantes cinéticas es posible determinar que la enzima granulada es más resistente al calor que la enzima líquida.

A modo de ejemplo, los valores z obtenidos para la fitasa líquida y granulada (46,02 y 50,31 °C, respectivamente), indican que para la enzima granulada se requiere un mayor incremento en la temperatura para disminuir el tiempo de reducción decimal D en un ciclo logarítmico.

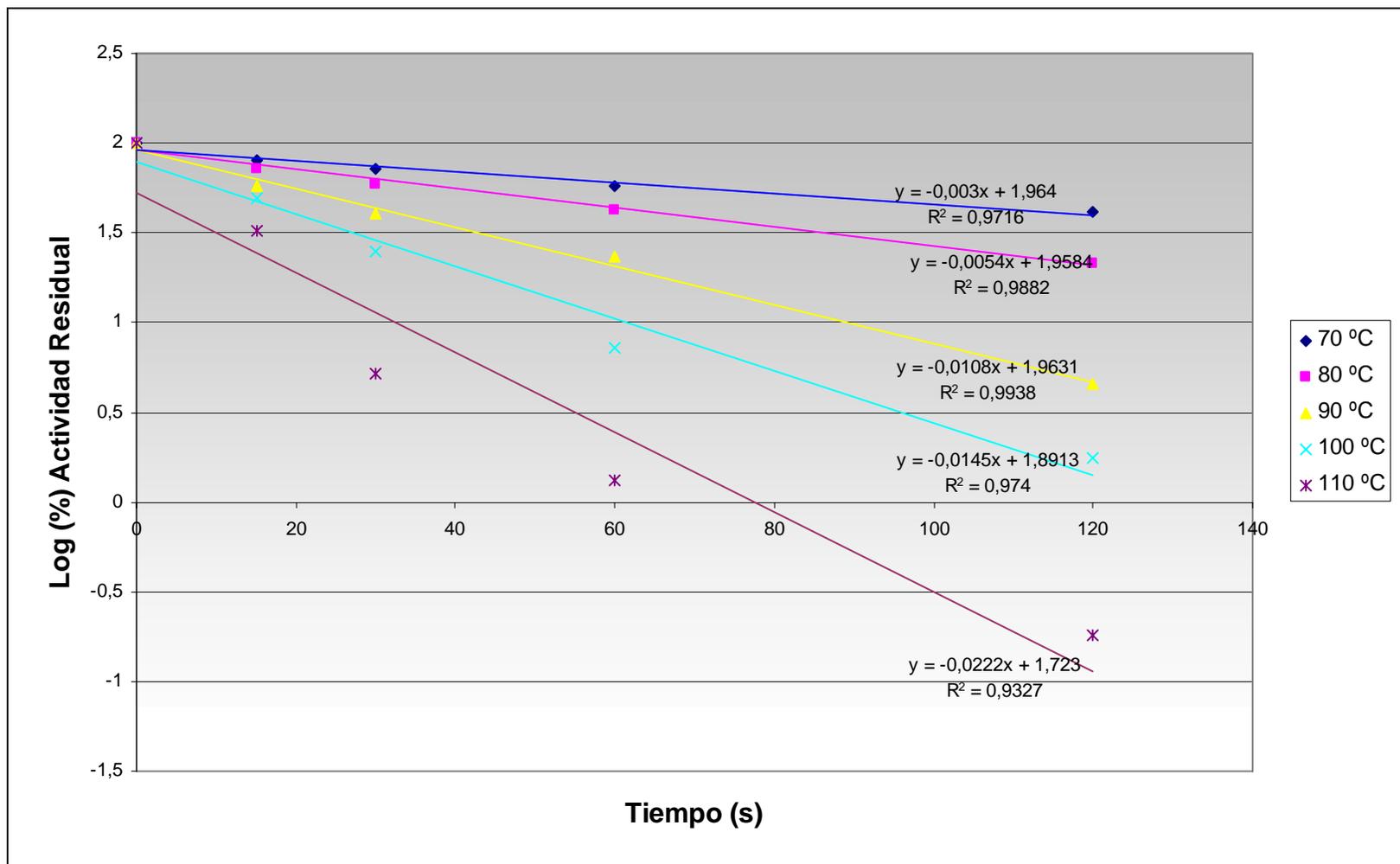


FIGURA 7. Gráfico del logaritmo de la actividad residual (%) en función del tiempo de incubación para la obtención de los valores k a distintas temperaturas para enzima líquida.

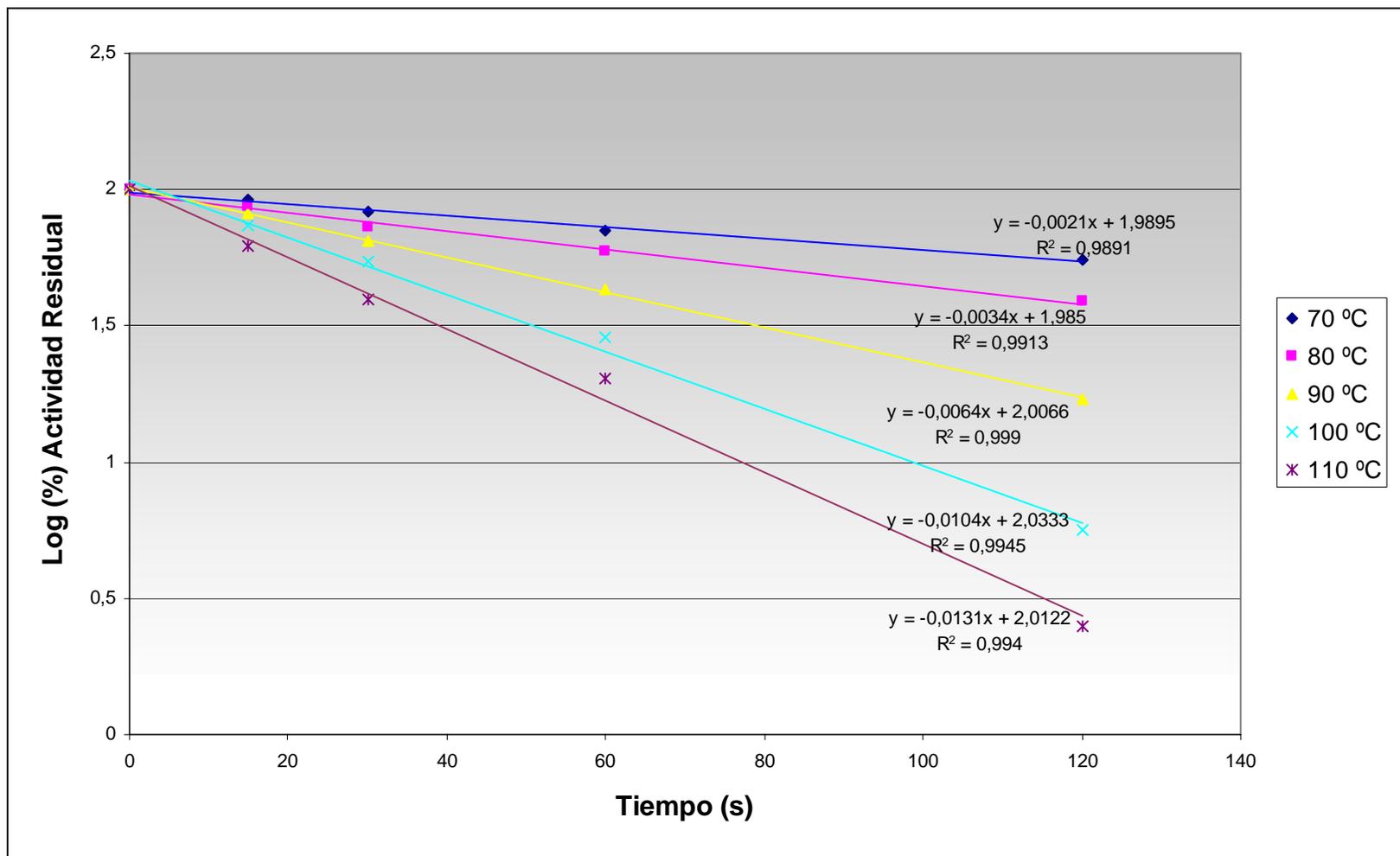


FIGURA 8. Gráfico del logaritmo de la actividad residual (%) en función del tiempo de incubación para la obtención de los valores k a distintas temperaturas para enzima granulada.

CUADRO 5. Constantes termocinéticas obtenidas para ambas presentaciones enzimáticas.

Temperatura °C	Fitasa granulada (CT)				Fitasa líquida (L)			
	k $\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	D s	E_a kJ/mol	Z K	k $\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	D s	E_a kJ/mol	Z K
70	4,8	476			6,9	333		
80	7,8	294			12,4	185		
90	14,7	156	52,36	50,31	24,9	93	54,69	46,02
100	24,0	96			33,4	69		
110	30,2	76			51,1	45		

4.1.3 Generación de un modelo matemático para ambas presentaciones enzimáticas. Para ambas presentaciones de la enzima se desarrolló una ecuación que permite el cálculo de actividad residual en términos de temperatura y tiempo, obteniendo:

Para la enzima fitasa líquida:

$$A_{RF(L)} = 100 \exp \left[-1,57 \times 10^6 \cdot t \cdot e^{\left(\frac{-6578,4}{T} \right)} \right] \quad (4.2)$$

donde: $A_{RF(L)}$ es el % de actividad residual de fitasa (L), T la temperatura en K y t el tiempo en s.

Para la enzima fitasa granulada:

$$A_{RF(CT)} = 100 \exp \left[-4,65 \times 10^5 \cdot t \cdot e^{\left(\frac{-6297,8}{T} \right)} \right] \quad (4.3)$$

donde: $A_{RF(CT)}$ es el % de actividad residual de fitasa (CT), T la temperatura en K y t el tiempo en s.

En el ANEXO 6 se presenta un ejemplo de cálculo del modelo matemático.

4.2 Determinación de actividad enzimática en muestras de alimento para salmones

Los resultados de actividad enzimática obtenidos para ambos tipos de muestras, es decir, muestras de masa y *pellet* se presentan en la FIGURA 9.

Del cálculo de la actividad residual para cada repetición se obtiene una media de 16,78 %. Este resultado contrasta con otros obtenidos para la enzima fitasa granulada (CT) sometida a proceso de pelletizado al vapor en la elaboración de alimento para aves, donde a una temperatura de 99 °C se obtuvo un porcentaje de retención de actividad enzimática del orden de 75% (WARD y WILSON, 2001). Pese a que se utilizaron temperaturas similares para la obtención del

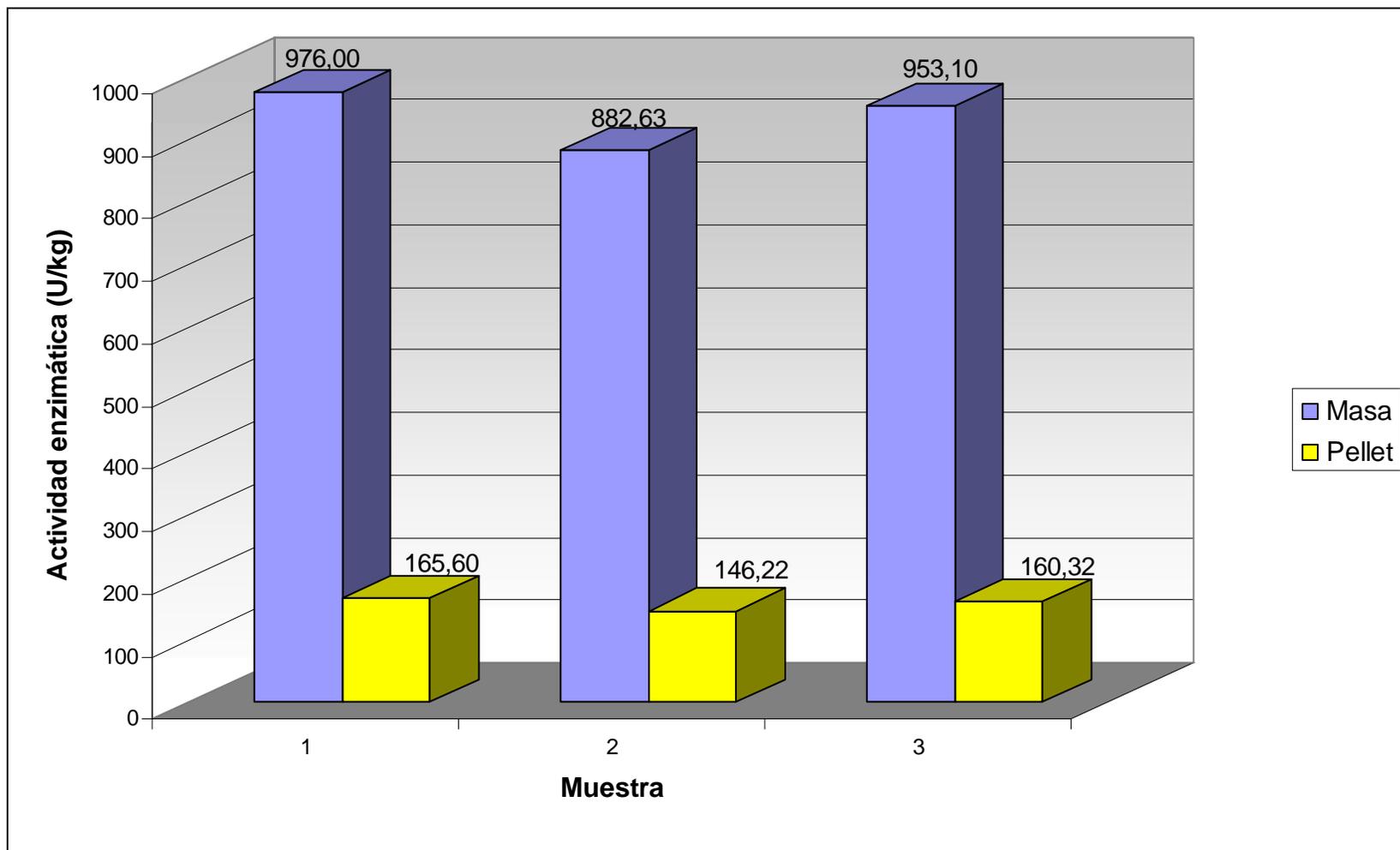


FIGURA 9. Actividad enzimática en muestras de alimento para salmón, antes y después de ser sometidas a extrusión.

alimento extruido analizado, la diferencia entre la actividad residual obtenida, puede ser atribuida a que durante este proceso se utilizan presiones más altas y el tiempo de exposición a estas temperaturas es mayor; esto debido principalmente a que los extruidos salen de la matriz con un mayor contenido de humedad, la cual debe ser removida mediante secado con aire caliente (LOVELL, 1998).

Como era de esperarse, en base a los resultados de actividad residual obtenidos, al realizar el Test de Contraste Múltiple LSD (ANEXO 7) se observa que existen diferencias estadísticamente significativas entre la actividad enzimática de ambos tipos de muestra, con un 95% de confianza.

5. CONCLUSIONES

A nivel de laboratorio fue posible implementar la técnica de determinación de actividad enzimática de fitasa en muestras *per se* y muestras de alimento para salmón.

Al comparar estadísticamente las actividades residuales obtenidas a distintos tratamientos térmicos para la enzima fitasa líquida (L) y granulada (CT), se concluyó que el recubrimiento lipídico con que cuenta la fitasa granulada aumenta la termoestabilidad de la enzima.

Conociendo la cinética característica de la enzima fue posible generar un modelo matemático, tanto para la fitasa líquida como para la fitasa granulada, que permite predecir su actividad residual a diferentes tratamientos térmicos.

En alimento para salmón que contenía la enzima fitasa granulada, el tratamiento de extrusión redujo la actividad enzimática en un 83%, por consiguiente, se deberían aplicar dosis altas de esta enzima si se utiliza en la elaboración de alimento extruido para peces.

La metodología utilizada, tanto para la obtención de la cinética de inactivación térmica de la enzima fitasa líquida y granulada, como para la determinación de actividad residual en alimento extruido, puede ser aplicada para caracterizar termocinéticamente a otras fitasas en desarrollo, con la finalidad de determinar la factibilidad de su aplicación en la elaboración de alimento para salmones.

6. RESUMEN

Las muestras de enzima fitasa en sus presentaciones líquida (L) y granulada (CT) fueron sometidas a tratamientos térmicos de 70, 80, 90, 100 y 110 °C por intervalos de tiempo que fluctuaron entre los 0 y 120 segundos. Posteriormente, se determinó la actividad enzimática de las muestras mediante la medición de la cantidad de fósforo inorgánico liberado, a partir de fitato, luego de la incubación de las muestras por 30 minutos a 37 °C.

Conociendo que la cinética de desactivación térmica es de primer orden y, mediante el cálculo de las constantes termocinéticas para ambas presentaciones comerciales, se generó un modelo matemático con la finalidad de estimar el efecto que produciría sobre la enzima distintos tratamientos térmicos, obteniendo las siguientes ecuaciones para cada formato:

$$A_{RF(L)} = 100 \exp \left[-1,57 \times 10^6 \cdot t \cdot e^{\left(\frac{-6578,4}{T} \right)} \right]$$
$$A_{RF(CT)} = 100 \exp \left[-4,65 \times 10^5 \cdot t \cdot e^{\left(\frac{-6297,8}{T} \right)} \right]$$

donde: $A_{RF(L)}$ es el % de actividad residual de fitasa (L), $A_{RF(CT)}$ es el % de actividad residual de fitasa (CT), t el tiempo en s y T la temperatura en K.

Muestras de alimento para salmón, con y sin extruir, proporcionadas por la industria que contenían como aditivo la enzima en su presentación granulada, fueron analizadas con la finalidad de conocer la actividad enzimática residual luego de ser sometidas a un proceso característico de elaboración. La actividad enzimática residual en el extruido con respecto a la actividad original de la muestra sin extruir fue de sólo 16%, lo que indica que la enzima sufre una gran destrucción bajo tales condiciones.

SUMMARY

Liquid (L) and granulated (CT) samples of phytase enzyme were heated at 70, 80, 90, 100 y 110 °C in time intervals between 0 and 120 seconds. The residual enzymatic activity was determined incubating the samples in presence of phytate at 37 °C for 30 minutes and then calculating the amount of inorganic phosphorus released.

Since kinetic inactivation is first order reaction, calculating the inactivation constants for both samples made it possible to develop a mathematic model to obtain the residual activity of the enzyme for different thermal treatments. The models for each of the enzyme were:

$$A_{RF(L)} = 100 \exp \left[-1,57 \times 10^6 \cdot t \cdot e^{\left(\frac{-6578,4}{T} \right)} \right]$$

$$A_{RF(CT)} = 100 \exp \left[-4,65 \times 10^5 \cdot t \cdot e^{\left(\frac{-6297,8}{T} \right)} \right]$$

where: $A_{RF(L)}$ is phytase (L) residual activity %, $A_{RF(CT)}$ is phytase (CT) residual activity %, t is heating time in s and T is temperature in K.

Salmon feed samples, pellet and mash, formulated with granulated phytase, and provided by industry were analysed in order to find out their enzymatic activity after processing under characteristic conditions. The residual enzymatic activity in pellet with respect to original activity in mash was only 16%, showing that phytase suffers a tremendous destruction under extrusion conditions.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ADRIAN, J. y FRANGNE, R. 1990. La Ciencia de los Alimentos de la A a la Z. Ed. Acribia S. A. Zaragoza, España. 317 p.
- BADUI, S. 1999. Química de los Alimentos. Ed Longman de México. México. 348 p.
- BARDACH, J. 1997. Sustainable Aquaculture. Ed John Wiley and Sons, Inc. New York, U.S.A. 251 p.
- BELITZ, H. y GROSCH, W. 1997. Química de los Alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza, España. 1087 p.
- CASP, A. y ABRIL, J. 1999. Procesos de Conservación de Alimentos. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 494 p.
- CHANDIA, V. 2000. Modelo Bifásico para la Determinación de los Parámetros Termocinéticos de la Desactivación de las Enzimas Peroxidasa y Lipoxigenasa en Zanahorias (*Daucus carota*), Brócoli (*Brassica oleracea* variedad italiana) y Espárragos (*Asparagus officinalis* L.) verdes sometidos a diversos tratamientos de escaldado. Tesis Lic. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 101 p.
- FENNEMA, O. 1993. Química de los Alimentos. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España. 1095 p.
- FRANCIS, G., MAKKAR, H. y BECKER, K. 2001. Antinutritional Factors Present in Plant-Derived Alternate Fish Feed Ingredients and their Effects in Fish. *Aquaculture*. 199:197–227.

- HEEN, K., MONAHAN, R. y UTTER, F. 1993. Salmon Aquaculture. Ed. Halsted Press. Nueva York. 278 p.
- HICKS, J. 2000. Bioquímica. Ed. McGraw-Hill Interamericana, S.A. México. 900 p.
- KONIETZNY, U. y GREINER, R. 2002. Molecular and Catalytic Properties of Phytate-Degrading Enzymes (Phytases). International Journal of Food Science and Technology. 37: 791–812.
- LOVELL, T. 1998. Nutrition and Feeding of Fish. Kluwer Academic Publishers. Estados Unidos. 267 p.
- MULLANEY, E. y ULLAH, A. 2003. The term phytase comprises several different classes of enzymes. Biochemical and Biophysical Research Communications. 312: 179–184.
- OATWAY, L., VASANTHAN, T. y HELM, J. 2001. Phytic Acid. Food Reviews International. 17(4):419–431.
- PARKER, R. 2002. Aquaculture Science. Ed. Delmar. Estados Unidos. 621 p.
- STEAD, S. y LAIRD, L. 2002. Handbook of Salmon Farming. Ed. Praxis Publishing Ltd. Chichester, UK. 502 p.
- ULLAH, A y SETHUMADHAVAN, K. 2003. PhyA Gene Product of *Aspergillus ficuum* and *Peniophora lycii* Produces Dissimilar Phytases. Biochemical and Biophysical Research Communications. 303: 463–468.
- VOGEL, K. y WAHL, G. 2002. Determination of Phytase Activity in Tel Quel (per se) and Feed Samples. Method PHY-101/04E. Roche Vitamins Ltd, Basel, Suiza.

- VOHRA, A. y SATYANARAYANA, T. 2003. Phytases: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 23: 29–60.
- WANG, X. MENG, F. ZHOU, H. 2004. Unfolding and inactivation during thermal denaturation of and enzyme that exhibits phytase and acid phosphatase activities. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 36:447–459
- WARD, N. y WILSON, J. 2001. Pelleting Stability of Ronozyme P (CT) Phytase in Commercial Feedmills. 54th Annu. Rec. Meat Conf., Vol. II., Poultry Science. 80 (Suppl. 1). Disponible en: <http://www.adsa.org/jointabs/iaafs154.pdf> . Acceso: Marzo 2005
- WYSS, M., BRUGGER, R., KRONENBERGER, A., RÉMY, R., FIMBEL, R., OESTERHELT, G., LEHMANN, M. y VAN LOON, A. 1999. Biochemical Characterization of Fungal Phytases (myo-Inositol Hexakisphosphate Phosphohydrolases): Catalytic Properties. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 367-373.

ANEXOS

ANEXO 1

Determinación de actividad de Fitasa en *Tel Quel (per se)* y Muestras de Alimento

VOGEL, K. y WAHL, G. 2002. Determination of Phytase Activity in *Tel Quel (per se)* and Feed Samples. Method PHY-101/04E. Roche Vitamins Ltd, Basel, Suiza.

1. Campo de aplicación

Este método es usado para determinar la actividad de fitasa en *tel quel (per se)* y en muestras de alimentos. El rango de determinación para muestras de alimentos es ≥ 50 unidades por kg.

2. Principio

La enzima fitasa libera fosfato del sustrato myo-inositol-hexafosfato (fitato). El fosfato inorgánico liberado se determina por la formación de un complejo amarillo con un reactivo ácido molibdato/vanadato. El complejo amarillo es medido a una longitud de onda de 415 nm y el fosfato inorgánico liberado es cuantificado con una curva estándar de fosfato.

Condiciones de la reacción

Concentración de fitato : 5.0 mM

pH : 5.5

Temperatura : 37 °C

Tiempo de incubación : 30 min

Definición de unidad

Una unidad de fitasa (U) es la cantidad de enzima que libera 1 μmol de fosfato inorgánico a partir de fitato por minuto bajo las condiciones de reacción señaladas.

(Continuación ANEXO 1)

3. Especificidad

El fosfato inorgánico en la muestra contribuirá a la formación de color, por tanto, se incluye un blanco por cada muestra. Para calcular la actividad de fitasa, se resta el valor del blanco al valor de la muestra.

4. Aparatos y materiales

- Baño de agua termorregulado
- Baño ultrasónico
- Espectrofotómetro
- pH – metro con precisión de dos decimales
- Agitadores magnéticos
- Balanza, sensibilidad 0,01 g
- Balanza analítica, sensibilidad 0,01 mg
- Mezclador Vortex
- Centrífuga para tubos de 2 mL, 14000 rpm
- Pipetas electrónicas 10-500 μ l y 50-1200 μ l
- Cubetas para el espectrofotómetro
- Tubos de 2 mL
- Material volumétrico

5. Químicos

- Solución de Amoniac 25%
- Heptamolibdato de Amonio tetrahidrato
- Vanadato de Amonio
- Ácido Clorhídrico 25%
- Ácido Nítrico 65%
- Fosfato de Potasio dihidrogeno

(Continuación ANEXO 1)

- Fitato de Sodio, de arroz
- Acetato de Sodio trihidrato
- Tween 20
- BSA (seroalbúmina de bovino)

6. Reactivos

Ácido Nítrico diluido (Solución 1)

Diluir 1 volumen de ácido nítrico 65% con 2 volúmenes de agua. Almacenar a temperatura ambiente.

Tiempo máximo de almacenamiento: indefinido

Solución Heptamolibdato de Amonio (Solución 2)

Disolver 100.0 g en aproximadamente 800 mL de agua destilada. Adicionar 10 mL de solución de amoniaco 25% y aforar a 1000 mL con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente y en oscuridad.

Tiempo máximo de almacenamiento: 2 meses

Solución de Vanadato de Amonio (Solución 3)

Disolver completamente 2.35 g en 400 mL de agua destilada (50-60 °C). Adicionar 20 mL de Ácido Nítrico diluido (Solución 1) y aforar a 1000 mL. Almacenar a temperatura ambiente y en oscuridad.

Tiempo máximo de almacenamiento: 2 meses

Solución Stop (Solución 4)

Mezclar 1 volumen de Solución 3 con 1 volumen de Solución 2 y adicionar 2 volúmenes de Ácido Nítrico diluido (Solución 1). Mezclar y almacenar a

(Continuación ANEXO 1)

temperatura ambiente.

Tiempo máximo de almacenamiento: 1 día

Reactivo Tween 20 al 10% (Solución 5)

Disolver 10,0 g de Tween 20 con agua destilada y aforar a 100 mL. Mezclar y almacenar a temperatura ambiente.

Tiempo máximo de almacenamiento: 6 meses

Buffer Acetato 0,25 M, pH 5,5 (Solución 6)

Disolver 34,02 g de Acetato de Sodio trihidrato en aproximadamente 900 mL de agua destilada. Ajustar el pH con HCl 25% a $5,50 \pm 0,02$ y aforar a 1000 mL con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

Tiempo máximo de almacenamiento: 2 semanas

Buffer Acetato 0,25 M, pH 5,5 con 0,01% de Tween 20 (Solución 7)

Disolver 34,02 g de Acetato de Sodio trihidrato en aproximadamente 900 mL de agua destilada. Ajustar el pH con HCl 25% a $5,50 \pm 0,02$. Agregar 1 mL de Tween 20 al 10% (solución 5) y aforar a 1000 mL con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

Tiempo máximo de almacenamiento: 2 semanas

Buffer Acetato 0,25 M, pH 5,5 con 0,06% de BSA y 0,5% de Tween 20 (Solución 8)

Disolver 34,02 g de Acetato de Sodio trihidrato en aproximadamente 900 mL de agua destilada. Ajustar el pH con HCl 25 % a $5,50 \pm 0,02$. Adicionar 5 g (4,5 mL de Tween 20 y 0,6 g de BSA. Aforar a 1000 mL con agua destilada. Almacenar

(Continuación ANEXO 1)

a temperatura ambiente.

Tiempo máximo de almacenamiento: 2 semanas

Buffer Acetato 0,50 M, pH 5,5 con 0,01% de Tween 20 (Solución 9)

Disolver 68,04 g de Acetato de Sodio trihidrato en aproximadamente 900 mL de agua destilada. Ajustar el pH con HCl 25 % a $5,50 \pm 0,02$. Adicionar 1 mL de Tween 20 al 10% (solución 5) y aforar a 1000 mL con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

Tiempo máximo de almacenamiento: 2 semanas

Solución de Fitato 7,5 mM (Solución 10)

Disolver 2,00 g de Fitato de Sodio en aproximadamente 200 mL de Buffer Acetato (Solución 6). Ajustar el pH con HCl 25% a $5,50 \pm 0,02$ y aforar con Solución 6 a 250 mL. Almacenar a 37 °C (en baño de agua).

Tiempo máximo de almacenamiento: 2 semanas a 4 °C.

Solución Estándar de Fosfato 50 mM (Solución 11)

Deshidratar 10 g de KH_2PO_4 en un horno a vacío a 105 °C por 2 horas y almacenar en un desecador. Pesar aproximadamente 682 mg de fosfato de potasio deshidratado, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL y aforar con Buffer Acetato con Tween 20 (Solución 7). Calcular la concentración exacta de la solución estándar de fosfato. Almacenar a temperatura ambiente.

Tiempo máximo de almacenamiento: 2 semanas.

Solución Estándar de Fitasa (Solución 12)

Pesar 100 a 300 g de fitasa estándar correspondientes a 200-500 U, transferir a un matraz de 100 mL y disolver en 100 mL de solución 7. Agitar por 15 a 45

(Continuación ANEXO 1)

minutos. Almacenar a temperatura ambiente.

Tiempo máximo de almacenamiento 1 día

7. EstándaresCurva estándar de Fosfato

Dilución de la solución estándar de fosfato (Solución 11).

Las diluciones para la curva estándar son realizadas en pasos de dilución 1:2 con Solución 7, partiendo de la Solución 11.

Estándar	Dilución final	μmol/ mL*
A	1:2	25
B	1:4	12,5
C	1:8	6,25
D	1:16	3,125

* Las concentraciones exactas deben ser calculadas

La pendiente obtenida debe ser remplazada posteriormente en la fórmula para calcular la actividad enzimática.

Control de Fitasa

Para cada incubación de muestras se incluye un control de fitasa. Una solución estándar de fitasa (Solución 12) con actividad conocida se diluye a una actividad final de 0,3-0,4 U/mL y se determina la actividad exacta.

8. Preparación de muestras tel quel (per se)Muestras Líquidas

0,2000 g de muestra son transferidos a un matraz de 100 mL, diluidos en Solución 7 y aforados. La muestra es agitada por 15 minutos y luego diluida con

(Continuación ANEXO 1)

Solución 7 a una concentración final de 0,1-0,5 U/mL.

Muestras Sólidas

0,2000 a 1,000 g de muestra son transferidos a un matraz de 100 mL. Se agregan 100 mL de Solución 7. La muestra es agitada por 45 minutos. 2 mL de muestra son transferidos a un tubo y centrifugados por 3 minutos a 14000 rpm y luego diluidos con Solución 7 a una concentración final de 0,1 – 0,5 U/mL.

Preparación de Ronozyme P (CT)

1,000 g de muestra es transferido a un matraz de 100 mL. Se adicionan 100 mL de Solución 8. La muestra es tratada bajo agitación por 20 minutos en un baño ultrasónico seguido por una agitación de 20 minutos más. 2 mL de la muestra son transferidos a un tubo y centrifugados por 3 minutos a 14000 rpm y luego diluidos con Solución 7 a una concentración final de 0,1 – 0,5 U/mL.

Ejemplo de Dilución

Actividad esperada 7500U/g. Actividad final deseada 0,25 U/mL. 0,2000 g disueltos en 100 mL.

$$\text{Factor de dilución} = \frac{0,2000 \text{ g} \times 7500 \text{ U} \times \text{ml}}{\text{g} \times 100 \text{ ml} \times 0,25 \text{ U}} = 60$$

La muestra debería ser diluida 1:60, pero puede ser medida fácilmente con una dilución entre 1:50 y 1:100.

9. Preparación de muestras de alimento

Dos porciones de pellets o masa, de aproximadamente 50 g cada una, son pesadas en un matraz de 500 mL. Se agregan 500 mL de agua destilada y 0,5 mL de solución 5 a la mezcla y se agita por 45 minutos. 2 mL de la mezcla son

(Continuación ANEXO 1)

transferidos a un tubo y centrifugados por 3 minutos a 14000 rpm.

10. Procedimiento

Estándares y muestras Tel Quel

Se realizan tres determinaciones y dos blancos por cada muestra. El procedimiento se describe en la tabla.

Descripción del ensayo

360 µl de Solución 7 son pipeteados en un tubo de 2 mL. Se agregan 40 µl de muestra diluida. Mezclar. La muestra es pre-incubada por 5 minutos a 37 °C. Se adicionan 0,8 mL de sustrato (Solución 10) a 37 °C. El tiempo de incubación es exactamente 30 minutos a 37 °C. Después de 30 minutos se agregan 0,8 mL de Solución STOP (Solución 4) y se mezcla. La muestra es mantenida por 10 minutos a temperatura ambiente y luego centrifugada por 3 minutos a 14000 rpm. La absorbancia del sobrenadante es medida a 415 nm.

Los blancos no son incubados a 37 °C y la Solución STOP (Solución 4) se agrega antes de la solución de fitato (Solución 10).

Pasos del Ensayo	Estándar y Muestras Tel Quel	Blanco (Blanco de Fosfato Estándar)
Buffer acetato (Solución 7)	360 µl	360 µl (400 µl)
Muestra	40 µl	40 µl (0µl)
Mezclar	Si	Si
Pre-incubación a 37 °C	5 min	No
Fitato (Solución 10)	0,8 mL	0,8 mL Paso 2
Mezclar	No	No
Incubación a 37 °C	30 min	No
Reactivo Stop (Solución 4)	0,8 mL	0,8 mL Paso 1
Mezclar	Si	Si
Temperatura ambiente	10 min	10 min
Centrifugación	3 min 14.000 rpm	3 min 14.000 rpm

(Continuación ANEXO 1)

400 μ l de Solución 7 son tomadas para el blanco de la curva estándar de fosfato.

Nota: Para la medición de una serie de muestras a 415 nm la cubeta no se cambia. La muestra es medida, luego aspirada y luego se llena la cubeta con la próxima muestra.

Muestras de alimento

Se realizan tres determinaciones y dos blancos por cada muestra. Se toman 100 μ l de cada muestra para el ensayo.

Pasos del Ensayo	Muestras de alimento	Blanco
Buffer acetato (Solución 7)	300 μ l	300 μ l
Muestra	100 μ l	100 μ l
Mezclar	Si	Si
Pre-incubación a 37 °C	5 min	No
Fitato (Solución 10)	0,8 mL	0,8 mL Paso 2
Mezclar	No	No
Incubación a 37 °C	30 min	No
Reactivo Stop (Solución 4)	0,8 mL	0,8 mL Paso 1
Mezclar	Si	Si
Temperatura ambiente	10 min	10 min
Centrifugación	3 min 14.000 rpm	3 min 14.000 rpm

Los blancos son hechos como se describe en la tabla. La Solución 4 se agrega antes que la Solución 10. No se requiere incubación a 37 °C.

Nota: El volumen de muestra de 400 μ l es variable dependiendo de la actividad de fitasa en el alimento. Sin embargo, la concentración de buffer debe ser ajustada, si el volumen de muestra es \geq 200 μ l, la extracción de muestra es hecha con agua destilada.

Ejemplo: 200 μ l de muestra + 200 μ l de buffer acetato 0,5 M pH 5,50 (Solución 9 en vez de Solución 7). La concentración final del buffer es 0,25 M.

(Continuación ANEXO 1)

Muestras inferiores a 200 μl no deben ser corregidas. 100 μl de muestra + 300 μl de Solución 7.

11. Cálculos

Se construye una curva estándar con el ΔDO 415:

$$(\text{DO } 415_{\text{Estándar}} - \text{DO } 415_{\text{Blanco}})$$

obtenido con los estándar de fosfato en el eje X y la concentración calculada de fosfato en el eje Y. Se aplica regresión lineal.

La actividad de fitasa se calcula con la fórmula:

$$\text{Actividad} = \frac{\Delta\text{DO} \times m \times D}{W \times t}$$

Donde:

$$\Delta\text{DO} = \text{DO } 415_{\text{Muestra}} - \text{DO } 415_{\text{Blanco}}$$

m = pendiente de la curva estándar [$\mu\text{mol DO}_{415}^{-1}$]

D = factor de dilución (volumen de extracción • dilución del extracto) [mL]

W = peso de la muestra [g]

ANEXO 2

Actividad residual obtenida para la enzima fitasa líquida (L) luego de los diferentes tratamientos térmicos

TIEMPO (s)	TEMPERATURA DE EXPOSICIÓN (°C)									
	70		80		90		100		110	
	% Act. Residual	Log (Act. Res.)	% Act. Residual	Log (Act. Res.)	% Act. Residual	Log (Act. Res.)	% Act. Residual	Log (Act. Res.)	% Act. Residual	Log (Act. Res.)
0	100,0 ± 0,0	2,00	100,0 ± 0,0	2,00	100,0 ± 0,0	2,00	100,0 ± 0,0	2,00	100,0 ± 0,0	2,00
15	80,0 ± 0,2	1,90	72,2 ± 2,3	1,86	57,4 ± 2,2	1,76	49,0 ± 1,2	1,69	32,9 ± 1,6	1,52
30	71,6 ± 1,2	1,86	59,6 ± 1,6	1,77	40,6 ± 1,6	1,61	25,2 ± 2,3	1,40	5,2 ± 1,3	0,72
60	58,1 ± 2,2	1,76	42,0 ± 3,1	1,62	23,1 ± 2,3	1,36	7,2 ± 1,8	0,86	1,3 ± 1,0	0,12
120	41,3 ± 1,2	1,62	21,5 ± 2,4	1,33	4,6 ± 2,0	0,66	1,8 ± 1,1	0,25	0,2 ± 0,2	-0,74

Los valores de actividad residual presentados corresponden al promedio de las tres repeticiones con su respectiva desviación estándar.

ANEXO 3

Actividad residual obtenida para la enzima fitasa granulada (CT) luego de los diferentes tratamientos térmicos

TIEMPO (s)	TEMPERATURA DE EXPOSICIÓN (°C)									
	70		80		90		100		110	
	% Act. Residual	Log (Act. Res.)	% Act. Residual	Log (Act. Res.)	% Act. Residual	Log (Act. Res.)	% Act. Residual	Log (Act. Res.)	% Act. Residual	Log (Act. Res.)
0	100,0 ± 0,0	2,00	100,0 ± 0,0	2,00	100,0 ± 0,0	2,00	100,0 ± 0,0	2,00	100,0 ± 0,0	2,00
15	91,5 ± 1,6	1,96	87,3 ± 0,9	1,94	81,6 ± 1,1	1,91	73,9 ± 0,5	1,87	62,4 ± 2,0	1,80
30	82,5 ± 1,3	1,91	72,8 ± 2,2	1,86	64,6 ± 1,5	1,81	54,5 ± 3,1	1,74	39,8 ± 1,7	1,60
60	70,9 ± 1,2	1,85	59,6 ± 1,4	1,78	43,3 ± 1,7	1,64	28,9 ± 1,4	1,46	20,4 ± 1,6	1,31
120	55,5 ± 0,6	1,74	38,9 ± 1,5	1,59	16,9 ± 1,2	1,23	5,6 ± 2,1	0,73	2,5 ± 1,2	0,40

Los valores de actividad residual presentados corresponden al promedio de las tres repeticiones con su respectiva desviación estándar.

ANEXO 4

**Análisis estadístico del diseño multifactorial para actividad residual en
enzimas *per se***

Análisis de Varianza para Actividad residual - Sumas de Cuadrados de Tipo III					
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tiempo	117425,0	4	29356,3	2710,65	0,0000
B:Temperatura	29020,2	4	7255,04	669,90	0,0000
C:Tipo de enzima	7726,36	1	7726,36	713,42	0,0000
INTERACCIONES					
AB	9062,51	16	566,407	52,30	0,0000
AC	2622,41	4	655,601	60,54	0,0000
BC	272,88	4	68,2201	6,30	0,0001
RESIDUOS	1256,28	116	10,83		
TOTAL (CORREGIDO)					
	167386,0	149			
Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.					

(Continuación ANEXO 4)

Contraste Múltiple de Rangos para Actividad residual según tiempo				

Método: 95,0 porcentaje LSD				
Tiempo	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos

120	30	18,8651	0,600832	X
60	30	35,4788	0,600832	X
30	30	51,6345	0,600832	X
15	30	68,8219	0,600832	X
0	30	100,0	0,600832	X

Contraste		Diferencias	+/- Límites	

0 - 120		*81,1349	1,68295	
0 - 15		*31,1781	1,68295	
0 - 30		*48,3655	1,68295	
0 - 60		*64,5212	1,68295	
120 - 15		*-49,9569	1,68295	
120 - 30		*-32,7694	1,68295	
120 - 60		*-16,6137	1,68295	
15 - 30		*17,1875	1,68295	
15 - 60		*33,3432	1,68295	
30 - 60		*16,1557	1,68295	

* indica una diferencia significativa.				

(Continuación ANEXO 4)

Contraste Múltiple de Rangos para Actividad residual según temperatura				

Método: 95,0 porcentaje LSD				
temperatura	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos

110	30	36,4675	0,600832	X
100	30	44,6198	0,600832	X
90	30	53,2074	0,600832	X
80	30	65,3726	0,600832	X
70	30	75,133	0,600832	X

Contraste		Diferencias	+/-	Límites

100 - 110		*8,15229		1,68295
100 - 70		*-30,5132		1,68295
100 - 80		*-20,7529		1,68295
100 - 90		*-8,58759		1,68295
110 - 70		*-38,6655		1,68295
110 - 80		*-28,9052		1,68295
110 - 90		*-16,7399		1,68295
70 - 80		*9,76038		1,68295
70 - 90		*21,9257		1,68295
80 - 90		*12,1653		1,68295

* indica una diferencia significativa.				

(Continuación ANEXO 4)**Contraste Múltiple de Rangos para Actividad residual según tipo de enzima**

Método: 95,0 porcentaje LSD

tipo de enzima	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Líquida	75	47,7831	0,38	X
CT	75	62,137	0,38	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
CT - Líquida	*14,354	1,06439

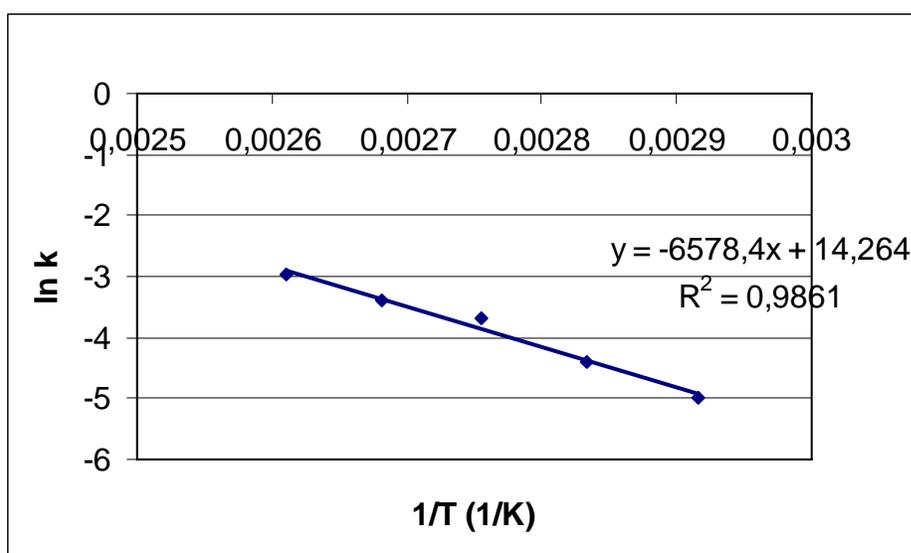
* indica una diferencia significativa.

ANEXO 5

Ejemplo de cálculo de la energía de activación (Ea) para la enzima fitasa líquida

Una vez calculados los valores de las constantes de velocidad de reacción (k) se realizó una gráfica del logaritmo natural de k versus 1/T.

A continuación se presenta la gráfica realizada para la enzima líquida.



Con la pendiente obtenida, que corresponde a E_a/R (según la ecuación de Arrhenius) se obtuvo el valor de la energía de activación multiplicando dicha pendiente por el valor de R (8,314 J/mol K).

$$\text{Pendiente} = 6578,4 = \frac{E_a}{R}$$

$$E_a = 6578,4 \cdot 8,314$$

$$E_a = 54693 \text{ J/mol}$$

ANEXO 6

Ejemplo de cálculo del modelo matemático de actividad residual para la enzima fitasa líquida

Del antilogaritmo del intercepto de la recta de $\ln k$ versus $1/T$ (ANEXO 5) se obtiene $k_0 = 1,57 \times 10^6 \text{ (s}^{-1}\text{)}$. La pendiente de la recta corresponde a:

$$\frac{E_a}{R} = 6578,4$$

De la ecuación (2.2) se obtiene:

$$\frac{A}{A_0} = e^{-kt}$$

Reemplazando k_0 y E_a/R en la ecuación (2.4):

$$k = k_0 e^{-E_a/RT} \rightarrow k = 1,57 \times 10^6 e^{-6578,4/T}$$

Luego se reemplaza este valor de k :

$$\frac{A}{A_0} = e^{\left[-1,57 \times 10^6 \cdot t \cdot e^{\left(\frac{-6578,4}{T} \right)} \right]}$$

Finalmente, reordenando la fórmula se obtiene:

$$\text{Actividad residual \%} = 100 \cdot e^{\left[-1,57 \times 10^6 \cdot t \cdot e^{\left(\frac{-6578,4}{T} \right)} \right]}$$

ANEXO 7

Análisis estadístico para muestras de alimento

Resumen Estadístico para Actividad enzimática				
Tipo de muestra	Frecuencia	Media	Varianza	Desviación típica
Masa	3	937,242	2368,13	48,6634
Pellet	3	157,382	100,353	10,0176
Total	6	547,312	183442,0	428,301
Tipo de muestra	Mínimo	Máximo	Rango	Asimetría tipi.
Masa	882,628	976,0	93,3719	-0,926697
Pellet	146,224	165,603	19,3791	-0,85253
Total	146,224	976,0	829,776	0,0198711
Contraste Múltiple de Rango para Actividad enzimática según tipo de muestra				
Método: 95,0 porcentaje LSD				
Tipo de muestra	Frec.	Media	Grupos homogéneos	
Pellet	3	157,382	X	
Masa	3	937,242	X	
Contraste	Diferencias		+/- Límites	
1 - 2	*779,861		79,6424	
* indica una diferencia significativa				