



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante  
**Marcia Costa Lobo**  
Instituto de Ciencia y  
Tecnología de los alimentos  
Facultad de Ciencias Agrarias

**OBTENCIÓN DE ENZIMA FITASA A PARTIR DE  
UNA CEPA DEL HONGO *Aspergillus ficuum*, POR MEDIO DE  
FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO Y SUMERGIDO**

Tesis de Grado presentada como parte de  
los requisitos para optar al grado de  
*Licenciado en Bioquímica* y Título  
Profesional de *Bioquímico*

**GERHARD NOLARD LERCHUNDI MONJE**

**VALDIVIA – CHILE**

**2006**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a Dios, A la Profesora Marcia Costa, por permitirme ser su tesista; por su gran apoyo y por entregarme las herramientas necesarias para en el proceso de mi tesis.

Quiero hacer partícipes en mis agradecimientos a los profesores informantes: Prof. Maria Adela Martinez y al Dr. Juan Guillermo Cárcamo; por sus aportes en la corrección de ésta tesis.

Igualmente, quiero agradecer a todos las personas del ICYTAL que aportaron con su colaboración y ayuda en el desarrollo de esta tesis.

Final y especialmente, quiero dar las gracias a mi familia por su constante preocupación, comprensión, estímulo.

El financiamiento para el desarrollo de esta tesis fue obtenido del Proyecto DID UACH. N° S-200308

**INDICE GENERAL**

<b>Capítulo</b>		<b>Página</b>
1	RESUMEN	1
1.1	SUMMARY	2
2	INTRODUCCIÓN	3
2.1	Fósforo y su papel en dietas de origen vegetal	3
2.2	Ácido Fítico (AF)	8
2.2.1	Características químicas del AF	8
2.2.2	Interacciones del AF con cationes y proteínas	11
2.2.2.1	Interacción del AF con los cationes	11
2.2.2.2	Interacción del AF con las proteínas	14
2.2.3	Hidrólisis del AF	16
2.2.4	Efecto nutricional y fisiológico del AF	18
2.2.4.1	Efectos del AF en la biodisponibilidad mineral	19
2.2.4.2	Efectos del AF en proteínas	26
2.2.4.3	Efectos del AF en la digestión del almidón	29
2.2.5	Efectos farmacológicos del AF en el organismo	30
2.3	Fitasas	34
2.3.1	Fitasas de origen vegetal	41

2.3.2	Fitasas microbianas	44
2.3.2.1	Fitasas bacterianas	44
2.3.2.2	Fitasas fúngicas	45
2.3.3	Estructura de la fitasa de <i>Aspergillus ficuum</i>	49
2.3.4	Factores que influyen en la eficacia de las fitasas	52
2.3.5	Efecto de las fitasas sobre la disponibilidad de los nutrientes	58
2.3.6	Obtención y métodos de análisis de enzimas fitasas	62
2.3.6.1	Cultivo de <i>Aspergillus</i> productores de fitasas	62
2.3.6.2	Semipurificación y purificación de enzima fitasa	63
2.3.7	Fitasas comerciales	67
2.4	Género <i>Aspergillus</i>	68
2.4.1	Usos de las especies del género <i>Aspergillus</i>	68
2.4.2	La identificación y taxonomía del <i>Aspergillus</i>	70
2.5	Hipótesis y objetivos	73
3	MATERIALES Y METODOS	75
3.1	Materiales	75
3.2	Métodos	77

3.2.1	Montaje y evaluación de un método de ensayo para medición de actividad enzimática de la fitasa.	77
3.2.2	Curva de calibración del ensayo enzimático	78
3.2.3	Medición de actividad de fitasa	80
3.2.4	Cultivo de <i>A. ficuum</i> , y obtención de fitasa	84
3.2.4.1	Fermentación en sustrato sólido (SSF)	84
3.2.4.2	Fermentación en cultivo sumergido (SmF)	87
3.2.5	Obtención de un extracto semipurificado de fitasa de <i>A. ficuum</i> proveniente de una SmF	89
4	RESULTADOS	95
4.1	Método de ensayo enzimático para medición de actividad de fitasa	95
4.1.1	Montaje del método	95
4.1.1.1	Análisis de los espectro de absorción	95
4.1.1.2	Estudio de estabilidad de la intensidad del color en el tiempo.	95
4.1.2	Evaluación del método	97
4.1.2.1	Estudio de sensibilidad y linealidad de la curva de calibración	97
4.1.2.2	Estudio de exactitud del método	99
4.1.2.3	Estudio de precisión del método	99
4.1.2.4	Estudio de precisión en relación a la estabilidad del color en el tiempo en muestras para ensayo de enzimático	101

4.2	Producción de fitasa proveniente de un cultivo de <i>A. ficuum</i>	102
4.2.1	Producción de fitasa mediante SSF	102
4.2.2	Producción de fitasa mediante SmF	102
4.3	Obtención de fitasa proveniente de un cultivo de <i>A. ficuum</i> en SmF, mediante técnicas de Semipurificación y Concentración	102
5	DISCUSIÓN	106
5.1	Discusión de resultados de la presente tesis	106
5.1.1	Montaje y evaluación del método	106
5.1.2	Producción de fitasa a partir de un cultivo de <i>A. ficuum</i>	110
5.2	Conclusiones	115
6	BIBLIOGRAFÍA	117
7	ANEXOS	140

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Estructura del Ácido Fítico	9
2	Interacciones del Ácido Fítico	12
3	Reacción enzimática de la Fitasa	38
4	Estructura primaria de algunas fitasas de <i>Aspergillus</i>	50
5	Estructura cristalina de la fitasa del hongo <i>Aspergillus ficuum</i>	51
6	Estructura morfológica del género <i>Aspergillus</i>	71
7	Ensayo enzimático	79
8	Esquema del protocolo de obtención de un extracto semipurificado de fitasa de <i>Aspergillus ficuum</i> proveniente de una SmF	90
9	Fermentación y obtención de un extracto semipurificado de fitasa	91
10	Estudio de estabilidad de la intensidad del color en el tiempo.	96
11	Estudio de sensibilidad y linealidad de la curva de calibración	98
12	Estudio de precisión del método de ensayo enzimático	100
13	Producción de fitasa mediante SSF	103
14	Producción de fitasa mediante SmF	104
15	Purificación de fitasa proveniente de un cultivo en SmF	105
16	Imágenes de cultivos de <i>A. ficuum</i>	141

17	Placas de cultivo de <i>A. ficuum</i> , mediante SSF	142
18	Placas control negativo de SSF	144
19	Muestras de cultivo de <i>A. ficuum</i> , mediante SmF	145
20	Control negativo de SSF	146

### INDICE CUADROS

<b>Nº</b>		<b>Página</b>
1	Preparación de Curva de calibración	78
2	Procedimiento de reacción enzimática en condiciones de reacción positiva (Rx. (+)) y negativa (Rx. (-)).	81
3	Exactitud del método de ensayo enzimático	154
4	Precisión en relación a la estabilidad del color en muestras para ensayo de enzimático	154

**INDICE ANEXOS**

<b>Nº</b>		<b>Página</b>
1	Fotografías de cultivos de <i>A. ficuum</i>	141
2	Crecimiento de la cepa DSM 932 de <i>A. ficuum</i> , mediante SSF	142
3	Crecimiento de la cepa DSM 932 de <i>A. ficuum</i> , mediante SmF	145
4	Consideraciones en la preparación de la curva de calibración	147
5	Preparación de reactivo de Taussky-Shorr	148
6	Consideraciones en la medición de muestras del ensayo enzimático	149
7	Preparación de inóculos	150
8	Preparación de muestras para medición de actividad de fitasa	152
9	Tablas de resultados	153

## ABREVIATURAS

- AF : Ácido fítico.
- EC : Enzyme Commission numbers.
- IPX : Formas poli fosforadas que presenta el fosfato de inositol  
(correspondiendo X al número de átomos de P).
- IUBMB : International Union of Biochemistry and Molecular Biology
- IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry.
- IUPAC-IUB : International Union of Pure and Applied Chemistry and International
- SmF : Fermentación en sustrato sumergido.
- SSF : Fermentación en sustrato sólido.

## GLOSARIO

Piensos : Todo material único o múltiple de característica inocuo, que sea elaborado, semielaborado o en bruto, y que este destinado directamente a la alimentación de animales en la forma de gránulos o pellets.

Microfiltración: Filtración para partículas de 0,1 a 10  $\mu\text{m}$ .

Ultrafiltración: Filtración para solutos de 0,001 a 0,1  $\mu\text{m}$  (1 a 100 kD)

## 1 RESUMEN

En los últimos años, las materias primas de origen vegetal están adquiriendo cada vez mayor importancia en la fabricación de alimentos para animales. Esta materia prima se caracteriza por presentar una cantidad importante de Fósforo (P) en forma de ácido fítico (AF). Estudios realizados en animales monogástricos demuestran que a diferencia de lo que ocurre en rumiantes, el AF es uno de los principales problemas que tienen en su alimentación a base de ingredientes de origen vegetal; ya que estos animales no pueden degradar el AF. Debido a este problema, hay interés considerable en la degradación enzimática de las formas en que se presenta el AF en estos alimentos, mediante la adición de enzimas fitasa. Estas enzimas tienen como función catalizar la hidrólisis de los grupos fosfatos del AF (*myo*-inositol hexakisfosfato), dando lugar a la formación de diversos fosfatos de inositol.

En la presente tesis, el objetivo fue producir una enzima fitasa proveniente de la cepa DSM 932 del hongo *Aspergillus ficuum*; esto mediante fermentaciones en sustrato sólido (SSF) y sumergido (SmF) a partir de ingredientes vegetales ricos en AF. Los resultados obtenidos indican que es factible la obtención de fitasa de la cepa DSM 932 de *A. ficuum*, si ésta es llevada a cabo en los medios diseñados para ambos tipos de fermentaciones. Se logró llevar a cabo la purificación parcial y concentración de un extracto de fitasa proveniente de una SmF mediante el conjunto de técnicas de filtración, microfiltración y ultrafiltración ideado para este propósito. Y al comparar ambas fermentaciones, los mayores niveles de fitasa son obtenidos en la SSF.

## 1.1 SUMMARY

In the last years, the raw materials of vegetable origin are more and more importance in the production of foods for animals. This raw material it is characterized to present a significant amount the phosphorous (P), in form of Phytic Acid (AF). Studies realized in Monogastric Animals demonstrate that contrary to concerning in ruminant, the PA is some of the main problems that have in its feeding based on ingredients of vegetable origin; since they cannot degrade the AF. Due to this problem, there is considerable interest in the enzymatic degradation of the forms in that the AF is presented in these foods, through enzymes have as function to catalyze the hydrolysis of the phosphate groups of PA (*myo*-inositol hexakisphosphate), giving place to the formation of diverse inositol phosphates.

In the present thesis, the objective was to produce an enzyme Phytase coming from the strain DSM 932 of the fungi *Aspergillus ficuum*; since by means of fermentations in solid substrate (SSF) and submerged (SmF) starting from rich vegetable ingredients in AF. The obtained results indicate that it is feasible the obtaining of fitasa of the strain *A. ficuum* DSM 932, if it is carried out in the mediums designed for both types of fermentations. It was possible to carry out the partial purification and concentration of an extract de phytase coming from a SmF by means of the combined of technical of filtration, microfiltration and ultrafiltration devised for this purpose. Comparing both fermentations, the biggest phytase levels of were obtained in the SSF.

## 2 INTRODUCCIÓN

### 2.1 Fósforo y su papel en dietas de origen vegetal

El Fósforo (P) es un nutriente muy importante para la mayoría de los sistemas biológicos. Es un importante componente estructural de huesos, músculo y participa en el metabolismo de aminoácidos, grasas, e hidratos de carbono; como también en la degradación y síntesis de proteínas, membranas celulares, y tejidos. Se le requiere en muchos procesos bioquímicos responsables del crecimiento, la producción, la reproducción, la respuesta inmune, el mantenimiento y la reparación de la estructura ósea (Auman, 2003).

El P detectado en el cuerpo de un animal, constituye aproximadamente entre el 0,7% al 1,2% del peso; y dentro de este porcentaje de P detectado, aproximadamente se almacena el 80% en el esqueleto y el 20% en los tejidos del cuerpo y fluidos (Auman, 2003).

También el P es componente esencial en los procesos y almacenamiento de energía. Interviene en la respiración aeróbica/anaeróbica, e iniciación de la señal neurológica y de transmisión (Auman, 2003).

Referente a la nutrición animal, este ha sido un tema muy importante desde hace muchos años. Pueden encontrarse revisiones de estudios muy tempranos sobre la nutrición animal escritos por Kastelic y Forbes (1961).

En este sentido, al estudiar la nutrición animal y el papel del P en dietas de origen vegetal; el ácido fítico (AF) se presenta como uno de los principales problemas en la alimentación a base de piensos de origen vegetal, cuando este tipo de alimento es dado a consumir a animales monogástricos. Es por ello, que en la nutrición animal y también en el contexto humano, se consideran dos aspectos del AF como extremadamente importantes, estos son:

- En los animales que presentan un estómago simple “monogástricos”, como es el caso de cerdos, aves, y así como los humanos; virtualmente falta la actividad de enzimas degradantes de las formas en que se presenta el AF en sus tractos digestivos (fitasas). Esto se produce ya que estos tipos de animales presentan una actividad fitasa muy reducida en sus tractos gastrointestinales (Cromwell y Coffey, 1991); lo que provoca que la baja biodisponibilidad de P presente en ingredientes de origen vegetal, sea un problema a nivel de este tipo de alimentación (Tomschy *et al.*, 2000).

En cambio los rumiantes, que se caracterizan por tener más de un estómago, si son capaces de digerir el fitato producto de la actividad microbiana presente en el rumen (Arriagada, 1998).

- El AF se presenta como un factor antinutricional, ya que forma los complejos con las proteínas y una variedad de iones metálicos, y por consiguiente las disminuciones la disponibilidad de estos nutrientes (Reddy *et al.*, 1982b; Wodzinski y Ullah, 1996).

A nivel económico, el P es el tercer componente más caro presente en una ración de no rumiantes, después de las proteínas y otros compuestos para la obtención de energía (Vallardi *et al.*, 2002).

Debido a estos problemas que se presentan en este tipo de alimentación, producto del AF (que son comentados detalladamente más adelante), hay interés considerable en la degradación enzimática de las formas que se presenta el AF en los alimentos de origen vegetal (Wyss *et al.*, 1999b).

Las primeras investigaciones llevadas a cabo con fitasas fueron dirigidos por Nelson (1967). En varios estudios realizados por él, se alimentaron animales con dietas de soya baja en P, la cual había sido previamente tratada con fitasa proveniente de *Aspergillus ficuum*; y sus resultados mostraron respuestas impresionantes en el crecimiento y en la médula del hueso (Nelson *et al.*, 1968). Como consecuencia de los resultados obtenidos, en otro estudio, también realizado por el mismo autor, agregaron enzima fitasa a dietas baja en P, observando efectos similares (Nelson *et al.*, 1971).

Otro gran problema que presenta la alimentación de origen vegetal dada a animales monogástricos es la contaminación producto del P. Este tipo de contaminación es producida a consecuencia de que casi todo el P del fitato dietético que es ingerido por estas especies, se excreta en el estiércol; lo cual ocasiona problemas medioambientales en las áreas de producción intensiva del ganado (Cromwell y Coffey, 1991). Además la descarga y lixiviación del excremento de estos animales hacia los ríos y mares, produce polución severa de los recursos de agua; con lo cual se provoca la eutroficación de la superficie de las aguas. Este último problema, que se caracteriza por

el incremento del crecimiento de las algas, y plantas acuáticas, disminución del oxígeno y cambios del pH; genera cambios en la ecología de la plantas acuáticas y en la cadena alimenticia (Vallardi *et al.*, 2002). El impacto adverso potencial del P presente en el estiércol proveniente de los sistemas de producción intensiva del cerdo y pollos, se encuentra bien estudiado y documentado (Auman, 2003; Foster, 2003)

Para compensar las limitaciones del P que se encuentra disponible en las fuentes de origen vegetal, generalmente los alimentos para los cerdos y aves tienen que ser suplementados con fosfato inorgánico (Pi); así se logra alcanzar los requisitos de fósforo de estos animales (Wodzinski y Ullah, 1996; Wyss *et al.*, 1999b). Aunque por lo mismo también se intensifica el problema de contaminación ambiental.

Lo mencionado anteriormente, hace necesario que exista y se requiera una suplementación del alimento con fitasa, enzima que degrada AF (Wodzinski y Ullah, 1996); ya que la suplementación con fitasa es preferible a la suplementación de Pi, porque de esta forma se reduce la polución de P medioambiental producto del estiércol del animal (Wodzinski y Ullah, 1996).

Se considera, que la recomendación que se está dando de incluir fitasas en las dietas, resultan ser un efectivo medio para reducir el nivel de P presente en los desechos animales (fecas), con lo cual, además permite disminuir la eutroficación de las aguas producidas por estos desechos (Foster, 2003).

Cabe destacar que en los últimos años las materias primas de origen vegetal también están adquiriendo cada vez mayor importancia en la fabricación de alimentos para

peces, dada su competitividad frente a las harinas de pescado, lo que estriba fundamentalmente en su mayor producción, ya que no es limitada por la productividad natural del medio, y además porque muchas de ellas son subproductos agroindustriales. Por consiguiente, los precios pueden llegar a ser muy competitivos, (Saez, 2003); con lo cual está adquiriendo cada vez mayor importancia el papel del AF en la alimentación animal.

De las materias primas vegetales que están siendo usadas en reemplazo de harina de pescado, se destaca los productos de soya; siendo la fuente proteica vegetal más usada en el reemplazo de esta harina de origen animal (Sales y Britz, 2003). En este sentido la harina de soya ya ha sido incorporada a las dietas por algunas empresas nacionales (Saez, 2003). A nivel de investigación también se está utilizando actualmente vegetales de variados orígenes; como harinas de Arveja, harinas de raps, harinas de lupino en varias proporciones, harinas de maravilla, y harinas de maíz. (Saez, 2003)

La conveniencia del uso de soya (*Glycine max*) como producto para reemplazar a la harina de pescado ha sido determinada por ser efectiva en costos, sustentable y baja en P (Saez, 2003).

Por la importancia de todo lo que se ha mencionado en relación al P y el AF, se han hecho muchas revisiones referentes a las aplicaciones de la enzima en alimentos para animales monogástricos (Campbell y Bedford, 1992); y por ello también revisiones sobre el desarrollo de fitasa como un producto comercial (Wodzinski y Ullah, 1996).

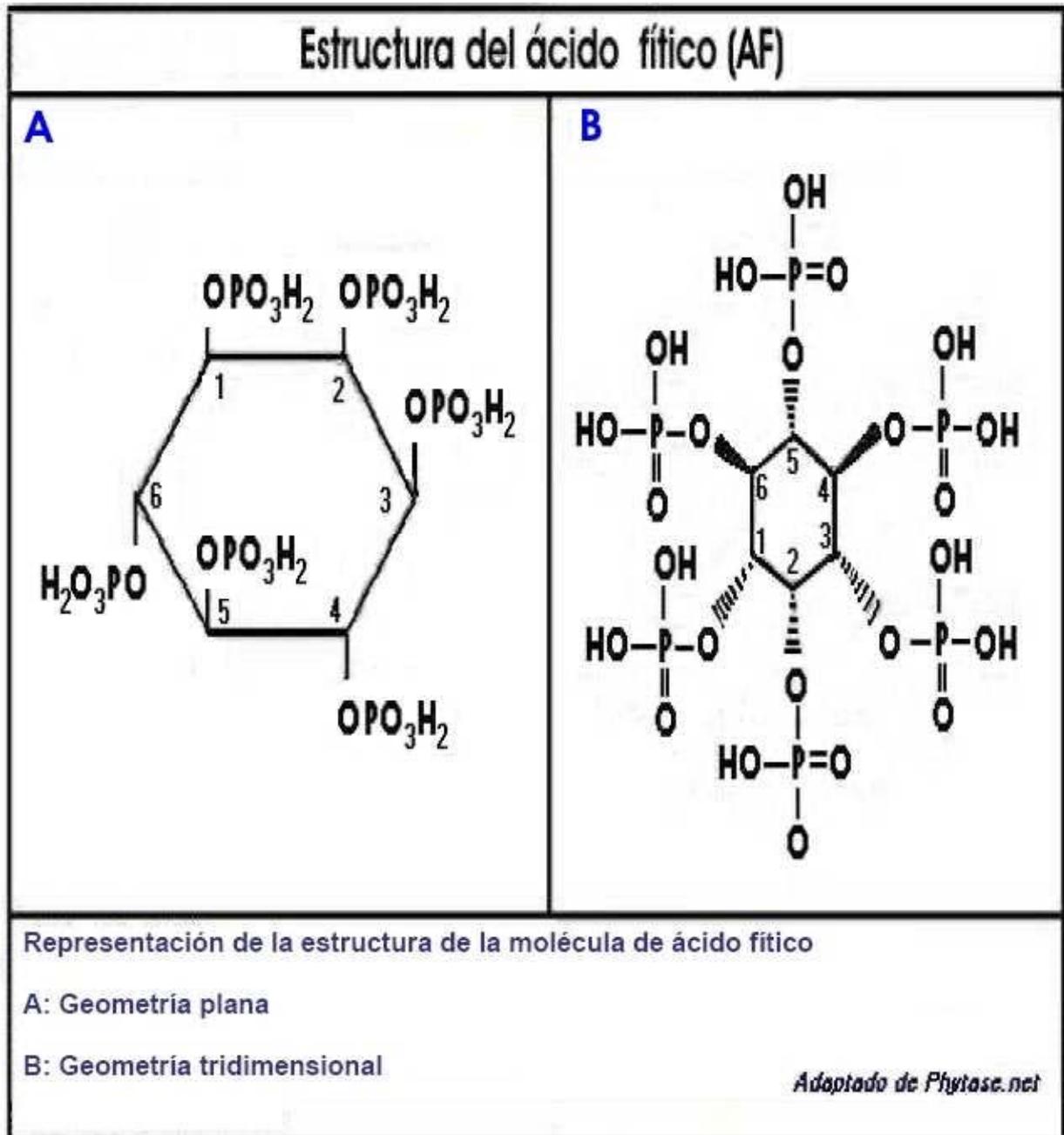
## 2.2 ACIDO FÍTICO (AF)

**2.2.1 Características químicas del AF.** El AF (Fig.1), desde su descubrimiento hace más de 150 años, ha recibido mucha atención producto de las características que presenta. Según el modelo aceptado (Anderson, 1914), el AF es una molécula de inositol esterificado con seis radicales ortofosfatos ((IP6), (InsP6) o (Ins 6-P)) (Thompson, 1987). El nombre químico que recibe el compuesto de AF es: **myo-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6 – hexaquis dihidrógeno fosfato** (Cosgrove, 1966; IUPAC and IUPAC-IUB, 1968; IUPAC-IUB, 1977); su fórmula química es: **C<sub>6</sub>H<sub>18</sub>O<sub>24</sub>P<sub>6</sub>** y presenta un peso molecular de **659,86 g/mol**.

Los compuestos de inositol fosfatos, en el cual está incluido el *myo*-inositol, pertenecen a la familia de los ésteres fosfóricos de hexodihidroxi-ciclohexano "*phosphoric esters of Hexahydroxycyclohexane*" (inositol) (Turner *et al.*, 2002). Entre ellos, el *myo*-inositol es el más común de los nueve esteroisómeros que son posibles de formar para el inositol hexodihidroxiciclohexano; y más específicamente, el *myo*-inositol, se puede encontrar en una gran variedad de formas poli fosforadas (Robinson, 1991). Así en la naturaleza, son variadas las formas poli fosforadas de fosfatos de inositol que se pueden encontrar formando parte de la composición de los vegetales; y por ello en los alimentos formados a partir de ellos.

En el AF, la posición de los grupos fosfatos presentes en este compuesto, son denotados por el número correspondiente a la posición de los carbonos existentes en el anillo de inositol; en el cual están unido estos grupos (Turner *et al.*, 2002).

Figura 1.



Según la IUPAC (1971), respecto al número de grupos de fosfatos substituidos en el anillo de inositol (que va de uno a seis), estos se indican en su nombre químico con los prefijos mono, bis, tris, tetrakis, pentakis y hexakis (preferentemente over di, tri, tetra, penta and hexa) (Turner *et al.*, 2002).

En la literatura, las formas poli fosforadas que presenta el fosfatos de inositol se identifican con las siguientes siglas IPX, InsPX o Ins X-P, correspondiendo X al número de átomos de P que están unidos a la molécula de *myo*-inositol (de 1 a 6 fosfatos), existiendo las siguientes formas de inositol: inositol monofosfato (IP1), inositol difosfato (IP2), inositol trifosfato (IP3), inositol tetrafosfato (IP4), inositol pentafofosfato (IP5), e inositol hexafofosfato (IP6) (Brenes *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2002).

Por la composición y estructura que tiene la molécula del AF, ésta molécula se caracteriza por poseer un alto contenido en fósforo, de aproximadamente un 28,2% (Wang, 1998). Encontrándose el AF en la mayoría de las plantas en una gran proporción de fósforo (P) de alrededor del (80%), está presente en forma de fitato (Brenes *et al.*, 2002); acumulándose fundamentalmente en la semilla y encontrándose los porcentajes más alto en los cereales (Sugiura *et al.*, 1999)

Producto de sus 6 radicales fosfóricos, el AF en condiciones de pH neutro y el presente normalmente en los alimentos, este se presenta como una molécula cargada negativamente y por tanto muy reactiva; obteniendo así una elevada capacidad para formar complejos o unirse a moléculas cargadas positivamente como cationes o proteínas (Wang, 1998); lo cual trae problemas anexos a la disposición del P.

**2.2.2 Interacciones del AF con cationes y proteínas.** Las interacciones que se presentan entre el AF y los cationes y proteínas son variadas, presentándose las siguientes formas:

**2.2.2.1 Interacción del AF con los cationes.** El tipo de interacciones que presenta el AF con los cationes, se deben exclusivamente a sus numerosos grupos fosfato que ella posee (Thompson, 1987), (Fig.2).

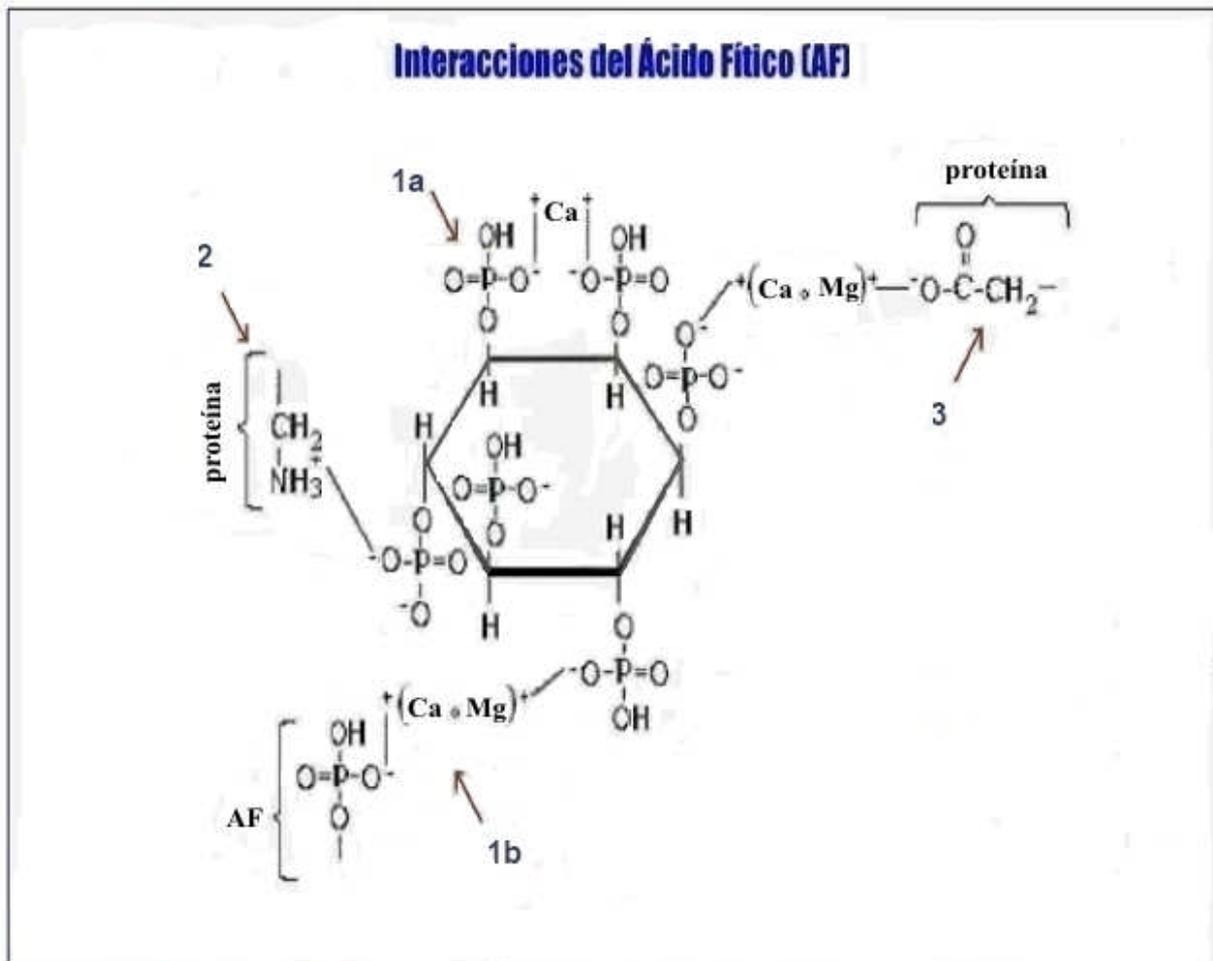
Las interacciones entre los cationes y el AF pueden producirse de diferentes maneras, dependiendo de las características de los compuestos implicados en ello. Entre las formas de uniones que se presentan, están:

- Los cationes pueden unirse a un sólo grupo fosfato, o a dos grupos fosfato de una misma molécula de AF. (Fig.2 <sub>1a</sub>)
- Los cationes pueden unirse a grupos fosfato presentes en distintas moléculas de AF (Fig.2 <sub>1b</sub>), (Thompson, 1987).

Además, los cationes pueden permitir que se produzcan ciertas interacciones de las proteínas con el AF (Thompson, 1993).

Las interacciones que se presentan entre el AF y los cationes, produce la formación una variedad de sales de *myo*-inositol hexaquis fosfato. Estas sales presentan distintas características dependiendo del tipo de catión que la forman (Nolan *et al.*, 1987), y del pH en que se encuentren el AF y los cationes (Nolan *et al.*, 1987; Han, 1988).

Figura 2.



Tipos de interacciones formadas por el ácido fitico.

- 1a Cationes unidos a dos grupos fosfato de una misma molécula de AF.
- 1b Cationes unidos a grupos fosfato de distintas moléculas de AF.
- 2 Interacción electrostática entre grupos amino terminal de las proteínas y ésteres fosfato aniónicos del AF, formando un complejo binario.
- 3 Complejo ternario formado por AF con cationes divalentes como el Ca o Mg, con las proteínas.

Adaptado de Martínez *et al.*, 2002.

Las sales formadas entre el AF y cationes, se denominan fitatos; formándose con cationes, tales como Na, Mg, K, Ca, Zn, Cu, Fe (Brenes *et al.*, 2002). El término fitina se emplea para referirse especialmente a una mezcla de sales de Ca y Mg con AF (Martínez *et al.*, 2002). Las fitina son las formas predominantes en que se encuentra el AF en los granos de cereales (Wheeler y Ferrel 1971), cuando cumple la función de fuente de fosfato, myo-inositol y cationes durante la germinación (Reddy *et al.*, 1982b).

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).

- A pH bajos el AF forma sales de Ca y Mg, las cuales son solubles (Han, 1988); y la afinidad de los complejos del fitato solubles para los iones metálicos a pH bajo varía de acuerdo al tipo de ión con que forma la interacción, siendo:



(Turner *et al.*, 2002).

- A pH neutro el AF forma también variedades de sales insolubles con cationes di-y trivalentes (Zn, Cu, Co, Mn y Fe) (Brenes *et al.*, 2002), manifestando esta capacidad quelante sólo las formas IP6 o la IP5 (Lonnerdal *et al.*, 1989).
- A pH más elevados, además de las sales por el AF con Zn, Cu, Co, Mn y Fe, las sales de Ca y Mg son también insolubles (Han, 1988).

**2.2.2.2 Interacción del AF con las proteínas.** La interacción que presenta el AF con las proteínas es de tipo pH-dependiente, es decir, el grado de interacción presente entre el AF y las proteínas es dependiente de factores como son la carga neta de la proteína, de su conformación y de las interacciones que presenten con los minerales, todas las cuales dependen del pH, en que se encuentren ambos (Thompson, 1987; Thompson, 1993).

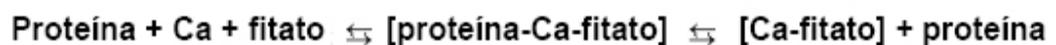
- A pH por debajo del punto isoeléctrico de las proteínas, las proteínas se encuentran cargadas positivamente y el AF negativamente. En estas condiciones de pH se produce una fuerte interacción electrostática entre grupos amino terminal de las proteínas, y de los ésteres fosfato aniónicos del AF, lo cual produce que se forme un complejo binario (Figura 2<sub>2</sub>) (Thompson, 1987).
- A pH intermedio, es decir que estén por encima del punto isoeléctrico de las proteínas, dado que la carga de las proteínas al igual que la del AF es negativa, la interacción directa entre ellas es imposible; sin embargo la interacción si puede llegar a realizarse a través de la formación de un complejo ternario (Thompson, 1987). El complejo ternario esta formado por la interacción del AF con cationes divalentes como el  $\text{Ca}^{2+}$  o el  $\text{Mg}^{2+}$  y proteínas (Figura 2<sub>3</sub>). Esta unión se realiza a través de los grupos carboxilos ionizados y el grupo imidazol desprotonado de una histidina, siendo necesaria una concentración mínima de estos cationes para mantener estos complejos (Thompson, 1987).

La interacción a pH intermedio entre el AF y las proteínas también puede realizarse a través de residuos lisil y arginil; por lo que de esta forma, también pueden existir algunos complejos binarios a estos pH, ya que a dichos pH los residuos lisil y arginil de las proteínas están aún cargados positivamente (Martínez *et al.*, 2002).

- A pH más elevado a los nombrados, disminuye la interacción que se forma entre las proteínas y el AF.

En el caso de las interacciones que se formaban con los grupos lisil y arginil, a estos pH no se produce ya que estos pierden su carga, y por tanto su capacidad de formar complejos binarios. (Thompson, 1987).

En el caso de los complejos ternarios que estén presentes, estos se desestabilizan ya que la fuerza iónica aumenta a pH elevado; con lo que se produce la siguiente reacción:



(Selle *et al.*, 2000)

Un incremento en la concentración del ión Na, hace que la reacción de equilibrio del complejo ternario se desplace hacia la derecha, con lo cual se produce la liberación de fitato cálcico insoluble y proteína-Na soluble (Thompson, 1987).

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

- Hidrólisis química: Las uniones fosfoéster presentes en la estructura del AF se caracterizan por ser muy estables, sobre todo si el AF está bajo condiciones de pH básico; pero en el caso de encontrarse el AF en un medio ácido, se produce una hidrólisis lenta (Anderson 1980). En esta última condición, la hidrólisis máxima del AF ocurre a un pH 4,5, y la mínima velocidad de hidrólisis se presenta a pH 0-1 (Anderson 1980).

Producto de lo anteriormente mencionado, la hidrólisis no enzimática de los fitatos tiene lugar cuando éstos son tratados con un ácido fuerte (Cosgrove, 1963). Aun 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 IP6 (Cosgrove, 1980).

Cuando los fitatos formados son solubles en agua, los complejos proteína-fitato que están presentes en los alimentos pueden romperse mediante el empleo de sales y ajustes de pH (Zhou *et al.*, 1990). Así por ejemplo, en la composición de los alimentos que contienen granos de cereales o de legumbres, y los que previamente son procesados a formas de harinas, pueden presentar cantidades apreciables de fitatos parcialmente desfosforilados (Philippy *et al.*, 1988).

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 presente en la materia prima. Ejemplo de ello, es que al someter por 4 h a diferentes tipos de semillas a una temperatura de alrededor de 115 °C, la desfosforilación de los fitatos presentes en ellas es muy variable y esta no llega a superar el 60%. (Boland *et al.*, 1975)

- 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 (IP6) dando lugar de forma progresiva a la formación de diversos fosfatos de inositol (Brenes *et al.*, 2002). Las fitasas serán comentadas ampliamente en su capítulo correspondiente.

**2.2.4 Efecto nutricional y fisiológico del AF.** El AF se encuentra en los alimentos en niveles del 0,1 al 6% (Reddy *et al.*, 1982a); dependiendo su concentración de la parte y tipo de la vegetal que se consuma. (Ravindran *et al.*, 1994). Presentando niveles elevados en granos, niveles moderados en los tubérculos, raíces y frutas, y niveles bajos en verduras (Ravindran *et al.*, 1994).

Estudios han estimado que el consumo de alimentos ricos en AF en la alimentación humana, es más elevado en países subdesarrollados y en vías de desarrollo, y así como en la población vegetariana de países desarrollados (Khokhar *et al.*, 1994). El consumo medio de AF se ha estimado en 0,75-0,79 g/persona/día, siendo estos niveles 2 ó 3 veces mayores en países en vías de desarrollo como la India (Khokhar *et al.*, 1994).

El AF se caracteriza por presentar una actividad antinutricional, debido a su ya mencionada capacidad de formar compuestos insolubles con minerales y proteínas (Zhou y Erdman, 1995; Sugiura *et al.*, 1999). De esta forma, estas características producen de esta forma la reducción de la biodisponibilidad mineral, y que el AF presente la capacidad de inhibir enzimas proteolíticas y amilolíticas; convirtiendo en no asimilables a muchos nutrientes ingeridos por el organismo (Khokhar *et al.*, 1994). Está claro además, que altos niveles de AF en la dieta están asociados con efectos nutricionales adversos en el hombre, y los animales monogástricos (Khokhar *et al.*, 1994); aunque paradójicamente el AF a niveles bajos presenta efectos beneficiosos tanto en el ser humano como en los animales monogástricos.

Los efectos nutricionales y fisiológicos referentes al AF, serían los siguientes:

**2.2.4.1 Efectos del AF en la biodisponibilidad mineral.** Como se ha explicado anteriormente, debido a su estructura altamente reactiva, el AF es un excelente agente quelante; el cual presenta una gran afinidad por elementos trazas polivalentes y minerales como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Sugiura *et al.*, 1999; Graf y Eaton, 1993).

Los efectos adversos del AF en la biodisponibilidad mineral dependen de un gran número de factores entre los que se destacan:

- La concentración de AF.
- La fuerza de la unión que el AF presenta con los diferentes minerales. (Thompson, 1993).

También influyen otros factores como son:

- La adaptación metabólica que presente el organismo, frente a altos niveles de AF.
- La presencia de fitasa de origen intestinal, bacteriana o de la dieta, así como la inhibición de dicha enzima.
- Si el AF es ingerido en la misma comida que la fuente mineral o están presentes en comidas separadas.
- La concentración de proteínas de la dieta, y por tanto la presencia de proteínas, péptidos o aminoácidos en el intestino que pueden interferir en la formación del complejo fitato- mineral.

- La presencia de otros agentes quelantes como: fibra dietética, taninos o ácidos como el oxálico, ascórbico y cítrico, que también se pueden unir con minerales.
- Las condiciones de procesado del alimento (especialmente pH), así como el tipo de AF presente en el alimento (añadido o endógeno), y la concentración de minerales en el alimento

(Thompson, 1993; Skoglund *et al.* 1997)

Referente a la medición del nivel de la acción que presenta el AF frente a los cationes, debido a la composición de los tipos de alimentos en que están presentes; en el que normalmente confluyen diferentes constituyentes capaces de ejercer también una acción antinutritiva frente a los cationes, como son el caso de oxalatos, taninos y fibra (Martínez *et al.*, 2002). Ello hace que resulte complicado establecer un orden de importancia en cuanto a las fuerzas de unión que el AF y cada uno de los demás constituyentes, ejercen individualmente (Torre *et al.*, 1991). Además la mayoría de los alimentos que presentan elevado contenido de AF son también buenas fuente de fibra dietética, la cual también tiene una gran afinidad por los minerales; y aunque los fitatos y la fibra son separados y evaluados independientemente, es difícil atribuir únicamente a los fitatos los efectos negativos que se presentan en la biodisponibilidad mineral (Ravindran *et al.*, 1994).

La mayor parte de los estudios realizados sobre la interacción entre el fitato y los minerales ponen de manifiesto la existencia de una relación inversa entre la absorción de estos micronutrientes y el AF (Martínez *et al.*, 2002).

Los efectos demostrados hasta el momento que el AF produce en la biodisponibilidad mineral, están presentes en los siguientes elementos:

- **El Calcio.** Estudios realizados en el hombre indican que el AF reduce la absorción de Ca (Knox *et al.*, 1991), y que la disminución del AF en la soya mediante mejora genética, supone un incremento en la biodisponibilidad de este mineral (Heany *et al.*, 1991). Por el contrario a estos estudios, los resultados obtenidos en ratas han sido contradictorios: ya que mientras algunos estudios indican la existencia de un efecto inhibitor del AF en la absorción de Ca (Lonnerdal *et al.*, 1989), mientras en otros no se obtiene efecto significativo alguno (Ranhotra *et al.*, 1981). Por otra parte, se ha sugerido que las ratas no pueden ser consideradas como un buen modelo para la absorción de Ca debido a la actividad de la fitasas en su mucosa intestinal, no juega un papel importante en la digestión del AF, a diferencia de lo que puede suceder en otros animales (Heany *et al.*, 1991). Además, hay que destacar que la fermentación intestinal disminuye los efectos inhibitorios de AF en la utilización mineral en las ratas (Lopez *et al.*, 1998).

Estudios han indicado que el efecto inhibitor que el fitato tiene sobre el Ca, depende del grado de fosforilación del inositol. Así cuando la fosforilación es elevada (5 ó 6 fosfatos) la absorción del Ca y también la del Zn es inhibida significativamente; sin embargo, a niveles menores de fosforilación este efecto no se observa (Lonnerdal *et al.*, 1989).

La solubilidad de los complejos formados entre AF y el Ca depende también de la razón fitato-Ca existente; así la solubilidad del complejo fitato-Ca, es extremadamente baja a razones 1/8, pero a otras razones la solubilidad es alta (Graf y Eaton, 1993).

Cuando el Ca está presente en concentraciones elevadas se forman complejos con 5 ó 6 cationes por molécula de fitato ( $[Ca]_5$ -fitato o  $[Ca]_6$ -fitato) (Nolan *et al.*, 1987). También pueden existir otros complejos que incluyen de 1 a 4 cationes unidos a una molécula de fitato, dependiendo de la concentración de Ca presente; los complejos hexa-, penta-, tetra-, y tricalcio son insolubles mientras que los complejos mono- y dicalcio son solubles (Gifford y Clydesdale, 1993).

Los complejos insolubles fitato-calcio son también considerados como los principales responsables de la reducción de la biodisponibilidad de otros minerales como Fe y Zn, a través de la unión de éstos al complejo fitato-Ca para formar un complejo aún menos soluble (Zhou y Erdman, 1995).

Un punto a tener presente en la interacción AF y Ca, son los resultados obtenidos en productos de panadería, ya que en ella está presente la adición de Ca (cuya práctica es habitual). Estudios hechos tanto *in vivo* como en investigaciones *in vitro* sugieren que la adición de Ca reduce la hidrólisis del AF (Snider y Liebman, 1992), debido a que elevadas concentraciones de Ca impiden la acción de las fitasas (Pallauf y Rimbach, 1997).

- **El Hierro.** Debido al importante contenido de Fe de los cereales, la mayoría de los estudios sobre la interacción entre el AF y este mineral se han realizado con pan integral, que al mismo tiempo permite vincular el AF presente en la cubierta de la semilla; aunque como se dijo anteriormente hay que tener en cuenta la adición de Ca a la hora de evaluar estos resultados.

Entre las investigaciones hechas sobre la interacción AF y Fe; numerosos estudios realizados en el hombre indican que el AF tiene un fuerte efecto inhibitor en la absorción de hierro (Tuntawiroon *et al.*, 1990). También es conocido que el salvado (capa protectora comestible del cereal) es un importante inhibitor del Fe, aunque según las investigaciones realizadas, este efecto no puede ser atribuido por entero a los fitatos (Simpson *et al.*, 1981). La mayoría de los estudios coinciden en que es debido exclusivamente al AF y otros inositol fosfato, y no a la fibra y otros constituyentes presentes en el salvado (Zhou y Erdman, 1995; Tuntawiroon *et al.*, 1990).

Se ha demostrado en seres humanos adultos, que el efecto negativo del AF en la absorción del Fe es dosis dependiente, y que se puede incrementar la biodisponibilidad del Fe mediante la adición de ácido ascórbico (Zhou y Erdman, 1995). El ácido ascórbico no sólo facilita la solubilización del Fe, sino que además reduce el ión férrico a ferroso, que es más soluble, y forma complejos Fe-ascorbato; impidiendo por tanto su unión al AF, estos complejos Fe-ascorbato siguen siendo solubles en el intestino delgado (Siegenberg *et al.*, 1991).

- **El Zinc.** Numerosas investigaciones en animales demuestran que el AF contenido en los alimentos reduce la biodisponibilidad del Zn (Gifford y Clydesdale, 1993). Las formas de AF que ejercen este efecto sobre el Zn serían los IP6 e IP5, mientras que los fitatos con menor grado de fosforilación ejercen un bajo o nulo efecto en la absorción del Zn (Lonnerdal, 2000).

Estudios realizados en el hombre también han demostrado que el AF presente en la dieta inhibe la biodisponibilidad del Zn, y que altos niveles de este antinutriente pueden dar lugar a una deficiencia de Zn (Zhou y Erdman, 1995).

Se ha sugerido la razón molar AF/Zn como indicador de la biodisponibilidad del Zn, y así valores de la misma mayores de 20, supondrían una disminución de la absorción de este mineral (Fitzgerald *et al.*, 1993).

Otros investigadores, consideran además que influyen otros factores en la relación entre el Zn y el AF, como es el contenido de Ca en la dieta (Wise, 1986). Estas investigaciones indican que la presencia del Ca es de vital importancia en el efecto negativo del AF sobre el Zn, e indican que para la predicción de la utilización del Zn sería más adecuada la razón fitato-Ca/Zn (Wise, 1986). En este sentido, se ha señalado que un aumento de la concentración de Ca en dietas que contienen Zn y fitato supone una reducción de la biodisponibilidad del Zn (Gifford y Clydesdale, 1993) debido a la formación de complejos insolubles Ca-fitato-Zn (Zhou y Erdman, 1995). Así, a valores de razón fitato-Ca/Zn mayores de 22, la utilización de Zn queda comprometida (Fitzgerald *et al.*, 1993).

- **El cobre.** En relación a las interacciones entre el Zn y el AF, algunos estudios han informado que se produce un efecto inhibitorio, mientras otros han indicado que no se produce ningún efecto del AF sobre la absorción de Cu en los humanos y en modelos animales (Morris y Ellis, 1985); sin embargo, paradójicamente, otros estudios también han notado que existiría un efecto positivo del AF en la absorción de Cu en el caso de análisis en las ratas (Lee *et al.*, 1988).

En relación a la investigación que muestra un efecto positivo del AF en la absorción de Cu, este parece ser modulado por varios factores dietéticos; sobre todo el nivel de cinc en la dieta. El AF podría reforzar la absorción de Cu posiblemente por el hecho de la habilidad que tiene el AF de ligar Zn, neutralizando su capacidad de competir con Cu en los sitios de absorción intestinales (Champagne e Hinojosa, 1987).

Debido a todo lo mencionado sobre la biodisponibilidad mineral, se ha sugerido que se podría realizar una adecuada selección genética de semillas con bajo contenido en AF; sin embargo, aunque supone un aumento de la eficiencia de utilización del P, ello también implicaría que se produzca una disminución del transporte del P hacia el interior del germen o la semilla. De este modo, se ha señalado que para los programas dirigidos hacia la mejora genética de los vegetales, se sugiere que estos si estén dirigidos a reducir el contenido de P fítico, pero siempre manteniendo el contenido total de P en la planta y en la semilla, así como otros constituyentes deseables (Raboy y Dickinson, 1993).

**2.2.4.2 Efectos del AF en proteínas.** La interacción del AF con las proteínas ha sido ampliamente estudiada, principalmente en soya, sin embargo su naturaleza no es totalmente conocida y los efectos antinutricionales en la disponibilidad de dichas proteínas no están aun claros (Deshpande y Damodaran, 1989; Carnovale *et al.*, 1988).

La existencia de una correlación negativa ( $p < 0,05$ ) entre el AF y la digestibilidad proteica ha sido puesta de manifiesto en varios alimentos (Kumar y Chauhan, 1993). Sin embargo, en otros estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, sobre el efecto del fitato en la digestibilidad de las proteínas queladas y la absorción de aminoácidos, contrariamente también se ha observado que el efecto adverso del fitato es o muy pequeño o nulo (Thompson y Serraino, 1986). Estos resultados discordantes en el caso de los experimentos *in vivo* tendrían como posibles causas las diferentes naturalezas de las fuentes de proteínas (Carnovale *et al.*, 1988).

Otros investigadores han atribuido que el efecto negativo que presentan los fitatos en relación al metabolismo proteico, se debe a la capacidad del AF de inhibir enzimas digestivas, más que a la formación de un complejo fitato-proteína (Deshpande y Damodaran, 1989). Se conoce que el AF inhibe a tripsina, tirosinasa pepsina y  $\alpha$ -amilasa de diferentes orígenes (Nair *et al.*, 1991). Que el fitato inhiba enzimas como la pepsina sería producto al pH ácido al cual ésta es activa, con lo que se promueven fuertes uniones electrostáticas entre ambos; lo mismo ocurre con aquellas enzimas que tienen un pH óptimo ácido (Deshpande y Damodaran, 1989). A diferencia de lo que ocurre con la pepsina, la interacción con tripsina y quimiotripsina no sólo depende del pH, sino también de otros factores entre los que se encuentra la relación proteína/fitato.

A pH 3 el fitato forma complejos insolubles con la tripsina y quimotripsina, sin embargo, a pH 7,8 en el que la actividad de estas enzimas es algo mayor, es necesario el  $\text{Ca}^{2+}$  para la formación estos complejos. No obstante lo señalado, las condiciones en que se producen estas fuertes interacciones, rara vez se dan *in vivo* (Deshpande y Damodaran, 1989).

En condiciones "*in vitro*", se ha observado que este AF inhibe la actividad de la tripsina, posiblemente al unirse con iones  $\text{Ca}^{2+}$  en la molécula de esta enzima, aumentando así la susceptibilidad de su autólisis. El AF también inhibe la conversión de tripsinógeno en tripsina por un mecanismo similar de quelación del calcio; este ión se considera necesario para la hidrólisis del enlace peptídico que hace que el tripsinógeno se convierta en su forma activa, la tripsina (Szkudelski, 1997).

Se dice que un dato clave a tener en cuenta al momento de realizar un estudio para entender el efecto antinutricional que presenta el AF en relación a las proteínas enzimáticas, sería el conocer cuanto fitato está aun disponible tras el procesado; para que halla interactuado con ellas. De este modo, si se considera factores como la fuerte afinidad del AF hacia varios cationes, el tipo de interacciones que supone su asociación con proteínas presentes en la dieta, el efecto del procesado de los alimentos, y la degradación térmica de los ésteres inositol y el pH; habría que esperar que tras el procesado, quedara poco fitato libre que interaccionara con proteínas enzimáticas, y con ello afectara los sistema digestivos y llegara a causar una influencia significativa. (Deshpande y Damodaran, 1989).

Por otro lado hay que tener en cuenta que estudios anteriores han mostrado que en presencia de minerales como  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ , la inhibición *in vitro* de las enzimas podría ser mucho menor (Deshpande y Cheryan, 1984).

Existen también evidencias de que al analizar el complejo fitato-proteína, este es menos susceptible a la digestión proteolítica en comparación a la proteína que está sin quelar. Estos resultados son posibles, ya que las proteínas en las cuales alguna cadena lisil o arginil estén queladas por el fitato, no serían efectivamente hidrolizadas por la enzima tripsina; y en estas condiciones serían enzimas más efectivas como la quimotripsina que muestra gran afinidad por las cadenas hidrofóbicas (Deshpande y Damodaran, 1989).

Varios estudios han mostrado claramente que aunque la digestibilidad de la proteína, y por lo tanto la absorción de aminoácidos, es marginalmente mayor en dietas que presentan bajo contenido en fitato; las diferencias encontradas en estos estudios no son estadísticamente significativas (Thompson, 1988).

Dado que la interacción fitato-proteína y su efecto en la digestibilidad proteica se produce bajo una amplia gama de condiciones, y las condiciones simuladas *in vivo* como los resultados obtenidos *in vitro* son limitados; se dice que el estudio de los efectos adversos de los fitatos en la nutrición debería ser dirigido exclusivamente hacia el punto de vista de los efectos que provoca en la biodisponibilidad mineral (Deshpande y Damodaran, 1989).

**2.2.4.3 Efectos del AF en la digestión del almidón.** El AF producto del efecto que presenta frente a proteínas y cationes, provoca que el AF además presente un efecto adverso frente a la digestión del almidón; lo cual al AF, le suma otro papel más como agente antinutricional.

El efecto adverso que presenta el AF frente a la digestión del almidón, se produciría mediante la inhibición de la actividad  $\alpha$ -amilásica, ya que el AF tiene la capacidad de afectar a la  $\alpha$ -amilasa; enzima que tiene como función la capacidad de degradar el almidón.

El modo de actuar del AF frente a la actividad  $\alpha$ -amilásica, y por ello sobre la digestión del almidón, no sería de una naturaleza competitiva, sino que es producto de varios factores; los cuales serían:

- La capacidad que tiene el AF de poder unirse a la  $\alpha$ -amilasa.
- El poder que tiene el AF para quelar los iones Ca que son necesarios para la normal actividad de la  $\alpha$ -amilasa

(Deshpande y Cheryan, 1984).

Además, el AF no solo actuaría indirectamente sobre la digestión del almidón, al poder alterar la actividad  $\alpha$ -amilásica; sino que además el AF tiene la capacidad de poder actuar directamente sobre el almidón; siendo esto posible, ya que el AF también tiene la capacidad de unirse a las proteínas que se encuentran ligadas a este polisacárido (Yoon *et al.*, 1983).

**2.2.5 Efectos farmacológicos del AF en el organismo.** Paradójicamente, el AF, a bajas dosis, presenta también efectos positivos sobre la salud de los organismos y estos efectos positivos también han sido descritos bibliográficamente. Estos efectos positivos han sido observados al trabajar a bajas concentraciones de AF, presentándose variados beneficios (Martínez *et al.*, 2002), con lo que no deja ser importante nombrarlos.

- **Niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos.** Estudios en que se a adicionado AF en niveles de 0,2-9%, en la dieta de ratas, a demostrado que se reduce significativamente los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos (Jariwalla, 1999). Esto parece estar relacionado con la capacidad del AF de unirse al Zn disminuyendo los niveles séricos de Zn y la razón Zn/Cu, ya que altos valores en esta relación tienden a predisponer al hombre a enfermedades cardiovasculares por implicar hipercolesterolemia (Thompson, 1993).

Además, se cree que posiblemente este efecto está también relacionado con la reducción de los niveles plasmáticos de glucosa y la concentración de insulina (Slavin *et al.*, 1997), la cual conduce a una disminución del estímulo para la síntesis hepática de lípidos (Wolever, 1990).

- **Prevención de cálculos renales y tratamiento de la hipercalciuria.** Existen evidencias experimentales de que los IP2 e IP3 son efectivos en la prevención de cristales de hidroxapatita *in vitro*, que son los que actúan como núcleo en la formación de cálculos (Zhou y Erdman, 1995). Además estudios *in vivo* e *in vitro* y estudios clínicos, han mostrado claramente que el fitato juega un papel

importante como inhibidor de la cristalización de sales cálcicas en los fluidos biológicos, siendo considerado una alternativa clara en el tratamiento de la litiasis renal (Grases y Costa-Bauza, 1999).

- **Tratamiento de la calcinosis del cutis.** Estudios realizados en ratas, han demostrado que el uso de IP6 adicionado en crema, es eficaz, como tratamiento para la calcinosis del cutis, una enfermedad caracterizada por la formación de depósitos anormales de fosfato de calcio en la piel y que es observado en diversos desórdenes. (Grases et al., 2005).

El beneficio que presenta el IP6 frente a esta enfermedad, sería producto de la capacidad que presenta el IP6, como un inhibidor de la cristalización de sales de Ca (Grases et al., 2005).

- **Efecto Anticancerígeno.** Estudios realizados en animales y en el hombre han mostrado que la inclusión en la dieta del salvado de trigo supone un papel protector frente a diversos tipos de cáncer, especialmente de colon y mama, sin embargo en un principio no estaba claro si este efecto era debido exclusivamente a la fibra o a otros componentes como el AF que estaban presentes en el salvado de trigo (Ferguson y Harris, 1999).

En este sentido, estudios han observado que el AF presente en el salvado de trigo, así como el AF añadido a dietas con bajo contenido en fibra reduce la presencia de biomarcadores del riesgo de cáncer (Jenab y Thompson, 1998).

Estudios realizados en ratas, las que fueron alimentadas con AF muestran una relación negativa significativa entre los niveles de AF (0,6-2,0%) y la proliferación de células epiteliales del colon ascendente y descendente (Nielsen *et al.*, 1987).

El AF disminuye el riesgo de cáncer a través de varios mecanismos; siendo los siguientes:

- La unión del AF al Fe, la cual disminuye la formación de radicales libres durante la oxidación de los lípidos, ya que ésta es catalizada por dicho ión.
- La unión del AF al Zn, debido a que el Zn es necesario para la síntesis de ADN, reduce indirectamente la proliferación celular.
- La capacidad de retardar la digestión del almidón, con lo cual éste puede llegar al colon y ser fermentado por las bacterias produciéndose ácidos grasos de cadena corta, cuya actividad protectora frente al cáncer es conocida.

(Thompson, 1993).

Otros estudios que han revisado el papel del AF sobre el cáncer, han llegado a la conclusión de que su papel no es sólo preventivo, sino que el AF también se presentaría como un agente terapéutico (Martínez *et al.*, 2002).

Pruebas del papel terapéutico del AF obtenidas en investigaciones en animales; realizadas para estudiar la supresión de cáncer del colon producto de una dieta de AF (Graf y Eaton, 1993); indican que esto sería posible ya que:

- Los IP6 tienen la capacidad de incrementar la diferenciación de células malignas (Shamsuddin y Vucenik, 1999).
- El AF produciría la inhibición de la generación de radicales hydroxyl intracolón, vía la quelación del Fe reactivo por el AF; Lo explicaría la supresión del cáncer de colon y otras enfermedades inflamatorias del intestino producto de las dietas ricas en AF (Graf y Eaton, 1993).

No obstante, el efecto del AF no es igual en todos los órganos: aunque se ha encontrado una reducción en la incidencia de nódulos hiperplásicos en el hígado, de carcinoma hepatocelular y de cáncer de mama (Thompson, 1993; Shamsuddin *et al.*, 1996); en otros órganos han mostrado tener un efecto nulo en la incidencia de cáncer (Horose *et al.*, 1991).

- **Efectos dietéticos.** El AF presentaría Efectos dietéticos a nivel del metabolismo de la glucosa, al tener la capacidad de disminuir la velocidad de la digestión del almidón a través de los mismos mecanismos por los que ejerce su acción antinutriente y que fue explicado anteriormente; modificando así su grado de gelatinización o su accesibilidad para las enzimas digestivas que actúan sobre el almidón, y con ello su facilidad para ser digerido. (Thompson, 1993).

### 2.3 FITASAS

Las fitasas “phytase” son enzimas que pertenecen a una subfamilia de las fosfatasas. Las fosfatasas son un conjunto diferenciado de enzimas que se clasifican en fosfatasas alcalinas, fosfatasas ácidas de alto y bajo peso molecular y fosfatasas-proteína (Vincent *et al.*, 1992). Estas enzimas difieren en sus pH óptimos, requerimientos de iones metálicos, especificidad por los substratos y, posiblemente por los mecanismos de reacción (Brenes *et al.*, 2002).

Entre las fosfatasas, las fosfatasas ácidas (EC 3.1.3.2) son un grupo heterogéneo de proteínas que hidroliza uniones fosfoester, teniendo un pH óptimo a pH bajo. Se ha mostrado que un gran número de fosfatasas ácidas, de procariotas y eucariotas, comparten dos regiones de similitud de la sucesión, cada uno centrado alrededor de un conservado residuo de histidina (Van Etten *et al.*, 1991).

Las dos histidinas que están presentes en el residuo de histidina, parecen estar involucradas en el mecanismo de la catálisis enzimática, localizándose y actuando de la siguiente forma:

- La primera histidina se localiza en la sección N-terminal y forma un intermedio del fosfohistidina.
- La segunda histidina se localiza en la sección C-terminal y posiblemente actué como donador de protones.

(Ostanin, *et al.*, 1992).

Las enzimas que pertenecen a esta familia se denominan fosfatasas ácidas histidina “*histidine acid phosphatases*”, y en ella encontramos incluidas a las enzimas denominadas fitasas.

Familia “fosfatasas ácidas histidina” ejemplos:

- Escherichia coli fosfatasa ácida pH 2.5 (gene appA).
- Escherichia coli glucosa-1-fosfatasa (EC 3.1.3.10) (gene agp).
- Aspergillus fitasas A y B (EC 3.1.3.8) (gene phyA and phyB).
- Fosfatasa ácida lisosomal de mamífero.
- Fosfatasa ácida prostática de mamífero.
- Caenorhabditis elegans hipotética proteínas B0361.7, C05C10.1, C05C10.4 and F26C11.1.

Esta familia presenta una secuencia de consenso:

**[LIVM]-X-X-[LIVMA]-X-X-[LIVM]-X-R-H-[GN]-X-R-X-[PAS]**

(Van Etten *et al.*, 1991).

Más específicamente, las fitasas (mioinositol hexafosfato fosfohidrolasas, EC 3.1.3.8 y 3.1.3.26), están catalogadas como enzimas que pertenecen a una “subfamilia de las fosfatasas ácidas histidina de alto peso molecular” (Ostanin *et al.*, 1992). Estas enzimas actuarían mediante el mecanismos de reacción que abarcan dos fases en las que es obligatoria la presencia de un aducto covalente (unión covalente) de fosfohistidina (Ostanin *et al.*, 1992).

El mecanismo de reacción de las fitasas, requiere de un intermediador de fosfohistidina en la reacción de transferencia del grupo fosforil, siendo los pasos del mecanismo catalizador, los siguientes:

- Un ataque nucleofílico de un grupo fosfato que sufre la escisión, por un residuo conservado de histidina, y una protonación del grupo saliente por otro grupo presente en la enzima, produciendo un intermediario covalente de **fosfo-enzima** y una **molécula del alcohol**.
- El complejo intermediario fosfo-enzima, que es inestable, es hidrolizado produciendo la liberación de un **fosfato inorgánico (Pi)**. (Van Etten, 1982).



(Vincent *et al.*, 1992).

El centro activo de histidina, que esta involucrado en el mecanismo de reacción, se encuentra en una secuencia altamente conservada en fitasas:

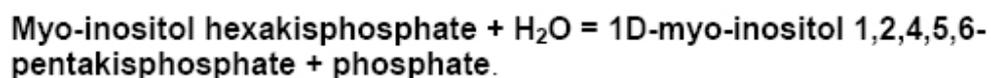
**RHGXRXP (Arg – His – Gly – X – Arg – X – Pro)**

Se piensa que la **His 59** presente en la secuencia de la fitasa es la responsable del ataque nucleofílico sobre el P fítico, actuando una **His338** o **Asp339** como donador del protón para el alcohol saliente; el centro activo también presenta un grupo de residuos cargados (**Arg 58, Arg 62, Arg 142**), conformando un ambiente favorable para el enlace del fitato que es cargado muy negativamente.

Una excepción que se conoce, referente a la secuencia altamente conservada que presentan entre este tipo de enzimas, es la existencia de una fitasa extracelular proveniente de *Bacillus subtilis*, que producto de las características que presenta, al parecer no pertenecería a la familia de las “fosfatasas ácidas histidina”, como es el caso de las demás fitasas (Kerovuo *et al.*, 1998).

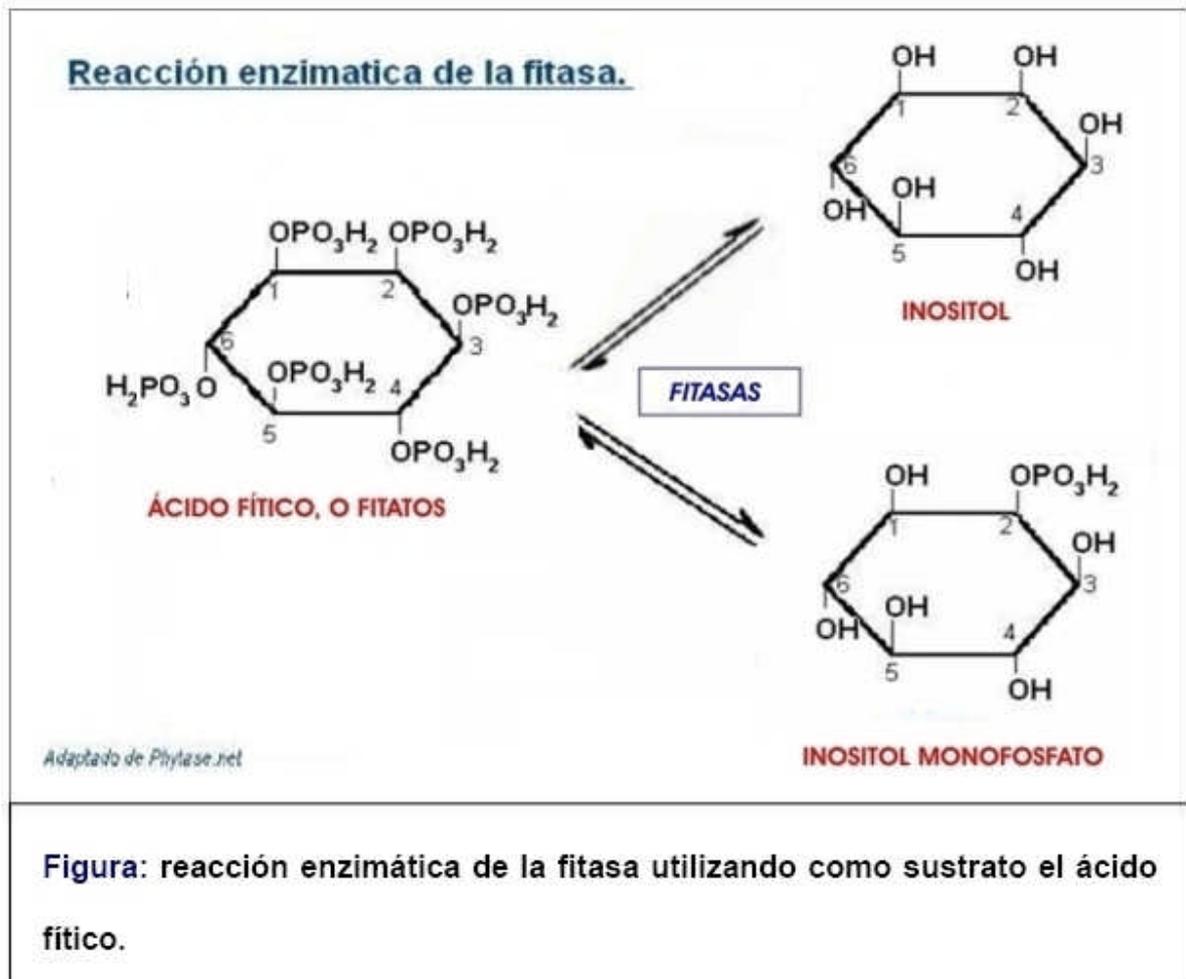
Las fitasas, son enzimas que catalizan la hidrólisis de las uniones **fosfomonoester** del fitato (sales de myo-inositol hexakisfosfato) o del myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis dihidrógeno fosfato (AF), produciendo fosfatos del myo-inositol de estequiometría variable y fosfato inorgánico (Pi) (Ullah, 1988; Ullah, y Phillippy, 1994). Es decir, son capaces de catalizar la hidrólisis de los fosfatos monoesterificados del AF (IP6), dando lugar de forma progresiva a la formación de inositol-5 fosfato (IP5), inositol-4 fosfato (IP4), inositol-3 fosfato (IP3), inositol-2 fosfato (IP2) e inositol-1 fosfato (IP1) (*myo*-inositol fosfatos, *myo*-inositol, y Pi) (Frossard *et al.*, 2000).

Reacción:



(Jongbloed *et al.*, 1992). (Fig.3).

Figura 3.



Las fitasa reciben su nombre según la posición específica en donde comienza la hidrólisis en el grupo éster fosfato en la molécula del fitato. La mayoría de las fitasa conocidas pertenecen a las 3-fitasa (EC 3.1.3.8) o 6-fitasa (EC 3.1.3.26) (Lassen *et al.*, 2001); aunque igualmente se han mencionados excepciones como es una fitasa alcalina del polen de la azucena, la cual inicialmente hidroliza el grupo 5-fosfato (Barrientos *et al.*, 1994). Caracterizándose generalmente las fitasa fúngicas y bacterianas por liberar cinco de los seis fosfatos (Wyss *et al.*, 1999a)

Hasta hace un tiempo, generalmente se consideraba que las 3-fitasa tales como las fitasa del *A. niger* eran solo de origen microbiano (Irving y Cosgrove, 1972); mientras que las 6-fitasa tales como la fitasa de salvado de trigo (Thomlinson y Ballou, 1962), se creía que estarían restringidas principalmente al reino vegetal (Lassen *et al.*, 2001). Sin embargo, hoy en día se conocen excepciones en las 6-fitasa, que no pertenecen a vegetales, tales como las 6-fitasa del *Paramecium* (Van der Kaay y Van Haastert, 1995), *E. coli* (Greiner *et al.*, 1993), y hongos Basidiomyceto como *Peniophora lycii*, (Lassen *et al.*, 2001).

Además, la distinción que se hace entre las 3-fitasa y las 6-fitasa, no es literalmente estricta, ya que las fitasa no muestran siempre un corte claro específico para su tipo correspondiente (Lassen *et al.*, 2001). Ejemplo de ello son la fitasa de *E. coli* que se ha demostrado no ser estrictamente 6-específico, ya que también puede comenzar la hidrólisis del fitato en el 3-fosfato, y viceversa para la 3-fitasa del *A. niger*. Un ejemplo notable de una enzima que despliega tal conducta del tipo-mixto es la fitasa del *A. pediades* (Lassen *et al.*, 2001).

Además la clasificación y los experimentos de espectroscopia de Resonancia magnética nuclear referentes a las 3 y 6-fitasa no han sido dirigidos a todos los aspectos del estereoisomerismo ni a hacer distinción entre los enantiómeros; por lo cual, el grupo de 3-fitasa puede comprender enzimas con preferencia para las posiciones D-3 (= L-1) o L-3 (= D-1), y las 6-fitasa puede comprender aquéllos con preferencia para las posiciones D-6 (= L-4) o L-6 (= D-4) (Lassen *et al.*, 2001).

Las fitasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, hallándose en variedades de microorganismos, plantas y animales (Pointillart, 1994a). Además se encuentran fitasas de tipo endógeno en el tracto gastrointestinal de varios animales, incluidos animales tales como, los cerdos (Pointillart, 1994a; Yi y Kornegay, 1996), aves (Maenz y Classen, 1998) y otras especies monogástricas (Pointillart, 1994b), pero con una muy escasa actividad fitásica. Se ha sugerido incluso, que esta actividad "fitásica" de la mucosa del intestino delgado puede ser simplemente una manifestación de la actividad de la fosfatasa alcalina (Pointillart, 1994b).

Estudios en cerdos, muestran que su actividad fitásica intestinal es despreciable cuando es comparada con la de la fosfatasa alcalina, incluso cuando la ingesta de fósforo es muy baja y lo hace en forma de fitato; referente a esto, se ha concluido que las fitasas y fosfatasas intestinales no son efectivas en la hidrólisis de los fitatos en dietas porcinas equilibradas (Pointillart, 1994b). Ambas actividades -fitásica y fosfatásica alcalina- están influenciadas por la composición de la dieta, en la que su actividad se ve disminuida por niveles altos de Ca y Mg, y aumentada por altos niveles de vitamina D3 (Brenes *et al.*, 2002).

**2.3.1 Fitasas de origen vegetal.** Las fitasas de origen vegetal, IUBMB Enzyme Nomenclature EC 3.1.3.26 (IUPAC-IUB, 1984) de Nombre sistemático: ***myo*-inositol-hexakisfosfato 6-fosfohidrolasa**, y de nombre común: **6-fitasa** (otro nombre usado es: fitasa 6- fosfatasa). Este tipo de fitasas se conocen desde hace mucho tiempo, siendo descubierta la primera fitasa de origen vegetal en el trigo (Peers, 1953), y posteriormente descubierta en gran cantidad de cereales y leguminosas.

La fitasa de origen vegetal pertenecen 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*-*myo*-inositol 1, 2, 3, 4, 5 *pentakis* fosfato, 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 en su mayoría entre 5,0 y 5,6. La mayoría de las fitasas presentes en las semillas, se encuadra dentro de la familia de las fosfatasas ácidas no específicas; teniendo un pH óptimo entre 4,0 y 5,6. Por el contrario, la actividad fitasa adicional, que se localiza a nivel subcelular en el cuerpo de proteínas en aleuronas de cereales y que está asociada a las membranas de los orgánulos corpusculares de almacenamiento de fitina, se produce a pH alcalino (Scott, 1991). En medios muy ácidos o alcalinos, las fitasas vegetales se inactivan de forma irreversible.

La temperatura óptima de estas fitasas se encuentra entre 45 a 60°C, siendo inactivadas por el calor a partir de 70°C (Pointillart, 1994a; Wodzinski y Ullah, 1996).

La actividad fitásica de estas enzimas se ha demostrado que varía considerablemente entre los diferentes granos según la especie vegetal que se considere en la comparación; e igualmente se ha demostrado que varía dentro de las distintas partes del grano correspondiente a una misma especie. (Pointillart, 1994a; Eeckhout y De Paepe, 1994; Viveros *et al.*, 2000).

Las fitasas de origen vegetal se encuentran preferentemente localizadas en las envolturas del grano, aunque también se hallan presentes en el endospermo; aunque también dependiendo la actividad fitasa intrínseca del tipo de alimento vegetal que se considere (Schroder *et al.*, 1996). Por esta razón, al analizar los subproductos provenientes de molinería -salvados-, éstos exhiben altos niveles de actividad fitásica correspondientes a las fitasas vegetales (Pointillart, 1994a).

Aunque en algunos estudios no han encontrado que exista una correlación entre el contenido de P total o P fítico, y la actividad fitásica presente (Eeckhout y De Paepe (1994); sin embargo, otros estudios si han mostrado la existencia de cierta relación (Viveros *et al.*, 2000); siendo en el caso de los cereales y sus subproductos positiva y en el caso de las leguminosas y oleaginosas, negativa. Así estos resultados indican que la actividad fitásica es importante en el centeno, triticale, trigo y sus subproductos, y reducida o muy reducida en el resto de los cereales y granos de leguminosas y oleaginosas (Brenes *et al.*, 2002).

Se ha comprobado que la actividad fitásica, independientemente de su nivel en las semillas sin germinar, aumenta extraordinariamente durante su germinación al mismo tiempo que se produce un descenso en el nivel del AF presente en las semillas (Brenes

*et al.*, 2002). En este sentido, algunos estudios dicen que la actividad fitásica presente en las semillas, sería tanto actividad fitasa constitutiva, así como enzimas fitasa que son sintetizadas "*de novo*" durante la germinación (Nayini, 1986). Mientras que otros estudios no aseguran si este incremento en la actividad fitásica durante la germinación de la semilla sea el resultado de la activación de la fitasa preexistente o de una síntesis "*de novo*" de fitasa (Gibson y Ullah, 1990). En otros estudios han observado un aumento del 200% y entre 800-3000% en la actividad fitásica del maíz y varias variedades de guisantes después de varios días de germinación (Chen y Pan, 1977). Más recientemente, se ha encontrado que paralelamente a un incremento de las actividades fitásica y fosfatasa ácida en el centeno (112 y 213%) y la cebada (212 y 634%), también se detecta un descenso del P fítico (84 y 58%, respectivamente) (Centeno *et al.*, 2001).

Al comparar las fitasas vegetales con fitasas provenientes de otro origen, las fitasas vegetales suelen ser menos efectivas que las de origen fúngica; cuando es utilizada para su uso exógeno. Estudios han hallado un 10% menos de eficacia (Eeckhout y De Paepe 1992), mientras en otro estudio señalaron una eficacia aún menor (x 2,5) (Schindler *et al.*, 1997). 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. No obstante, se ha observado un efecto aditivo entre ambas fitasas, y una óptima incorporación de ingredientes vegetales con alta actividad fitásica puede incluso eliminar completamente la suplementación de fosfatos inorgánicos en el caso de la dieta en el cerdo (Pointillart, 1994a).

**2.3.2 Fitasas microbianas.** Las fitasas microbianas están divididas en fitasas bacterianas y en 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).

**2.3.2.1 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* (Wang *et al.*, 2004), y *Escherichia coli*. (Nagashima *et al.*, 1999); pero este tipo de fitasa presentan varios inconvenientes:

- Sólo la fitasa producida por el *B. subtilis* es de carácter extracelular.
- Las fitasas bacterianas presentan bajo rendimiento productivo.
- Su pH neutro-alcalino que necesitan hacen prácticamente inútil su empleo como aditivos para piensos

(Wodzinski y Ullah, 1996).

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

**2.3.2.2 Fitasas fúngicas.** Las fitasas de origen fúngico, IUBMB Enzyme Nomenclature EC 3.1.3.8 (IUPAC-IUB, 1984) de nombre sistemático: **myo-inositol-hexakisfosfato 3-fosfohidrolasa**, y de nombre común: **3-fitasa** (Otros nombres usados son: 1-fitasa; fitasa; fitasa 1 fosfatasa; fitasa 3- fosfatasa), se conocen en una gran cantidad de especies de hongos y levaduras. Entre este tipo de fitasas, destacan las producidas por levaduras como *Schwanniomyces castellii* y *Saccharomyces cerevisiae* (Nagashima *et al.*, 1999) y las producidas hongos como *Aspergillus ficuum*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. fumigatus*, *Emericella nidulans*, *Myceliophthora thermophila*, y *Talaromyces thermophilus* (Wyss *et al.*, 1999b).

Para fines comerciales, las fitasas utilizadas, son producidas principalmente por hongos del género *Aspergillus*. Estos hongos (cuyas características y taxonomía es explicada más adelante) producen enzimas extracelulares del tipo 3-fitasa con capacidad hidrolítica del IP6 sobre el grupo ortofosfato situado en posición 3 de la molécula, dando lugar a *D-my*o-inositol 1, 2, 4, 5, 6-pentakifosfato 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); para ello la adición de una fosfatasa ácida (EC 3.1.3.2) permite acelerar y completar esta desfosforilización (Zyla, 1993).

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 (Pointillart, 1994a).

Cuando por razones de procesamiento de los alimentos, se sobrepasa la temperatura requerida para la actividad de estas fitasas, las empresas comerciales recomiendan su aplicación posterior una vez ya realizada la granulación o expansión del *pellet*; siendo la aplicación ideal en forma líquida (Brenes *et al.*, 2002).

De todos los organismos estudiados (plantas, bacterias y hongos), el *A. ficuum* NRRL 3135 (*Aspergillus niger* NRRL 3135) es el que produce la fitasa extracelular más activa (Wodzinski y Ullah, 1996).

La fitasa producida por el *Aspergillus ficuum* se caracteriza por ser una glicoproteína extracelular (Kostrewa *et al.*, 1997). A través de los resultados obtenidos por cromatografía de filtración de gel y electroforesis de poliacrilamida -SDS para el *Aspergillus ficuum* NRRL 3135, indicaron que el peso molecular aproximado de la proteína nativa es de 85-100 kDa, con base a un peso molecular de 85 kDa, el coeficiente de extinción molar de la enzima a 280 nm fue estimado en  $1,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Además se ha calculado que el punto isoeléctrico de esta enzima es de aproximadamente 4,5.

Referente a la inactivación de la enzima producto de la temperatura; se ha demostrado que la enzima purificada es notablemente estable a 0°C. Los estudios de inactivación térmica han mostrado que la enzima retuvo el 40% de su actividad después de ser expuesta a 68 °C durante 10 min, exhibiendo la enzima una temperatura óptima con la actividad catalítica máxima a 58°C. La Constante de Michaelis ( $K_m$ ) de la enzima para el fitato y el p-NFP es aproximadamente 40  $\mu\text{M}$  y 265  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Ullah y Gibson, 1987).

Van Gorcom *et al.*, (1995) indican que la fitasa que es producida por la cepa de *A. ficuum* NRRL 3135 y purificada por Ullah, (1988), contendría dos proteínas, una fitasa que tiene un peso molecular de 85 kDa y una fosfatasa ácida que tiene un peso molecular de 100 kDa.

Wodzinski y Ullah, (1996) han indicado que la cepa de *A. ficuum* NRRL 3135, produce dos fitasas -A y B- y una fosfatasa ácida de pH 6,0. La fitasa tipo A se caracteriza por un peso molecular de 85 kDa,  $K_m$  de 27, pH óptimos 5,0 y 2,5, y una temperatura óptima de 58°C. La fitasa de tipo B posee un peso molecular de 68 kDa,  $K_m$  de 103, pH óptimo de 2,5 y una temperatura óptima de 63°C.

Cuando Nagashima *et al.*, (1999) purificaron la fitasa de *A. ficuum* NRRL 3135, encontraron que la fitasa de *A. ficuum* NRRL 3135 presentaba una masa molecular de 85 kDa, coincidiendo con los resultados de otras investigaciones; y que además presentaba una  $K_m$  de  $184,2 \pm 12,5 \mu\text{M}$ .

El óptimo del pH de esta fitasa es de 5,0, 4,0, y 3,0 para el fitato, ATP, y polifosfato respectivamente, y libera más del 51% del Pi total disponible del fitato en un ensayo de 3 h a 58 °C, pero la  $K_{cat}$  cae un 15% de la proporción inicial (Ullah, 1988).

Estudios han demostrado que esta enzima presenta sensibilidad hacia los cationes. Así, cationes como el  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  son inhibitorios para esta enzima; mientras el  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$  no produjeron efecto en la razón catalítica de la enzima. Al contrario de lo anteriormente mencionado se ha observado que el  $\text{Mn}^{2+}$  refuerza la actividad de la enzima un 33% a 50  $\mu\text{M}$  (Ullah, 1988).

Estudios realizados con inhibidores conocidos para las fosfatasa s ácidas, tales como L (+)-tartrato, fosfomicina, y el fluoruro de sodio, no tienen efecto en la actividad de esta enzima (Ullah, 1988).

En esta fitasa hay 10 sitios potenciales de N - glicosilaci3n en la estructura primaria (Van Hartingsveldt *et al.*, 1993). La deglicosilaci3n enzimática de la fitasa, del *Aspergillus ficuum* usando endoglicosidasa H, bajaron el peso molecular de la enzima nativa de 85-100-kDa a aproximadamente 76-kDa; y la fitasa digerida todavía retiene algùn hidrato de carbono (Ullah y Gibson, 1987).

Cuando se ha expresado el gen *phyA*, de la fitasa del *Aspergillus ficuum*, en *Saccharomyces cerevisiae* y posterior deglicosilaci3n por Endo H<sub>f</sub>, la fitasa expresada mantiene un 91% de la actividad original y un 40% de su termostabilidad (Han, *et al.*, 1999). En el contraste, investigaciones indican que en la *Escherichia coli*, al no poseer la maquinaria celular necesaria, es incapaz de expresar la fitasa activa del gen *phyA*, con lo cual solo se produce una proteína no glicosilada, de inclusi3n intracelular de 56 kDa (Phillippy y Mullaney, 1997). Aparentemente, una falta de glicosilaci3n y/o secreci3n de la fitasa producida por la *E. coli* evita la expresi3n de la fitasa activa (Han, *et al.*, 1999).

Se conoce que el gen del *phyA* del *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 contiene un porcentaje G+C alto (68,3%); coincidiendo con ello, investigaciones han indicado, en el sentido de que ese porcentaje de G+C alto es una de las características de la gran expresi3n de genes en los hongos filamentosos (Wang *et al.*, 2004).

**2.3.3 Estructura de la fitasa de *Aspergillus ficuum*.** Al comparar la estructura primaria o secuencia del aminoácido de la fitasa de las variedades *A. ficuum* y *A. niger*, se ha encontrado que en sus secuencias hay 438 aminoácidos que se conservan; existiendo sólo 12 diferencias entre ambas secuencias (Fig.4). (Tomschy *et al.*, 2000).

Experimentos han demostrado que un cambio en la posición 27, tiene efectos profundos en la pH-actividad de la fitasa del *A. fumigatus* (Tomschy *et al.*, 2000).

La estructura cristalina a una resolución de 2,5 Å. muestra que la fitasa (Fig.5) es una fosfatasa ácida de alto peso molecular, y en su estructura presenta un dominio alpha/beta similar a la fosfatasa ácida de rata y un dominio alfa- con un nuevo pliegue (Kostrewa *et al.*, 1997).

Los aminoácidos de las posiciones 27 y 28 de la fitasa del *A. ficuum* NRRL 3135, forman en la fitasa una especie de gorra que cierra el lado de la parte de atrás del sitio activo (Tomschy *et al.*, 2000).

Análisis han demostrado que la parte N-terminal de la fitasa del *A. ficuum* NRRL 3135, y también probablemente de todas las fitasa de origen fúngico estaría localizada en la superficie de la molécula de fitasa; consistiendo en una secuencia de aproximadamente 50 aminoácidos; (Kostrewa *et al.*, 1997).

Se ha dicho que para el caso de la parte N-terminal de la fitasa proveniente del *A. fumigatus*, sus primeros 26 aminoácidos representan la secuencia señal necesaria para la secreción apropiada de la fitasa (Pasamontes, *et al.*, 1997).

Figura 4.

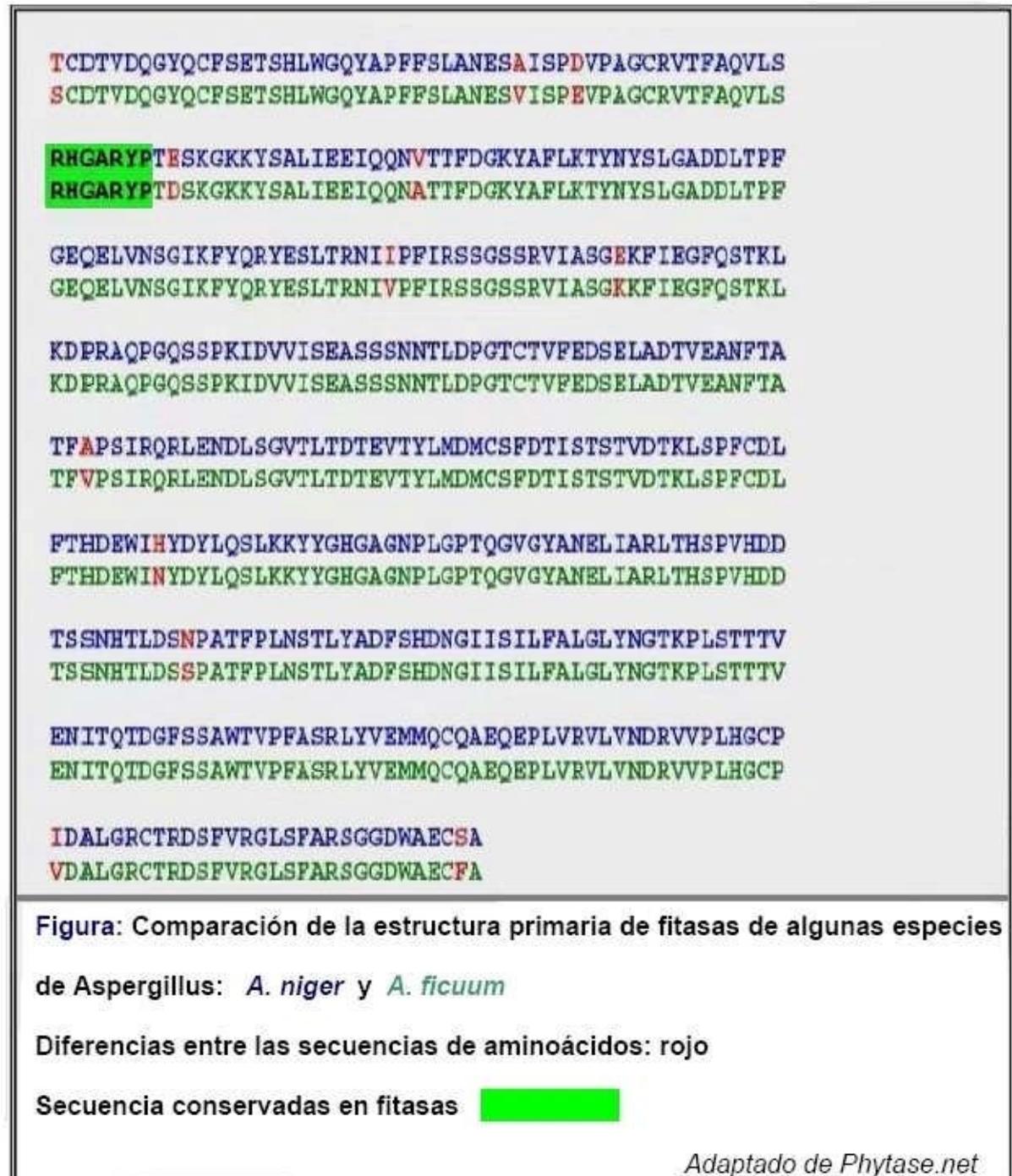
Estructura primaria de algunas fitasas de *Aspergillus*.

Figura 5.

**Estructura cristalina de la fitasa del hongo *Aspergillus ficuum***

Representación de la estructura cristalina de la fitasa del hongo *Aspergillus ficuum*:

Hebra beta en **amarillo**      Hebra alfa en **morado**

*Adaptado de Phytase.net*

**2.3.4 Factores que influyen en la eficacia de las fitasas.** Hay muchos factores que influyen en la eficacia de las fitasas, siendo los siguientes:

- **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). Se ha comprobado que un 40-50% de la actividad de las fitasas añadidas a la dieta de cerdos se detecta a nivel del estómago, mientras que en la parte superior del intestino delgado sólo se encuentra un 16-30% (Yi y Kornegay, 1996).

Investigaciones, muestran que existe algún tipo de relación entre la edad y el estado fisiológico de ciertos animales, en relación a la eficacia de las fitasas exógenas. En el caso de las aves parece existir una mayor eficacia en aves adultas ponedoras que en las aves para carne “broilers” (Van der Klis y Versteegh, 1996). En el caso del cerdo, se duda de la influencia que puedan ejercer la edad y el estado fisiológico sobre la eficacia de las fitasas exógenas (Kornegay, 1999). Así, algunas investigaciones indican que la efectividad de las fitasas microbianas si se ve afectada por el estado fisiológico (cerdas lactantes > cerdos crecimiento, cerdas al final de gestación > lechones > cerdas a mitad de

gestación), (Kemme *et al.* 1997). Mientras otras no han encontrado diferencias en cerdos en crecimiento ni en lechones (Harper *et al.*, 1997).

- **Calcio y relación Ca/P.** La respuesta a un nivel dado de fitasa exógena puede afectarse por la cantidad de calcio y/o la relación Ca/P, el nivel de P y el nivel de fitato de la dieta (Lei *et al.*, 1994). Una alta relación molar Ca/fitato, que se presente en la dieta, puede dar lugar a la formación de complejos Ca-fitatos muy insolubles en el medio intestinal. Se cree también que un exceso de Ca puede reducir la actividad enzimática al competir con las fitasas por su lugar preferente de acción (Kornegay, 1999). En estudios con cerdos, se obtiene una mayor respuesta a las fitasas -mejor utilización del P- cuando la relación Ca total/P total se mantiene entre 1:1 y 1,1:1 (Qian *et al.*, 1996). Niveles más altos de Ca reducen la absorción de P y la utilización de los fitatos (Jongbloed *et al.*, 1996).
  
- **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).

Se ha señalado que un aumento en el nivel de vitamina D de la dieta (6600 UI/kg) disminuye parcialmente el efecto negativo que un nivel normal de Ca ejerce sobre la actividad fitásica, pero no produce mejora cuando el nivel de Ca

es bajo (Lei *et al.*, 1994). Sin embargo, no observan ningún aumento en la utilización del P mediante la adición de 2000 UI de vitamina de D/kg a una dieta con o sin fitasas (Li *et al.*, 1998).

- **Ácidos orgánicos.** Los estudios realizados para determinar la eficacia que presentan los ácidos orgánicos para potenciar la acción de las fitasas exógenas, entregan resultados contradictorios sobre el papel que cumplen estos ácidos.

La inclusión de ácido láctico -3,0%- a la dieta de cerdos en crecimiento produce una mejora en la digestibilidad aparente ileal de la proteína, aminoácidos, Ca y Mg, pero no causa ningún efecto sinérgico con la fitasa sobre estos nutrientes cuando ambos aditivos se añaden conjuntamente (Kemme *et al.*, 1999). Sin embargo, este efecto sí se observa en la digestibilidad aparente del P total (Kemme *et al.*, 1999).

Eidelsburger (citado por Best y Gill, 1998) ha logrado obtener un efecto sinérgico sobre el crecimiento, el índice de conversión y la digestibilidad del P por medio de la adición conjunta de fitasa y ácido fórmico a dietas de cerdos en crecimiento. Este efecto sinérgico entre estos ácidos orgánicos y las fitasas microbianas podría deberse tanto a una reducción en la velocidad del vaciado gástrico, permitiendo así un mayor tiempo de actuación de la fitasa, como a un efecto directo en la reducción del pH de la dieta sobre los minerales, aumentando su solubilidad (Kemme, 1998).

Los resultados obtenidos con el ácido cítrico no parecen ser tan concluyentes. Así, mientras algunos estudios hallan un efecto positivo del ácido cítrico -1,5%- cuando se añade a fitasas microbianas y endógenas -salvado de trigo- sobre la utilización del fósforo en lechones (Han *et al.*, 1998); sin embargo, otros análisis no observan ningún efecto sinérgico entre estos dos aditivos (Radcliffe *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998).

La inconsistencia de estos resultados puede deberse a diferencias en la composición de las dietas, y a variaciones en el pH del contenido gastrointestinal en respuesta a esta composición. El ácido cítrico en algunos casos puede haber hecho descender el pH por debajo del pH óptimo de la fitasa y, por lo tanto, haber disminuido su actividad (Yi y Kornegay, 1996); o puede haber alterado el tiempo de tránsito del quimo, facilitando una mayor estancia en estómago y una mayor acción degradadora de las proteasas endógenas sobre la fitasa (Radcliffe *et al.*, 1998).

Investigaciones recientes muestran que compuestos como EDTA, ácido cítrico y ácido ftálico, con capacidad quelante, son eficaces para disminuir la formación de complejos mineral-fitatos, y, por lo tanto, mejoran la eficacia de las fitasas microbianas en la hidrólisis del AF. El efecto beneficioso de estos quelantes sobre las fitasas sería óptimo cuando las dietas tuvieran altos niveles de fitatos, bajos niveles de fitasas y niveles relativamente altos de minerales multivalentes - Zn, Fe, Mn, Ca, Mg- (Maenz *et al.*, 1999).

- **Procesamiento del alimento.** Se conoce que la pérdida de la integridad estructural del grano puede modificar la actividad fitásica (Reddy *et al.*, 1982b). Este efecto se produce ya que la molienda del grano pone en contacto más estrecho sustrato y enzima, favoreciendo de esta forma su acción. También influye la alta presión a que se somete el pienso durante el proceso de granulación, el cual hace que su textura sea más fina, facilitando así aún más el acceso de las enzimas al sustrato y aumentando potencialmente su digestibilidad (Brenes *et al.*, 2002).

Otros estudios también han comprobado que la granulación mediante vapor del pienso mejoraba la utilización del fósforo en las aves; y que cuando las raciones contenían altos niveles de salvado de trigo, la granulación con vapor producía un descenso en la disponibilidad del P; debido a la destrucción de la actividad fitásica endógena (Summers *et al.*, 1968).

Se ha demostrado que para el caso de los cerdos existe una mejora en la absorción del P mediante la granulación con vapor de su dieta; observándose que, cuando la temperatura utilizada en la granulación alcanzaba aproximadamente 80 °C, se producía un fuerte descenso en la digestibilidad de este mineral (Jongbloed, 1987). Se postuló que posiblemente esto era debido a una destrucción de la actividad fitásica endógena de la dieta (Jongbloed y Kemme, 1990). Sin embargo, en investigaciones recientes, se encontró un 7% de reducción en el contenido de fitatos cuando la dieta fue granulada con vapor a

81°C, pero no se detectó ni destrucción de la actividad fitásica endógena, ni hidrólisis del AF (Skoglund *et al.*, 1997).

El suministro de pienso en forma líquida -sopa- causa una mejora en los parámetros productivos en el caso del cerdo. Se ha obtenido una mejora del crecimiento y del índice de conversión mediante el remojo del pienso a 18 °C durante 8 horas durante el día o 15 horas a lo largo de la noche (Kempe y Jongbloed 1993). Las enzimas naturales presentes en los cereales son activadas por la humedad (Reddy *et al.*, 1982b), produciendo una hidrólisis parcial de los fitatos y un aumento en la absorción del P. Se ha conseguido resultados similares con pienso en remojo -2 partes de agua y 1 parte de pienso durante 2 horas a 30 °C- observando una interacción altamente significativa entre el procedimiento de remojo y las fitasas (Liu *et al.*, 1997).

Se ha observado que mediante el remojo del pienso en agua durante 9 horas a temperatura ambiente, se logra una reducción del nivel de fitatos del 45% -frente a un 7% mediante la granulación-; también se logra un aumento triple de la cantidad de P libre y un incremento de la absorción aparente ileal de este mineral (Skoglund *et al.*, 1997). Cuando el remojo del pienso se hace con suero líquido a 40°C durante 3 h, se produce una mejora -3,0%- de la absorción aparente del P en cerdos en cebo, siendo esta mejora del 9% cuando se adiciona fitasa al pienso (Näsi *et al.*, 1995).

**2.3.5 Efecto de las fitasas sobre la disponibilidad de los nutrientes.** El papel que cumplen las fitasas sobre la disponibilidad de los nutrientes es muy variado, siendo los siguientes:

- **Efecto en la disponibilidad de Fósforo.** En esta última década, son numerosas las pruebas experimentales que se han realizado con fitasas microbianas y vegetales para establecer su eficacia en la mejora de la disponibilidad del P y otros nutrientes presentes en ingredientes vegetales con alto contenido en P fítico (Brenes *et al.*, 2002).

Se demostró que existe una respuesta no lineal de la fitasa añadida sobre la digestibilidad del P, en el caso de los cerdos (Kornegay *et al.*, 1996), siendo la magnitud de la respuesta por unidad de fitasa (U) mucho más acentuada con niveles bajos de esta enzima (Kornegay, 1999). Se ha determinado que la adición de 500 U de fitasa/Kg de pienso produce una reducción del 33,2% en la excreción de P, permitiendo disminuir el nivel de éste en la dieta en 0,1 unidades porcentuales (Brenes *et al.*, 2002).

Estudios muestran que existe una clara dosis-respuesta en la adición de fitasa hasta alcanzar un nivel de 1000 U de fitasa/kg de alimento, no hallándose que exista por encima de este nivel una ulterior mejora de la digestibilidad del P. La adición de 1000 U de fitasa/kg de pienso produce una mejora en la digestibilidad de este mineral de hasta 28 unidades porcentuales, lo que equivale aproximadamente a 1g de P digestible por kg de pienso. En el caso de las principales firmas que comercializan fitasas recomiendan 500 U de fitasa/Kg de

pienso con una equivalencia de 0,80 g de P digestible/kg de pienso (Natuphos, 1998; Bio-Feed Phytase, 2000).

- **Efecto en la disponibilidad de Calcio.** La acción hidrolítica de la fitasa sobre los fitatos en el estómago, no sólo aumenta la digestibilidad del P proveniente del AF, sino que indirectamente eleva la digestibilidad del Ca que está unido al AF. Se ha estimado que se produce una equivalencia de 0,73 g de Ca para 500 U de fitasa/kg de dieta (Kornegay *et al.*, 1996); mientras que otros estudios señalan que se producen valores de 0,4 a 0,7 g de Ca. (Jongbloed *et al.*, 1996). El valor recomendado por BASF es de 1,0 g de Ca/kg (Natuphos, 1998).
  
- **Efecto en la disponibilidad de Minerales traza.** Investigaciones realizadas sobre este tema han demostrado que la adición de 1350 U de fitasa/kg a una dieta a base de maíz-soya baja en P (0,3%) y Zn (30 mg/kg), mejora la biodisponibilidad del P y Zn al reestablecer los valores normales de crecimiento y los de Zn y fosfatasa alcalina en plasma (Lei *et al.*, 1993). Se ha obtenido una elevación significativa en la absorción de Mg y Zn, para el caso de los lechones, mediante la suplementación a la dieta de 500 ó 1000 U de fitasa/kg (Pallauf *et al.*, 1992).

Se señala que en el caso de los lechones, existe una mejora del crecimiento y de la retención de los minerales traza Zn, Cu, P y Ca, cuando se suplementan la dieta con 1500 U de fitasa/kg (Adeola *et al.*, 1995). También se sabe que la adición de 1200 U de fitasa/kg produce una hidrólisis del Fe ligado al fitato en

una dieta a base de maíz-soya, mejorando su biodisponibilidad en lechones (Stahl *et al.*, 1998). Hasta ahora, no se han logrado establecer valores de equivalencia de los minerales traza con respecto al nivel de fitasa en la dieta (Brenes *et al.*, 2002).

- **Efecto en la disponibilidad de Proteína y aminoácidos:** La literatura existente sobre el efecto de las fitasas sobre la digestibilidad de la proteína y los aminoácidos es más bien escasa (Brenes *et al.*, 2002); estudiándose mayormente el efecto del AF de forma independientemente. Entre los estudios realizados para conocer el efecto de la fitasa en relación a este tema, se ha demostrado que:

En pruebas experimentales "*in vitro*", se a observado que los fitatos quelan aminoácidos libres, especialmente lisina. En este sentido experimentos realizados mediante la incubación de lisina en HCl con salvado de arroz, los cuales se caracterizan por ser ricos en fitatos; muestra que un 20% de esta lisina queda ligada a éstos. La adición de fitasa al medio de incubación libera el 50% de esta lisina quelada (Rutherford *et al.*, 1997).

En pruebas experimentales realizadas "*in vivo*", se ha observado que la adición de fitasa en la dieta mejora la digestibilidad aparente de la proteína y los aminoácidos (Biehl y Bakker, 1996). Señalándose en este sentido, que el empleo de fitasa produce un promedio de mejora de 0,85 unidades porcentuales en relación a la digestibilidad aparente total de la proteína (Jongbloed *et al.*, 1996).

En este sentido, BASF ha hecho recomendaciones que aconseja la utilización de *Natuphos* en la formulación de raciones para cerdos (Natuphos, 1998).

Por último, se ha estimado que mediante una reducción conservativa de la proteína bruta de 1,0 unidad porcentual (7,1% de reducción) y un valor de excreción de nitrógeno (incluido el N urinario) del 40% del consumo de N, la excreción de éste se puede reducir 7,1% cuando se añade 500 U/kg de fitasa a la dieta de cerdos (Kornegay, 1999).

- **Efecto en la disponibilidad de grasa y ácidos grasos:** Se ha hallado que existe una reducción significativa en la digestibilidad prececal total de la grasa, y especialmente de los ácidos grasos insaturados, cuando se incluye fitasa en la dieta. Además, se ha demostrado que la adición de vitamina E a la dieta suplementada con fitasa mejora la digestibilidad de los ácidos grasos (Gebert *et al.*, 1998).

Otros estudios han sugerido que las fitasas tendría un papel indirecto en la oxidación de los ácidos grasos. Este efecto se produciría ya que la oxidación de los ácidos grasos, especialmente de los insaturados, se ve favorecida por los elementos traza minerales que son liberados por la acción de la fitasa (Gebert *et al.*, 1999). Por esta razón, se recomienda que además de agregar fitasa en la dieta, haya una suplementación extra de vitamina E (Brenes *et al.*, 2002).

**2.3.6 Obtención y métodos de análisis de enzimas fitasas.** Desde hace varios años que se ha estudiado y obtenido fitasa proveniente de hongos del genero *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 para este propósito, y los pasos a seguir, son los siguientes:

**2.3.6.1 Cultivo de *Aspergillus* productores de fitasas.** 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 los siguientes tipos de fermentación:

- **Fermentación sumergida (SmF).** En el que se realiza el cultivo mediante un equipo fermentador. Es el método convencional para la producción de la enzima fitasa (Bogar *et al.*, 2003).

En este tipo de fermentación, el resultado de los productos obtenidos, además de depender del tipo de microorganismo, composición y parámetros como T<sup>0</sup> y pH del medio usado para este propósito; al utilizar hongos filamentosos en la producción, influyen otros factores como son la viscosidad y agitación; esto es debido a que la morfología fungal es un parámetro que determina los niveles de producción de fitasa, especialmente en el caso de llevarse a cabo en una SmF (Papagianni *et al.*, 2001).

- **Fermentación en sustrato sólido (SSF).** 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).

En los dos 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, siendo un factor importante la morfología fungal presente en el inóculo (Papagianni *et al.*, 2001).

**2.3.6.2 Semipurificación y purificación de enzima fitasa.** La semipurificación y purificación necesaria para la obtención de fitasa se lleva a cabo mediante numerosas técnicas; el tipo de técnica que es usada va de acuerdo al nivel de producción y la cantidad de enzima a obtener y purificar. Las técnicas que se utilizan para este propósito son:

- **Centrifugación.** La centrifugación es un método comúnmente usado para remover células al trabajar con cultivos pequeños (Tomschy, *et al.*, 2000), o que son proveniente de una suspensión de una muestra o cultivo tratado proveniente de una SSF (Bogar *et al.*, 2003). La centrifugación tiene la ventaja de proveer un sobrenadante colectado adecuado para una posterior ultrafiltración (Tomschy, *et al.*, 2000), o para realizar una medición directa de la actividad fitásica (Bogar *et al.*, 2003). El rango de centrifugación usado para este propósito va generalmente desde 8300 a 10000 g.

- **Filtración.** El tipo de filtración utilizado para la obtención de fitasa depende de varios factores, como son:
- Tipo y composición del cultivo, ya que en este tipo de cultivo es importante que el medio sea adecuado para inducir la producción de fitasa. Además hay que tener en cuenta si la muestra a filtrar para la obtención de fitasa, proviene de una SmF o SSF (siendo en este último necesario que el cultivo obtenido deba ser tratado mediante dilución de la muestra sólida y agitación, para que de esta forma se pueda obtener un extracto crudo líquido (Bogar *et al.*, 2003)).
  - Densidad del cultivo, producto de la concentración del microorganismo presente, en especial cuando corresponden a hongos filamentosos como son los hongos del género *aspergillus*.

Como técnicas de filtración que se utilizan para la purificación de los cultivos, están los siguientes métodos:

- **Filtración grosera.** Este paso se realiza con algunas de estas técnicas:
  - **Tela de filtración:** Este tipo es utilizado como un primer paso cuando proviene de una SmF (Lassen *et al.*, 2001).
  - **Filtros de profundidad:** Con una matriz filamentosa (Lassen *et al.*, 2001).
  - **Papel filtro:** Como *filter paper* (no. 2; ADVANTEC, Tokyo, Japan). (Nagashima, *et al.*, 1999).

- **Ultrafiltración.** Se realiza para obtener una mayor purificación y concentración de los extractos de enzimas obtenidos en alguna de las etapas de semipurificación o purificación anteriormente mencionadas.

La ultrafiltración se realiza mediante variados métodos, dependiendo del objetivo y uso de la muestra a purificar. Para este propósito se ha usado los siguientes procedimientos:

- **Equipos de purificación:** Los cuales estén equipados con ultrafiltros: ejemplo como “*Sartcon mini system*” (Sartorius) equipado con un ultrafiltro de 10-kDa *cut-off*, que además desala el extracto crudo (Nagashima, *et al.*, 1999).

Por ello, en la presente tesis se desea hacer uso del equipo de ultrafiltración sistema de filtración *SPINTREX*<sup>TM</sup> equipado con una membranas de 0,45 $\mu$ , y que posee un modo de recirculación de la muestra, que permite una clarificación y purificación de células o los componentes presentes.

- **Membranas de ultrafiltración:** Utilizándose para este propósito, membranas como, polyethersulfone de 10-kDa *cut-off*, que fue seguida por una diafiltración con agua destilada (Lassen *et al.*, 2001); y UK-10 membrane molecular weight *cut off* de 10-kDa (ADVANTEC) (Nagashima, *et al.*, 1999).

- **Cromatografía:** Para un estudio más detallado y caracterización de las fitasas a los concentrados de enzimas obtenidos por métodos de filtración ultrafiltración y diafiltración, previa diálisis de las muestras o fracciones según el paso correspondiente (Nagashima, *et al.*, 1999). Para este propósito se ha usado:
- **Cromatografía de intercambio iónico.** Es normalmente usada como primer paso para estudios mas detallados. Ejemplos: *Q-Sepharose FF anion-exchange column* (Amersham Pharmacia Biotech) (Lassen *et al.*, 2001); *Anion-exchange DIAION HPA-75 column* (Nagashima, *et al.*, 1999); *Sepharose Fast Flow column* (2.5 by 30 cm; Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) (Nagashima, *et al.*, 1999).
  - **Cromatografía de filtración en gel.** Es normalmente usada luego de una cromatografía de intercambio iónico. Ejemplos: *Sephacryl S-300 gel permeation chromatography column* (Pharmacia Biotech) (Wyss *et al.*, 1999b); *Toyo-Pearl HW-55F column* (2.0 by 60 cm.; Tosoh, Tokyo, Japan), columna de exclusión por tamaño molecular que presenta un tamaño de partícula de 30-60  $\mu\text{m}$  con un tamaño de poro de 500 Å de para proteínas globulares de 100 a 700000 Da.
  - **Cromatografías de interacción hidrofóbica (HIC).** Ha sido utilizada luego de una cromatografía de intercambio iónico por Lassen *et al.*, (2001), quien utilizó la columna *Phenyl Toyopearl 650S* (TosoHaas) (polímero con tamaño de partícula de 35  $\mu\text{m}$ ).

**2.3.7 Fitasas comerciales.** En la actualidad la mayoría de las fitasas comerciales disponibles, son obtenidas por fermentación de un *aspergillus* genéticamente modificado (*Natuphos*, *Novo phytase* y *Finase*), y una por extracción del medio de cultivo de un *aspergillus* no modificado genéticamente (*Alltech phytase*); encontrándose disponibles en polvo, gránulos o en forma líquida. (Brenes *et al.*, 2002).

La información genética usada para la obtención de las fitasas *Natuphos* y *Novo phytase* procede específicamente del *Aspergillus ficuum*, con posterior transferencia al *Aspergillus niger* o al *Aspergillus oryzae*, respectivamente (Brenes *et al.*, 2002).

Recientemente, se ha investigado para lograr conseguir fitasas más estables al calor que puedan soportar altas temperaturas durante la granulación (Kornegay, 1999). En este sentido, una nueva fitasa genéticamente modificada desarrollada Novo Nordisk y Roche (Ronozyme) ha aparecido en el mercado. Es un enzima, del tipo 6-fitasa, más estable al calor que resiste temperaturas de 90 °C durante 30 segundos. Esta fitasa procede del hongo *Peniophora lycii* y está producida por fermentación sumergida de *Aspergillus oryzae* genéticamente modificado (Khan, 2000).

La utilización de las fitasas en la industria de piensos, se ha visto favorecida por lo atractivo de sus precios (descenso de los costos de producción por la aplicación de nueva biotecnología), la mejora en la utilización de una variedad de nutrientes (minerales, aminoácidos, etc.), el aumento del rendimiento animal (carne) y la disminución del grado de polución ambiental (menor eliminación de efluentes) (Brenes *et al.*, 2002).

## 2.4 Género *Aspergillus*

**2.4.1 Usos de las especies del género *Aspergillus*.** Las especies del género *Aspergillus* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, pudiéndose aislar de una gran variedad de substratos (Abarca, 2000). Ello conlleva a que este género de hongo produzca una variedad de sustancias, las cuales el hombre ha aprovechado para su beneficio.

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

Entre los ejemplos del variado uso que el ser humano le ha dado al *A. niger*, se encuentran:

- Su papel destacado principalmente en su aplicación dada en la industria de alimentos, en donde se utiliza para la producción de muchas enzimas, tales como, el  $\alpha$ -amilasa, amiloglucosidasa, celulasas, lactasas, pectinasas, proteasas ácidas y fitasas (Ward, 1989).
- Su papel destacado en la industria de la producción de ácido cítrico mediante métodos de fermentación; el cual se lleva a cabo comercialmente mediante dos métodos; a través de procesos sumergidos y el cultivo en superficie (Ward, 1989).
- También hay interés en el uso de este hongo por cierto tipo de reacciones enzimáticas que estas especies realizan, y cuyos productos son muy difíciles de lograr en forma tradicional a través de medios estrictamente químicos. Ejemplo de ello, son la realización de adiciones específicas de esteroides y otros anillos complejos (Jong y Gantt, 1987).
- El *A. niger* además de los usos mediante la obtención de sus productos de fermentación anteriormente mencionados, tiene además algunos usos como organismo propio. Por ejemplo, debido a su facilidad de visualización y resistencia a varios agentes antifúngicos, el *A. niger* se usa para probar la eficacia de tratamientos preservantes (Jong y Gantt, 1987).

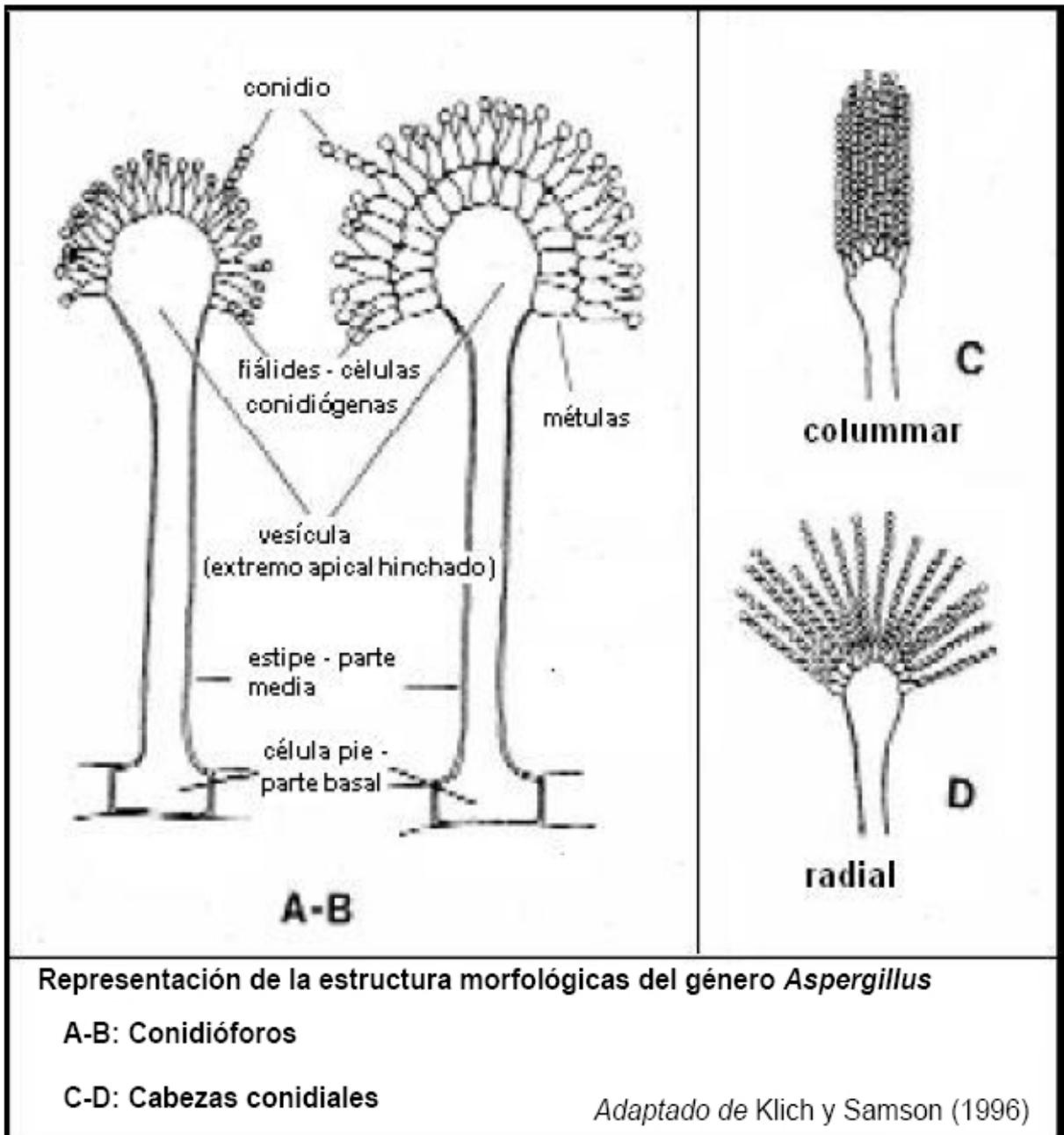
**2.4.2 La identificación y taxonomía del *Aspergillus*.** Al trabajar con hongos hay que saber diferenciarlos de otras especies que puedan crecer en el medio a utilizar en los cultivos, en el caso de la taxonomía de los *Aspergillus*, como es el caso de muchos hongos; ésta había sido principalmente basada en los rasgos morfológicos que presenta este género, en lugar de los rasgos fisiológicos, bioquímicos y las características genéticas con las cuales comúnmente se clasifican las bacterias (TSCA, 1997).

El género *Aspergillus* es un género mitospórico que se caracteriza por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas que originarán las esporas asexuales o conidios (Abarca, 2000). Sobre el conidióforo característico presente en los *Aspergillus*, aunque es una estructura unicelular posee tres partes bien diferenciadas:

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

En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas métulas (célula soporte). Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan uniseriadas, y las que presentan fiálides y métulas, biseriadas (Abarca, 2000) (ver Fig.6).

Figura 6

Estructura morfológica del género *Aspergillus*

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

La cepa de *Aspergillus niger* var. *Ficuum*, de nombre tradicional *Aspergillus ficuum*, que fue adquirida y utilizada en la realización de la presente tesis, esta cepa es denominada *A. ficuum* DSM 932; la cual también es conocida como *A. ficuum* MUCL 31164 o *A. ficuum* NRRL 3135, según la *DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany*. Así, en la presente tesis, el nombre usado para referirse a la cepa adquirida, es el de “*A. ficuum* DSM 932”, que es el nombre de denominación que recibió la cepa utilizada para ello.

Referente al nombre que recibe la cepa *A. ficuum* DSM 932, debido a su variación sufrida en su nomenclatura, al referirse a esta misma cepa, en varias publicaciones también es nombrada y conocida como *A. niger* NRRL 3135, siendo éste el nombre más común usado en la actualidad.

En relación a la utilización del *A. ficuum* en la industria de producción de fitasa, cabe destacar que la fitasa producida por la cepa *A. ficuum* DSM 932, fue una de las primeras fitasas usadas (Nelson *et al.*, 1968); lo que ha llevado a que esta fitasa, haya sido muy bien estudiada.

## 2.5 Hipótesis y objetivos

Producto de todo lo mencionado anteriormente, en función del papel del fósforo en los organismos, de las características y efectos que presenta el ácido fítico, su presencia en la alimentación de origen vegetal y el papel que tienen las enzimas fitasas referente a ello; indican la necesidad de contar con el conocimiento apropiado para la obtención de esta importante enzima, hoy en día.

Por este motivo, utilizando para ello los medios e implementos que tenemos disponibles; se considera la validación de la siguiente *hipótesis* de trabajo:

***“Si se cultiva la cepa DSM 932 del Hongo *Aspergillus ficuum* en un medio de cultivo rico en sustratos con componentes vegetales, los cuales incluyen AF, entonces será posible detectar liberación de la enzima fitasa y conocer la cinética de producción de la misma”.***

Para lograr verificar la validación de esta hipótesis en la elaboración de la presente tesis se proponen lograr los siguientes objetivos:

### **Objetivo general**

Producir la enzima fitasa a partir de una cepa de *Aspergillus ficuum*, DSM 932 en fermentaciones en sustrato sólido y líquido, con sustratos vegetales ricos en AF.

### **Objetivos específicos**

1. Estandarizar un método de determinación de actividad enzimática de fitasa, proveniente de la cepa de *Aspergillus ficuum* DSM 932.
2. Cultivar la cepa de *Aspergillus ficuum* DSM 932 en sustrato sólido de componentes vegetales.
3. Cultivar la cepa de *Aspergillus ficuum* DSM 932 en una suspensión de componentes vegetales.
4. Conocer la cinética de producción de la enzima fitasa de la cepa de *Aspergillus ficuum* DSM 932 que se cultivará indistintamente en sustratos sólido y líquido.
5. Desarrollar un protocolo basado en técnicas de semipurificación y concentración, para ser aplicado en la obtención de un extracto crudo de fitasa proveniente de un tipo de cultivo realizado con la cepa de *Aspergillus ficuum* DSM 932.

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales

**Reactivos químicos.** Los reactivos químicos usados en la elaboración de la presente tesis fueron los siguientes:

- Dihidrógeno fosfato de potasio,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (adquirido en MERCK)
- Sulfato de magnesio heptahidratado,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (adquirido en MERCK)
- Acetato de sodio anhidro,  $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$  (adquirido en CHEMIE S.A)
- Ácido acético glacial,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (adquirido en MERCK)
- Sulfato ferroso,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (adquirido en BDH CHEMICAL Ltd)
- Ácido fítico – sal dodecasódica,  $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_{24}\text{P}_6\text{Na}_{12}$  (adquirido en SIGMA)
- Sulfato de amonio,  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  (adquirido en MERCK)
- Ácido tricloroacético,  $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$  (adquirido en MERCK)
- Heptamolibdato de amonio,  $\text{H}_{24}\text{Mo}_7\text{N}_6\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (adquirido en MERCK)
- Ácido clorhídrico,  $\text{HCl}$  (adquirido en MERCK)
- Hidróxido de sodio,  $\text{NaOH}$  (adquirido en MERCK)
- Ácido sulfúrico,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (adquirido en MERCK)

**Microorganismo.** El microorganismo usado para la producción de la fitasa en todas las fermentaciones realizadas, fue un hongo del genero *Aspergillus*, de la especie *aspergillus ficuum*.

- Cepa *Aspergillus ficuum* DSM 932

**Medio de cultivos:**

- Medio Agar Papa Dextrosa (adquirido en MERCK)
- Medio natural de cereales, en solución (C2) y sólido (C1) compuesto en diferentes proporciones por:
  - Afrechillo (adquirido en COMERCIO LOCAL)
  - Chuchoca (adquirido en COMERCIO LOCAL)
  - Harina integral de trigo (adquirido en COMERCIO LOCAL)
  - Sulfato de amonio,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (adquirido en MERCK)

**Equipos e implementos:**

- Equipo de sistema de filtración SPINTREX™ con membranas de  $0,45 \mu$  (New Brunswick Scientific Co. Inc.)
- Membranas de ultrafiltración: polietersulfona 100 kD (MILLIPORE) y Diaflo 30 kD (AMICON)
- Tela de muselina (adquirido en el comercio local)
- Fermentador modular Gallenkamp (Modular Fermenter System FB2-200-W)
- Baño termorregulador (Mettler)
- Bomba de vacío para filtración (MILLIPORE)
- Equipo de ultrafiltración (MILLIPORE)
- Espectrofotómetro Spectronic Genesis 5
- Centrífuga Beckman J2-HS
- Agitador orbital termorregulado (Trilab)

### 3.2 Métodos

**3.2.1 Montaje y evaluación de un método de ensayo para medición de actividad enzimática de la fitasa.** Este método analítico de la actividad de la enzima fitasa considera el uso del reactivo de Taussky-Shorr; que permite detectar el fosfato inorgánico (Pi), a través de la medición de la absorbancia producida por el sulfato ferroso formado durante la reducción del ácido fosfomolibdico a partir del Pi en solución (Taussky y Shorr ,1953). Considerando lo anterior, se procedió a efectuar una serie de experimentos para montar y evaluar la adecuación del método descrito por Harland y Harland (1980). Los experimentos llevados a cabo fueron:

➤ Montaje del método:

1. Espectro de absorción, a partir de diferentes soluciones de Pi proveniente de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
2. Estabilidad en el tiempo, a partir del análisis de diferentes soluciones de Pi provenientes de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y de soluciones de ácido fítico (AF).
3. Curva de calibración, a partir de diferentes soluciones de Pi provenientes de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

➤ Evaluación del método. Se procedió a evaluar la confiabilidad del método mediante los siguientes análisis estadísticos:

1. Sensibilidad (que fue llevado junto al análisis de la curva de calibración).
2. Exactitud, a partir de diferentes soluciones de Pi proveniente de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
3. Precisión, a partir de diferentes soluciones de Pi proveniente de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y de soluciones de AF.

**3.2.2 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 (Cuadro 1) (Fig.7b), y utilizando el promedio de las pendientes para el análisis.

**Cuadro 1.**

<b><u>Preparación de Curva de calibración</u></b>					
<b>Nº TUBO</b>	<b>CONCENTRACIÓN Pi (<math>\mu\text{mol/mL}</math>)</b>	<b>VOLUMEN (mL) Pi 2 <math>\mu\text{mol/mL}</math></b>	<b>VOLUMEN (mL) H<sub>2</sub>O<sub>d</sub></b>	<b>VOLUMEN (mL) TCA 10%</b>	<b>VOLUMEN (mL) MgSO<sub>4</sub> 0,1M en buffer acetato 0,2M pH 5,15</b>
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

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 las concentraciones se calcularon tomando en consideración lo indicado en el Anexo 4.

Figura 7.

## Ensayo enzimático



**3.2.3 Medición de actividad de fitasa.** El análisis realizado corresponde a un ensayo de tiempo fijo, en el que se midió la cantidad de fosfato inorgánico (Pi), presente en la solución, y cuya detección se basó en el uso del reactivo de Taussky-Shorr (la preparación del reactivo se presenta en el Anexo 5).

Las muestras fueron preparadas de acuerdo a lo escrito en el Anexo 8. La reacción enzimática se realizó en tubos de ensayos por duplicado 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. (+)), ver Cuadro 2, A.
- En otro tubo de ensayo, se realiza la reacción enzimática en condiciones de reacción negativa (Rx. (-)), ver Cuadro 2, B.
- Para descartar la absorbancia proveniente de otras fuentes, además del blanco del ensayo, se analiza muestras correspondiente al “control negativo”, a las cuales también se les realiza las correspondiente reacciones enzimáticas en condiciones de Rx. (+) y Rx. (-). Correspondiendo las muestras de “control negativo”, según sea el caso a:
  - 1.- Muestras correspondientes sólo al medio usado.
  - 2.- El filtrado de unas de las muestras o cultivo, realizado con un filtro que asegura la retención de la enzima Fitasa analizada.

Cuadro 2

<b><u>Procedimiento de reacción enzimática en condiciones de:</u></b>
<b><u>A. Reacción positiva (Rx. (+)).</u></b>
<p>Agregar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1,0 mL MgSO<sub>4</sub> 0,1M en buffer acetato 0,2 M pH 5,15</li> <li>- 0,6 mL de Extracto con la Enzima (muestra)</li> <li>- 2,4 mL de solución de Ácido Fítico 6,82 mM en buffer acetato 0,2 M pH 5,15</li> </ul> <p>Incubar por 1 h a 55°C (Figura 7a)</p>
<p>Agregar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) AL 10% (para detener la reacción).</li> <li>- 1,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y refrigerar por 20 min. (Para disminuir la temperatura).</li> </ul> <p>Agregar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 2,4 mL del reactivo de Taussky-Shorr.</li> </ul> <p>Esperar 30 min. y medir abs. a 660 nm.</p>
<b><u>B. Reacción negativa (Rx. (-)).</u></b>
<p>Agregar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1,0 mL MgSO<sub>4</sub> 0,1M en buffer acetato 0,2 M pH 5,15</li> <li>- 0,6 mL de Extracto con la Enzima (muestra)</li> <li>- 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) AL 10% (Para detener la reacción).</li> <li>- 2,4 mL de solución de Ácido Fítico 6,82 mM en buffer acetato 0,2 M pH 5,15</li> </ul> <p>Esperar por 1 h a T° ambiente.</p>
<p>Agregar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y refrigerar por 20 min. (Para equiparar el volumen y la temperatura con los ensayos de Rx. (+)).</li> </ul> <p>Agregar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 2,4 mL del reactivo de Taussky-Shorr.</li> </ul> <p>Esperar 30 min. y medir abs. a 660 nm.</p>

El ensayo enzimático fue llevado a cabo tomando en consideración lo expresado en el Anexo 6.

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

$$\text{Abs. Pi liberado} = [ \text{abs. Rx. (+)} - \text{abs. Rx. (-)} ] - [ \text{abs. cn Rx. (+)} - \text{abs. cn Rx. (-)} ]$$

Correspondiendo:

abs.= absorbancia

cn = control negativo

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**

$$[\text{Pi}] = \frac{\text{Abs. liberado}}{\text{Pendiente de la curva de calibración}}$$

### Actividad de fitasa

La medición de actividad de fitasa, se calculó con la siguiente formula:

$$U \left[ \frac{\text{moles}}{\text{min}} \right] = \frac{[\text{Pi}] * N^{\circ} \text{ de dilución de la muestra} * \text{Vol. ensayo}}{\text{minutos del ensayo} * \text{Vol. enzima}}$$

$$U \left[ \frac{\text{moles}}{\text{min}} \right] = [\text{Pi}] * \text{factor}$$

Correspondiendo:

**U** = Unidad de actividad enzimática de la fitasa.

**[Pi]** = Concentración del Pi liberado [Pi] la cual corresponde a los  $\mu\text{moles}$  de Pi liberado en 1 h por una solución de enzima diluida.

**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).

**Dilución de la muestra** = calculado mediante lo indicado en el Anexo 8.

**3.2.4 Cultivo de *A. ficuum*, y obtención de fitasa.** Primero, se procedió al diseño de medios de cultivo naturales y para asegurar la producción de la enzima fue necesario diseñar un medio de cultivo que presentara en su composición compuestos vegetales que presentaran AF y un bajo costo económico; es así como se consideró básico la presencia de trigo, maíz y similares.

La proporción usada de cada ingrediente fue obtenida de acuerdo a las necesidades específicas requeridas para ser usada en cada fermentación, referente a solidez para el caso de la fermentación en sustrato sólido (SSF) y de viscosidad para la fermentación sumergida (SmF). Además se tomó en cuenta de que la consistencia del medio no se alterara demasiado luego de ser autoclavado.

Para el cultivo de la cepa de *Aspergillus ficuum* DSM 932 y posterior medición de actividad de la producción de fitasa se diseñó una serie de protocolos y se trabajó en base a ellos.

**3.2.4.1 Fermentación en sustrato sólido (SSF).** El cultivo en medio sólido (Anexo 2), se realizó usando como sustrato un medio natural de cereales (C1), el que inicialmente se usó de prueba para la estandarización del método. La segunda SSF fue realizada para la medición de “cinética de producción de la fitasa”, tomando muestras diarias a partir del 1<sup>er</sup> día durante 6 días.

Las dos SSF y posterior toma de muestras se procedieron mediante el siguiente protocolo.

**Protocolo:**

Paso 1: Cultivo de *Aspergillus ficuum* en un medio natural de cereales, sólido (C1).

(Para fermentación en sustrato sólido en placa de Petri de 11 cm de diámetro)

a) Preparación del medio C1:

45 g de chuchoca (harina de maíz).

21 g de afrechillo de trigo.

21 g de harina integral de trigo.

2,3 g de  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  (para 100 mL = 90 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  + 10 mL de inóculo APD)  
(0,017g/mL).

120 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ .

b) Mezclar bien y agregar equitativamente y de forma homogénea el contenido en 2 placas de 11 cm de diámetro, (2 placas para inocular - cultivo por duplicado - y 2 placas como control negativo), y autoclavar las placas con medio.

c) Inoculación: A partir de un inóculo APD (ver Anexo 7), con una jeringa estéril, agregar 10 mL a cada una de las 2 placas para inocular (inóculo al 10%).

d) Cultivar por 6 días a  $24 \pm 1$  °C para el análisis de "cinética de producción de la fitasa".

Paso 2: Toma y procesamiento de las muestras tomadas de un cultivo de *Aspergillus ficuum* en un medio C1, para una fermentación en sustrato sólido (SSF).

- a) Toma de muestra: en el análisis “cinética de producción de la fitasa”, se tomó una muestra diaria por 6 días, correspondiendo una muestra a una porción de 1/8 de la placa extraídas usando una espátula flameada. Las muestras se guardaron en frascos estériles (anteriormente pesados estando vacíos). Y luego guardadas en el refrigerador.

(Los frascos deben ser adecuados, para que permitan la posterior elusión de la muestra en ellos).

- b) Las muestras guardadas fueron pesadas, para realizar el cálculo de su volumen de elusión de muestras correspondiente a cada una de ellas. Posteriormente, todas las muestras del cultivo fueron guardadas refrigeradas, hasta su posterior elusión.
- c) Elusión de las muestras: para obtener el extracto crudo, se agregó por cada gramo de muestra, 5 mL de Tween 80 al 0,1% (estéril); y los frascos fueron dejaron en agitación orbital a 250 rpm por 1 h a t<sup>o</sup> ambiente.
- d) Procesamiento de las muestras de extracto crudo: para separar el extracto crudo de restos del medio y hongos, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm por 10 min.
- e) Posteriormente se guardo en el refrigerador, el sobrenadante de cada una de las muestras; esto a fin de tener todas las muestras juntas para su posterior análisis de actividad.

**3.2.4.2 Fermentación en cultivo sumergido (SmF).** La fermentación en medio líquido (Anexo 3), fue llevada a cabo en un fermentador usando como sustrato un medio natural de cereales, en solución (C2).

La SmF se realizó en dos oportunidades, primeramente como un cultivo para la medición de “cinética de producción de la fitasa” tomando muestras (por duplicado) a partir del 1<sup>er</sup> día por 6 días.

La segunda SmF fue realizada para la medición de “la producción de fitasa” luego de diversos pasos de semipurificación. Como control negativo se utilizaron muestras del medio (C2) sin inocular Las dos SmF que se realizaron, y la posterior toma de muestras para la medición de actividad; se procedieron mediante el siguiente protocolo:

**Protocolo:**

Paso 1: Cultivo de *Aspergillus ficuum* en un medio natural de cereales, en solución (C2).

(Para fermentación sumergida en un Medio de cultivo 800 mL)

a) Preparación del medio C2:

4 g de Chuchoca.

2 g de Afrechillo.

2 g de Harina integral de trigo.

13,6 g de  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  (Para 800 mL = 720 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ +80 mL de inóculo C2)  
(0,017gr/mL).

720 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ .

- b) Mezclar bien y vaciar en el recipiente del fermentador
- c) Autoclavar.
- d) Recolectar muestras correspondientes al control negativo (muestra correspondiente al medio sin inocular), por duplicado.
- e) Inoculación: A partir de un inóculo C2 (ver Anexo), agregar 80 mL de este inóculo, al medio del fermentador (inóculo al 10%).
- f) Cultivar en el fermentador bajo los siguientes parámetros:
  - 28 ± 1 °C ; pH 5,3 ± 2; Agitación de 200 rpm aprox.

El tiempo del cultivo es de acuerdo al tipo de análisis a realizar:

- 6 días para el primer análisis realizado “cinética de producción de la fitasa”.
- 4 días para el segundo análisis realizado “obtención de la producción de fitasa”.

Paso 2: Toma y procesamiento de las muestras obtenidas de un cultivo de *Aspergillus ficuum* en un medio C2, para una fermentación sumergida (SmF).

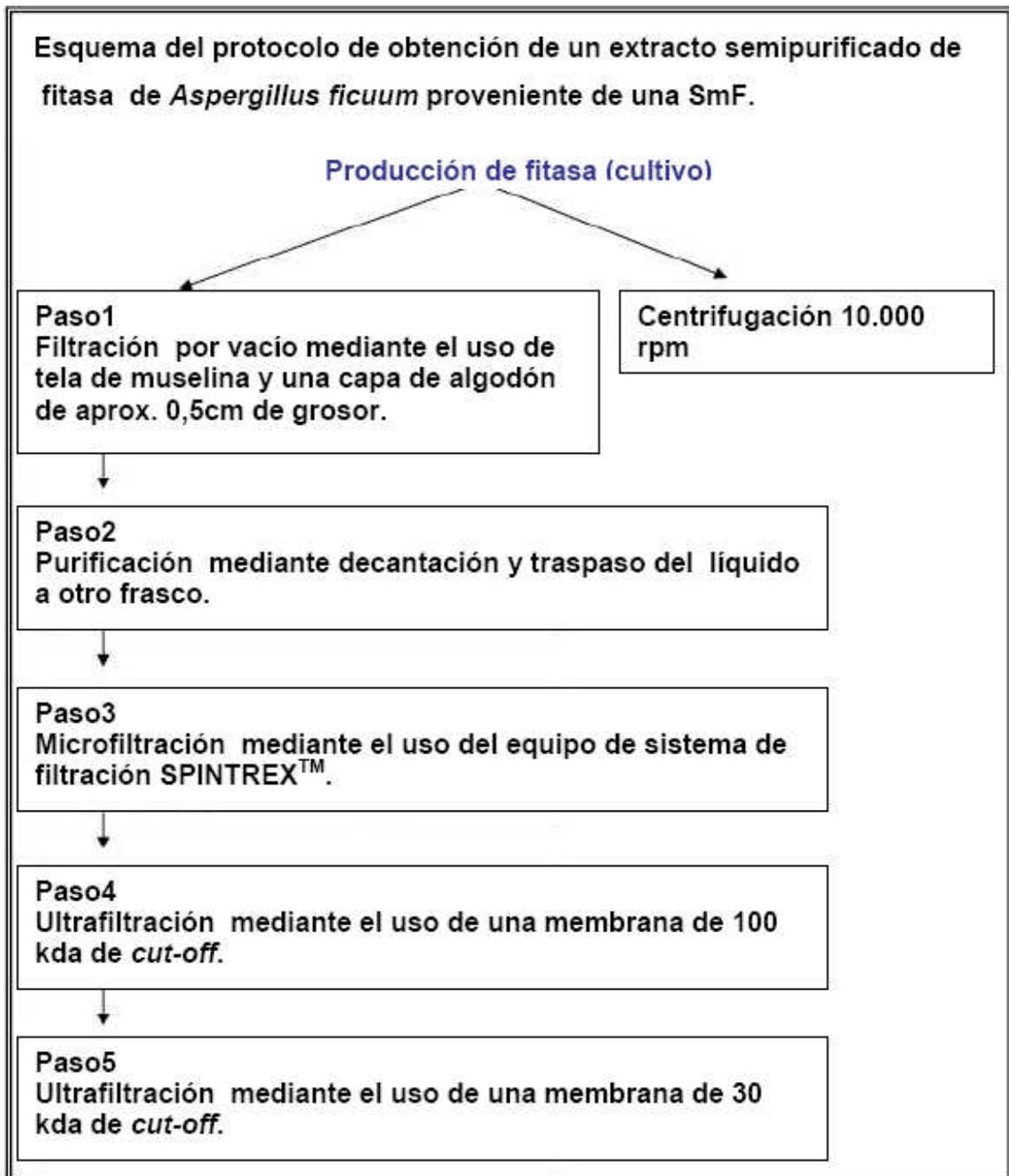
- a) Toma de muestra: la toma de muestra se realizó de acuerdo al tipo de análisis. En el primer análisis realizado “cinética de producción de la fitasa”, se tomó 2 muestras correspondientes al control negativo (muestra correspondiente al medio sin inocular) y luego de la inoculación al completar un día de cultivo, se procedió a tomar una muestra diaria (por duplicado) por 6 días; correspondiendo una muestra a un volumen de 10 mL recolectado utilizando una pipeta de 5 mL con las punta de los tips recortadas debido a la densidad del cultivo. Las muestras depositadas en frascos estériles fueron

refrigeradas, hasta el posterior análisis de todas al mismo tiempo. En el segundo análisis realizado “obtención de la producción de fitasa”, se acopió todo el contenido de 4 días de cultivo, día en el que se obtiene la actividad mayor según los resultados obtenidos en la cinética de producción de la fitasa. La muestra debe ser guardada en un frasco estéril para su posterior análisis en el ensayo enzimático.

- b) Procesamiento de las muestras de extracto crudo: Para separar el extracto crudo de restos del medio y micelio.
1. En caso de muestras pequeñas: centrifugar a 10.000 rpm. por 10 min y guardar el sobrenadante en el refrigerador para su posterior análisis.
  2. En caso de muestras más grandes: el extracto crudo obtenido, se procedió a purificar mediante procedimiento que se detalla a continuación.

**3.2.5 Obtención de un extracto semipurificado de fitasa de *A. ficuum* proveniente de una SmF.** A partir de un cultivo de *Aspergillus ficuum* realizado en un fermentador usando el medio natural de cereales en solución (C2), se procedió a semipurificar y concentrar un extracto enzimático a partir del caldo sin micelio (Fig.8 y 9). Las muestras analizadas fueron el sobrenadante de una muestra de la SmF centrifugada a 10000 rpm (Cultivo); y de los sobrenadantes del método de semipurificación y concentración obtenidos a partir de las etapas de: microfiltración mediante el uso Equipo de sistema de filtración SPINTREX™; ultrafiltración por una membrana para retención de partículas desde 100 kD (100 kDa de *cut-off*); y ultrafiltración por una membrana para retención de partículas desde 30 kD (30 kDa de *cut-off*).

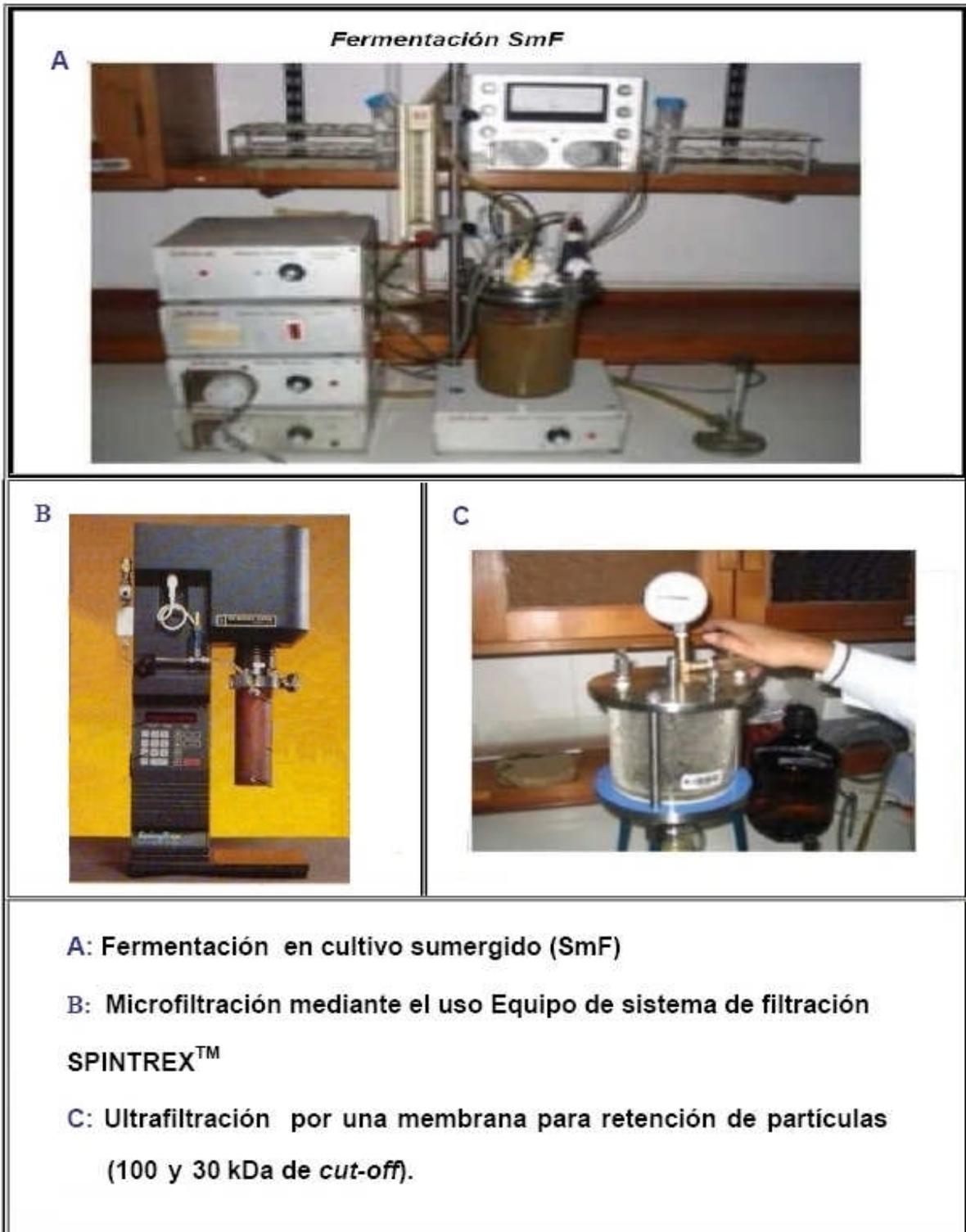
Figura 8.



**Figura:** Esquema presentando los pasos realizados en la semipurificación de un extracto de fitasa obtenida Fermentación en cultivo sumergido (SmF).

Figura 9.

### Fermentación y obtención de un extracto semipurificado de fitasa



Así de acuerdo a lo indicado en la fig.8, el protocolo diseñado para este propósito fue el siguiente:

**Protocolo:** nota (Después de cada paso el extracto obtenido debe ser guardado en el refrigerador para su siguiente purificación en pasos posteriores).

Paso 1: semipurificación simple.

Al cultivo con la producción de fitasa se le realiza primero una semipurificación simple, mediante el paso del cultivo a través de un filtro compuesto por una tela de muselina y una capa de algodón de 0,5 cm de grosor, con ayuda de vacío.

Paso 2: semipurificación mediante decantación.

Se dejó reposar el extracto crudo obtenido del paso 1 por 1 h. Luego mediante el uso de una manguera y un frasco estéril, y teniendo el frasco del extracto crudo de cultivo a una altura mayor al frasco estéril; se traspasa el extracto crudo al nuevo frasco mediante la variación de presión producido al sacar el aire de la manguera con una jeringa estéril, teniendo cuidado de no remover del fondo los restos de cultivo que pasaron el primer filtro.

Paso 3: purificación mediante microfiltración.

Los 2 primeros pasos es una purificación simple de la muestra son realizados para llevar a cabo el paso de purificación por microfiltración mediante el uso del sistema de filtración SPINTREX™ (Fig.9b), operado a modo de recirculación.



La recolección de las muestras a analizar, se realizó tomando muestras (por duplicado) de los diferentes pasos de purificación del cultivo de 4 días. Como control negativo se utilizaron muestras obtenidas del ultrafiltrado de 30KD, por ser una membrana que asegura una muestra libre de enzimas de fitasa.

En el análisis se midió la actividad de muestras correspondiente al sobrenadante de una muestra de la SmF centrifugada a 10000 rpm, y muestras obtenidas a partir del producto de los siguientes pasos: de la microfiltración del cultivo producido por SmF; del producto de la ultrafiltración de 400 mL obtenidos del paso anterior (50 mL de retenido y 350 mL de ultrafiltrado); y del producto de la ultrafiltración de los 350 mL del paso anterior, obteniendo 50 mL de retenido.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Método de ensayo enzimático para medición de actividad de fitasa

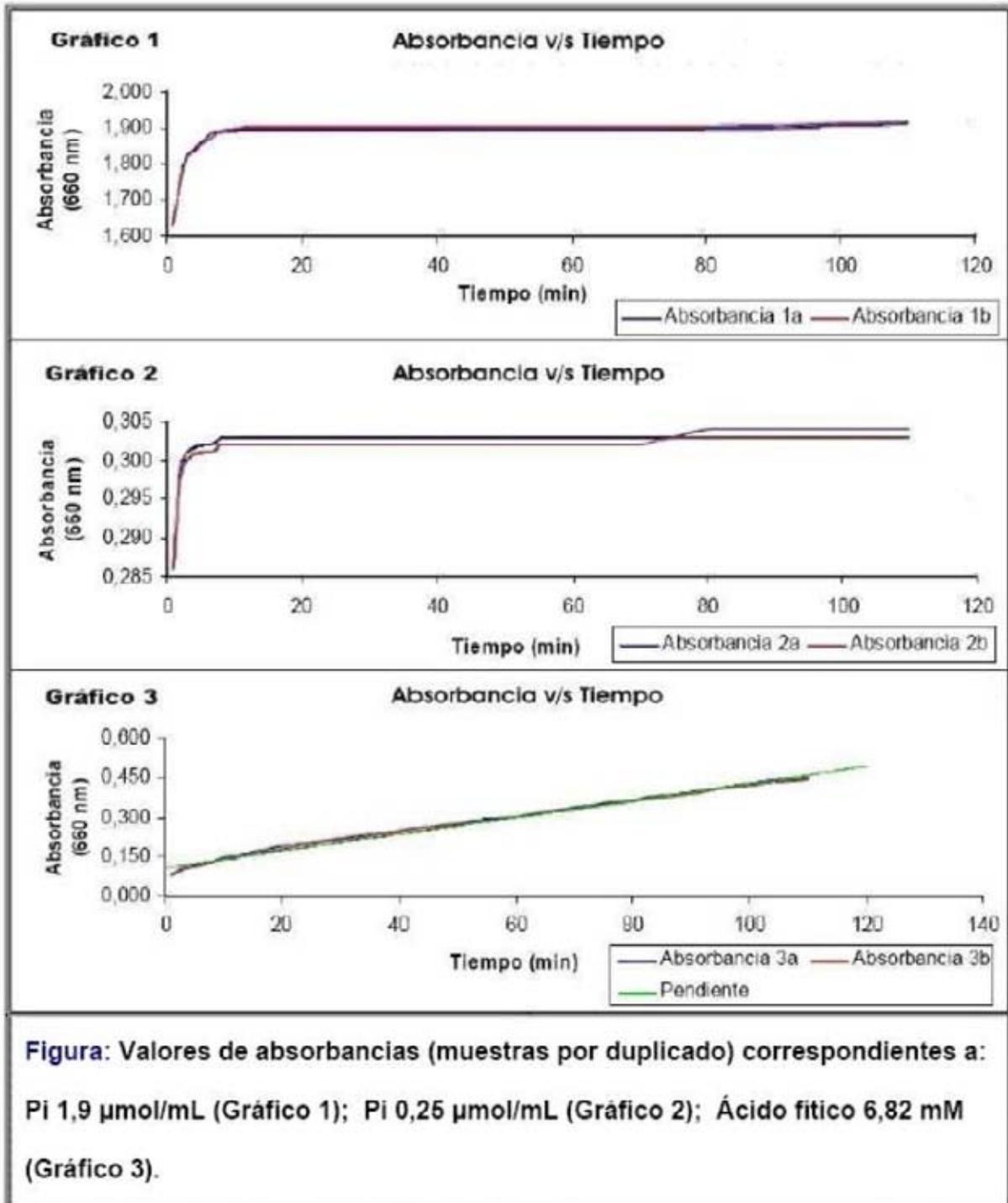
**4.1.1 Montaje del método.** El montaje del método se llevó a cabo mediante varios análisis, obteniéndose los siguientes resultados:

**4.1.1.1 Análisis de los espectros de absorción.** Del análisis de los espectros de absorción del sulfato ferroso formado durante la reducción del ácido fosfomolibdico, a partir de tres muestras de Pi (por duplicado) que abarcaron un rango amplio de concentraciones; los resultados obtenidos en todas las muestras corresponden a absorbancias máximas obtenidas a la longitud de onda de 660 nm. Estos datos se presentan detalladamente en la Tabla 4 del anexo 9.

**4.1.1.2 Estudio de estabilidad de la intensidad del color en el tiempo.** Del análisis de estabilidad del color en el tiempo, realizado a partir de muestras (por duplicado) que presentan diferencias de concentraciones y origen de Pi; los resultados obtenidos mostraron la siguientes gráficas (Fig.12).

Figura 10.

## Estudio de estabilidad de la intensidad del color en el tiempo.



Al ser analizados los valores del gráfico 3, correspondiente a las pendientes se obtuvieron los siguientes parámetros estadísticos:

- Muestra (Absorbancia 3a)

Pendiente (rango 25 a 95 min): abs. =  $2,939 \times 10^{-3} \times T_{(min.)} + 0,130$

Correlación: 0,9997

Covarianza: 1,469

- Muestra (Absorbancia 3a)

Pendiente (rango 25 a 95 min): abs. =  $2,931 \times 10^{-3} \times T_{(min.)} + 0,127$

Correlación: 0,9998

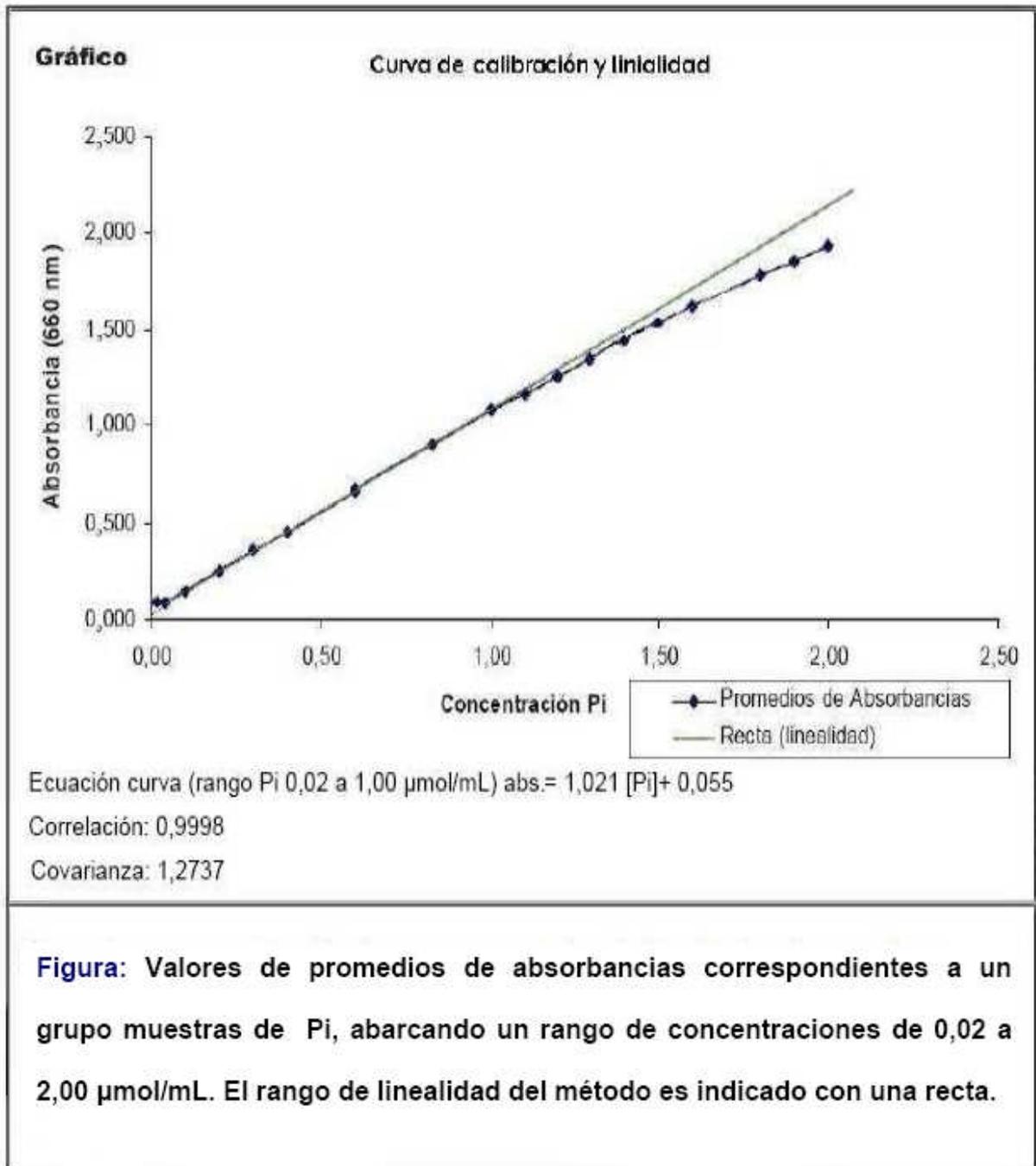
Covarianza: 1,465

**4.1.2 Evaluación del método.** Para la evaluación del método se realizaron varios análisis; obteniéndose en cada uno de ellos los siguientes resultados:

**4.1.2.1 Estudio de sensibilidad y linealidad de la curva de calibración.** Del análisis llevado a cabo para determinar la linealidad del método en función de la medición de la concentración  $P_i$ , así como la sensibilidad del método a partir del grupo de muestras de  $P_i$  (por duplicado) abarcando un rango amplio de concentraciones (0,02 a 2,00  $\mu\text{mol/mL}$ ); los resultados obtenidos mostraron la siguiente gráfica (Fig.13).

Figura 11.

### Estudio de sensibilidad y linealidad de la curva de calibración



**4.1.2.2 Estudio de exactitud del método.** Del análisis llevado a cabo a fin de evaluar la correspondencia de los valores obtenidos de una serie de determinaciones mediante el método en estudio, frente a un valor conocido de una muestra (muestra estándar de concentración conocida), a partir de 5 determinaciones realizadas a una muestra de una concentración conocida de Pi ( $0,6 \mu\text{mol/mL}$ ); los resultados obtenidos mostraron los siguientes parámetros estadísticos. La tabla de resultados (cuadro 3), se presentan en el anexo 9.

Parámetros estadísticos:

Media (X): 0,664

Máximo: 0,666 y Mínimo: 0,662

Desviación estándar:  $1,483 \times 10^{-3} = 0,0015$

Varianza:  $2,2 \times 10^{-6}$

% Coeficiente de variación: 0,226

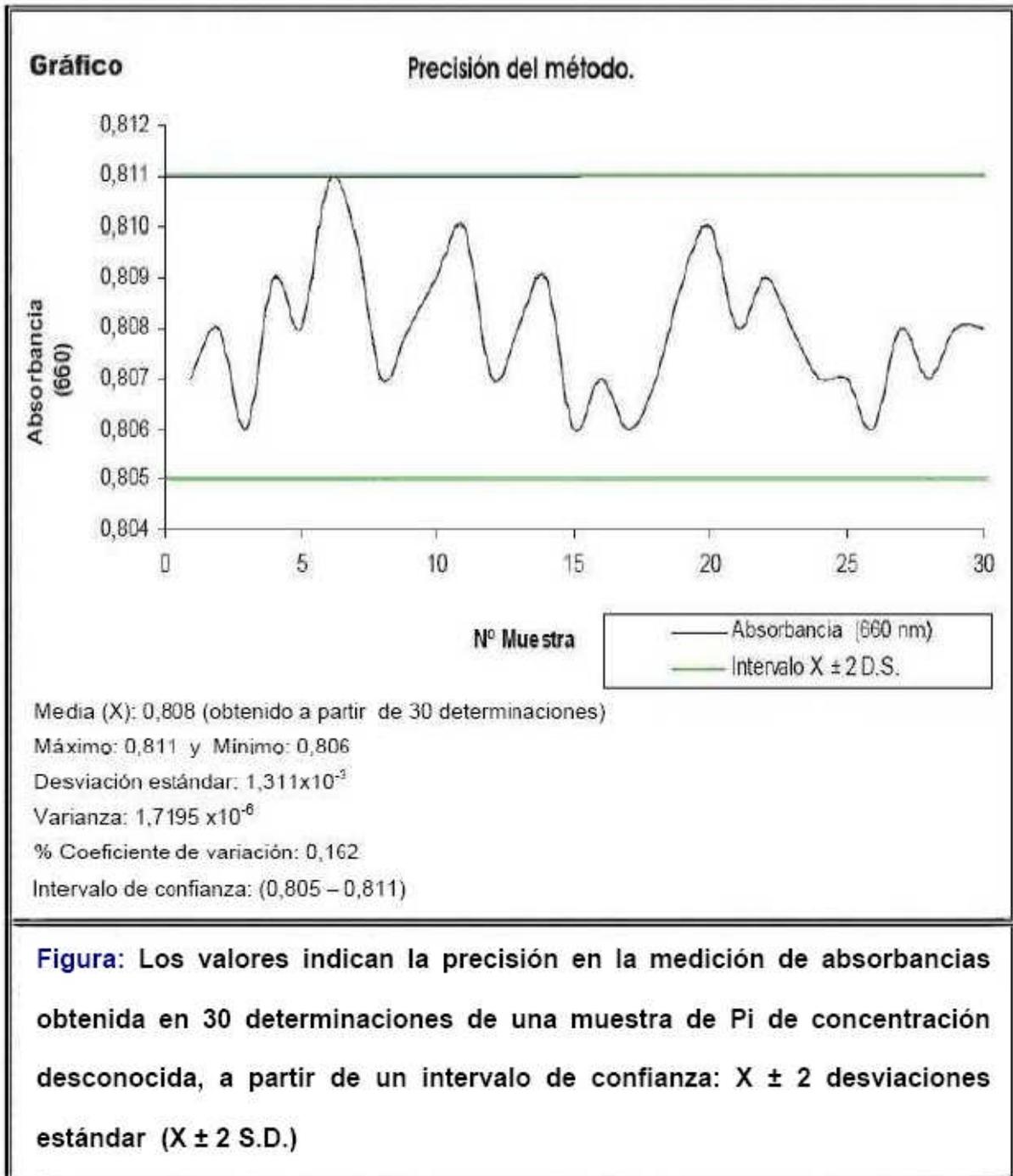
Intervalo de confianza:  $X \pm 2$  desviaciones estándar ( $X \pm 2$  S.D.): (0,661 – 0,667)

(0,667 = Valor de absorbancia obtenido en la curva de calibración, a partir de la interpolación del valor de concentración teórico de Pi ( $0,6 \mu\text{mol/mL}$ ) de la muestra).

**4.1.2.3 Estudio de precisión del método.** Del análisis realizado a fin de evaluar el método en estudio en relación a la variación en los valores obtenidos respecto a una serie de determinaciones de una misma muestra (muestra de una concentración desconocida de Pi elegida al azar); los resultados obtenidos mostraron los siguientes parámetros estadísticos y gráfica (Fig.14).

Figura 12.

## Estudio de precisión del método



**4.1.2.4 Estudio de precisión en relación a la estabilidad del color en muestras para ensayo de enzimático.** Del análisis llevado a cabo a fin de evaluar la correspondencia de los valores obtenidos en relación al análisis de muestras provenientes de un ensayo enzimático, en el que se procedió al análisis enzimático de 20 muestras elegidas al azar, midiéndose las absorbancias a los 30 y 55 minutos); los resultados obtenidos mostraron los siguientes parámetros estadísticos en función de la variación entre los valores de absorbancias de Pi entre los diferentes tiempos. ( $\Delta$  ( $\Delta$  Abs 30 y 55min)), que fueron obtenidos a partir de la diferencias entre los valores correspondientes a condiciones de reacción enzimática positiva (Abs (+)), y las condiciones de reacción enzimática negativa (Abs (-)). La tabla que muestra los resultados (Cuadro 4), se presentan en el anexo 9.

Parámetros estadísticos: (referente a la :  $\Delta$  ( $\Delta$  ABS 30 y 55min))

Media (X): 0,001

Máximo: 0,002

Mínimo: 0,000

En estos resultados, para el análisis se tomó como orden en la medición de las muestras, el medir primeramente la absorbancia de la reacción enzimática negativa e inmediatamente después la absorbancia de la reacción enzimática positiva correspondiente a la misma muestra.

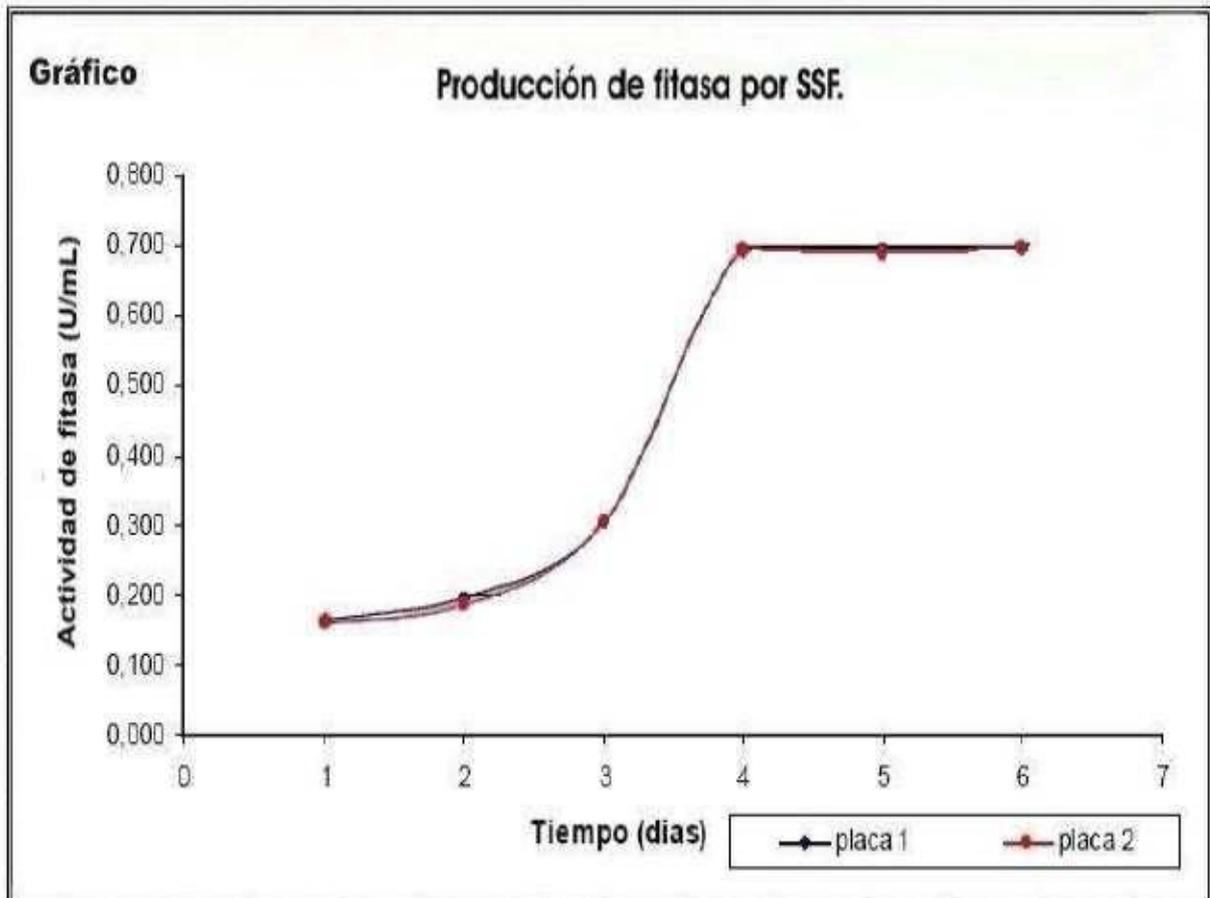
**4.2 Producción de fitasa proveniente de un cultivo de *A. ficuum*.** A partir de las fermentaciones en sustrato sólido (SSF) y sumergida (SmF), durante seis días, y la purificación parcial efectuada, a un cultivo de *Aspergillus ficuum* en SmF, mediante técnicas de Semipurificación y Concentración; se obtuvieron los siguientes resultados.

**4.2.1 Producción de fitasa mediante SSF.** Del análisis llevado a cabo a fin de determinar indirectamente la cinética de la producción de fitasa por SSF; a través de su actividad enzimática presente en 1 ml de cada extracto. El cual es equivalente a la actividad de la fitasa que fue extraída de 0,2 gramos de muestra del cultivo recolectado de la SSF; los resultados obtenidos mostraron la siguiente gráfica (Fig.13).

**4.2.2 Producción de fitasa mediante SmF.** Del análisis llevado a cabo a fin de determinar indirectamente la cinética de la producción de fitasa mediante SmF; a través de su actividad enzimática que está presente en 1 ml de cada extracto. El cual es equivalente a la presente en 1 ml de cada extracto recolectado de la SmF; los resultados obtenidos mostraron la siguiente gráfica (Fig.14).

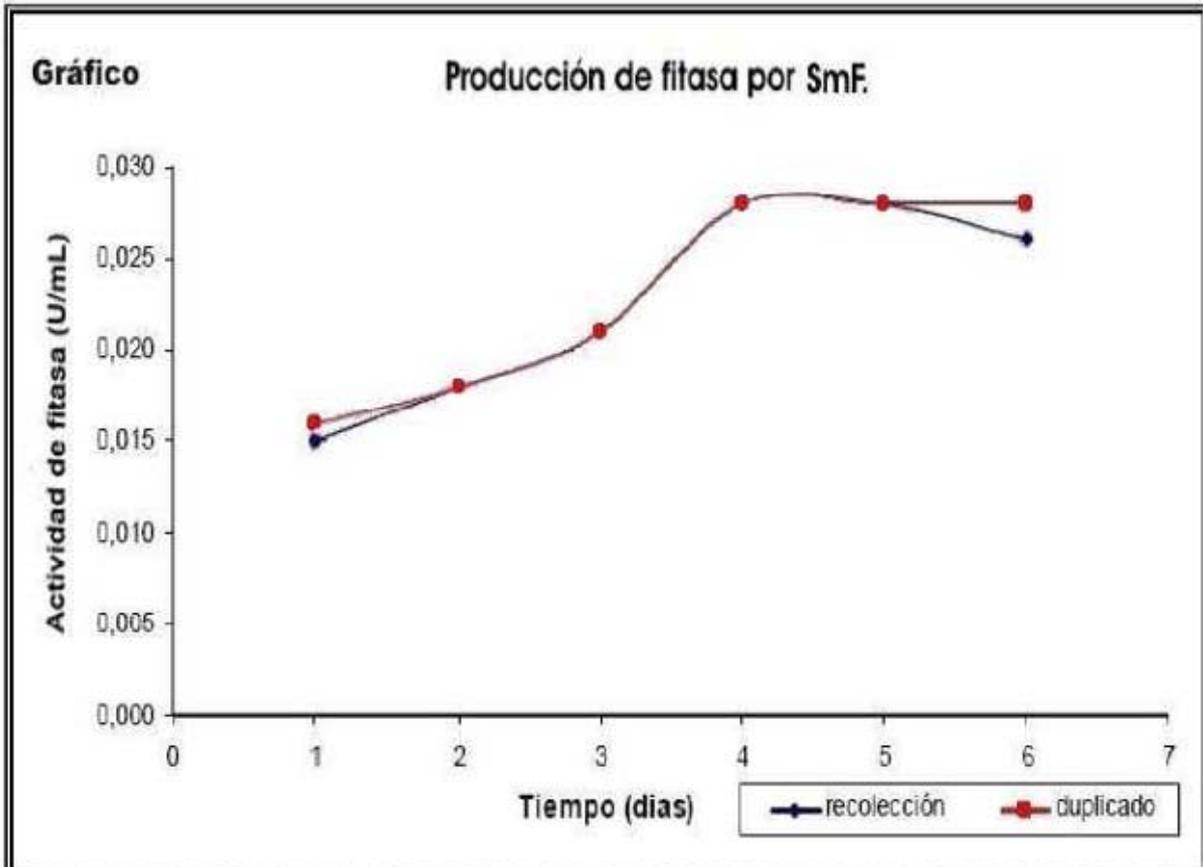
**4.3 Obtención de fitasa proveniente de un cultivo de *A. ficuum* en SmF, mediante técnicas de Semipurificación y Concentración.** Del análisis llevado a cabo a fin de determinar indirectamente la obtención de fitasa luego de aplicar técnicas de Semipurificación y Concentración, con la medición de la actividad enzimática que está presente en 1 ml de cada extracto obtenido en cada etapa del proceso; los resultados obtenidos mostraron la siguiente gráfica (Fig.15).

Figura 13.



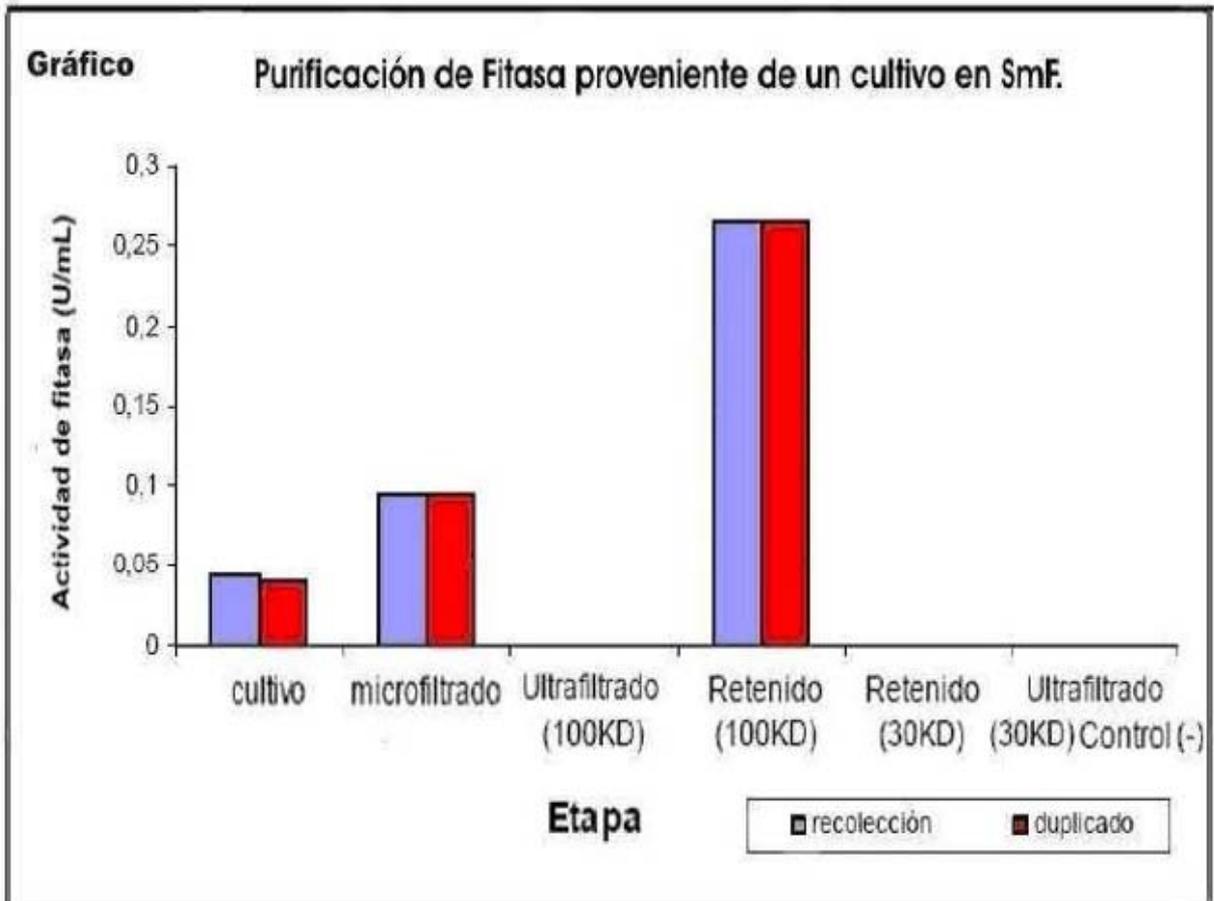
**Figura:** Los valores indican la producción de fitasa a partir de una fermentación en sustrato sólido (SSF) de un cultivo de *A. ficuum* DSM 932, en un medio natural de cereales sólido (C1); realizadas con muestras por duplicado recolectadas en 6 días. La producción de fitasa esta expresada en actividad enzimática de fitasa (U/ml).

Figura 14.



**Figura:** Los valores indican la producción de fitasa a partir de una fermentación sumergida (SmF) de un cultivo de la cepa *A. ficuum* DSM 932, en un medio natural de cereales en solución (C2); realizadas con muestras por duplicado recolectadas en 6 días. La producción de fitasa esta expresada en actividad enzimática de fitasa (U/ml).

Figura 15.



**Figura:** Los valores indican la concentración de fitasa de una fermentación sumergida (SmF) de un cultivo de la cepa *A. ficuum* DSM 932, en un medio natural de cereales en solución (C2); obtenidas en cada una de las diferentes etapas de semipurificación y concentración obtenidas. La producción de fitasa esta expresada en actividad enzimática de fitasa (U/ml).

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 Discusión de resultados de la presente tesis

**5.1.1 Montaje y evaluación del método.** Los resultados obtenidos en el montaje y evaluación del método para detección de Pi, llevado a cabo con el objetivo de adecuar el ensayo enzimático, para ser utilizado en la medición de actividad de fitasa provenientes de cultivo de *Aspergillus ficuum*; indican que:

- Los espectros de absorción, los cuales abarcaron un rango amplio de concentraciones de Pi preparadas a partir de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; indican que la absorbancia máxima en todas las muestras analizadas se produce a una longitud de onda de 600nm en el rango estudiado de Pi (0,02 a 2,00  $\mu\text{mol/mL}$ ).

La longitud de onda obtenida, concuerda con la obtenida por Tausky y Shorr (1953), quienes diseñaron el método microcolorimétrico para la determinación del Pi a partir del uso del reactivo "Tausky y Shorr"; que es el usado en la presente tesis.

- En relación al estudio de la estabilidad de la intensidad del color en el tiempo, el análisis realizado a varias muestras con concentraciones y origen diferente de Pi; mostraron que para las muestras de Pi, a partir de:

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Este análisis presentó una zona de tiempo, con un rango de estabilidad en función del tiempo. Es así como, para las muestras de Pi 0,25  $\mu\text{mol/mL}$ , se presenta una estabilidad en el valor de la absorbancia que va de los 8 a los 75 min; para luego aumentar levemente de valor. Por otra parte, las muestras de Pi 1,9  $\mu\text{mol/mL}$  presentan una estabilidad entre los 12 min y los 60 min; para luego aumentar levemente su valor.
- Ácido fólico 6,82 mM. Al observar los valores de las absorbancias correspondiente a las muestras de Pi, que tienen como único origen de Pi a la solución de ácido fólico 6,82 mM; este análisis indica en sus resultados, que luego de transcurridos 110 min, no se produce una estabilidad en el nivel de absorbancia. Observándose que sólo se produce un aumento de los valores de absorbancias en el rango de tiempo analizado

A pesar de lo mencionado anteriormente, si se observa, que en el aumento de los valores absorbancias, éste se produce a un nivel constante a partir de los 25 min hasta alcanzar los 95 min (ambas muestras presentaron una pendiente con un valor de correlación superior al 0,999). Luego de transcurridos los 95 min se observa que los valores decaen suavemente durante el resto de tiempo observado.

La inestabilidad observada en función de las absorbancias de las soluciones de ácido fólico 6,82 mM; no ha sido citado en ninguna de las publicaciones revisadas en la presente tesis. Este aumento de los valores de absorbancias en el rango de

tiempo observado podría deberse a una hidrólisis química suave que se presentaría en el sustrato (ácido fítico) en ciertas condiciones de pH ácido (Anderson 1980) y alta temperatura (Philippy *et al.*, 1988).

- En relación al análisis de sensibilidad y linealidad de la curva de calibración del método a aplicar, estos resultados muestran que la linealidad de la curva de calibración comprende el rango de Pi que va de 0,04 a 1,00  $\mu\text{mol/mL}$ ; lo cual concuerda con el rango obtenido en la investigación realizada por Taussky y Shorr (1953). A partir de la linealidad obtenida, además se concluye que el método presenta una sensibilidad a valores bajos de Pi de hasta 0,04  $\mu\text{mol/mL}$ ; la concentración de Pi más baja medible correctamente y la usada para los análisis.
  
- En relación al análisis de evaluación de la exactitud del método de ensayo enzimático; los resultados muestran que el valor de absorbancia 0,667, obtenida a partir de interpolación del valor de concentración teórico (Pi 0,6  $\mu\text{mol/mL}$ ), en la curva de calibración; se encuentra dentro del intervalo de confianza (0,661–0,667). Este resultado indica que el método a estudiar presenta un nivel de exactitud aceptable.
  
- El estudio de precisión del método de ensayo enzimático, realizado mediante el análisis de 30 determinaciones de una muestra de Pi, a partir de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  de concentración desconocida y elegida al azar; mostró un intervalo de confianza de  $\bar{X} \pm 2$  desviaciones estándar de (0,805 – 0,811) y % de coeficiente de variación de

0,162; presentándose todos los valores de las muestras analizadas dentro del intervalo de confianza. Este resultado indica que el método a estudiar presenta un nivel de precisión aceptable.

- El estudio de la precisión del ensayo enzimático en relación a la estabilidad del color, realizado en un grupo de 20 muestras de un cultivo de *aspergillus ficuum*, elegidas al azar, y medidas de acuerdo al orden diseñado para la toma de la medición; muestra que las absorbancias obtenidas dentro del rango de tiempo analizado (30 y 55 min), indican que se produce una pequeña variación en la absorbancia no mayor a 0,002; producto de la actividad enzimática. Esta pequeña variación obtenida, equivale a aproximadamente a 0,002  $\mu\text{mol/mL}$  de Pi; lo que resulta despreciable para obtener el cálculo final de la actividad fitásica mediante el ensayo enzimático en estudio.

A partir de estos resultados y conclusiones, además se concluye que en muestras de ácido fítico 6,82 mM; el valor de la pendiente, que se observa en el estudio de la estabilidad del color en función del tiempo, no presentaría variaciones significativas al ser sometida una muestra a las diferentes condiciones de ensayo requeridas. Esta última conclusión se obtiene a partir de los resultados de la precisión del ensayo enzimático, los cuales estarían igualmente señalando que la razón de la diferencia de los puntos de absorbancias se mantienen en el rango de 30 y 55 min; y con ello también se mantiene el valor de las pendientes dentro de las condiciones de ensayos y en el rango de tiempo analizado.

**5.1.2 Producción de fitasa a partir de un cultivo de *A. ficuum*.** 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 molidos, el cual denominamos “medio natural de cereales sólido” (C1); mostró al cabo de seis días de cultivo, que en la cinética de producción obtenida (i.e. 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.

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 en la producción de fitasa, mediante fermentación sumergida (SmF) de un cultivo de *Aspergillus ficuum* en un medio líquido a base de una mezcla de cereales molido, al cual se le denominó “medio natural de cereales, en solución” (C2), indican que la SmF realizada en la tesis es un método de cultivo adecuado para la obtención de fitasa. En el cultivo se obtuvo una cinética de producción de enzima fitasa que alcanza un nivel máximo al 4<sup>to</sup> día de cultivo, al igual que el tiempo obtenido en la SSF. Estos resultados concuerdan con

lo reportado por Papagianni, *et al.* (2001) a partir de una SmF realizada en un medio semi-sintético.

Conforme a la revisión bibliográfica revisada, parte de la cual se presentó en el capítulo correspondiente, no se han encontrado reportes de investigaciones llevadas a cabo sobre la producción de fitasa en SmF con sustratos naturales; con lo cual en la presente tesis se prueba la factibilidad de este tipo de medio, como un medio adecuado para obtener una producción de fitasa a partir de un cultivo de *Aspergillus ficuum* en SmF.

Al realizar una comparación de los niveles de producción de fitasa, en función de la mayor producción obtenida por mL de extracto; los resultados obtenidos en la SSF (0,695 U/mL (promedio)) frente a la SmF (0,028 U/mL (promedio)), indican que la SmF presenta un nivel de producción considerablemente menor en comparación a los niveles de producción que se pueden obtener por SSF. Es así como se confirmaría lo dicho por Papagianni, *et al.* (2001) y por Bogar, *et al.* (2003), referente a que una SSF, en comparación a una SmF, es más eficiente para llegar a obtener producciones más altas de fitasa a partir del producto recolectado de un cultivo de *Aspergillus ficuum*.

- La segunda SmF, realizada con el fin de obtener un concentrado de fitasa más purificado, mediante el uso de tecnología de membrana, muestran que:
  - A partir de los resultados de actividad enzimática obtenidos en el paso de la microfiltración efectuada en el SPINTREX™ (0,095 U/mL (promedio)), se

desprende que resulta factible la utilización tecnologías de microfiltración, como primera etapa del procedimiento. Interesante resultó comprobar que no obstante la alta consistencia del medio introducido producto de las partículas de los ingredientes naturales de origen vegetal que lo componían y del micelio desarrollado, el sistema filtró y concentró la enzima.

Los valores de producción de la enzima fitasa obtenidos mediante esta microfiltración (0,095 U/mL (promedio)), es mayor que la presentada por la muestra del cultivo sin microfiltrar obtenida mediante centrifugación del cultivo (0,043 U/mL (promedio)). La mayor concentración presente en la muestra tratada en el SPINTREX™, puede haberse debido a que la microfiltración mediante la modalidad de recirculación permite extraer más sustancia de una muestra a diferencia de la purificación mediante una simple centrifugación.

- Respecto de los resultados obtenidos mediante purificación por ultrafiltración, se observa que:
  - En la etapa de ultrafiltración realizada mediante el uso de una membrana de 100 kd de cut-off, en las muestras correspondiente al retenido, se obtiene una actividad de la enzima fitasa (0,265 U/mL, promedio). Al ser mayor esta actividad en comparación a la del paso anterior; indica que la enzima fitasa de *Aspergillus ficuum* es retenida mediante el uso de esta membrana. Este resultado es esperable, de acuerdo con lo reportado por Ullah y Gibson, (1987); quienes

indican que el peso molecular aproximado para la proteína nativa está entre 85 y 100 kDa.

Por otra parte, el permeado (filtrado) no presenta actividad, ratificando la retención de la enzima. Este resultado es el mismo al comparar los valores correspondientes al permeado de este paso, con los obtenidos en el paso de la segunda ultrafiltración (membrana de 30 kDa de *cut-off*), como se señala a continuación.

- En la etapa de ultrafiltración realizada mediante el uso de una membrana de 30 kDa de *cut-off*, en la cual se ultrafiltró el permeado obtenido mediante la primera membrana (100 kDa); los valores obtenidos en el retenido y permeado de 30 kDa son idénticos, indicando la no presencia de actividad en ambas muestras.

El ultrafiltrado que se obtuvo en este paso, producto del tamaño de exclusión que presenta la membrana y al tamaño de la proteína dada por la literatura (Ullah y Gibson, 1987), corresponde a un extracto libre de la enzima fitasa.

Como se ha dicho, estos últimos resultados ratifican la actividad obtenida del paso de ultrafiltración (30 kd); siendo indicativo de la ausencia de la proteína fitasa en las muestras correspondiente tanto al primer ultrafiltrado (100 kd), como al segundo retenido obtenido (30 kd).

En relación a la pequeña diferencia en las absorbancias de la reacción enzimática en condiciones (+) frente a la (-), que fue observada en las muestras usadas como control negativo (0,003  $\mu\text{moles/min}$ ) y descartada en los cálculos finales; podría producirse debido a las diferencias que se presenta en algunos parámetros, al ser llevado a cabo las condiciones de ensayo requeridas en cada caso respectivamente. Por lo cual lo que se mediría, sería un pequeño nivel de hidrólisis; la que se produciría u o se favorecería al estar expuesto el sustrato a las condiciones de reacción (+).

Del mismo modo, la medición de una concentración elevada de Pi que se registraron en todas las muestras provenientes de un cultivos, y que incluso se observa en condiciones de reacción (-) y en los análisis de los controles negativos (y por ello se descarta en los cálculos de actividad); no sólo podría ser producto del factor antes mencionado, en relación a una pequeña hidrólisis del AF; sino que en si provendría de los componentes presentes en el medio utilizado en los cultivos, al ser éstos un medio complejo de origen vegetal.

Este efecto que sería producido por el medio utilizado, se ratificaría al analizar los resultados de las absorbancias obtenidas; ejemplo de ello, es que niveles más altos de absorbancia del control negativo se detectan en la SSF (0,332), frente a los niveles presentes en la SmF (0,207). E igualmente, las concentraciones de los ingredientes necesarios en la elaboración de los medios, son mayores en la SSF respecto de las requeridas en la SmF; esto producto de la naturaleza de los sustratos usados en ambas fermentaciones.

## 5.2 Conclusiones

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

- Los protocolos diseñados en la presente investigación, indican que es factible la detección de Pi mediante el uso del reactivo de Taussky-Shorr, para su uso en la determinación de actividad de fitasa proveniente de cultivos de *Aspergillus ficuum*, confirmando lo indicado por Harland y Harland (1980).
- 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 molidos (C1).
- La realización de una SmF llevado a cabo mediante un cultivo de *Aspergillus ficuum* en un medio líquido a base de una mezcla de cereales molido (C2), es adecuado para poder obtener una producción de fitasa por fermentación sumergida, en las condiciones y medio en que fue llevada a cabo.
- La evidencia acumulada hasta el momento indica que la SSF presenta un sustrato más adecuado para la producción de fitasa proveniente *Aspergillus ficuum*; en comparación a los resultados que se pueden obtener en la SmF.

- Las técnicas de filtración y ultrafiltración aplicadas, son adecuadas para lograr un extracto semipurificado o parcialmente purificado de fitasa proveniente de un cultivo de *Aspergillus ficuum* en medio C2.
- La enzima fitasa obtenida queda retenida al ultrafiltrar el extracto sin micelio por una membrana de 100kD de *cut off*; y ello indicaría que la enzima tiene un PM alrededor de 100 kD.

En síntesis, producto de los resultados obtenidos; el trabajo desarrollado en la presente tesis muestra una gran proyección a futuro. Esto ya que la utilización de las fitasas en la industria de producción animal se ha visto cada vez más favorecida, al mejorar la utilización de varios nutrientes (minerales, aminoácidos, energía), ayudar en la disminución de costos, el aumento del rendimiento animal (carne) y disminuyendo el grado de polución ambiental (menor eliminación de Pi en efluentes).

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Abarca M.L. (2000) Taxonomy y identification of the species involved in nosocomial aspergillosis *Rev. Iberoam. Micol.*, 17(3): S79-S84
- Abarca, M.L., Accensi, F., Cano, J. y Cabañes F. J. (2004) Taxonomy and significance of *black aspergilli*. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 86, 33–49,
- Adeola, O., Lawrence, B.V., Sutton, A.L. y Cline, T.R. (1995) Phytase-induced changes in mineral utilization in zinc-supplemented diets for pigs. *J. Anim. Sci.*, 73, 3384-3391.
- Anderson, R.J. (1914) Contribution to the chemistry of phytin. *J. Biol. Chem.*, 1914, 17-171.
- Anderson, G. (1980) Assessing organic phosphorus in soil. In: F. E. Khasawneh, E.C. Sample & E. J. Kamprath (eds) *The role of phosphorus in agriculture*: 411–431. American Society of Agronomy, Madison, USA.
- Auman, S.K (2003) *Increasing Dietary Phosphorus Retention and Decreasing Fecal Phosphate Excretion in Modern Commercial Broilers*. disertación doctoral. North Carolina State University. North Carolina, 179 pp.
- Barrientos, L., Scott, J.J. y Murthy, P.P.N. (1994) Specificity of hydrolysis of phytic acid by alkaline phytase from lily pollen. *Plant Physiol.*, 106, 1489-1495.
- BASF (1998) *Determination of Phytase Activity (3rd revised edition) KC 9505. Keeping Current.*, 1-8.

- Best, P. y Gill, C. (1998) New additive synergy ? Formic acid plus phytase for pigs. *Feed Management.*, 49(8), 23-24.
- Biehl, R.R. y Baker, D.H. (1996) Efficacy of supplemental 1 $\alpha$ -hydroxycholecalciferol and microbial phytase for young pigs fed phosphorus- or amino acid-deficient corn-soybean meal diets. *J. Anim. Sci.*, 74, 2960-2966.
- Bio-Feed Phytase. (2000) A new enzyme for animal feed. Novo Nordisk A/S, Denmark.
- Boland, A.R., Garner G.B., y O'Dell. B.L. (1975) Identification and properties of "phytate" in cereal grains and oil seed products. *J. Agric. Food Chem.* 23,1186–1189
- Bogar, B., Szakacs, G., Linden J.C. y Pandey A. (2003) Optimization of phytase production 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.
- Campbell, G.L. y Bedford, M.A. (1992) Enzyme applications for monogastric feeds: A review. *Can. J. Anim. Sci.*, 72, 449-466.
- Carnovale, E., Lugaro, E. y Lombardi-Boccia, G. (1988) Phytic acid in faba bean and pea: effect on protein availability. *Cereal Chem.*, 65, 114-117.
- Centeno, C., Viveros, A., Brenes, A., Canales, R., Lozano, A. y De la Cuadra, C. (2001) Effect of several germination conditions on total P, phytate P, phytase, and acid

- phosphatase activities and inositol phosphate esters in rye and barley. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 3208-3215.
- Champagne, E.T. y Hinojosa, O. (1987) Independent and mutual interactions of copper (II) and zinc (II) ions with phytic acid. *J. Inorg. Biochem.*, 30, 15-22
- Chen, L.H. y Pan, S.H. (1977) Decrease of phytates during germination of pea seeds (*Pisum sativa*). *Nutr. Rep. Int.*, 16, 125-131.
- Cosgrove, D.J. (1963) The isolation of myo-inositol pentaphosphates from hydrolysates of Phytic acid. *Biochem. J.*, 89, 172-175.
- Cosgrove, D.J. (1966) The chemistry and biochemistry of inositol polyphosphates. *Rev. of Pure and Appl. Chem.*, 16, 209–224.
- Cosgrove, D.J. (1970) Inositol phosphate phosphatases of microbial origin. Inositol phosphate intermediates in the dephosphorylation of the hexaphosphates of myo-inositol, scyllo-inositol, and D-chiro-inositol by bacterial (*Pseudomonas* sp.) phytase. *Aust. J. Biol. Sci.*, 23, 1207-1220
- Cosgrove, D.J. (1980) Inositol phosphates—their chemistry, biochemistry and physiology. Elsevier Scientific, Amsterdam.
- Cromwell, G.L., y Coffey, R.D. (1991) Phosphorus, a key essential nutrient, yet a possible major pollutant—its central role in animal nutrition. In: .P. Lyons (ed.)

- Biotechnology in the feed industry T: 134–145. Alltech Technical Publications, Nicholasville, Ky.
- Deshpande, S.S. y Cheryan, M. (1984)** Effects of phytic acid, divalent cations, and their interactions on  $\alpha$ -amylase activity. *J. Food Sci.*, 49, 516-519.
- Deshpande, S.S. y Damodaran, S. (1989)** Effect of phytate on solubility, activity and conformation of trypsin and chymotrypsin. *J. Food Sci.*, 54, 695-699.
- Eeckhout, W. y De Paepe, M. (1992)** Comparaison de l'effet de 500 unités de phytase de blé et d'une phytase microbienne sur la digestibilité apparente du phosphore d'un aliment pour porcs à l'engrais. *Revue de l'Agriculture.*, 45, 209-216.
- Eeckhout, W. y De Paepe, M. (1994)**. Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 47, 19-29.
- Ferguson, L.R. y Harris, P.J. (1999)** Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. *Eur. J. Cancer Prev.*, 8, 17-25.
- Fitzgerald, S.L., Gibson, R.S., Quan de Serrano, J., Portocarrero, L., Vasquez, A., de Zepeda, E., Lopez-Palacios, C.Y., Thompson, L.U., Stephen, A.M. y Solomons, N.W. (1993)** Trace element intakes and dietary phytate/Zn and Ca x phytate/Zn millimolar ratios of periurban guatemalan women during the third trimester of pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr.*, 57, 195-201.

- Foster, A.J. (2003) Reducing phosphorus runoff using poultry litter derived from phytase-amended diets. Tesis Department of Agronomy. Louisiana State University. 58 pp.
- Frossard, E., Bucher, M., Mächler, F., Mozafar, A. y Hurrell, R. (2000) Potential for increasing the content and bioavailability of Fe, Zn, and Ca in plants for human nutrition. *J. Sci. Food. Agric.*, 80, 861-879.
- Gebert, S., Bee, G., Pfirter, H.P. y Wenk, C. (1998) Phytase and vitamin E in the feed of growing pigs: 1. Influence on growth, mineral digestibility and fatty acids in digesta. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 81, 9-19.
- Gebert, S., Bee, G., Pfirter, H.P. y Wenk, C. (1999) Growth performance and nutrient utilisation as influenced in pigs by microbial phytase and vitamin E supplementation to a diet of high oxidative capacity. *Ann. Zootech.*, 48, 105-115.
- Gibson, D. M. y Ullah, A. B. J (1990) 6. Phytases and their action on phytic acid. In: D. J. Morre, W. F. Boss and F. A. Loewus (eds) *Inositol Metabolism in Plants: 77-92*. Wiley-Lis, New York.
- Gifford, S.R. y Clydesdale, F.M. (1993) Effect of varying concentrations of phytate, calcium, and zinc on the solubility of protein, calcium, zinc, and phytate in soy protein concentrate. *J. Food Protect.*, 56, 42-46.
- Graf, E. y Eaton, J.W. (1993) Suppression of colonic cáncer by dietary phytic acid. *Nutr. Cáncer.*, 19, 11 - 19.

- Grases, F. y Costa-Bauza, A. (1999) Phytate (IP6) is a powerful agent for preventing calcifications in biological fluids: usefulness in renal lithiasis treatment. *Anticancer Res.*, 19, 3717- 3722.
- Grases, F., Perelló, J., Isern, B. y Prieto, R.M. (2005) Study of a myo-inositol hexaphosphate-based cream to prevent dystrophic calcinosis cutis *British J. of Dermatology.*, 152(5), 1022-1025(4)
- Greiner, R., Konietzny, U. y Jany K.-D. (1993) Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 260, 215-221.
- Han, Y.W. (1988) Removal of phytic acid from soybean and cottonseed meals. *J. Agric. Food Chem.*, 36, 1181-1183.
- Han, Y.M., Roneker, K.R., Pond W.G. y Lei, X.G. (1998) Adding wheat middling microbial phytase, and citric acid to corn-soybean meal diets for growing pigs may replace inorganic phosphorus supplementation. *J. Anim. Sci.*, 76, 2649-2656.
- Han, Y.M., Wilson, D.B. y Lei, X.G. (1999) Expression of an *Aspergillus niger* Phytase Gene (*phyA*) in *Saccharomyces cerevisiae* *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(5), 1915-1918.
- Harland, B.F. y Harland, J. (1980) Fermentative reduction of Phytase in rye, white, and whole wheat breads. *Cereal Chem.*, 57, 226-229.
- Harper, A.F., Kornegay, E.T. y Schell, T.C. (1997) Phytase supplementation of low-phosphorus growing-finishing pig diets improves performance, phosphorus

- digestibility, and bone mineralization and reduces phosphorus excretion. *J. Anim. Sci.*, 75, 3174-3186.
- Heany, R.P, Weaver, C.M y Fitzsimmons, M.L. (1991) Soybean phytate content: effect on calcium absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* 53, 745-747.
- Horose, M., Ozaki, K., Takaba, K., Fukushima, S., Shirai, T. y Ito, N. (1991) Modifying effects of the naturally occurring antioxidants gamma oryzanol, phytic acid, tannic acid and n-triacontan- 16, 18-dione in rat wide spectrum organ carcinogenesis model. *Carcinogen.*, 12, 1917-1921.
- Irving, G.C. J. y Cosgrove, D.J. (1972) Inositol phosphate phosphatases of microbiological origin: the inositol pentaphosphate products of *Aspergillus ficuum* phytases. *J. Bacteriol.*, 112, 434-438
- IUPAC. y IUPAC-IUB. (1968) The nomenclature of cyclitols. *Eur. J. Biochem.*, 5, 1–12.
- IUPAC 1971 Nomenclature of inorganic chemistry, definitive rules (1970). Butterworths, London.
- IUPAC-IUB: Commission on Biochemical Nomenclature, (1977) Nomenclature of phosphorus containing compounds of biochemical importance. *Eur. J. Biochem.*, 79, 1–11.
- IUPAC-IUB: (1984) Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry. Enzyme nomenclature. Academic Press Inc.

- Jariwalla, R.J. (1999) Inositol hexaphosphate (IP6) as an antineoplastic and lipid-lowering agent. *Anticancer Res.*, 19, 3699-3702.
- Jenab, M, y Thompson, L.U. (1998) The influence of phytic acid in wheat bran on early biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogen.*, 19, 1087-1092.
- Jongbloed, A. W., (1987). Phosphorus in the feeding of pigs: effect of diet on the absorption and retention of phosphorus by growing pigs. *Report I.V.V.O. nr.*, 179, Lelystad, The Netherlands.
- Jongbloed, A.W. y Kemme, P.A. (1990) Effect of pelleting mixed feeds on phytase activity and the apparent absorbability of phosphorus and calcium in pigs. *Anim. Feed Sci., Technol.*, 28, 233-242.
- Jongbloed, A.W., Mroz, Z. y Kemme, P.A. (1992) The Effect of Supplementary *Aspergillus niger* Phytase in Diets for Pigs on Concentration and Apparent Digestibility of Dry Matter, Total Phosphorus, and Phytic Acidin Different Sections of the Alimentary Tract. *J. Anim. Sci.*, 70, 1159-1168.
- Jongbloed, A. W., Kemme P. A. y Mroz, Z. (1996) In: Coelho. M. B. and Kornegay, E. T. (ed) Phytase in Animal Nutrition and Waste Management: 393-400. BASF Corp., NJ. Citados por: Kornegay, E. T., (1999).
- Kastelic, J y Forbes, R.M. (1961) Animal nutrition and phosphates in feeds. The availability of phosphorus in plant material to various species of animals. In: Van

- Wazen, J. R., (ed) Phosphorus and Its Compounds. Vol. II. Chap. 24: 1549-1561. Interscience Publishers, Inc., N.Y.
- Khan, N., (2000) Properties and performance of phytase from *Peniophora lycii*. In: 3rd Abstracts of lectures and posters. European Symposium on Feed Enzymes: 35. Noordwijkerhout, the Netherlands,
- Kemme, P.A. y Jongbloed, A.W. (1993) Effect of *Aspergillus niger* phytase and soaking on the apparent digestibility of P in diets for pigs. *J. Anim. Sci.*, 71, (Suppl.1):181 (Abstr.).
- Kemme, P.A., Jongbloed, A.W., Mroz, Z. y Beynen, A.C. (1997) The efficacy of *Aspergillus niger* phytase in rendering phytate phosphorus available for absorption in pigs is influenced by pig physiological status. *J. Anim. Sci.*, 75, 2129-2138.
- Kemme, P.A. (1998) Phytate y phytases in pig nutrition. Tesis doctoral. Universidad de Wageningen. Netherlands, 166 pp.
- Kemme, P.A., Jongbloed, A.W., Mroz, Z., Kogut, J. y Beynen, A.C. (1999) Digestibility of nutrients in growing-finishing pigs is affected by *Aspergillus niger* phytase, phytate and lactic acid levels. 2. Apparent total tract digestibility of phosphorus, calcium and magnesium and ileal degradation of phytic acid. *Livestock Prod. Sci.*, 58, 119-127.
- Kerovuo, P., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N. y Apajalahti J. (1998) Isolation, Characterization, Molecular Gene Cloning, and Sequencing of a Novel Phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol.*, 64(6) 2079-2085.

- Khokhar, S., Pushpanjali, y Fenwick G.R. (1994) Phytate content of indian foods and intakes by vegetarian indians of Hisar region, Haryana State. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2440-2444.
- Knox, T., Kassarijian, Z. y Dawson-Hughes, B. (1991) Calcium absorption in elderly subjects on high and low fiber diets: effects of gastric acidity. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53, 1480-1486.
- Kornegay, E.T. y Qian, H. (1996) Replacement of inorganic phosphorus by microbial phytase for young pigs fed on a maize-soybean-meal diet. *Br. J. Nutr.*, 76, 563-578.
- Kornegay, E. T., (1999) Application of phytase for retention of nonphosphorus nutrients. *Proc. 46th Maryland Nutr. Conf.*, pp. 83-103.
- Kostrewa, D., Grüninger-Leitch, F., D'Arcy, A., Broger, C., Mitchell, D. y Van Loon, A.P.G.M. (1997) Crystal structure of phytase from *Aspergillus ficcum* at 2.5 Å resolution. *Nature Struct. Biol.*, 4, 185-190.
- Kumar, A. y Chauhan, B.M. (1993) Effects of phytic acid on protein digestibility (*in vitro*) and HCl-extractibility of minerals in pearl millet sprouts. *Cereal Chem.*, 70, 504-505.
- Lassen, S.F., Breinholt, Peter, J., Østergaard, R., Brugger, R., Bischoff, A., Wyss, M. y Fuglsang, C.C. (2001) Expression, Gene Cloning, and Characterization of Five Novel Phytases from Four Basidiomycete Fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, a *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 4701–4707.

- Lee, D., Schoroeder, J. y Gordon, D.T. (1988) Enhancement of Cu bioavailability in the rat by phytic acid. *J. Nutr.*, 118, 712-717.
- Lei, X.G., Ku, P.K. Miller, E.R., Ullrey, D.E. y Yokoyama, M.T. (1993) Supplemental microbial phytase improves bioavailability of dietary zinc to weanling pigs. *J. Nutr.*, 123, 1117-1123.
- Lei, X.G., Ku, P.K., Miller, E.R., Yokohama, M.T. y Ullrey, D.E. (1994) Calcium level affects the efficacy of supplemental microbial phytase in corn-soybean meal diets of weanling pigs. *J. Anim. Sci.*, 72, 139-143.
- Li, D., Che, X., Wang, Y., Hong, C. y Thacker, P.A. (1998) Effect of microbial phytase, vitamin D3, and citric acid on growth performance and phosphorus, nitrogen and calcium digestibility in growing swine. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 73, 173-186.
- Liu, J., Bollinger, D.W., Ledoux, D.R., Ellersieck, M.R. y Veum, T.L. (1997) Soaking increases the efficacy of supplemental microbial phytase in a low-phosphorus corn-soybean meal diet for growing pigs. *J. Anim. Sci.*, 75, 1292-1298.
- Lonnerdal, B., Sandberg, A-S., Sandstrom, B. y Kunz, C. (1989) Inhibitory effects of phytic acid and other inositol phosphates on zinc and calcium absorption in suckling rats. *J. Nutr.*, 119, 211-214.
- Lonnerdal, B. (2000) Dietary factors influencing zinc absorption. *J. Nutr.*, 130, 1378S-83S

- Lopez, W.H., Coudray, C., Bellanger, J., Younès, H., Demigné, C. y Rémésy, C. (1998) Intestinal fermentation lessens the inhibitory effects of phytic acid on mineral utilization in rats. *J. Nutr.*, 128, 1192–1198.
- Maenz, D.D. y Classen, H.L. (1998) Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. *Poult. Sci.*, 77, 557-563.
- Maenz, D.D., Engele-Schaan, C.M., Newkirk, R.W. y Classen, H.L. (1999) The effects of minerals and mineral chelators on the formation of phytase-resistant and phytase-susceptible forms of phytic acid in solution and in a slurry of canola meal. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 81, 177-192.
- Martínez, B., Ibáñez, M.V. y Rincón, F. (2002) Ácido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.*, 52(3), ISSN 0004-0622
- Morris, E. R. y Ellis, R. (1985) Trace element nutriture of adult men consuming three levels of phytate. In: Mills, C.F., Bremner, I. and Chesters J.K., (eds) Trace Elements in Man and Animals vol. 5: 443-447. Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough, UK.
- 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.
- Näsi, J.M., Helander E.H. y Partanen, K.H. (1995) Availability for growing pigs of minerals and protein of a high phytase barley-rape seed meal diet treated with *Aspergillus niger* phytase or soaked with whey. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 56, 83-98.
- Natuphos. (1998) The natural key to higher yields. Basf, Gist-brocades. BASF Aktiengesellschaft. Ludwigshafen, Germany.
- Nayini NR. y Markakis P. (1986) Phytases. In: E. Graf. (Ed) 'Phytic Acid: Chemistry and Applications: 23-42. Pilatus Press: Minneapolis.
- 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.
- Nelson, T.S., Shieh, T.R., Wodzinski, R.J. y Ware, J.H. (1971) Effect of supplemental phytase on the utilization of phytate phosphorus by chicks. *J. Nutr.*, 101, 1289.
- Nielsen, B.K., Thompson, L.U. y Bird, R.P. (1987) Effect of phytic acid on colonic epithelial cell proliferation. *Cancer Lett.*, 37, 317-25.

- 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.
- Ostanin, K., Harms, E. H., Stevis, P. E., Kuciel, R., Zhou M-M. y van Etten, R.L. (1992) Overexpression, site-directed mutagenesis, and mechanism of *Escherichia coli* acid phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 267, 22830-22836.
- Pallauf, J., Höler D. y Rimbach, G. (1992) Effekt einer Zulage an mikrobieller Phytase zu einer Mais-Soja-Diät auf die scheinbare Absorption von Mg, Fe, Cu, Mn und Zn sowie auf Parameter des Zinkstatus beim Ferkel. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 68, 1-9.
- Pallauf, J. y Rimbach, G. (1997) Nutritional significance of phytic acid and phytase. *Arch Tierernahr.*, 50, 301-319.
- 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.
- Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M. y Van Loon, A.P.G.M. (1997) Gene Cloning, Purification, and Characterization of a Heat-Stable Phytase from the Fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(5), 696-1700.
- Peers, F.G. (1953) The phytase of wheat. *Biochem. J.*, 53, 102-110.

- Phillippy, B.Q. y Mullaney, E.J. (1997) Expression of an *Aspergillus niger* phytase (*phyA*) in *Escherichia coli*. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3337-3342.
- 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.
- 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.
- Raboy, V. y Dickinson, D.B. (1993) Phytic acid levels in seeds of *Glycine max* and *G. soja* as influenced by phosphorus status. *Crop. Sci.*, 33, 1300-1305.
- Radcliffe, J.S., Zhang, Z. y Kornegay, E.T. (1998) The effects of microbial phytase, citric acid, and their interaction in a corn-soybean meal-based diet for weanling pigs. *J. Anim. Sci.*, 76, 1880-1886.
- Ranhotra, G.S., Gelroth, J.A., Torrence, F.A., Bock, M.A. y Winterringer, G.L. (1981) Bread (white and whole wheat) and not fat dry milk as sources of bioavailable calcium for rats. *J. Nutr.*, 111, 2081-2086.
- Ravindran, V., Ravindran, G. y Sivalogan. S. (1994) Total and phytate phosphorus contents various foods and feedstuffs of plant origin. *Food Chem.*, 50, 133-136.

- Reddy, N.R., Pierson, M.D. y Salunkhe, D.K. (1982a) Legumes-Based Fermented Foods. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 17, 335-370.
- Reddy, N.R., Sathe S.K. y Salunkhe, D.K., (1982b) Phytates in legumes and cereals. *Adv. Food Res.*, 28, 1-92.
- Robinson, D. (1991) *Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos* Ed. Acribia, Zaragoza 531 pp.
- Saez P.J. (2003) Utilización digestiva de dietas con distintos niveles de inclusión de harina de lupino (*Lupinus albus*) en juveniles de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis de grado Esc. de acuicultura y Cs. Veterinarias. Facultad de Ciencias. Univ. Católica de Temuco. Temuco, 69 pp.
- Sales, J. y Britz, P. (2003) Apparent and true availability of amino acids from common feed ingredients for South African abalone (*Haliotis midae* L.) *Aquaculture Nutr.* 9., 55-64.
- Schindler, B., Lantsch, H.J., Schöner, F.J., Biesalski, H.K., Mosenthin, R y Drochner, W (1997) The efficacy of plant and microbial phytases for growing pigs. *J. Anim. Sci.* 75 (Suppl. 1): 183 (Abstr.).
- Schroder, B., Breves, G. and Rodehutscord, M. (1996) Mechanisms of intestinal phosphorus absorption y availability of dietary phosphorus in pigs. *DTW Dtsch Tierarztl Wochensc.*, 103, 209-14.

- Scott, J.J. (1991) Alkaline phytase activity in nonionic detergent extracts of legume seeds. *Plant. Physiol.*, 95, 1298-1301.
- Selle, P.H., Ravindran, V., Caldwell, R.A., y Bryden, W.L. (2000) Phytate and phytase: consequences for protein utilisation. *Nutr. Research Reviews* 13, 255-278
- Shamsuddin, A.M., Yang, G.Y. y Vucenik, I.N. (1996) Anticancer functions of Ips: growth-inhibition and differentiation of human mammary-cancer cell-lines in *vitro*. *Anticancer Res.*, 6A, 3287-3292.
- Shamsuddin, A.M. y Vucenik, I. (1999) Mammary tumor inhibition by IP6: a review. *Anticancer Res.*, 19, 3671-3674.
- Siegenberg, D., Baynes, R.D., Bothwell, T.H., Mcfarlane, B.J., Lamparelli, R.D., Car, N.G., Macphail, P., Schmidt, U., Tal, A. y Mayet, F. (1991) Ascorbic acid prevents the dose-dependent inhibitory effects of polyphenols and phytates on nonheme-iron absorption. *Am. J. Clinical Nutr.*, 53, 537-541.
- Simpson, K.M., Morris, E.R. y Cook, J.D. (1981) The inhibitory effect of bran on iron absorption in man. *Am. J. Clinical. Nutr.*, 34, 1469-1478.
- Skoglund, E, Larsen, T. y Sandberg A.S. (1997) Comparison between steeping and pelleting a mixed diet at different calcium levels on phytate degradation in pigs. *Canadian. J. Anim. Sci.*, 77, 471-477.

- Slavin, J., Jacobs, D. y Marquart, L. (1997) Whole grain consumption and chronic disease protective mechanisms. *J. Nutr. Cáncer.*, 1, 14-21.
- Snider, M. y Liebman, M. (1992) Calcium additives and sprouted wheat effects on phytate hydrolysis in whole wheat bread. *J. Food. Sci.*, 57, 118-120.
- Stahl, C.H., Han, Y.M., Roneker, R., y Lei, X.G. (1998) Supplemental dietary phytase improves iron bioavailability to weanling pigs. *J. Anim. Sci.*, 76 (Suppl.1), 178.
- 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.
- TSCA, (1997) Attachment I--Final risk assessment for *Aspergillus niger*. *Area of EPA's Web Site.*, 1-24
- Thomlinson, R.V. y Ballou, C.E. (1962) *myo*-Inositol polyphosphate intermediates in the dephosphorylation of phytic acid by phytase. *Biochemistry.*, 1,166-171.

- Thompson, L.V. (1987) Reduction of phytic acid concentration in protein isolates by acylation techniques. *J. AOCS.*, 64, 1712-1717.
- Thompson, L.U. y Serraino, M. (1986) Effect of phytic acid reduction on rapeseed protein digestibility and aminoacid absorption. *J. Agric. Food Chem.*, 34, 468-469.
- Thompson, L.U. (1988) Antinutrients and blood glucose. *Food Technol.*, 42, 123-132.
- Thompson, L.U. (1993) Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. *Food Res. Int.*, 26, 131-149.
- Tomschy, A., Tessier, M., Wyss, M., Brugger, R. Broger, C., Schnoebelen, L., Van Loon, A. P.G.M y Pasamontes, L. (2000) Optimization of the catalytic properties of *Aspergillus fumigatus* phytase based on the three-dimensional structure. *Protein Science.*, 9, 1304–1311.
- Torre, M., Rodríguez, A.R. y Saura-Calixto, F. (1991) Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. *CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1, 1-22.
- Tuntawiroon, M., Sritongkul, N., Rossander, H.L., Pleehachinda., R., Suwanik, R., Brune R. y Hallberg, L. (1990) Rice and iron absorption in man. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 44, 489-497.
- Turner, B., Papházy, M.J., Haygarth, P.M. y McKelvie I.D. (2002) Inositol phosphates in the environment. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 357, 449–469

- Ullah, A.H. y Gibson DM. (1987) Extracellular phytase (E.C. 3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization. *prep. Biochem.* 17(1), 63-91.
- Ullah, A.H.J. (1988) *Aspergillus ficuum* phytase: partial primary structure, substrate selectivity, and kinetic characterization. *Prep. Biochem.*, 18, 459-471
- Ullah, A.H. J. y Phillippy, B.Q. (1994) Substrate selectivity in *Aspergillus ficuum* phytase and acid phosphatases using *myo*-inositol phosphates. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 423-425.
- Vallardi, M., Morales, R., y Ávila, E. (2002) Effect of the addition to laying hens diets of phytase as an inorganic phosphorous source. *Téc Pecu Méx.*, 40(2), 181-186
- Van der Kaay, J. y Van Haastert, P.J. (1995) Stereospecificity of inositol hexakisphosphate dephosphorylation by *Paramecium* phytase. *Biochem. J.*, 312, 907-910.
- Van der Klis, J.D. y Versteegh, H.A.J. (1996) Phosphorus nutrition of poultry. In: Garnsworth, P. C., Wiseman, J and Haresign, W (eds) *Recent Advances in Animal Nutrition*. 71-83. Nottingham.
- Van Etten, R.L. (1982) Human prostatic acid phosphatase: a histidine phosphatase. *Ann. NY Acad. Sci.*, 390, 27-51.

- Van Etten, R.L., Davidson, R., Panayiotis, E.S., MacArthur, H. y Moore D.L. (1991) Covalent structure, disulfide bonding, and identification of reactive surface and active site residues of human prostatic acid phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 266, 2313-2319.
- Van Gorcom, R. F. M., W. van Hartingsveldt, P. A. van Paridon, A. E. Veenstra, R. G. M. Luiten, y G. C. M. Selten. July 1995. U.S. patent 5,436,156.
- Van Hartingsveldt, W., Van Zeijl, C.M.J., Harteveld, G.M., Gouka, R.J., Suukerbuyk, M.E.G., Luiten, R.G.M., Van Paridon, P.A., Selten, G.C.M., Veenstra, A.E., Van Gorcom, R.F.M. y Van den Hondel, A.M.J.J. (1993) Cloning, characterization and overexpression of the phytase-encoding gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*. *Gene.*, 127, 87-94
- Vincent, J.B., Crowder M.W. y Averill, B.A. (1992) Hydrolysis of phosphate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions. *Trends Biochem. Sci.*, 17, 105-110.
- Viveros, A., Centeno, C., Brenes, A., Canales, R. y Lozano, A. (2000). Phytase and acid phosphatase in plant feedstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 9, 4009-4013.
- Wang**, C.F., Tsay, S.M., Lee, C.Y., Liu, S.M. y Aras, N.K. (1992) Phytate content in taiwanese diet determined by <sup>31</sup>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.

- Wang, X., Upatham, S., Panbangred, W., Isarangkul, D., Summpunn, P., Wiyakrutta, S. y Meevootisomd, V. (2004) Purification, Characterization, Gene Cloning and Sequence Analysis of a Phytase from *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* XY-5. *ScienceAsia.*, 30, 383-390.
- Ward, O.P (1989) Fermentation biotechnology. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Wheeler, E. y Ferrel, R.E., (1971) A method for phytic acid determination in wheat and wheat fractions. *Cereal Chem.*, 48, 312-320.
- Wise A. (1986) Influence of calcium on trace metal-phytate interactions. In: E. Graf. (ed) Phytic Acid, Chemistry and Applications: 151. Pilat.us Press, Minneapolis.
- Wodzinski, R.J. y Ullah, A.H.J. (1996) Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.*, 42, 263-302.
- Wolever, T.M.S. (1990) The glycemic index. *Wld. Rev. Nutr. Diet.*, 62, 120-125.
- Wyss, M., Brugger, R., Kronenberg, A., Remy, R., Fimbel, R., Oesterhelt, G., Lehman, M. y Van Loon, A. P.G.M. (1999a) Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 367-373.
- Wyss, M., Pasamontes, L., Friedlein, A., Rémy, R., Tessier, M., Kronenberger, A., Middendorf, A., Lehmann, M., Schnoebelen, L., Röthlisberger, U., Kusznir, E., Wahl, G., Müller, F., Lahm, H.-W., Vogel, K. y Van Loon. A. P. G. M. (1999b) Biophysical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate

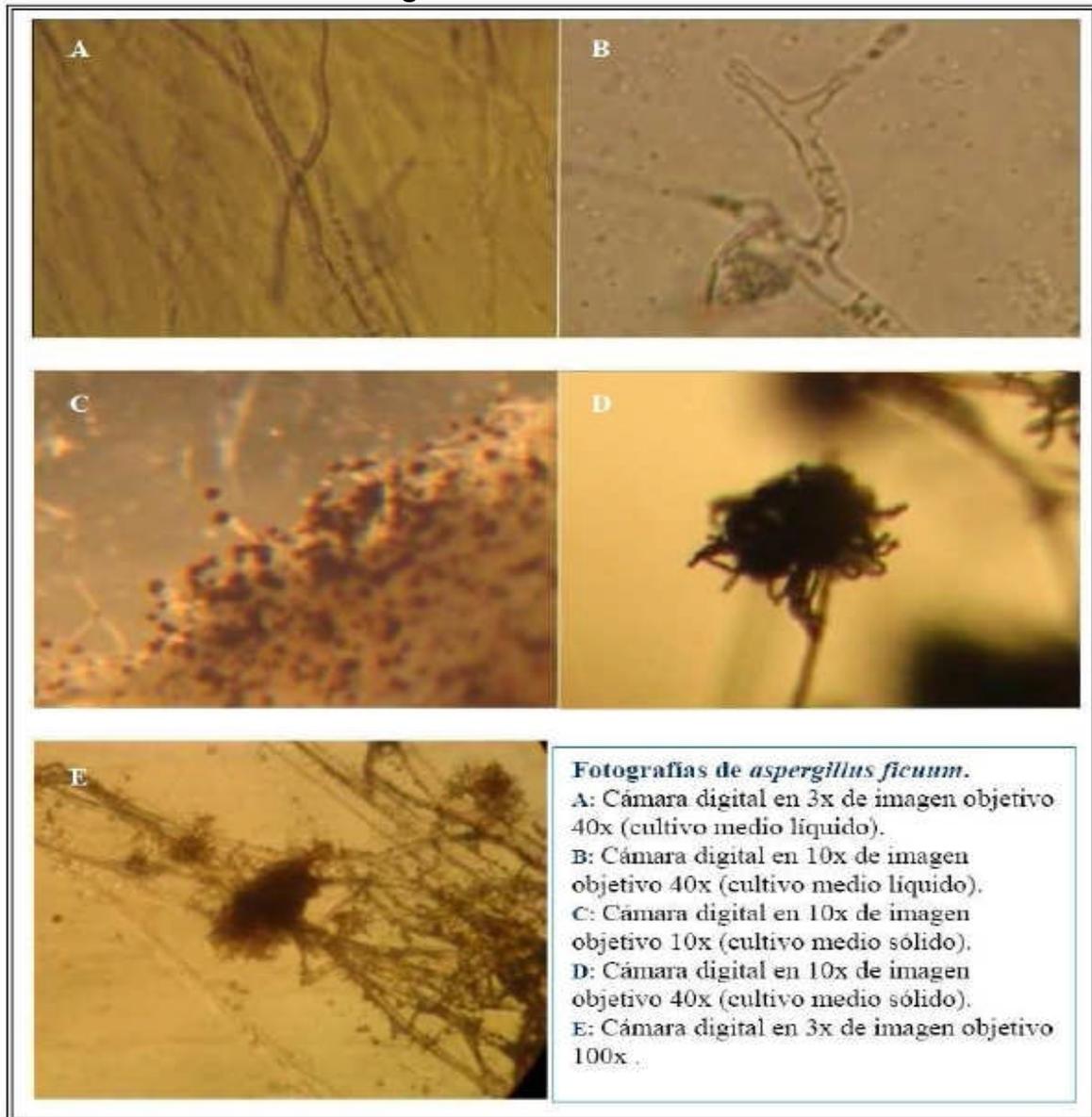
- phosphohydrolases): molecular sizes, glycosylation patterns, and engineering of proteolytic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 359-366
- Yi, Z. y Kornegay, E.T. (1996) Sites of phytase activity in the gastrointestinal tract of young pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 61, 361-368.
- Yoon, J., Thompson L.U. y Jenkins, J.A. (1983) The effect of phytic acid on the *in vitro* rate of starch digestion and blood glucose response. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 38, 835-842.
- Zhou, B., He, Z., Yu, H., y Mukherjee, K.D. (1990) Proteins from Double-Zero Rapeseed. *J. Agric. Food Chem.* 38, 690-694.
- Zhou, J.R. y Erdman J.W.Jr. (1995) Phytic acid in health and disease. *C.R.C. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 35, 495-508.
- Zyla, K. (1993) The role of acid phosphatase activity during enzymic dephosphorylation of phytates by *Aspergillus niger* phytase. *World J. Microb. Biotech.*, 9, 117-119.

**ANEXOS**

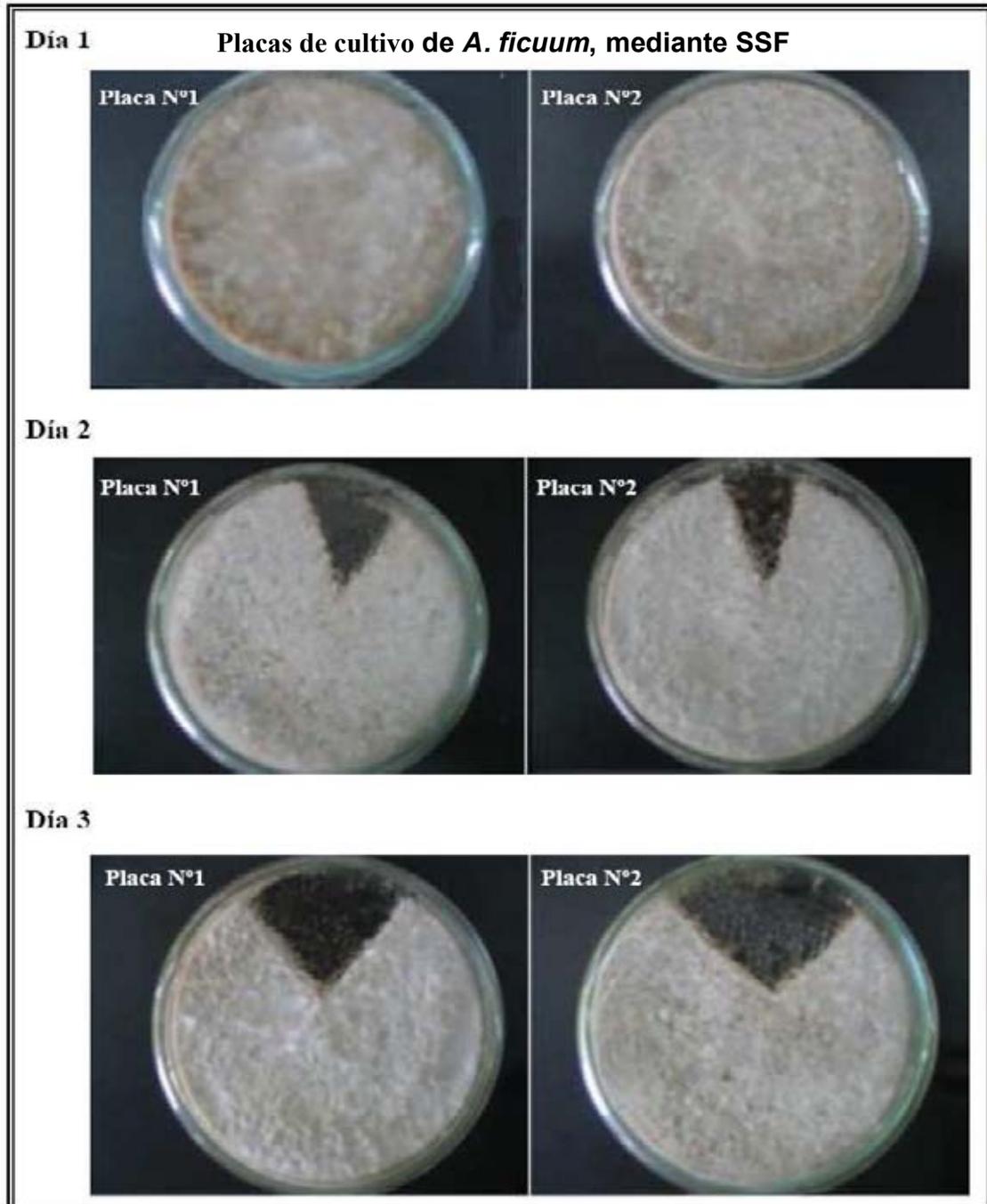
Anexo 1. Fotografías de cultivos de *A. ficuum*.

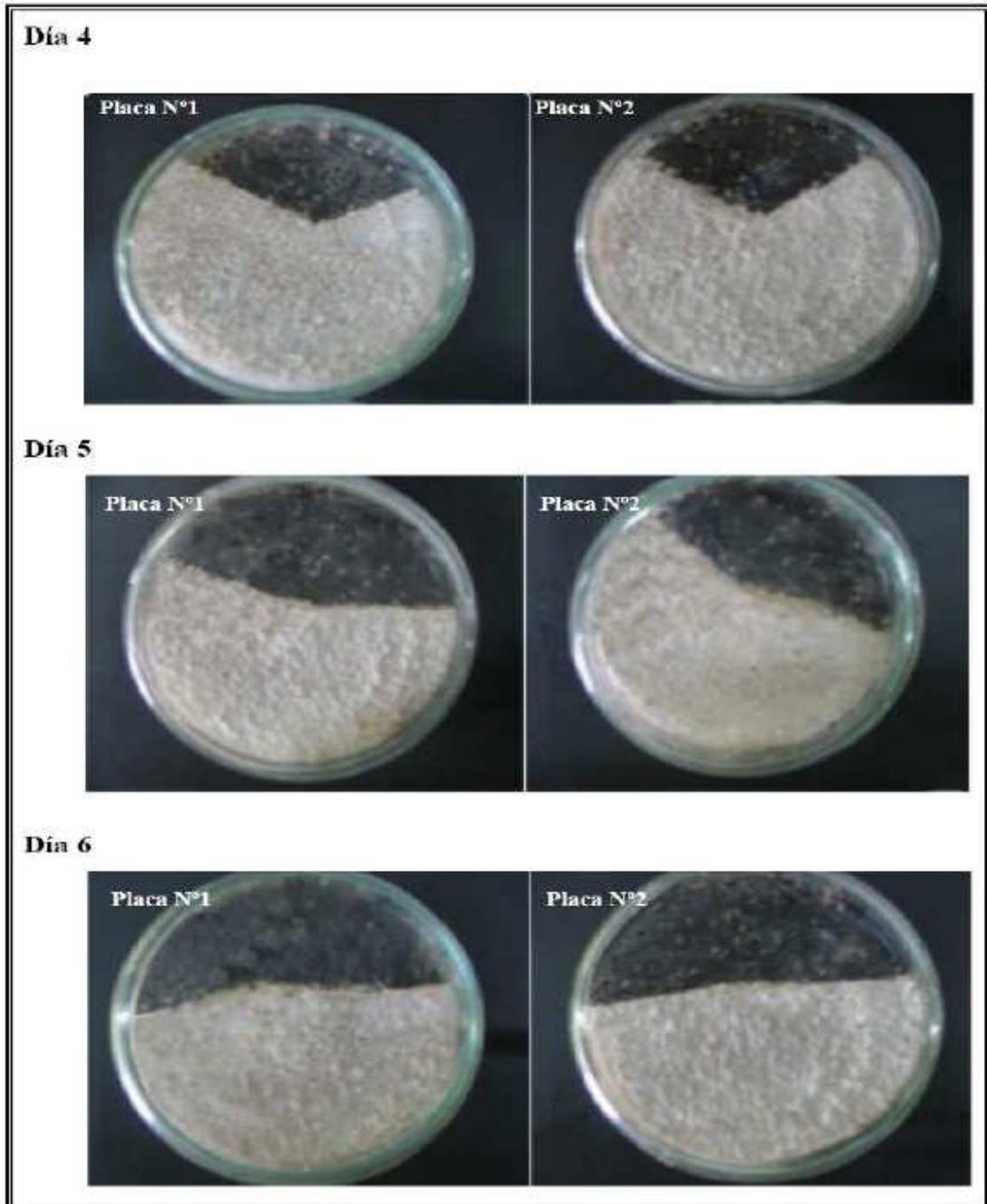
Figura 16.

Imágenes de cultivos de *A. ficuum*



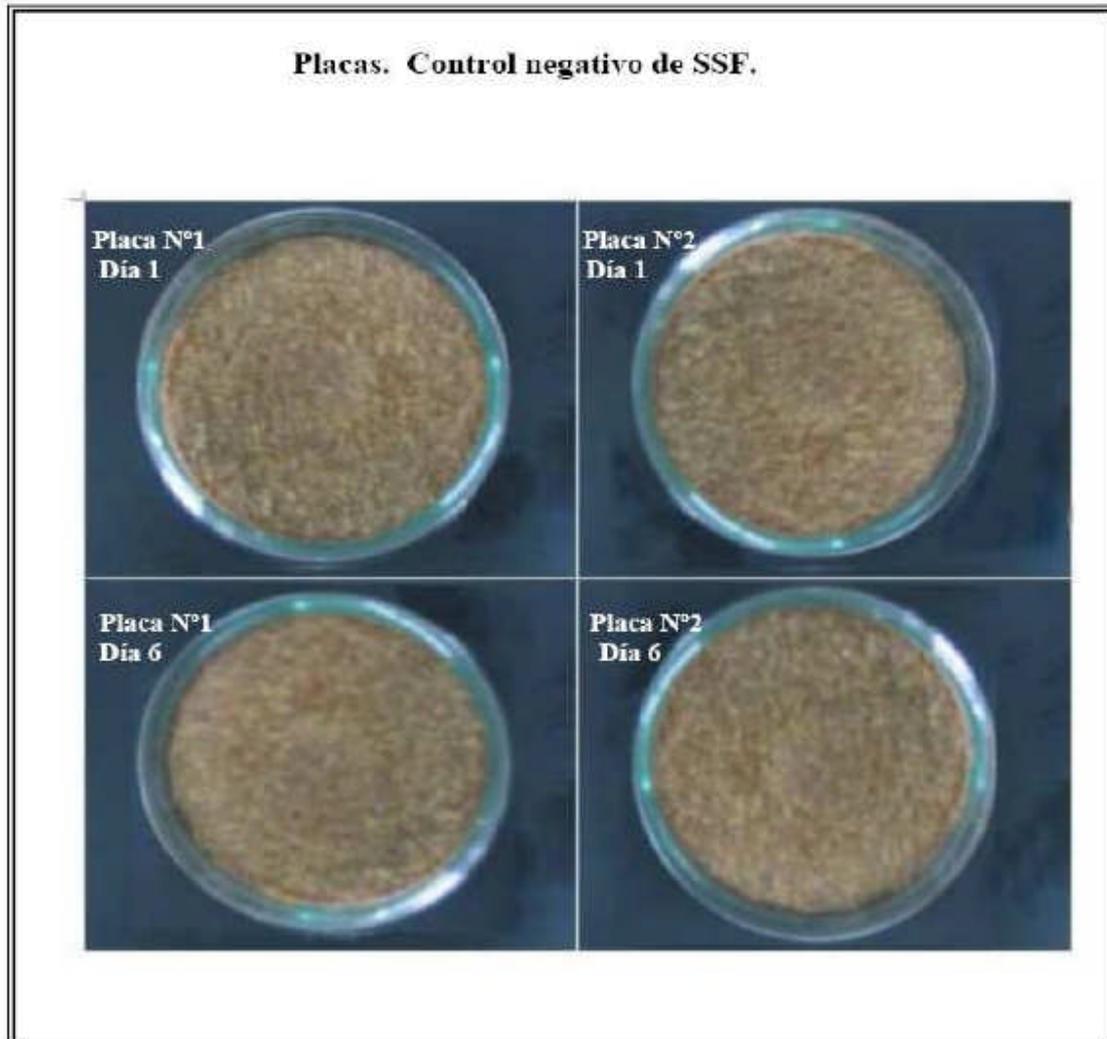
**Figura:** Imágenes de cultivos de *A. ficuum* obtenidos a través de la realización de la presente tesis.

**Anexo 2. Crecimiento de la cepa DSM 932 de *A. ficuum*, mediante SSF.****Figura 17**



**Figura:** Imágenes de cultivos de *A. ficuum* obtenidos a través de 6 días de cultivo en una fermentación en sustrato sólido.

Figura 18.



**Figura:** Imágenes de controles negativos de cultivos de *A. ficuum* para una fermentación en sustrato sólido, en un periodo de 6 días.

Anexo 3. Crecimiento de la cepa DSM 932 de *A. ficuum*, mediante SmF.

Figura 19.

Muestras de cultivo de *A. ficuum*, mediante SmF

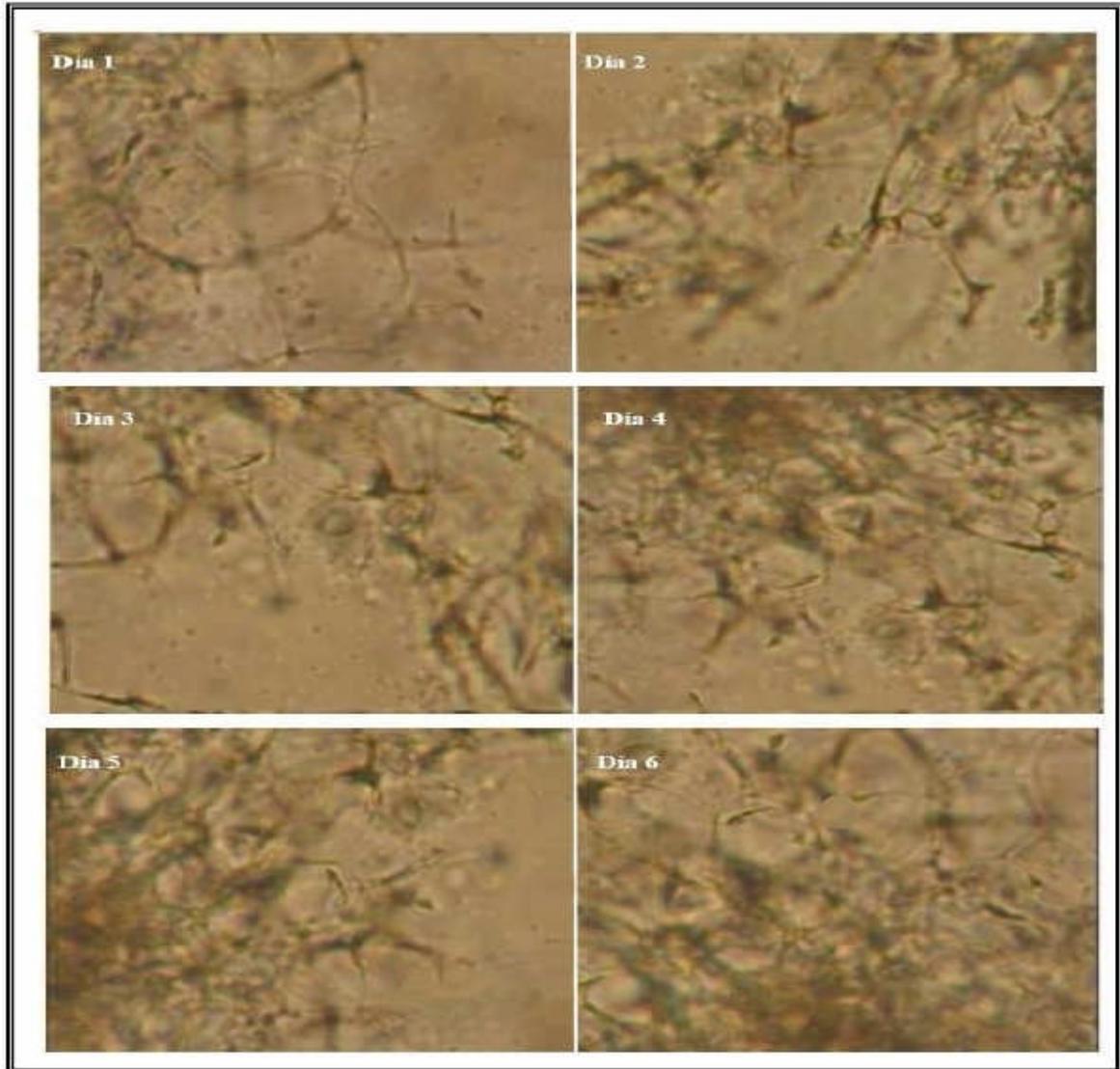


Figura: Imágenes de cultivos de *A. ficuum* obtenidos a través de 6 días en una fermentación en cultivo sumergido.

**Figura 20.**

**Figura:** Imágenes de control negativo del cultivo de *A. ficuum* para en una fermentación en cultivo sumergido (medio sin inocular).

#### **Anexo 4. Consideraciones en la preparación de la curva de calibración.**

1. Las concentraciones están calculadas de acuerdo a:

El volumen de Pi + H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, 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 H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>; 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 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (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 H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, que se agrega para mantener la equivalencia con el mL (1 mL) de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> que es agregado a las muestras, en el ensayo enzimático.

2. En la preparación de la curva de calibración se tomó en cuenta:

- La preparación del reactivo de Taussky-Shorr que se utiliza, fuese la misma que el que se va a usar en las muestras del ensayo. (Una curva por cada preparación de reactivo).
- Los tubos de ensayo deben haber sido lavados con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y secados antes de su uso, ya que el fosfato procedente de restos de detergentes altera los resultados obtenidos.

**Anexo 5. Preparación de 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  $\text{H}_2\text{O}$ .

**Anexo 6. Consideraciones en la medición de muestras del ensayo enzimático.**

Como parte del protocolo de ensayo enzimático (producto de los resultados obtenidos en el montaje y evaluación del método), se diseñó el siguiente procedimiento a tener a consideración:

- El reactivo de Taussky-Shorr debe ser agregado en el siguiente orden: para cada muestra se agrega a su Rx. (+) e inmediatamente a su Rx. (-), y así sucesivamente para cada muestra a analizar.
- Para cada muestra medir la abs. de su Rx. (+), e inmediatamente medir la abs. correspondientes a su Rx. (-).

En el caso de las muestras de cultivo recolectadas a través del tiempo; todas ellas son analizadas al mismo tiempo, para evitar las pequeñas variaciones que se puedan producir por el procedimiento del ensayo.

Se realiza una curva de calibración cada vez que se procedió a un ensayo mediciones de la actividad de las muestras. Esto se lleva a cabo ya que el reactivo de Taussky-Shorr debe ser agregado preparado fresco; y debido a ello pueden producirse pequeñas variaciones entre las diferentes preparaciones del reactivo en fresco; con lo cual se puede provocar pequeñas variaciones de absorbancias.

También se procedió a lavar los tubos de ensayo con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y a secarlos antes de su uso, ya que el fosfato procedente de restos de detergentes interfiere en el cálculo de los resultados.

## **Anexo 7. Preparación de inóculos.**

**1.-** Primeramente se procedió a la activación de un cultivo antiguo refrigerado de la cepa de *A. ficuum* mediante el siguiente protocolo de **Cultivo de *A. ficuum* en Agar Papa Dextrosa en tubo inclinado.**

- a.- Agregar en al interior del tubo con Agar inclinado, un trozo de Agar pequeño (aprox. 0,5 cm<sup>2</sup>) proveniente de un cultivo anterior en Agar Papa Dextrosa (APD).
- b.- Cultivar por 10 días a 24 ± 1 °C; y guardar en el refrigerador hasta su uso.

**2.-** Luego se procedió al cultivo para la preparación del inóculo APD mediante el siguiente protocolo de **Cultivo de *A. ficuum* en Agar Papa Dextrosa en Placa.**

- a.- Agregar en el tubo con Agar inclinado un trozo pequeño (Ej: 0,5 cm<sup>2</sup>) proveniente de un cultivo preparado en Agar Papa Dextrosa (tubo con Agar inclinado) el cual fue agregado en el extremo de una placa de 11 cm de diámetro.
- b.- Cultivar por 20 días a 24 ± 1 °C, y guardar el cultivo en el refrigerador hasta la preparación del inóculo.

**3.-** Se procedió a la preparación del inóculo APD mediante el siguiente protocolo de **Fabricación del inóculo proveniente de un cultivo de *A. ficuum* en Agar Papa Dextrosa en Placa (inóculo APD).** (Para preparar unos 50 mL de inóculo APD)

- a.- Se procede a abrir la placa y agregar un pequeño volumen de agua destilada estéril (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) (unos 2 mL), procediendo posteriormente a raspar la superficie del Agar suavemente y depositar la suspensión en un frasco estéril.

b.- Lavar con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> estéril el interior de la placa y depositar el lavado en el mismo frasco estéril hasta completar los 50 mL de inóculo, y guardar el inóculo en el refrigerador hasta su uso como inóculo para SSF, y preinoculo para SmF.

4.- Como inóculo para SmF se procedió mediante el siguiente protocolo de **Fabricación del inóculo proveniente de un cultivo de *A. ficuum* en un medio natural de cereales en solución (C2). (Inóculo C2)**. (Para preparar unos 200 mL de inóculo C2)

- a.- Preparar 199 mL de medio C2 (ver 3.2.4 de Materiales y métodos, paso 2; cultivo de *Aspergillus* en medio C2) en un matraz de 500 mL y autoclavar.
- b.- Agregar en el medio 1 mL de un inóculo APD (inóculo al 1%).
- c.- Cultivar por 5 días a  $24 \pm 1$  °C, en agitación. Y guardar el inóculo en el refrigerador hasta su uso en la SmF.

La cepa original fue activada mediante sucesivos pasajes en agar Papa Dextrosa (APD) de tubos de agar inclinado a placas de Petri de 11 cm de diámetro, a  $24 \pm 1$  °C por períodos de 10 a 20 días, hasta lograr una tupida esporulación del micelio. Finalmente, se logró una suspensión de esporas una vez que éstas fueron removidas con agua destilada estéril, conformando el “inóculo madre” que es mantenido en refrigeración, para ser usado para las fermentaciones en sustrato sólido (SSF).

Para las fermentaciones en cultivo sumergido (SmF), el inóculo es logrado a partir de un cultivo previo del mismo medio de cultivo, inoculado al 1% del “inóculo madre”, y este nuevo inóculo es agregado al medio en el fermentador al 10%.

### **Anexo 8. Preparación de muestras para medición de actividad de fitasa.**

Se procedió a la preparación adecuada de las muestras a partir del siguiente protocolo creado:

**Protocolo:** Cálculo de dilución de muestras a analizar para el ensayo enzimático de medición de actividad de fitasa. Para conocer las concentraciones adecuadas de las muestras para su uso en el método utilizado, se procede a realizar sucesivas diluciones (con H<sub>2</sub>O) de las muestras a analizar. Los niveles de dilución elegidos fueron elegidos abarcando un rango amplio de diluciones: 1/1 (muestra original); 1/10; 1/20; 1/30; 1/40. Las muestras a calcular sus diluciones se realizaron en muestras correspondientes al:

- Control negativo (por posible presencia de fósforo).
- Muestra que debiera presentar menor actividad teóricamente.
- Muestra que debiera presentar mayor actividad teóricamente.

A cada muestra a analizar se le realizó el ensayo enzimático de las diferentes diluciones “por duplicado”; igual que lo descrito en materiales y métodos. Y se eligió la dilución que presentaron valores de absorbancia dentro de los valores correspondiente a la lineal de la curva. Luego se procedió a la dilución de todas las muestras para la realización del ensayo enzimático.

\* Calculo de diluciones para un volumen de 10 mL:

$$X = \frac{1 \times 10}{\text{N}^\circ \text{ veces diluida}} = \text{mL de muestra original del extracto}$$

## Anexo 9. Tablas de resultados.

Cuadro 3.

<b><u>Exactitud del método de ensayo enzimático</u></b>	
<b>Nº Determinación</b>	<b>Absorbancia (660 nm)</b>
1	0,664
2	0,663
3	0,664
4	0,666
Muestra de valor teórico por interpolación en la curva de calibración	0,667

Cuadro 4.

<b><u>Precisión en relación a la estabilidad del color en muestras para ensayo de enzimático</u></b>								
<b>Tiempo (30 min)</b>				<b>Tiempo (55 min)</b>				<b>Δ (Δ Abs 30 y 55min)</b>
<b>Nº Muestra</b>	<b>Abs Reac (+)</b>	<b>Abs Reac (-)</b>	<b>Δ Abs</b>	<b>Nº Muestra</b>	<b>Abs Reac (+)</b>	<b>Abs Reac (-)</b>	<b>Δ Abs</b>	
1	0,481	0,384	0,097	1	0,614	0,516	0,098	0,001
2	0,444	0,367	0,077	2	0,568	0,492	0,076	0,001
3	0,379	0,364	0,015	3	0,485	0,472	0,013	0,002
4	0,428	0,364	0,077	4	0,545	0,470	0,075	0,002
5	0,400	0,359	0,041	5	0,512	0,473	0,039	0,002
6	0,476	0,383	0,093	6	0,607	0,515	0,092	0,001
7	0,411	0,355	0,056	7	0,525	0,469	0,056	0,000
8	0,434	0,377	0,057	8	0,553	0,497	0,056	0,001
9	0,422	0,350	0,072	9	0,540	0,467	0,073	0,001
10	0,429	0,370	0,059	10	0,548	0,487	0,061	0,002
11	0,476	0,378	0,098	11	0,608	0,511	0,097	0,001

Tiempo (30 min)				Tiempo (55 min)				$\Delta$ ( $\Delta$ Abs 30 y 55min)
Nº Muestra	Abs Reac (+)	Abs Reac (-)	$\Delta$ Abs	Nº Muestra	Abs Reac (+)	Abs Reac (-)	$\Delta$ Abs	
12	0,440	0,369	0,071	12	0,563	0,494	0,069	0,002
13	0,370	0,339	0,031	13	0,474	0,445	0,029	0,002
14	0,411	0,368	0,043	14	0,525	0,484	0,041	0,002
15	0,437	0,368	0,069	15	0,558	0,489	0,069	0,000
16	0,482	0,349	0,133	16	0,615	0,483	0,132	0,001
17	0,476	0,369	0,107	17	0,607	0,502	0,105	0,002
18	0,598	0,404	0,194	18	0,762	0,568	0,194	0,000
19	0,546	0,378	0,168	19	0,698	0,531	0,167	0,001
20	0,528	0,384	0,144	20	0,675	0,533	0,142	0,002

**Abs Reac (+):** absorbancia en condiciones de reacción enzimática positiva.

**Abs Reac (-):** absorbancia en condiciones de reacción enzimática negativa.

**$\Delta$  Abs:** diferencia de las Abs, correspondiente al Pi liberado producto de las condiciones de reacción positiva.

**( $\Delta$  Abs 30 y 55min):** diferencia entre las  $\Delta$  Abs producidas entre los distintos tiempos.