

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**



**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA FITASA C
DE *Bacillus subtilis* Y DE SUS FORMAS RECOMBINANTES**

Por

Q.B.P. Jesús Gerardo Carreon Treviño

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
con Especialidad en Biotecnología**

Septiembre 2008

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA FITASA C DE *Bacillus subtilis* Y DE SUS FORMAS RECOMBINANTES



Comisión de tesis:

Comisión de tesis:

DRA. MARTHA GUERRERO OLAZARÁN
Directora de Tesis

DR. JOSÉ MARÍA VIADER SALVADÓ
Secretario

DR. LUIS J. GALÁN WONG
Vocal 1

DRA. LILIA H. MORALES RAMOS
Vocal 2

DRA. L. ELIZABETH CRUZ SUÁREZ
Vocal 3

DRA. DIANA RESENDEZ PEREZ
Subdirectora de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Martha Guerrero Olazarán** por el privilegio de contar con su apoyo y asesoría constante, necesarios para lograr la conclusión de esta etapa, por su guía y consejos, pilares importantes en mi formación académica y sobre todo por motivarme y enseñarme el maravilloso campo de la investigación.

Al **Dr. José María Viader Salvadó** por su invaluable apoyo y consejos en todo momento recibidos y por la gran oportunidad de interactuar en el campo de investigación.

Al **Dr. Luis Jesús Galán Wong** por su distinguida amistad, apoyo y consejos dados durante todo momento que han sido muy valiosos y motivantes para lograr la superación en el campo académico.

A la **Dra. Lilia H. Morales Ramos** por su apoyo otorgado durante todo el tiempo que duro este proyecto y por formar parte de la comisión de tesis.

A la **Dra. Elizabeth Cruz Suárez**, por sus comentarios brindados y por formar parte de la comisión de tesis.

A la **M en C Eddy Luz Cab Barrera** por sus comentarios y consejos siempre brindados de manera incondicional, gracias.

A la **QBP Lucila Adriana Galán Franco** sin su apoyo no hubiera iniciado este proyecto tan importante para mi, gracias por tu amistad.

Al **QBP José Antonio Fuentes Garibay** por su amistad, por el apoyo técnico brindado y por sus comentarios tan acertados, gracias. Al **QBP Juan Antonio Gallegos López** por el apoyo técnico brindado y por sus comentarios tan acertados.

A la **LCA Karen Patricia Contreras Torres** por su amistad, por la compañía en las jornadas largas de trabajo y por el apoyo técnico brindado, mil gracias...

A mis compañeros de Laboratorio **Eddy, Lili, Antonio, Karen, Juan, Mauricio, Miguel, Alejandra, Ramiro, Enrique, Eneida, Ángel y Alberto** por compartir conmigo la experiencia de formar juntos una excelente equipo de trabajo.

Al programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnología (PAICYT) y al Fondo SAGARPA-CONACYT por el apoyo económico otorgado para financiar este proyecto

Al CONACYT por la beca otorgada durante todo el programa de postgrado cursado.

DEDICATORIA

A Dios Nuestro Señor por permitirme llegar con éxito al final de este proyecto tan importante para mí, gracias por darme la fuerza de seguir continuando con la fe de no desistir en mi superación profesional.

A mis padres *Sr. José María Carreón Leal y la Sra. Amelia Treviño Treviño* quienes me dieron la vida, su cariño y comprensión, sin pedir nada a cambio. Además de forjar en toda la familia el respeto, al trabajo y los buenos principios. ¡Gracias!

A mis hermanos *José María, Juan Ángel y Emma Cecilia*, por su comprensión y cariño

A mis queridos sobrinos *Daniela, Juanito, Gael, Montserrat y Greco* porque son todo mi querer.

A mis ahijados *Daniela Carlos, Montserrat y Greco* son una bendición que dios me mando.

A mis amigos: *Rogelio, Luz, Luis y Lucy Galán* que siempre me acompañaron y comprendieron mi esfuerzo, quienes me apoyaron cuando lo necesité y vivieron conmigo el progreso de mi Doctorado, gracias por sus consejos y su ayuda desinteresada.

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad”

Albert Einstein

La vida es inconcebible sin las enzimas. La mayoría de las miles de reacciones bioquímicas que mantienen los procesos vivos se producirían a velocidades imperceptibles sin las enzimas. Las enzimas son catalizadores enormemente potentes que exhiben una especificidad elevada. Sus actividades catalíticas pueden regularse de forma precisa.

Área de trabajo:

El presente trabajo titulado “CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA FITASA C DE *Bacillus subtilis* Y DE SUS FORMAS RECOMBINANTES” se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Molecular (L5) del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la Dirección de la Dra. Martha Guerrero Olazarán y la Co-Dirección del Dr. José María Viader Salvadó.

Parte del presente trabajo ha sido presentado en forma de cartel en los siguientes congresos:

M. Guerrero-Olazarán, L. Rodríguez-Blanco, J.G. Carreon-Treviño, J.A. Gallegos-López, M. Castillo-Galván, J.M. Viader-Salvadó Bacterial phytase produced in *Pichia pastoris*. 13th European Congress on Biotechnology, Barcelona, España. 16-19 Septiembre de 2007.

J. A. Gallegos-López, J. G. Carreón-Treviño, A. Rojo-Domínguez, M. Guerrero-Olazarán, J.M. Viader-Salvadó “Construcción de cepas recombinantes de *Pichia pastoris* productoras de una fitasa termoestable”. BioMonterrey06, Coordinación de Ciencia y Tecnología, Gobierno del Estado de Nuevo León, Monterrey, N.L., (México), 20-24 de Septiembre de 2006.

J. G. Carreón-Treviño, K. P. Contreras-Torres, J. M. Viader-Salvadó, M. Guerrero-Olazarán, “Biochemical comparison of five microbial phytases”. Second International Congress of Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries. Saltillo, Coahuila, (México), 16-18 de Octubre de 2006.

Además ha sido publicado y aceptado para su publicación en:

M. Guerrero-Olazarán, L. Rodríguez-Blanco, J.G. Carreon-Treviño, J.A. Gallegos-López, M. Castillo-Galván, J.M. Viader-Salvadó. 2007. Bacterial phytase produced in *Pichia pastoris*. Journal of Biotechnology 131(2):S233-S234. ISSN: 0168-1656

Viader-Salvadó, J.M., Carreón-Treviño, J.G., Contreras-Torres, K.P., Guerrero-Olazarán, M. Biochemical comparison of five microbial phytases. En: Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries. Vol. 2. En impresión.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	v
ÁREA DE TRABAJO.....	vi
LISTA DE TABLAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
NOMENCLATURA.....	xviii
RESUMEN.....	xx
ABSTRACT.....	xxi
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 HIPÓTESIS.....	3
3 OBJETIVOS.....	4
3.1. Objetivo general.....	4
3.2. Objetivos específicos.....	4
4 ANTECEDENTES.....	5
4.1. Generalidades sobre el ácido fítico.....	5
4.2. Generalidades sobre las fitasas.....	8
4.3. Clasificación de las fitasas.....	12
4.4. Propiedades bioquímicas de las fitasas.....	18
4.5. Parámetros cinéticos y actividades específicas.....	27
4.6. Aplicación biotecnológica de las fitasas.....	31
5 MÉTODOS.....	46
5.1. Reactivos y material biológico.....	46
5.2. Equipo.....	47
5.3. Estrategia experimental.....	48
5.4. Actividad enzimática de fitasa.....	49
5.4.1. Determinación de la actividad de fitasa y definición de conceptos.....	49

5.4.2.	Determinación de la actividad residual.....	53
5.4.3.	Determinación de proteínas totales.....	54
5.4.4.	Análisis SDS-PAGE.....	55
5.5	Cultivos bajo condiciones de inducción de tres genes codificantes para fitasas del género <i>Bacillus</i>	55
5.5.1.	Cultivos de <i>Bacillus subtilis</i> bajo condiciones de inducción.....	55
5.5.2.	Cultivos de <i>Pichia pastoris</i> bajo condiciones de inducción.....	57
5.5.3.	Análisis de los cultivos de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Pichia pastoris</i>	59
5.5.3.1.	Determinación de parámetros de crecimiento del cultivo de <i>Bacillus subtilis</i>	59
5.5.3.2.	Comportamiento de los cultivos de <i>Pichia pastoris</i>	59
5.5.3.3.	Determinación de la concentración de proteínas totales.....	60
5.5.3.4.	Determinación de la actividad enzimática.....	60
5.6.	Obtención de preparaciones semipurificadas de la Fitasa C de <i>Bacillus subtilis</i>	62
5.7.	Obtención de preparaciones semipurificadas de la Fitasa C recombinante y de la Fitasas C modificada recombinante producidas en <i>Picha pastoris</i>	63
5.8.	Obtención de preparaciones de dos fitasas comerciales: Natuphos y Allzyme SSF.....	65
5.9.	Caracterización bioquímica de las fitasas.....	66
5.9.1.	Peso molecular: Análisis de SDS-PAGE.....	66
5.9.2.	Evaluación y comparación de la actividad enzimática a diferentes valores de pH.....	66
5.9.3.	Evaluación y comparación de la actividad enzimática a diferentes temperaturas.....	68
5.9.4.	Evaluación y comparación de la estabilidad a 37°C.....	69
5.9.5.	Evaluación y comparación de termoestabilidad a 37, 60 y 80°C.....	70
5.9.6.	Evaluación y comparación de la estabilidad a la proteólisis por las enzimas digestivas de camarón (<i>Litopenaeus vannamei</i>).....	73
5.9.7.	Evaluación y comparación de la estabilidad a la proteólisis por la enzima tripsina porcina.....	81
5.9.8.	Determinación del valor de Km de la Fitasa C recombinante.....	86
5.9.9.	Análisis estadístico.....	87

6	RESULTADOS.....	89
6.1.	Cultivos bajo condiciones de inducción de tres fitasas del género <i>Bacillus</i>	89
6.1.1.	Cultivos de <i>Bacillus subtilis</i> bajo condiciones de inducción.....	89
6.1.1.1.	Determinación de parámetros de crecimiento del cultivo de <i>Bacillus subtilis</i>	89
6.1.1.2.	Determinación de la concentración de proteínas totales.....	90
6.1.1.3.	Determinación de la actividad enzimática.....	91
6.1.2.	Cultivos de <i>Pichia pastoris</i> bajo condiciones de inducción.....	92
6.1.2.1.	Comportamiento de los cultivos de <i>Pichia pastoris</i>	92
6.1.2.2.	Determinación de la concentración de proteínas totales.....	93
6.1.2.3.	Determinación de la actividad enzimática de fitasa.....	94
6.2.	Obtención de preparaciones semipurificadas de la Fitasa C de <i>Bacillus subtilis</i>	94
6.3.	Obtención de las preparaciones semipurificadas de la Fitasa C recombinante y de la Fitasas C modificada recombinante producidas en <i>Picha pastoris</i>	95
6.4.	Obtención de preparaciones de dos fitasas comerciales: Natuphos y Allzyme SSF.....	96
6.5.	Caracterización bioquímica de las fitasas.....	96
6.5.1.	Análisis del peso molecular por SDS-PAGE.....	96
6.5.2.	Evaluación y comparación de la actividad enzimática a diferentes valores de pH.....	97
6.5.3.	Evaluación y comparación de la actividad enzimática a diferentes temperaturas.....	99
6.5.4.	Evaluación y comparación de la estabilidad a 37°C... ..	101
6.5.5.	Evaluación y comparación de termoestabilidad a 37, 60 y 80°C.....	102
6.5.6.	Evaluación y comparación de la estabilidad a la proteólisis por las enzimas digestivas de camarón (<i>Litopenaeus vannamei</i>).....	111
6.5.7.	Evaluación y comparación de la estabilidad a la proteólisis por la enzima tripsina porcina.....	118
6.5.8.	Determinación del valor de Km de la Fitasa C recombinante.....	124
7	DISCUSIÓN.....	126
8	CONCLUSIONES.....	143

APÉNDICES.....	147
LITERATURA CITADA	164
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	187

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Litado de fitasas producidas por diversas fuentes y hospederos empleados para la producción de las formas recombinantes.....	10
II	Especificidad de sustrato de fosfatasas ácidas de histidina (HAPs) y fitasas alcalinas de varios organismos.....	14
III	Clasificación de fitasas de acuerdo a sus propiedades bioquímicas y moleculares.....	16
IV	Propiedades bioquímicas y moleculares de fitasas de diversas fuentes.....	19
V	Información de la producción de fitasas microbianas comerciales.....	44
VI	Descripción de las enzimas usadas en este proyecto. Origen, clasificación y referencia bibliográfica.....	46
VII.	Mezcla de reacción para actividad de fitasa de los géneros <i>Aspergillus</i> y <i>Bacillus</i>	51
VIII	Curva de calibración para la determinación de fósforo (fosfato).....	52
IX	Curva de calibración para la determinación de proteínas totales mediante el método Bradford.....	54
X	Actividades fíticas presentes en las preparaciones enzimáticas en el ensayo de susceptibilidad con Hp 1X.....	77
XI	Actividades fíticas presentes en las preparaciones enzimáticas en el ensayo de susceptibilidad con Hp 10X.....	77
XII	Actividades fíticas presentes en las preparaciones enzimáticas en el ensayo de susceptibilidad con Hp 40X.....	78
XIII	Actividades fíticas presentes en las preparaciones enzimáticas en el ensayo de susceptibilidad con tripsina 1X.....	83

LISTA DE TABLAS
(Continuación)

XIV	Actividades fíticas presentes en las preparaciones enzimáticas en el ensayo de susceptibilidad con tripsina 10X.....	83
XV	Concentraciones del fitato de sodio presentes en la reacción enzimática para la determinación del valor de la Km de la PhyC-R.....	87
XVI	Proteínas totales extracelulares de los sobrenadantes crudos de la Fitasa C de <i>B. subtilis</i> a diferentes tiempos de inducción.....	91
XVII	Comportamiento de los cultivos de <i>Pichia pastoris</i>	93
XVIII	Purificación de la Fitasa C de <i>Bacillus subtilis</i> VTT E-6803 (PhyC-N).....	95
XIX	Purificación de la Fitasa C recombinante (PhyC-R)....	95
XX	Purificación de la Fitasa C modificada recombinante (FTE).....	96
XXI	Valores de propiedades bioquímicas de las fitasas evaluadas	142

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Efecto de pH y metales en la fisiología natural del fitato	7
2	Ilustración de la hidrólisis del sustrato de las fosfatasas ácidas de histidinas (HAPs) y fitasas alcalinas.....	13
3	Representación esquemática de la estrategia general....	49
4	Representación general de los cultivos llevados a cabo para la inducción de PhyC de <i>Bacillus subtilis</i>	56
5	Representación general de los cultivos llevados a cabo para la inducción PhyC-R y FTE expresadas en <i>Pichia pastoris</i>	58
6	Representación general de la preparación semipurificada de la Fitasa C de <i>Bacillus subtilis</i> (PhyC-N).....	62
7	Representación general de la preparación semipurificada de la Fitasa C recombinante (PhyC-R) y de la Fitasa C modificada recombinante (FTE) producidas en <i>Pichia pastoris</i>	64
8	Representación del diseño experimental para la evaluación de la actividad enzimática a diferentes valores de pH.....	67
9	Representación del diseño experimental para la evaluación de la actividad enzimática a diferentes temperaturas (25, 37, 45, 55, 70 y 80°C) durante 30 min.....	68
10	Representación del diseño experimental para la evaluación de la estabilidad de las cinco fitasas a 37°C, 1 mM CaCl ₂ C durante 10, 30 y 120 min.....	69
11	Representación del diseño experimental de la evaluación de la termoestabilidad a tres temperaturas (37, 60 y 80 °C).....	70
12	Representación del diseño experimental de la evaluación de la termoestabilidad a pH 5.5 a 1 y 5 mM CaCl ₂	71

LISTA DE FIGURAS
(Continuación)

13	Representación del diseño experimental de la evaluación de la termoestabilidad a pH 7.5 a 1 y 5 mM CaCl ₂	72
14	Representación general de la preparación del extracto crudo de hepatopáncreas de camarón.....	74
15	Representación del diseño experimental de susceptibilidad de las fitasas del género <i>Bacillus</i> frente a las enzimas digestivas de camarón.....	76
16	Representación del diseño experimental de susceptibilidad de las fitasas del género <i>Aspergillus</i> frente a las enzimas digestivas de camarón.....	80
17.	Representación del diseño experimental de susceptibilidad de las fitasas del género <i>Bacillus</i> frente a la enzima tripsina porcina.....	82
18	Representación del diseño experimental de susceptibilidad de las fitasas del género <i>Aspergillus</i> frente a la enzima tripsina porcina.....	85
19	Gráfica semilogarítmica de Ln DO/DO ₀ vs tiempo. Crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> VVT E 68013 bajo condiciones de inducción del gen phyC.....	90
20	Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) del análisis de las preparaciones semipurificadas de las cinco fitasas (PhyC-N, PhyC-R, FTE, Natuphos y Allzyme SSF).....	97
21	Efecto de pH en la actividad de fitasa a 37 °C y 1 mM de CaCl ₂ , actividad en porcentaje respecto al valor más alto de cada fitasa.....	98
22	Efecto del la temperatura en la actividad de fitasa a 1 mM de CaCl ₂	100
23	Estabilidad de las cinco fitasa a 37 °C y 1 mM CaCl ₂	101
24	Comparación de la actividad residual a 37 °C y 10 min de las cinco fitasas a diferentes condiciones experimentales.....	103

LISTA DE FIGURAS
(Continuación)

25	Comparación de la actividad residual a 60 °C y 10 min de las cinco fitasas a diferentes condiciones experimentales.....	105
26	Comparación de la actividad residual a 80 °C y 10 min de las cinco fitasas a diferentes condiciones experimentales.....	107
27	Comportamiento de la PhyC-N en la termoestabilidad a 37, 60 y 80 °C durante 10 min, en presencia de 1 y 5 mM de CaCl ₂ a pH 5.5 y 7.5.....	108
28	Comportamiento de la PhyC-R en la termoestabilidad a 37, 60 y 80 °C durante 10 min en presencia de 1 y 5 mM de CaCl ₂ a pH 5.5 y 7.5.....	109
29	Comportamiento de la FTE en la termoestabilidad a 37, 60 y 80°C durante 10 min, en presencia de 1 y 5 mM de CaCl ₂ a pH 5.5 y 7.5.....	110
30	Comportamiento de las fitasas comerciales (Natuphos y Allzyme SSF) en la termoestabilidad a 37, 60 y 80 °C durante 10 min, en presencia de 1 mM de CaCl ₂ y pH 5.5.....	110
31	Comportamiento de susceptibilidad a enzimas digestivas de camarón de la PhyC-N, en presencia de 1 mM de CaCl ₂ y pH 7.5.....	111
32	Comportamiento de susceptibilidad a enzimas digestivas de camarón de la PhyC-R, en presencia de 1 mM de CaCl ₂ y pH 7.5.....	112
33	Comportamiento de susceptibilidad a enzimas digestivas de camarón de la FTE, en presencia de 1 mM de CaCl ₂ y pH 7.5.....	113
34	Comportamiento de susceptibilidad a enzimas digestivas de camarón de la Natuphos, en presencia de 1 mM de CaCl ₂ y pH 7.5.....	114
35	Comportamiento de susceptibilidad a enzimas digestivas de camarón de la Allzyme SSF, en presencia de 1 mM de CaCl ₂ y pH 7.5.....	114

LISTA DE FIGURAS
(Continuación)

36	Susceptibilidad a enzimas digestivas de camarón de las cinco fitasas durante 30 min.....	115
37	Susceptibilidad a enzimas digestivas de camarón de las cinco fitasas durante 120 min.....	117
38	Comportamiento de susceptibilidad a la enzima tripsina de la PhyC-N, en presencia de 1 mM de CaCl ₂ y pH 7.5.....	119
39	Comportamiento de susceptibilidad a la enzima tripsina de la PhyC-R, en presencia de 1 mM de CaCl ₂ y pH 7.5.....	120
40	Comportamiento de susceptibilidad a la enzima tripsina de la FTE, en presencia de 1 mM de CaCl ₂ y pH 7.5....	120
41	Comportamiento de susceptibilidad a la enzima tripsina de la Natuphos, en presencia de 1 mM de CaCl ₂ y pH 7.5.....	121
42	Comportamiento de susceptibilidad a la enzima tripsina de la Allzyme SSF, en presencia de 1 mM de CaCl ₂ y pH 7.5.....	122
43	Susceptibilidad a enzimas de tripsina porcina de las cinco fitasas durante 30 min.....	123
44	Representación de Michaelis Menten para PhyC-R.....	124
45	Representación de Lineweaver-Burk para PhyC-R.....	125
46	Representación de Eadie-Hofstee para PhyC-R.....	125

NOMENCLATURA

AC	Actividad fítica control
AM	Actividad fítica muestra
AR	Actividad residual
ARAc	Actividad residual control
ARAM	Actividad residual muestra
B	Mezcla de blanco
B_C	Mezcla de blanco control
B_M	Mezcla de blanco muestra
M	Mezcla de muestra
BMG	Medio mínimo amortiguado con glicerol
BMM	Medio mínimo amortiguado con metanol
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CaCl₂	Cloruro de calcio
°C	Grados Celsius
DO	Densidad óptica a 600 nanómetros
<i>et al.</i>	Et alii (y colaboradores)
FD	Factor de dilución
FTE	Unidades/ mg de peso seco
g	Gramos
HCl	Ácido clorhídrico
h	Horas
Log	Logaritmo
Ln	Logaritmo natural
M	Concentración Molar
mA	Miliamperes
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Concentración Milimolar
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
P	Fósforo
P_{BM}	µg de fósforo liberados en el blanco de muestra
P_{BS}	µg de fósforo liberados en el blanco de sustrato
P_M	µg de fósforo liberado de la fitasa
P_L	µg de fósforo liberado del fitato por la acción de la fitasa
pH	Potencial de iones hidrógeno
<i>phyC</i>	Gen de la Fitasa C
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PSA	Persulfato de amonio
rpm	Revoluciones por minuto
SD	Desviación estándar
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS
<i>sp</i>	Especie
t	Tiempo

to	Tiempo inicial
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Trizma-base ó Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidades (Actividad enzimática)
U/mL	Unidades por mililitro
V	Volts
UV	Ultravioleta
X	Veces la concentración
YNB	Base nitrogenada para levaduras
YPD	Medio de extracto de levadura y peptona
μ	Velocidad específica de crecimiento
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μM	Micromolar
%	Porcentaje

RESUMEN

Las fitasas o hexafofato de inositol fosfohidrolasas son importantes aditivos de alimentos para animales que incrementan la disponibilidad de fósforo y otros minerales nutricionalmente importantes en animales monogástricos debido a la hidrólisis enzimática del ácido fítico, un factor anti-nutricional presente en la mayoría de los alimentos a base de cereales o leguminosas.

En este trabajo se realizó por primera vez la caracterización bioquímica de dos formas recombinantes de fitasas de origen bacteriano producidas en *Pichia pastoris*. La fitasa C recombinante (PhyC-R), la cual es producida de forma natural en *Bacillus subtilis* y reportada como fitasa C nativa (PhyC-N) y la FTE, una forma recombinante que posee un 99 % de similitud a la fitasa DS11 de *B. amyloliquefacies*. Además fueron evaluadas las propiedades bioquímicas de la fitasas C nativa y dos fitasas fúngicas.

La PhyC-R producida en *P. pastoris* mostró propiedades bioquímicas diferentes a su forma nativa (PhyC-N), a pesar de compartir una secuencia aminoácidica idéntica. Las diferencias podrían haber sido causadas por la glicosilación presente en PhyC-R.

También se encontraron diferencias en las propiedades bioquímicas entre FTE y las reportadas para la fitasa DS11, estas diferencias son probablemente determinadas por los 5 aminoácidos que no comparten estas dos enzimas y la glicosilación presente en la FTE.

Con excepción de la FTE, todas las fitasas evaluadas fueron estables a 37°C por 120 min. Las fitasas comerciales presentaron actividad en un intervalo de pH de 2.5 a 5.5 y ausencia total de actividad a pH 7.5, mientras que las fitasas bacterianas presentaron la mayor actividad a valores de pH de neutros a básicos, conservando hasta un 68 % de actividad a pH de 5.5.

Las fitasas PhyC-R y FTE presentaron actividad a temperaturas de 25 a 70°C. Estas mostraron actividades relativas a temperaturas de 25 a 55°C semejantes a las determinadas para las fitasas comerciales y más altas que las actividades relativas presentadas por PhyC-N.

Las fitasas bacterianas fueron más termoestables a 60°C que las fitasas comerciales. Las PhyC-R y FTE mostraron ser más termoestables a 80°C que la PhyC-N y las fitasas fúngicas comerciales. La termoestabilidad de las fitasas bacterianas fue dependiente de las condiciones de pH y la concentración de calcio.

La PhyC-N, PhyC-R y las dos fitasas comerciales mostraron ser estables al tratamiento con las enzimas digestiva del camarón Blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) y tripsina porcina, con valores de actividad relativa por arriba del 80 %.

La FTE mostró ser susceptible al tratamiento con enzimas digestivas de camarón, pero mostró ser estable a la tripsina porcina con actividades residuales por arriba del 100 %, estos resultados sugieren la generación de polipéptidos estables a tripsina porcina y con mayor actividad que la proteína original.

A diferencia de las fitasas comerciales activas a valores de pH ácidos, y de acuerdo a las propiedades bioquímicas determinadas para PhyC-R, esta fitasa es una alternativa viable para aplicarse como aditivo en las preparaciones nutrimentales para el camarón y en especies con características fisiológicas semejantes para obtener una mayor disponibilidad de fósforo fítico y otros nutrientes. Además, la termoestabilidad a 80°C presentada por PhyC-R ofrece una ventaja competitiva sobre las dos fitasas comerciales evaluadas en el proceso de peletizado. También es factible su aplicación en procesos industriales para disponer del fósforo fítico en harinas de origen vegetal, en condiciones de pH neutras y a temperatura ambiente, ofreciendo una ventaja técnica y competitiva respecto a las fitasas fúngicas comerciales.

La inestabilidad de la FTE a pH 7.5 y a la acción de las enzimas digestivas de camarón hace que esta enzima no sea viable para aplicarse como aditivo en las preparaciones nutrimentales para el camarón Blanco del Pacífico y especies semejantes.

ABSTRACT

Phytase, or hexakisphosphate phosphohydrolase, is an important feed additive used to increase the phosphorous availability and other nutritionally important minerals for monogastric animals by the enzymatic hydrolysis of phytic acid, an anti-nutritional factor present in most of the cereals and legume-based feeds. In this work, the biochemical characterization of two recombinant forms of bacterial phytases produced in *Pichia pastoris* was carried out for the first time. The recombinant phytase C (PhyC-R), reported as native phytase C (PhyC-N) when produced in its natural form in *Bacillus subtilis*, and FTE, a recombinant form that possesses a 99% similarity with *B. amyloliquefacies* DS11 phytase. Furthermore, biochemical evaluations of the native phytase C and two commercial fungal phytases were also carried out.

Although PhyC-R and PhyC-N share an identical amino acid sequence, PhyC-R produced in *P. pastoris* showed different biochemical properties from those of the native form (PhyC-N). The differences may be due to the glycosylation present in PhyC-R. Differences were also found between the biochemical properties of FTE and those reported for DS11 phytase. These differences may be due to the five amino acids that are not shared in both enzymes and the glycosylation that is present in FTE. Except for FTE, all of the evaluated phytases were stable at 37°C for 120 min.

Commercial phytases exhibit activity at pH values between 2.5 to 5.5 and show a total absence of activity at pH 7.5. The bacterial phytases; however, exhibit their activity in the neutral to basic pH range, and conserve up to 68% of their relative activity at pH of 5.5. PhyC-R and FTE exhibited activities from 25 to 70°C, and relative activities at temperatures from 25 to 55°C, that were similar to those shown by commercial phytases and higher than those exhibited by PhyC-N.

The bacterial phytases were more thermostable at 60°C than were commercial phytases, and PhyC-R and FTE were more stable at 80°C than was PhyC-N or the commercial phytases. The thermostability shown by the bacterial phytases depends on the pH and calcium concentration.

PhyC-N, PhyC-R, and the two commercial phytases appeared to be stable (with residual activities above 80%) after being treated with digestive enzymes from the Pacific White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) or with porcine trypsin. FTE was susceptible to treatment by the shrimp digestive enzymes, but stable to porcine trypsin (residual activities above 100%). This suggests that stable polipeptides, with higher activity than the original protein's activity, were generated by the porcine trypsin treatment.

Because commercial phytases are active at acidic pH, and because of other differences in biochemical properties, PhyC-R would be a viable alternative to use as a feed additive to increase the availability of phosphorous and other nutritionally important minerals for shrimp and similar species. The thermostability of PhyC-R at 80°C offers a competitive advantage over the two commercial phytases evaluated in this work, particularly for the pelleting process used for feeds. PhyC-R could also be used in industrial processes, under gentle conditions (neutral pH and low temperatures), for the enzymatic treatment of vegetable meal that will improve the availability of phytic phosphorus, and thus offer a technical advantage over the fungal phytases.

The instability of FTE at pH 7.5 and after being subjected to shrimp digestive enzymes makes this enzyme a poor choice for use as a feed additive for shrimp and similar species.

1. INTRODUCCION

El empleo de las fitasas en la industria de los piensos como aditivos comestibles para animales monogástricos, principalmente aves y cerdos, es actualmente un hecho, el uso de la fabricación de piensos para estas especies ha aumentado el rendimiento de su producción, representando un ahorro estimado en millones de dólares anuales, además de la consecuente reducción del deterioro ambiental asociado a la contaminación causada por fósforo. (Lei & Sthal, 2001), el empleo de fitasas en la nutrición de camarón ofrece una alternativa para resolver los efectos antinutricionales de los fitatos presentes en las harinas vegetales.

El cultivo de camarón es una de las áreas de más rápido crecimiento en la industria de producción acuícola mundial. En la actualidad el factor alimento tiene un papel muy importante en el desarrollo y la viabilidad de la industria del cultivo de camarón, ya que representa hasta un 50% de los costos de producción, constituye la principal fuente de contaminación de los efluentes acuícola y puede modificar la calidad e inocuidad del producto terminado. Por lo anterior, es particularmente importante el desarrollo de alimentos de bajo costo, de alta digestibilidad y amigables con el medio ambiente. Una estrategia, es la sustitución de la harina de pescado por fuentes de proteínas de origen vegetal de menor costo, aunado a la aplicación de fitasas, lo que permitirá producir alimentos con una buena digestibilidad de fósforo y causar menor impacto al medio ambiente.

Las fitasas disponibles actualmente en el mercado son por lo general de origen fúngico, del género *Aspergillus*, y éstas han sido optimizadas principalmente para su empleo en la producción de cerdos y aves. La optimización de la eficacia de las fitasas se han enfocado principalmente en el desarrollo de fitasas con alta actividad catalítica a valores de pH ácidos de 2 a 5 y a las temperaturas del tracto gastrointestinal de las especies animales monogástricos terrestres, estabilidad a altas temperaturas y resistencia a las enzimas proteolíticas digestivas. De acuerdo a estos criterios, las fitasas adecuadas para la alimentación del camarón deberían tener actividad a valores de pH 7 a 8, y a un

intervalo de temperaturas de 26 a 32 °C, condiciones presentes en el aparato digestivo de las especies de camarón y del medio acuoso de los estanques de cultivo; además se requiere que éstas posean resistencia al ataque proteolítico de las enzimas digestivas de esta especie, estabilidad a las temperaturas empleadas en el proceso de los alimentos y una lixiviación limitada de la fitasa adicionada al alimento, en el medio acuático. A pesar de que la efectividad de algunas de las fitasas comerciales ha sido evaluadas en peces, existen escasos reportes en cuanto la eficacia en la nutrición del camarón.

Debido a que las características de pH y temperatura que reúnen la fitasas bacterianas de *B. subtilis*, las hacen candidatas para el empleo como aditivo en la alimentación del camarón, y especies con fisiología semejante, para mejorar las propiedades nutrimentales de harinas de fuente vegetal. Sin embargo es indispensable evaluar las propiedades bioquímicas que ofrecen estas fitasas para su aplicación específica.

En basa a lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue el de caracterizar bioquímicamente tres fitasas del género *Bacillus* para valorar su potencial de uso en la nutrición de especies como el camarón Blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*). En el presente trabajo se realizó una comparación de las propiedades bioquímicas de cinco fitasas, tres del género *Bacillus* y dos del género *Aspergillus*.

2. HIPÓTESIS

La determinación de las propiedades bioquímicas de fitasas del género *Bacillus* y su comparación con dos fitasas comerciales permitirá la valoración de su uso potencial en la nutrición del camarón Blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Caracterizar bioquímicamente tres fitasas del género *Bacillus* para su valoración en su potencial de aplicación en la nutrición del camarón Blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*).

3.2 Objetivos específicos

1. Producción de la Fitasa C nativa (PhyC-N) a través del desarrollo de cultivos de *B. subtilis* VTT E-68013 bajo condiciones de inducción del gen *phyC*.
2. Producción de las Fitasa C recombinante (PhyC-R) y Fitasa C recombinante modificada (FTE) a través del desarrollo de cultivos de cepas de *Pichia pastoris* bajo condiciones de inducción del gen *phyC* y *gen phyC*.
3. Obtención de preparaciones crudas y semipurificadas de las tres fitasas bacterianas a partir de los sobrenadantes de los medios de cultivo.
4. Evaluar y comparar la actividad enzimática a cuatro valores de pH a 37°C, de las tres fitasas bacterianas (PhyC-N, PhyC-R y FTE) y dos fitasas fúngicas comerciales.
5. Evaluar y comparar la actividad enzimática a diferentes temperaturas (25, 37, 45, 55, 70 y 80°C) de las tres fitasas bacterianas (PhyC-N, PhyC-R y FTE) y dos fitasas fúngicas comerciales.
6. Evaluar y comparar la estabilidad a 37°C durante 10, 30 y 120 min de las tres fitasas bacterianas (PhyC-N, PhyC-R y FTE) y dos fitasas fúngicas comerciales.
7. Evaluar y comparar la termoestabilidad a tres temperaturas (37, 60 y 80°C) de las tres fitasas bacterianas (PhyC-N, PhyC-R y FTE) y dos fitasas fúngicas comerciales.
8. Evaluar y comparar la estabilidad a la proteólisis por las enzimas digestivas del camarón Blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) y a la tripsina porcina de las tres fitasas bacterianas (PhyC-N, PhyC-R y FTE) y dos fitasas fúngicas comerciales.
9. Determinar el valor de Km para la Fitasa C recombinante.

4. ANTECEDENTES

4.1. Generalidades sobre el ácido fítico

El ácido fítico (*myo*-inositol 1,2,3,4,5,6 hexafosfato, IP6) es un compuesto formado por inositol esterificado con seis grupos fosfatos, las sales de éste son conocidas con el término de fitato. El fitato es la principal forma de almacenamiento de inositol y fosfato en las semillas de plantas y en granos (Pointillart, 1994a). El fitato es formado durante la maduración de las plantas y en la germinación de las semillas representa del 60-90% del fosfato total (Loewus, 2002). Por tal razón, el fitato es un componente común en los alimentos derivados de plantas.

Debido a los 6 grupos fosfatos, el fitato se encuentra cargado negativamente en un amplio rango de pH, interaccionando fuertemente con componentes de los alimentos que se encuentren cargados positivamente, tales como minerales, elementos traza y proteínas (Konietzny & Greiner, 2003; Cheryan, 1980). Esta interacción afecta la calidad nutricional, además del rendimiento y la calidad de los alimentos (Caransa *et al.*, 1988)

Los 6 grupos fosfato del ácido fítico muestran una fuerte capacidad para quelar cationes de minerales como zinc, hierro, magnesio, manganeso y cobre (Konietzny & Greiner, 2003; López *et al.*, 2002). La formación de complejos de fitato-mineral a valores de pH fisiológico conduce a una pobre biodisponibilidad de estos minerales, ya que estos complejos no son absorbidos en el tracto gastrointestinal de humanos y animales monogástricos (Greiner & Konietzny, 2006). La solubilidad y la estabilidad de los complejos fitato-mineral decrecen a medida que los residuos de fosfato son removidos del fitato, por lo cual la remoción de fosfatos del fitato mejora la absorción de los minerales que interaccionan con éste (Han *et al.*, 1994)

Debido a su unión a proteínas mediante interacciones electrostáticas, el ácido fítico puede también interferir en la digestión de las proteínas al afectar la solubilidad de éstas, (Cheryan, 1980). A pH ácido, el ácido fítico posee una fuerte carga negativa para interaccionar con proteínas con carga positiva. A pH neutro y alcalino, tanto el ácido

fítico como las proteínas poseen carga negativa, por lo que se cree que son necesarios cationes multivalentes, como el calcio para, formar el complejo fitato-proteína (Rham & Jost, 1979; Cheryan, 1980). La interacción del fitato con las proteínas puede afectar en su estructura y como consecuencia en la actividad enzimática, solubilidad y digestibilidad proteolítica, aunque en este último caso aún existe controversia al respecto (Greiner & Konietzny, 2006).

La interacción del ácido fítico no se limita solamente a las proteínas ingeridas con el alimento, sino que también se ha reportado la inhibición de enzimas digestivas endógenas, tales como la α -amilasa (Brenes, 2002, Knuckles & Betschart, 1987; Desphande & Cheryan, 1984), lipasas (Knuckles, 1988) y proteasas (Singh & Krikorian, 1982; Inagawa *et al.*, 1987) tales como tripsina, pepsina y quimotripsina. Esta inhibición, puede ser debido a la interacción del fitato con las proteínas, o debido a la acción quelante del fitato sobre el ion calcio, el cual es esencial para la actividad de la tripsina y la α -amilasa.

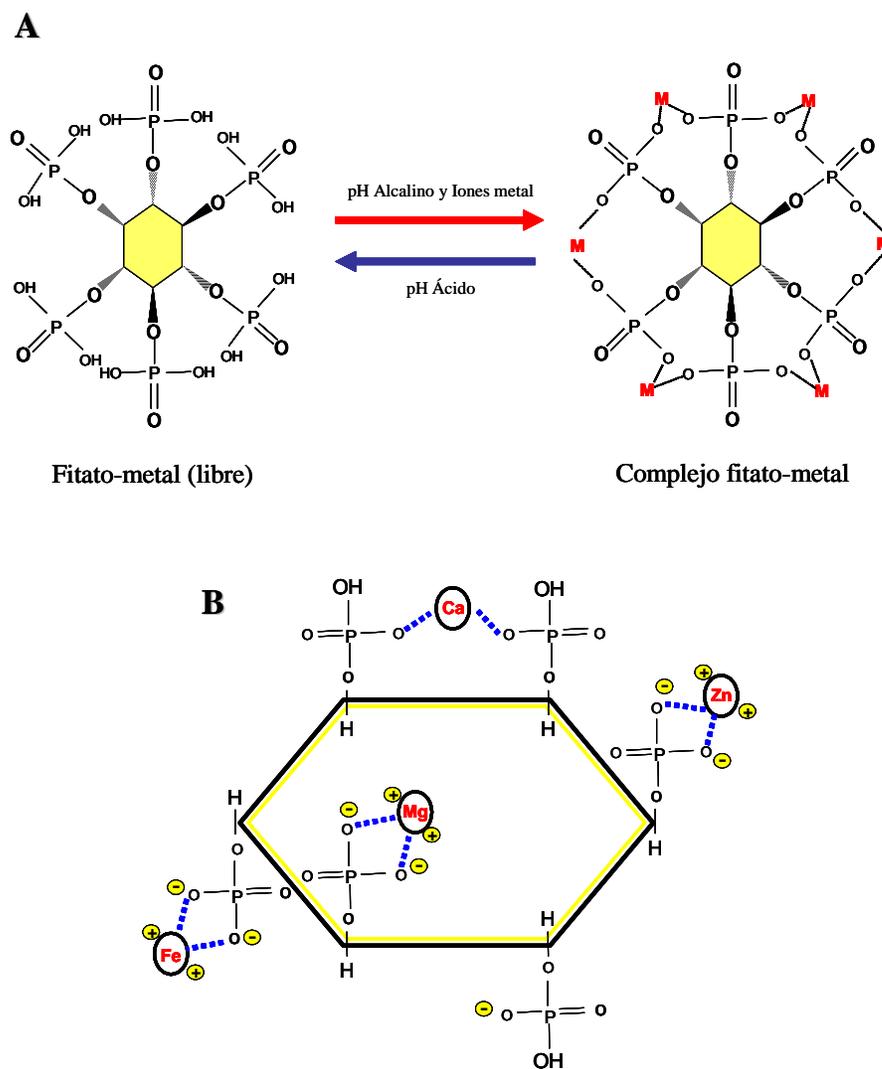
Así, el fitato es considerado como un factor antinutricional debido a su acción quelante sobre cationes divalentes, como Ca^{2+} , Zn^{2+} y Fe^{2+} , y la interacción con proteínas importantes nutricionalmente disminuyendo la biodisponibilidad de ambos nutrientes (Urbano *et al.*, 2000).

Por otro lado, los animales monogástricos son incapaces de utilizar el fitato, ya que éstos carecen o presentan una baja actividad de fitasa en su tracto digestivo (Schroder *et al.*, 1996). Por consiguiente el fosfato inorgánico es agregado frecuentemente en sus alimentos, para facilitar el crecimiento óptimo de estos animales. Esta práctica conduce a un alto contenido de fitato y fosfato inorgánico en la excreción de los animales, lo cual puede estimular el crecimiento de algas y causar eutroficación en la superficie del agua.

Propiedades químicas del fitato

El fitato puede existir en forma libre o como complejo de fitato-metal dependiendo del pH y la concentración de cationes en la solución (Fig. 1A). A pH ácido, la protonación de los grupos fosfatos del fitato genera una forma libre sin interacciones con metales. En contraste, a pH neutro la desprotonación de los grupos fosfatos cargados

negativamente interactúan con metales catiónicos divalentes, principalmente Mg^{2+} y Ca^{2+} , formando el complejo fitato-metal (Cheryan, 1980; Maenz *et al.*, 1999).



Sacado de Oh *et al.*, 2004

Figura 1 A, B. Efecto de pH y metales en la fisiología natural del fitato. A. El fitato existe en forma libre y como complejo fitato-metal, dependiendo del pH, de los metales catiónicos divalentes, la magnitud del enlace depende del pH y la relación del metal-fitato. A valores de pH alcalino y alta concentración del catión se forma el complejo fitato-metal debido a la interacción electrostática directa. **B.** Los metales con cationes divalentes enlazan los grupos fosfatos del fitato dependiendo del radio iónico de los cationes. La formación del complejo fitato-metal bidentato es favorecido por la interacción con cationes con un radio iónico grande.

En el complejo fitato-metal, los metales catiónicos divalentes con un radio iónico grande, tal como el Ca^{2+} (0.99Å) y el Sr^{2+} (1.12Å) enlazan dos oxianiones de dos grupos

fosfatos en forma de bidentato (Martin & Evans, 1986). Sin embargo, los metales catiónicos divalentes con un radio iónico pequeño, tales como Mg^{2+} (0.65Å), Fe^{2+} (0.74Å) y Zn^{2+} (0.71Å) enlazan dos átomos de oxígeno de un grupo fosfato (Fig. 1B). Por tal razón, la formación de la forma bidentato del complejo fitato-metal prefiere los metales divalentes con radios de iónicos grandes (Jonson & Tate, 1969; Cheryan, 1980).

4.2. Generalidades sobre las fitasas

Las fitasas son una clase especial de fosfatasas que catalizan la hidrólisis secuencial del fitato a derivados de myo-inositol menos fosforilados y fosfato inorgánico (Wyss *et al.*, 1999a). Recientemente, Oh y colaboradores (Oh *et al.*, 2004) han clasificado las fitasas en dos clases principales basados tanto en las secuencias de aminoácidos y su análisis filogenético, como por las propiedades bioquímicas de éstas: las fosfatasas ácidas de histidina (HAP) y las fitasas alcalinas, las cuales correlacionan bien con las propiedades bioquímicas y las propiedades catalíticas de cada clase.

La mayoría de las fitasas bacterianas, fúngicas y de plantas pertenecen a las fosfatasas ácidas de histidina (HAP; EC 3.1.3.3 Van Etten *et al.*, 1991). Todos los miembros de esta familia comparten un sitio activo conservado con la secuencia RHGXRX, la cual está presente solo en esta clase de enzimas (Van Etten *et al.*, 1991).

Las fitasas alcalinas son ampliamente distribuidas en la naturaleza (Liu *et al.*, 1998). Sin embargo, la caracterización enzimática de las fitasas ha sido principalmente enfocada en las HAPs, ya que la técnica más ampliamente usada para realizar el screening de fitasas se basa en medir la cantidad de fosfato inorgánico liberado del fitato libre no unido a metal (fitato de sodio) y usado como sustrato (Englen *et al.*, 1994). Por tal razón, el screening de microorganismos o plantas productores de fitasas y la clonación de genes que codifican para éstas, conduce a seleccionar principalmente HAPs que actúan sobre fitato libre a pH ácido.

La Unión Internacional de Química aplicada y la Unión Internacional de Bioquímica (IUPAC-IUB 1975) clasificaron las enzimas de HAPs en dos grupos: las 3-fitasa (hexafosfato de inositol 3-fosfohidrolasa, EC 3.1.3.8) y 6 fitasa (hexafosfato de inositol 6-fosfohidrolasa, EC 3.1.3.26), basados en la posición específica de la hidrólisis inicial del fitato. La 3-fitasa hidroliza primero el grupo fosfato de la posición 3, mientras

que la 6-fitasa hidroliza primero el de la posición 6, dando lugar al 1, 2, 4, 5, 6-pentafosfato de inositol y el 1, 2, 3, 4, 5-pentafosfato de inositol, respectivamente.

Las fitasas son usadas como aditivos en alimentos para animales mejorando la biodisponibilidad de fosfato y reduciendo la pérdida de fosfatos y cationes divalentes del fitato.

Las fitasas existen ampliamente en una variedad de microorganismos, plantas y en algunos tejidos de animales (Liu *et al.*, 1998).

Las primeras fitasas fueron descritas en cereal de arroz en 1907 y posteriormente las fitasas de especies de *Aspergillus* en 1911 (Dox & Goleen, 1911). También han sido encontradas en el cereal de trigo, semillas de plantas, en el tracto gastrointestinal de cerdos (Pointillart, 1994b; Yi & Kornegay, 1996), aves (Davies & Motzok, 1972; Maenz & Classen, 1998) y en otras especies monogástricas se han encontrado fitasas, (Pointillart, 1994a) aunque su actividad fítica es muy escasa.

La actividad de fitasa a sido encontrada mas frecuentemente en hongos, tales como *Aspergillus terreus* (Yamada *et al.*, 1968), *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus niger* (Shieh & Ware, 1968). Las fitasas también son producidas en bacterias gram-positivas tales como *Bacillus* y bacterias gram-negativas tales como *Aerobacter aerogenes* (Greaves *et al.*, 1967), *Pseudomonas sp.* (Cosgrove, 1970), *Escherichia coli* (Greiner *et al.*, 1993) y *Klebsiella* (Shah & Parekh, 1990; Tambe *et al.*, 1994; Greiner *et al.*, 1997; Jareonkitmongkol *et al.*, 1997). Generalmente las fitasas de bacterias gram-negativas son proteínas intracelulares, mientras que las fitasas de bacterias gram-positivas y de hongos son enzimas extracelulares (Powar & Jagannathan, 1982; Shimizu, 1992; Kerovuo *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998a; Choi *et al.*, 2001).

En plantas, la actividad de fitasa se encuentra en muchas de las semillas de éstas (Chang, 1967; Eskin & Wiebe, 1983; Gibson & Ullah, 1990; Laboure *et al.*, 1993), sin embargo solamente las fitasas de trigo, fríjol verde y soja han sido purificadas y caracterizadas (Mandal *et al.*, 1972; Maiti *et al.*, 1974; Nagai *et al.*, 1975; Gibson & Ullah, 1988).

En la tabla I se presentan un listado de fitasas documentadas en la literatura y y hospederos empleados para la producción de las formas recombinantes.

Tabla I. Litsado de fitasas producidas por diversas fuentes y hospederos empleados para la producción de las formas recombinantes.

Hongos			
Origen de la fitasa	Hospedero	Localización	Referencia
<i>Aspergillus sp.</i>			Kim <i>et al.</i> , 1999a,b.
<i>A. awamori</i>			Martin <i>et al.</i> , 2003.
<i>A. niger</i> NRRL 3135		EX	Shieh <i>et al.</i> , 1969.
<i>A. niger</i>		EX	Shieh & Ware, 1968.
<i>A. niger</i>			Hong <i>et al.</i> , 2001; van Hartingsveldt <i>et al.</i> , 1993.
<i>A. niger</i>			Mandviwala & Khire, 2000.
<i>A. niger</i>			Krishna & Nokes, 2001.
<i>A. niger</i>	<i>Escherichia coli</i>		Phillippy & d Mullaney, 1997.
<i>A. niger</i>	<i>S. cerevisiae</i>		Han <i>et al.</i> , 1999.
<i>A. niger</i>	<i>Pichia pastoris</i>		Xiong <i>et al.</i> , 2004.
<i>A. niger</i>	<i>Pichia pastoris</i>		Han and Lei, 1999.
<i>A. ficuum</i>			Gibson, 1987.
<i>A. ficuum</i>			Bogar <i>et al.</i> , 2003b.
<i>A. flavus</i>		EX	Shieh & Ware, 1968.
<i>A. terrus</i>		EX	Yamada <i>et al.</i> , 1968.
<i>A. terrus</i>	<i>H. polymorpha</i>	EX	Mayer <i>et al.</i> , 1999.
<i>A. carneus</i>		EX	Ghareib, 1990.
<i>A. oryzae</i>		EX	Shimizu, 1993.
<i>A. fumigatus</i>		EX	Pasamontes, 1997b.
<i>A. fumigatus</i>			Rodríguez <i>et al.</i> , 2000a,b.
<i>A. fumigatus</i>			Martin <i>et al.</i> , 2003.
<i>A. fumigatus</i>			Mayer <i>et al.</i> , 1999.
<i>Mucor sp.</i>		EX	Shieh & Ware, 1968.
<i>Mucor hiemalis</i>			Bogar <i>et al.</i> , 2003a.
<i>Mucor racemosus</i>			Bogar <i>et al.</i> , 2003a.
<i>Penicillium sp.</i>		EX	Shieh & Ware, 1968.
<i>P. caseolicolum</i>		EX	Amano Pharmaceuticals, 1995.
<i>Rhizopus oligosporus</i>		IN y EX	Sutardi & Buckle, 1988.
<i>Rhizopus oligosporus</i>			Bogar <i>et al.</i> , 2003a
<i>Rhizopus oligosporus</i>			Sabu <i>et al.</i> , 2002.
<i>Rhizopus microsporus</i>			Bogar <i>et al.</i> , 2003a.
<i>Rhizopus oryzae</i>			Bogar <i>et al.</i> , 2003a.
<i>Rhizopus thailandensis</i>			Bogar <i>et al.</i> , 2003a.
<i>Consensus</i>	<i>H. polymorpha</i>		Mayer <i>et al.</i> , 1999.
Levaduras			
<i>Arxula adininivorans</i>			Sano <i>et al.</i> , 1999.
<i>Fellomyces fuzhouensis</i>			Sano <i>et al.</i> , 1999.
<i>Pichia anomala</i>			Vohra & Satyanarayana, 2004.
<i>Pichia farinosa</i>			Sano <i>et al.</i> , 1999.
<i>Rhodotorula gracilis</i>			Bindu <i>et al.</i> , 1998.
<i>S. cerevisiae</i>		EX	Nayini & Markakis, 1984a.
<i>Schwanniomyces castelii</i>		EX	Lambrechts <i>et al.</i> , 1992.
<i>S. occidentalis</i>			Lambrechts <i>et al.</i> , 1993.
<i>S. occidentalis</i>			Sano <i>et al.</i> , 1999.
<i>Sporobolimyces sp.</i>			Sano <i>et al.</i> , 1999.
<i>Sporidiobolus johnsonii</i>			Sano <i>et al.</i> , 1999.

Tabla I. (Continuación)

Levaduras			
Origen de la fitasa	Hospedero	Localización	Referencia
<i>Sterigmatosporus polymorphum</i>			Sano <i>et al.</i> , 1999.
<i>Kluyveromyces fragilis</i>		EX	Lambrechts <i>et al.</i> , 1992.
<i>Candida tropicalis</i>		EX	Lambrechts <i>et al.</i> , 1992.
<i>Torulopsis candida</i>		EX	Lambrechts <i>et al.</i> , 1992.
<i>Debaryomyces castellii</i>		EX	Lambrechts <i>et al.</i> , 1992.
Bacterias			
<i>Bacillus sp.</i>		EX	Choi <i>et al.</i> , 1999.
<i>Bacillus subtilis</i>		EX	Powar & Jagannathan, 1982.
<i>Bacillus subtilis</i>			Tye <i>et al.</i> , 2002.
<i>B. subtilis (natto)</i>		EX	Shimizu, 1993.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	EX	Kim <i>et al.</i> , 1999 a,b.
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>		Tye <i>et al.</i> , 2002.
<i>B. amyloliquefaciens</i>		EX	Kim <i>et al.</i> , 1998 a, b.
<i>Escherichia coli</i>		IN	Greiner <i>et al.</i> , 1993.
<i>Escherichia coli</i>			Miksch <i>et al.</i> , 2002.
<i>Escherichia coli</i>			Golovan <i>et al.</i> , 2000.
<i>Escherichia coli</i>	<i>S. lividans</i>		Stahl <i>et al.</i> , 2003.
<i>Escherichia coli</i>	<i>Pichia pastoris</i>		Rodriguez <i>et al.</i> , 1999.
<i>Escherichia coli</i>	<i>Pichia pastoris</i>		Stahl <i>et al.</i> , 2003.
<i>Escherichia coli</i>	<i>Pichia pastoris</i>		Chen <i>et al.</i> , 2004.
<i>Klebsiella aerogenes</i>		IN	Tambe <i>et al.</i> , 1994.
<i>Klebsiella</i>		IN	Shah & Parekh, 1990; Tambe <i>et al.</i> , 1994; Greiner <i>et al.</i> , 1997; Jareonkitmongkol <i>et al.</i> , 1997.
<i>Klebsiella</i>		IN	Hwang, 1999.
<i>K. terrigena</i>		IN	Greiner <i>et al.</i> , 1997.
<i>K. oxytoca</i>		IN	Jareonkitmongkol <i>et al.</i> , 1997.
<i>Pseudomonas sp.</i>		EX	Irving & Cosgrove, 1971.
<i>Pseudomonas sp.</i>		EX	Cosgrove, 1980.
<i>Pseudomonas mendocina</i>			Richardson & Hadobas, 1997.
<i>Pseudomonas putida</i>			Richardson & Hadobas, 1997.
<i>Prevotella ruminicola</i>			Yanke <i>et al.</i> , 1998.
<i>Enterobacter sp.</i>		EX	Yoon <i>et al.</i> , 1996.
<i>Citrobacter freundii</i>		IN	Delucca <i>et al.</i> , 1992.
<i>Citrobacter braakii</i>			Kim <i>et al.</i> , 2003
<i>Aerobacter aerogenes</i>			Greaves <i>et al.</i> , 1967.
<i>Lactobacillus amylovorus</i>			Sreeramulu <i>et al.</i> , 1996.
<i>Lactobacillus fructivorans</i>			De Angelis <i>et al.</i> , 2003.
<i>L. sanfranciscensis</i>			De Angelis <i>et al.</i> , 2003.
<i>Megasphaera elsdenii</i>			Yanke <i>et al.</i> , 1998.
<i>Mitsuokella jalaludinii</i>			Lan <i>et al.</i> , 2002.
<i>Selenomonas ruminatum</i>			Yanke <i>et al.</i> , 1998.
<i>Weissella confusa</i>			De Angelis <i>et al.</i> , 2003.

Tabla I. (Continuación)

Plantas			
Origen de la fitasa	Hospedero	Localización	Referencia
Germinado de maíz		IN	Laboure <i>et al.</i> , 1993.
Semillas de soja		IN	Gibson and Ullah, 1988.
Semillas de leguminosas		IN	Scout, 1991.
<i>Typha latifolia</i> (polen)		IN	Hara <i>et al.</i> , 1985.
Animales			
M. del intestino de rata		IN	Yang <i>et al.</i> , 1991 a,b.
Hígado de rata		IN	Craxton <i>et al.</i> , 1997.
<i>Paramecium</i>		IN	Freund <i>et al.</i> , 1992.

IN = Intracelular
EX = Extracelular

4.3. Clasificación de las fitasas

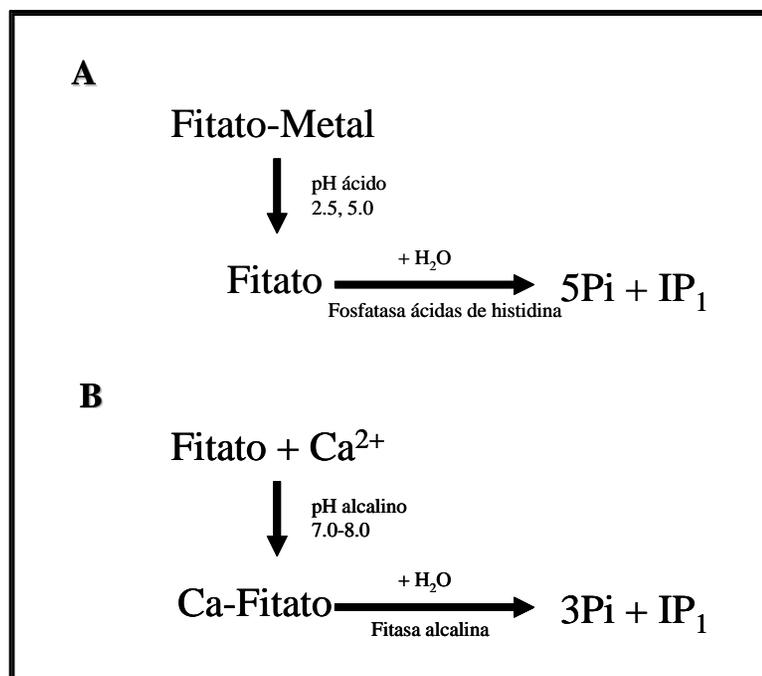
Las fosfatasa son una muy diversa clase de enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace éster-monofosfato en los sistemas biológicos (Vincent *et al.*, 1992). Las fosfatasa han sido clasificadas en cinco diferentes subclases: fosfatasa alcalinas, fosfatasa ácido púrpura, fosfatasa ácidas de histidina (HAP) de bajo peso molecular, HAP de alto peso molecular y protein-fosfatasa.

Las fitasas son una clase especial de fosfatasa que catalizan la hidrólisis secuencial del fitato a derivados de myo-inositol menos fosforilados y fosfato inorgánico (Wyss *et al.*, 1999a).

Un análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos de varias fitasas muestra claramente dos clases de fitasas, las cuales correlacionan con las propiedades bioquímicas y catalíticas (Figura 2, Tabla II y III).

Una de estas clases, las fitasas ácidas (EC 3.1.3.2), es la subfamilia de fosfatasa o fitasas ácidas de histidina HAP, que comparten un sitio activo altamente conservado RHGXRX (Van Etten *et al.*, 1991).

Las clase HAP pueden adicionalmente dividirse en tres grupos (PhyA, PhyB, PhyC) diferentes de acuerdo en la homología en su secuencia de aminoácidos y en sus propiedades bioquímicas, tales como su pH de actividad óptima y la posición específica de la hidrólisis del fitato (Tabla III). La otra clase pertenece al grupo de las fitasas alcalinas. (Tabla III).



Sacado de Oh *et al.*, 2004

Figura 2 A, B. Ilustración de la reacción de hidrólisis de fitato por fosfatasa ácida de histidina (HAPs) y fitasas alcalinas. **A** Las HAPs son capaces de hidrolizar cinco grupos fosfatos del fitato a pH ácido, teniendo como producto final el mio-inositol monofosfato. **B** Las fitasas alcalinas son capaces de hidrolizar tres grupos fosfatos específicos del complejo fitato-calcio a pH alcalino, teniendo como producto final el mio-inositol trifosfato.

Grupo I, PhyA, en este grupo se encuentran las enzimas con una secuencia de 465-469 aminoácidos, incluyendo las fitasas extracelulares HAP de *A. niger* (Van Hartingsveldt *et al.*, 1993), *A. niger (awamori)* (Piddington *et al.*, 1993), *A. fumigatus* (Pasamontes *et al.*, 1997b), *A. terreus* (Mitchell *et al.*, 1997), *Emericella nidulans* (Pasamontes *et al.*, 1997a), *Myceliophthora thermophila* (Mitchell *et al.*, 1997), y *Talaromyces thermophilus* (Pasamontes *et al.*, 1997a). Estas fitasas tienen dos valores de pH óptimo (2.5 y 5.5) y una temperatura óptima de 55-60°C (Ullah 1988; Wyss *et al.*, 1999a).

El peso molecular de las fitasas PhyA sin glicosilar oscila entre 48-50 kDa. Sin embargo el peso molecular aparente de las fitasas glicosiladas determinado por SDS-PAGE oscila entre 62-128 kDa y por ultracentrifugación analítica en un intervalo 64-137 kDa (Wyss *et al.*, 1999b).

Tabla II. Especificidad de sustrato de fosfatasa ácida de histidina (HAPs) y fitasas alcalinas de varios organismos.
La velocidad de hidrólisis del fitato de sodio como sustrato fue tomado como el 100% para la comparación. En el caso de las fitasas alcalinas se tomó como sustrato fitato de calcio y no fitato de sodio.

Sustrato	Actividad relativa (%)										
	HAP							Fitasas alcalinas			
	<i>A. niger</i> (phyA)	<i>A. niger</i> (phyB)	<i>A. fumigatus</i>	Semilla canola	<i>K. terrigena</i>	<i>E. coli</i>	spelt	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i> (natto)	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>T. latifolia</i> L.
Fitato de sodio	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Fosfato <i>p</i> -Nitrofenil	66	1125	393	890	24.2	12.3	29	0	0	0	6
Fructosa 1,6-bifosfato	27.3	2125	393	--	11.9	8.5	103	0	--	--	--
Fructosa 6-fosfato	2	437	43	--	7.2	1.3	121	0	--	--	--
Glucosa 6-fosfato	13	1062	125	--	2.1	--	--	0	--	--	0
Ribosa 5-fosfato	2	562	36	--	--	--	--	--	--	--	--
A-Glicerofosfato	3	562	43	--	--	--	--	0	0	0	--
B-Glicerofosfato	41	687	157	72	4.9	1.9	38	0	0	0	0
3-fosfoglicerol	3	750	129	--	--	--	--	0	--	--	--
Na-Pirofosfato	19.4	--	136	23190	13.7	--	517	4.2	4.2	2	0
AMP	0	150	14	--	10.3	0.4	11	0	--	0	0
ADP	8	625	64	--	11	--	--	0	--	0	--
ATP	48	875	86	17545	8	0.9	252	0	--	0	0

Sacado de Oh *et al.*, 2004

Estas fitasas presentan actividad sobre un amplio rango de compuestos con fosfato, incluyendo el fitato y otros ésteres de fosfatos (Tabla III; Wyss *et al.*, 1999b). Ellas hidrolizan el fitato en la posición D-3 generando D-*myo*-inositol (1,2,4,5,6) pentafofato, por lo cual son clasificadas como 3-fitasas (Cosgrove, 1980; Greiner *et al.* 1997; Wyss *et al.*, 1999b).

Grupo II, PhyB, este grupo se incluyen las fitasas HAP extracelulares de *A. niger* (Ethrlich *et al.*, 1993), *Saccharomyces cerevisiae* (Bajwa *et al.*, 1984) y *Schizosaccharomyces pombe* (Elliott *et al.*, 1986). Este grupo de fitasas presenta secuencias de 453-479 aminoácidos y un peso molecular de 48-50 kDa. Un peso molecular aparente cuando la proteína está glicosilada de 65 kDa determinado mediante la técnica de SDS-PAGE y de 270 kDa determinado mediante ultracentrifugación analítica (Kostrewa *et al.*, 1999). La estructura cristalina de la fitasa PhyB de *A. niger* muestra claramente que presenta una estructura en forma de tetrámero (Kostrewa *et al.*, 1999). Estas fitasas tienen un único pH óptimo a 2.5, careciendo de actividad a pH 5.5 o a valores más alcalinos y su temperatura óptima es de 55-60°C. Estas enzimas tienen un amplio rango de especificidad de sustrato (Ullah & Cummins, 1987; Wyss *et al.*, 1999a). El grupo PhyB hidroliza el fitato libre y es clasificada como 3-fitasa (Irving & Cosgrove, 1972; Greiner *et al.*, 2001).

Grupo III, PhyC, comprende a las fitasas ácidas de *E. coli* (Dossa & Boquet, 1985; Dossa *et al.*, 1990), lisosomas (Pohlmann *et al.*, 1988; Geier *et al.*, 1991) y fosfatasas ácido prostáticas (Van Etten *et al.*, 1991) de rata y humano. Estas fitasas son proteínas monoméricas no glicosiladas (Wyss *et al.*, 1999b) e intracelulares, compuestas de secuencias de 354-439 aminoácidos con un peso molecular de 42-45 kDa. Las PhyC tienen un único pH óptimo entre 5-6 y una temperatura óptima de 40-60°C.

La estructura cristalina de la fitasa de *E. coli* está estrechamente relacionada con la fosfatasa ácida de rata (Schneider *et al.*, 1993; Lim *et al.*, 2000), a pesar de la baja homología de las secuencias (14% identidad). La estructura de cristal del complejo fitasa-fitato de *E. coli* revela que la región del sitio activo contiene muchos grupos con carga positiva demostrando una favorable interacción por el fitato libre a pH ácido (Lim *et al.*, 2000).

El grupo III de las fitasas no solo son capaces de hidrolizar el fitato libre, sino también otros ésteres de fosfatos de la misma manera que lo hacen otras HAPs (Ullah & Cummins, 1987; Wyss *et al.*, 1999a)

Tabla III. Clasificación de las fitasas de acuerdo a sus propiedades bioquímicas y moleculares

Sacado de Oh *et al.*, 2004

Características	Fosfatasa ácida de histidina (HAS)			Fitasas Alcalinas
	PhyA	PhyB	PhyC	PhyD
Peso molecular (kDa)	62-128	270	42-45	38-45
Glicosilación	Si	Si	No	No
pH óptimo	2.5-5	5	5-6	7-8
Temperatura óptima (°C)	55-60	55-60	40-60	55-70
Termoestabilidad	Bajo (60°C)	Bajo (60°C)	Bajo (60°C)	Alto (85-95°C)
Efecto del Ca ²⁺	Inhibición	Inhibición	Inhibición	Estimulación
Efecto de EDTA	Estimulación	Estimulación	Estimulación	Inhibición
Especificidad de sustrato	Ancho	Ancho	Ancho	Específico
Fitato natural	Fitato libre	Fitato libre	Fitato libre	Fitato de calcio
Posición específica	Posición D-3 del fitato	Posición D-3 del fitato	Posición D-6 del fitato	Posición D-3 del fitato
Producto final	IP ₁ + 5P _i	IP ₁ + 5P _i	IP ₁ + 5P _i	IP ₃ + 3P _i
Sitio activo	Aminoácido carga (+)	Aminoácido carga (+)	Aminoácido carga (+)	Aminoácido carga (-)
Estructura de cristal	α-dominio pequeño y un α / β grande	α-dominio pequeño y un α / β grande	α-dominio pequeño y un α / β grande	Seis hojas β propella

Sin embargo, estas fitasas son consideradas como 6-fitasas ya que hidrolizan el fitato preferentemente en la posición D-6 (1-4) (Greiner *et al.*, 1993; Lassen *et al.*, 2001). Todas las fitasas HAP son capaces de hidrolizar cinco grupos fosfatos del fitato libre rindiendo *myo*-inositol monofosfato como producto final (Wyss *et al.*, 1999a; Figura. 2A).

La otra clase principal de las fitasas, la clase II, comprende las fitasas alcalinas, las cuales difieren en muchos aspectos de las fitasas ácidas (HAPs), incluyendo el pH óptimo, peso molecular, la estructura terciaria, especificidad del sustrato y los requerimientos de iones calcio para la catálisis enzimática. Basada en sus diferencias bioquímicas y en sus datos filogenéticos, las fitasas alcalinas de *Bacillus* y algunas semillas de plantas pueden ser clasificadas en otro grupo: PhyD.

Grupo IV, PhyD, este grupo comprende las enzimas fitato-específicas de *Bacillus* y algunas plantas, tales como el polen de *T. latifolia* (Hara *et al.*, 1985), polen de *L. longiflorum* (Scott & Loewus, 1986; Barrientos *et al.*, 1994) y algunas semillas de leguminosas (Scott, 1991). La comparación de secuencias de

aminoácidos entre estas fitasas es imposible, ya que aún no se encuentran disponibles las secuencias de las fitasas alcalinas de las plantas. Sin embargo las fitasas de plantas tienen características bioquímicas muy similares a las de *Bacillus* (Oh *et al.*, 2001). Varios genes de esta clase de fitasas han sido clonados tales como *B. amyloliquefaciens* (Kim *et al.*, 1998b; Idriss *et al.*, 2002), *B. licheniformis* (Tye *et al.*, 2002) y *B. subtilis* (Kunst *et al.*, 1997; Kerovuo *et al.*, 1998; Tye *et al.*, 2002). Estas fitasas presentan secuencias de 383 aminoácidos y son proteínas monoméricas extracelulares. El peso molecular es aproximadamente de 42 kDa en SDS-PAGE y una masa aparente molecular de 38-44 kDa.

Las secuencias de aminoácidos de las fitasas de *Bacillus* poseen una alta homología entre ellas con una similitud de un 64-98%. Sin embargo las secuencias de aminoácidos de las fitasas de *Bacillus* no se alinean con otras secuencias de HAPs y otras fosfatasa ya conocidas. Es más, éstas no contienen la secuencia conservada RHGXRP del sitio activo de las HAPs (Van Etten *et al.*, 1991). El análisis filogenético claramente muestra que las fitasas alcalinas no son una subfamilia de las HAPs, siendo un nuevo grupo de fitasas (Oh *et al.*, 2004). Más significativamente este grupo requiere de calcio para su actividad catalítica y su pH óptimo es de 7-8 (Powar & Jagannathan, 1982; Shimizu, 1992; Kerovuo *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998a; Choi *et al.*, 2001; Idriss *et al.*, 2002). La temperatura óptima es de 55-70°C y ellas son muy termoestables a una temperatura en un rango de 80-95°C (Kim *et al.*, 1998a; Choi *et al.*, 2001; Tye *et al.*, 2002).

Las fitasas alcalinas tienen una alta especificidad por el complejo fitato-calcio (Oh *et al.*, 2001) pero no tienen actividad con pNPP y otros ésteres de fosfatos, los cuales son sustratos de las HAPs (Powar & Jagannathan, 1982; Shimizu, 1992; Kim *et al.*, 1998a; Choi *et al.*, 2001). También ellas hidrolizan el complejo fitato-calcio preferentemente en la posición D-3, rindiendo D-myo-inositol (1, 2, 4, 5, 6) pentafofato como producto inicial (Idriss *et al.*, 2002) y son clasificadas como 3-fitasas. Las fitasas alcalinas son capaces de hidrolizar tres grupos fosfatos del complejo fitato-calcio produciendo *myo*-inositol trifosfato como producto final (Figura. 2B; Hara *et al.*, 1985; Barrientos *et al.*, 1994; Kerovuo *et al.*, 2000d).

4.4. Propiedades Bioquímicas de las Fitasas

La mayoría de las fitasas pertenecen al grupo de las fitasas ácidas o al de las fitasas alcalinas dependiendo de su pH óptimo para su actividad catalítica, el cual varía de 2-8. La mayoría de las fitasas de origen fúngico tienen un pH óptimo entre 4.5-5.6, con algunas excepciones se han reportados valores de pH óptimos de 2 a 2.5 (Vats & Banerjee, 2005; Ullah & Gibson, 1987; Ullah, 1988; Wodzinski & Ullah, 1996, tabla IV) y de 6 (Pasamontes *et al.*, 1997b; tabla IV), mientras que algunas fitasas de origen bacteriano especialmente las del género *Bacillus* tienen un pH óptimo neutro (6.5-7.5). Las fitasas ácidas de *E coli* (Greiner *et al.*, 1993), *K terrigena* (Greiner *et al.*, 1997), *A. niger* (Skowronski, 1978), *A. fumigatus* (Ullah *et al.*, 2000), semillas de canola (Houde *et al.*, 1990), y variedades de trigo (Konietzny *et al.*, 1995) tienen un rango de pH óptimo de 4.5-5.5 (tabla IV).

En contraste con las fitasas alcalinas de *Bacillus* (Powar & Jagannathan, 1982; Shimizu, 1992; Kerovuo *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998a; Choi *et al.*, 2001; Idriss *et al.*, 2002) y algunas semillas de plantas *Typha latifolia* L. (Hara *et al.*, 1985) y la del polen de *Lilium longiflorum* (Scott and Loewus, 1986,) tiene un rango de pH óptimo de 6.5-8.0 (tabla IV).

Todas las fitasas fúngicas, bacterianas y de plantas investigadas hasta ahora tienen valores de PI ácidos, con excepción de la fitasa de *A. fumigatus* con un PI básico. Las fitasas bacterianas poseen un PI generalmente de 6, mientras que para las fitasas fúngicas tiene un valor de PI por de bajo de 5.5.

La mayoría de las fitasas han sido caracterizado hasta el momento como enzimas monoméricas (Kerovuo, 2000a). El peso molecular de estas enzimas es muy variable y éste oscila en rango de 37 a 100 kDa (tabla IV). El alto peso molecular de las enzimas de hongos y levaduras es debido a la glicosilación producidas por estos organismos (Wyss *et al.*, 1999b). Sin embargo algunas fitasas de plantas y animales están constituidas por múltiples subunidades (Yang *et al.*, 1991b), tal es el caso de la fitasa que se acumula en el maíz durante la germinación, la cual es una enzima dimérica constituida por dos subunidades de 38 kDa (Laboure *et al.*, 1993).

Tabla IV. Propiedades bioquímicas y moleculares de fitasas de diversas fuentes

Origen de la fitasa	PM teórico (kDa)	PM experimental (kDa)	pH	Temperatura °C	Km (mM)	Actividad específica (U/mg ⁻¹)	Termoestabilidad (°C)	Referencia
<i>Aspergillus niger</i>	48	65						Wyss <i>et al.</i> , 1999a.
<i>A. niger</i> NRRL 3135		85-100	2.2; 5.0-5.5	58	0.04			Ullah & Gibson, 1987.
<i>A. niger</i>		90-100	5	55	0.44	45.78	40, 60, 70 y 80	Dvorakova, <i>et al.</i> , 1997.
<i>A. niger</i>		84	5 y 11.5	65	0.1	5.276	80	Casey & Walsh, 2003.
<i>A. niger</i>			2-2.5	52-55	0.606		65, 55, 45, 37 y 30	Vats and Banerjee, 2005.
<i>A. niger</i> (PhyA)		85	2.5, 50	58				Ullah, 1988.
<i>A. niger</i> (PhyB)		85-100	2.5	60				Ullah & Phillippy, 1994.
<i>A. terreus</i>	48	70						Wyss <i>et al.</i> , 1999a.
<i>A. terreus</i>		214	4.5	70				Yamada <i>et al.</i> , 1968.
<i>A. carneus</i>			5.6	40				Ghareib, 1990.
<i>A. carbonarius</i>			4.7	53				Al Asheh & Duvnjak, 1994.
<i>A. fumigatus</i>	48	70						Wyss <i>et al.</i> , 1999a.
<i>A. fumigatus</i>	49	85-100	5.0	58	0.03		80	Ullah <i>et al.</i> , 2000.
<i>A. fumigatus</i>			6.0				90	Pasamontes <i>et al.</i> , 1997b.
<i>A. ficuum</i>		85-100	2.5-5.0	58	0.004			Ullah <i>et al.</i> , 2000.
<i>A. ficuum</i>	49	87	5.5	58	0.027	2.16	70	Ullah & Sethumadhavan, 2003.
<i>A. oryzae</i>		120-140	5.5	50				Shimizu, 1993.
<i>A. nidulans</i>		77.8	5.5	55				Wyss <i>et al.</i> , 1999b.
<i>Citrobacter freundii</i>			2.7, 5.0	52				Delucca <i>et al.</i> , 1992.
<i>Rhizopus oligosporas</i>			4.5	55	0.15	9.47		Sutardi & Buckle, 1988.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			4.6	45				Nayini, 1984a.
<i>S. castelii</i>		490	4.4	77				Sequeilha <i>et al.</i> , 1992.
<i>S. occidentalis</i>		490	4-5	75-80	0.038			Sequeilha <i>et al.</i> , 1992.
<i>K. thermotolerans</i>			4-5	60-65				Nakamura <i>et al.</i> , 2000.
<i>Pichia anomala</i>		64	4	60	0.20			Vohra & Satyanarayana, 2002.
<i>Penicillium caseoicolum</i>		60-81	3	45				Amano Pharmaceuticals, 1995.
<i>E. nidulans</i>	49	67						Wyss <i>et al.</i> , 1999a.
<i>M. thermophila</i>	50	66						Wyss <i>et al.</i> , 1999a.

Tabla IV. (Continuación)

Origen de la fitasa	PM teórico (kDa)	PM experimental (kDa)	pH	Temperatura °C	Km (mM)	Actividad específica (U/mg ⁻¹)	Termoestabilidad (°C)	Referencia
<i>Bacillus sp.</i>		46	6	60	0.5	36	80	Choi <i>et al.</i> , 2001.
<i>Bacillus sp.</i>		40	7	70	0.55			Vohra & Satyanarayana, 2003.
<i>Bacillus subtilis</i> 168		44	6	55		36.9	95	Tye <i>et al.</i> , 2002.
<i>Bacillus licheniformis</i>		47	6	65		23.6	70	Tye <i>et al.</i> , 2002.
<i>Bacillus subtilis</i> (natto)		38	6.0-6.5	60	0.500	8.7		Shimizu, 1992.
<i>B. subtilis</i>		42	7.0	55		29		Kerovuo <i>et al.</i> , 1998.
<i>B. subtilis</i>		37	7.0	60	0.05, 0.06, 0.1, 0.15	8.55		Powar & Jagannathan, 1982.
<i>B. amyloliquefaciens</i>	39	44	7.0-7.5	70	0.550	20		Kim <i>et al.</i> , 1998a.
<i>Klebsiella sp.</i>			6	37	2.0	62.5		Shah & Parekh, 1990.
<i>Klebsiella aerogenes</i>		700	4.5-5.2	60	0.11			Tambe <i>et al.</i> , 1994.
<i>K. terrigena</i>		40	5	58	0.3	205	40, 50 y 60	Greiner <i>et al.</i> , 1997.
<i>K. oxytoca</i>		40	5.0-6.0	55				Jareonkitmongkol <i>et al.</i> , 1997.
<i>Escherichia coli</i>	44	42	4.5	55	0.13	811		Greiner <i>et al.</i> , 1993.
<i>Escherichia coli</i>			3.5	55	0.3-2.1		55	Lee <i>et al.</i> , 2005.
<i>Enterobacter cloacae</i> .	27	ND						GenBank acceso no. U92439.
<i>Pseudomonas sp.</i>			5.5	40	0.016			Irving & Cosgrove, 1971.
Maíz		76	4.8	55				Laboure <i>et al.</i> , 1993.
Germinado de maíz								Laboure <i>et al.</i> , 1993.
Soja		60	4.5-4.8	55				Gibson & Ullah, 1988.
Semillas de leguminosas			8	ND				Scott, 1991.
Semillas de canola			5.2	50				Houde <i>et al.</i> , (1990.
<i>Cucúrbita maxima</i>		66.5	4.8	48				Goel & Drama, 1979)
<i>Lilium longiflorum</i>		36, 88	8.0	55-60				Scott & Loewus, 1986.
<i>Typha latifolia</i> (polen)			8	ND	0.017	0.113		Hara <i>et al.</i> , 1985.
Mucosa del intestino de rata		70-90	7.5	ND				Yang <i>et al.</i> , 1991 b.
Hígado de rata	51	ND						Craxton <i>et al.</i> , 1997.
<i>Paramecium</i>		240						Freund <i>et al.</i> , 1992.

Otro caso lo representa la enzima con estructura hexamérica del protozoario *Paramecium* (Freund *et al.*, 1992). Las fitasas bacterianas son generalmente más pequeñas que las fúngicas.

Las fitasas fúngicas generalmente presentan un tamaño molecular alrededor de 50 kDa y el tamaño experimental es entre 65 y 70 kDa, indicando una fuerte glicosilación. La fitasa nativa de *A. niger* NRRL 3135 es glicosilada en un 27%, presentando N-glicosilación de cadenas de manosa y galactosa (Ullah, 1988). Los patrones de glicosilación en las fitasas recombinantes varía de hospedero a hospedero y con las condiciones de cultivo (Wyss *et al.*, 1999b). A pesar de que los diferentes patrones de glicosilación observados en la fitasa de *A. niger* no afectaron las propiedades catalíticas, termoestabilidad y en la propiedades de replegamiento de esta enzima (Wyss *et al.*, 1999a), en general la glicosilación puede afectar las propiedades catalíticas de las fitasas o tener un impacto en la estabilidad o el PI de la proteína. Estudios sobre los patrones de glicosilación de la fitasa de *A. niger* (*phyA*) expresada en *Pichia pastoris* (Han & Lei, 1999), indican que esta fitasa no es afectada en su capacidad de hidrolizar el ácido fítico y que mejora ligeramente la termoestabilidad comparada con la misma enzima sobreexpresadas en *A. niger*. La desglicosilación de esta fitasa presentó un 34% de reducción en su termoestabilidad.

Otros estudios realizados en fitasas fúngicas por Wyss y colaboradores (Wyss *et al.*, 1999a) sugieren que la glicosilación no afecta o presenta efecto mínimo sobre PI, con excepción de las fitasas sobre-expresadas en *H. polymorpha*, las cuales cambiaron el pI a valores ácidos.

La temperatura óptima de las fitasas varía de 40-70 °C. Las temperaturas óptimas de las fitasas del género de *Aspergillus* oscila entre 40 y 70 °C mientras que para el género de *Bacillus* oscila entre 55 y 70 °C, siendo la fitasa de *A. terreus* (Yamada *et al.*, 1968) y la fitasa *Bacillus amyloliquefaciens* (DS11) (Kim *et al.*, 1998a) las que poseen actividad a temperaturas óptimas de 70°C. Para la fitasa de *Escherichia coli* se ha reportado una temperatura óptima de 55°C (Greiner *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2005). En la tabla IV se presentan las temperaturas óptimas para fitasas de diversos orígenes.

En el uso de las fitasas como aditivos en los alimentos para dietas de animales, es deseable que estas enzimas presenten termoestabilidad entre 80 a 100 °C, temperaturas empleadas durante el proceso del peletizado del alimento para animales.

Las fitasas del género *Aspergillus* suelen ser inestables a altas temperaturas perdiendo por lo general su actividad a 60°C, con excepción de la fitasa producida por *Aspergillus fumigatus*, siendo una de las fitasas más termoestables reportadas hasta el momento, ésta soporta temperaturas arriba de 100°C durante 20 min, perdiendo solo el 10% de su actividad enzimática inicial (Pasamontes, 1997b).

Las fitasas alcalinas de *Bacillus* son muy estables a temperaturas altas en un rango de 70-95°C (Kim *et al.*, 1998a; Choi *et al.*, 2001; Tye *et al.*, 2002). La fitasa de *Bacillus amyloliquefaciens* es una de las enzimas más termoestable, basándose en los valores de T_m (80 °C, la temperatura de desnaturalización) determinado por diferentes métodos calorimétricos (Ha *et al.*, 2000). Esta fitasa retiene el 100% de actividad remanente después de un calentamiento a 70°C durante 10 min (en presencia de 5 mM de CaCl₂) y el 50 % de actividad después del tratamiento a 90°C por 10 min (Ha *et al.*, 2000). La estabilidad de la fitasa de *Bacillus amyloliquefaciens* se reduce drásticamente al someterla a 50°C en ausencia de CaCl₂, esto indica que los iones de Ca²⁺ protegen a la enzima contra el efecto de la desnaturalización térmica. La fitasa *phyL* de *Bacillus lichiniformis* reportada por Tye y colaboradores en el 2002 (Tye *et al.*, 2002) retiene el 61 % de actividad después del tratamiento a 95°C por 15 min, siendo la fitasa más termoestable reportada de esta especie.

La fitasa AppA2 de *Escherichia coli* expresada en diferentes sistemas de expresión (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Pichia pastoris*) mostró propiedades bioquímicas similares en cuanto a la actividad a pH y temperatura. Todas las AppA2 recombinantes fueron termoestables a 55°C con una actividad relativa entre 90-96 % pero a 75°C, solo mantienen 20 % de actividad relativa. La AppA2 expresada en *Schizosaccharomyces pombe* fue la enzima más termoestable (\cong 50% actividad relativa) a 65°C que las fitasas AppA2 expresadas en las otras levaduras, la diferencia en la termoestabilidad es aún discutible si se debe a la glicosilación u otra modificación postraduccional o bien a la pureza de la preparación (Lee *et al.*, 2005).

Un estudio comparativo realizado por Yin y colaboradores en el 2007 (Yin *et al.*, 2007) sobre la termoestabilidad de dos fitasas comerciales de *Aspergillus niger*, fitasa R (Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland), fitasa B (BASF company, The Netherlands), la fitasa E nativa de *E. coli* y dos fitasas recombinantes de *E. coli* producidas en *Pichia pastoris*, la fitasa PG (expresada con pGAPZaA) y la fitasa PI (expresada con pPICZaA), mostró que la fitasa R fue la más termoestable con una actividad relativa del 41–42% a 90 °C, del 86% a 80 °C y del 96–100% a 70 °C en un tratamiento de 15 min. Las demás fitasas fueron termoestables a 60°C con una actividad relativa de 82-100%, pero a 70°C la fitasa B presentó una actividad relativa de un 71%, mientras que las fitasas bacterianas presentaron una actividad relativa en un intervalo de 27 al 58 %. En la tabla IV se presenta la termoestabilidad reportada para algunas fitasas.

La actividad de fitasa de *B. subtilis* no es susceptible a proteasas tales como tripsina, papaina y elastasa (Powar & Jagannathan, 1982), además se sugiere que las fitasas fúngicas son más resistentes a las proteasas.

Mecanismos de hidrólisis del fitato

El mecanismo catalítico de la hidrólisis de los enlaces éster-monofosfato de las fosfatasa ácidas de histidina o histidin fitasas HAPs fue elucidado mediante mutagénesis sitio- dirigida (Ostanin *et al.*, 1992; Ostanin & Van Etten, 1993) y por la estructura cristalina de análogos de complejos del estado de transición (Lim *et al.*, 2000). En base a estos resultados se propuso el mecanismo catalítico de la hidrólisis de los éster-monofosfato, el cual consiste en que un residuo de histidina, que se encuentra en el sitio conservado RHGXRRP, sirve como nucleófilo en la formación fosfohistidina, un intermediario covalente (Ostanin *et al.*, 1992; Lindqvist *et al.*, 1994) y que un residuo de ácido aspártico en el motivo HD conservado en el extremo C-terminal sirve como protón donador al átomo de oxígeno del éster-monofosfato que se hidroliza (Lindqvist *et al.*, 1994, Porvari *et al.*, 1994). Por la participación de una histidina directamente en el mecanismo de catálisis enzimático, estas fitasas se denominan histidin fitasas. Estas fitasas se encuentran en microorganismos tales como los hongos, en particular en especies del género *Aspergillus* por ejemplo *A. terreus*, *A. ficum* y *A. níger*.

El mecanismo catalítico de la hidrólisis del fitato de las fitasas alcalinas fue caracterizado por mutagénesis sitio dirigida, análisis cinéticos y de la estructura cristalina de la fitasa de *Bacillus amyloliquefaciens* o DS11 (Oh *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2001). De forma general estos estudios proponen que una molécula de calcio-agua en el sitio activo de la fitasa ataca directamente el enlace éster-monofosfato de un complejo de fitato-calcio presente en la fitasa alcalina. Estas enzimas de origen bacteriano, como es el caso de las producidas por *Bacillus subtilis* (Kerovuo *et al.*, 1998) y las producidas en *Bacillus amyloliquefaciens* (Ha *et al.*, 2000), se caracterizan por no poseer el dominio (RHGXRX) en su sitio activo, a diferencia de las histidin fitasas presentan alta similitud entre ellas en su secuencia aminoacídica y tienen una actividad catalítica óptima a valores próximo a pH 7. Una característica interesante de esta familia es su dependencia de iones calcio tanto para su estabilidad como para su actividad catalítica por lo que los iones calcio deben interactuar con la cadena polipeptídica tanto fuera como dentro del sitio activo. Mediante estudios de modelización computarizadas sobre la fijación del sustrato, así como del análisis de los productos obtenidos después de la hidrólisis (Kerovuo *et al.*, 2000d) se ha propuesto el siguiente mecanismo: El sustrato interacciona con la enzima a nivel de una hendidura superficial que se encuentra en la parte superior de ésta a través de los grupos fosfato en posición 2 y 4. Esta interacción se realiza en parte con iones calcio que se encuentran en la hendidura catalítica y por otra parte por los residuos de aminoácidos presentes cargados positivamente (Lys76, Lys77, Arg122, Lys 179). El grupo fosfato que se encuentra en la posición 3 interacciona fuertemente con la hendidura catalítica y así poder ser removido. El intermediario I (1, 2, 4, 5, 6) P5 obtenido puede ahora interaccionar de la misma manera con la hendidura catalítica. Siendo en este caso los grupos fosfato en posición 2 y 6 los que se unen a los iones calcio. El fosfato en la posición 1 se remueve y el intermediario formado I (2, 4, 5, 6) P4 pasa a ser el nuevo sustrato. De la misma manera, la siguiente interacción ocurre con los grupos fosfatos en posición 6 y 4 y se remueve el grupo fosfato en posición 5 formándose el I (2, 4, 6) P3 siendo el producto final de la reacción. Adicionalmente se ha observado también que durante la hidrólisis del ácido fítico la formación en menor grado del intermediario I (1, 2, 3, 5) P4, que indica que la enzima también interacciona con el fitato en los fosfatos de la posición 1 y 5 removiéndose el fosfato de la posición 6.

Por lo tanto, estas enzimas tienen fundamentalmente actividad de 3 fitasas y algo de actividad 6 fitasa pero en ningún caso se llega a remover todos los grupos fosfato del fitato.

Especificidad del sustrato

La especificidad y afinidad por el sustrato son propiedades importantes de las fitasas, específicamente relacionada con la naturaleza fisiológica del sustrato (Figura 1 y 2).

Las fitasas actúan sobre amplia variedad de sustratos tales como el ADP ATP, p-nitrofenil fosfato, fructosa 1,6-bifosfato, glucosa 6 fosfato α y β glicerofosfato, y el ácido fítico. Las propiedades catalíticas de diversas fitasas han sido determinadas para diversos sustratos, siendo el fitato el sustrato más estudiado, sin embargo solo pocas fitasas presentan alta afinidad por el ácido fítico siendo las fitasas del género *Bacillus* (Powar & Jagannathan, 1982, Shimizu, 1992) y las fitasas alcalinas aisladas del polen lily (Barrientos *et al.*, 1994), las que se caracterizan por tener alta especificidad por el fitato.

La especificidad de sustrato de las fitasas alcalinas es más estrecha que las HAP. La relación recíproca entre la especificidad del sustrato y la estructura cristalina de las HAPs o las fitasas alcalinas proporcionan una nueva visión en la naturaleza del fitato y en el reconocimiento molecular de las fitasas. Las HAPs presentan una amplia especificidad por diversos ésteres de fosfatos. Los mecanismos de reacción de la hidrólisis de los ésteres de fosfatos en las HAP parecen seguir las propiedades de las fosfatasas ácidas no específicas (Gibbson & Ullah, 1988).

Específicamente para el fitato como sustrato, las HAP pueden hidrolizar el fitato libre a pH ácido, cuando el fitato existe en forma fitato libre (Figura 1, Maenz *et al.*, 1999; Wyss *et al.*, 1999a). Recientemente, la estructura cristalina del complejo de la fitasa de *E. coli* y fitato demostró que el sitio activo cargado positivamente de estas fitasas prefieren fitato libre (Figura 3B, Lim *et al.*, 2000). De hecho, las HAP no pueden hidrolizar el complejo fitato-metal (Maenz *et al.*, 1999; Wyss *et al.*, 1999a). Por consiguiente agentes quelantes como el EDTA y ftalato estimula la actividad de fitasa

debido a la remoción de los cationes divalentes de los metales (Maenz *et al.*, 1999; Wyss *et al.*, 1999a).

Al contrario de otras HAPs, las fitasas alcalinas exhiben una alta especificidad por el fitato y no tiene una actividad enzimática sobre otros ésteres de fosfatos (Tabla II, Powar & Jagannathan, 1982; Hara *et al.*, 1985; Scott and Loewus, 1986; Scott, 1991; Shimizu, 1992; Kerovuo *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998a; Choi *et al.*, 2001; Idriss *et al.*, 2002). Mas específicamente, estudios cinéticos de *B. amyloliquefaciens* demostraron que las fitasas alcalinas pueden hidrolizar el complejo fitato-calcio a pH 7-8, cuando el fitato existe como complejo de fitato-calcio (Figura 2; Oh *et al.*, 2004). Además, la estricta especificidad de sustrato de las fitasas alcalinas es racionalizada por la formación de un puente entre un calcio y los dos oxianiones de los grupos fosfato del fitato (figura 1B; Oh *et al.*, 2004). Este tipo de estricta especificidad de sustrato es común en una reacción que involucra intermediarios fosforilados, especialmente nucleótidos. Por ejemplo casi en todas las reacciones que involucra el ATP requiere de MgATP como un sustrato (Segel, 1975).

Recientemente la estructura cristalina de la fitasa de *B. amyloliquefaciens* DS11, demostró que el sitio activo cargado negativamente proporciona un ambiente electrostáticamente favorable complejo fitato-calcio cargado positivamente (Ha *et al.*, 2000; Shin *et al.*, 2001). Por tal razón, el EDTA es un fuerte inhibidor de la actividad de las fitasas alcalinas (Powar & Jagannathan, 1982; Kerovuo *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998a; Liu *et al.*, 1998).

La estructura cristalina de la fitasa de *E. coli* muestra claramente que la mayoría de los grupos fosfatos del fitato interactúan con el sitio activo de las fitasas. La amplia región del sitio activo permite a HAPs acomodar varios tipos de ésteres de fosfato tal como pNPP, AMP, ATP, fructosa 1, 6-bifosfato y glucosa 6 fosfatos (Tabla II). En contraste con la región del sitio activo de la fitasa de *B. amyloliquefaciens* puede solo enlazar dos grupos fosfatos del complejo fitato-calcio, que dota a las fitasas alcalinas con alta especificidad del sustrato por el complejo fitato-calcio (Figura 2B).

4.5. Parámetros cinéticos y actividad específica

Las propiedades cinéticas de una enzima se determinan a través de diferentes parámetros cinéticos, siendo los más importantes la velocidad máxima (V_{\max}), la constante de Michaelis-Menten (K_m) y la constante catalítica (K_{cat}). Todas estas constantes son determinadas con un sustrato concreto y a condiciones de reacción específicas. La K_m es característica de una enzima y particular para un sustrato, representa la cantidad de sustrato necesario para alcanzar el 50 % del valor de la V_{\max} y se expresa en unidades de concentración ($K_m = V_{\max}/2$) y no varía con la concentración de enzima.

El valor de K_m representa la constante de disociación de una enzima y proporciona información sobre la afinidad de la enzima por el sustrato. Valores bajos de K_m indican que el complejo enzima sustrato es muy estable, refleja una alta afinidad de la enzima por su sustrato, porque a una baja concentración del mismo, la enzima ha desarrollado ya la mitad de la velocidad máxima, que la disociación es lenta y por lo tanto que la cantidad de producto obtenido es baja. Valores altos de K_m indican una baja afinidad de la enzima por su sustrato porque a una concentración elevada del mismo, la enzima desarrolla la mitad de la velocidad máxima.

El valor de K_{cat} , también conocido como “turnover number” o número de recambio refleja la capacidad de la enzima para llevar a cabo la transformación y es definido como el número de moléculas de sustrato transformadas por unidad de tiempo por molécula de enzima o de sitio activo. El k_{cat} se determina en condiciones de saturación de manera que la cantidad de sustrato no sea limitante, se mide en s^{-1} y se puede calcular con la siguiente ecuación $k_{\text{cat}} = V_{\max}/[E]_T$.

Por último, la eficiencia de una enzima puede ser expresada en términos de K_{cat}/K_m , factor conocido como constante de especificidad, debido a que este factor implica la afinidad de la enzima por el sustrato y las propiedades catalíticas de la enzima y es muy útil para comparar la eficiencia de varias enzimas en la catálisis por un sustrato, o bien compara la eficiencia de una enzima por diversos sustratos. El valor máximo teórico para este factor es de 10^8 a 10^9 en $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

La actividad específica es la actividad de una preparación enzimática por mg de proteína y nos da un criterio de pureza.

Con algunas excepciones, la mayoría de las fitasas estudiadas siguen la cinética de Michaelis-Menten en la tabla IV se presentan los valores de K_m y actividades específicas reportadas para algunas fitasas.

Oh y colaboradores (Oh *et al.*, 2001) realizaron un estudio de parámetros cinéticos y mutagénesis dirigida sobre la fitasa de *Bacillus amyloliquefacien*, en donde se realizó una serie de modificaciones estratégicas en la cadena aminoacídica y se comparó los valores de K_m de la fitasa nativa (0.138 mM), con los valores de K_m de las fitasas modificadas, estos valores aumentaron en un rango de 0.7 a 11.9 mM⁻¹, cambiando totalmente las propiedades de la enzima y en todos los casos el número de recambio fue menor que la enzima nativa.

Powar y Jagannathan (Powar & Jagannathan, 1982) determinaron las propiedades cinéticas de la fitasa de *Bacillus subtilis*, analizaron el valor aparente de la K_m para el fitato a diferentes pH, a 7.5, 6.5, 6.0 y 5.5, reportando los siguientes valores 0.05, 0.06, 0.1 y 0.15 mM respectivamente. Encontraron que durante la reacción enzimática se adicionan al inositol hexafofato otros sustratos (polifosfatos) generados por la hidrólisis de la enzima, concluyendo que la reacción enzimática es compleja. La actividad específica reportada para esta fitasa fue de 8.53 U/mg de proteína (Powar & Jagannathan, 1982).

Choi y colaboradores, (Choi *et al.*, 2001) estimaron los parámetros para una fitasa de *Bacillus sp.* con un valor de K_m para el fitato de 0.05 mM, una actividad específica de 36 U/mg de proteína y un número de recambio de 26.6 s⁻¹. Kerovuo (Kerovuo *et al.*, 2000a) reportó para la fitasa C de *Bacillus subtilis*, un valor de K_m para el fitato de 0.2 mM y una actividad específica de 29 U/mg de proteína.

La actividad específica de las fitasas fúngicas con ácido fítico como sustrato varía de 23 a 198 U/mg⁻¹ para *A. fumigatus* y *A. terreus* respectivamente (Kerovuo *et al.*, 2000a). Los diferentes patrones de glicosilación no tienen un efecto significativo en la actividad específica en las fitasas fúngicas (Wyss *et al.*, 1999b). Actividad específica de las fitasas de origen bacteriano varía entre 8.7 U/mg⁻¹ para *B. subtilis* (Shimizu, 1992) y 811 U/mg⁻¹ para *E. coli* (Greiner *et al.*, 1993).

Casey y Walsh en el 2003 (Casey & Walsh, 2003), reportaron el valor de actividad específica de la fitasa de *Aspergillus niger* 5.27 U/mg, mientras que para *Bacillus subtilis* se reportó el valor de 8.53 U/mg de proteína por Powar y Jagannathan en 1982 (Powar & Jagannathan 1982).

Las fitasas que presentan un rango amplio de sustratos específicos tienen baja actividad específica para el ácido fítico que varía de 23 y 43 U/mg⁻¹ (Kerovuoto *et al.*, 2000a). Sin embargo, las fitasas con un estrecho rango de sustrato presentan una actividad específica de 103 (Wyss *et al.*, 1999a)-811 (Greiner *et al.*, 1993) U/mg⁻¹, las fitasas de *Bacillus* no entran en esta clasificación, estas fitasas tienen alta especificidad por el ácido fítico, pero tienen baja actividad específica.

La fitasa purificada de *A. ficuum* silvestre se caracteriza por tener un peso molecular de 61.7 kDa, intervalo de pH de actividad de 2.5 a 5.5, un valor de Km de aproximadamente 40 µM y una actividad específica cerca de 50 U/mg (Ullah, 1988). Estas características difieren de una fitasa reportada para otra cepa de *Aspergillus ficuum* (PCT WO 91/05053), la cual es activa a valores de pH de 2.5 a 5.5, posee un valor de Km de 250 µM y una actividad específica de cerca de 100 U/mg proteína. De todos los organismos estudiados (plantas, bacterias y hongos), el *Aspergillus niger* NRRL 3135 es el que produce la fitasa extracelular más activa. Este *Aspergillus* produce dos fitasas denominadas A y B. La fitasa tipo A se caracteriza por un peso molecular de 85 kDa, posee una Km de 27 µM, 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, una Km de 103 µM, un pH óptimo de 2.5 y una temperatura óptima de 63°C (Wodzinski & Ullah, 1996).

Los valores de Km y actividad específica de algunas fitasas publicadas se presentan en la tabla IV en donde se usó como sustrato ácido fítico.

Moduladores de actividad enzimática

Los iones metálicos muestran una modulación en la actividad de fitasa probablemente debido a la formación de complejos con el fitato y por consiguiente disminuye la concentración del sustrato en el sitio activo. La fitasa de *Enterobacter sp.* es gradualmente inhibida por el Zn²⁺, Cd²⁺, Ba²⁺, Cu²⁺ y Al³⁺ (Yoon *et al.*, 1996), similarmente las fitasas de *B. subtilis* (nativa) N-77 se inhiben gradualmente con iones de

Zn²⁺, Cd²⁺, Ba²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺ y Al³⁺ (Shimizu, 1992). Wyss y colaboradores en 1999, (Wyss *et al.*, 1999b) reporta que el Cu²⁺ reprime considerablemente la actividad enzimática de las fitasas de *E. nidulans* y *A. terreus* y la fitasa *A. fumigatus* es inhibida por varios metales. Mientras que la actividad de la fitasa de *A. fumigatus* es estimulada en un 50% por el EDTA, las fitasas dependientes de calcio como lo son las fitasas de *Bacillus* son inhibidas por EDTA.

En algunos casos los reactivos reductores tales como 2-mercaptoetanol, ditioneol y glutatión no tiene efectos sobre las fitasas microbiana, por lo cual se sugiere que estas enzimas no tienen accesible grupos disulfuro, o que el grupo disulfuro libre juega un rol despreciable en la actividad y en la estructura. Sin embargo para el caso de la fitasa de *A. ficuum*, los puentes de disulfuro (Ullah & Mullaney, 1996) son necesarios en el plegado y la actividad de esta enzima. Las fitasas de *Bacillus* no tienen residuos de cisteína.

El myo-inositol hexsulfato, un análogo estructural del fitato, ha mostrado ser un potente inhibidor competitivo para la PhyA y PhyB de *A. ficuum* (Ullah & Sethumadhavan, 1998). El fluoruro es conocido como inhibidor de diferentes fitasas y fosfatasas (Irving, 1980; Nayini & Markakis, 1986), tal es el caso de la fitasa alcalina de polen lili (Barrientos *et al.*, 1994; Scott & Loewus, 1986) y de una inhibición competitiva de la fitasa de *A. terrigena* (Greiner *et al.*, 1997). La fitasa de *A. terrigena* es también inhibida por el fosfato, molibdato y vanadato. La inhibición por producto de la hidrólisis del fitato causado por el fosfato inorgánico ha sido documentado para las fitasas bacterianas, fúngicas y de las fitasas de avena (Greiner *et al.*, 1993; Howson and Davis, 1993; Konietzny *et al.*, 1995).

Las concentraciones altas de sustrato se han reportado que presentan un efecto inhibitorio para fitasas tal es el caso de las fitasas *Klebsiella sp.* y *Rhizopus oligosporus* (Shah & Parekh, 1990; Sutardi & Buckle, 1988). La actividad de las fitasas fúngicas es inhibida a concentraciones por arriba de 1 mM de sustrato (Ullah, 1988). Las fitasas de la raíz de maíz y de soja son inhibidas a una concentración de sustrato de 300 µM y 20 mM respectivamente (Hubel & Beck, 1996; Sutardi & Buckle, 1986). A altas concentraciones de sustrato, la carga de los grupos fosfatos puede afectar el medio ambiente del dominio catalítico de la enzima. Esto puede inhibir la conversión del

complejo enzima-sustrato al complejo enzima-producto (Ullha & Phillipy, 1994), aunque la formación de un complejo insoluble de proteína-fitato probablemente no se pueda descartar.

4.6 Aplicación Biotecnológica de las Fitasa

Las fitasas son de gran interés para la aplicación biotecnológica, particularmente para la reducción del contenido de fitato en alimentos para animales y consumo humano (Lei & Stahl, 2001; Vohra & Satyanarayana, 2003).

Dependiendo de la aplicación, una fitasa de interés comercial debe de cumplir con una serie de criterios de calidad. Éstas deben de ser efectivas en la liberación del fósforo fítico en el tracto digestivo, también deben de ser estables y resistentes a las altas temperaturas empleadas durante el procesado del alimento y durante el almacenamiento, además que su producción sea de bajo costo.

La termoestabilidad es una característica importante ya que el proceso de peletizado es comúnmente realizado a temperaturas entre 65-95 °C. Existe la posibilidad de aplicar la fitasa después del peletizado ya sea por aspersión o recubrimiento químico y con esto superar la desnaturalización por las altas temperaturas, aún así la termoestabilidad sigue siendo una característica deseable para estas enzimas. Son muy pocas las fitasas de origen natural que poseen el nivel requerido de termoestabilidad para la aplicación como aditivo para alimentos para animales (Lei & Stahl, 2001). Por lo cual esta propiedad es hasta hoy motivo de búsqueda de nuevos aislamientos y caracterización y del diseño de nuevas fitasas termoestables (Kim *et al.*, 1998b; Lehmann *et al.*, 2000; Pasamontes *et al.*, 1997b). De la misma manera sigue siendo de gran valor las enzimas estables a un largo tiempo de almacenamiento y transporte a temperatura ambiente.

La habilidad de las fitasas para hidrolizar el fitato en el tracto digestivo es determinada por sus propiedades enzimáticas. Ya que es el estomago el principal sitio dónde se requiere la actividad de una fitasa, ésta debe de poseer una buena actividad a pH ácidos y deben de ser resistentes a la pepsina. El valor de pH en el tracto digestivo de la especie animal dónde se requiera aplicar una fitasa, determinará el tipo de fitasa a emplearse dependiente de el intervalo de pH en el cual la fitasa tiene actividad.

La estabilidad a las enzimas proteolíticas del tracto digestivo de cada especie es también un factor determinante en el tipo de fitasa emplearse. Se ha demostrado que las fitasas de *Escherichia coli* y *Citrobacter braakii* son más resistentes a la pepsina y pancreatina que las fitasas comerciales disponibles de *Aspergillus niger* (Kerovuo *et al.*, 2000b; Rodríguez *et al.*, 1999), además la fitasa de *Citrobacter braakii* es resistente a tripsina (Rodríguez *et al.*, 1999). Las fitasas de *Bacillus* exhiben una sensibilidad similar a la pancreatina que la fitasa de *E. coli*, pero son más susceptibles a la pepsina (Simon & Igbasan, 2002).

En cuanto a la eficiencia catalítica, las fitasas de *E. coli* y *Citrobacter braakii* exhiben los valores más altos reportados de K_{cat}/K_m , 1.34×10^7 y $1.03 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ respectivamente, valores que les favorecen para emplearse como aditivo de alimento.

La fitasa de *E. coli* presenta una excepcional estabilidad bajo condiciones de pH ácidos, incluso al exponerse a pH 2 por varias horas sin afectar la actividad (Greiner *et al.*, 1993).

Otra característica que determina la eficiencia o limitaciones en la suplementación de las fitasas es la dependiente de la especificidad del sustrato. Experimentos *in vitro* sugieren que las fitasas que presentan una especificidad amplia por diversos sustratos son más apropiadas para su aplicación en la nutrición animal (Wyss *et al.*, 1999a) que las fitasas con una estrecha especificidad. Desafortunadamente una amplia especificidad por el sustrato está relacionada con una baja actividad específica. Finalmente, las fitasas son competitivas si se pueden producir con un rendimiento alto y purificar con estrategias relativamente baratas, por lo cual actualmente existe una gran competitividad en la sobre-expresión y secreción de fitasas por microorganismos recombinantes (Mayer *et al.*, 1999; Miksch *et al.*, 2002; Yang & Shamsuddin, 1995).

La reducción de los niveles de fitato y el incremento de la actividad de fitasa en las semillas de plantas se ha planteado como otra alternativa estratégica. El incremento de la actividad de fitasa en las semillas de las plantas se ha buscado a través de la expresión de genes heterólogos de fitasas fúngicas (Brinch-Pedersen *et al.*, 2000; Li *et al.*, 1997; Pen *et al.*, 1993; Ullah *et al.*, 1999).

Otra estrategia investigada es el de proporcionar a las fitasas como una más de las enzimas digestivas en los animales como cerdos y pollos, mediante manipulación

genética. Un ejemplo fue el de la generación de cerdos transgénicos portando el gen de la fitasa de *E. coli*, capaces de producir esta fitasa y secretarla en la saliva (Forsberg *et al.*, 2003; Golovan *et al.*, 2001).

La industria de la alimentación está también interesada en el uso de las fitasas, por un lado para mejorar la bio-disponibilidad de minerales reduciendo el contenido de fitato en los alimentos y por otro para producir alimentos funcionales.

Estudios recientes han sugerido que ciertos *myo*-inositol fosfatos tiene un efecto benéfico en la salud, reduciendo el riesgo de enfermedades cardiacas (Kerovuo *et al.*, 2000c; Konietzny & Greiner, 2003), de ciertos tipos de cáncer (Baten *et al.*, 1989; Graf & Eaton, 1993; Shamsuddin, 2002; Shamsuddin & Vucenik, 1997; Ullah & Shamsuddin, 1990; Vucenik & Sakamoto, 1993; Vucenik & Shamsuddin, 2003; Yang & Shamsuddin, 1995) y la formación de piedras renales (Modlin, 1980; Ohkawa *et al.*, 1984). El número y la posición de los grupos fosfatos en el anillo del *myo*-inositol son de gran importancia para su función fisiológica. Independientemente de su origen, plantas, bacterias o hongos, las fitasas ácidas estudiadas liberan cinco de seis grupos fosfatos del fitato, obteniendo como producto final el monofosfato de *myo*-inositol (Barrientos *et al.*, 1994; Cosgrove, 1970; Greiner *et al.*, 2000; Greiner *et al.*, 2001; Greiner *et al.*, 2002; Hayakawa *et al.*, 1990; Lim & Tate, 1973; Maiti *et al.*, 1974; Nakano *et al.*, 2000; Wyss *et al.*, 1999b) esto indica que todas estas fitasas tienen preferencia por los grupos fosfatos en posición ecuatorial, y son incapaces de actuar sobre el fosfato en posición axial y solo en algunos casos raros ha sido detectado *myo*-inositol. Por otro lado, las fitasas alcalinas solo hidrolizan hasta tres grupos fosfato produciendo trifosfato de *myo*-inositol como producto final (Barrientos *et al.*, 1994; Hara *et al.*, 1985; Kerovuo *et al.*, 2000c). Así entonces, dependiendo de la fitasa usada serán diferentes los residuos del fitato generados, ha diferentes velocidades y en diferente orden. Por consiguiente, cada fitasa puede ser útil en la producción de alimentos con un contenido y composición regulada de *myo*-inositol fosfato con efectos benéficos para la salud.

Aplicación en nutrición animal

La fitasa es incorporada en dietas comerciales para animales como pollos, cerdos y peces, para mejorar la disponibilidad de fósforo, minerales, aminoácidos y energía. Del 60-80% de fósforo en alimento derivado de plantas se encuentra acompañado en forma de fitato. El fitato y los nutrientes acompañados a éste no pueden ser adsorbidos en el tracto digestivo sin la acción de las fitasas. Generalmente esta actividad puede ocurrir en el tracto digestivo y/o en el alimento antes del consumo (Sebastián *et al.*, 1998).

Algunos cereales son ricos en fitasas endógenas tales como centeno, trigo, cebada, mientras que otros granos como el maíz y otras semillas oleosas poseen muy poca o nula actividad de fitasa (Eeckhout & Paepe, 1994). Las fitasas de origen vegetal son generalmente activas, (Temperton *et al.*, 1965 a,b), sin embargo la acción de las fitasas vegetales en las preparaciones nutritivas para animales es limitada ya que su contenido es muy variable. Además, el proceso de peletizado a temperaturas de 70 °C produce una inactivación parcial de las fitasas presentes en los granos vegetales (Pointillart, 1988). Adicionalmente, la bio-eficacia de las fitasas de cereales ha mostrado ser solo de un 40% comparada con las fitasas microbianas de las especies de *Aspergillus* (Zimmermann *et al.*, 2002).

Las fitasas producidas por microorganismos en el tracto digestivo de los rumiantes pueden degradar el fitato eficientemente, permitiendo una disponibilidad completa del fosfato fítico (Rodehutschord, 2001). Sin embargo, la flora microbiana de los animales monogástricos se localiza a lo largo del intestino y el fósforo liberado no puede ser absorbido y es desechado en el excremento. Debido a la baja disponibilidad del fósforo derivado de alimentos de origen vegetal, las dietas para animales monogástricos son tradicionalmente suplementadas con fosfato inorgánico. El fósforo en exceso en las dietas que no es adsorbido es excretado hacia el suelo. Debido al incremento de la producción de ganado en muchas regiones, exceden las proporciones de estiércol mezcladas en el suelo, resultando la acumulación de fósforo (CAST, 2002). Esto puede llevar a la eutrofización en la superficie del agua y a tiempos largos la lixiviación del fósforo en la tierra y en el agua (Furrer & Stauffer, 1987).

La primera fitasa comercialmente disponible ofreció a la nutrición animal una herramienta para reducir drásticamente la excreción de fósforo por animales monogástricos al sustituir el fosfato inorgánico con fitasas microbiana. Dependiendo de la dieta, especie animal y nivel de fitasa suplementada, la excreción del fósforo puede ser reducida entre un 25-50% (Kornegay, 1999).

La suplementación de fitasas microbiana en las dietas de animales monogástricos también mostró efectos favorables en otros nutrientes, tales como la mejora de la disponibilidad de calcio (Sebastián, 1998, Schoener & Hoppe, 2002), el incremento de la disponibilidad de Mg (Brink *et al.*, 1991), y varios elementos traza tales como el Zn (Thiel & Weigand, 1992), Cu (Adeolas, 1999), Fe (Pallauf *et al.*, 1992) y Mn (Mohanna & Nyss, 1999). Además de mejora la disponibilidad de minerales y elementos traza, también pueden potenciar la digestibilidad de las proteínas en cerdos (Jongbloed *et al.*, 1999), en pollos en engorda (Farell *et al.*, 1993), en gallinas ponedoras (Van der Klis & Versteegh, 1991), en pavos (Yi *et al.*, 1996), así como en patos (Martin & Farrell, 1994).

El efecto de las fitasas sobre la mejora en la disponibilidad de proteínas y aminoácidos puede explicarse a la destrucción de los complejos proteína-fitato y proteína-fitato-mineral en las preparaciones nutrimentales con vegetales (Ravindran *et al.*, 1999). El complejo de fitato-proteína puede formarse en el intestino en el caso de que el fitato no haya sido hidrolizado por una fitasa (Jongbloed *et al.*, 1997), así también el fitato puede acomplejarse con los aminoácidos libres suplementados al alimento (Rutherford *et al.*, 1997).

También se ha determinado que el fitato es un inhibidor de enzimas proteolíticas (Caldwell, 1992), se une al almidón e inhibe a la amilasa (Deshpande & Cheryan, 1984), por lo cual se cree que la fitasa es capaz de incrementar el empleo de energía en los animales monogástricos. Debido a los efectos descritos anteriormente y al potencial de producción de fitasas microbianas a gran escala y bajo costo, las fitasas microbianas pueden emplearse ampliamente en dietas en animales monogástricos, sin embargo, tiene que ser tomados en cuenta que las fitasas microbianas de diferentes orígenes pueden diferir en su bioeficiencia (Paditz *et al.*, 2004; Klein Holkenborg *et al.*, 2003; Wendt & Rodehutscord, 2004).

Aplicación de las fitasas en la alimentación de peces

El fósforo es un nutrimento esencial para el crecimiento, el desarrollo esquelético (Asgard & Shearer, 1997) y reproducción de peces (Hardy & Shearer, 1985). La captación de fosfato del agua por los peces es mínima, siendo la dieta la principal fuente de fosfatos en la nutrición de peces, para cumplir con los requerimientos nutricionales de esta especie, más que el fosfato presente en el agua. Por otro lado el fósforo es un contaminante crítico del medio ambiente acuático, concentración excesiva de fosfatos en el agua causa eutroficación de ríos, lagos y otras reservas acuáticas (Correll, 1999). Así que la inclusión de fitasa en la dieta de peces u otros organismos acuáticos cultivables, ha sido sugerida para reducir la expresión de fosfato hacia el agua y disminuir el efecto contaminante.

Muchos estudios han demostrado que la suplementación con fitasa en la dieta de peces incrementa la disponibilidad del fósforo del fitato (Cain & Garling, 1995; Baruah *et al.*, 2004; Rodehutschord & Pfeffer, 1995). Se ha reportado que de un 20% hasta un 80% de fósforo puede liberarse con la adición de fitasa de 500 y 1000 U/Kg en dietas a base de soya (Schafer & Koppe, 1995, Yu & Wang, 2000).

La digestibilidad aparente del fósforo y la mineralización de los huesos son consideradas como los criterios principales para determinar la influencia de la fitasa empleada en la dieta de los peces. En diversos estudios se ha mostrado que la adición de fitasa en dietas a base de soya incrementa el coeficiente aparente de digestibilidad (ACD) en fósforo en diversas especies de peces como: salmón, tilapia, truchas (Sugiera *et al.*, 2001; Sajjadi & Carter, 2004; Liebert & Portz, 2005).

Los resultados de los estudios sobre el efecto de fitasa en el crecimiento de diversas especies de peces usando dietas basadas total o parcialmente en proteínas de origen vegetal han sido inconsistentes.

Muchos estudios reportan que la adición de fitasas en dietas deficientes en fósforo favorece el crecimiento (Jackson *et al.*, 1996; Li & Robinson, 1997; Yu & Wang, 2000; Schaefer & Koppe, 1995), tal es el caso del pez gato africano (Van Weerd *et al.*, 1999), trucha arcoiris (Vielma *et al.*, 1998), salmón del atlántico (Sajjadi & Carter, 2004) y el pez piedra de Korea *Sebastes schlegeli* (Yoo *et al.*, 2005). También ha sido

reportado un incremento significativo en la retención de energía (Debnath *et al.*, 2005), así que el incremento en el crecimiento debido a la suplementación con fitasa puede explicarse por la mejora en la retención de energía. Sin embargo, en otros estudios no han encontrado diferencias significativas en el crecimiento y la ingesta de alimento entre dietas suplementadas o carentes de fitasa (Robinson *et al.*, 2002). Así que se requiere de futuras investigaciones para confirmar las funciones de la fitasa, en relación a la formulación de las dietas, tamaño del pez, al estadio de desarrollo y sistema digestivo de la especie y el contenido de fitasas endógenas en el sistema digestivo de los peces y otras especies acuáticas de interés para la acuicultura.

Por otro lado no se ha observado un efecto negativo en la sobre-vivencia causado por la suplementación de fitasa (Robinson *et al.*, 2002), indicando la ausencia de toxicidad de esta enzima.

Las fitasas incrementan efectivamente la disponibilidad del fósforo proveniente de los alimentos a base de harina de soya, pero existe menos información sobre la disponibilidad de proteínas y aminoácidos. La suplementación de fitasa en alimentos para la nutrición de peces y otras especies de interés en la acuicultura a base de harinas de origen vegetal es de gran interés para las empresas del ramo de alimentos pecuarios.

Diversos estudios muestran que la fitasa suplementada en dietas para cerdos favorece a la disponibilidad de proteínas y aminoácidos, debido a la destrucción del complejo fitato-proteína (Kornegay & Qian, 1996), sin embargo los resultados de los estudios realizados en peces aún son controversiales. Es probable que la variación de los resultados de los diferentes estudios realizados se debe a diversos factores como: la variación del contenido de fitato en las dietas, las especies sujetas a estudio, características inherentes de los ingredientes, presencia o ausencia del estómago en las diferentes especies de peces y que la actividad de fitasa es específica para un valor dado de pH (Baruah *et al.*, 2004).

Vielma y colaboradores en el 2004 (Vielma *et al.*, 2004) reportaron el efecto positivo de la suplementación de fitasa en la digestibilidad de proteínas en dietas para trucha arcoiris. Cheng y Hardy en el 2003 (Cheng & Hardy, 2003) encontraron que la suplementación con fitasa en los pelletizados de soya aumentan la digestibilidad de proteína cruda significativamente comparado con la soya cruda. Resultados similares se

encontraron en especies de peces tales como carpas (Bai *et al.*, 2004) y de trucha arcoiris (Sugiura *et al.*, 2001; Forster *et al.*, 1999). En contraste, Papatryphon y colaboradores (Papatryphon *et al.*, 1999), reportaron que no mejora la digestibilidad aparente de las proteínas incluso a niveles de 1000 FTU/Kg. De la misma manera, resultados semejantes fueron descritos en tilapia (Riche *et al.*, 2001) y salmón (Storebaken *et al.*, 1998, Lanari *et al.*, 1998).

La suplementación de fitasas en dietas a base materias primas vegetales incrementa la biodisponibilidad de minerales como el calcio, magnesio y zinc aumentando la concentración de estos minerales en huesos y en el organismo completo en diversas especies de peces (Vielma *et al.*, 1998, Yan & Reigh, 1997), tales como trucha arcoiris (Cheng, 2004), en salmón (Cain & Garling, 1995; Storebakken, 1998; Vielma *et al.*, 1998), en carpas (Schaefer & Koppe, 1995), róbalo (Papatryphon *et al.*, 1999; Hughes & Soares, 1999) y tilapia del nilo (Liebert & Portz, 2005). Sin embargo la absorción y la utilización de cada mineral en particular es dependiente de cada especie específica y de los ingredientes usados para cada dieta, por lo cual se requieren de futuras investigaciones en este campo.

La concentración de la dosis de fitasa suplementada en las dietas suele ser de 250-1500 U/Kg en muchas especies de peces. Sin embargo, una dosis óptima de fitasa, depende de ciertos factores tales como: especie, fuente y tipo de fitasa, formulación de la dieta (cantidades de sustrato por fitasa) y la selección de otros parámetros más adecuados (Ling *et al.*, 2007).

Aplicación en nutrición humana

El procesado y la manufactura de alimento para el consumo humano es también un campo de aplicación posible para las fitasas. Hasta el momento no hay en el mercado una fitasa aplicada en la alimentación humana. Las investigaciones se han enfocado para mejorar la absorción de minerales y el mejoramiento técnico del procesado de alimentos.

Algunos estudios han mostrados que las formas superiores de inositol trifosfato (IP3) afectan la adsorción de hierro presente en cereales y leguminosas (Sandberg *et al.*, 1999) y ésta se puede mejora al incluir fitasa en el preparado alimenticio.

Métodos empleados en el procesado de alimentos como lo son: cocinado, germinación, fermentación, tratamiento hidrotérmico y remojo muestran una reducción considerable de la cantidad de fitato de las leguminosas (Rehms & Barz, 1995; Nout & Rambouts, 1990). Así se ha reportado que fitasas endógenas degradan totalmente el ácido fitico durante la manufactura de los alimentos basados en harinas de arroz trigo, maíz, avena, sorgo y una harina la cual es una mezcla de soja y trigo (Hurrell *et al.*, 2003) y la degradación del fitato se ha correlacionado con una mejora en absorción de hierro. Haros y colaboradores en el 2001 (Haros *et al.*, 2001) a investigaron el posible uso de fitasas durante el procesado del pan, demostrando que el empleo de fitasa mejorar el procesado del pan.

Aplicación en la síntesis de derivados de myo-inositol

Los derivados de fosfatos de myo-inositol (mono, bis tris y tetra fosfato) juegan un papel crucial en los procesos de señalización de membranas y en la movilización del calcio intracelular en los tejidos de animales y plantas (Michell, 1975; Berridge & Irving, 1984; Samanta *et al.*, 1993; Dasgupta *et al.*, 1996; Krystofova *et al.*, 1994).

Debido a ésto, existe gran interés en la síntesis o preparación de diversos derivados de fosfatos de myo-inositol, sin embargo la síntesis química es difícil (Billington, 1993). En contraste, la síntesis enzimática ofrece la ventaja de poder ser esteroespecífica y realizada bajo condiciones de reacción suaves. El uso de fitasas ha demostrado ser efectiva en la síntesis de diferentes especies de fosfatos de myo-inositol (Siren, 1986 a, b; Dvorakova *et al.*, 2000), mostrando el potencial de aplicación de esta enzima en síntesis estereo específica de estos compuestos.

El empleo de la fitasa en la acuicultura

La acuicultura es otra de las áreas relacionadas con la producción de alimentos; su rápida expansión ha traído como consecuencia un efecto negativo sobre el impacto ambiental causado por una excesiva descarga de fósforo en los ecosistemas acuáticos durante la producción intensiva de peces y mariscos.

La harina de pescado es un ingrediente fundamental en la alimentación acuícola, su producción promedio mundial en la década pasada fue estimada en 65 millones de

toneladas métricas, de la cual el 23% fue empleado en la producción de alimentos para la acuicultura. Sin embargo, se prevé que no habrá incremento en la producción de harina de pescado en los próximos diez años a pesar del continuo crecimiento de la producción acuícola (15% anual), lo cual será un factor limitante en la producción de alimento que satisfaga el constante incremento del consumo en este sector (Hardy, 2000).

Las fuertes presiones que actualmente existen por reducir el consumo de harina de pescado han dado como resultado la búsqueda de candidatos para su substitución de entre una gran variedad de proteínas de origen vegetal. La harina de fuentes vegetales es considerada como un buen substituto de la harina de pescado en la acuicultura, y a pesar de que ofrece importantes ventajas sobre la primera, la presencia de factores antinutricionales para las especies animales acuáticas ha obstaculizado la substitución plena de la harina de pescado por aquella de origen vegetal y ha conducido a realizar múltiples evaluaciones y proponer estrategias para salvar los inconvenientes que estos factores presentan.

La suplementación de fitasas en las preparaciones nutrimentales para los peces ha sido considerada para vencer el inconveniente de la presencia de fitato en las harinas vegetales. Estudios recientes han demostrado la eficiencia del uso de fitasa para incrementar la disponibilidad del fósforo en peces, bagre (Jackson *et al.*, 1996; Li & Robinson, 1997) y trucha (Cain & Garling, 1995; Vielma *et al.*, 2000; Ling *et al.*, 2007), alimentados con preparados nutrimentales con este tipo de harinas. Sin embargo, la eficiencia de este tratamiento es dependiente de la temperatura del agua de los estanques y de los niveles de fitasa agregada. Por otro lado, se ha descrito que el costo de añadir fitasa al alimento del bagre es aproximadamente igual que el ahorro asociado con la eliminación de la suplementación de fósforo inorgánico (Li & Robinson, 1997). Algunos estudios han mostrado que el empleo de fitasa en la alimentación para peces ha tenido un efecto positivo en la disminución de los niveles de fósforo fecal asociado con la contaminación acuática, estando relacionada con los niveles de fitasa empleada (Jackson *et al.*, 1996). A pesar de los resultados positivos obtenidos hasta el momento en el empleo de fitasa en la alimentación de peces con harinas de origen vegetal, es necesario optimizar las características de fitasas para esta aplicación específica, ya que

las fitasas que actualmente son disponibles de forma comercial han sido optimizadas principalmente para su empleo en la producción de cerdos y aves.

El salmón y el camarón son considerados las especies marinas cultivables en granjas acuícolas de mayor interés económico debido a la naturaleza del mercado que las consume. Aproximadamente un tercio de la cosecha mundial de camarón (pescado y cultivado) es comercializado a nivel internacional, equivalente a unas 900,000 toneladas. Esto representa menos del 1% de la producción pesquera mundial en peso, pero el camarón es el producto marino con más valor en el mercado mundial actual.

Las granjas para la producción de salmón del pacífico y camarón son las que más han demandado el consumo de la harina de pescado como ingrediente en sus preparaciones nutrimentales. Hasta un 70% de la harina y aceite de pescado producida para el cultivo de peces es consumido para la producción de salmón, trucha y camarón (Hardy, 2000). Al igual que para la producción de peces cultivados, la industria acuícola camaronera contempla la substitución de la harina de pescado por aquellas de fuentes vegetales y el empleo de enzimas como aditivos nutrimentales, entre ellas la fitasa, para mejorar el valor nutricional de estas fuentes. Las expectativas de crecimiento de la demanda de camarón a lo largo de la próxima década y la creciente presión de sustituir la harina de pescado justifica la preocupación de contar con enzimas que satisfagan con las características necesarias para su empleo en la producción específica de las especies de camarón.

Como en los casos de otras especies animales, el empleo de fitasa ofrece una alternativa para resolver los efectos antinutricionales de los fitatos presente en las harinas vegetales. Sin embargo, en los pocos estudios realizados en camarón (Davis, 2000) no se ha encontrado un efecto positivo significativo posiblemente a que las fitasas disponibles de forma comercial han sido optimizadas principalmente para su empleo en la producción de cerdos y aves. Estas fitasas son activas a valores de pH ácidos de 2 a 5, a intervalos de temperatura del tracto gastrointestinal de estas especies animales, estables a las temperaturas empleadas en el procesado de los alimentos y resistentes a las enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal de estos animales. Sin embargo, las fitasas adecuadas para la alimentación del camarón deberían tener actividad a valores de pH de 7 a 8, y a un intervalo de temperatura de 26-32°C, condiciones presentes en el

aparato digestivo de las especies de camarón y del medio acuoso de los tanques de cultivo; además se requiere que éstas posean resistencia al ataque proteolítico de las enzimas digestivas camarón y estabilidad a las temperaturas empleadas en el procesado de los alimentos; por último una lixiviación limitada de la fitasa presente en las preparaciones extruidas en el medio acuoso de los tanques de incubación.

Especificaciones técnicas de las fitasas comerciales

Para la optimización de la aplicación de la fitasa como aditivo alimenticio es necesario considerar que existe una gran variedad de aplicaciones, particularmente para la producción a gran escala. Por ejemplo, hay un amplio rango de fuentes alimenticias, métodos de preparación y especies receptoras.

Una de las opciones para el empleo de fitasas es el tratamiento con fitasa exógena a través de la fermentación de las fuentes comestibles con microorganismos que producen y secretan fitasa de forma activa, o bien el tratamiento de las fuentes comestibles con fitasa exógena purificada.

Otra alternativa es la fabricación de piensos, hojuelas o peletizados suplementados con la enzima activa. En este caso, se requiere exponer los ingredientes a altas presiones y/o temperaturas para producir extuídos que no se disuelvan y/o degraden prematuramente (por ejemplo antes de su consumo), tomando en cuenta que en algunos casos estas preparaciones se sumergen en agua. Por lo tanto, sería deseable que para este tipo de proceso de elaboración se puedan emplear aditivos enzimáticos que sean estables bajo condiciones de alta temperatura y presión. Una alternativa empleada para superar los problemas de someter a la enzima a las temperaturas de extrusión del alimento es la aspersión de formulaciones líquidas de la enzima sobre el alimento previamente extruído y la aplicación de un revestimiento externo de una capa de aceite que evite el lixiviado prematuro de la enzima en el medio acuoso.

Las presentaciones comerciales de la fitasa microbiana están disponibles en tres formas: polvo, líquido y granulado. La estabilidad de estos productos es diferente durante su almacenamiento, así como durante la producción industrial del alimento. Generalmente la fitasa microbiana es estable hasta 6 meses en un lugar fresco y seco, en

formulaciones alimenticias se espera que pierda del 10 al 15% de su actividad si es almacenada a temperatura ambiente por cuatro meses.

Las investigaciones sobre las fitasas llevan más de 87 años, desde su descubrimiento hasta su comercialización en Europa en 1993-1994 por Gist-Brocades. El interés de la comercialización de la primera fitasa se debió a razones ambientales. Recientemente, debido al interés económico y de protección ambiental, se ha incrementado considerablemente la producción de fitasas para su empleo en preparaciones alimenticias para consumo animal en Europa y EU, y su venta se ha introducido con éxito en Latinoamérica, China y otros países asiáticos. Actualmente el volumen del mercado de las fitasas se estima en 150 millones euros (Haefner *et al.*, 2005).

Actualmente la mayoría de fitasas producidas a gran escala para su comercialización son enzimas modificadas por ingeniería genética y producidas en hongos filamentosos recombinantes. Tres fitasas comúnmente empleadas como aditivos en alimentos es la 3-fitasa de *A. niger* y dos 6-fitasas, la *Peniophora lycii* y la de *E. coli*. Las fitasas fúngicas presentan una alta resistencia a altas temperaturas y un rango de pH de actividad más bajo que las fitasas bacterianas (Liebert *et al.*, 2005). En general las fitasas de distintas fuentes presentan características diferentes que se deben considerar para su empleo en las dietas de las diferentes especies animales.

Natuphos fue la primera fitasa comercial disponible en el mercado desde 1991, fabricada por Gist Brocades (ahora DSM) y distribuida por BASF, proveniente de una cepa de *Aspergillus niger* modificada, desde entonces la actividad de fitasa es definida como unidades de fitasa (U o FTU), donde una FTU es definida por la cantidad de enzima que libera un μmol de fósforo inorgánico por minuto de 0.0015mol/L de fitato de sodio a pH 5.5 y $37\text{ }^\circ\text{C}$ (Simons *et al.*, 1990). Esta definición proporcionada es útil para determinar cuantificar la actividad de fitasas y representar la muestra en el mercado.

En la Tabla V se presenta un resumen de las diferentes propiedades de las fitasas que se encuentran en el mercado. Debido a las diferencias con respecto a las condiciones de cultivo y a las ligeras diferencias respecto a las condiciones de los ensayos de fitasa, es comprensible que la su comparación sea difícil.

De acuerdo a la información reportada por el mercado (Hou, 2001), las fitasas de Europa y Norte América son mas competitivas que las fitasas producidas por compañías asiáticas alcanzando una actividad de 40,000-4, 000,000 U/g en formulaciones en polvo, mientras que la actividad presente en formulaciones liquidas están por enzima de 40, 000,000 U/mL, el precio de estas fitasa varia de \$ 12.5 a 15 dólares por kilogramo. Compañías de Asia que recientemente se han desarrollado provenientes de China, Japón y el sur de Korea obtiene formulaciones con una actividad de fitasa alrededor de 500 a 50,000 U/mg y de 5,000 a 50,000 U/mL. Los precios de estas fitasas fluctua alrededor de \$ 3 a 10 dólares por Kilogramo.

Tabla V. Información de la producción de fitasas microbianas comerciales

Compañía	País	Fuente	Cepa producida	Marca comercial
AB Enzymes	Alemania	<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	Finase
Alko Biotechnology	Finlandia	<i>A. oryzae</i>	<i>A oryzae</i>	SP, TP, SF
Alltech	USA	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	Allzyme
BASF	Alemania	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	Natuphos
BioZyme	USA	<i>A oryzae</i>	<i>A oryzae</i>	AMAFERM
DSM	USA	<i>P lycii</i>	<i>A oryzae</i>	Bio-Feed
Fermic	México	<i>A. oryzae</i>	<i>A oryzae</i>	Phyzyme
Finnfeeds International	Finlandia	<i>Aspergillus awamori</i>	<i>T. reesei</i>	Avizyme
Genencor International	USA	<i>P. simplicissimum</i>	<i>Penicillium funiculosum</i>	ROVABIO
Roal	Finlandia	<i>Aspergillus awamori</i>	<i>T. reesei</i>	Finase
Novozymes	Dinamarca	<i>A. oryzae</i>	<i>A oryzae</i>	Ronozyme Roxazyme

Sacado de Ling *et al.*, 2007

A pesar de los avances logrados con el empleo de fitasa como aditivo alimenticio, ninguna fitasa disponible comercialmente satisface hasta el momento con todos los requerimientos ideales para cada aplicación específica. Por un lado, la termoestabilidad limitada de las fitasas ocasiona que estas enzimas se desnaturalicen

bajo las condiciones empleadas para la fabricación de preparaciones alimenticias peletizadas o extruidas. Además, una considerable cantidad de fitasa ingerida como aditivo alimenticio se degrada en el estómago y el intestino delgado de los animales, probablemente debido a la acción proteolítica de pepsina y tripsina endógena, dando a lugar a la necesidad del suministro de grandes cantidades de fitasas de alta eficiencia catalítica en las dietas animales. Por tal razón, diversas compañías y centros de investigación enfocan sus esfuerzos al desarrollo de fitasas mejoradas, termoestables, más resistentes a proteasas, etc., para la producción industrial de preparaciones alimenticias para el consumo de animales monogástricos de producción masiva.

5. MÉTODOS

5.1. Reactivos y material biológico

La cepa *Bacillus subtilis* VTT E-68013 se obtuvo de la colección de cultivos del Centro de Investigación Técnica de Finlandia (*Culture Collection of the Technical Research Centre of Finland*).

Se trabajó con cinco fitasas, tres de ellas del género *Bacillus*, y dos fitasas comerciales Natuphos y Allzyme SSF ambas del género *Aspergillus*. En la tabla VI se describe el origen de cada una de ellas.

Tabla VI. Descripción de las enzimas usadas en este proyecto Origen, clasificación y referencia bibliográfica.

Enzima	Origen	Clasificación	Referencia
Fitasa C Nativa (PhyC-N)	Fitasa C nativa de <i>Bacillus subtilis</i>	EC 3.1.3.8	Kerovuo J. (2000)
Fitasa C Recombinante (PhyC-R)	Fitasa C de <i>B. subtilis</i> expresada en <i>Pichia pastoris</i>	EC 3.1.3.8	Rodríguez L. (2006)
Fitasa C Modificada Recombinante (FTE)	Fitasa de <i>Bacillus</i> modificada expresada en <i>Pichia pastoris</i>	EC 3.1.3.8	Gallegos J. (2006)
Natuphos(BASF/DSM) Enzima Comercial	<i>Aspergillus niger</i>	EC 3.1.3.26	
Allzyme SSF(Alltech) Enzima comercial	<i>Aspergillus niger</i>	EC 3.1.3.26	

Para la preparación de medios para el cultivo de *Bacillus subtilis* se utilizó fosfato monobásico de potasio KH_2PO_4 (*Fermont* 35862), fosfato dibásico de potasio anhidro K_2HPO_4 (*Fermont* 35842), sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (*Sigma* A-4418), sulfato de magnesio (MgSO_4) (*Fermont* 63622), hidrolizado de caseína (*Sigma* C-0626), cloruro de calcio (*Sigma* C-3306), y salvado de trigo. Para los medios de *Pichia pastoris* se utilizó fosfato monobásico de potasio KH_2PO_4 (*Fermont* 35862), fosfato dibásico de potasio

anhidro K_2HPO_4 (*Fermont* 35842), base nitrogenada de levadura (YNB) (*Sigma* Y-0626), biotina (*Sigma* B-4501), glicerol (*Fermont* 06201), metanol (*Fermont* 06125).

Para la caracterización bioquímica de las cinco fitasas se utilizaron los siguientes reactivos: ácido fítico ó fitato de sodio (sal dodecasódica) (*Sigma* P-3168), trizma-base (*Sigma* T-6066), acetato de sodio (*Sigma* F-0670), ácido clorhídrico (*Productos Químicos Monterrey* 01245), hidróxido de sodio (*Fermont* 36901), ácido sulfúrico (*Productos Químicos Monterrey* 01615), molibdato de amonio (*Fermont* 40051), ácido ascórbico (*Fermont* 03121), ácido tricloroacético (*Fermont* 03701), liofilizado de hepatopáncreas de camarón (*Litopenaeus vannamei*), tripsina porcina (*Sigma* T-0134).

Para el análisis de proteínas se utilizó albúmina bovina (*Sigma* A-8022), azul brillante de coomassie G-250 (*Sigma* B-0770), alcohol etílico 96° G.L: (*Jalmek* A-3380-16), ácido fosfórico 85% (*Fermont* 01335). Para el análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se utilizó lo siguiente: acrilamida (*Sigma* A-8887), bis-acrilamida (*Research-Organics* 9540M), dodecil sulfato de sodio SDS (*Promega*-H-5114), glicina (*Sigma* G-7126), persulfato de amonio (*Gibco BRL* 11039D), N,N,N',N'-Tetrametilendiamina TEMED (*Sigma* T-9281) y agarosa (*Research-Organics* 1170A).

5.2. Equipo

Los equipos utilizados para el desarrollo de este trabajo se describen a continuación: una campana microbiológica (*Labconco Co. Inc.*), balanza granataría (*Mettler, Toledo*), balanza analítica (*Mettler, Toledo*), potenciómetro (*Beckman*), placa de agitación (*Termolyne*), agitadores magnéticos (*Thermoline*), gradillas (*Glaser*), baño de agua (*Precision, Termo EC*), cubetas desechables de poliestireno (*Sigma* C-5291), incubadora (*Yamato*), placa de calentamiento 17600 modelo DB17615 (*Thermoline*), termociclador (*PCR Sprint Hybaid*), cámara de electroforesis vertical y fuente de poder (*494 ISCO*), equipo de captura de imágenes (*EDAS 40 Kodak*), espectrofotómetro DU-650 (*Beckman Coulter*), espectrofotómetro modelo SmartSpect (*Bio-Rad TM3000*), microcentrífuga (*Beckman, Coulter TM22R*), centrífuga Allegra (*Beckman Coulter TM21R*), centrífuga Avanti (*Beckman Coulter J25I*), concentrador a vacío (*Labconco Corporation*), mini vortex (*VWRbrand 58816-121*), filtros para ultrafiltración *Centricom*

Plus 70 10 kDa (Millipore), incubadora con agitación (*Lab-Line Instruments Inc.*), bomba de vacío (*0322-V4B-G180X General Electric*), autoclave (*Aesa*), olla de presión 21 litros (*Presto*), congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*Torrey*) y 2 refrigeradores (*Torrey*)

Para el procesamiento de datos y esquemas gráficos se empleó una computadora Compaq presario MV540 (*Compaq*), el procesador de texto Microsoft Word XP (*Microsoft Corporation, 2002*), el procesador de gráficos Microsoft Power Point XP (*Microsoft Corporation, 2002*) y la hoja de cálculo Microsoft Excel XP (*Microsoft Corporation, 2002*). Para el análisis estadístico se empleó el programa SPSS 8.0 Windows.

5.3. Estrategia experimental

Para realizar la caracterización bioquímica de la Fitasa C nativa y recombinantes se obtuvieron preparaciones semipurificadas de éstas. Para el caso de la Fitasa C nativa, se realizaron cultivos de 24 h bajo condiciones de inducción del gen *PhyC* de la cepa VTT E-68013 de *Bacillus subtilis*, la proteína se recuperó por precipitación del sobrenadante con etanol frío, el precipitado secado al vacío se empleó para realizar los ensayos de la caracterización bioquímica. Las preparaciones semipurificadas las fitasas C recombinantes se obtuvieron a partir de cultivos de dos cepas recombinantes de *Pichia pastoris*, una portadora en su genoma del gen *phyC* que codifica para la Fitasa C nativa y la segunda portadora de una secuencia modificada del mismo *phyC*. Los cultivos se realizaron durante 48 h bajo condiciones de inducción del gen heterólogo y las preparaciones de las dos fitasas recombinantes se obtuvieron a partir de los sobrenadantes de los medios de cultivo, los cuales fueron desalados y concentrados por ultrafiltración.

La caracterización bioquímica de las tres preparaciones semipurificadas de las fitasas bacterianas, se realizó evaluando los siguientes parámetros: peso molecular aparente mediante un análisis de SDS-PAGE, actividad enzimática a diferentes pH y temperaturas, termoestabilidad, susceptibilidad a enzimas digestivas de camarón y de tripsina porcina. Estos mismos parámetros fueron determinados para las dos fitasas comerciales y se realizó una comparación de éstos con los de las fitasas bacterianas

sujetas a estudio. Para la comparación de estos parámetros se utilizó un análisis de ANOVA y de t-students.

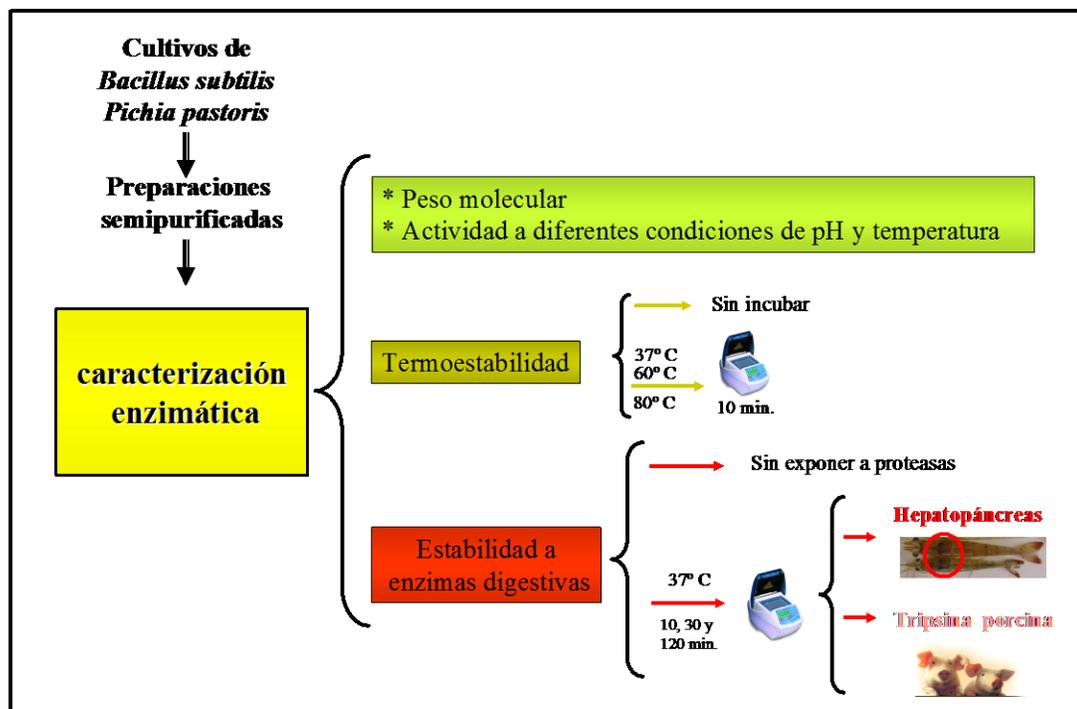


Figura 3. Representación esquemática de la estrategia general. Se muestran cada una de las etapas realizadas para la caracterización bioquímica de las cinco fitasas.

5.4. Actividad enzimática de fitasa

5.4.1. Determinación de la actividad de fitasa y definición de conceptos

La determinación de la actividad de fitasa se llevó a cabo mediante el método descrito por Kim y colaboradores, 1998 (Kim *et al.*, 1998a). Este método se basa en el incremento de fosfato inorgánico liberado a partir de ácido fítico o sus sales durante la reacción por unidad de tiempo. El fosfato inorgánico liberado reacciona con el molibdato de amonio formando un complejo iónico que al ser reducido absorbe la luz visible de 820 nm y puede ser determinado por espectrofotometría. Una unidad de fitasa en U/mL es considerada como los μ moles de fósforo liberado por minuto por mL de muestra, bajo las condiciones evaluadas, generalmente a 37°C durante 30 min (Kim *et al.*, 1998a).

El sustrato utilizado para la reacción enzimática fue el ácido fítico (sal dodecasódica del ácido hexafosfórico de inositol) de *Sigma Aldrich Corporation* (PM: 923.8). La actividad fítica fue medida en una mezcla de reacción conteniendo una alícuota de la preparación enzimática, 1.6 mM de fitato de sodio, 100 mM de Tris-HCl pH 7.5, 1 mM de CaCl₂ para el caso de las fitasas de *Bacillus* y para las fitasas de *Aspergillus* se utilizó un buffer de 360 mM de acetato de sodio pH 5.5, 1 mM de CaCl₂ e incubando a 37°C durante 30 min. La reacción fue detenida con un volumen igual de ácido tricloroacético al 15% y el fosfato inorgánico liberado se determinó midiendo la absorbancia a 820 nm de acuerdo a lo reportado por Kim.

Para cada uno de los ensayos se consideraron dos blancos: el blanco de sustrato (solo sustrato sin fitasa) y el blanco de muestra (sin el sustrato), la mezcla de reacción enzimática se muestra en la tabla VII. El blanco de sustrato se incluye para asegurar que el sustrato, fitato de sodio, no libera fosfato inorgánico sin la acción de una fitasa durante la reacción enzimática. En caso del blanco de muestra se incluye para considerar la concentración de fosfato ya presente en la muestra o liberado durante la reacción enzimática sin la acción de una fitasa y tomar en consideración al momento de realizar los cálculos de actividad enzimática.

La reacción enzimática se realizó por triplicado para cada ensayo de la siguiente manera: En una celda de poliestireno se agregaron 200 µL de sustrato (2 mM fitato de sodio en buffer 360 mM de acetato sodio pH 5.5, 1 mM CaCl₂ ó 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM CaCl₂) y 50 µL de la muestra diluida previamente con buffer de reacción para actividad de fitasa (buffer 360 mM de acetato sodio pH 5.5, 1 mM CaCl₂ ó 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM CaCl₂, según su caso), la mezcla de reacción junto con sus blancos correspondientes (Tabla 2) se incubaron a 37°C por 30 min en un baño de agua *Precision, Termo EC*.

El blanco de sustrato fue preparado con 2 mM fitato de sodio en 360 mM de acetato sodio pH 5.5, 1 mM CaCl₂ ó 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM CaCl₂) y buffer de reacción (360 mM de acetato sodio pH 5.5, 1 mM CaCl₂ ó 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM CaCl₂) mientras que el blanco de muestra fue preparado con buffer de reacción (360 mM de acetato sodio pH 5.5, 1 mM CaCl₂ ó 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM CaCl₂) más la muestra, como se describió en la tabla VII. La reacción se detuvo por cambio de

pH añadiendo 250 μL de TCA al 15%. Posteriormente, se adicionaron 2 mL del reactivo A (6 N ácido sulfúrico, molibdato de amonio al 2.5%, ácido ascórbico al 10%) recién preparado para la determinación del fosfato.

Para cada ensayo de actividad enzimática se realizó una curva de calibración por triplicados con tres estándares de fosfato monobásico de potasio anhidro (PM: 136.09) de *Sigma Aldrich Corporation*, de diferentes concentraciones: Estándar A (159.4 mg/mL), estándar B (79.7 mg/mL) y estándar C (15.94 mg/mL). La mezcla de reacción de los estándares para la curva de calibración se realizó como se muestra en la tabla VIII.

Tabla VII. Mezcla de reacción para actividad de fitasa de los géneros *Aspergillus* y *Bacillus*.

Tipo de Muestra	*Sustrato Fitato de sodio (μL)	**Buffer de reacción pH 5.5 ó 7.5 (μL)	***Muestra (μL)
Problema	200	----	50
Blanco de muestra	----	200	50
Blanco de fitato	200	50	----

*Sustrato: Fitato de sodio 2 mM en buffer 360 mM de acetato de sodio pH 5.5, 1 mM CaCl_2 ó 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM CaCl_2 (concentración final del sustrato 1.6 mM).

**Buffer de reacción para actividad de fitasa: 360 mM de acetato sodio pH 5.5, 1 mM CaCl_2 ó 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM CaCl_2

***Muestra: Se diluyó con buffer de reacción para actividad de fitasa a pH 5.5 ó 7.5 según su caso, antes de la reacción enzimática

Tanto las muestras como los estándares de calibración se incubaron a 37°C en una incubadora Yamato, durante 30 min. Posteriormente se realizó la medición de absorbancia a 820 nm en un espectrofotómetro *Beckman Coulter*, calibrando a cero con celda de poliestireno.

Tabla VIII. Curva de calibración para la determinación de fósforo (fosfato). Además del estándar fósforo, se añadieron 250 μL de TCA al 15% y 2 mL de reactivo.

Estándar Fósforo	Volumen Fósforo (μL)	Agua MilliQ (μL)	Estándar Fósforo ($\mu\text{g P total}$)
-	0	250	0
C	125	125	2
B	50	200	4
B	100	150	8
A	100	150	16

Los μg de fósforo (P) en las muestras se calcularon mediante una interpolación matemática del valor de absorbancia de la muestra en la curva de absorbancia vs μg de fósforo, utilizando el método de mínimos cuadrados, y tomando en cuenta el factor de dilución de la muestra.

Las unidades de fitasa en U/mL se calcularon con la siguiente ecuación:

$$U / mL = \left(\frac{P_L * 20 * FD}{31 * t} \right)$$

Donde los P_L son los μg de fósforo liberado del fitato por la acción de la fitasa de la muestra y se obtuvieron de la siguiente ecuación:

$$P_L = P_M - (P_{BS} + P_{BM})$$

Los P_M son los μg de fósforo liberados de la muestra, P_{BS} son los μg de fósforo liberados del blanco de sustrato, P_{BM} son los μg de fósforo liberados del blanco de muestra; 20 es un factor de conversión calculado como el inverso del volumen de muestra usado en la reacción enzimática expresado en mL (0.05 mL), FD es el factor de dilución inicial (antes de la reacción enzimática) o final (después de la reacción enzimática) de la muestra o el producto de ambos, t equivale al tiempo de incubación de la reacción enzimática (30 min) a 37°C, y 31 es el peso atómico del fósforo. En los diferentes ensayos el FD fue variable antes de hacer la reacción enzimática o después de ella dependiendo de la muestra y del ensayo. Los cálculos se realizaron con la ayuda del programa Microsoft Excel para Windows XP.

La actividad específica de la fitasa (U/mg proteína) se calculó empleando la ecuación que se muestra a continuación:

$$U / mg_{proteína} = \left(\frac{U / mL}{\mu g_{proteína} / mL} \right) * 1000$$

Donde $\mu g_{proteína} / mL$ corresponde a la concentración de proteínas extracelulares totales determinadas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) y el 1000 corresponde al factor de conversión de mg a μg .

Para el cálculo de los FTU de la fitasa (U/g peso seco) se empleó la ecuación que se muestra a continuación:

$$FTE = \frac{U / mL}{g_{peso\ seco} / mL}$$

Donde $g_{peso\ seco} / mL$ corresponde a los gramos de peso seco de las preparaciones enzimáticas por volumen de suspensión.

5.4.2. Determinación de la actividad residual (AR)

La actividad residual se definió como la actividad enzimática que queda después de someter a la preparación de la fitasa a cualquier tratamiento, tomando en cuenta con un valor del 100% la actividad inicial sin ningún tratamiento. Esta actividad se utilizó para evaluar la termoestabilidad y la susceptibilidad a enzimas digestivas de camarón y de tripsina porcina para las cinco fitasas en estudio. La actividad residual (AR) se calculó con la siguiente ecuación:

$$AR = \left(\frac{U / mL_f}{U / mL_i} \right) * 100$$

Donde los U / mL_f corresponden a los U/mL después de someter la fitasa a algún tratamiento determinado y las U / mL_i corresponden a los U/mL de la misma preparación enzimática sin someterla a algún tratamiento determinado. AR se expresa en porcentaje (%).

5.4.3. Determinación de proteínas totales

La concentración de proteínas totales se determinó a las diferentes muestras de las cinco fitas por el método de Bradford (Bradford, 1976), para lo cual se midió la absorbancia a 595 nm que se presenta por la unión del azul brillante de Coomassie a las proteínas, en un espectrofotómetro (Beckman Coulter). Se realizaron curvas de calibración con estándares de albúmina de suero bovino (ASB), en un intervalo de concentración de 5 a 45 $\mu\text{g/mL}$ (tabla IX). Tanto las muestras como los estándares se prepararon por triplicado.

Tabla IX. Curva de calibración para la determinación de proteínas totales mediante el método Bradford. Además de la ASB y el agua MilliQ, se añadieron 800 μL de solución de azul brillante de Coomassie.

Agua MilliQ (μL)	ASB 50 $\mu\text{g/mL}$ (μL)	Estandar ($\mu\text{g/mL}$)
200	0	0.0 (Blanco)
180	20	5.0
170	30	7.5
140	60	15.0
110	90	22.5
80	120	30.0
20	180	45.0

Las muestras se prepararon tomando 200 μL del sobrenadante directo o de una dilución cuando las muestras quedaban fuera de la curva de calibración, y se agregaron 800 μL de solución de azul brillante de Coomassie G-250. Posteriormente fueron obtenidas las lecturas de absorbancia a 595 nm tanto de los estándares como de las muestras. Con las lecturas de los estándares se construyó una curva de calibración la que fue estimada por el método de mínimos cuadrados. En base a la curva construida, se determinó la concentración de las muestras empleando la ecuación de la recta. Los cálculos se realizaron con la ayuda del programa Microsoft Excel para Windows XP.

5.4.4. Análisis de proteínas por SDS-PAGE

El análisis de proteínas por SDS-PAGE se realizó en las preparaciones semipurificadas de las cinco fitasas, la muestra se diluyó con buffer de muestra para SDS-PAGE, en una relación 1:1, y se calentó a 95 °C por 3 min.

Para la separación de proteínas por SDS-PAGE se empleó un gel de poliacrilamida al 12% y se aplicaron de 10 a 20 µL de las muestras previamente desnaturalizadas. Después de su aplicación en el gel, el corrimiento se llevó a cabo en una cámara de electroforesis vertical Thermo EC, se sometió a una corriente inicial de 10 mA (por aproximadamente 30 min), cuando el colorante penetró en el gel separador se incrementó la corriente a 15 mA, así se mantuvo la electroforesis hasta que el colorante salió del gel (por aproximadamente 80 min).

Al finalizar el corrimiento de las muestras, se desensamblaron los vidrios que contenían el gel y éste se colocó en un contenedor con solución fijadora (metanol 50%, ácido acético 10% en agua destilada v/v), se sometió a agitación a 50 rpm durante 2 h en una placa de agitación Termolyne. Después el gel se retiró de la solución fijadora, se añadió la solución colorante de Coomassie (azul brillante de Coomassie R-250, 0.05%, metanol 50%, ácido acético 10% en agua destilada v/v), se agitó a 50 rpm durante 4 h, se retiró la solución colorante, se añadió solución decolorante (metanol 5%, ácido acético 7% en agua destilada v/v), se mantuvo en ésta bajo agitación constante a 50 rpm durante 1 a 2 h. La decoloración se continuó con cambios periódicos de la solución decolorante hasta que se observaron bandas azules de proteínas en un fondo claro del gel (Ausubel, 1992). Las bandas de proteínas resueltas en el gel fueron analizadas a través del sistema de imagen Kodak EDAS-290.

5.5. Cultivos bajo condiciones de inducción de tres genes codificantes para fitasas del género *Bacillus*

5.5.1. Cultivos de *Bacillus subtilis* bajo condiciones de inducción

Para la inducción del gen *phyC* de *Bacillus subtilis* (PhyC-N) se realizaron cultivos a nivel matraz como se muestra en la figura 4 y se describen a continuación:

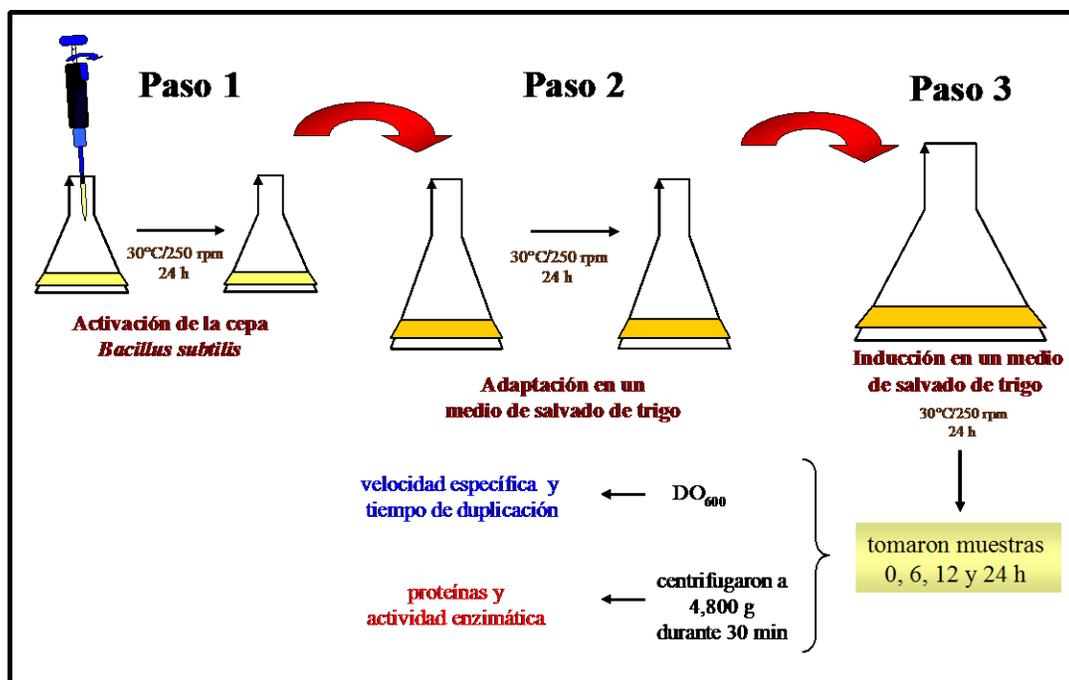


Figura 4. Representación general de los cultivos llevados a cabo para la inducción de PhyC de *Bacillus subtilis*. El proceso de inducción se realizó en tres pasos: el primer paso fue la activación, el segundo paso fue la generación del inóculo adaptado y el tercer paso fue la inducción. Las muestras se tomaron a los tiempos establecidos para determinar DO, proteínas y actividad enzimática.

El cultivo se realizó en tres pasos: el primer paso consistió en la activación de la cepa, para lo cual la cepa *Bacillus subtilis* se reactivó y creció en caldo nutritivo a partir de cultivos conservados en caldo nutritivo-glicerol al 50%.

Se tomaron 150 μL de la cepa conservada en glicerol y se inoculó en 15 mL de caldo nutritivo (Difco) conteniendo 600 μL de CaCl_2 al 5% (para obtener una concentración final 0.2% de CaCl_2), éstos se incubaron a 30°C con agitación constante a 250 rpm durante 24 h.

El segundo paso consistió en la obtención del inóculo, para lo cual los cultivos del paso 1 se utilizaron para inocular matraces conteniendo 129 mL del medio de inducción salvado de trigo (Anexo A), éstos se incubaron a 30°C con agitación constante a 250 rpm durante 24 h.

El tercer paso consistió en la inducción de PhyC de *Bacillus subtilis*, para lo cual los cultivos del paso 2 se utilizaron para inocular matraces conteniendo 1290 mL del

medio de inducción salvado de trigo (Anexo A), éstos se incubaron a 30°C con agitación constante a 250 rpm durante 24 h.

Para calcular la velocidad específica (μ) y el tiempo de duplicación del medio de la cepa de *Bacillus subtilis* en las condiciones de cultivo empleadas, se tomaron alícuotas a los tiempos 0, 6, 12 y 24 h y se determinó la DO de las muestras en cubetas desechables de poliestireno. Para la determinación de proteínas totales y actividad enzimática para fitasa se utilizó el medio de cultivo libre de células obtenido a los tiempos antes mencionados.

Las células se separaron del medio de cultivo mediante centrifugación a 4,800 g a 4°C, durante 30 min. Los sobrenadantes se guardaron a -20°C para su análisis posterior.

5.5.2. Cultivos de *Pichia pastoris* bajo condiciones de inducción

Para la inducción de las cepas recombinantes de *Pichia pastoris* conteniendo PhyC-R y FTE se realizaron cultivos a nivel matraz bajo las condiciones experimentales que se muestran en la figura 5.

El cultivo se realizó en tres pasos: el primer paso consistió en la activación de la cepa y la obtención del inóculo, para lo cual las cepas de *Pichia pastoris* se reactivaron y se crecieron en YPD (Peptona 2%, extracto de levadura 1%, dextrosa 2%) a partir de cultivos conservados en YPD-glicerol al 15%.

Se tomaron 250 μ L de las cepas conservadas en YPD glicerol y se inocularon en 25 mL de YPD, éstos se incubaron a 30°C con agitación constante a 250 rpm hasta alcanzar una DO de 8 a 10, en aproximadamente 16 a 20 h.

El segundo paso consistió en la obtención de biomasa, en este paso se utilizó el medio BMG en el cual el glicerol se usó como única fuente de carbono y la expresión el gen heterólogo se mantuvo reprimida.

Para lo cual se utilizaron los cultivos del paso 1 para inocular matraces conteniendo 600 mL de medio BMG (fosfato de potasio 100 mM, pH 6.0; base nitrogenada para levaduras [YNB] 1.34%, biotina 4×10^{-5} %, glicerol 1%), se ajustó el volumen del inóculo para obtener una DO inicial de 0.2-0.3, estos se incubaron a 30°C a

250 rpm hasta alcanzar una DO de 9-10. Posteriormente, las células se cosecharon por centrifugación a 4800 g por 10 min a temperatura ambiente.

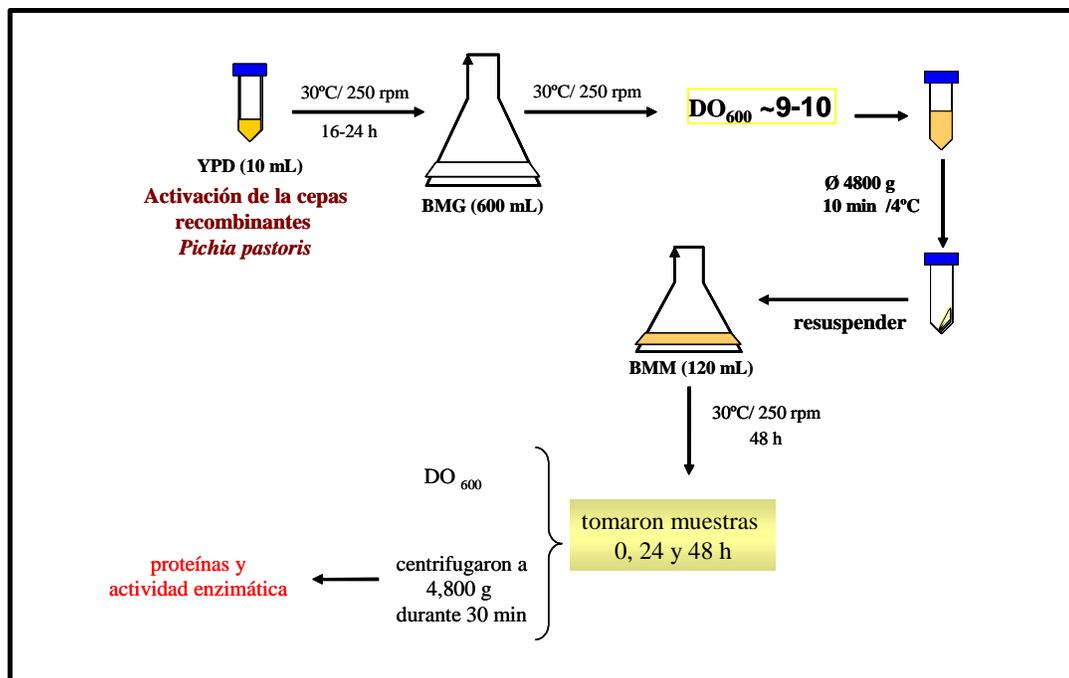


Figura 5. Representación general de los cultivos llevados a cabo para la inducción PhyC-R y FTE expresadas en *Pichia pastoris*. El proceso de inducción se llevó a cabo en tres pasos: activación y obtención del inoculo en YPD, obtención de biomasa en BMG y inducción de la expresión del gen heterólogo en BMM. Las muestras se tomaron a los tiempos establecidos para cada determinación realizada.

El tercer paso consistió en la inducción del gen heterólogo, el paquete celular obtenido en el paso 2 se resuspendió en 120 mL de BMM- $CaCl_2$ (fosfato de potasio 100 mM, pH 6.0; YNB 1.34%, biotina $4 \times 10^{-5}\%$, $CaCl_2$ 0.1%, metanol 0.75%), donde se alcanzó una DO de 50-52. La inducción del gen heterólogo se inició al agregar el metanol absoluto como única fuente de carbono, a una concentración final de 0.75% (900 μ L/ 120 mL de cultivo). El cultivo se incubó a 30°C a 250 rpm durante 48 h, cada 24 h se midió la DO y se agregó metanol ajustando la concentración al 0.75%. Cada 24 h se tomaron alícuotas para determinar proteínas totales extracelulares y actividad enzimática para fitasa en el medio de cultivo libre de células. Las células se separaron del medio de cultivo mediante centrifugación a 4800 g a 4°C, durante 30 min, los sobrenadantes se guardaron a -20°C, para su análisis posterior.

5.5.3. Análisis de los cultivos de las tres fitasas del género *Bacillus*

5.5.3.1. Determinación de parámetros de crecimiento del cultivo de *Bacillus subtilis*

Para calcular la velocidad específica de crecimiento (μ) se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento evaluadas por DO, para lo cual se tomaron muestras del cultivo a las 0, 6, 12 y 24 h y se realizaron lecturas de DO de las muestras diluidas 1:10 (para todos los tiempos). La dilución se realizó de la siguiente manera: se tomaron alícuotas de 300 μ L del cultivo y se llevaron a 3 mL con agua destilada en una cubeta desechable de poliestireno. La absorbancia de estas diluciones fue determinada en un espectrofotómetro SmartSpect™ 300 de Bio-Rad, calibrando a cero de absorbancia con agua destilada a 600 nm. La DO de los cultivos se obtuvo multiplicando la absorbancia a 600 nm por el factor de dilución.

Para obtener las velocidades específicas de crecimiento (μ) se construyeron gráficas semilogarítmicas de DO (se determinó el logaritmo natural de cada DO corregida por el factor de dilución) vs tiempo, se calculó la pendiente en la fase lineal inicial de dichas curvas de crecimiento mediante el método de mínimos cuadrados.

La pendiente resultante es igual a la velocidad específica de crecimiento (μ) en h^{-1} . Para calcular los tiempos de duplicación (t_d) se aplicó la siguiente ecuación:

$$t_d = \frac{\text{Ln}(2)}{\mu}$$

El procesamiento de datos para el cálculo de logaritmos naturales, velocidades específicas de crecimiento y tiempos de duplicación, así como la construcción de las gráficas de las cinéticas de crecimiento se realizaron mediante la ayuda del programa Microsoft Excel para OfficeXP.

5.5.3.2. Comportamiento de los cultivos de *Pichia pastoris*

Para la evaluación del desarrollo del cultivo de *Pichia pastoris* bajo condiciones de inducción, se tomaron muestras del cultivo a las 0 (T0), 12 (T1) y 24 (T3) h y se realizaron lecturas de DO de las muestras diluidas (T0 1:1, T2 1:100 y T3 1:100). La dilución se realizó de la siguiente manera: se tomaron alícuotas de 30 a 300 μ L del cultivo y se llevaron a 3 mL con agua destilada en una cubeta desechable de

poliestireno. La absorbancia de estas diluciones fue determinada en un espectrofotómetro SmartSpect™ 300 de Bio-Rad, calibrando a cero de absorbancia con agua destilada a 600 nm. La DO de los cultivos se corrigiendo multiplicando por el factor de dilución.

5.5.3.3. Determinación de la concentración de proteínas

En la determinación de proteínas totales, se utilizaron muestras de los cultivos inducidos de *Bacillus subtilis* de 24 h bajo las condiciones de cultivo realizadas de acuerdo al procedimiento de la figura 4 (sección 5.5.1) y de los cultivos de *Pichia pastoris* de 48 h bajo las condiciones de cultivo realizadas de acuerdo al procedimiento de la figura 5 (sección 5.5.2).

La concentración de proteínas totales se determinó en los sobrenadantes libres de células de los cultivos *Bacillus subtilis* a los tiempo 0 (T0), 6 (T2), 12(T3) y 24 (T4) h, las muestras se diluyeron (T0 1:40, T2 1:10, T3 1:10 y T4 1:10) para que quedaran dentro de la curva de calibración presentada en la tabla IX (sección 5.4.3). En los sobrenadantes libres de células de los cultivos de *Pichia pastoris*, la concentración de proteínas se determinó a los tiempo 0 (T0), 12 (T1) y 24 (T3) h, diluyendo las muestras (T0 1:1, T2 1:2 y T3 1:4) para que quedaran dentro de la curva de calibración presentada en la tabla IX (sección 5.4.3)

La reacción se llevó a cabo con 200 µL del sobrenadante directo o diluido y 800 µL de la solución de azul brillante de Coomassie G-250 y se determinó la absorbancia a 595 nm como lo descrito en la sección 5.4.3. Con las lecturas de los estándares se construyó una curva de calibración que fue estimada por el método de mínimos cuadrados. En base a la curva construida, se determinó la concentración de proteínas de las muestras empleando la ecuación de la recta. Los cálculos se realizaron con la ayuda del programa Microsoft Excel para Windows XP.

5.5.3.4. Determinación de la actividad enzimática de fitasa

La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo mediante el método descrito por Kim y colaboradores, 1998 (Kim *et al.*, 1998a). El sustrato utilizado fue el

ácido fítico (sal dodecasódica del ácido hexafosfórico de inositol, PM: 923.8.) de *Sigma Aldrich Corporation* y considerando para cada ensayo dos blancos: blanco de sustrato y el blanco de muestra como se explica en la tabla VII (sección 5.4.1).

Para la determinación de actividad enzimática, se utilizaron muestras de los cultivos inducidos de *Bacillus subtilis* de 24 h y de los cultivos de *Pichia pastoris* de 48 h bajo las condiciones de cultivo realizadas de acuerdo al procedimiento de las figuras 4 y 5 (sección 5.5.2 y 5.5.2).

Las muestras para el análisis enzimático de los cultivo de *B. subtilis* fueron colectadas a los tiempos 0, 12 y 24 h de inducción. El medio de cultivo libre de células (muestra) fue ajustada a 1 mM de CaCl_2 , posteriormente se diluyó 1:10 con 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM CaCl_2 . Para las muestras de los cultivos de *Pichia pastoris* colectadas a las 24 y 48 h inducción, el medio de cultivo libre de células (muestra) se ajustó a 1 mM de CaCl_2 , y se diluyó 1:5 con 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM CaCl_2 . Para el caso de *Pichia pastoris* se realizó una segunda dilución 1:4 después de la reacción enzimática para que las lecturas de absorbancia quedaran dentro de la curva de calibración de fosfatos descrita en la tabla VIII (sección 5.4.1).

Cada reacción enzimática se realizó en una celda de poliestireno, se agregaron 200 μL de sustrato (2 mM fitato de sodio en 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM CaCl_2) y 50 μL de la muestra diluida previamente. La mezcla de reacción junto con sus blancos correspondientes (Tabla VII) se incubaron a 37°C por 30 min en un baño de agua *Precision, Termo EC*. El blanco de sustrato fue preparado con sustrato (2 mM fitato de sodio en 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM CaCl_2) y buffer de reacción (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM CaCl_2), mientras que el blanco de muestra fue preparado con buffer de reacción (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM CaCl_2) más la muestra (sobrenadante libre de células), como se describió en la tabla VII. La reacción se detuvo precipitando la enzima con 250 μL de TCA al 15%, y se diluyó 1:8 (62.5 μL de mezcla de reacción-TCA (1:5) + 435 μL de agua MilliQ). Posteriormente se adicionó el reactivo A (ácido sulfúrico 6 N, molibdato de amonio 2.5%, ácido ascórbico 10%) recién preparado para la determinación del fosfato.

Para la determinación de fosfato se realizó una curva de calibración de acuerdo a la tabla VIII, tanto las muestras como los estándares de calibración se incubaron a 37°C

en una incubadora Yamato, durante 30 min. Posteriormente se realizó la medición de absorbancia a 820 nm en un espectrofotómetro *Beckman Coulter*, calibrando a cero con una celda de poliestireno. Los cálculos se realizaron de acuerdo a la fórmula previamente descrita en la sección 5.4.1.

5.6. Obtención de preparaciones semipurificadas de la Fitasa C de *Bacillus subtilis*

La preparación semipurificada de la Fitasa C de *Bacillus subtilis* (PhyC-N) se realizó a partir de las fermentaciones de 3 L a nivel matraz (sección 5.5.1) como se muestra en la figura 6 y se describe a continuación:

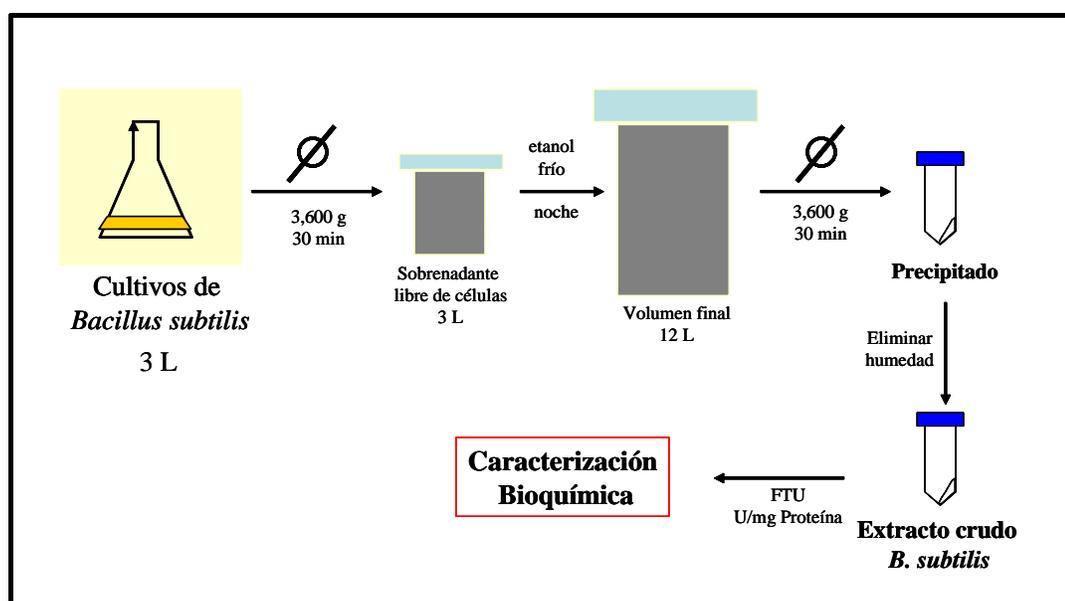


Figura 6. Representación general de la preparación semipurificada de la Fitasa C de *Bacillus subtilis* (PhyC-N). La preparación se realizó precipitando el sobrenadante del cultivo con etanol frío, posteriormente se lavó con acetona y se secó al vacío

La obtención de la preparación de la Fitasa C de *Bacillus subtilis* se realizó en dos pasos:

El primer paso consistió en centrifugar los 3000 mL del sobrenadante del cultivo de *Bacillus subtilis* a 3,600 g (5000 rpm, centrífuga Allegra™ 21R, rotor JA-14 Beckman) a 4°C durante 30 min, eliminando restos celulares.

El segundo paso consistió en precipitar los 2900 mL obtenidos del sobrenadante libre de células con 9000 mL de etanol desnaturalizado frío, éste se agregó poco a poco

y con ayuda de una barra metálica se homogenizó perfectamente, hasta terminar de agregar el solvente. Posteriormente se dejó precipitar toda la noche a 4°C, después los 12 L del sobrenadante precipitado se centrifugó a 3600 g (centrífuga Allegra™ 21R, rotor JA-14 Beckman), a 4°C durante 30 min, en frascos de 250 mL (Beckman). Finalmente el precipitado se obtuvo en un tubo cónico de 50 mL. Para poder eliminar fácilmente la humedad, el precipitado se lavó con 20 mL de etanol frío desnaturalizado resuspendiéndolo perfectamente, posteriormente se centrifugó a 1880 g durante 30 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Este proceso se repitió dos veces con etanol frío y dos con acetona, la humedad se eliminó totalmente al vacío, de la siguiente manera: el precipitado se fue colocado en un tubo cónico de 50 mL previamente pesado y sellado con un gasa doble, éste se introdujo en un matraz de quitasatos de 2 L en posición vertical, sellando perfectamente el matraz con un tapón, posteriormente se puso bajo condiciones de vacío durante aproximadamente 7 h hasta secarse completamente. Se obtuvieron 5 g de producto seco (preparación semipurificada de la Fitasa C de *B. subtilis*), el polvo de apariencia fina y de color crema claro se almacenó a -20°C, para su uso posterior.

Para la evaluación de la preparación semipurificada de la Fitasa C de *B. subtilis* se prepararon muestras a 40 y 80 mg polvo de fitasa /mL de buffer 100 mM de Tris-HCl pH 7.5, 1 mM de CaCl₂ y 100 ppm Tween 20 (20 µg/µL). Para las muestras de 40 mg/mL se pesaron 200 mg del polvo de la preparación de fitasa y se resuspendieron en 5 mL del buffer antes mencionado, en un tubo cónico de 50 mL. La mezcla se agitó durante 30 min a 4°C, posteriormente se centrifugó a 6900 g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante café claro se separó y se realizaron alícuotas de 500 µL, las cuales se mantuvieron a -20°C, hasta su posterior uso. Para las preparaciones a 80 mg/mL se pesaron 400 mg de polvo de fitasa y se realizó el mismo procedimiento anterior.

5.7. Obtención de preparaciones semipurificadas de la Fitasa C recombinante y de la Fitasa C modificada recombinante producidas en *Pichia pastoris*

Las preparaciones semipurificadas de la Fitasa C recombinante (PhyC-R) y de la Fitasa C modificada recombinante (FTE) producidas en *Pichia pastoris* se realizaron a

partir de las fermentaciones de 120 mL a nivel matraz (sección 5.5.2) como se muestra en la figura 7.

La obtención de la preparación semipurificada de la Fitasa C recombinante (PhyC-R) y de la Fitasa C modificada recombinante (FTE) se realizó en dos pasos:

El primer paso consistió en concentrar y diafiltrar los 120 mL de cada uno de los sobrenadantes de los cultivos con *Pichia pastoris* (PhyC-R y FTE) en una unidad de ultrafiltración con una membrana de celulosa con un tamaño de poro de 10 kDa (Centricon Plus-70 Millipore), por centrifugación en pasos sucesivos de 60 mL a 4000 g a 4°C durante 30 min (Centrifuga Allegra 6 Beckman Coulter, Rotor GH-38 180°).

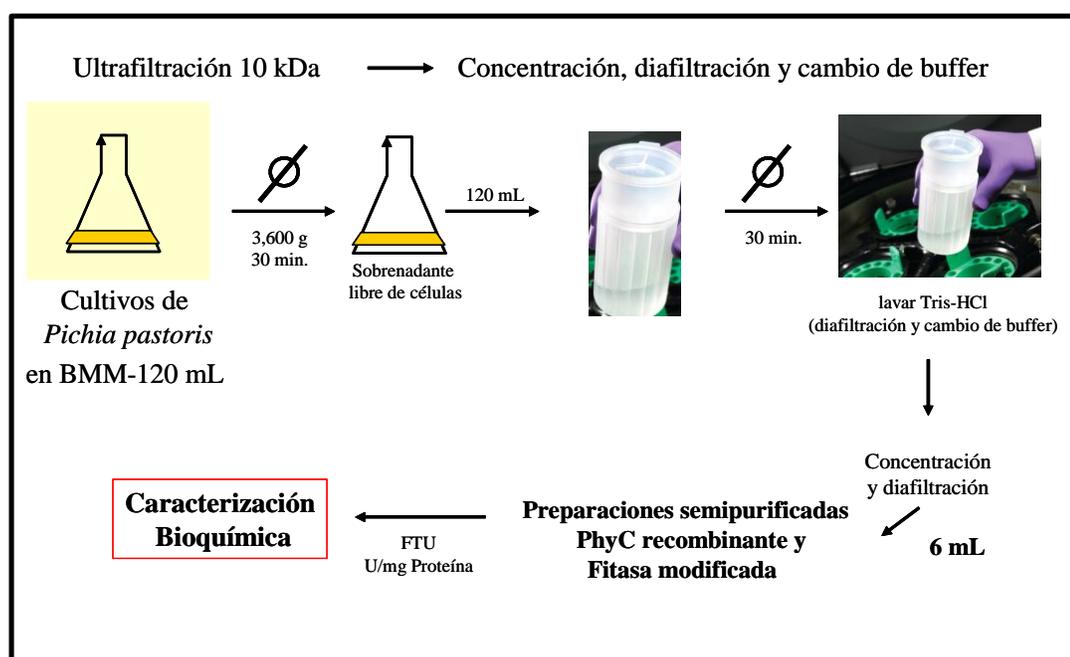


Figura 7. Representación general de la preparación semipurificada de la Fitasa C recombinante (PhyC-R) y de la Fitasa C modificada recombinante (FTE) producidas en *Pichia pastoris*. Las preparaciones se obtuvieron realizando una ultrafiltración de 10 kDa, concentrando, diafiltrando y cambiando el buffer de los sobrenadantes libres de células de los cultivos de *Pichia pastoris* en una unidad de filtración (Centricon Plus-70 Millipore, membrana de celulosa con un tamaño de poro de 10 kDa).

Con este proceso se eliminaron restos celulares, sales y fosfatos, para recuperar los sobrenadantes concentrados y diafiltrados, se invirtió la unidad de filtración y se centrifugó a 2000 g durante 2 min, recuperando aproximadamente 500 μ L. El segundo paso consistió en cambiar el buffer y lavar los 500 μ L obtenidos en el paso anterior, en otra unidad de filtración de las características antes mencionadas, se realizó una serie de

tres lavados con 60 mL de buffer 100 mM de Tris-HCl pH 7.5, 5 mM de CaCl₂, y centrifugando a 4000 g a 4°C durante 30 min (Centrifuga Allegra 6 Beckman Coulter, Rotor GH-38 180°). Posteriormente la muestra se recuperó invirtiendo la unidad de filtración (Centricon Plus-70 Millipore) y centrifugando a 2000 g durante 2 min, recuperando aproximadamente 500 µL, los cuales se llevaron a 6 mL con el mismo buffer antes mencionado. Los 6 mL de las preparaciones obtenidas (concentrados 20 veces) se dividieron en alícuotas de 500 µL y se almacenaron a -20°C para su uso posterior.

5.8. Obtención de preparaciones de dos fitasas comerciales: Natuphos y Allzyme SSF

Para la obtención de las preparaciones de las fitasas comerciales Natuphos y Allzyme SSF se prepararon suspensiones de éstas en un buffer de acetatos (360 mM de acetato de sodio pH 5.5, 1 mM de CaCl₂ y 100 ppm Tween 20 (20 µg/µL)) a una concentración de 10 mg/mL. Para lo cual, se pesaron 200 mg del polvo de cada fitasa y se resuspendieron en 20 mL del buffer antes mencionado en un tubo cónico de 50 mL. La mezcla se agitó durante 30 min a 4°C y posteriormente se centrifugó a 6900 g durante 30 min a 4°C. Con el sobrenadante obtenido se prepararon alícuotas de 500 µL, las cuales se mantuvieron a -20°C, hasta su posterior uso.

Para la evaluación de las preparaciones de Natuphos y Allzyme SSF se realizaron diluciones de las alícuotas de los sobrenadantes descongelados. Para el caso de la fitasa Natuphos se realizaron dos diluciones una a 1:50 (donde se tomaron 20 µL de la alícuota descongelada y se mezcló perfectamente con 980 µL del buffer antes mencionado en un tubo cónico de 2 mL) para obtener una concentración de 0.2 mg/mL y la otra 1:25, para lo cual se tomaron 40 µL de la alícuota descongelada y se mezcló perfectamente con 960 µL del buffer antes mencionado para obtener una concentración de 0.4 mg/mL. Para la fitasa de Allzyme SSF también se realizaron dos diluciones una a 1:20, para lo cual se tomaron 50 µL de la alícuota descongelada y se mezcló perfectamente con 950 µL del buffer antes mencionado en un tubo cónico de 2 mL y otra 1:10 donde se tomaron 100 µL de la alícuota descongelada y se mezcló perfectamente con 900 µL del buffer antes mencionado en un tubo cónico de 2 mL.

5.9. Caracterización bioquímica de las fitasas

5.9.1. Peso molecular: Análisis de SDS-PAGE

El peso molecular se determinó a partir de las tres preparaciones semipurificadas de las fitasas del género *Bacillus* (PhyC-N, PhyC-R y FTE) y de las dos preparaciones de las fitasas del género *Aspergillus* (Natuphos y Allzyme SSF), mediante un análisis SDS-PAGE con un gel de poliacrilamida al 12%.

La Fitasa C nativa (PhyC-N) se preparó de la siguiente manera: se tomaron 200 μL de la suspensión a 40 mg/mL y se precipitaron con 600 μL de etanol frío durante toda la noche, se centrifugó a 5000 rpm a 4°C durante 30 min, después se eliminó el sobrenadante y el paquete formado se resuspendió en 10 μL de agua MilliQ y 10 μL de buffer de muestra para SDS-PAGE, después se calentó 95-100°C durante 5 min, para posteriormente aplicarse toda la muestra en uno de los carriles del gel.

Para el caso de las fitasas PhyC-R y FTE, las muestras se prepararon de la siguiente manera: se tomaron 150 μL del sobrenadante concentrado (PhyC-R ó FTE) y se precipitaron con 600 μL de metanol-acetona (1:1) durante toda la noche, se centrifugó a 5000 rpm a 4°C durante 30 min, después se eliminó el sobrenadante y el paquete formado se resuspendió en 25 μL de agua MilliQ, posteriormente se tomaron 10 μL de esta muestra y se mezclaron con 10 μL de buffer de muestra (SDS-PAGE) y se continuó con el procedimiento antes mencionado. Para el caso de las fitasas comerciales Natuphos y Allzyme SSF, las muestras se prepararon a partir de las suspensiones a una concentración de 10 mg/mL, se tomaron 25 μL de esta suspensión y se precipitó con 75 μL de etanol frío durante toda la noche, posteriormente se siguió el mismo procedimiento antes mencionado para la PhyC-N. Después de aplicar las muestras, el gel se procesó como lo descrito en la sección de análisis de proteínas SDS-PAGE (5.4.4).

5.9.2. Evaluación y comparación de la actividad enzimática a diferentes valores de pH

La evaluación de la actividad enzimática a diferentes pH se determinó a partir de las tres preparaciones semipurificadas de las fitasas del género *Bacillus* (PhyC-N, PhyC-R y FTE) y de las dos preparaciones de las fitasas del género *Aspergillus* (Natuphos y Allzyme SSF) a 37°C en presencia de 1 mM de CaCl₂ como se muestra en la figura 8.

El efecto del pH en la actividad enzimática, se determinó utilizando diferentes amortiguadores a 1 mM CaCl₂ durante la reacción enzimática. Para el pH 2.5 se usó 250 mM Glicina-HCl, 1 mM CaCl₂, para el pH 5.5 se usó 360 mM acetato sodio, 1 mM CaCl₂, y a pH 7.5 y 9 se usó 100 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂ ajustando los valores de pH a 7.5 y 9 con ácido clorhídrico concentrado. Cada ensayo a diferentes valores de pH se realizó por triplicado.

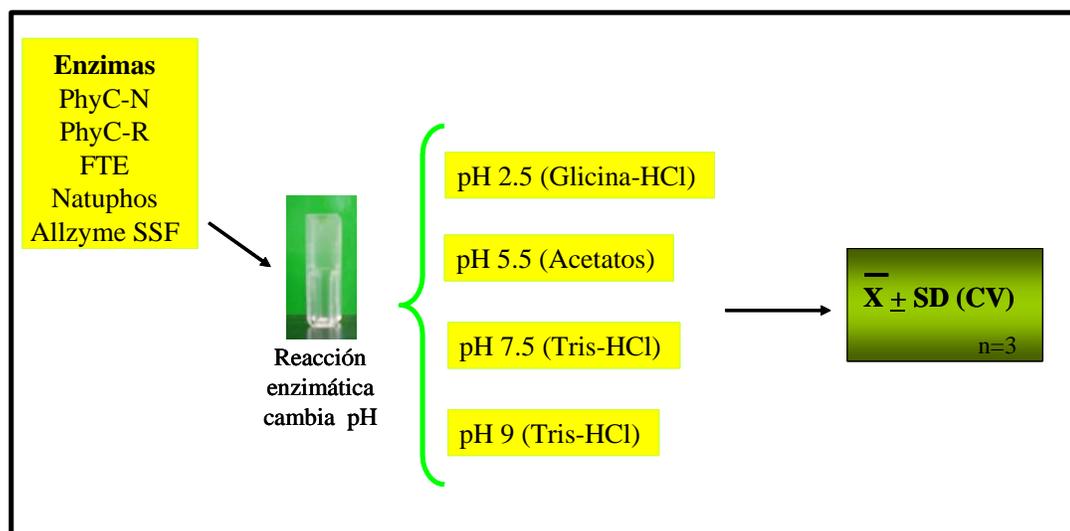


Figura 8. Representación del diseño experimental para la evaluación de la actividad enzimática a diferentes valores de pH. Para determinar el efecto del pH se realizaron ensayos con amortiguadores de diferentes valores de pH.

La reacción enzimática se realizó como se describe en la tabla VII de la sección 5.4.1 con sus blancos correspondientes (blanco de muestra y blanco de fitato).

La actividad enzimática se determinó como se indica en la sección de actividad enzimática (5.4.1) y el % de actividad respecto al valor de actividad enzimática más alto de cada fitasa se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad} = \left(\frac{U / mL_I}{U / mL_a} \right) * 100$$

Donde los U/mL_a corresponden a la actividad más alta de cada fitasa a un pH determinado y las U/mL_I corresponden a la actividad determinada a diferentes pH de cada fitasa.

5.9.3. Evaluación y comparación de la actividad enzimática a diferentes temperaturas

La evaluación de la actividad enzimática a diferentes temperaturas se determinó a partir de las tres preparaciones semipurificadas de las fitasas del género *Bacillus* (PhyC-N, PhyC-R y FTE) y de las dos preparaciones de las fitasas del género *Aspergillus* (Natuphos y Allzyme SSF) a 1 mM $CaCl_2$ como se muestra en la figura 9.

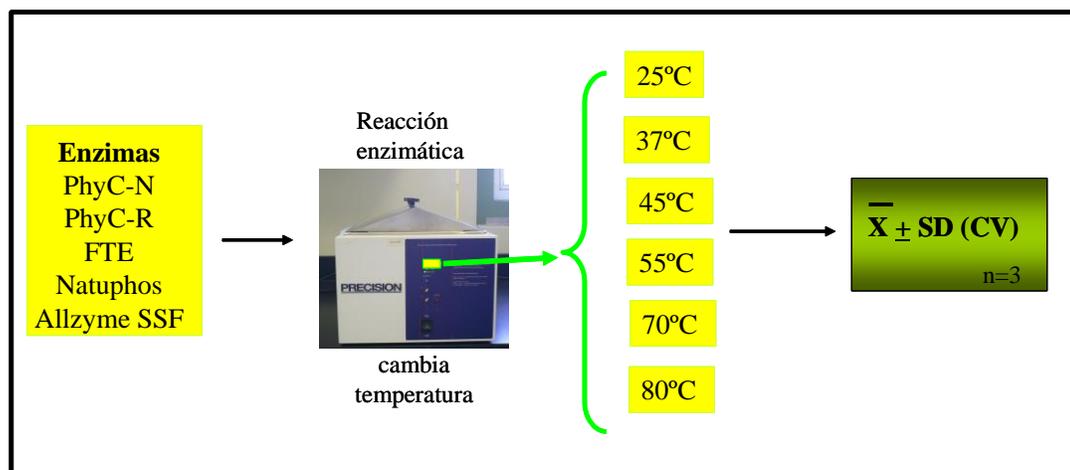


Figura 9. Representación del diseño experimental para la evaluación de la actividad enzimática a diferentes temperaturas (25, 37, 45, 55, 70 y 80°C) durante 30 min. Para medir el efecto de la temperatura se realizaron ensayos a diferentes temperaturas mostradas en el esquema.

La actividad enzimática se realizó como lo descrito en la sección (5.4.1) a pH 5.5 para las fitasas del género *Aspergillus* y a pH 7.5 para las fitasas del género *Bacillus*.

La reacción enzimática se llevó a cabo a 25, 37, 45, 55, 70 y 80°C incubando en un baño de agua (*Precision, Termo EC*) por 30 min. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada temperatura.

La mezcla de reacción y el cálculo de actividad enzimática se realizaron como se indica en la sección 5.4.1. El % de actividad respecto al valor de actividad enzimática más alto de cada fitasa se calculó de acuerdo a la siguiente formula:

$$\% \text{ Actividad} = \left(\frac{U / mL_i}{U / mL_a} \right) * 100$$

Donde los U/mL_i corresponden a la de actividad más alta de cada fitasa a una temperatura determinada y las U/mL_i corresponden a la actividad determinada a diferentes temperaturas de cada fitasa.

5.9.4. Evaluación y comparación de la estabilidad a 37°C

La evaluación de la estabilidad se determinó a partir de las tres preparaciones semipurificadas de las fitasas del género *Bacillus* (PhyC-N, PhyC-R y FTE) y de las dos preparaciones de las fitasas del género *Aspergillus* (Natuphos y Allzyme SSF) a 37°C y 1 mM CaCl₂ como se muestra en la figura 10.

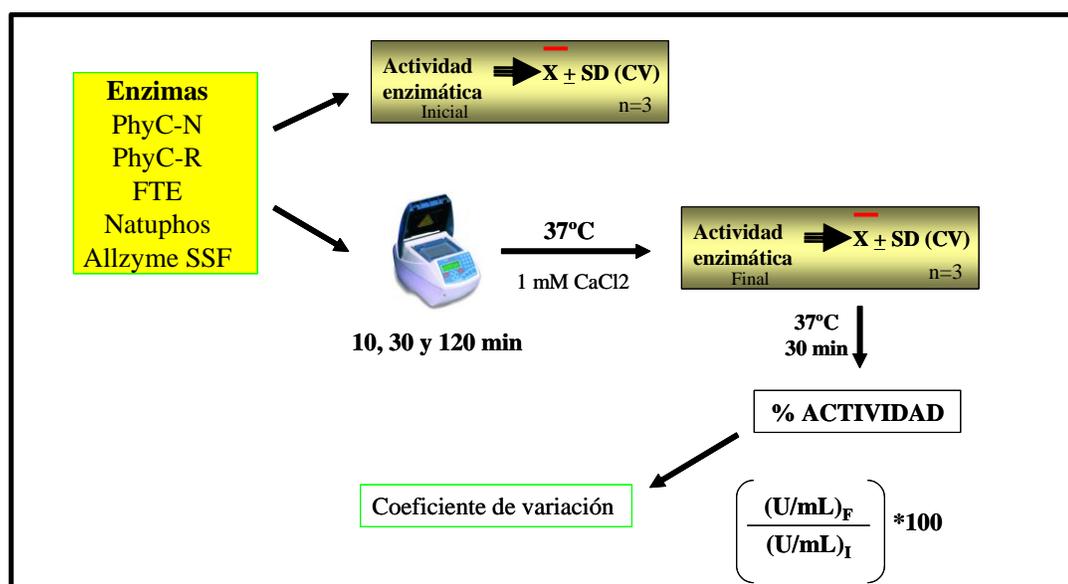


Figura 10. Representación del diseño experimental para la evaluación de la estabilidad de las cinco fitasas a 37°C, 1 mM CaCl₂ durante 10, 30 y 120 min. Para medir el efecto de la estabilidad se determinó la actividad enzimática inicial y la actividad enzimática final después de incubar a 37°C por 10, 30 y 120 min.

La estabilidad se evaluó determinando la actividad enzimática inicial y la actividad enzimática final después de incubar a 37°C por 10, 30 y 120 min en un buffer

360 mM acetato de sodio pH 5.5, 1 mM de CaCl_2 para las fitasas del género *Aspergillus* y en buffer 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM de CaCl_2 para las fitasas del género *Bacillus*.

La mezcla de reacción y el cálculo de actividad enzimática se realizaron como se indica en la sección 5.4.1. El % de actividad respecto al valor de actividad inicial de cada fitasa se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad} = \left(\frac{U / mL_f}{U / mL_i} \right) * 100$$

Donde los U/mL_i corresponden a la actividad sin ningún tratamiento térmico y las U/mL_f corresponden a la actividad después de la incubación a 37°C durante 10, 30 y 120 min.

5.9.5. Evaluación y comparación de la termoestabilidad a 37, 60 y 80°C

La evaluación de la termoestabilidad se determinó a partir de las tres preparaciones semipurificadas de las fitasas del género *Bacillus* (PhyC-N, PhyC-R y FTE) y de las dos preparaciones de las fitasas del género *Aspergillus* (Natuphos y Allzyme SSF) como se presenta de manera general en la figura 11.

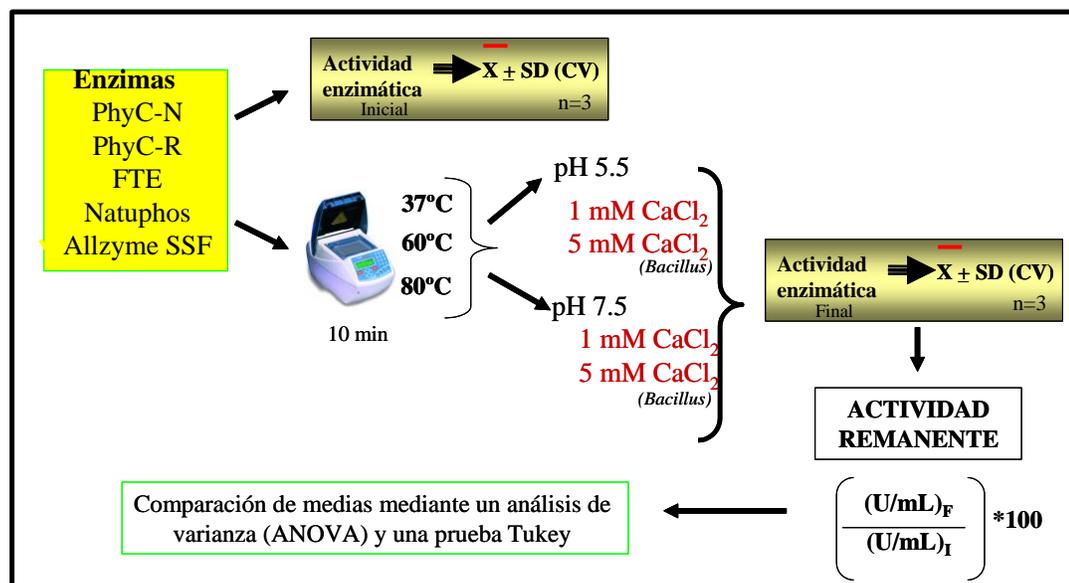


Figura 11. Representación del diseño experimental de la evaluación de la termoestabilidad a tres temperaturas (37, 60 y 80°C). Para medir el efecto de la termoestabilidad se determinó la actividad enzimática inicial y la actividad enzimática final después de incubar a 37, 60 y 80°C por 10 min.

La evaluación del tratamiento térmico de las cinco fitasas se realizó a pH 5.5 y 7.5. Para el caso de las fitasas del género *Aspergillus* (Natuphos y Allzyme SSF) se determinó solo en presencia de 1 mM de CaCl_2 , mientras que la evaluación de las fitasas del género *Bacillus* (PhyC-N, PhyC-R y FTE) se determinó en presencia de 1 y 5 mM CaCl_2 .

En la figura 12 A se muestra el procedimiento realizado para el ensayo de termoestabilidad a pH 5.5 y 1 mM de CaCl_2 . En la figura 12 B se muestra el procedimiento realizado para el ensayo de termoestabilidad a pH 5.5 y 5 mM de CaCl_2 .

La termoestabilidad a pH 5.5 y 1 mM de CaCl_2 (ensayo # 12 A) se realizó con preparaciones enzimáticas obtenidas a un pH 7.5 y 5 mM CaCl_2 , a éstas se les ajustó la concentración de calcio a 1 mM y el valor de pH a 5.5 diluyendo 1:5 con un buffer 360 mM de acetato de sodio a pH 5.5 y sin calcio. Habiendo ajustado el pH y la concentración de calcio se realizó una segunda dilución para ajustar las unidades a 0.1 U/mL. Esta dilución fue dependiente de la preparación enzimática y finalmente la muestra se dividió en dos alícuotas, a una de las alícuotas se le determinó actividad fítica (inicial) y a la segunda se le determinó la actividad fítica final, después de someter la muestra ajustada a un valor de pH 5.5, 1 mM de CaCl_2 y 0.1 U/mL, al tratamiento térmico (37, 60 y 80°C) durante 10 min.

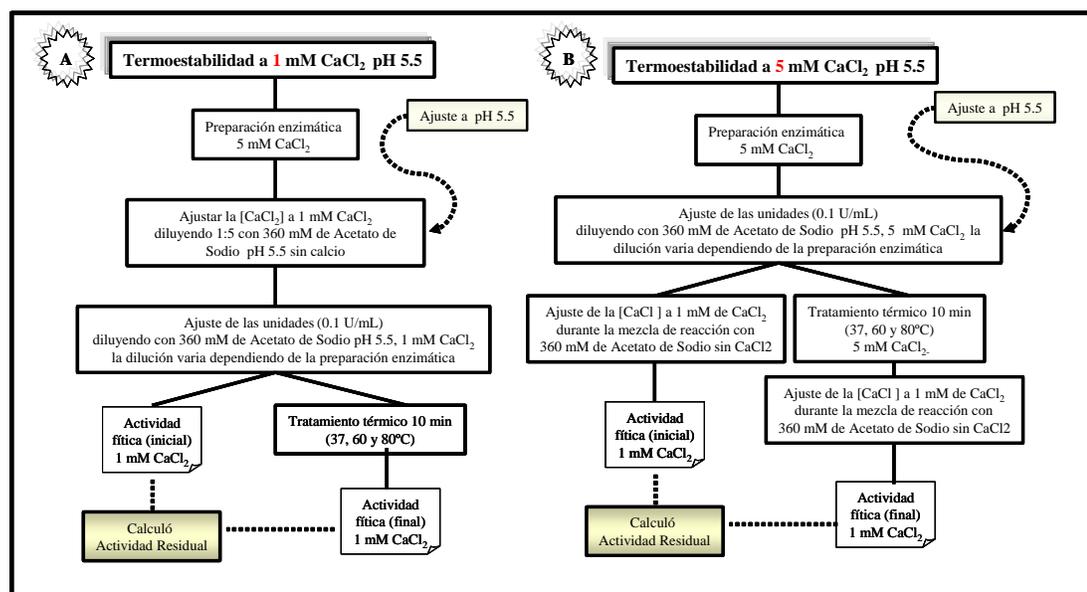


Figura 12. Representación del diseño experimental de la evaluación de la termoestabilidad a pH 5.5 a 1 y 5 mM CaCl_2 . Para determinar la termoestabilidad a pH 5.5 se utilizó un buffer 360 mM de Acetatos Sodio a pH 5.5.

La evaluación de la actividad fítica inicial y final se determinó en presencia de 1 mM de CaCl_2 y pH 5.5 (buffer 360 de mM de acetato de sodio). Posteriormente se calculó la actividad residual como se describe en la sección 5.4.2. La termoestabilidad a pH 5.5 y 5 mM de CaCl_2 (ensayo-# 12 B) se realizó al igual que el ensayo # 12 A con las preparaciones enzimáticas conteniendo 5 mM de CaCl_2 y un valor de pH 7.5, a éstas se les ajustó el valor de pH y las unidades a 0.1 U/mL con un buffer 360 mM de acetato de sodio a pH 5.5 y 5 mM de CaCl_2 , esta dilución fue dependiente de la preparación enzimática. Posteriormente la muestra ajustada a un valor de pH 5.5 y 0.1 U/mL se dividió en dos alícuotas, a una de ellas se le determinó actividad fítica inicial, mientras que la segunda alícuota se sometió a tratamiento térmico (37, 60 y 80°C) durante 10 min para después determinar actividad fítica final. En la preparación de la mezcla de reacción enzimática de la actividad inicial y final se realizó el ajuste de la concentración de calcio a 1 mM usando un buffer 360 mM de acetato de sodio a pH 5.5 y sin CaCl_2 , con ambos valores de actividad se calculó la actividad residual como se describe en la sección 5.4.2.

En la figura 13 A se muestra el procedimiento realizado para el ensayo de termoestabilidad a pH 7.5 y 1 mM de CaCl_2 . En la figura 13 B se muestra el procedimiento realizado para el ensayo de termoestabilidad a pH 7.5 y 5 mM de CaCl_2 .

La termoestabilidad a pH 7.5 y 1 mM de CaCl_2 (ensayo-# 13 A) se realizó con preparaciones enzimáticas obtenidas a un pH 7.5 y 5 mM CaCl_2 , a las cuales se les ajustó la concentración de calcio a 1 mM diluyendo 1:5 con un buffer 100 mM de Tris-HCl a pH 7.5 y sin calcio. Habiendo ajustado la concentración de calcio se realizó una segunda dilución para ajustar las unidades a 0.1 U/mL. Esta dilución fue dependiente de la preparación enzimática y finalmente se dividió en dos alícuotas, a una de las alícuotas se le determinó actividad fítica inicial y a la segunda se le determinó la actividad fítica final después de someter la muestra ajustada a 1 mM de CaCl_2 y 0.1 U/mL al tratamiento térmico (37, 60 y 80°C) durante 10 min. La evaluación de la actividad fítica inicial y final se determinó en presencia de 1 mM de CaCl_2 y pH 7.5, usando un buffer 100 mM de Tris-HCl a pH 7.5 y 1 mM de CaCl_2 . Posteriormente se calculó la actividad residual como se describe en la sección 5.4.2.

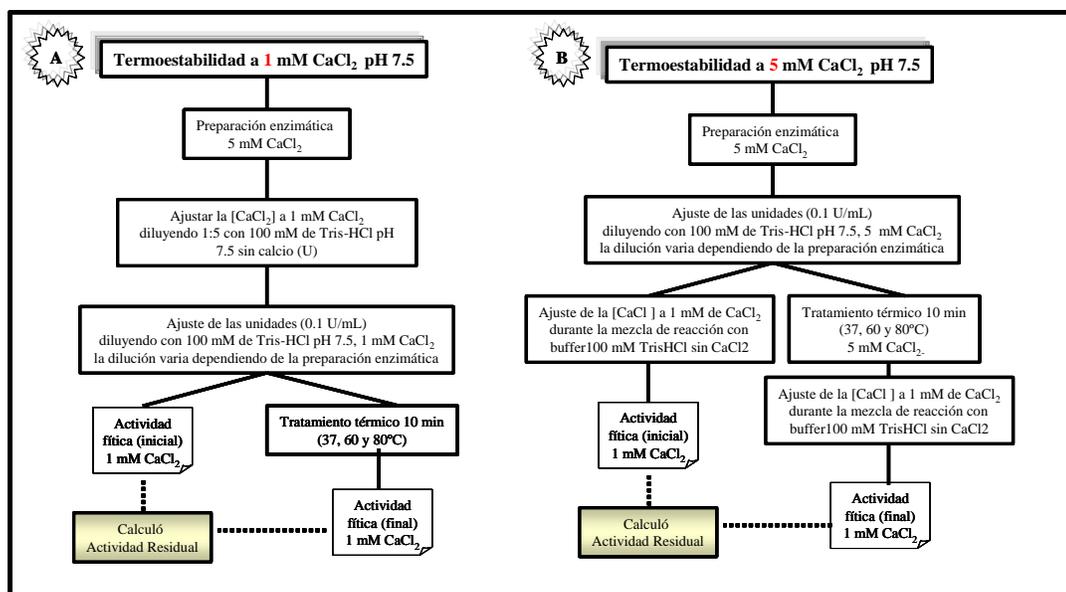


Figura 13. Representación del diseño experimental de la evaluación de la termoestabilidad a pH 7.5 a 1 y 5 mM CaCl₂. Para determinar la termoestabilidad a pH 7.5 se utilizó un buffer 100 mM de Tris-HCl a pH 7.5.

La termoestabilidad a pH 7.5 y 5 mM de CaCl₂ (ensayo-# 13 B) se realizó al igual que el ensayo # 13 A con las preparaciones enzimáticas conteniendo un valor de pH 7.5 y 5 mM de CaCl₂, a éstas se les ajustó las unidades a 0.1 U/mL diluyendo con un buffer 100 mM de Tris-HCl a pH 7.5 y 5 mM de CaCl₂, esta dilución fue dependiente de la preparación enzimática. Posteriormente la muestra ajustada a 0.1 U/mL se dividió en dos alícuotas, en donde a una de ellas se le determinó actividad fítica inicial, mientras que la segunda alícuota de la muestra ajustada a 0.1 U/mL se sometió a tratamiento térmico (37, 60 y 80°C) durante 10 min para después determinar actividad fítica final. En la preparación de la mezcla de reacción enzimática de la actividad inicial y final se realizó el ajuste de la concentración de calcio a 1 mM usando un buffer 100 mM de Tris-HCl a pH 7.5, sin CaCl₂, con ambos valores de actividad se calculó la actividad residual como se describe en la sección 5.4.2

5.9.6. Evaluación y comparación de la estabilidad a la proteólisis por las enzimas digestivas de camarón (*Litopenaeus vannamei*)

La evaluación de la estabilidad a las enzimas digestivas de camarón se realizó a partir de preparaciones semipurificadas de las fitasas del género *Bacillus*, (PhyC-N, PhyC-R y FTE) y del género *Aspergillus* (Natuphos y Allzyme SSF)

Para evaluar este objetivo se preparó un extracto crudo de hepatopáncreas de camarón (*Litopenaeus vannamei*), en la figura 14 se describe el procedimiento de dicha preparación.

La preparación del extracto crudo del hepatopáncreas de camarón se realizó a partir de 80 camarones, donados por el Programa de Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la siguiente manera: con ayuda de unas tijeras y unas pinzas de disección se extrajo el hepatopáncreas de los camarones, obteniendo 27 g de tejido húmedo, éste se homogenizó con un Ultraturrex en 440 mL de 10 mM de Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂ durante cinco períodos de 20 seg manteniendo siempre la temperatura a 4°C.

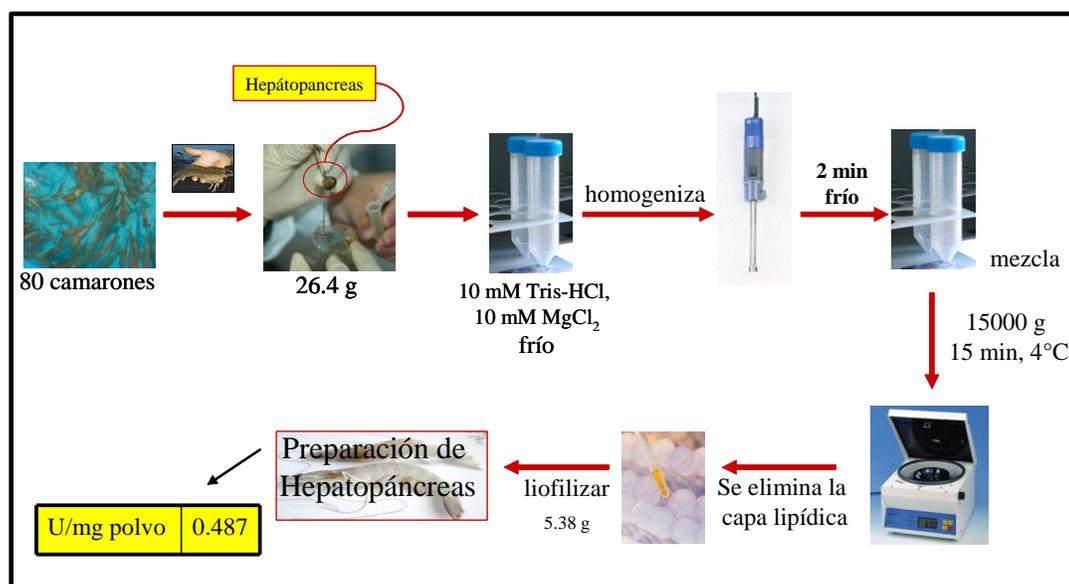


Figura 14. Representación general de la preparación del extracto crudo de hepatopáncreas de camarón. Para medir el efecto de la estabilidad a enzimas digestivas de camarón se preparó un extracto crudo de hepatopáncreas de camarón.

Posteriormente se centrifugó a 7000 g a 4°C durante 15 min. La fase acuosa fue removida con pipeta evitando sustraer la capa de lípidos y los restos celulares, estos se desecharon posteriormente. La suspensión café clara se liofilizó y se guardó a -20°C para su uso posterior.

La evaluación de la susceptibilidad a la proteólisis de las cinco fitasas se realizó con tres preparaciones de hepatopáncreas con diferente actividad: la primera preparación a partir de una solución de hepatopáncreas de una actividad de tripsina de 0.18 U/mL BAPNA a 37°C (0.045 U/mL en la mezcla de reacción) y 64 µg proteína/mL (1X), la segunda preparación a partir de una solución de hepatopáncreas de una actividad de tripsina de 1.8 U/mL BAPNA a 37°C (0.45 U/mL en la mezcla de reacción) y 640 µg proteína/mL (10 X) y la tercer preparación a partir de una solución de hepatopáncreas de una actividad tripsina de 6.7 U/mL BAPNA a 37°C (0.2 U/mL en la mezcla de reacción) para 40X.

Para la preparación 1X se pesaron 30 mg de polvo del extracto crudo de hepatopáncreas y se resuspendieron en 5 mL de 20 mM de Tris-HCl pH 7.6 (6 mg/mL), posteriormente se centrifugó a 18000 g a 4°C durante 10 min. El sobrenadante café claro se separó y se realizaron alícuotas de 150 µL, las cuales se mantuvieron a -20°C, hasta su posterior uso. Para las preparaciones 10 y 40X se pesaron 300 y 1200 mg de polvo del extracto crudo de hepatopáncreas respectivamente, se resuspendieron en 5 mL de 20 mM de Tris-HCl pH 7.6 y se realizó el mismo procedimiento anterior.

La estabilidad a la proteólisis por enzimas digestivas de camarón se determinó evaluando la actividad enzimática después de someter las preparaciones de fitasas a una incubación en presencia y en ausencia de las enzimas digestivas de camarón a 37°C durante 0, 10, 30 y 120 min. En la figura 15 se representa un esquema del protocolo experimental de este ensayo para las fitasas de *Bacillus*.

Para cada tiempo de tratamiento con hepatopáncreas, se preparó una mezcla a 1 mM CaCl₂ conteniendo 200 µL de la preparación enzimática más 100 µL de hepatopáncreas (Hp 1X, 10X y 40X) más 100 µL de buffer 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM CaCl₂. A su vez, también se preparó una muestra control (sin Hp) conteniendo 200 µL de la preparación enzimática más 200 µL de buffer 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM CaCl₂, tanto la muestra como el control se incubaron a 0, 10, 30 y 120 min a 37°C.

Después de la incubación se determinó la actividad enzimática, para lo cual se tomaron 50 µL del control o la muestra y se mezclaron con 200 µL de buffer 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM CaCl₂ (blanco de muestra) ó 200 µL de sustrato (1.6 mM Fitato de sodio concentración final). Estas mezclas se incubaron a 37°C por 30 min y se

determinó fósforo libre. Este ensayo se realizó con cada una de las preparaciones enzimáticas y con las tres concentraciones de hepatopáncreas, para cada uno de los ensayos tal como se muestra en la tabla X, XI y XII. Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado.

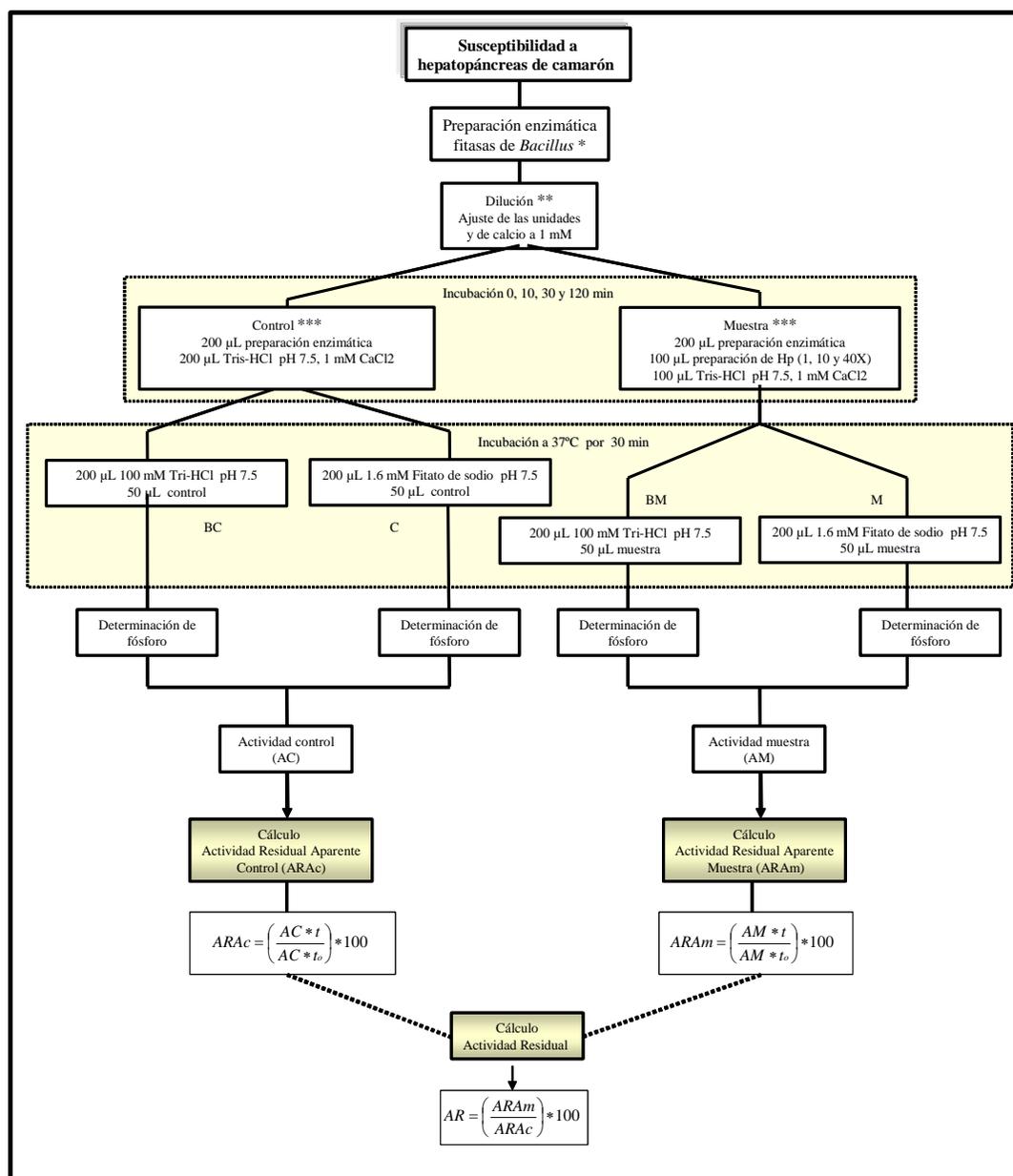


Figura 15. Representación del diseño experimental de susceptibilidad de las fitasas del género *Bacillus* frente a las enzimas digestivas de camarón. Para determinar este ensayo se utilizaron tres concentraciones de hepatopáncreas (1, 10 y 40X). Los asteriscos hacen referencia a los valores descritos en las tablas X, XI y XII.

Tabla X. Actividades fíticas presentes en las preparaciones enzimáticas en el ensayo de susceptibilidad con Hp 1X. Los asteriscos hacen referencia a las etapas descritas en las figuras 15 y 16.

	PhyC-N U/mL	PhyC-R U/mL	FTE U/mL	Natuphos U/mL	Allzyme SSF U/mL
Actividad de la preparación enzimática *	3.17	0.89	0.55	29.45	9.48
Actividad inicial de la preparación enzimática **	0.79	0.15	0.14	1.18	0.95
Actividad en la mezcla de tratamiento ***	0.40	0.07	0.07	0.59	0.47
	n=3 al menos	n=3 al menos	n=3 al menos	n=3 al menos	n=3 al menos

Para la preparación enzimática de PhyC-N (40 FTU) se pesaron 400 mg del polvo y se resuspendieron en 5 mL de buffer 100 mM Tris-HCl pH 7.5 y 1 mM CaCl₂ y con una actividad de 3.17 U/mL, se ajustaron las unidades a 0.79 U/mL diluyendo 1:4 con un buffer 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM de CaCl₂, se preparó la muestra y el control, éstas se incubaron por 0, 10, 30 y 120 min a 37°C, obteniendo la actividad fítica de la muestra control (AC) y la actividad fítica de la muestra tratada con hepatopáncreas (AM) para cada tiempo de incubación.

Tabla XI. Actividades fíticas presentes en las preparaciones enzimáticas en el ensayo de susceptibilidad con Hp 10X. Los asteriscos hacen referencia a las etapas descritas en las figuras 15 y 16.

	PhyC-N U/mL	PhyC-R U/mL	FTE U/mL	Natuphos U/mL	Allzyme SSF U/mL
Actividad de la preparación enzimática *	2.73	0.70	0.49	28.24	6.92
Actividad inicial de la preparación enzimática **	0.68	0.12	0.12	1.13	0.69
Actividad en la mezcla de tratamiento ***	0.34	0.06	0.06	0.56	0.35
	n=3 al menos	n=3 al menos	n=3 al menos	n=3 al menos	n=3 al menos

Tabla XII. Actividades fíticas presentes en las preparaciones enzimáticas en el ensayo de susceptibilidad con Hp 40X. Los asteriscos hacen referencia a las etapas descritas en las figuras 15 y 16.

	PhyC-N U/mL	PhyC-R U/mL	FTE U/mL	Natuphos U/mL	Allzyme SSF U/mL
Actividad de la preparación enzimática *	3.46	0.53	0.27	33.24	10.48
Actividad inicial de la preparación enzimática **	0.86	0.53	0.27	1.33	1.05
Actividad en la mezcla de tratamiento ***	0.43	0.26	0.13	0.66	0.52
	n=3 al menos	n=3 al menos	n=3 al menos	n=3 al menos	n=3 al menos

El control se realizó para eliminar algún efecto sobre la actividad fítica causado por la temperatura durante el tiempo de incubación.

Se cálculo la actividad residual aparente del control (ARAc) y de la muestra (ARAm) como se describe en las siguientes fórmulas y de acuerdo al diagrama de la figura 15.

$$ARAc = \left(\frac{AC * t}{AC * t_0} \right) * 100$$

$$ARAm = \left(\frac{AM * t}{AM * t_0} \right) * 100$$

Con ambos valores se cálculo la actividad residual (AR) como se describe en la siguiente fórmula:

$$AR = \left(\frac{ARAm}{ARAc} \right) * 100$$

ARAm fue denominado como porcentaje de actividad (actividad %) a lo largo de este texto.

Para el caso de las preparaciones enzimáticas de PhyC-R a 0.89 U/mL y la FTE a 0.55 U/mL con 5 mM de CaCl₂ pH 7.5, se les ajustó la concentración de calcio (1 mM) y las unidades diluyendo 1:6 para PhyC-R (0.15 U/mL) y 1:4 para FTE (0.14 U/mL) con un buffer 100 mM de Tris-HCl pH 7.5 sin CaCl₂. Posteriormente las muestras se trataron como se describió para la PhyC-N y se determinó ARAc y ARAm, para posteriormente calcular AR.

En la figura 16 se representa un esquema del protocolo experimental del ensayo de susceptibilidad de las enzimas de *Aspergillus* frente a las enzimas digestivas de camarón.

Para las preparaciones enzimática de Natuphos y Allzyme SSF (2950 y 950 FTU respectivamente) se pesaron 100 mg del polvo y se resuspendieron en 10 mL de buffer 360 mM de acetato de sodio, 1 mM CaCl_2 y pH 5.5 con una actividad de 29.5 U/mL para Natuphos y 9.5 U/mL para Allzyme SSF, se ajustaron las unidades diluyendo 1:25 para Natuphos (1.18 U/mL) y 1:10 para Allzyme SSF (0.95 U/mL) con un buffer 360 mM de acetato de sodio pH 5.5, 1 mM de CaCl_2 , se preparó la muestra y el control y estas se incubaron por 0, 10, 30 y 120 min a 37°C, obteniendo la actividad fítica de la muestra control (AC) y la actividad fítica de la muestra tratada con hepatopáncreas (AM) para cada tiempo de incubación. El control se realizó para eliminar algún efecto sobre la actividad fítica causado por la temperatura durante el tiempo de incubación.

Se cálculo la actividad residual aparente del control (ARAc) y de la muestra (ARAm) como se describe en las siguientes fórmulas y de acuerdo al diagrama de la figura 16

$$ARAc = \left(\frac{AC * t}{AC * t_0} \right) * 100$$

$$ARAm = \left(\frac{AM * t}{AM * t_0} \right) * 100$$

Con ambos valores se cálculo la actividad residual (AR) como se describe en la siguiente fórmula:

$$AR = \left(\frac{ARAm}{ARAc} \right) * 100$$

ARAm fue denominado como porcentaje de actividad (actividad%) a lo largo de este texto.

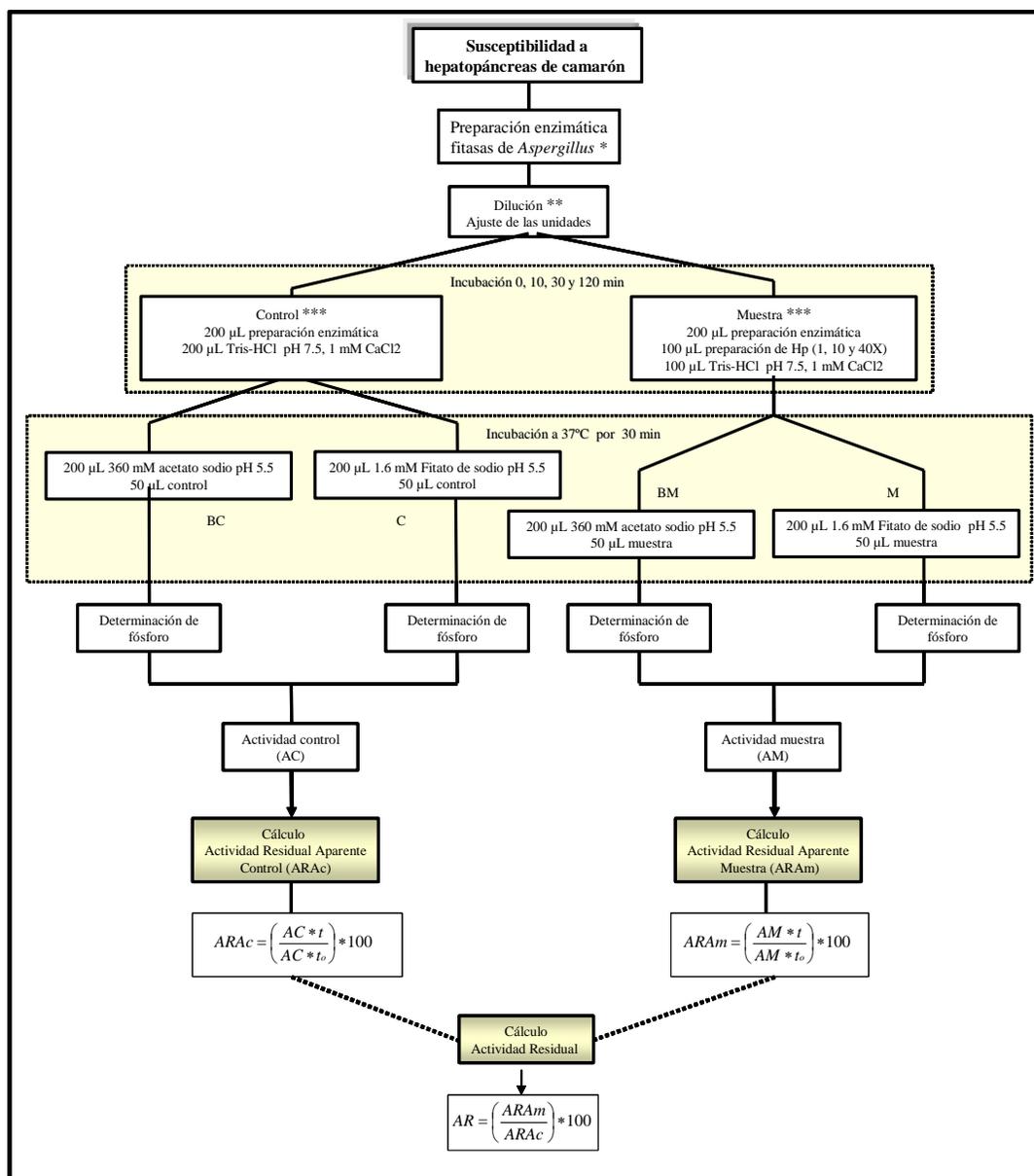


Figura 16. Representación del diseño experimental de susceptibilidad de las fitas del género *Aspergillus* frente a las enzimas digestivas de camarón. Para determinar este ensayo se utilizaron tres concentraciones de hepatopáncreas (1, 10 y 40X). Los asteriscos hacen referencia a los valores descritos en las tablas X, XI y XII.

5.9.7. Evaluación y comparación de la estabilidad a la proteólisis por la enzima tripsina porcina

La evaluación de la estabilidad a la tripsina porcina se realizó a partir de preparaciones semipurificadas de las fitasas del género *Bacillus* (PhyC-N, PhyC-R y FTE) y del género *Aspergillus* (Natuphos y Allzyme SSF)

La enzima utilizada para esta evaluación fue la tripsina porcina de *Sigma Aldrich Corporation* (T-0134) de la cual se realizaron dos preparaciones con diferente actividad, la primera preparación a partir de una solución de tripsina porcina con una actividad de 0.12 U/mL BAPNA y 62 µg proteína/mL (1X) y la segunda preparación a partir de una solución de tripsina porcina con una actividad de 1.2 U/mL BAPNA y 620 µg proteína/mL (10 X). Para la preparación 1X se pesaron 2 mg de polvo de tripsina porcina (*Sigma*) y se resuspendieron en 25 mL de 1 mM de ácido clorhídrico (0.08 mg/mL), posteriormente se mezcló perfectamente durante unos minutos. El sobrenadante incoloro se separó y se realizaron alícuotas de 150 µL, las cuales se mantuvieron a -20°C, hasta su posterior uso. Para la preparación 10X se pesaron 20 mg de tripsina porcina (*Sigma*) y se resuspendieron en 25 mL de 1 mM de ácido clorhídrico (0.8 mg/mL), se mezcló perfectamente durante unos minutos y se realizó el mismo procedimiento anterior.

La estabilidad a la proteólisis por la enzima tripsina porcina se determinó evaluando la actividad enzimática después de someter las preparaciones de fitasas a una incubación en presencia y en ausencia de las enzimas digestivas de camarón a 37°C durante 0, 10, 30 y 120 min. En la figura 17 se representa un esquema del protocolo experimental de este ensayo para las fitasas de *Bacillus*.

Para cada tiempo de tratamiento con tripsina porcina, se preparó una mezcla a 1 mM CaCl₂ conteniendo 200 µL de la preparación enzimática más 100 µL de tripsina (tripsina 1X y 10X) más 100 µL de buffer 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM de CaCl₂. A su vez, también se preparó una muestra control (sin tripsina) conteniendo 200 µL de la preparación enzimática más 200 µL de buffer 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM de CaCl₂, tanto la muestra como el control se incubaron a 0, 10 y 30 min a 37°C.

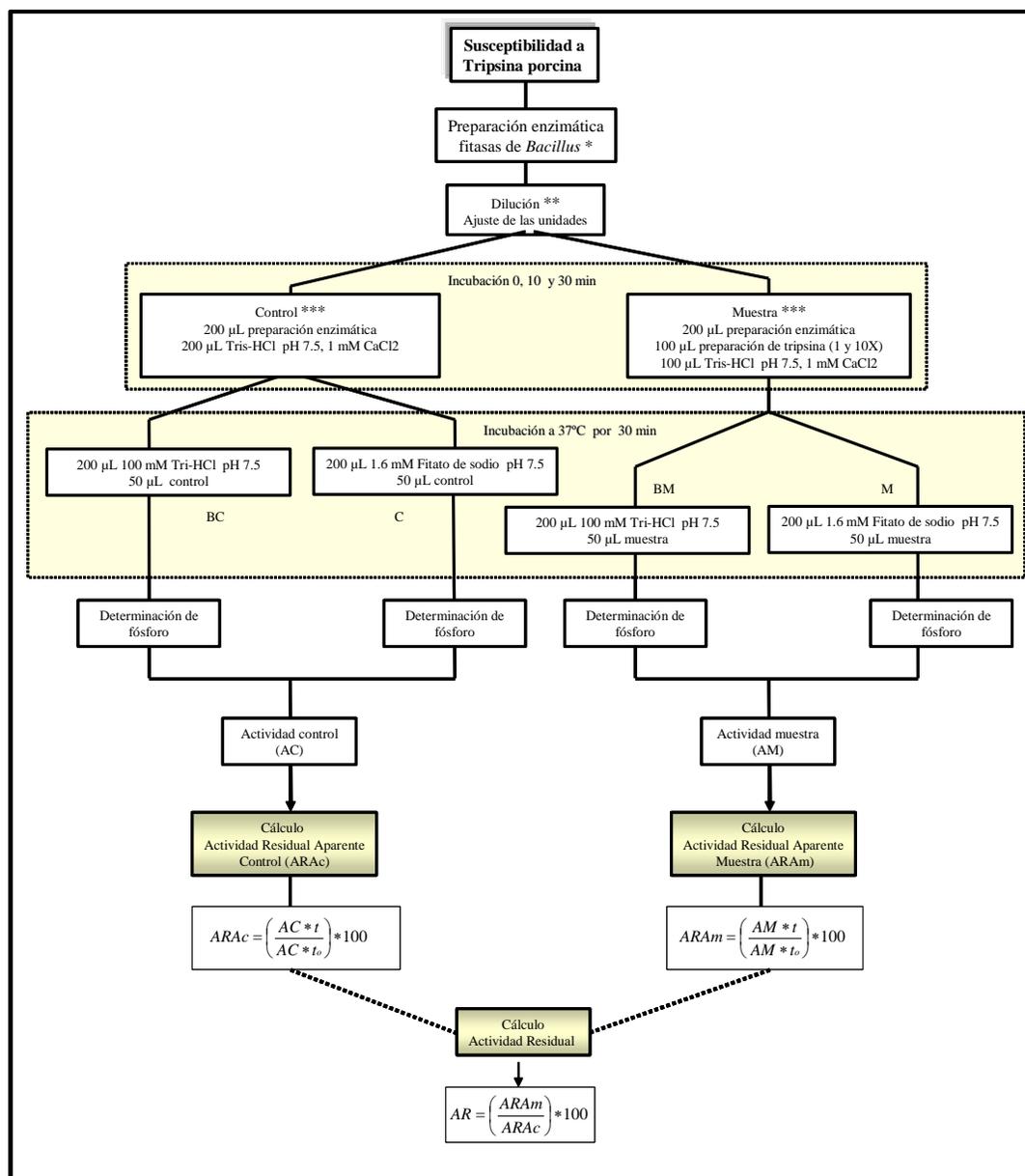


Figura 17. Representación del diseño experimental de susceptibilidad de las fitasas del género *Bacillus* frente a la enzima tripsina porcina. Para determinar este ensayo se utilizaron dos concentraciones de tripsina (1 y 10X). Los asteriscos hacen referencia a los valores descritos en las tablas XIII y XIV.

Después de la incubación se determinó la actividad enzimática, para lo cual se tomaron 50 µL de la muestra o el control y se mezclaron con 200 µL de buffer 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM de CaCl₂ (blanco de muestra) ó 200 µL de sustrato (1.6 mM fitato de sodio). Estas mezclas se incubaron a 37°C por 30 min y se determinó fósforo libre. Este ensayo se realizó con cada una de las preparaciones enzimáticas y con las dos

concentraciones de tripsina porcina, para cada uno de los ensayos tal como se muestra en la tabla XIII y XIV. Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado.

Tabla XIII. Actividades fílicas presentes en las preparaciones enzimáticas en el ensayo de susceptibilidad con tripsina 1X. Los asteriscos hacen referencia a las etapas descritas en las figuras 17 y 18.

	PhyC-N U/mL	PhyC-R U/mL	FTE U/mL	Natuphos U/mL	Allzyme SSF U/mL
Actividad de la preparación enzimática *	3.17	0.64	0.30	32.10	9.46
Actividad inicial de la preparación enzimática **	0.79	0.26	0.12	1.28	0.95
Actividad en la mezcla de tratamiento ***	0.40	0.13	0.06	0.64	0.47
	n=3 al menos	n=3 al menos	n=3 al menos	n=3 al menos	n=3 al menos

Para la preparación enzimática de PhyC-N (40 FTU) se pesaron 400 mg del polvo y se resuspendieron en 5 mL de buffer 100 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂ y pH 7.5 con una actividad de 3.17 U/mL, se ajustaron las unidades a 0.79 U/mL diluyendo 1:4 con un buffer 100 mM de Tris-HCl pH 7.5, 1 mM de CaCl₂, se preparó la muestra y el control, éstas se incubaron por 0, 10 y 30 min a 37°C, obteniendo la actividad fílica de la muestra control (AC) y la actividad fílica de la muestra tratada con tripsina porcina (AM) para cada tiempo de incubación. El control se realizó para eliminar algún efecto sobre la actividad fílica causado por la temperatura durante el tiempo de incubación.

Tabla XIV. Actividades fílicas presentes en las preparaciones enzimáticas en el ensayo de susceptibilidad con tripsina 10X. Los asteriscos hacen referencia a las etapas descritas en las figuras 17 y 18.

	PhyC-N U/mL	PhyC-R U/mL	FTE U/mL	Natuphos U/mL	Allzyme SSF U/mL
Actividad de la preparación enzimática *	3.12	0.62	0.30	33.50	11.37
Actividad inicial de la preparación enzimática **	0.79	0.25	0.12	1.34	1.14
Actividad en la mezcla de tratamiento ***	0.39	0.12	0.06	0.67	0.57
	n=3 al menos	n=3 al menos	n=3 al menos	n=3 al menos	n=3 al menos

Se calculó la actividad residual aparente del control (ARAc) y de la muestra (ARAm) como se describe en las siguientes fórmulas y de acuerdo al diagrama de la figura 17.

$$ARAc = \left(\frac{AC * t}{AC * t_0} \right) * 100$$

$$ARAm = \left(\frac{AM * t}{AM * t_0} \right) * 100$$

Con ambos valores se calculó la actividad residual (AR) como se describe en la siguiente fórmula:

$$AR = \left(\frac{ARAm}{ARAc} \right) * 100$$

ARAm fue denominado como porcentaje de actividad (actividad %) a lo largo de este texto.

Para el caso de las preparaciones enzimáticas de PhyC-R a 0.64 U/mL y la FTE a 0.30 U/mL con 5 mM de CaCl₂ pH 7.5, se ajustó la concentración de calcio (1 mM) y las unidades diluyendo 1:2.5 para PhyC-R (0.26 U/mL) y para FTE (0.12 U/mL) con un buffer de 100 mM Tris-HCl pH 7.5 sin CaCl₂. Posteriormente las muestras se trataron como se describió para la PhyC-N y se determinó ARAc y ARAm, para posteriormente calcular AR.

En la figura 18 se representa un esquema del protocolo experimental del ensayo de susceptibilidad de las enzimas de *Aspergillus* frente a la enzima tripsina porcina.

Para las preparaciones enzimática de Natuphos y Allzyme SSF (3200 y 950 FTU respectivamente) se pesaron 100 mg del polvo y se resuspendieron en 10 mL de buffer 360 mM acetato de sodio, 1 mM CaCl₂ y pH 5.5 con una actividad de 32.10 U/mL para Natuphos y 9.50 U/mL para Allzyme SSF, se ajustaron las unidades diluyendo 1:25 para Natuphos (1.28 U/mL) y 1:10 para Allzyme SSF (0.95 U/mL) con un buffer 360 mM de acetato de sodio pH 5.5, 1 mM de CaCl₂, se preparó la muestra y el control, éstas se incubaron por 0, 10, 30 y 120 min a 37°C, obteniendo la actividad fítica de la muestra control (AC) y la actividad fítica de la muestra tratada con tripsina porcina

(AM) para cada tiempo de incubación. El control se realizó para eliminar algún efecto sobre la actividad fítica causado por la temperatura durante el tiempo de incubación.

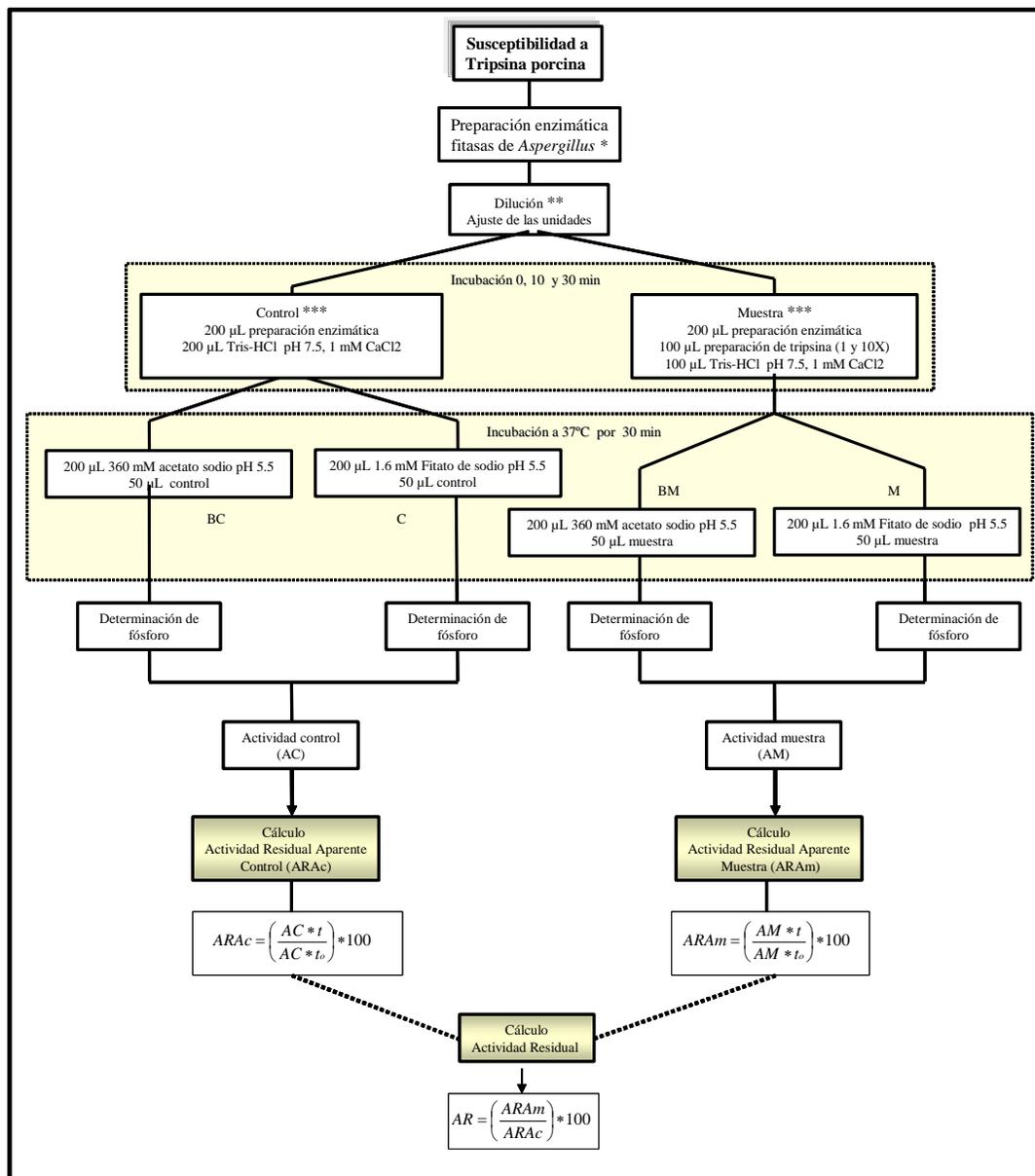


Figura 18. Representación del diseño experimental de susceptibilidad de las fitasas del género *Aspergillus* frente a la enzima tripsina porcina. Para determinar este ensayo se utilizaron dos concentraciones de tripsina (1 y 10X). Los asteriscos hacen referencia a los valores descritos en las tablas XIII y XIV.

Se calculó la actividad residual aparente del control (ARAc) y de la muestra (ARAm) como se describe en las siguientes fórmulas y de acuerdo al diagrama de la figura 18.

$$ARAc = \left(\frac{AC * t}{AC * t_o} \right) * 100$$

$$ARAm = \left(\frac{AM * t}{AM * t_o} \right) * 100$$

Con ambos valores se calculó la actividad residual (AR) como se describe en la siguiente fórmula:

$$AR = \left(\frac{ARAm}{ARAc} \right) * 100$$

ARAm fue denominado como porcentaje de actividad (actividad %) a lo largo de este texto.

5.9.8. Determinación del valor de Km de la Fitasa C recombinante

La determinación del valor de Km se realizó a partir de la preparación semipurificada de PhyC-R.

Para obtener el valor de la Km se realizaron ocho cinéticas enzimáticas de punto final realizadas a 30 min manteniendo constante la concentración de fitasa (0.51 U/mL) y aumentando la concentración de fitato de sodio de 0.03 a 1.6 mM.

La preparación de los stocks de fitato de sodio (923.8 g/mol) se realizaron de la siguiente manera: primero se preparó el stock de 2 mM, se pesaron 9.2 mg de fitato de sodio y se disolvió en 5 mL de 100 mM Tris-HCl pH 7.5 (sin calcio), se mezcló perfectamente, a partir de esta preparación se realizaron una serie de diluciones, mostradas en la tabla XV, para tener las diferentes concentraciones de fitato de sodio, estas diluciones se realizaron con un buffer 100 mM de Tris-HCl pH 7.5 (sin calcio).

La determinación de actividad enzimática se realizó como se indica en la sección de actividad enzimática (5.4.1) considerando los blancos correspondientes (el blanco de muestra y el blanco de sustrato) y se tomó como velocidad inicial de la reacción enzimática.

Tabla XV. Concentraciones del fitato de sodio presentes en la reacción enzimática para la determinación del valor de la K_m de la PhyC-R

Fitato de sodio (sustrato)	
Dilución	Concentración Final (mM)
1:1	1.60
1:5	1.06
1:2	0.80
1:5	0.32
1:10	0.16
1:15	0.10
1:25	0.06
1:50	0.03

Los valores de actividad fítica evaluados durante las cinéticas enzimáticas se utilizaron para calcular el valor de K_m mediante los siguientes representaciones gráficas: Michaelis Menten teniendo como coordenadas la velocidad inicial (V_o) en el eje de las y contra la concentración del sustrato $[S]$ en el eje de las x , en donde el valor más alto de la velocidad es la velocidad máxima (V_{max}). La representación de Lineweaver-Burk tiene como coordenadas el inverso de la velocidad inicial ($1/V_o$) en el eje de y contra el inverso de la concentración del sustrato ($1/[S]$) en el eje x , estas coordenadas se basan en un reordenamiento algebraico de la ecuación de velocidad hiperbólica original de Michaelis-Menten. El punto de corte con el eje de las abscisas en el modelo de Lineweaver-Burk coincide con el inverso opuesto de la K_m . Finalmente en la representación de Eadie-Hofstee las coordenadas son la velocidad inicial (V_o) en el eje de las y contra el coeficiente de la velocidad inicial y la concentración del sustrato ($V_o/[S]$) en el eje de las x , en donde la pendiente es $-K_m$.

5.9.9. Análisis estadístico

Todos los ensayos para determinar las propiedades físico-químicas de las diferentes fitasas se realizaron al menos por triplicado evaluando media, desviación standard (DS) y coeficiente de variación (%) para cada uno de ellos. Además se realizó una comparación de los resultados obtenidos en el efecto en la termoestabilidad, a tres temperaturas 37, 60 y 80°C en presencia de dos concentraciones de calcio y dos valores de pH, comparando la actividad residual de las fitasas a igualdad de condiciones experimentales, la actividad residual de una determinada fitasa a un valor de pH

determinado en presencia de dos concentraciones de Ca^{2+} diferentes y la actividad residual de una determinada fitasa a un valor determinado de concentración de Ca^{2+} y a dos valores diferentes de pH. También se comparó la actividad residual de una determinada fitasa a diferentes concentraciones de hepatopáncreas de camarón o de tripsina porcina y la actividad residual de las fitasas a la misma concentración de hepatopáncreas o tripsina porcina. Todas las comparaciones se realizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tuckey. Todos los procedimientos estadísticos fueron realizados utilizando el programa computacional SPSS (SPSS-1999).

6. RESULTADOS

6.1. Cultivos bajo condiciones de inducción de tres fitasas del género *Bacillus*

6.1.1. Cultivos de *Bacillus subtilis* bajo condiciones de inducción

El cultivo bajo condiciones de inducción de *B. subtilis* se realizó en un medio a base de salvado de trigo, de color café claro y aspecto turbio. Durante el tiempo de inducción el color oscureció ligeramente, al final de la inducción la turbidez disminuyó sin estar completamente translucido y se formaron aglomerados de células que precipitaron en el fondo del matraz.

6.1.1.1. Determinación de Parámetros de Crecimiento del Cultivo de *Bacillus subtilis*

El crecimiento bajo condiciones de inducción de la cepa de *Bacillus subtilis* VTT E-68013 durante 24 h se presenta en la gráfica de la figura 19. Se construyó una gráfica semilogarítmica de $\ln DO/DO_0$ vs tiempo, para calcular la velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación como se indica en la sección 5.5.3.1. Los valores de DO de cada uno de los tres ensayos evaluados fueron corregidos dividiendo entre el valor de DO inicial de cada ensayo (DO_0). Los valores de DO usados en la determinación de la pendiente son el promedio de tres ensayos.

La velocidad específica de crecimiento se determinó con la pendiente de una recta obtenida entre los tiempos 0-12 h, con un coeficiente R^2 de 0.97.

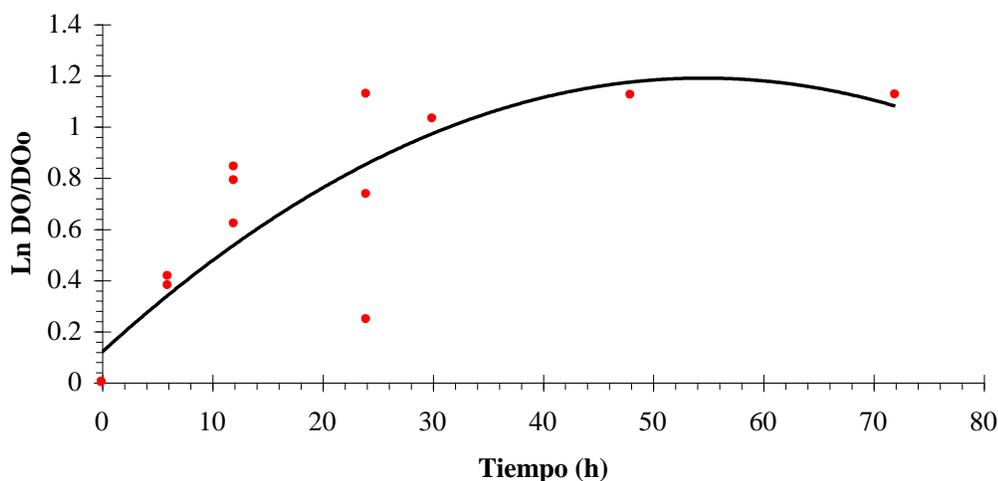


Figura 19. Gráfica semilogarítmica de Ln DO/DOo vs tiempo. Crecimiento de *Bacillus subtilis* VVT E 68013 bajo condiciones de inducción del gen *phyC*. La gráfica se obtuvo de tres ensayos, los puntos representan el promedio de tres mediciones de DO a determinado tiempo.

Los cultivos de *Bacillus subtilis* VTT E-68013 presentaron una velocidad específica de crecimiento de 0.06 h^{-1} y un tiempo de duplicación de 11.1 h, mientras que los valores de velocidad de crecimiento reportados por Poulton y colaboradores (Poulton *et al.*, 1970) varían de 0.30 a 1.50 h^{-1} . El uso de medios de cultivo diferentes puede afectar la velocidad específica de crecimiento (Poulton *et al.*, 1970). Poulton y colaboradores en 1970 utilizaron diferentes medios de cultivo cambiando solo la fuente de carbono encontrando velocidades de crecimiento diferentes para cada medio.

6.1.1.2. Determinación de la concentración de proteínas totales

La concentración de proteínas totales se determinó en los sobrenadantes libres de células mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

En la tabla XVI se presentan los niveles de proteínas extracelulares determinadas a las 0, 6, 12 y 24 h de los sobrenadantes crudos de la Fitasa C de *B. subtilis*.

El valor de la concentración de proteínas del medio de cultivo libre de células más alto fue el inicial, indicando que el medio de inducción empleado es rico en polipéptidos y proteínas. Conforme pasa el tiempo del cultivo bajo condiciones de inducción, el nivel de proteínas disminuyó rápidamente, debido al crecimiento del microorganismo.

Tabla XVI. Proteínas totales de los sobrenadantes crudos de la Fitasa C de *B. subtilis* a diferentes tiempos de inducción. Los datos representan la $\bar{X} \pm SD$ (C.V. < 5%).

Tiempo (h)	Dilución	Proteínas μg/mL $\bar{X} \pm SD$ (n=3)
0	1:40	1241 \pm 13
6	1:10	244 \pm 10
12	1:10	236 \pm 10
24	1:10	280 \pm 6

Al llegar a las 12 h de inducción los niveles de proteínas se mantuvieron y a las 24 h se elevaron ligeramente. Los niveles de proteínas obtenidos a diferentes tiempos no reflejaron la producción y secreción de la fitasa bacteriana.

6.1.1.3. Determinación de la actividad enzimática de fitasa

La actividad de fitasa se determinó a los mismos tiempos en los que se analizaron las muestras para proteínas totales, detectando solo actividad de fitasa a las 24 h con valores de 0.42 ± 0.09 U/mL en el medio de cultivo libre de células, correspondiente a una actividad específica de 1.2 ± 0.06 U/mg proteína.

Kerovuo y colaboradores reportaron una actividad específica de 8 U/mg proteína en los sobrenadantes libres de células del cultivo de *Bacillus subtilis* VTT E-6803 (Kerovuo., 1998). El valor de la actividad específica obtenida fue diferente al reportado por Kerovuo y colaboradores en el 1998 (Kerovuo *et al.*, 1998) a pesar de utilizar la misma cepa de *Bacillus subtilis* (VTT E-6803) y las mismas condiciones del cultivo. El valor de la actividad específica obtenido en este ensayo pudo estar subestimado debido a un efecto de inhibición durante la determinación de la actividad enzimática de fitasa por la alta concentración de fosfatos en los sobrenadantes libres de células, la inhibición de la actividad de fítica por fosfatos ha sido previamente reportada por otros investigadores (Kim *et al.*, 1998a). También podría ser debido a que el medio de inducción empleado contuviera inicialmente una mayor concentración de proteínas que el medio empleado por Kerovuo.

El medio de salvado de trigo empleado normalmente en los cultivos para la expresión del gen *phyC* de *Bacillus subtilis* (PhyC-N) presenta una concentración de 6 mM de fosfatos calculado teóricamente en base al fosfato agregado (0.1%) y una concentración final de 0.1% de CaCl₂. Kim y colaboradores en el 1998 (Kim *et al.*, 1998a) reportaron que la actividad enzimática de la fitasa de *Bacillus amyloliquefaciens* es inhibida en presencia de 6 mM de fosfatos. Con lo cual se buscó disminuir la concentración de fosfato durante la determinación de la actividad enzimática de la Fitasa C de *Bacillus subtilis* (PhyC-N) diluyendo la muestra (1:10). Sin embargo a pesar de realizar estas diluciones, la concentración de fosfatos aún presente pudo interferir con el ensayo de actividad enzimática.

Los niveles de actividad enzimática presentes en los sobrenadante crudos de *B. subtilis* fueron suficientes para realizar la preparación semipurificada de PhyC-N empleada en la caracterización bioquímica.

6.1.2. Cultivos de *Pichia pastoris* bajo condiciones de inducción

En los cultivos de las cepas GS115-*PhyC* (productora de PhyC-R) y GS115-*FTE* (productora de FTE) se utilizaron dos medios de cultivo el BMG y el BMM, estos son incoloros e inoloros al inicio del cultivo. Durante el transcurso de los cultivos los medios se tornaron más turbios y densos hasta tener una consistencia muy espesa, además presentaron un olor muy fuerte (queso fuerte) característica de las cepas de *Pichia pastoris*. En lo que se refiere al color de los cultivos, la cepa GS115-*PhyC* presentó un color amarillo verdoso, mientras que para el caso de la cepa GS115-*FTE* se observó un color amarillo claro.

6.1.2.1. Comportamiento de los cultivos de *Pichia pastoris*

El comportamiento de los cultivos de las cepas GS115-*PhyC* y GS115-*FTE* se analizó determinando la DO durante las diferentes etapas de éstos. Para la obtención de biomasa, se realizaron cultivos de *Pichia pastoris* en 600 mL de BMG, hasta obtener una DO \approx 10. Para la obtención del cultivo de alta densidad en BMM el cultivo de BMG se concentró cinco veces (de 600 mL a 120 mL) para obtener una DO \approx 50. La

inducción se realizó durante 48 h en BMM. Los resultados se presentan más detalladamente en la tabla XVII.

Se buscó obtener cultivos de alta densidad durante la etapa de inducción de las cepas recombinantes de *Pichia pastoris* con el fin de obtener suficiente biomasa para la producción de las fitasas recombinantes.

Tabla XVII. Comportamiento de los cultivos de *Pichia pastoris*.

Fitasa	Obtención de biomasa		Inducción del gen heterólogo		
	DO inicial	DO final	DO 0 h	DO 24 h	DO 48 h
PhyC-R	0.3	10.6	53.0	55.0	58.8
FTE	0.3	9.4	47.0	52.0	53.5

En todos los cultivos de las cepas en estudio se observó un ligero crecimiento celular durante la etapa de inducción con cultivos de alta densidad celular. Con estos cultivos de alta densidad celular se buscó aumentar la concentración de las proteínas heterólogas en el medio de cultivo libre de células.

6.1.2.2. Determinación de la concentración de proteínas totales

Las proteínas totales extracelulares de los sobrenadantes de los cultivos inducidos durante 48 h de las cepas de *Pichia pastoris* recombinantes presentaron niveles de $71 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ (n=3) para la cepa GS115-PhyC y $41 \pm 0.81 \mu\text{g/mL}$ (n=3), para la cepa GS115-FTE.

Existen varios reportes donde se menciona que *Pichia pastoris* es ampliamente empleada para la producción de proteínas recombinantes, secretando pocas proteínas nativas (Esposito *et al.*, 2005). En virtud de que las cepas de *Pichia pastoris* secretan pocas proteínas endógenas podríamos asumir que la concentración de proteínas totales en el medio de cultivo tiene relación con la concentración de la proteínas heterólogas. Tomando esto en consideración la cepa GS115-PhyC presentó una mayor producción y secreción de la proteína recombinante.

6.1.2.3. Determinación de la actividad enzimática de fitasa

La actividad de fitasa en los sobrenadantes de los cultivos de *Pichia pastoris* inducidos 48 h mostraron niveles de 0.39 ± 0.04 U/mL (n=3) con una actividad específica de 5.55 ± 0.65 U/mg proteína (n=3) para la cepa GS115-PhyC y niveles 0.092 ± 0.008 U/mL (n=3) con una actividad específica de 2.26 ± 0.21 U/mg proteínas (n=3) para la cepa GS115-FTE.

El medio BMM que es empleado normalmente para la expresión de un gen heterólogo en *Pichia pastoris* presenta una concentración de 100 mM de fosfatos. Como ya se mencionó dicha concentración es inhibitoria para la actividad enzimática de la fitasa según lo reportado por Kim en 1998 (Kim *et al.*, 1998a), por lo cual se buscó disminuir la concentración de fosfato en la mezcla de reacción para la actividad enzimática diluyendo las muestras 1:5.

Los niveles de actividad enzimática presentes en los sobrenadante crudos de los cultivos de *Pichia pastoris* fueron suficientes para realizar las preparaciones semipurificadas de PhyC-R y FTE empleadas en la caracterización bioquímica.

6.2. Obtención de preparaciones semipurificadas de la Fitasa C de *Bacillus subtilis*

La preparación semipurificada de la Fitasa C nativa (PhyC-N) se realizó a partir de una precipitación selectiva con un solvente orgánico (etanol desnaturalizado frío), obteniendo 5 g de polvo seco con apariencia fina y de color crema claro.

Durante la evaluación de la preparación semipurificada de PhyC-N, se prepararon suspensiones de PhyC-N a una concentración de 40 mg/mL, mostrando valores de 46 ± 2 FTU (n=3) con una actividad específica de 1.36 ± 0.07 U/mg proteína (n=3).

Los resultados de la purificación de la Fitasa C se presentan en la tabla XVIII. La actividad específica presente en el sobrenadante directo libre de células fue de 1.2 U/mg de proteínas mientras que en el sobrenadante semipurificado fue de 1.36 U/mg de proteínas. Con la purificación por precipitación con etanol solo se logró un incremento de un 13% en su actividad específica. Otros estudios (Kerovuo 1998) reportaron una mayor actividad específica empleando el mismo proceso (de 8 U/mg proteínas del sobrenadante directo a 15 U/mg de proteínas del sobrenadante semipurificado).

Tabla XVIII. Purificación de la Fitasa C de *Bacillus subtilis* VTT E-6803 (PhyC-N)

Muestra	Cantidad	Proteínas	Proteínas Totales mg	Actividad	U totales	Actividad específica U/mg proteína
Sobrenadante	3000 mL	280 µg/mL	840	0.42 U/mL	1230	1.20
Preparación semipurificado	5 g	35 mg/g	185	46 U/g	246	1.36
Recuperación			22%		20%	

El porcentaje de recuperación de proteínas totales fue del 22% mientras que el porcentaje de recuperación de unidades (U) totales fue del 20%.

6.3. Obtención de las preparaciones semipurificadas de la Fitasa C recombinante y de la Fitasa C modificada recombinante producidas en *Pichia pastoris*

Las preparaciones semipurificadas de la PhyC-R y de la FTE se realizaron a partir de una ultrafiltración y concentración de un volumen de 120 mL.

Las preparaciones semipurificadas de PhyC-R y FTE, presentaron niveles de 2.78 ± 0.43 U/mL, con una actividad específica de 6.68 ± 1.43 U/mg proteína (n=3) para PhyC-R y niveles de 0.633 ± 0.001 U/mL (n=3), con una actividad específica de 3.30 ± 0.01 U/mg proteína (n=3) para la FTE.

Los resultados de la purificación de la PhyC-R y de la FTE se muestran en las tablas XIX y XX, respectivamente. La actividad específica de la PhyC-R del sobrenadante directo fue de 5.55 U/mg proteínas (n=3) mientras que en el sobrenadante semipurificado fue de 6.68 U/mg proteína (n=3), con el proceso de ultrafiltración se logró incrementar una unidad en la actividad específica para la PhyC-R, además con este proceso se logró la eliminación total del fosfato presente en el cultivo.

Tabla XIX. Purificación de la Fitasa C recombinante (PhyC-R)

PhyC-R	Cantidad (mL)	Proteínas (µg/mL)	Proteínas totales (mg)	Actividad (U/mL)	U totales	Actividad específica (U/mg)
Sobrenadante	108	71	7670	0.39	42.1	5.55
Sobrenadantes semipurificados	6	417	2500	2.78	16.7	6.68
Recuperación			33%		40%	

Tabla XX. Purificación de la Fitasa C modificada recombinante (FTE)

FTE	Cantidad (mL)	Proteínas (µg/mL)	Proteínas totales (mg)	Actividad (U/mL)	U totales	Actividad específica (U/mg)
Sobrenadante	114	41	4694.5	0.092	10.5	2.26
Preparación semipurificada	6	192	1152.8	0.62	3.8	3.30
Recuperación			25%		36%	

Para el caso de la FTE el resultado del proceso de purificación fue similar a la PhyC-R, en donde la actividad específica del sobrenadante directo fue de 2.26 U/mg proteínas mientras que en el sobrenadante semipurificado fue de 3.30 U/mg proteína. El porcentaje de recuperación de proteínas y unidades totales fue de 25 y 36% respectivamente.

Con los estudios de purificación se puede concluir que con el proceso de ultrafiltración y concentración se logró aumentar la actividad específica en una unidad para ambas enzimas, sin embargo la PhyC-R presentó niveles más altos tanto de actividad como de actividad específica en comparación con la FTE.

6.4. Obtención de preparaciones de dos Fitassas comerciales: Natuphos y Allzyme SSF

Las preparaciones de las fitassas comerciales Natuphos y Allzyme SSF, se realizaron a partir de los granulados de las preparaciones comercializadas por las compañías BASF/DSM (Natuphos) y Alltech (Allzyme SSF).

Las preparaciones de Natuphos y Allzyme SSF, mostraron niveles de 3300 ± 187 FTU, con una actividad específica de 37 ± 5 U/mg proteína (n=3), para la fitasa comercial Natuphos y niveles de 978 ± 49 FTU, con una actividad específica de 13 ± 3 U/mg proteína para la fitasa comercial Allzyme SSF.

6.5. Caracterización bioquímica de las fitasas

6.5.1. Análisis del peso molecular por SDS-PAGE

El análisis del peso molecular de las proteínas en estudio se realizó por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 20. En el carril 1 y 7 se aplicó la preparación del marcador de peso molecular mientras que en el carril 2, se aplicó la muestra PhyC-N, en el carril 3 y 4 se aplicaron las muestras PhyC-R y FTE, respectivamente, finalmente se aplicaron las fitasas comerciales Natuphos y Allzyme SSF, en los carriles 5 y 6 respectivamente.

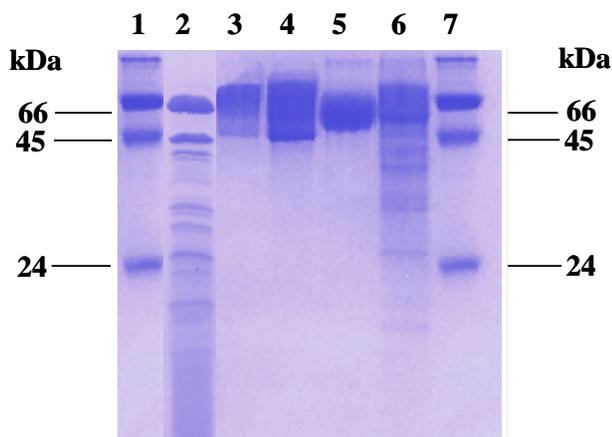


Figura 20. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) del análisis de las preparaciones semipurificadas de las cinco fitasas (PhyC-N, PhyC-R, FTE, Natuphos y Allzyme SSF). Carril 1: Marcador, Carril 2: PhyC-N, Carril 3: PhyC-R, Carril 4: FTE, Carril 5: Natuphos, Carril 6: Allzyme SSF y finalmente el Carril 7: Marcador.

En el carril 2 se observaron dos bandas de ≈ 41 y 44 kDa, no se determinó con exactitud cual de ellas corresponda a la Fitasa C nativa. Kerovuo en 1998 (Kerovuo *et al.*, 1998) reportó para esta misma fitasa una banda de aproximadamente 43 kDa. En el carril 3 se observó una banda de ≈ 51 kDa adjudicada a la PhyC-R. La diferencia en el tamaño molecular de la PhyC-R con respecto al tamaño de la PhyC-N probablemente sea debido a la glicosilación de la PhyC-R producida por el sistema de *Pichia pastoris*. En el carril 4 se observó una banda de ≈ 54 kDa adjudicada a la FTE y finalmente en los carriles 5 y 6 se observaron las bandas de las dos fitasas comerciales (Natuphos y Allzyme SSF) con un tamaño molecular de ≈ 60 kDa.

6.5.2. Evaluación y comparación de la actividad enzimática a diferentes valores de pH

El efecto del pH en la actividad enzimática se realizó a partir de las preparaciones semipurificadas de las fitasas PhyC-N, PhyC-R y FTE y de las preparaciones de las fitasas comerciales (Natuphos y Allzyme SSF), a cuatro valores de pH: 2.5, 5.5, 7.5 y 9. Estos ensayos se realizaron por triplicado, para cada preparación enzimática se usó la misma cantidad de enzima (0.02 U/mL).

En la figura 21 se presenta el efecto de los diferentes valores de pH en la actividad de fitasa a 37°C y 1 mM de CaCl₂, la actividad enzimática se expresó en porcentaje respecto al valor de actividad más alto de cada fitasa. Un punto representa la media de al menos tres determinaciones, presentando un coeficiente de variación menor de 5% (C.V. < 5%).

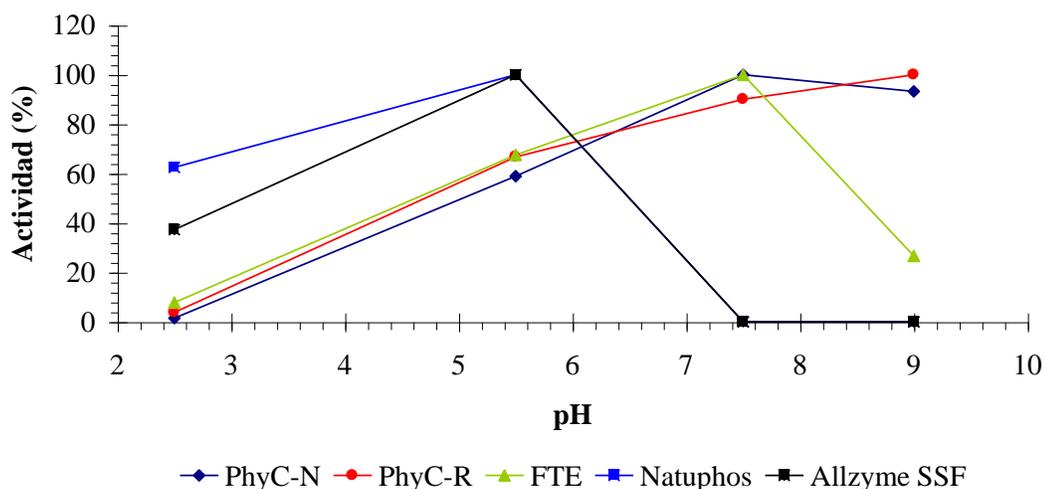


Figura 21. Efecto de pH en la actividad de fitasa a 37°C y 1 mM de CaCl₂, actividad en porcentaje respecto al valor más alto de cada fitasa. Un punto representa la media de al menos tres determinaciones (C.V. < 5%).

Las fitasas de origen fúngico (Natuphos y Allzyme SSF) presentaron el valor más alto de actividad a pH 5.5 mientras que las fitasas de origen bacteriano presentan el valor más alto de actividad a pH básico. Para el caso de la PhyC-N y FTE el valor de pH óptimo fue de 7.5, y para el caso de PhyC-R se realizó una comparación para los valores

más altos de actividad a los valores de pH 7.5 y 9 mediante una prueba de t-Student, encontrando que la actividad enzimática presenta un aumento significativo ($p < 0.05$) a pH 9. Con lo anterior se puede concluir que la PhyC-R presentó el valor más alto de actividad fítica a pH 9.

Las fitasas comerciales fueron activas solo a pH ácidos, mientras que las fitasas PhyC-N, PhyC-R y FTE presentaron actividad a pH ácidos y básicos. Esta cualidad las pone en ventaja sobre las fitasas comerciales ya que las fitasas de origen bacteriano mostraron un rango de pH más amplio en el cual presentan actividad.

Las fitasas bacterianas (PhyC-N, PhyC-R y FTE) por ser activas a pH básicos son candidatas para ser empleadas como aditivos en la alimentación del camarón debido a las características fisiológicas del tracto digestivo de esta especie e incluso para el procesamiento de ingredientes-vegetales.

6.5.3. Evaluación y comparación de la actividad enzimática a diferentes temperaturas

El efecto de la temperatura en la actividad enzimática se realizó a partir de las preparaciones semipurificadas de las fitasas PhyC-N, PhyC-R y FTE y de las preparaciones de las fitasas comerciales (Natuphos y Allzyme SSF), a seis valores de temperaturas: 25, 37, 45, 55, 70 y 80°C.

Estos ensayos se realizaron por triplicado, para cada preparación enzimática se usó la misma cantidad de enzima (0.02 U/mL).

En el gráfico de la figura 22 se presentan los resultados del efecto de la temperatura en la actividad de fitasa a 1 mM de CaCl_2 . Las fitasas del género *Bacillus* fueron evaluadas a pH 7.5 y las fitasas del género *Aspergillus* a pH 5.5. La actividad enzimática se expresa en porcentaje respecto al valor de actividad más alto de cada fitasa. Un punto representa la media de al menos tres determinaciones, presentando un coeficiente de variación menor de 5% (C.V. < 5%).

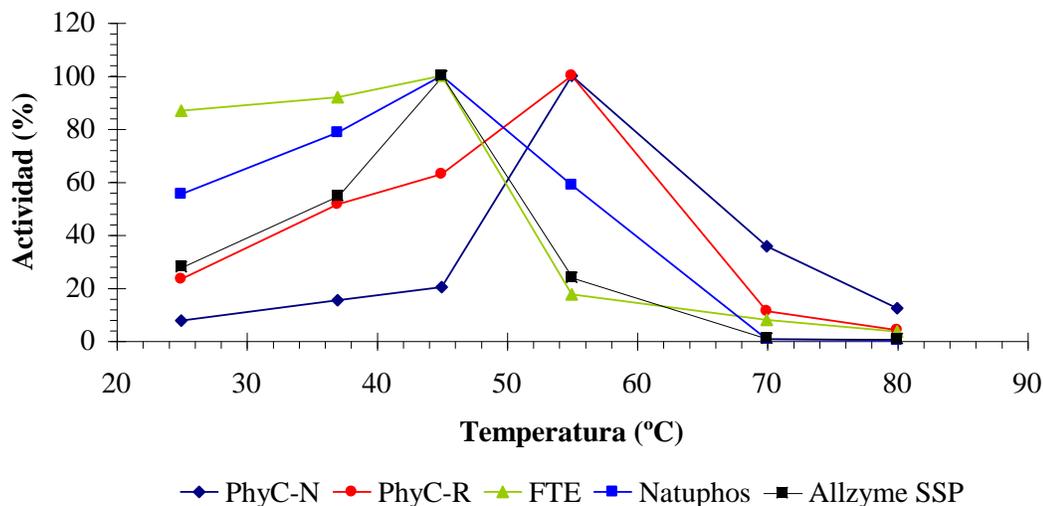


Figura 22. Efecto de la temperatura en la actividad de fitasa a 1 mM de CaCl_2 . Las fitasas bacterianas fueron evaluadas a pH 7.5 y las fitasas fúngicas a pH 5.5. Actividad en porcentaje respecto al valor más alto de cada fitasa. Un punto representa la media de al menos tres determinaciones (C.V. < 5%).

En los resultados del efecto de la temperatura se puede mencionar que las fitasas en estudio se dividen en dos grupos: las que presentaron mayor actividad a 45°C, entre las cuales están la FTE y las dos fitasas comerciales, y las que presentaron mayor actividad a 55°C, entre las cuales están PhyC-N y PhyC-R.

La fitasa PhyC-R presentó mayor actividad a temperaturas bajas que la PhyC-N, esta diferencia se presenta probablemente debido a las glicosilaciones producidas por *Pichia pastoris* en PhyC-R.

Para determinar la temperatura óptima de la FTE, se realizó una prueba de ANOVA comparando la actividad a las diferentes temperaturas, encontrando que la actividad a las temperaturas 25 y 37°C no presentaron diferencias significativa ($p < 0.05$), mientras que al aumentar la temperatura a 45°C se encontró un aumento significativo ($p < 0.05$) en su actividad. A diferencia de las otras cuatro fitasas, la FTE presentó mayor actividad relativa en un intervalo de temperatura de 25 a 45°C (80 a 100%), esta cualidad la favorece en el proceso industrial a temperatura ambiente.

Las actividades de las fitasas comerciales (Natuphos y Allzyme SSF) y la FTE se ven afectadas al aumentar la temperatura a 55°C, desactivándose casi por completo, mientras que la PhyC-N y PhyC-R su actividad disminuye a valores entre 40 y un 20% de su actividad relativa a 70°C.

Las fitasas del género *bacillus* presentan actividad tanto en temperaturas bajas como altas, condición que pone en desventaja a las fitasas comerciales.

6.5.4. Evaluación y comparación de la estabilidad a 37°C

El efecto de la estabilidad se realizó a partir de las preparaciones semipurificadas de las fitasas PhyC-N, PhyC-R y FTE y de las preparaciones de las fitasas comerciales (Natuphos y Allzyme SSF) a 37°C y 1 mM CaCl₂. Estos ensayos se realizaron por triplicado, para cada preparación enzimática se usó la misma cantidad de enzima (0.8 U/mL) en cada caso.

En el gráfico de la figura 23 se presentan los resultados de estabilidad de las cinco fitasa a 37°C y 1 mM CaCl₂. Las fitasas del género *Bacillus* fueron evaluadas a pH 7.5 y las fitasas de *Aspergillus* a pH 5.5. La actividad enzimática se expresó en porcentaje respecto al valor de actividad inicial de cada fitasa. Un punto representa la media de al menos tres determinaciones, presentando un coeficiente de variación menor de 5% (C.V. < 5%).

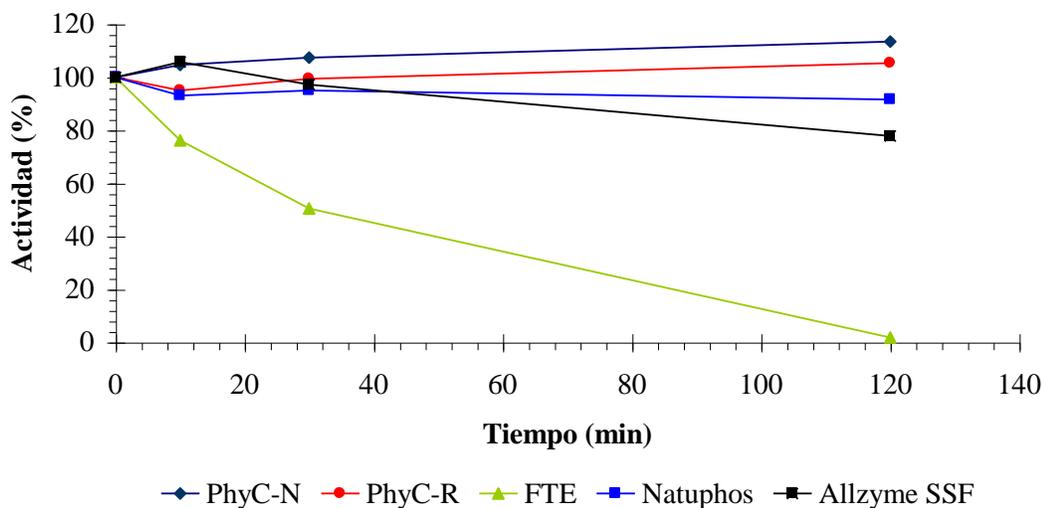


Figura 23. Estabilidad de las cinco fitasa a 37°C y 1 mM CaCl₂. Las fitasas bacterianas fueron evaluadas a pH 7.5 y las fitasas fúngicas a pH 5.5. Actividad en porcentaje respecto al valor inicial de cada fitasa. Un punto representa la media de al menos tres determinaciones (C.V. < 5%).

La PhyC-N, PhyC-R y las dos fitasas comerciales presentaron un 100% de su actividad fítica después de incubar a 37°C y 1 mM CaCl₂ durante 120 min, mientras que

bajo las mismas condiciones la FTE perdió su actividad gradualmente después de incubar 10 y 30 min, perdiéndola totalmente después de incubar 120 min. Durante este trabajo se concluyó que la PhyC-N, PhyC-R y las fitasas comerciales son estables a 37°C y 1 mM de CaCl₂ durante 120 min, mientras la FTE bajo las mismas condiciones no es estable. El uso de iones calcio favorece la actividad enzimática de las fitasas bacterianas (Powar and Jagannathan 1982). En investigaciones previas se reportó que las fitasas del género *Bacillus* son estables en presencia de concentraciones elevadas de calcio después de un tratamiento térmico (Kerovuo *et al.*, 2000b). A concentraciones más altas de calcio en la reacción es probable que mejore la estabilidad de FTE a esta temperatura durante 120 min.

6.5.5. Evaluación y comparación de termoestabilidad a 37, 60 y 80°C

Para evaluar la termoestabilidad de las cinco fitasas, las preparaciones enzimáticas (ver apartado 5.6, 5.7 y 5.8) se sometieron a un tratamiento térmico a tres diferentes temperaturas, fijando el valor de pH a 5.5 ó 7.5 y la concentración de calcio a 1 mM ó 5 mM. Después del tratamiento térmico de 10 min, se determinó la actividad enzimática a los mismos valores de pH y a 1 mM CaCl₂.

Los resultados obtenidos de la evaluación de la termoestabilidad se presentan en las gráficas de la figuras 24 para 37°C, 25 para 60°C y 26 para 80°C. En cada una de las gráficas, la actividad enzimática se expresó en actividad residual, ésta se determinó en porcentaje respecto al valor de actividad enzimática inicial tal como se describe en la sección 5.4.2.

En cada una de las representaciones gráficas se compara la actividad residual de las cinco fitasas a igualdad de condiciones (concentración de calcio y pH) representada en los cuatro diferentes bloques de cada gráfica.

En una segunda comparación se evaluó el efecto de la concentración de calcio a igualdad de pH y temperatura para cada una de las fitasas y en una tercera comparación se evaluó el efecto del pH en la actividad residual para cada fitasa a igualdad de concentración de calcio y temperatura.

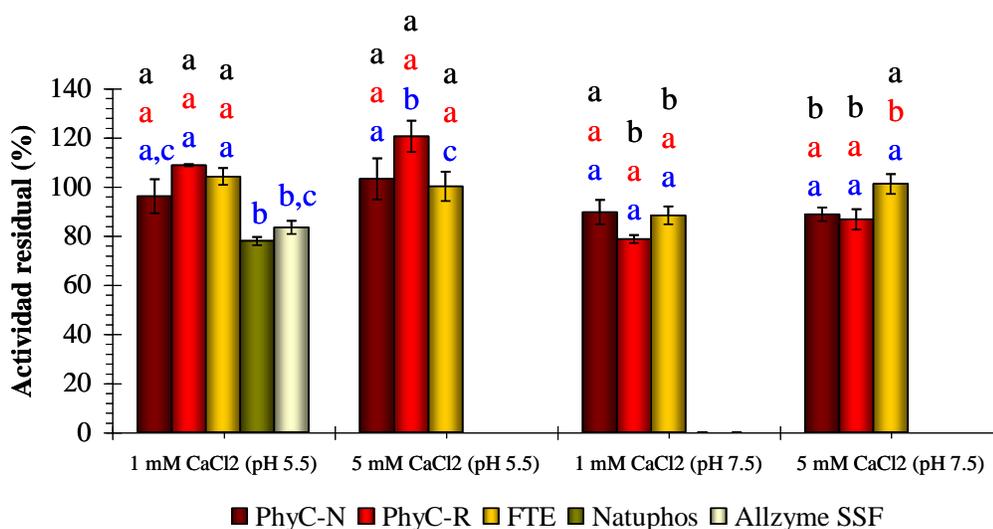


Figura 24. Comparación de la actividad residual a 37°C y 10 min de las cinco fitasas a diferentes condiciones experimentales. Actividad residual determinada en porcentaje respecto al valor de actividad inicial. Literales azules diferentes indican diferencias significativas entre la actividad residual de las fitasas a igualdad de condiciones experimentales ($p < 0.05$). Literales rojas diferentes indican diferencias significativas entre la actividad residual de una determinada fitasa a un valor de pH determinado en presencia de dos concentraciones de Ca²⁺ diferentes ($p < 0.05$). Literales negras diferentes indican diferencias significativas entre la actividad residual de una determinada fitasa a un valor determinado de concentración de Ca²⁺ y a dos valores diferentes de pH ($p < 0.05$).

En el gráfico de la figura 24 se presentan los resultados de la termoestabilidad a 37°C, en la comparación efectuada para el ensayo con 1 mM de CaCl₂ y pH 5.5, las actividades residuales para todas las fitasas oscilaron en valores de 78 a 109%, siendo iguales entre si las fitasas bacterianas ($p > 0.05$, literales azules (a)), y diferentes a las dos enzimas comerciales ($p < 0.05$), las cuales fueron iguales entre si ($p > 0.05$ literales azules (b)), excepto para la PhyC-N y Allzyme SSF quienes mostraron actividades residuales estadísticamente iguales entre si ($p > 0.05$, literales azules (c)), además de presentar igualdad con sus respectivos grupos ($p > 0.05$). A 5 mM de CaCl₂ y pH 5.5, la PhyC-R presentó la actividad residual mas alta (120%), seguida por la PhyC-N (103%) y por la FTE con una actividad residual de 100% ($p > 0.05$, literales azules (a,b,c)). La actividad fítica de las fitasas del género *Aspergillus* no se determinó a estas condiciones.

A 1 mM de CaCl₂ y pH 7.5, los valores de actividad residual de la PhyC-N, PhyC-R y la FTE no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$, literales azules (a)) entre éstas y retuvieron más del 79% de actividad. Finalmente para el ensayo a 5 mM de

CaCl₂ y pH 7.5 todas las fitasas del género *Bacillus* no presentaron diferencias significativas ($p>0.05$, literales azules (a)) entre sus actividades residuales y retuvieron más de un 87% de su actividad. La actividad residual de las fitasas del género *Aspergillus* no se determinaron a pH 7.5.

Al evaluar el efecto de la concentración de CaCl₂ en la termoestabilidad a 37°C como se muestra en la gráfica de la figura 24, a pH 5.5 la concentración de CaCl₂ no afectó la actividad residual para ninguna de las fitasas bacterianas obteniendo valores de 96 a 120% ($p>0.05$, literales rojas (a)).

A pH 7.5 la concentración de calcio solamente afectó a la FTE con valores que variaron de 88 a 101% en su actividad residual ($p>0.05$, literales rojas (a, b)).

Al evaluar el efecto del pH en la termoestabilidad a 37°C (figura 24) a 1 mM de CaCl₂ la actividad residual para la PhyC-N fue de 96% a un valor de pH 5.5 y 88% a un valor de pH 7.5 (literales negras (a)). Para el caso de PhyC-R y FTE se obtuvo mayor actividad residual a pH 5.5 que a pH 7.5 con valores de 109 y 79% para la PhyC-R y de 104 a 88% para la FTE ($p<0.05$ literales negras (a, b)). A 5 mM de CaCl₂ la mayor actividad residual fue obtenida a pH 5.5 para la PhyC-N y PhyC-R obteniendo valores de 103 y 120% respectivamente (literales negras (a, b)), mientras que la FTE conserva el 100% de actividad residual en ambos valores de pH (literales negras (a)), estos resultados se muestran en la gráfica de la figura 24.

En general las cinco fitasas fueron estables a 37°C con valores de actividad residual próximos al 100% (78 a 120%), siendo más estables las fitasas del género *Bacillus*. La mejor estabilidad a 37°C la presentó la PhyC-R a pH 5.5 a 1 y 5 mM de CaCl₂

En el gráfico de la figura 25 se presentan los resultados de la termoestabilidad a 60°C. En la comparación efectuada para el ensayo con 1 mM de CaCl₂ y pH 5.5, las cinco fitasas se dividieron en dos grupos, el formado por la PhyC-N, FTE y Natuphos que presentaron actividades residuales iguales entre sí y (56 a 67%, literales azules (a)) que el grupo formado por la PhyC-R y Allzyme SSF con una actividad residual de 5 y 18% ($p<0.05$ literales azules (b)). A 5 mM de CaCl₂ y pH 5.5, todas las fitasas del género *Bacillus* no presentaron diferencias significativas ($p>0.05$ literales azules (a)) en

sus valores de actividad residual y reteniendo más del 90% de actividad. La actividad fítica de las fitasas del género *Aspergillus* no se determinó a estas condiciones ($p < 0.05$).

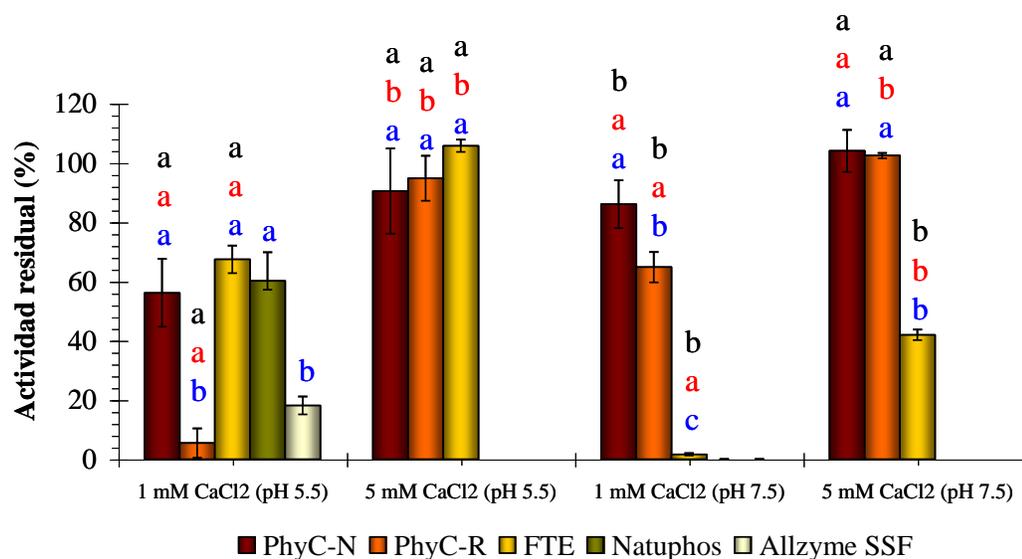


Figura 25. Comparación de la actividad residual a 60°C y 10 min de las cinco fitasas a diferentes condiciones experimentales. Actividad residual determinada en porcentaje respecto al valor de actividad inicial. Literales azules diferentes indican diferencias significativas entre la actividad residual de las fitasas a igualdad de condiciones experimentales ($p < 0.05$). Literales rojas diferentes indican diferencias significativas entre la actividad residual de una determinada fitasa a un valor de pH determinado en presencia de dos concentraciones de Ca^{2+} diferentes ($p < 0.05$). Literales negras diferentes indican diferencias significativas entre la actividad residual de una determinada fitasa a un valor determinado de concentración de Ca^{2+} y a dos valores diferentes de pH ($p < 0.05$).

A 1 mM de CaCl_2 y pH 7.5 (figura 25), la PhyC-N presentó la actividad residual más alta (86%) seguida por la PhyC-R (65%) y por la FTE (2%) ($p < 0.05$, literales azules (a, b, c)). Finalmente para el ensayo a 5 mM de CaCl_2 y pH 7.5, las fitasas PhyC-N y PhyC-R presentaron la actividad residual más alta, obteniendo valores de 102 y 104%, respectivamente (literales azules (a), mientras que la FTE presentó una actividad residual menor con un valor de 42% ($p < 0.05$, literal azul (b)). La actividad fítica de las fitasas del género *Aspergillus* no se determinó a pH 7.5.

Respecto al efecto de la concentración de CaCl_2 en la termoestabilidad a 60°C a pH 5.5 (figura 25) todas las fitasas del género *Bacillus* presentaron una actividad residual más alta a 5 mM de CaCl_2 , obteniendo valores de 90% para PhyC-N, de 95% para PhyC-R y de 106% para la FTE, mientras que a 1 mM de CaCl_2 estos valores fueron de 56, 5 y 67% respectivamente ($p < 0.05$, literales rojas (a, b)). A pH 7.5, la

actividad residual para la PhyC-N no se vio afectada de forma significativa obteniendo valores de 86-104% para las concentraciones 1 y 5 mM de CaCl_2 respectivamente (literales rojas (a)), mientras que para la PhyC-R y FTE presentaron una actividad residual más alta a 5 mM CaCl_2 obteniendo valores de 102% para PhyC-R y de 42% para la FTE, mientras que a 1 mM de CaCl_2 estos valores fueron de 65 y 2%, respectivamente ($p < 0.05$, literales rojas (a, b)).

En la evaluación del efecto del pH en la termoestabilidad a 60°C (figura 25) a 1 mM de CaCl_2 , la PhyC-N y PhyC-R presentaron mayor actividad residual a pH 7.5 (literales negras (a, b)) obteniendo valores de 86% (PhyC-N) y de 65% (PhyC-R). A pH 5.5 estos valores fueron 56 y 5%, respectivamente. Para el caso de la FTE la mayor actividad residual se obtuvo a pH 5.5 que a 7.5 (67 y 2% con una $p < 0.05$, literales negras (a, b)). Las fitasas PhyC-N, PhyC-R y FTE resisten más el choque térmico de 60°C en presencia de 5 mM de CaCl_2 a los dos valores de pH evaluados (5.5 y 7.5).

A 5 mM de CaCl_2 , el valor de pH no afectó la actividad residual para la PhyC-N y PhyC-R (literales negras (a)), con valores de 90 a 104% (PhyC-N) y de 95 a 102% (PhyC-R). Para el caso de la FTE la actividad residual fue más alta a pH 5.5 que a 7.5 (106 y 42% con una $p < 0.05$, literales negras (a, b)) estos resultados se muestran en la gráfica de la figura 25.

En el gráfico de la figura 26 se presentan los resultados de la termoestabilidad a 80°C en la comparación efectuada para el caso del ensayo con 1 mM de CaCl_2 y pH 5.5, la FTE presentó la actividad residual más alta (83%), seguida por la Allzyme SSF (63%), Natuphos (48%), PhyC-N (7%) y por la PhyC-R la cual perdió totalmente su actividad fítica ($p < 0.05$, literales azules (a, b, c, d)). A 5 mM de CaCl_2 y pH 5.5, la PhyC-R y la FTE presentaron actividades residuales sin diferencias significativas 85 y 79% respectivamente (literales azules (b) y mayores que la PhyC-N con un valor de actividad residual del 11% ($p < 0.05$, literal azul (a)). La actividad fítica de las fitasas del género *Aspergillus* no se determinó a estas condiciones ($p < 0.05$).

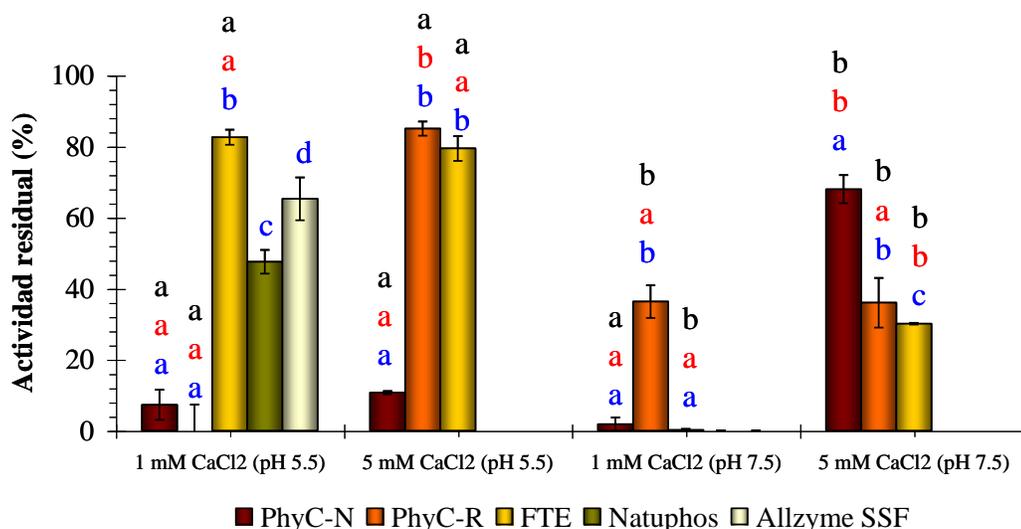


Figura 26. Comparación de la actividad residual a 80°C y 10 min de las cinco fitasas a diferentes condiciones experimentales. Actividad residual determinada en porcentaje respecto al valor de actividad inicial. Literales azules diferentes indican diferencias significativas entre la actividad residual de las fitasas a igualdad de condiciones experimentales ($p < 0.05$). Literales rojas diferentes indican diferencias significativas entre la actividad residual de una determinada fitasa a un valor de pH determinado en presencia de dos concentraciones de Ca^{2+} diferentes ($p < 0.05$). Literales negras diferentes indican diferencias significativas entre la actividad residual de una determinada fitasa a un valor determinado de concentración de Ca^{2+} y a dos valores diferentes de pH ($p < 0.05$).

Para el ensayo con 1 mM de CaCl_2 y pH 7.5 (figura 26) se encontró que la PhyC-R presentó la actividad residual más alta (36%, literal azul (b)) seguido de la PhyC-N (2%) y la FTE la cual perdió totalmente la actividad residual ($p < 0.05$, literales azules (a)). Para el ensayo a 5 mM de CaCl_2 y pH 7.5 la PhyC-N presentó la actividad residual más alta (68%), seguido por la PhyC-R (36%) y la FTE con un valor de actividad del 30% ($p < 0.05$, literal azul (a, b, c)).

En la evaluación del efecto de la concentración de CaCl_2 en la termoestabilidad a 80°C (figura 26), a pH 5.5 la concentración de calcio no afectó la actividad residual para la PhyC-N y la FTE obteniendo valores de 7-11% para la PhyC-R (literales rojas (a)) y 83-79% para la FTE (literales rojas (a)) a las concentraciones 1 y 5 mM de CaCl_2 , mientras la PhyC-R conservó su actividad en un 85% a 5 mM de CaCl_2 y la perdió por completo a 1 mM de CaCl_2 ($p < 0.05$, literales rojas (a, b)). A pH 7.5, la concentración de calcio no afectó la actividad residual para la PhyC-R obteniendo valores de 36% para las concentraciones 1 y 5 mM de CaCl_2 (literales rojas (a)), mientras PhyC-N y FTE

presentan una actividad residual más alta a 5 mM de CaCl_2 que a 1 mM de CaCl_2 obteniendo valores de 2 y 68% para la PhyC-N y 0 y 30% para la FTE ($p < 0.05$, literales rojas (a, b)).

En la evaluación del efecto del pH en la termoestabilidad a 80°C (figura 26) a 1 mM de CaCl_2 el valor de pH no afectó la actividad residual para la PhyC-N obteniendo valores de 7 y 12% para pH 5.5 y 7.5, respectivamente (literales negras (a)), para el caso de la PhyC-R se obtuvo la más alta actividad residual a pH 7.5 (0 y 36% con una $p < 0.05$, literales negras (a, b)). Para el caso de la FTE perdió por completo la actividad a pH 7.5 y conservó un 83% de su actividad a pH 5.5 ($p < 0.05$, literales negras (a, b)).

A 5 mM de CaCl_2 , la mayor actividad residual fue a pH 7.5 para la PhyC-N obteniendo valores del 68% mientras que a pH 5.5 este valor fue de 11% (literales negras (a, b)). Para el caso de la PhyC-R y la FTE presentaron mayor actividad residual a pH 5.5 obteniendo valores de 85% para la PhyC-R y 79% para la FTE, mientras que a pH 7.5 estos valores fueron de 36 y 30% respectivamente ($p < 0.05$, literales negras a, b)).

Por lo tanto a 80°C la PhyC-R como la FTE mostraron la mayor termoestabilidad a 5 mM de CaCl_2 y pH 5.5, es notable que esta estabilidad se pierde en un 49% cuando las condiciones se cambiaron a pH 7.5 (85% a 36%).

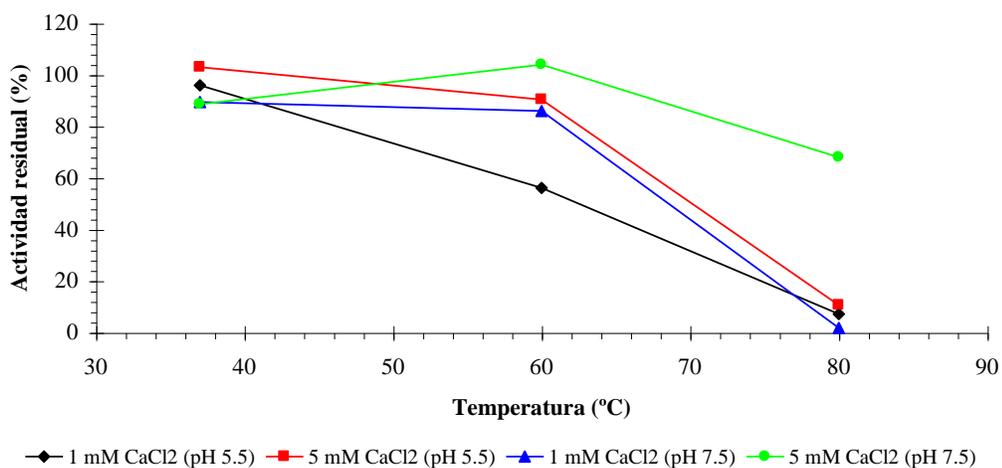


Figura 27. Comportamiento de la PhyC-N en la termoestabilidad a 37, 60 y 80°C durante 10 min, en presencia de 1 y 5 mM de CaCl_2 a pH 5.5 y 7.5.

En el gráfico 27 se muestra el comportamiento de la PhyC-N en los ensayos de termoestabilidad a las tres temperaturas evaluadas, en donde se puede apreciar que a

60°C resistió más el choque térmico a pH 7.5 y en presencia de 1 y 5 mM de CaCl_2 , obteniendo valores de 86 y 104% de actividad residual respectivamente, mientras que a pH 5.5 necesitó la presencia de iones calcio para resistir el choque térmico a 60°C, obteniendo un 90% de actividad residual a 5 mM CaCl_2 . Al aumentar la temperatura a 80°C la PhyC-N se vio favorecida con la presencia de iones calcio a pH 7.5, al presentar bajo estas condiciones el mayor porcentaje de actividad residual (68%).

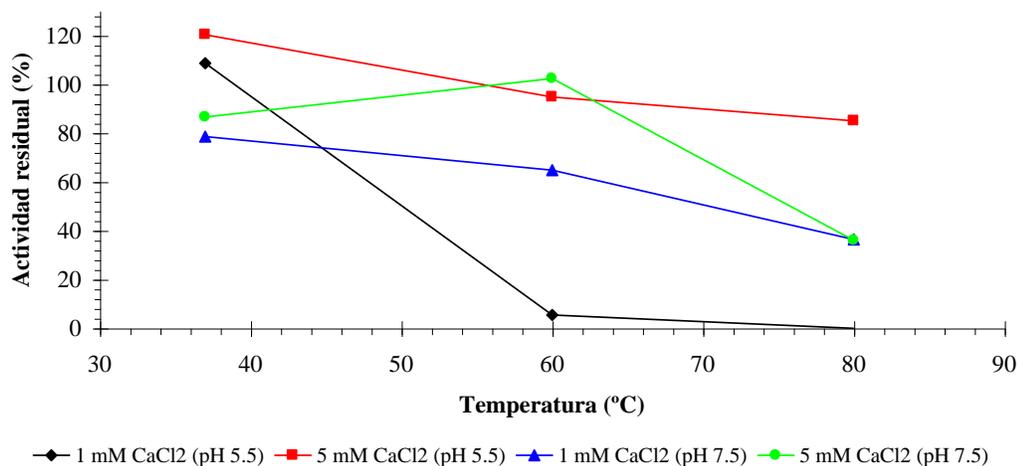


Figura 28. Comportamiento de la PhyC-R en la termoestabilidad a 37, 60 y 80°C durante 10 min en presencia de 1 y 5 mM de CaCl_2 a pH 5.5 y 7.5.

En el gráfico 28 se muestra el comportamiento de la PhyC-R en los ensayos de termoestabilidad, en donde se observó que a 60°C resistió más el choque térmico en presencia de 5 mM de CaCl_2 y pH 7.5 reteniendo un 102% de actividad, mientras que al aumentar la temperatura a 80°C bajo estas mismas condiciones su actividad residual disminuyó a 36%. Sin embargo a pH 5.5 y en presencia de 5 mM de CaCl_2 , la actividad residual se mantuvo con valores altos para ambas temperaturas, obteniendo valores de 95% (60°C) y 85% (80°C).

En el gráfico 29 se muestra el comportamiento de la FTE en los ensayos de termoestabilidad, en donde se puede apreciar que a 60°C resistió más el choque térmico a pH 5.5 y en presencia de 5 mM de CaCl_2 reteniendo un 106% de actividad, mientras que al disminuir la concentración de calcio su actividad residual se vio afectada con un 67%. Sin embargo al aumentar la temperatura a 80°C la FTE resistió más el tratamiento térmico a pH 5.5, sin importar la concentración de calcio, obteniendo los valores más

altos de actividad residual de 84 y 79% para las concentraciones 1 y 5 mM de CaCl_2 , respectivamente, en donde sorprendentemente la actividad residual obtenida a 60°C aumentó de un 67 a 84% al ser sometida a 80°C.

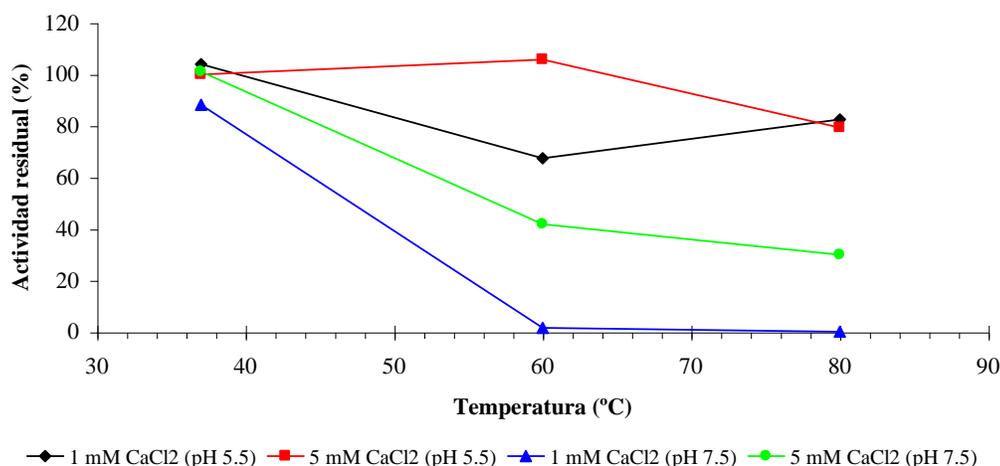


Figura 29. Comportamiento de la FTE en la termoestabilidad a 37, 60 y 80°C durante 10 min, en presencia de 1 y 5 mM de CaCl_2 a pH 5.5 y 7.5.

En el gráfico 30 se muestra el comportamiento de la Natuphos y Allzyme SSF en los ensayos de termoestabilidad a 1 mM de CaCl_2 a pH 5.5, en donde se puede apreciar claramente que la Natuphos disminuye su actividad conforme la temperatura fue aumentando en el ensayo, obteniendo una actividad residual de 60% a 60°C y de 48% a 80°C, para el caso de la Allzyme SSF se puede observar que a 60°C que su actividad residual bajó a un 18%, mientras que al someterse a 80°C sorprendentemente su actividad se recuperó a 65%.

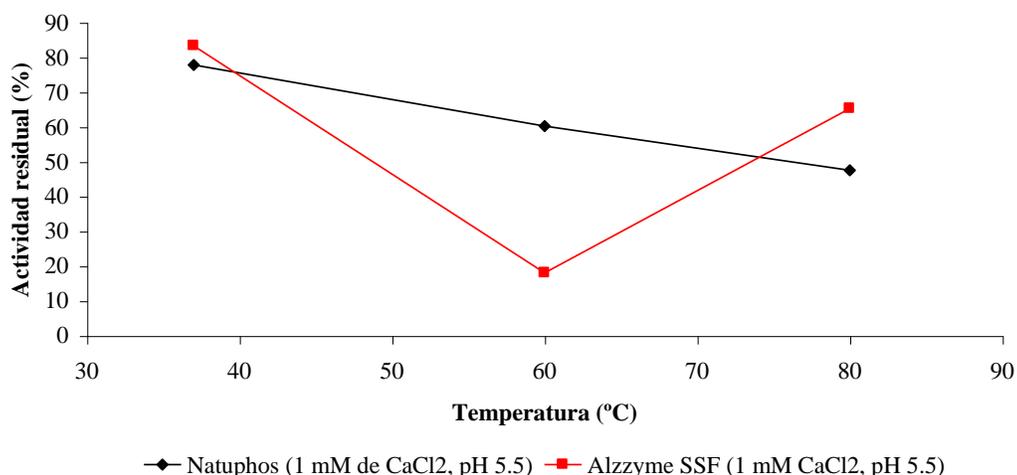


Figura 30. Comportamiento de las fitasas comerciales (Natuphos y Allzyme SSF) en la termoestabilidad a 37, 60 y 80°C durante 10 min, en presencia de 1 mM de CaCl₂ y pH 5.5.

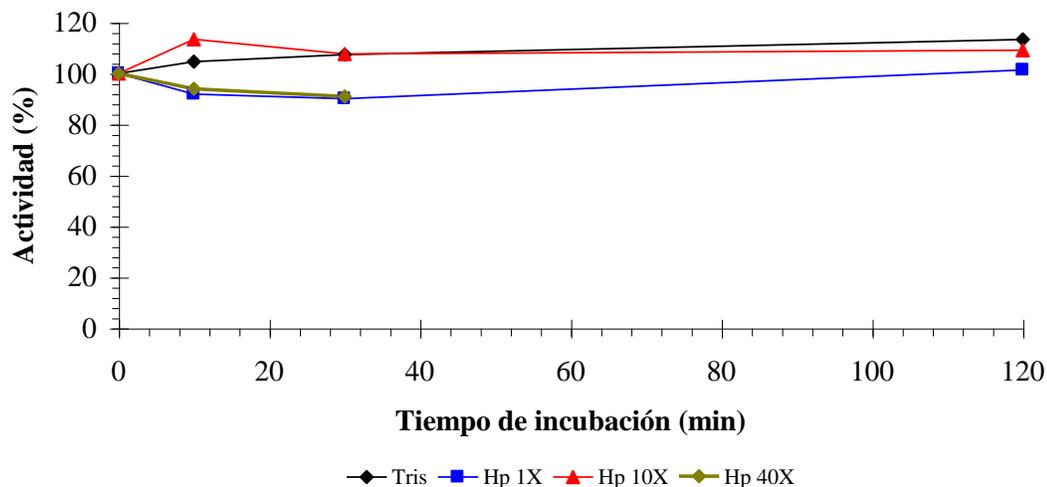
6.5.6. Evaluación y comparación de la estabilidad a la proteólisis por las enzimas digestivas de camarón (*Litopenaeus vannamei*)

La evaluación de la estabilidad a las enzimas digestivas de camarón se realizó a partir de preparaciones semipurificadas de las fitasas del género *Bacillus*, (PhyC-N (0.79 U/mL), PhyC-R (0.15 U/mL) y FTE (0.14 U/mL)) y del género *Aspergillus* (Natuphos (1.18 U/mL) y Allzyme SSF (0.95)), utilizando tres preparaciones de hepatopáncreas con diferente actividad de tripsina: 1X (con 0.18 U/mL BAPNA y 64 µg proteína/mL), 10 X (con 1.8 U/mL BAPNA y 640 µg proteína/mL) y 40X (con 6.7 U/mL BAPNA).

En las gráficas de las figuras 31 a 37 se presentan los resultados obtenidos de la susceptibilidad a enzimas digestivas de camarón.

En las gráficas 31 a 35 la actividad enzimática se expresa en porcentaje de actividad (%). Este valor fue obtenido de acuerdo a la fórmula descrita en la sección 5.9.6. que corresponde al valor de la actividad residual aparente de la muestra (ARAM).

En estas representaciones gráficas se presenta el comportamiento de una determinada fitasa a la susceptibilidad de tres concentraciones de enzimas digestivas de camarón y de un control sin enzimas digestivas de camarón (Tris) hasta 120 min.



Fig

Figura 31. Comportamiento de susceptibilidad a enzimas digestivas de camarón de la PhyC-N, en presencia de 1 mM de CaCl_2 y pH 7.5.

En el gráfico 31 se muestra el comportamiento de la PhyC-N bajo el tratamiento con tres concentraciones de enzimas digestivas de camarón y el control (Tris) durante 120 min, en donde se puede apreciar que todos los valores de actividad obtenidos fueron cercanos al 100%.

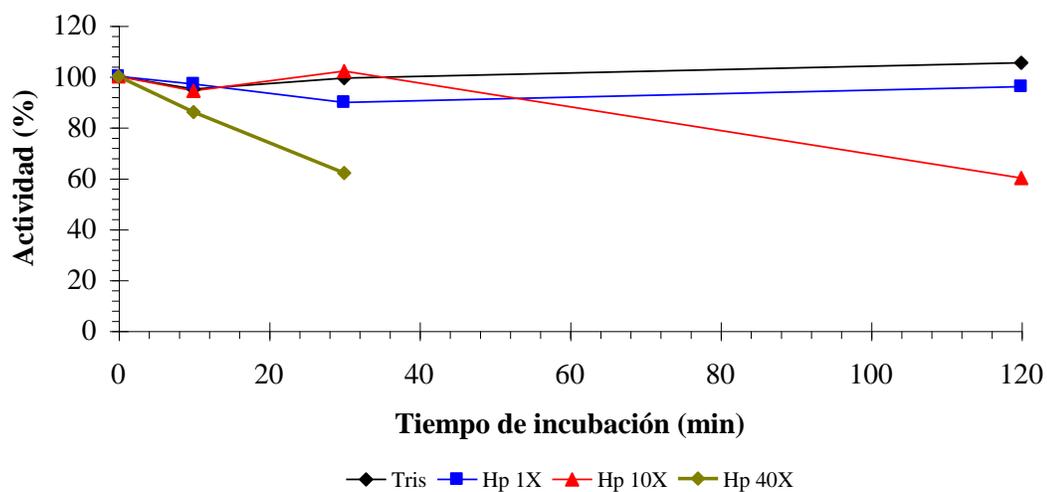


Figura 32. Comportamiento de susceptibilidad a enzimas digestivas de camarón de la PhyC-R, en presencia de 1 mM de CaCl_2 y pH 7.5.

En el gráfico 32 se muestra el comportamiento de la PhyC-R bajo el tratamiento con tres concentraciones de enzimas digestivas de camarón y el control (Tris) durante 120 min, en donde se puede apreciar que el control mantuvo su actividad de un 90-105%

de actividad durante los tiempos evaluados, a 1X se mantuvo la actividad en valores cercanos al 100% (90-97) hasta los 120 min, a 10X presentó una actividad de 60% después de incubar 120 min, a 40X presentó una actividad de 86 y 62% después de incubar 10 y 30 min respectivamente. La PhyC-R no se evaluó a 120 min de incubación con la preparación 40X de hepatopáncreas de camarón.

En el gráfico 33 se muestra el comportamiento de la FTE bajo el tratamiento con tres concentraciones de enzimas digestivas de camarón y el control (Tris) durante 120 min, en donde se puede apreciar que tanto el control como el ensayo con hepatopáncreas 1X presentaron un comportamiento muy similar en cuanto a su actividad durante los diferentes tiempos de incubación, disminuyendo la actividad hasta que se perdió por completo a los 120 min. A 10X presentó una actividad de 51 y 14% después de incubar 10 y 30 min respectivamente, mientras que a 120 min perdió por completo su actividad. La FTE a 40X perdió por completo su actividad en los diferentes tiempos de incubación. La FTE no se evaluó a 120 min de incubación con la preparación 40X de hepatopáncreas de camarón

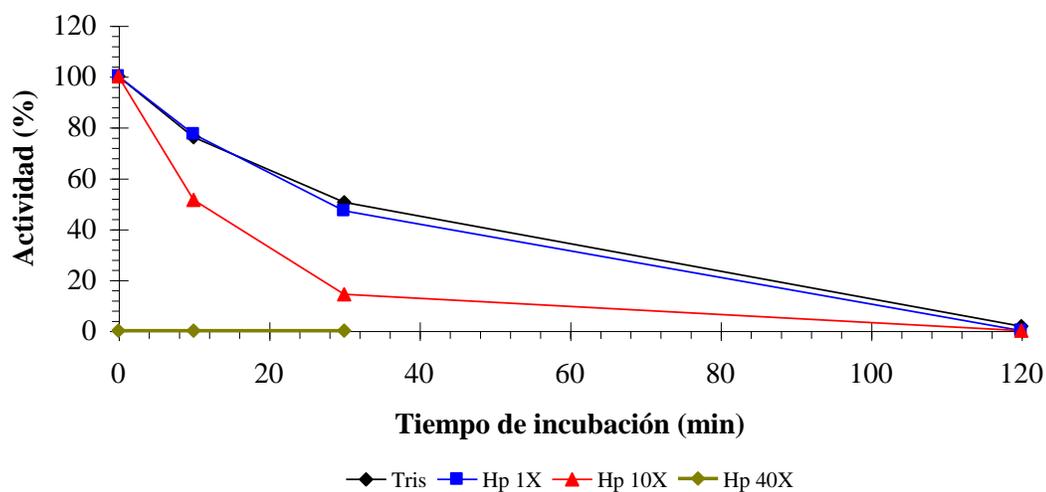


Figura 33. Comportamiento de susceptibilidad a enzimas digestivas de camarón de la FTE, en presencia de 1 mM de CaCl_2 y pH 7.5.

En el gráfico 34 se muestra el comportamiento de la Natuphos bajo el tratamiento con tres concentraciones de enzimas digestivas de camarón y el control (Tris) durante 120 min, en donde se puede apreciar que el control conservó su actividad a valores

cercanos al 100% (92-100%) de actividad a lo largo del tiempo, a concentraciones de hepatopáncreas 1 y 10X presentó un comportamiento muy similar en cuanto a su actividad, disminuyendo conforme pasó el tiempo, presentando a los 120 min una actividad de 46 y 39% para 1 y 10X respectivamente, mientras que a 40X presentó sorprendente un aumento en su actividad de 122% a los 10 min de incubación.

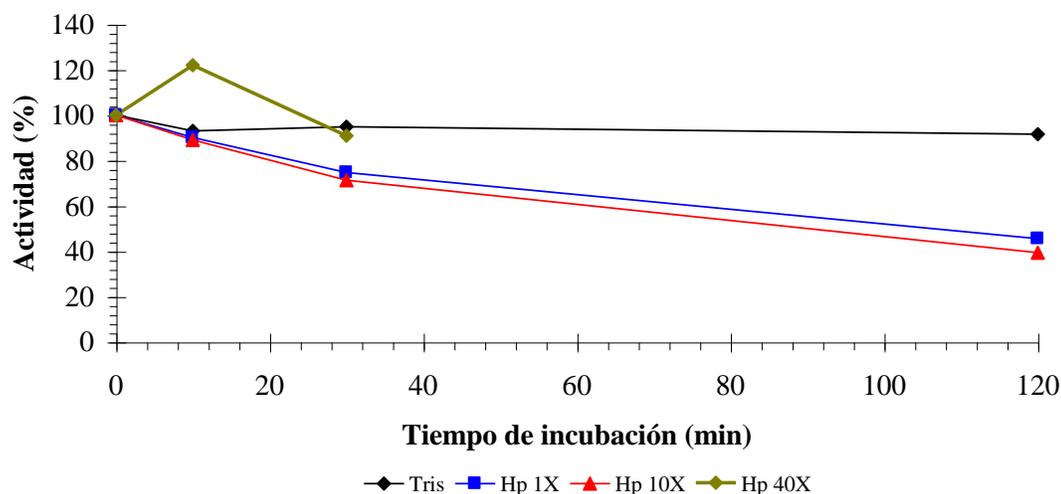


Figura 34. Comportamiento de susceptibilidad a enzimas digestivas de camarón de la Natuphos, en presencia de 1 mM de CaCl_2 y pH 7.5.

Al aumentar el tiempo de incubación a 30 min su actividad disminuyó a 91%. La Natuphos a 40X de hepatopáncreas no se evaluó a los 120 min de incubación.

En el gráfico 35 se muestra el comportamiento de la Allzyme SSF bajo el tratamiento con tres concentraciones de enzimas digestivas de camarón y el control (Tris) durante 120 min, en donde se puede apreciar que la actividad se conservó en valores cercanos al 100% (92-100%) de actividad a lo largo del tiempo, a excepción del tiempo de incubación de 10 min, en donde se presentó un aumento sorprendente en su actividad de 106 y 108% en los ensayos con 10 y 40X de hepatopáncreas respectivamente. A 30 min se presentó un comportamiento similar aumentando su actividad de 110 y 117% para 1 y 40X de hepatopáncreas, respectivamente. A 120 min de incubación presentan una actividad de 81 y 78% para 1 y 10X de hepatopáncreas, respectivamente. La Allzyme SSF a 40X de hepatopáncreas no se evaluó a los 120 min de incubación.

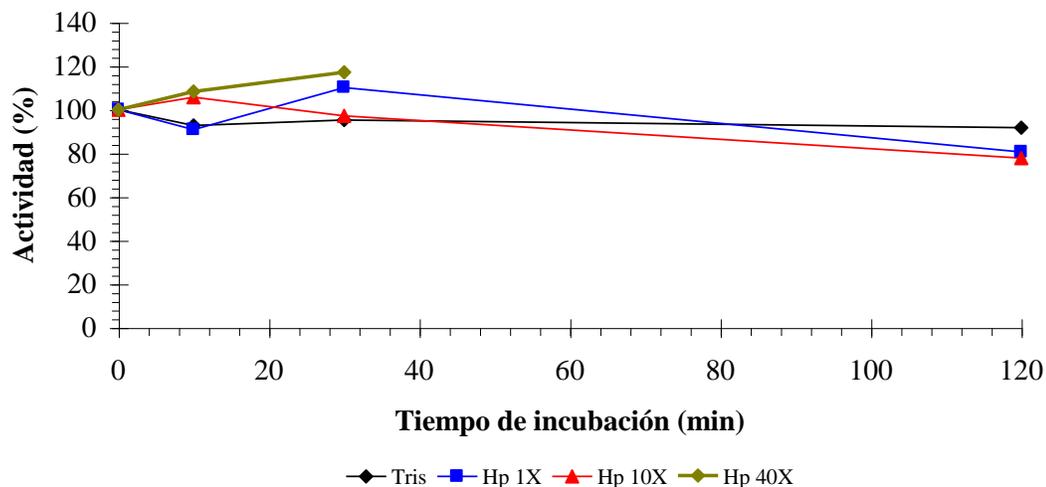


Figura 35. Comportamiento de susceptibilidad a enzimas digestivas de camarón de la Allzyme SSF, en presencia de 1 mM de CaCl_2 y pH 7.5.

En las gráficas de la figuras 36 y 37, la actividad enzimática se expresa en actividad residual, ésta se determinó en porcentaje respecto al valor de actividad enzimática inicial antes del tratamiento tal como se describe en la sección 5.9.6. En estas representaciones gráficas se compara la actividad residual de cada fitasa a tres concentraciones de hepatopáncreas y la actividad residual de las cinco fitasas a una determinada concentración de hepatopáncreas. Esta comparación solamente se realizó a los 30 (figura 36) y 120 min (figura 37) de tratamiento con las enzimas digestivas de camarón.

La PhyC-N (figura 36) presentó una actividad residual de 84, 100 y 94% para las preparaciones de hepatopáncreas 1, 10 y 40X respectivamente (literales negras (a, b)), mostrando sorprendentemente que al aumentar la concentración de hepatopáncreas de 1 a 10X su actividad residual se incrementó de un 84 a 100%, este suceso podría ser causado por una activación de la fitasa durante el proceso proteolítico.

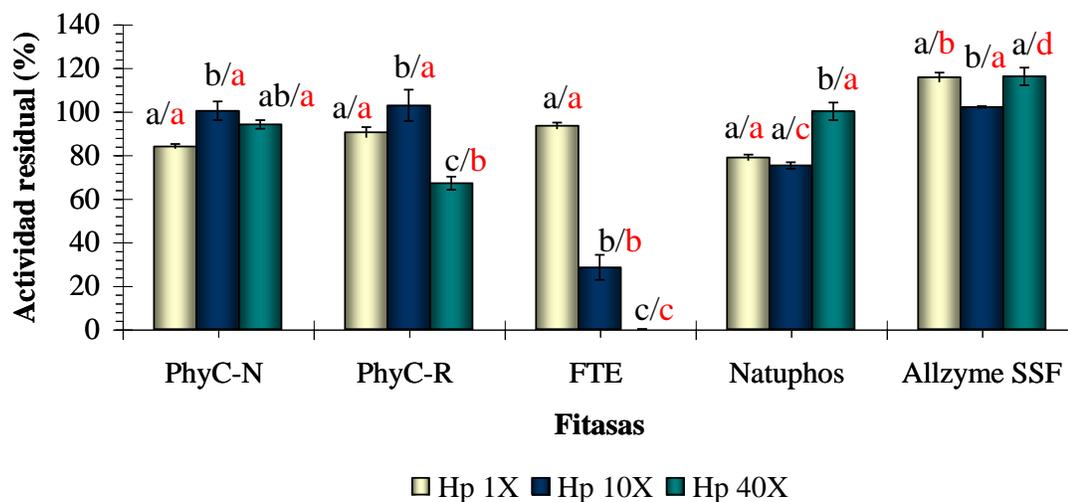


Figura 36. Susceptibilidad a enzimas digestivas de camarón de las cinco fitasas durante 30 min. Actividad residual determinada en porcentaje respecto al valor de actividad inicial. Literales negras diferentes indican diferencias significativas entre la actividad residual de una determinada fitasa a tres diferentes concentraciones de hepatopáncreas de camarón ($p < 0.05$). Literales rojas diferentes indican diferencias significativas entre la actividad residual de las fitasas a la misma concentración de hepatopáncreas ($p < 0.05$). Hp 1X: Hepatopáncreas de camarón con una actividad de tripsina de 0.18 U/mL, Hp 10X y 40X Hepatopáncreas de camarón 10 y 40 veces más concentrado de 1X.

La PhyC-R presentó el mismo comportamiento observado para la PhyC-N, al aumentar la concentración de hepatopáncreas de 1 a 10X su actividad residual se incrementó de un 90 a 103% (literales negras (a, b)). Sin embargo en presencia de la concentración más alta de hepatopáncreas su actividad residual disminuyó a un 67% (literal negra (c)).

La FTE presentó una actividad residual de 93, 28 y 0% para las preparaciones de hepatopáncreas 1X, 10X y 40X respectivamente. La FTE presentó el siguiente comportamiento al ir aumentando la concentración de hepatopáncreas su actividad residual se vio afectada hasta perderla completamente con la preparación de hepatopáncreas 40% (literales negras (a, b, c)).

La Natuphos presentó una actividad residual de 78, 75 y 100% para las preparaciones de hepatopáncreas 1, 10 y 40X respectivamente, al igual que la PhyC-N y PhyC-R al aumentar la concentración de hepatopáncreas su actividad residual se incrementa de 75 a 100% para 10 y 40X, respectivamente (literales negras (a, b)).

La Allzyme SSF presentó una actividad residual de 116, 106 y 116% para las preparaciones de hepatopáncreas 1, 10 y 40X respectivamente, la Allzyme SSF en presencia de las tres concentraciones de hepatopáncreas presentó valores de actividad residual mayores del 100%, sin embargo al aumentar la concentración de hepatopáncreas de 1 a 10X su actividad bajó de un 116 a 106% (literales negras (a, b)) y sorprendentemente al aumentar la concentración a 40X su actividad residual se recupera a 116% (literal negra (a)), este comportamiento es similar al de las fitasas PhyC-N, PhyC-R y Natuphos en donde aumentó la actividad residual al aumentar la concentración de hepatopáncreas. Como ya se mencionó anteriormente este suceso podría ser causado por la activación de la fitasa durante el proceso proteolítico.

Para el ensayo de susceptibilidad con la preparación 1X de hepatopáncreas de camarón, la Allzyme SSF presentó la actividad residual más alta (116%, literal roja (b)) seguida por la PhyC-N, PhyC-R; FTE y Natuphos (84, 90, 93 y 79% respectivamente), cuyas actividades residuales fueron estadísticamente iguales ($p < 0.05$ literales rojas (a)).

Para el ensayo de susceptibilidad con la preparación 10X de hepatopáncreas camarón, la PhyC-N, PhyC-R y Allzyme SSF presentaron la actividad residual más alta (100, 103 y 105% respectivamente) cuyos valores no presentaron diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$, literales rojas (a)), seguida por la Natuphos (75%, literal roja (c)) y por la FTE con un valor de actividad residual de 28% ($p < 0.05$, literal roja (b)).

Para el ensayo con la preparación 40X de hepatopáncreas de camarón, la Allzyme SSF presentó la actividad residual más alta (116%, literales rojas (d)), seguida por la Natuphos y PhyC-N (100 y 94% respectivamente, literales rojas (a)), por la PhyC-R (67%, literales rojas (b)) y por la FTE la cual perdió totalmente su actividad ($p < 0.05$, literal roja (c)).

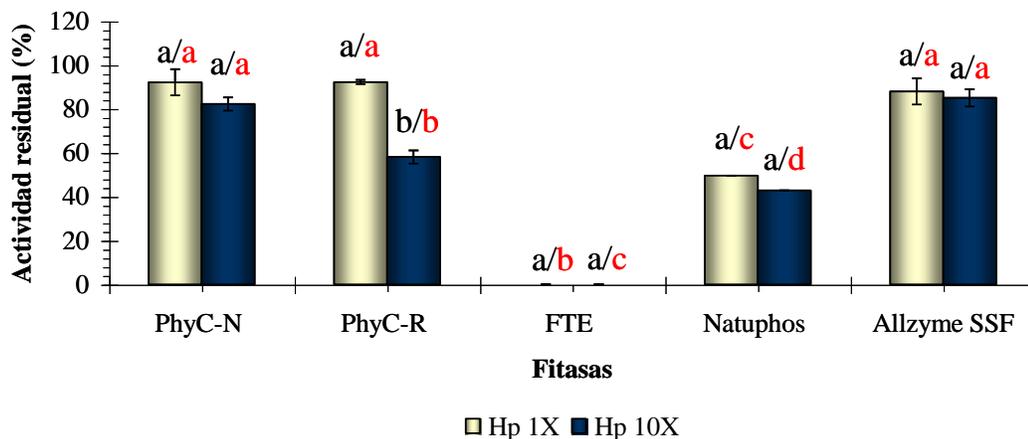


Figura 37. Susceptibilidad a enzimas digestivas de camarón de las cinco fitasas durante 120 min. Actividad residual determinada en porcentaje respecto al valor de actividad inicial. Literales negras diferentes indican diferencias significativas entre la actividad residual de una determinada fitasa a tres diferentes concentraciones de hepatopáncreas de camarón ($p < 0.05$). Literales rojas diferentes indican diferencias significativas entre la actividad residual de las fitasas a la misma concentración de hepatopáncreas ($p < 0.05$). Hp 1X: Hepatopáncreas de camarón con una actividad de tripsina de 0.18 U/mL, Hp 10X Hepatopáncreas de camarón 10 veces más concentrado que 1X.

En la gráfica de la figura 37 se compara la actividad residual de cada fitasa a tres concentraciones de hepatopáncreas y la actividad residual de las cinco fitasas a una determinada concentración de hepatopáncreas a los 120 min (figura 37) de tratamiento con las enzimas digestivas de camarón.

La PhyC-N presentó una actividad residual de 92 y 82% para las preparaciones de hepatopáncreas 1 y 10X respectivamente (literales negras (a)), para el caso de la PhyC-R presentó una actividad residual de 92% a 1X de hepatopáncreas camarón (literal negra (a)), mientras que al aumentar la concentración de hepatopáncreas de camarón 10 veces presentó una actividad de 58% (literal negra (b)). La FTE no presentó actividad residual en ambas concentraciones de hepatopáncreas de camarón evaluada (literales negras (a)).

La Natuphos presentó una actividad residual de 50 y 43% para las preparaciones de hepatopáncreas 1 y 10X respectivamente (literales negras (a)), para el caso de Allzyme SSF presentó una actividad residual de 88 y 85% para las preparaciones de hepatopáncreas 1 y 10X respectivamente (literales negras (a)).

Para el ensayo de susceptibilidad con la preparación 1X de hepatopáncreas de camarón, PhyC-N, PhyC-R y la Allzyme SSF presentaron la actividad residual más alta (92, 92 y 88% respectivamente, literales rojas (a)) seguida por la Natuphos (50%, literales rojas (c)), y por la FTE la cual perdió totalmente su actividad ($p < 0.05$, literales rojas b)).

Para el ensayo de susceptibilidad con la preparación 10X de hepatopáncreas de camarón, PhyC-N y la Allzyme SSF presentaron la actividad residual más alta (82 y 88% respectivamente (literales rojas (a)), seguida por la PhyC-R (58%, literal roja (b)), y por la Natuphos (43%, literal roja (d)) y por la FTE la cual perdió totalmente su actividad ($p < 0.05$, literal roja (c)).

6.5.7. Evaluación y comparación de la estabilidad a la proteólisis por la enzima tripsina porcina

La evaluación de la estabilidad a la enzima tripsina se realizó a partir de preparaciones semipurificadas de las fitasas del género *Bacillus*, (PhyC-N (0.79 U/mL), PhyC-R (0.26 U/mL) y FTE (0.12 U/mL)) y del género *Aspergillus* (Natuphos (1.29 U/mL) y Allzyme SSF (0.95 U/mL)), utilizando dos preparaciones de diferente concentración de tripsina porcina: 1X (con 0.12 U/mL BAPNA y 62 μ g proteína/mL) y 10 X (con 1.2 U/mL BAPNA y 620 μ g proteína/mL).

En las gráficas de las figuras 38 a 43 se presentan los resultados obtenidos de la susceptibilidad a la enzima tripsina porcina.

En las gráficas 38 a 42 la actividad enzimática se expresa en porcentaje de actividad (%), este valor fue obtenido de acuerdo a la fórmula descrita en la sección 5.9.7. que corresponde al valor de la actividad residual aparente de la muestra (ARAM).

En estas representaciones gráficas se presenta el comportamiento de una determinada fitasa a la susceptibilidad de dos concentraciones de enzima tripsina porcina y de un control sin la enzima tripsina (Tris) hasta 30 min.

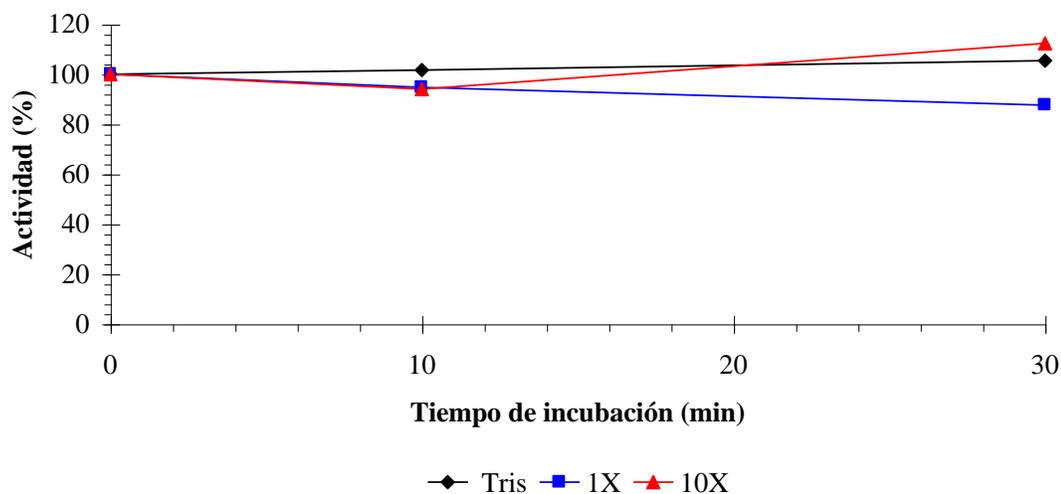


Figura 38. Comportamiento de susceptibilidad a la enzima tripsina de la PhyC-N, en presencia de 1 mM de CaCl_2 y pH 7.5.

En el gráfico 38 se muestra el comportamiento de la PhyC-N bajo el tratamiento con dos concentraciones de la enzima tripsina porcina y el control (Tris) durante 30 min, en donde se puede apreciar que a la concentración de tripsina 1X la PhyC-N presentó una actividad de 95 y 88% para 10 y 30 min de incubación, respectivamente, y al aumentar la concentración de tripsina a 10X presentó una actividad de 94 y 112% para 10 y 30 min de incubación, respectivamente.

En el gráfico 39 se muestra el comportamiento de la PhyC-R bajo el tratamiento con dos concentraciones de la enzima tripsina porcina y el control (Tris) durante 30 min, en donde se puede apreciar que tanto el control como a 1X presentaron un comportamiento muy similar en cuanto a su actividad durante los 10 y 30 min de incubación, presentando valores de actividad 92 al 95% en ambos tiempos de incubación. A 10X presentó una actividad de 103 y 108% después de incubar 10 y 30 min, respectivamente.

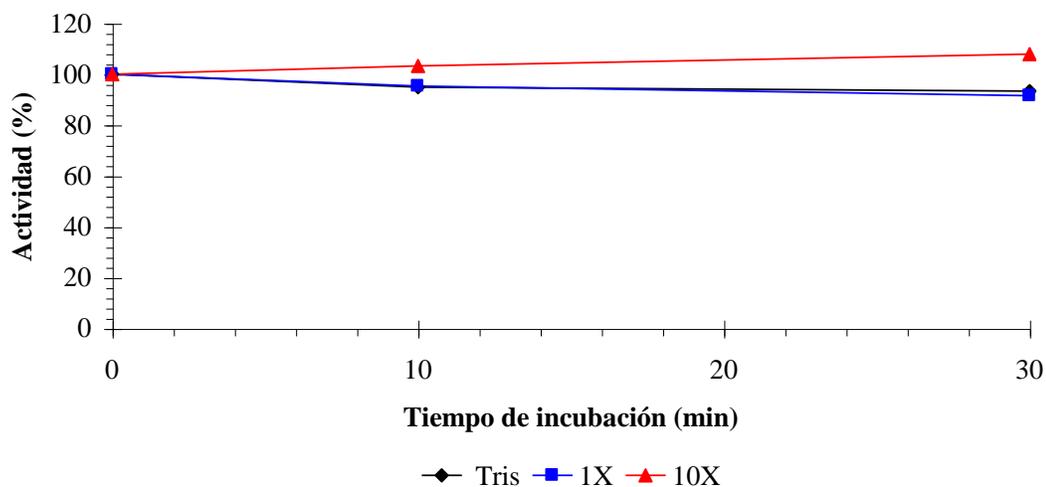


Figura 39. Comportamiento de susceptibilidad a la enzima tripsina de la PhyC-R, en presencia de 1 mM de CaCl_2 y pH 7.5.

En el gráfico 40 se muestra el comportamiento de la FTE bajo el tratamiento con dos concentraciones de la enzima tripsina porcina y el control (Tris) durante 30 min, en donde se puede apreciar que el control presentó una actividad de 88 y 66% después de incubar 10 y 30 min respectivamente, para el caso de 1X de tripsina porcina presentó una actividad de 95 y 92% para los tiempos de incubación de 10 y 30 min, al aumentar la concentración de tripsina 10 veces presentó una actividad de 96% para ambos tiempos de incubación (10 y 30 min).

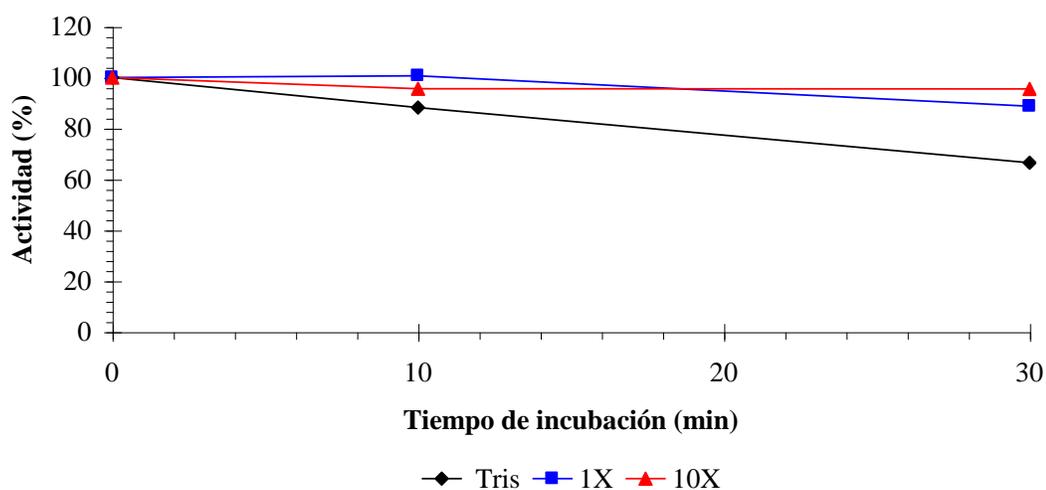


Figura 40. Comportamiento de susceptibilidad a la enzima tripsina de la FTE, en presencia de 1 mM de CaCl_2 y pH 7.5.

En el gráfico 41 se muestra el comportamiento de la Natuphos bajo el tratamiento con dos concentraciones de la enzima tripsina porcina y el control (Tris) durante 30 min, en donde se puede apreciar que todos los valores de actividad obtenidos son cercanos al 100% (91 a 104%).

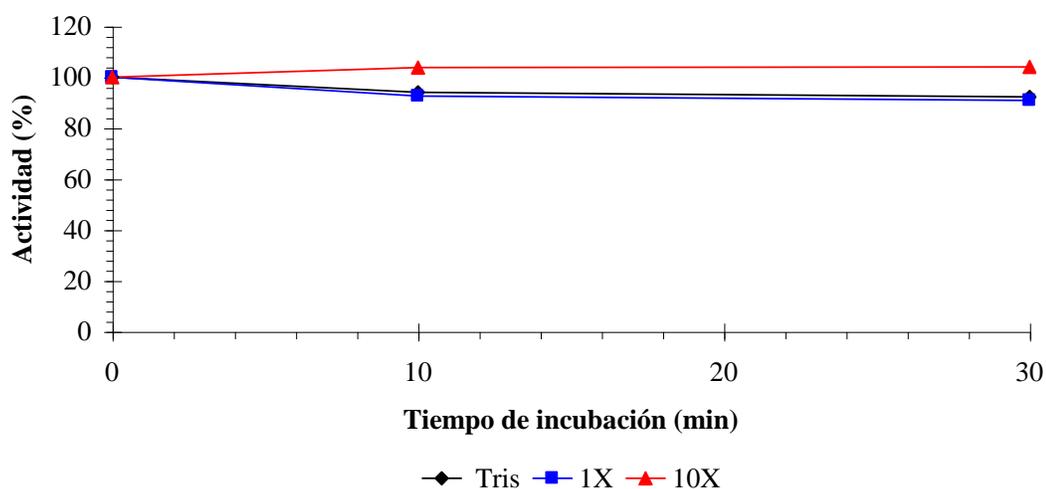


Figura 41. Comportamiento de susceptibilidad a la enzima tripsina de la Natuphos, en presencia de 1 mM de CaCl_2 y pH 7.5.

En el gráfico 42 se muestra el comportamiento de la Allzyme SSF bajo el tratamiento con dos concentraciones de la enzima tripsina porcina y el control (Tris) durante 30 min, en donde se puede apreciar que el control presentó una actividad de 86 y 92% para los tiempos de incubación de 10 y 30 min, respectivamente, a 1X presentó una actividad de 105 y 100% para 10 y 30 min de incubación, respectivamente, y a 10X presentó una actividad de 89 y 114% de actividad a 10 y 30 min de incubación, respectivamente.

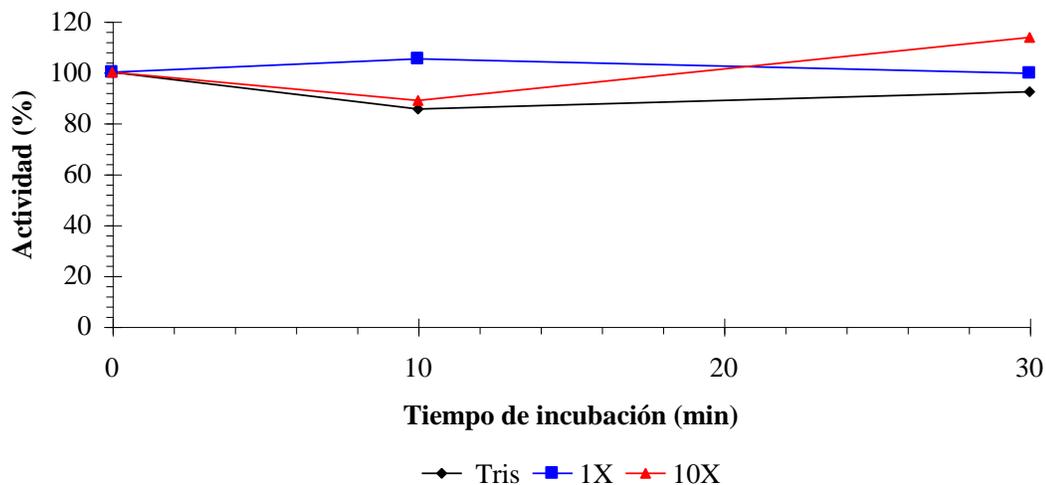


Figura 42. Comportamiento de susceptibilidad a la enzima tripsina de la Allzyme SSF, en presencia de 1 mM de CaCl_2 y pH 7.5.

En la gráfica de la figura 43, la actividad enzimática se expresa en actividad residual, ésta se determinó en porcentaje respecto al valor de actividad enzimática inicial antes del tratamiento tal como se describe en la sección 5.9.7.

En esta representación gráfica se compara la actividad residual de cada fitasa a dos concentraciones de tripsina y la actividad residual de las cinco fitasas a una determinada concentración de tripsina. Esta comparación solamente se realizó a los 30 min de tratamiento con la enzima tripsina porcina.

La PhyC-N mostró sorprendentemente que al aumentar la concentración de tripsina de 1 a 10X su actividad residual incrementó de un 84 a 100% (literales negras (a, b)), este comportamiento es similar al reportado en la sección anterior (6.5.6), en donde la PhyC-N, PhyC-R y Natuphos aumentaron la actividad residual a más altas concentraciones de hepatopáncreas.

La PhyC-R presentó una actividad residual de 98 y 116% para las preparaciones de tripsina 1 y 10X respectivamente (literales negras (a)). Por otro lado la FTE presentó actividad residual por arriba del 100%, al someterse a 1 y 10X de tripsina (literales negras (a)).

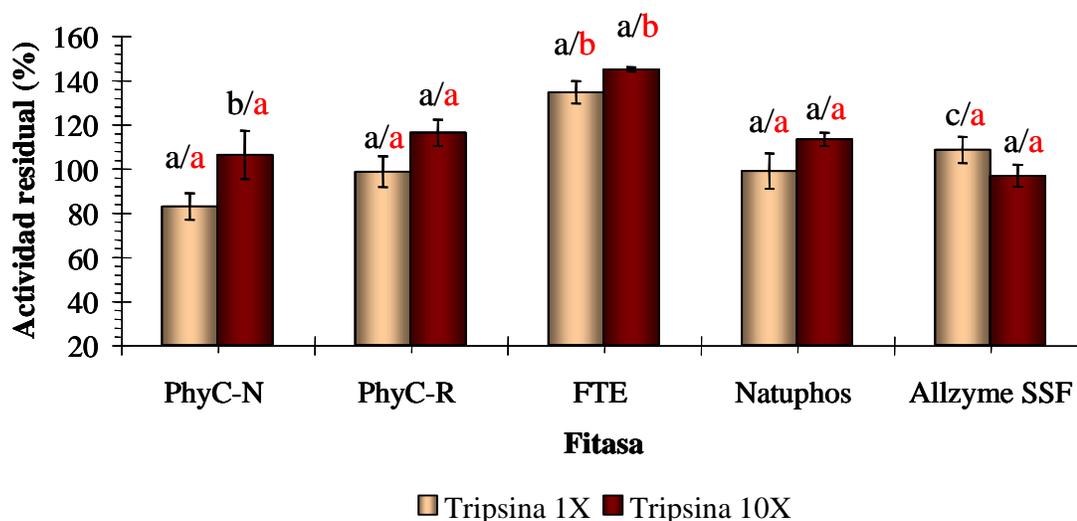


Figura 43. Susceptibilidad a enzimas de tripsina porcina de las cinco fitas durante 30 min. Actividad residual determinada en porcentaje respecto al valor de actividad inicial. Literales negras diferentes indican diferencias significativas entre la actividad residual de una determinada fita a dos diferentes concentraciones de tripsina porcina ($p < 0.05$). Literales rojas diferentes indican diferencias significativas entre la actividad residual de las fitas a la misma concentración de tripsina porcina ($p < 0.05$). Tripsina 1X: tripsina porcina con una actividad de tripsina de 0.12 U/mL, Tripsina 10X tripsina porcina 10 veces más concentrado de 1X.

La Natuphos presentó una actividad residual de 99 y 113% para las preparaciones de tripsina respectivamente (literales negras (a)). La Allzyme SSF presentó una actividad residual de 108 y 97% para las preparaciones de tripsina respectivamente (literales negras (a)).

Para el ensayo de susceptibilidad con la preparación 1X de tripsina, la FTE presentó la actividad residual más alta (134%, literal roja (b)) seguida por la Allzyme SSF (108%, literal roja (c)) y por la Natuphos, PhyC-R y PhyC-N (99, 98 y 83%, respectivamente, literales rojas (a)).

Para el ensayo de susceptibilidad con la preparación 10X de tripsina, la FTE presentó la actividad residual más alta (145%, literales rojas (b)) seguida por la PhyC-R, Natuphos, PhyC-N y Allzyme SSF (116, 113, 106, y 97%, respectivamente, literales rojas (a)).

6.5.8. Análisis de la evaluación de K_m de la fitasa recombinante

En la figura 44 se muestra una gráfica con la representación de Michaelis-Menten, con los valores de las ocho cinéticas enzimáticas realizadas, los cuales no se pudieron ajustar matemáticamente a la ecuación de Michaelis-Menten. La K_m (constante de Michaelis) se calculó tomando en cuenta la concentración de sustrato (fitato de sodio) que generó la mitad de la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}/2$). La K_m aparente calculada fue de 0.5 mM.

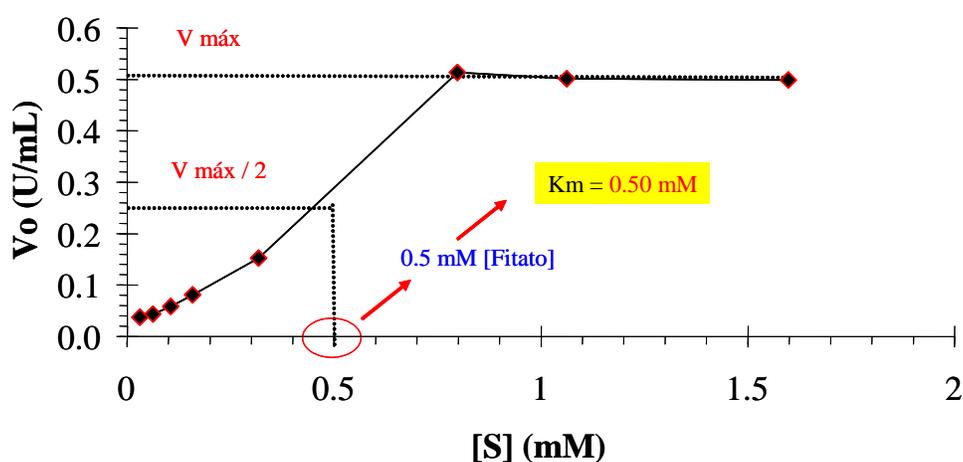


Figura 44. Representación de Michaelis Menten para PhyC-R. Esta se representa con la velocidad inicial (V_o) y frente a la concentración del sustrato ($[S]$).

En la figura 45 se muestra una gráfica, con la representación de Lineweaver-Burk en donde se utilizaron los valores de actividad enzimática de las ocho cinéticas realizadas. Se tomó como zona lineal los tres primeros puntos y se calculó la K_m con el punto de corte con el eje de las abscisas de la recta generada por los tres primeros puntos, el cual coincide con el inverso opuesto de la K_m , obteniendo una K_m aparente con un valor de 0.4 mM.

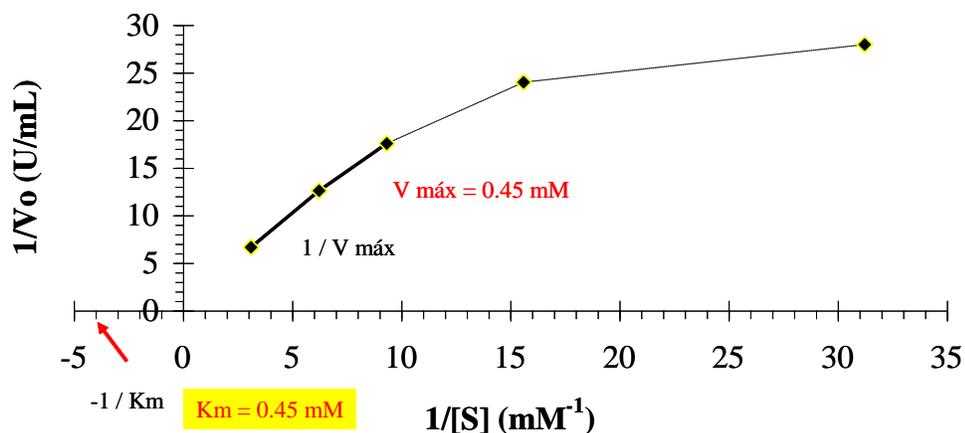


Figura 45. Representación de Lineweaver-Burk para PhyC-R. Esta se representa con el inverso de la velocidad inicial ($1/V_o$) frente al inverso de la concentración del sustrato ($1/[S]$).

En la figura 46 se muestra una gráfica, con la representación de Eadie-Hofstee utilizando los mismos datos de las cinéticas de PhyC-R, en donde claramente se observó que no sigue la ecuación de Eadie-Hofstee ya que se debería obtener una recta. Por lo tanto podemos confirmar que los valores de las cinéticas de la PhyC-R no siguen el modelo enzimático de Michaelis Menten. Powar y Jagannathan (1982) reportaron que la reacción de la cinética enzimática de la fitasa *B. subtilis* es compleja al usar como sustrato ácido fítico (IP6), debido principalmente que durante la reacción se forman otros sustratos como IP5, IP4 e IP3.

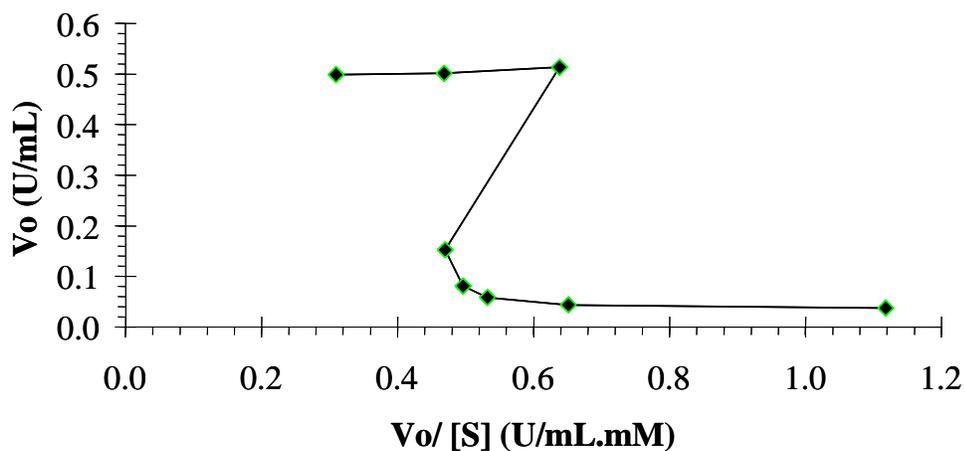


Figura 46. Representación de Eadie-Hofstee para PhyC-R. Esta se representa con la velocidad inicial (V_o) frente al inverso de la concentración del sustrato ($V_o/[S]$).

7. DISCUSIÓN

Las fitasas son proteínas que catalizan la hidrólisis de los grupos fosfatos del ácido fítico. Las fitasas producidas por el género *Bacillus* poseen propiedades bioquímicas diferentes a las fitasas fúngicas que actualmente se encuentran en el mercado, lo cual ofrece la oportunidad que éstas sean empleadas en aplicaciones distintas a las actualmente realizadas.

Las fitasas deben cumplir con una serie de criterios para ser usadas como aditivos en alimentos de animales o en procesos de tecnología de alimentos. Éstas deben ser efectivas en la liberación de fósforo *in vitro* e *in vivo* en el tracto digestivo de animales, resistir temperaturas altas durante el proceso de peletizado y soportar el ataque proteolítico de las enzimas digestivas, además de tolerar largos periodos de almacenamiento y transporte a temperatura ambiente.

Con el fin de valorar el potencial de aplicación de dos fitasas bacterianas recombinantes, en este proyecto se realizó la evaluación y la comparación de diferentes propiedades bioquímicas de tres fitasas del género *Bacillus*, una nativa (PhyC-N) y dos recombinantes (PhyC-R y FTE) producidas en *Pichia pastoris*, tomando de referencia dos fitasas del género *Aspergillus* (comerciales).

La caracterización bioquímica se realizó a partir de preparaciones semipurificadas de las tres fitasas bacterianas. La preparación de PhyC-N presentó una actividad específica 1.36 U/mg de proteína, la cual resultó ser menor que la reportada previamente por Kerovuo y colaboradores en 1998 (Kerovuo *et al.*, 1998), quienes obtuvieron preparaciones con una actividad de 15 U/mg de proteína.

Las preparaciones semipurificadas de la PhyC-R y FTE se obtuvieron de los sobrenadantes de cultivos de las cepas recombinantes de *Pichia pastoris* crecidas durante 24 h bajo condiciones de inducción del gen heterólogo. Los medios de cultivo a base de amortiguadores de fosfatos inhibieron la actividad fítica presente en los sobrenadantes de los cultivos, este efecto fue contrareestado con una serie de diluciones para disminuir la concentración de fosfatos en el sobrenadante sometido a los ensayos de

actividad enzimática, sin embargo estos ensayos de actividad mostraron una gran variabilidad.

Las preparaciones semipurificadas de la PhyC-R y FTE se obtuvieron a partir de los sobrenadantes, los cuales fueron concentrados y desalados en unidades de filtración de 10 kDa (Millipore), además de realizar un cambio de amortiguador (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM de CaCl_2). Las recuperaciones calculadas para este proceso fueron menores del 50%, cabe mencionar que esta estimación fue aproximada debido a que los cálculos se realizaron con los valores de actividad inicial del sobrenadante con alto contenido de fosfato, y estas determinaciones fueron imprecisas.

Una alternativa para la eliminación de fosfato es el de realizar el desalado del sobrenadante con columnas de Sepadex P-10, (Kerovuo *et al.*, 1998) y de esta manera evitar la inhibición de la actividad de fitasa causada por el fosfato. Resultados recientes (Castillo, 2008) muestran que es posible obtener una recuperación mayor del 90 % en la obtención de preparaciones semipurificadas de las fitasas recombinantes a partir del sobrenadante ultrafiltrado en unidades de filtración de 10 kDa y empleando como amortiguador 100 mM Tris-HCl pH 8.5, 50 mM NaCl_2 , 5 mM CaCl_2 , 2% glicerol. En este caso, el valor inicial de la actividad del sobrenadante se estimó a partir de sobrenadantes desalados en columnas de Sepadex P-10 y se tomó de referencia para el cálculo de la recuperación de sobrenadantes ultrafiltrados (Castillo, 2008), por lo cual el porcentaje de recuperación fue mayor que el obtenido en este trabajo.

El proceso de desalado, cambio de amortiguador y concentración implicados en la ultrafiltración, fueron suficientes para obtener preparaciones semipurificadas homogéneas de las dos fitasas recombinantes requeridas para realizar su caracterización bioquímica y comparar sus propiedades con la PhyC-N y las dos fitasas comerciales.

Las preparaciones de las enzimas comerciales, Natuphos y Allzyme SSF, se realizaron a partir de las presentaciones granuladas, las cuales se resuspendieron en un amortiguador de acetatos a pH 5.5. Estas preparaciones fueron homogéneas para todos los ensayos y presentaron una actividad específica constante con valores superiores a las obtenidas para las preparaciones de las fitasas bacterianas hasta en un factor de 27 en el caso más extremo (Natuphos y PhyC-N).

En los estudios comparativos, se procuró tener siempre en igualdad el valor de la actividad fítica inicial para cada ensayo realizado con cada una de las enzimas, además se procuró tener precaución especial en las concentraciones de calcio presente en cada ensayo y que la determinación de la actividad enzimática siempre se realizará a una concentración de 1 mM de CaCl₂, para lo cual la concentración de calcio requerida siempre fue ajustada de forma precisa, ya que la actividad fítica de las fitasas bacterianas es dependiente de la concentración de este metal.

La caracterización bioquímica de estas cinco fitasas, se realizó evaluando peso molecular aparente mediante un análisis de SDS-PAGE, actividad enzimática a diferentes pH y temperaturas, termoestabilidad y susceptibilidad a enzimas digestivas de camarón y de tripsina porcina. Para la comparación de estos parámetros se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) y de t-students.

Mediante el análisis por SDS-PAGE de la preparación de PhyC-N se detectaron dos bandas de \approx 41 y 44 kDa, valores muy próximos al reportado en estudios previos (Kerovuo, *et al.*, 1998) para la fitasa de C (43 kDa), mientras que para las fitasas C recombinantes, PhyC-R y FTE, se detectó un barrido de bandas en un intervalo de \approx 51 a 66 kDa. El aumento en el tamaño y el barrido observado puede ser debido a la glicosilación de las fitasas recombinantes producida en el sistema de expresión de *Pichia pastoris*. Para el caso de las enzimas Natuphos y Allzyme SSF, ambas enzimas de *Aspergillus*, se observaron bandas anchas con un tamaño molecular de \approx 60 kDa, peso molecular que corresponde al reportado previamente para el caso de Natuphos (Wyss *et al.*, 1999b). Las bandas anchas y poco definidas detectadas por SDS-PAGE se deben también a la glicosilación presente en estas fitasas, se ha reportado que las fitasas del género *Aspergillus* están ampliamente glicosiladas y que sus pesos moleculares oscila entre 62-128 kDa, determinado por el método SDS-PAGE (Ullah, 1988; Vohra & Satyanarayana, 2003). Los resultados obtenidos mediante el análisis por SDS-PAGE, muestran claramente que ambas fitasas recombinantes de *Bacillus* (PhyC-R y FTE) poseen un tamaño molecular diferente a la fitasa nativa, esta diferencia es claramente debido a la glicosilación presente en las dos formas recombinantes a pesar que la forma nativa ha sido reportada en su forma no glicosilada (Kerovuo, *et al.*, 1998).

La fitasa C nativa cuenta con 3 sitios de N-glicosilación teóricos, los cuales son probablemente afectados por el sistema de glicosilación de *Pichia pastoris*. Diversos estudios (Han & Lei, 1999) han mostrado la capacidad de *Pichia pastoris* de realizar este tipo de modificaciones postraduccionales, a pesar de que los mismos no estén presentes en la proteína nativa. Por último el análisis por SDS-PAGE permitió evaluar el grado de pureza de cada una de las preparaciones obtenidas, siendo evidente que tanto las preparaciones de las fitasas recombinantes, cómo la Natuphos, son las que presentan el mayor grado de pureza, mientras que en las preparaciones de PhyC-N y Allzyme SSF se detectaron una serie de bandas de menor tamaño a la esperada.

Debido a la naturaleza de los dos grupos de enzimas en estudio, las enzimas de origen fúngico, para el caso de las comerciales, y las de origen bacteriano, el perfil de actividad a diferentes valores de pH define perfectamente bien a los dos grupos. Las fitasas comerciales, clasificadas como fosfatasas ácidas de histidina poseen su máxima actividad a pH de 5.5, mantuvieron su actividad hasta un valor de pH de 2.5 y presentaron ausencia de actividad a pH 7.5, estos resultados corroboran con estudios que indican que la mayoría de las fitasas producidas el género *Aspergillus*, presentan actividad enzimática a valores de pH entre 2.5 y 6 (Vohra & Satyanarayana, 2003; Vats & Banerjee, 2005; Ullah & Gibson, 1987; Ullah, 1988). A un pH de 2.5, la enzima de Natuphos presentó mayor actividad relativa que la enzima Allzyme SSF (26%).

Las fitasas de *Bacillus* (PhyC-N, PhyC-R y FTE) presentaron la mayor actividad a pH de neutros a básicos, sin embargo conservaron hasta un 68 % de actividad a pH de 5.5. El intervalo más amplio de pH en el que presentaron actividad estas fitasas bacterianas, les proporciona una mayor versatilidad en su aplicación.

El perfil de pH de las fitasas bacterianas mostró diferencias entre ellas, así, mientras que para el caso de la PhyC-N y FTE el valor de pH óptimo fue de 7.5, para la PhyC-R fue de 9. Por otro lado, FTE pierde gran parte de su actividad a pH de 9.

Estudios previos (Kerovuo *et al.*, 1998), coinciden con los valores de pH óptimos para PhyC-N y Natuphos. Sin embargo, para el caso de PhyC-N los valores de actividad relativa a valores de pH más básicos obtenidos por estos autores, difieren con los del presente estudio, estas diferencias pueden ser debidas a las condiciones en las que estos autores realizaron estos ensayos. Las fitasas PhyC-N, y PhyC-R mostraron diferencias

en el valor de pH óptimo, mientras que la FTE presentó una clara evidencia de inestabilidad a pH de 9.

El hecho de que las fitasas bacterianas (PhyC-N, PhyC-R y FTE) sean activas a pH de neutro a básicos, las hacen candidatas potenciales para ser empleadas como aditivo en la alimentación de aquellas especies animales, en las cuales el pH de los tractos digestivos sean de neutros a básicos, o bien en especies agástricas como es el caso de algunos peces y crustáceos como el camarón (Ling *et al.*, 2007). Por otro lado, estas enzimas son candidatas para su potencial aplicación en procesos industriales realizados en condiciones neutras para mejorar la disponibilidad del fósforo fítico en harinas vegetales ricas en fitato.

Al igual que en el efecto del pH sobre la actividad, en el comportamiento del efecto de la temperatura, las enzimas en estudio se pueden separar en dos grupos, Natuphos y Allzyme SSF y FTE con actividad en un intervalo de 25 a 55°C, con un máximo a 45°C y un segundo grupo la PhyC-N y la PhyC-R con actividad en un intervalo de temperatura más amplio de 25 a 70°C, con un máximo a 55°C. Con respecto al primer grupo, la FTE presentó la mayor actividad que las dos enzimas fúngicas a 25 y 37°C. Y respecto a la PhyC-R y PhyC-N, la primera mostró mayor actividad a 25, 37 y 45°C, sin embargo la forma nativa mostró mayor actividad a 70°C. A 80°C, solo la PhyC-N mostró una actividad relativa significativa (12%). Cabe mencionar que la PhyC-R fue la enzima con actividad (11 a 100 %) en un intervalo más amplio de temperatura y la enzima FTE fue la enzima con mayor actividad a las temperaturas mas bajas ensayadas (87-92 %). Los reportes previos sobre esta propiedad, mencionan que las fitasas del genero *Aspergillus* presentan temperaturas óptimas en un rango de 40 a 70°C (Vohra & Satyanarayana, 2003; Oh *et al.*, 2004; Ling *et al.*, 2007), mientras que las fitasa del genero *Bacillus* presentan actividad entre 55 y 70°C (Vohra & Satyanarayana, 2003; Oh *et al.*, 2004; Ling *et al.*, 2007). Las enzimas con actividad en un intervalo amplio de temperatura, ofrece una mayor versatilidad en cuanto su aplicación. Por otro lado, una buena actividad a temperaturas entre 25 y 37°C ofrece un potencial para su aplicación en especies acuática cultivables.

Con excepción de la FTE, todas las fitasas evaluadas en este trabajo fueron estables a 37°C por 120 min en 1 mM CaCl₂ a su pH óptimo de actividad. Es muy

evidente la inestabilidad de la FTE a 37°C (pH 7.5). La FTE se diferencia de PhyC-R y PhyC-N en 25 aminoácidos (93 % de similitud), uno de éstos, el aspártico 336 fue substituido por una asparagina. De acuerdo a lo reportado por Shin y colaboradores (Shin *et al.*, 2001) el aspártico 336 es uno de los aminoácidos que interactúa con iones de calcio para conferir estabilidad a esta proteína, por lo cual esta podría ser la razón de la inestabilidad presentada por esta variante.

La termoestabilidad es considerada una característica recomendable para aquellas enzimas que sean aplicadas en procesos industriales. Así que, en éste estudio se evaluó la termoestabilidad a tres temperaturas diferentes y para el caso de las fitasas bacterianas se evaluó también la influencia del pH y concentración de CaCl₂ a las temperaturas evaluadas.

A 37°C (pH 5.5 y 1 mM CaCl₂) las enzimas comerciales fueron menos estables (78-83 % actividad residual) que las fitasas bacterianas con una actividad residual de 96 a 109 % (p< 0.05). La igualdad en la actividad residual presentada entre PhyC-N y Allzyme SSF fue debido probablemente a la variación en los valores de PhyC-N.

Estos resultados muestran la separación de los dos grupos, fitasas bacterianas y fúngicas, quedando en el límite de los dos grupos la PhyC-N. El efecto de la concentración de calcio fue observado solamente en la enzima FTE, mostrando un incremento de 88 a 101 % (p< 0.05), en su actividad residual cuando la concentración de calcio se incrementó de 1 a 5 mM, pero solo en los ensayos realizados a pH 7.5.

A 37°C, tanto PhyC-R como PhyC-N fueron más estables a pH de 5.5 que a 7.5 (p< 0.05) a 5 mM CaCl₂, con valores de actividad residual que disminuyeron desde 120 % hasta 87%, mientras que a 1 mM CaCl₂, tanto PhyC-R como FTE obtuvieron mayor actividad residual a un pH de 5.5 (p< 0.05).

En general las cinco fitasas fueron estables a 37°C, con valores de actividad residual próximos al 100% (78 a 120%), siendo más estables las fitasas del género *Bacillus*. La mejor estabilidad a 37°C la presentó la PhyC-R (120 % actividad relativa) a pH 5.5 a 5 mM de CaCl₂.

A 60°C, la PhyC-R y Allzyme SSF (1 mM CaCl₂, pH 5.5) fueron las enzimas menos estables con una actividad residual de 5 y 18 % respectivamente. Las enzimas

restantes obtuvieron valores actividad residual en un intervalo de 56 a 67 % sin diferencias estadísticamente significativas entre ellas en estas condiciones.

Tanto PhyC-R, como FTE fueron más termoestables a 60°C al aumentar la concentración de calcio a 5 mM en cualquiera de los dos valores de pH. Mientras que en la PhyC-N solo se observó este efecto a pH 5.5 (tabla XXI)

A 60°C, el efecto del pH no es significativo en PhyC-N y PhyC-R cuando la concentración de CaCl₂ es 5 mM, sin embargo a 1 mM de CaCl₂, fueron más estables a pH 7.5, mientras que la FTE fue siempre más estable a pH de 5.5.

Las fitasas PhyC-N, PhyC-R resisten más el choque térmico de 60°C en presencia de 5 mM de CaCl₂ a los dos valores de pH evaluados (5.5 y 7.5), mientras que la FTE obtiene valores comparables solamente a pH 5.5 (tabla XXI).

En conclusión la PhyC-N y PhyC-R fueron las enzimas que mostraron la mayor estabilidad a 60°C (90 a 104 % actividad residual) a los dos valores de pH evaluados, pero solo en presencia de 5 mM de CaCl₂. Cabe resaltar que la FTE se comportó de igual manera que las otras dos enzimas bacterianas solo a pH de 5.5 y 5 mM de CaCl₂

En los ensayos realizados a 1 mM de CaCl₂, pH 5.5 a 80°C, la PhyC-N y PhyC-R fueron las enzimas menos estables con una actividad residual de 7 % para PhyC-N y pérdida total de la actividad en el caso de PhyC-R. A esta temperatura, la enzima más estable fue la FTE (83 %), seguido de la Allzyme SSF (65%) y por último la Natuphos (48 %). A esta temperatura, el efecto de la concentración de calcio fue distinto en cada una de las enzimas bacterianas y dependiente del valor de pH. Así, en la PhyC-N aumentó su termoestabilidad al aumentar la concentración de calcio solamente a pH 7.5.

En todos los caso la PhyC-N fue muy inestables con valores del 2 al 11% de actividad residual, con exepcion a pH 7.5 y 5 mM de CaCl₂ con un valor de actividad residual del 68%.

Para el caso de la PhyC-R, fue notable la influencia del pH para mejorar la termostabilidad con el aumento de la concentración de calcio, así en este caso, la termoestabilidad mejora a 5 mM de CaCl₂ pero solo a pH 5.5 con una actividad residual que cambia del 0 al 85 %.

Para el caso de la FTE a esta temperatura (80°C) posee una buena termoestabilidad a pH 5.5 independiente de la concentración de calcio, a pH 7.5, la termoestabilidad mejora de un 0 a un 30 % cuando aumenta la concentración de calcio.

A 80°C, la mejor termoestabilidad la presentaron PhyC-R y FTE con una actividad residual en un intervalo de 79 a 85% a pH 5.5 y 5 mM CaCl₂ (tabla XXI) Estas dos enzimas pierden actividad al cambiar a pH de 5.5 a 7.5.

La PhyC-N obtuvo el mejor valor de actividad residual (hasta un 104 %) a 60°C en presencia de 5 mM de CaCl₂ y a pH 7.5. Al aumentar la temperatura a 80°C la actividad residual se ve favorecida solo en presencia de 5 mM de CaCl₂ y a un pH 7.5 (68%). A pH de 5.5 y a esta temperatura (80°C), esta fitasa es muy inestable ya que prácticamente pierde su actividad bajo estas condiciones. Kerovuo y colaboradores (Kerovuo, *et al.*, 2000b), reportaron que la fitasa C retiene un 90% y 43% de su actividad después de someterla a 60 y 80° C durante 10 min en presencia de 5 mM de CaCl₂, resultados equiparables a los obtenidos en este trabajo con un 104 y 68 % de actividad residual. El mismo autor, reporta que en ausencia de calcio la actividad se pierde completamente bajo las mismas condiciones. En los resultados obtenidos en este trabajo, a 1 mM de CaCl₂, se ve afectada la termoestabilidad, demostrando claramente el efecto del calcio en la estabilidad de esta enzima bajo estas condiciones.

Un hallazgo nuevo e interesante es la estabilidad de PhyC-N dependiente del pH, ya que a pH de 5.5 esta enzima es inestable 80°C aún en presencia de 5 mM de CaCl₂, mientras que a pH de 7.5 se logró mejorar la estabilidad con la mayor concentración de calcio. Es probable que a 80°C y a pH 5.5, la energía cinética intramolecular favorezca que la interacción con los iones de calcio decrezca.

Estas características fisicoquímicas hacen que la PhyC-N, no sea apta para tratamientos térmicos, bajo condiciones de pH ácidos, limitando su empleo bajo estas condiciones.

Por otro lado, en el caso de la PhyC-R, los niveles más altos de la actividad residual se observaron a pH 5.5, 5 mM de CaCl₂ a 60°C (95%) y 80°C (85%) y a pH 7.5, 5 mM de CaCl₂ a 60°C se obtuvo una actividad residual 102%.

A pesar de que la PhyC-N y la PhyC-R tienen la misma secuencia aminoacídica, los resultados obtenidos en este estudio, muestran que las dos enzimas tienen propiedades

bioquímicas diferentes (tabla XXI). PhyC-N y PhyC-R fueron diferentes estructuralmente constatado por el tamaño molecular determinado por SDS-PAGE. Esta diferencia es probablemente debido a una glicosilación causada por el sistema de *Pichia pastoris* y influyendo en las propiedades bioquímicas de PhyC-R, así PhyC-R y PhyC-N, difieren en su pH óptimo, perfil de actividad a diferentes temperaturas, termoestabilidad a 60°C y 80°C (Tabla XXI).

En la evaluación de la termoestabilidad de la FTE, se pudo apreciar que los valores de actividad residual más altos fueron a pH 5.5, a 60°C, esta enzima resistió más el choque térmico en presencia de 5 mM de CaCl₂ (106%). Sorprendentemente al aumentar la temperatura de 60 a 80°C a pH 5.5 pero a 1 mM de CaCl₂, la FTE presentó un aumento de actividad de 67 a 83 %. A 80°C, el ensayo de termoestabilidad evaluado a pH 5.5 fue el más favorecido que a pH de 7.5 sin importar la concentración de calcio (83% para 1 mM de CaCl₂ y 79% para 5 mM de CaCl₂), sin embargo la actividad residual a 80°C a pH 7.5 y en presencia de iones de calcio fue menor al 30%. La FTE tiene un 99% de similitud de la secuencia aminoacídica con la fitasa producida por *B. amyloliquefacies* (DS11), la cual es reportada como termoestable a pH 7.5 (Ha *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 1998a). A pesar de esta similitud en cuanto su secuencia aminoacídica, la FTE fue poco termoestable a pH 7.5, este efecto negativo de la termoestabilidad a este valor de pH 7.5 se debe probablemente a las diferencia que existen entre ambas secuencias a aminoacídicas.

Previos estudios reportaron (Kerovuoto *et al.*, 2000b) que los iones calcio protegen a la fitasa C de la desnaturalización térmica. Recientemente se determinó la estructura tridimensional de la fitasa de *B. amyloliquefaciens* (DS11), revelando que la enzima contiene seis iones calcio, tres de estos aminoácidos se encuentran en la superficie de la proteína y están involucrados con la estabilidad y termoestabilidad de la fitasa, mientras que los otros tres se encuentran en el sitio activo y son los responsables de la actividad enzimática (Shin *et al.*, 2001). Al comparar la estructura tridimensional de la FTE con la DS11, se observó que la FTE pierde interacción con uno de los calcio que proporcionan termoestabilidad a la proteína (FTE), es muy probable que por esta razón la FTE no presente el mismo comportamiento que la DS11.

En los ensayos de termoestabilidad a 1 mM de CaCl₂ a pH 5.5 de la Natuphos y Allzyme SSF, se pudo apreciar claramente que la Natuphos disminuye su actividad conforme la temperatura fue aumentando en el ensayo (60% a 60°C y de 48% a 80°C), para el caso de la Allzyme SSF se puede observar que la actividad residual a 60 °C presentó el nivel más bajo (18%), mientras que al someterse a 80°C sorprendentemente su actividad se recuperó hasta un valor de 65%.

A 80°C la PhyC-R mostró la mayor termoestabilidad a 5 mM de CaCl₂ y pH 5.5, es notable que esta estabilidad se pierde en un 49% cuando las condiciones se cambiaron a pH 7.5 (85% a 36% actividad residual). La FTE fue la segunda fitasa más resistente (83% a 79% actividad residual) a pH 5.5, independientemente de la concentración de calcio, ambas enzimas mostraron mayor termoestabilidad a esta temperatura que las fitasas del género *Aspergillus* evaluadas en este estudio. Así mismo, los valores de termoestabilidad determinadas a 80°C para PhyC-R y FTE fueron semejantes a los reportados para aquellas fitasas consideradas como las más termoestables: *B amyloliquefaciens* 50% de actividad a 90°C por 10 min (Ha *et al.*, 2000), la fitasa *phyL* de *Bacillus lichiniformis* (Tye *et al.*, 2002) retiene el 61% de actividad a 95°C por 15 min, siendo ésta la fitasa más termoestable reportada de esta especie y una fitasas comercial de *Aspergillus niger* (Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland) con una actividad residual del 86% a 80 °C y del 96–100% a 70 °C en un tratamiento de 15 min (Yin *et al.*, 2007).

En este estudio de termoestabilidad se pudo demostrar que las fitasas de *Bacillus* PhyC-R y FTE (85 y 79 % actividad residual) resisten más a la degradación a temperaturas elevadas (80°C) que las fitasas comerciales Natuphos y Allzyme SSF (48 y 65%).

De acuerdo a los resultados obtenidos, la Fitasa C recombinante fue glicosilada por *Pichia pastoris*, el hospedero empleado para su producción, y es probable que esta glicosilación sea la justificación a las diferencias encontradas entre PhyC-N y PhyC-R en sus propiedades bioquímicas analizadas. El efecto más notable fue las diferencias encontradas en sus propiedades de termoestabilidad y dependiente del pH. De acuerdo estudios previos existen controversias respecto a los efectos debido a la glicosilación, ya que mientras que Wyss y colaboradores (Wyss *et al.*, 1999a) indican que la glicosilación

puede alterar el pI, la estabilidad y propiedades catalíticas, sin embargo la termoestabilidad no es alterada. Otros autores (Han & Lei, 1999) encontraron que la glicosilación en una fitasa de *A. niger* no afectó las propiedades catalíticas, pero si mejoró la termoestabilidad de ésta. En el presente estudio la termoestabilidad de PhyC-R fue diferente a la determinada para PhyC-N, y en ambos caso fue dependiente del pH y de la concentración de calcio. La dependencia de la estabilidad al pH, puede ser debido a que la glicosilación haya afectado el pI y éste a su vez influyó en la termoestabilidad.

Mientras que las fitasas fúngicas son susceptibles a la proteólisis en los sobrenadantes concentrados de los cultivos (Wyss *et al.*, 1999b), las fitasas de *Bacillus* parecen ser más resistentes a la actividad proteolítica de tripsina, papaina y pancreatina según los estudios realizados por Kerovuo y colaboradores en el 2000 (Kerovuo *et al.*, 2000b). En este mismo estudio se reporta que la Fitasa C de *Bacillus subtilis* fue susceptible a la pepsina, efecto que fue justificado más por la desnaturalización de la enzima a valores bajos de pH.

En esta investigación se realizaron por primera vez, ensayos de susceptibilidad frente a enzimas digestivas de camarón, empleando preparaciones crudas de hepatopáncreas del camarón Blanco del Pacífico. Los resultados muestran que el tratamiento de las diferentes fitasas con la preparación de hepatopáncreas de camarón por 30 min, que en todos los casos, excepto para la FTE, se observó un incremento de la actividad residual al aumentar la concentración de la preparación de hepatopáncreas y en algunos casos se registraron actividades residuales por arriba del 100%. Este efecto fue diferente entre las fitasas y dependiente de la concentración de la preparación de hepatopáncreas, así PhyC-N (84 a 100%) y PhyC-R (90 a 103 %) se activan cuando la concentración se incrementa de 1 a 10X (0.12-1.2 U/mL BAPNA), mientras que Natuphos (75 a 100 %) y Allzyme SSF (106 a 116%) son activadas cuando la concentración se incrementa 10X a 40X (1.2-4.8 U/mL BAPNA). La Allzyme SSF presentó la actividad residual más alta (116%) a 40X y 30 min de incubación, seguida por la Natuphos y PhyC-N (100 y 94% respectivamente). La PhyC-R presentó su mejor estabilidad a 10X (103%), disminuyendo este valor a 67 % cuando se incrementó la concentración de la preparación de hepatopáncreas a 40X.

Hay que señalar que la actividad residual de la Natuphos fue afectada a 1 y 10X con actividades residuales de 75 y 79%, mientras que a 40X presenta hasta un 100% de actividad residual. Por último, la susceptibilidad de FTE hacia la preparación de hepatopáncreas fue afectada de forma dependiente de la concentración, perdiendo por completo su actividad a la concentración de 40X.

En los ensayos de susceptibilidad a 120 min con las preparaciones de hepatopáncreas a 1 y 10X, las enzimas PhyC-N y Allzyme SSF presentaron la mejor estabilidad con valores de 82 a 92 %. A pesar de que la PhyC-R mantuvo una actividad residual (92%) igual a la PhyC-N y Allzyme SSF en los ensayos a 1X, ésta fue menor (58%) que las determinadas para PhyC-N y Allzyme SSF cuando se aumentó la concentración de las preparaciones de hepatopáncreas a 10X. La actividad residual para Natuphos fue siempre menor que las de las enzimas anteriores, manteniendo niveles de 50 a 43 % a 1X y 10X respectivamente. Por último la FTE fue inestable perdiendo por completo su actividad a los 120 minutos del tratamiento a las dos concentraciones evaluadas.

La FTE fue claramente afectada por la actividad proteolítica de la preparación de hepatopáncreas, tal como se evidencia por los resultados obtenidos con el tratamiento a 30 min. Hay que tener en consideración que la enzima FTE es inestable a pH 7.5 después ser incubada por 120 min a 37°C en 1 mM CaCl₂, (sección 6.5.4), por lo cual la pérdida de actividad en este caso puede ser atribuida a un factor combinado de las condiciones del ensayo y la actividad proteolítica de las enzimas de la preparación de hepatopáncreas.

En general el tratamiento con tripsina porcina no afectó la estabilidad de las fitasas a las dos concentraciones de tripsina evaluadas, excepto para el caso de la PhyC-N que pierde un 16% de su actividad con el tratamiento a 1X. En todos los casos la actividad residual osciló entre 97 y 116%, excepto para el caso de la FTE que presentó una actividad residual en un intervalo de 134 a 145 %. Un incremento en la actividad residual fue observado al aumentar la concentración de tripsina de 1X a 10X en las enzimas PhyC-N, PhyC-R, FTE y Natuphos, sin embargo, solo en el caso de PhyC-N fue estadísticamente diferente. Cabe señalar que la enzima FTE presentó actividades residuales hasta de un 145%, estos resultados conducen a pensar que el tratamiento

proteolítico activa a esta enzima, posiblemente a través de una mejor disponibilidad del sustrato hacia el sitio activo, o bien la generación de un péptido mas pequeño con mayor actividad fítica.

El aumento de la actividad residual debido al tratamiento con enzimas proteolíticas ha sido documentado previamente por Rodríguez y colaboradores en 1999 (Rodríguez *et al.*, 1999). Estos autores estudiaron el efecto de tripsina y pepsina porcina sobre la fitasa de *Aspegillus níger* (r-PhyA) y la fosfatasa ácida pH 2.5 de *Escherichia coli* (r-AppA) y encontraron que r-AppA incrementa su actividad hasta en un 30% de forma estable hasta por 120 min, concluyendo que se generan polipéptidos de r-AppA estables a la pepsina. Por otro lado, en este mismo estudio, r-AppA fue sensible a la tripsina conservando menos del 20% de actividad a los 30 min y perdiendo prácticamente toda la actividad a 120 min. Para el caso de r-PhyA, los resultados fueron inversos a los reportados para r-AppA, r-PhyA fue resistente a tripsina con una actividad residual de hasta un 85 %, pero sensible a pepsina perdiendo casi por completo la actividad a 120 min.

Los resultados del presente estudio coinciden con los resultados reportados por Rodríguez (Rodríguez *et al.*, 1999) en cuanto la estabilidad de las fitasas fúngicas a la tripsina, obteniendo valores de actividad residual desde un 50% hasta valores de 143%.

Respecto a las fitasas bacterianas, tanto PhyC-N y PhyC-R mostraron ser estables a los tratamientos con las enzimas digestivas de camarón y tripsina porcina con valores de actividad relativa por arriba del 80 %, exceptuando la PhyC-R que fue sensible a las enzimas de hepatopáncreas en el tratamiento prolongado por 120 min. Cabe mencionar que el tiempo aproximado de la digestión del camarón Blanco del Pacífico es de 30 min, por lo cual el tiempo de 120 min es cuatro veces mayor del requerido en un tratamiento *in vivo*. Los resultados obtenidos corroboran con los obtenidos previamente por Kerovuo y colaboradores (Kerovuo *et al.*, 2000b) y de acuerdo a estos resultados se puede considerar que tanto PhyC-N como PhyC-R pueden ser estables a la acción de tripsina tanto en el tracto digestivo del camarón Blanco del Pacífico como en el intestino del cerdo, sin embargo el pH ácido del estómago del cerdo no favorecen la acción de estas enzimas. En contraste con PhyC-N y PhyC-R, FTE fue mucho más estable bajo el tratamiento de tripsina porcina que con las enzimas del hepatopáncreas, por lo cual es de

considerar que esta enzima es más apta, en cuanto estabilidad a proteasas, para el tracto digestivo del cerdo que para camarón. Por otro lado, los altos niveles de actividad relativa de FTE bajo el tratamiento de tripsina porcina, sugieren la generación de polipéptidos estables a tripsina porcina y con mayor actividad que la proteína original, sin embargo se requieren de más estudios para corroborar la producción de estos péptidos.

En este trabajo se evaluó el valor de la K_m de PhyC-R utilizando como sustrato el fitato de sodio, obteniendo una K_m aparente de 0.5 mM mediante la representación de Michaelis-Menten, también se evaluó mediante la representación de Lineweaver-Burk obteniendo un valor de K_m aparente de 0.4 mM, estos valores de K_m son similares a los reportados para las fitasas de *Bacillus* entre un rango de 0.5 mM (Vohra & Satyanarayana, 2003) a 0.05 mM (Powar & Jagannathan, 1982). Shimizu en el 1992 (Shimizu, 1992) reportó una K_m de 0.5 mM para la fitasa producida por *B. subtilis* (natto), mientras que Kerovuo y colaboradores (Kerovuo *et al.*, 2000a) reportaron una K_m de 0.2 mM para la fitasa C de *B. subtilis*. Finalmente se utilizó la representación de Eadie-Hofstee en donde claramente se observó que no sigue esta ecuación, por lo tanto podemos confirmar que los valores de las cinéticas de la PhyC-R no siguen el modelo enzimático de Michaelis Menten. Powar y Jagannathan en el 1982 (Powar & Jagannathan, 1982) reportaron que la reacción de la cinética enzimática de la fitasa *B. subtilis* es compleja al usar como sustrato ácido fítico (IP6), debido principalmente que durante la reacción se forman otros sustratos como IP5, IP4 e IP3.

La Fitasa C de *B. subtilis* (PhyC-R) producida en *Pichia pastoris*, posee algunas diferencias en sus propiedades bioquímicas respecto a la PhyC-N, a pesar de poseer secuencias aminoácidas idénticas. Estas diferencias pueden ser causadas por la glicosilación de PhyC-R producida en *Pichia pastoris*. La PhyC-N y la PhyC-R, son activas a pH básicos, teniendo su pH óptimo a 7.5 y 9 respectivamente. Ambas fitasas obtuvieron su temperatura óptima a 55°C, sin embargo la PhyC-R retuvo más actividad a temperaturas bajas en comparación de la PhyC-N. Los iones Ca^{2+} estabilizan las fitasas de *Bacillus* (PhyC-N y PhyC-R) al comparar el comportamiento en la termoestabilidad a 80°C, la PhyC-R mostró la más alta actividad residual a pH 5.5 (85%) y la PhyC-N presentó la más alta actividad residual a pH 7.5 (68%). Las dos fitasas (PhyC-N y PhyC-

R) fueron estables al ataque proteolítico de las enzimas digestivas de camarón y a la enzima tripsina porcina. Resultados similares a los obtenidos por Keruvuo y colaboradores en el 2000 (Keruvuo *et al.*, 2000b) para la Fitasa C, en donde se observó una estabilidad frente proteasas tales como la tripsina, papaina y pancreatina reteniendo un 100% de su actividad residual, incluso en altas concentraciones de proteasa, sin embargo no existen otros estudios hasta el momento de la estabilidad de las fitasas frente a enzimas digestivas de camarón, en este estudio se demuestra que las fitasas de *Bacillus* son estables a las enzimas digestivas de camarón las cuales contienen un cóctel de proteasas entre las cuales se encuentran tripsina, quimiotripsina, elastasa, catepsina L entre otras, presentando mayor actividad específica la quimiotripsina .

Las fitasas de *Bacillus* pertenecen a la clase de fitasas alcalinas (Oh, *et al.*, 2004) dicha afirmación se confirmó con los resultados obtenidos durante este trabajo, de igual manera se confirmaron las propiedades bioquímicas de las fitasas comerciales del género *Aspergillus* como pertenecientes a la subclase de fitasas ácidas de histidina (HAP) presentando actividad a pH ácidos (Oh, *et al.*, 2004).

En este trabajo se realizó por primera vez la caracterización bioquímica de dos formas recombinantes de fitasas de origen bacteriano producidas en *Pichia pastoris*. La Fitasa C recombinante (PhyC-R), es producida de forma natural en *Bacillus subtilis* y reportada como Fitasa C nativa (PhyC-N) y la FTE es una forma recombinante que posee un 99 % de similitud a la fitasa DS11 de *B. amyloliquefacies*.

Las fitasas fúngicas comerciales evaluadas en este trabajo presentarían limitaciones en su aplicación *in vivo* para aumentar la disponibilidad fósforo fítico en preparaciones nutrimentales para camarón y en especies fisiológicamente afines, debido a que carecen de actividad a valores de pH de neutros a básicos, a pesar de que sean estables a las enzimas digestivas de esta especie. Otro inconveniente sería la termoestabilidad de estas enzimas, ya que perderían hasta un 50 % de su actividad en los procesos de peletizados a 80°C.

A pesar de que la FTE es activa los intervalos de pH de 5.5 a 9, igual que la PhyC-R, y a intervalos de temperatura de 25 a 45°C, estable a 60 y 80°C (pH 5.5 a 5 mM CaCl₂), la inestabilidad a pH 7.5 y a la acción de las preparaciones de hepatopáncreas del camarón Blanco del Pacífico, hacen que esta enzima no sería viable

para aplicarse como aditivo en las preparaciones nutrimentales para el camarón Blanco del Pacífico y especies con características fisiológicas semejantes mediante una acción *in vivo*. De la misma manera, esta enzima sería ineficiente para ser aplicada en procesos industriales para disponer del fósforo fítico en harinas de origen vegetal con alto contenido de fitato, en condiciones de pH neutras.

Tomando en consideración que los intervalos de pH (5.5 a 9) y de temperatura (25 a 55°C) en los cuales presentó actividad la PhyC-R, la estabilidad presentada a 60 y 80°C (pH 5.5 a 5mM CaCl₂) y a la acción de las preparaciones de hepatopáncreas del camarón Blanco del Pacífico, esta enzima es una alternativa viable para aplicarse como aditivo en las preparaciones nutrimentales para el camarón Blanco del Pacífico y en especies con características fisiológicas semejantes para obtener una mayor disponibilidad de fósforo fítico y por consecuencia una mejor disponibilidad de otros nutrientes mediante una acción *in vivo*.

A pesar de que la PhyC-R, mostró ser estable al tratamiento de la tripsina porcina, su baja actividad a valores de pH ácidos la hacen inapropiada para aplicarse como aditivo en preparaciones nutrimentales para cerdos para su acción *in vivo*. Sin embargo, esta enzima puede ser aplicada en procesos industriales para disponer del fósforo fítico en harinas de origen vegetal con alto contenido de fitato, en condiciones de pH neutras y a temperatura ambiente, ofreciendo una ventaja técnica y económica competitiva respecto a las fitasas fúngicas comerciales que requieren de trabajar a valores de pH ácidos.

Los valores de Km obtenidos para la PhyC-R y la baja actividad específica inherente a esta clase de enzimas y la controversia sobre la necesidad de liberar los 6 grupos fosfatos del fitato, son aspectos que desfavorecen el empleo de esta fitasa para fines industriales. Sin embargo, la opción de producción de este tipo de fitasas en *Pichia pastoris*, ofrece una buena alternativa para producirla de forma industrial a costos bajos. Por lo cual un objetivo a futuro será el de contar con cepas y procesos de producción competitivos, además estas enzimas serían una opción de primera elección para su aplicación en especies con tractos digestivos fisiológicamente activos a valores de pH neutros o especies agastricas con éstas características fisiológicas.

Tabla XXI. Valores de propiedades bioquímicas de las fitasas evaluadas.

Parámetros	PhyC-N	PhyC-R	FTE	Natuphos	Allzyme SSF
PM	≈ 41 y 44 kDa	≈ 51 kDa	≈ 54 kDa	≈ 60 kDa	≈ 60 kDa
pH óptimo	7.5	9.0	7.5	5.5	5.5
Temperatura óptima	55 °C	55 °C	45 °C	45 °C	45 °C
* Actividades enzimáticas relativas a diferentes temperaturas	80 °C	12%	4%	1%	1%
	70 °C	36%	11%	8%	1%
	55 °C	100%	100%	17%	24%
	45 °C	20%	63%	100%	100%
	37 °C	15%	51%	92%	78%
25 °C	8	23%	87%	55%	28%
** Termoestabilidad a 60°C	1 mM CaCl₂ pH 7.5 = 86% 5 mM CaCl₂ pH 5.5 = 90% pH 7.5 = 104%	5 mM CaCl₂ pH 5.5 = 95% pH 7.5 = 102%	5 mM CaCl₂ pH 5.5 = 106%	1 mM CaCl₂ pH 5.5 = 60%	1 mM CaCl₂ pH 5.5 = 18%
** Termoestabilidad a 80°C	5 mM CaCl₂ pH 7.5 = 68%	5 mM CaCl₂ pH 5.5 = 85%	1 mM CaCl₂ pH 5.5 = 83% 5 mM CaCl₂ pH 5.5 = 79%	1 mM CaCl₂ pH 5.5 = 48%	1 mM CaCl₂ pH 5.5 = 65%
** Susceptibilidad a Hp 1X, 30 min.	84%	90%	93%	79%	116%
** Susceptibilidad a Hp. 10X, 30 min.	100%	102%	28%	75%	102%
** Susceptibilidad a Hp. 40X, 30 min.	94%	67%	0%	100%	116%
** Susceptibilidad a Tripsina 1X, 30 min.	83%	98%	134%	99%	108%
** Susceptibilidad a Tripsina 10X, 30 min.	106%	108%	145%	113%	97%
Estabilidad	√	√	---	√	√
KM	ND	≈ 0.5 mM	ND	ND	ND

* Es el porcentaje de actividad respecto al valor de actividad más alto

** Expresada en actividad residual como el porcentaje de actividad respecto al valor inicial

√: Fitasa estable a 37°C durante 120 min.

ND: No determinada

8. CONCLUSIONES

En este trabajo se realizó por primera vez la caracterización bioquímica de dos formas recombinantes de fitasas de origen bacteriano producidas en *Pichia pastoris*. La Fitasa C recombinante (PhyC-R), es producida de forma natural en *Bacillus subtilis* y reportada como Fitasa C nativa (PhyC-N) y la FTE es una forma recombinante que posee un 99 % de similitud a la fitasa DS11 de *B. amyloliquefacies*.

Se realizó una valoración del potencial de aplicación de las fitasas bacterianas recombinantes a través del estudio comparativo de las propiedades bioquímicas de éstas, la fitasas C nativa y dos fitasas fúngicas comerciales.

Los resultados del presente estudio muestran que la Fitasa C nativa resultó poseer propiedades bioquímica semejantes a las previamente reportadas en la literatura, en cuanto a su tamaño molecular, pH, temperatura óptima, termoestabilidad y estabilidad a la acción de la tripsina porcina, además se reporta por primera vez que esta enzima es estable a la acción de las enzimas digestivas del hepatopáncreas del camarón Blanco del Pacífico.

En este trabajo se reporta por primera vez la inestabilidad de PhyC-N a pH de 5.5 y 80°C aún en presencia de 5 mM de CaCl₂, haciendo que esta enzima no sea apta para tratamientos térmicos, bajo condiciones de pH ácidos, limitando su empleo bajo estas condiciones.

La forma recombinante de la Fitasa C (PhyC-R) producida en *Pichia pastoris* resultó poseer propiedades bioquímica diferentes a su forma nativa (PhyC-N), a pesar de compartir una secuencia aminoácídica idéntica.

Las diferencias presentadas por PhyC-R respecto a PhyC-N en cuanto a su pH óptimo, perfil de actividad a diferentes temperaturas, termoestabilidad a 80°C, Km y tamaño molecular podrían haber sido causadas por la glicosilación presente en PhyC-R.

La enzima FTE se caracterizó por tener una temperatura óptima menor que la reportada para la fitasa DS11, un perfil de actividad a temperaturas menores que la óptima 45°C y fue más sensible a los tratamiento térmicos que los reportados para DS11, además fue más estable a los tratamientos térmicos a pH 5.5 y muy inestable a pH 7.5.

Las diferencias en las propiedades bioquímicas encontradas entre la FTE y las reportadas para la fitasa DS11, son probablemente determinadas por las diferencia en los solo 5 aminoácidos entre estas dos enzimas y la glicosilación presente en la FTE.

Con excepción de la FTE, todas las fitasas evaluadas en este trabajo fueron estables a 37°C por 120 min en 1 mM CaCl₂ al pH óptimo cada enzima.

La inestabilidad de la FTE a 37°C (pH 7.5) puede ser debido a la sustitución del aspártico 336 por asparagina, ya que el aspártico 336 es uno de los aminoácidos que interactúa con iones de calcio para conferir estabilidad a este tipo de proteínas.

Las fitasas comerciales presentaron actividad en intervalo de pH de 2.5 a 5.5 y ausencia total de actividad a pH 7.5, mientras que las fitasas bacterianas presentaron la mayor actividad a pH de neutros a básicos, sin embargo conservaron hasta un 68% de actividad a pH de 5.5.

El hecho de que las fitasas bacterianas (PhyC-N, PhyC-R y FTE) sean activas a pH de neutro a básicos, las hacen candidatas potenciales para ser empleadas como aditivo en la alimentación de aquellas especies animales, en las cuales el pH de los tractos digestivos sean de neutros a básicos, o bien en especies agástricas como es el caso de algunos peces y crustáceos como el camarón Blanco del Pacífico.

El intervalo más amplio de pH en el que presentan actividad las fitasas PhyC-N y PhyC-R, les proporciona una mayor versatilidad en su aplicación, siendo buenas candidatas para su potencial empleo en procesos industriales para mejorar la disponibilidad del fósforo fítico en harinas vegetales ricas en fitato realizados en condiciones neutras.

En el comportamiento del efecto de la temperatura, las enzimas en estudio se pueden separar en dos grupos, Natuphos y Allzyme SSF y FTE con actividad en un intervalo de 25 a 55°C y un segundo grupo la PhyC-N y la PhyC-R con actividad en un intervalo de temperatura más amplio de 25 a 70°C.

Las fitasas bacterianas, la PhyC-R y FTE serán más eficientes que la PhyC-N en procesos que requieran temperaturas en intervalos de 25 a 45°C, y mostraron ser competitivas con las fitasas comerciales en cuanto a esta propiedad. La FTE fue la enzima con mayor actividad relativa en este intervalo de temperatura que todas las fitasas evaluadas.

Las fitasas bacterianas fueron más termoestables a 60°C que las fitasas comerciales, dependiendo dicha termoestabilidad de las condiciones de pH y concentración de calcio.

Las PhyC-R y FTE fueron más termoestables a 80°C que la PhyC-N y las fitasas fúngicas comerciales y se debe de considerar que esta termoestabilidad depende del pH y la concentración de calcio presente en el proceso.

En esta investigación se realizaron por primera vez, ensayos de susceptibilidad frente a enzimas digestivas del camarón Blanco del Pacífico, los resultados muestran que las diferentes fitasas evaluadas, excepto la FTE, fueron estables al tratamiento con las preparaciones de hepatopancreas de esta especie.

La PhyC-N, PhyC-R y las dos fitasas comerciales mostraron ser estables al tratamiento con las enzimas digestivas de camarón y tripsina porcina con valores de actividad relativa por arriba del 80 %.

La FTE mostró ser susceptible al tratamiento con enzimas digestivas de camarón, pero mostró ser estable a la tripsina porcina con actividades residuales por arriba del 100%, estos resultados sugieren la generación de polipéptidos estables a tripsina porcina y con mayor actividad que la proteína original.

Tomando en consideración que los intervalos de pH (5.5 a 9) y de temperatura (25 a 55°C) en los cuales presentó actividad la PhyC-R, la estabilidad presentada a 60 y 80°C (pH 5.5 a 5 mM CaCl₂) y a la acción de las preparaciones de hepatopáncreas del camarón Blanco del Pacífico, esta enzima es una alternativa viable para aplicarse como aditivo en las preparaciones nutrimentales para el camarón Blanco del Pacífico y en especies con características fisiológicas semejantes para obtener una mayor disponibilidad de fósforo fítico y por consecuencia una mejor disponibilidad de otros nutrientes mediante una acción *in vivo*.

Debido a la termoestabilidad presentada por la PhyC-R a 80°C, esta enzima se puede someter al tratamiento de peletizado hasta 80°C, siempre y cuando el proceso se mantenga controlando el pH 5.5 y la concentración de calcio a 5 mM, esta propiedad ofrece una ventaja competitiva sobre las dos fitasas comerciales evaluadas.

A pesar de que la PhyC-R, mostró ser estable al tratamiento de la tripsina porcina, su baja actividad a valores de pH ácidos la hacen inapropiada para aplicarse

como aditivo en preparaciones nutrimentales para cerdos para su acción *in vivo*. Sin embargo, esta enzima puede ser aplicada en procesos industriales para disponer del fósforo fítico en harinas de origen vegetal con alto contenido de fitato, en condiciones de pH neutras y a temperatura ambiente, ofreciendo una ventaja técnica y económica competitiva respecto a las fitasas fúngicas comerciales que requieren de trabajar a valores de pH ácidos.

A pesar de que la FTE es activa los intervalos pH de 5.5 a 9, igual que la PhyC-R, y a intervalos de temperatura de 25 a 45°C, estable a 60 y 80°C (pH 5.5 a 5 mM CaCl₂), la inestabilidad a pH 7.5 y a la acción de las preparaciones de hepatopáncreas del camarón Blanco del Pacífico, hacen que esta enzima no sea viable para aplicarse como aditivo en las preparaciones nutrimentales para el camarón Blanco del Pacífico y especies con características fisiológicas semejantes mediante una acción *in vivo*. De la misma manera, esta enzima sería ineficiente para ser aplicada en procesos industriales para disponer del fósforo fítico en harinas de origen vegetal con alto contenido de fitato, en condiciones de pH neutras.

Las fitasas fúngicas comerciales evaluadas en este trabajo presentarían limitaciones en su aplicación *in vivo* para aumentar la disponibilidad fósforo fítico en preparaciones nutrimentales para camarón y en especies fisiológicamente afines, debido a que carecen de actividad a valores de pH de neutros a básicos, a pesar de que sean estables a las enzimas digestivas de esta especie. Otro inconveniente sería la termoestabilidad de estas enzimas, ya que perderían hasta un 50 % de su actividad en los procesos de peletizados a 80°C.

APÉNDICES

APÉNDICE A

Preparación de medios, soluciones y reactivos

Ácido ascórbico 10 % (actividad de fitasa)

Disolver 1.0 g de ácido ascórbico en 100 mL de agua ultrapura. Almacenar a temperatura ambiente.

Ácido clorhídrico (HCl) 1 M

Mezclar 91.38 mL de agua ultrapura con 8.62 mL de HCl concentrado.

Acido sulfúrico 6 N (actividad de fitasa)

Mezclar 32 mL de ácido sulfúrico concentrado con 168 mL de agua ultrapura (el ácido sulfúrico se agrega despacio para que no reaccione con el agua). Almacenar a temperatura ambiente.

Acido tricloroacético (TCA) 15 % (actividad de fitasa)

Disolver 15 g de ácido tricloroacético en 100 mL de agua ultrapura. Almacenar a temperatura ambiente.

Acrilamida-bisacrilamida (SDS-PAGE)

Disolver 30 g de acrilamida y 0.8 g de bisacrilamida en 60 mL de agua bidestilada (acrilamida 30 %, bisacrilamida 0.8 %). Aforar a 100 mL y almacenar en frasco oscuro a 4°C.

Albúmina sérica bovina (ASB) 50 µg/µL (proteínas totales)

Disolver 5 mg de ASB en 3 mL de agua bidestilada y aforar 5 mL (ASB 1 µg/µL). Tomar 250 µL de esta solución y aforar a 5 mL con agua bidestilada. Almacenar a 4 °C.

Azul brillante de Coomassie (SDS-PAGE)

Disolver 0.05 g de azul brillante de Coomassie R250 en 30 mL de agua bidestilada. Agregar 50 mL de metanol y 10 mL de ácido acético (azul brillante de Coomassie R250 0.05 %, metanol 50 %, ácido acético 10 %). Aforar a 100 mL. Almacenar a temperatura ambiente en un frasco ámbar.

Azul brillante de Coomassie (proteínas totales)

Disolver 10 mg de azul brillante de Coomassie G-250 en 5 mL de etanol al 95 %, agitar vigorosamente. Agregar 10 mL de ácido fosfórico al 85 %. Mezclar vigorosamente por 20 a 30 min, aforar a 100 mL con agua bidestilada, agitar nuevamente por 20 a 30 min y filtrar con papel Whatman no. 1 para eliminar el colorante no disuelto. Almacenar en un frasco ámbar a 4 °C.

B 500X (Biotina 0.02 %) (medios de cultivo)

Disolver 20 mg de biotina en 100 mL de agua bidestilada y esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C. La vida media de esta solución es de aproximadamente 1 año.

Buffer 360 mM acetato de sodio pH 5.5-1 mM CaCl₂ (actividad de fitasa)

Disolver 2.95 g de acetato de sodio, 305 µL de ácido acético glacial y 100 µL de 1 M CaCl₂ en 80 mL de agua ultrapura. Ajustar el pH a 5.5 con 1 M de NaOH y aforar a 100 mL con agua ultrapura. Esterilizar en autoclave y almacenar en alícuotas de 10 mL a temperatura ambiente.

Buffer de corrimiento para proteínas 5X (SDS-PAGE)

Disolver 1.51 g de Tris [Trizma base o Tris (hidroxi-metil) aminometano], 7.2 g de glicina y 0.5 g de SDS, en 80 mL de agua bidestilada. Aforar a 100 mL. Solución de trabajo: mezclar 30 mL de buffer 5X con 150 mL de agua bidestilada.

Buffer 1 M fosfato de potasio, pH 6.0 (medios de cultivo)

Disolver 10.1 g de K_2HPO_4 y 128.2 g de KH_2PO_4 en 80 mL de agua bidestilada, ajustar el pH a 6.0 con HCl concentrado o KOH, aforar a 100 mL y esterilizar en autoclave. Almacenar a temperatura ambiente, estable más de 1 año.

Buffer de muestra pH 6.8, 2X (SDS-PAGE)

Mezclar 20 mL de buffer Tris-HCl/SDS 0.5 M pH 6.8 4X, con 20 g de glicerol, 4 g de SDS, 2 mL de β -mercaptoetanol y 1 mg de azul de bromofenol, en 40 mL de agua ultrapura y aforar a 100 mL. (Tris-HCl/SDS 0.1M pH 6.8 4X, glicerol 20 %, SDS 4 %, azul de bromofenol 0.001%) Hacer alícuotas de 1 mL y almacenar a $-20^\circ C$.

Buffer 250 mM Glicina-HCl pH 2.5-1 mM $CaCl_2$ (actividad de fitasa)

Disolver 1.87 g glicina y 100 μL de 1 M $CaCl_2$ en 80 mL de agua ultrapura. Ajustar el pH a 2.5 con HCl concentrado y aforar a 100 mL con agua ultrapura. Esterilizar en autoclave y almacenar en alícuotas de 10 mL a temperatura ambiente.

Buffer 1 M Tris-HCl

Disolver 12.11 g de tris base en 70 mL de agua ultrapura. Ajustar al pH deseado con HCl concentrado. Aforar a 100 mL con agua ultrapura. Esterilizar por autoclave y almacenar a temperatura ambiente.

Buffer 100 mM Tris-HCl pH 7.5-1 mM $CaCl_2$ (actividad de fitasa)

Mezclar 10 mL de buffer 1 M Tris-HCl, pH 7.5, 100 μL de 1 M $CaCl_2$ y 80 mL de agua ultrapura. Ajustar el pH a 7.5 con HCl concentrado y aforar a 100 mL. Esterilizar en autoclave y almacenar en alícuotas de 10 mL a temperatura ambiente.

Buffer 100 mM Tris-HCl pH 9 1 mM $CaCl_2$ (actividad de fitasa)

Mezclar 10 mL de buffer 1 M Tris-HCl, pH 7.5, 100 μL de 1 M $CaCl_2$ y 80 mL de agua ultrapura. Ajustar el pH a 9 con HCl concentrado y aforar a 100 mL con agua ultrapura. Esterilizar en autoclave y almacenar en alícuotas de 10 mL a temperatura ambiente.

Buffer 0.5 M Tris-HCl/SDS pH 6.8, 4X (SDS-PAGE)

Disolver 6.05 g de tris base y 0.4 g de SDS en 40 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH a 6.8 con 1 N HCl. Aforar a 100 mL con agua bidestilada (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, SDS 0.4 %). Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C. Solución estable por 1 mes.

CaCl₂ 1 M (actividad de fitasa)

Disolver 14.7 g de CaCl₂·2H₂O en 80 mL de agua ultrapura. Aforar a 100 mL con agua ultrapura, esterilizar por filtración o autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

D 10X (Dextrosa 20 %) (medios de cultivo)

Disolver 20 g de D-glucosa en 100 mL de agua bidestilada. Distribuir en alícuotas de 40 mL, en tubos cónico estériles de 50 mL. Esterilizar por filtración o autoclave. Estable por 1 año a temperatura ambiente.

Estándar de fosfato A: fosfato de potasio monobásico 5.18 mM (159.4 mg/mL) (actividad de fitasa)

Disolver 70.19 mg de fosfato de potasio monobásico anhidro (KH₂PO₄) en 50 mL de agua ultrapura y aforar a 100 mL con agua ultrapura. Almacenar en alícuotas de 600 µL en tubos cónicos de 1.5 mL a -20°C.

Estándar de fosfato B: fosfato de potasio monobásico 2.59 mM (79.7 mg/mL) (actividad de fitasa)

Disolver 35.094 mg de fosfato de potasio monobásico anhidro (KH₂PO₄) en 50 mL de agua ultrapura y aforar a 100 mL con agua ultrapura. Almacenar en alícuotas de 600 µL en tubos cónicos de 1.5 mL a -20°C.

**Estándar de fosfato C: fosfato de potasio monobásico 0.518 mM (15.94 mg/mL)
(actividad de fitasa)**

Hacer una dilución 1:10 del estándar A con agua ultrapura, tomar 5 mL de esta dilución y aforar a 50 mL con agua ultrapura. Almacenar en alícuotas de 600 μ L en tubos cónicos de 1.5 mL a -20°C .

Extracto de salvado de trigo

Disolver 10 g de cascarilla de salvado de trigo en 100 mL de agua ultrapura. Esterilizar en autoclave (120°C , durante 60 min), dejar enfriar durante toda la noche, después filtrar con una tela de gasa (seis capas) obteniendo el extracto de salvado de trigo el cual se lleva al volumen inicial. Esta solución se utiliza para la preparación del medio de salvado de trigo y se utiliza el día de la preparación (extracto utilizado para la elaboración del medio de salvado de trigo).

Fitato de sodio 2 mM (actividad de fitasa)

Disolver 18.4 mg de fitato de sodio en 10 mL de buffer 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM CaCl_2 .

GY 10X (medios de cultivo)

Mezclar 10 g de glicerol con 90 mL de agua bidestilada y esterilizar en autoclave o por filtración (Glicerol 10 %). Almacenar a temperatura ambiente. La vida media de esta solución es de más de 1 año.

Hidróxido de sodio 1 M (1 N)

Disolver 40 g de NaOH en 80 mL de agua ultrapura, aforar a 100 mL de agua ultrapura.

Medio BMG /BMGH (amortiguado con o sin histidina)

Mezclar 69.8 mL de agua bidestilada estéril, 10 mL de buffer de 1 M fosfato de potasio pH 6.0, 10 mL de YNB 10X, 10 mL de GY 10X y 0.2 mL de B 500X. Para hacer BMGH adicionar 1 mL de la solución de H 100X y utilizar 68.8 mL de agua destilada estéril (fosfato de potasio 100 mM pH 6.0, YNB 1.34%, biotina 4×10^{-5} %, glicerol 1%)

Almacenar a 4°C. La vida media de esta solución es de aproximadamente 2 meses. Para preparar placas adicionar al agua 15 g de agar.

Medio BMM amortiguado

Mezclar 69.8 mL de agua bidestilada esteril 10 mL de buffer de 1 M fosfato de potasio pH 6.0, 10 mL de YNB 10X, 10 mL de GY 10X y 0.2 mL de B 500X. (fosfato de potasio 100 mM pH 6.0, YNB 1.34%, biotina 4×10^{-5} %, metanol 0.75 Almacenar a temperatura ambiente en alícuotas de 25 mL. Al momento de inocular el cultivo, adicionar 187.5 μ L de metanol absoluto por cada 25 mL de medio. La vida media de esta solución es de aproximadamente 2 meses.

Medio de salvado de trigo

Disolver 0.4 mg de fosfato dibásico anhidro (K_2HPO_4), 0.5 g de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), 40 mg de sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$), 20 mg sulfato de magnesio ($MgSO_4$), 1 g de caseína en 100 mL de extracto de salvado de trigo, esterilizar en autoclave. Esta solución se utiliza el día de preparación.

Medio YPD

Disolver 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, y 20 g de glucosa en 1000 mL de agua destilada (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 1%). Esterilizar en autoclave y almacenar a temperatura ambiente o 4 °C. La vida media de esta solución es de varios meses.

Molibdato de Amonio 2.5 % (actividad de fitasa)

Disolver 2.5 g de molibdato de amonio en 100 mL de agua ultrapura. Almacenar a temperatura ambiente.

Persulfato de amonio 10% (SDS-PAGE)

Disolver 2 g de persulfato de amonio en 20 mL de agua bidestilada. Almacenar a 4 °C.

Reactivo A (actividad de fitasa)

Preparar previo al momento de realizar la curva de calibración de fósforo y después de realizar la reacción enzimática de determinada muestra. Mezclar 20 mL de agua ultrapura con 10 mL de 6 N ácido sulfúrico, 10 mL de molibdato de amonio (2.5%), y 10 mL de ácido ascórbico (10%) recién preparado.

SDS 10 % (Dodecil Sulfato de Sodio) (SDS-PAGE)

Disolver 10 g de SDS en 90 mL de agua bidestilada. Calentar a 68 °C para facilitar su disolución.

Solución decolorante (SDS-PAGE)

Mezclar 5 mL de metanol con 7 mL de ácido acético, y aforar con agua bidestilada a 100 mL (metanol 5 %, ácido acético 7%). Almacenar a temperatura ambiente.

Solución Fijadora (SDS-PAGE)

Mezclar 250 mL de metanol, con 50 mL de ácido acético y aforar con agua bidestilada a 500 mL (metanol 50 %, ácido acético 10 %). Almacenar a temperatura ambiente.

YNB 10X (medios de cultivo)

Disolver 13.4 g de base nitrogenada de levadura (YNB) con sulfato de amonio y sin aminoácidos en 100 mL de agua bidestilada y esterilizar por filtración o autoclave (Base nitrogenada de levadura con sulfato de amonio sin aminoácidos 13.4 %). Almacenar a 4 °C. La vida media de esta solución es de aproximadamente 1 año.

APÉNDICES

APÉNDICE B

Tablas con resultados de la caracterización bioquímica

Tabla de valores de actividad relativa a diferentes pH a 37°C y 1 mM de CaCl₂ expresada en porcentaje respecto al valor más alto de actividad de cada fitasa. Cada valor representa la media de al menos tres determinaciones con un coeficiente de variación menor de 5% (C.V. < 5%).

Enzimas	Actividad relativa (%)				
	pH	2.5	5.5	7.5	9.0
PhyC-N		2	59	100	93
PhyC-R		4	67	90	100
FTE		8	68	100	27
Natuphos		63	100	0	0
Allzyme SSF		37	100	0	0

Tabla de valores de actividad relativa a diferentes temperaturas a 1 mM de CaCl₂ expresada en porcentaje respecto al valor más alto de actividad de cada fitasa. Cada valor representa la media de al menos tres determinaciones con un coeficiente de variación menor de 5% (C.V. < 5%).

Enzimas	Actividad relativa (%)						
	Temperatura	25 °C	37 °C	45 °C	55°C	70°C	80 °C
PhyC-N		8	15	20	100	36	12
PhyC-R		23	51	63	100	11	4
FTE		87	92	100	17	8	1
Natuphos		55	78	100	59	1	0
Allzyme SSF		28	55	100	24	1	1

Tabla con valores de la estabilidad a 37°C y 1 mM CaCl₂ la actividad relativa es expresada en porcentaje respecto al valor inicial de cada fitasa. Cada valor representa la media de al menos tres determinaciones con un coeficiente de variación menor de 5% (C.V. < 5%).

Enzimas	Actividad relativa (%)			
	0 min	10 min	30 min	120 min
PhyC-N	100	105	107	113
PhyC-R	100	95	99	105
FTE	100	76	51	2
Natuphos	100	93	95	92
Allzyme SSF	100	106	97	78

Tabla con valores de actividad residual a 37°C y 10 min a diferentes condiciones experimentales. Actividad residual se expresa en porcentaje respecto al valor de actividad inicial. Cada valor representa la media de al menos tres determinaciones.

Enzima	Termoestabilidad a 37°C				
	Actividad residual (%)				
	PhyC-N	PhyC-R	FTE	Natuphos	Allzyme SSF
1 mM CaCl ₂ (pH 5.5)	96±7	109±1	104±3	78±2	83±3
5 mM CaCl ₂ (pH 5.5)	103±8	120±6	100±6	ND	ND
1 mM CaCl ₂ (pH 7.5)	89±5	79±2	88±4	0±1	0±1
5 mM CaCl ₂ (pH 7.5)	88±3	87±4	101±4	ND	ND

ND= No determinado

Tabla con valores de actividad residual a 60°C y 10 min a diferentes condiciones experimentales. Actividad residual se expresa en porcentaje respecto al valor de actividad inicial. Cada valor representa la media de al menos tres determinaciones.

Enzima	Termoestabilidad a 60°C				
	Actividad residual (%)				
	PhyC-N	PhyC-R	FTE	Natuphos	Allzyme SSF
1 mM CaCl ₂ (pH 5.5)	56±11	5±1	67±5	60±2	18±3
5 mM CaCl ₂ (pH 5.5)	90±14	95±8	106±2	ND	ND
1 mM CaCl ₂ (pH 7.5)	86±8	65±5	2±1	0±1	0±1
5 mM CaCl ₂ (pH 7.5)	104±7	102±1	42±2	ND	ND

ND= No determinado

Tabla con valores de actividad residual a 80°C y 10 min a diferentes condiciones experimentales. Actividad residual se expresa en porcentaje respecto al valor de actividad inicial. Cada valor representa la media de al menos tres determinaciones.

Enzima	Termoestabilidad a 80°C				
	Actividad residual (%)				
	PhyC-N	PhyC-R	FTE	Natuphos	Allzyme SSF
1 mM CaCl ₂ (pH 5.5)	7±4	0±7	83±2	48±3	65±6
5 mM CaCl ₂ (pH 5.5)	11±1	85±2	79±3	ND	ND
1 mM CaCl ₂ (pH 7.5)	2±2	36±5	0±1	0±2	0±1
5 mM CaCl ₂ (pH 7.5)	68±4	36±7	30±1	ND	ND

ND= No determinado

Tabla con valores de actividad residual de la PhyC-N a 37, 60 y 80°C durante 10 min. Cada valor representa la media de al menos tres determinaciones.

Actividad residual (%)				
PhyC-N	1 mM CaCl ₂ (pH 5.5)	5 mM CaCl ₂ (pH 5.5)	1 mM CaCl ₂ (pH 7.5)	5 mM CaCl ₂ (pH 7.5)
37 °C	96±7	103±8	89±5	89±3
60 °C	56±11	90±14	86±8	104±7
80 °C	7±4	11±1	2±2	68±4

Tabla con valores de actividad residual de la PhyC-R a 37, 60 y 80°C durante 10 min. Cada valor representa la media de al menos tres determinaciones.

Actividad residual (%)				
PhyC-R	1 mM CaCl ₂ (pH 5.5)	5 mM CaCl ₂ (pH 5.5)	1 mM CaCl ₂ (pH 7.5)	5 mM CaCl ₂ (pH 7.5)
37 °C	109±1	120±6	79±2	87±4
60 °C	5±5	95±8	65±5	102±0
80 °C	0±7	85±2	36±5	36±7

Tabla con valores de actividad residual de la FTE a 37, 60 y 80°C durante 10 min. Cada valor representa la media de al menos tres determinaciones.

Actividad residual (%)				
FTE	1 mM CaCl₂ (pH 5.5)	5 mM CaCl₂ (pH 5.5)	1 mM CaCl₂ (pH 7.5)	5 mM CaCl₂ (pH 7.5)
37 °C	104±3	100±6	88±4	101±4
60 °C	67±5	106±2	2±1	42±2
80 °C	83±2	79±3	0±1	30±1

Tabla con valores de actividad residual de la enzimas comerciales (Natuphos y Allzyme SSF) a 37, 60 y 80°C durante 10 min. Cada valor representa la media de al menos tres determinaciones.

Actividad residual (%)		
Temperaturas	Natuphos	Allzyme SSF
	1 mM CaCl₂ (pH 5.5)	1 mM CaCl₂ (pH 5.5)
37 °C	78±2	83±3
60 °C	60±10	18±3
80 °C	48±3	65±6

Tabla con valores actividad residual de PhyC-N debido a la susceptibilidad a enzimas digestivas de camarón expresada en porcentaje respecto al valor de actividad inicial. Cada valor representa la media de al menos tres determinaciones.

PhyC-N	Actividad residual (%)			
	0 min	10 min	30 min	120 min
Tris *	100±6	105±7	107±7	113±7
Hp 1X	100±0	92±5	90±1	101±5
Hp 10X	100±5	113±2	108±4	109±5
Hp 40X	100±5	94±4	91±2	ND

ND= No determinado

Tris: ensayo control, contiene fitasa y tris en lugar de la enzima digestiva (Hp.)

Tabla con valores actividad residual de PhyC-R debido a la susceptibilidad a enzimas digestivas de camarón expresada en porcentaje respecto al valor de actividad inicial. Cada valor representa la media de al menos tres determinaciones.

PhyC-R	Actividad residual (%)			
	0 min	10 min	30 min	120 min
Tris	100±2	95±8	99±9	105±7
Hp 1X	100±3	97±3	90±3	96±2
Hp 10X	100±5	94±10	102±7	60±5
Hp 40X	100±3	86±3	62±4	ND

ND= No determinado

Tris: ensayo control, contiene fitasa y tris en lugar de la enzima digestiva (Hp.)

Tabla con valores actividad residual de FTE debido a la susceptibilidad a enzimas digestivas de camarón expresada en porcentaje respecto al valor de actividad inicial. Cada valor representa la media de al menos tres determinaciones.

FTE	Actividad residual (%)			
	0 min	10 min	30 min	120 min
Tris	100±6	76±7	51±8	2±6
Hp 1X	100±3	77±1	47±2	0±0
Hp 10X	100±3	51±0	14±4	0±0
Hp 40X	0±0	0±0	0±0	ND

ND= No determinado

Tris: ensayo control, contiene fitasa y tris en lugar de la enzima digestiva (Hp.)

Tabla con valores actividad residual de Natuphos debido a la susceptibilidad a enzimas digestivas de camarón expresada en porcentaje respecto al valor de actividad inicial. Cada valor representa la media de al menos tres determinaciones.

Natuphos	Actividad residual (%)			
	0 min	10 min	30 min	120 min
Tris	100±4	93±3	95±2	92±0
Hp 1X	100±2	90±2	75±2	46±1
Hp 10X	100±4	89±3	71±2	39±0
Hp 40X	100±1	122±3	91±4	ND

ND= No determinado

Tris: ensayo control, contiene fitasa y tris en lugar de la enzima digestiva (Hp.)

Tabla con valores actividad residual de Allzyme SSF debido a la susceptibilidad a enzimas digestivas de camarón expresada en porcentaje respecto al valor de actividad inicial. Cada valor representa la media de al menos tres determinaciones.

Allzyme SSF	Actividad residual (%)			
	0 min	10 min	30 min	120 min
Tris	100±9	93±13	95±4	92±7
Hp 1X	100±2	91±4	110±2	81±7
Hp 10X	100±5	106±9	97±0	78±5
Hp 40X	100±4	108±0	117±2	ND

ND= No determinado

Tris: ensayo control, contiene fitasa y tris en lugar de la enzima digestiva (Hp.)

Tabla con valores actividad residual de Allzyme SSF debido a la susceptibilidad a enzimas digestivas de camarón durante 30 min, expresada en porcentaje respecto al valor de actividad inicial. Cada valor representa la media de al menos tres determinaciones.

Actividad residual (%)					
	PhyC-N	PhyC-R	FTE	Natuphos	Allzyme SSF
Hp 1X	84±1	90±2	93±2	79±1	116±2
Hp 10X	100±4	103±7	28±6	75±1	102±0
Hp 40X	94±2	67±3	0±0	100±4	116±4

Tabla con valores actividad residual de Allzyme SSF debido a la susceptibilidad a enzimas digestivas de camarón durante 120 min, expresada en porcentaje respecto al valor de actividad inicial. Cada valor representa la media de al menos tres determinaciones.

Actividad residual (%)					
	PhyC-N	PhyC-R	FTE	Natuphos	Allzyme SSF
Hp 1X	92±6	92±1	0±0	50±0	88±6
Hp 10X	82±3	58±3	0±0	43±0	85±5

Tabla con valores actividad residual de PhyC-N debido a la susceptibilidad a la enzimas tripsina porcina expresada en porcentaje respecto al valor de actividad inicial. Cada valor representa la media de al menos tres determinaciones.

PhyC-N	Actividad residual (%)		
	0 min	10 min	30 min
Tris	100±7	102±10	105±7
Tripsina 1X	100±3	95±6	88±7
Tripsina 10X	100±10	94±10	112±11

Tris: ensayo control, contiene fitasa y tris en lugar de la enzima digestiva (Tripsina)

Tabla con valores actividad residual de PhyC-R debido a la susceptibilidad a la enzimas tripsina porcina expresada en porcentaje respecto al valor de actividad inicial. Cada valor representa la media de al menos tres determinaciones.

PhyC-R	Actividad residual (%)		
	0 min	10 min	30 min
Tris	100±4	95±6	93±5
Tripsina 1X	100±6	95±2	92±6
Tripsina 10X	100±10	103±2	108±12

Tris: ensayo control, contiene fitasa y tris en lugar de la enzima digestiva (Tripsina)

Tabla con valores actividad residual de FTE debido a la susceptibilidad a la enzimas tripsina porcina expresada en porcentaje respecto al valor de actividad inicial. Cada valor representa la media de al menos tres determinaciones.

FTE	Actividad residual (%)		
	0 min	10 min	30 min
Tris	100±4	88±5	66±4
Tripsina 1X	100±3	101±6	89±4
Tripsina 10X	100±2	96±6	96±1

Tris: ensayo control, contiene fitasa y tris en lugar de la enzima digestiva (Tripsina)

Tabla con valores actividad residual de Natuphos debido a la susceptibilidad a la enzimas tripsina porcina expresada en porcentaje respecto al valor de actividad inicial. Cada valor representa la media de al menos tres determinaciones.

Natuphos	Actividad residual (%)		
	0 min	10 min	30 min
Tris	100±0	94±4	92±5
Tripsina 1X	100±1	93±2	91±8
Tripsina 10X	100±8	104±2	104±2

Tris: ensayo control, contiene fitasa y tris en lugar de la enzima digestiva (Tripsina)

Tabla con valores actividad residual de Allzyme SSF debido a la susceptibilidad a la enzimas tripsina porcina expresada en porcentaje respecto al valor de actividad inicial. Cada valor representa la media de al menos tres determinaciones.

Allzyme SSF	Actividad residual (%)		
	0 min	10 min	30 min
Tris	100±8	86±4	92±4
Tripsina 1X	100±8	105±11	100±6
Tripsina 10X	100±7	89±5	114±6

Tris: ensayo control, contiene fitasa y tris en lugar de la enzima digestiva (Tripsina)

Tabla con valores actividad residual de PhyC-N debido a la susceptibilidad a la enzimas tripsina porcina durante 30 min, expresada en porcentaje respecto al valor de actividad inicial. Cada valor representa la media de al menos tres determinaciones.

Actividad residual (%)					
	PhyC-N	PhyC-R	FTE	Natuphos	Allzyme SSF
Tripsina 1X	83±6	98±7	134±5	99±8	108±6
Tripsina 10X	106±11	116±6	145±1	113±3	97±5

APÉNDICES

APÉNDICE B

Lista de Reactivos

Nombre del Reactivo	PM	Compañía de Venta
Fosfato monobásico de potasio (KH ₂ PO ₄)	136.09	<i>Fermont 35862</i>
Fosfato dibásico de potasio anhidro (K ₂ HPO ₄)	174.18	<i>Fermont 35842</i>
Sulfato de amonio (NH ₄) ₂ SO ₄	114.12	<i>Sigma A-4418</i>
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	246.47	<i>Fermont 63622</i>
Hidrolizado de caseína	-----	<i>Sigma C-0626</i>
Cloruro de calcio	74.55	<i>Sigma C-3306</i>
Base nitrogenada de levadura (YNB)	-----	<i>Sigma Y-0626</i>
Biotina	244.31	<i>Sigma B-4501</i>
Glicerol	92.10	<i>Fermont 06201</i>
Metanol	32.04	<i>Fermont 06125</i>
Ácido fítico ó fitato de sodio	923.8	<i>Sigma P-3168</i>
Trizma-base	121.14	<i>Sigma T-6066</i>
Acetato de sodio	82.03	<i>Sigma F-0670</i>
Ácido clorhídrico	36.46	<i>Productos Químicos Monterrey 01245</i>
Hidróxido de sodio	56.11	<i>Fermont 36901</i>
Ácido sulfúrico	98.08	<i>Productos Químicos Monterrey 01615</i>
Molibdato de amonio	1235.86	<i>Fermont 40051</i>
Ácido ascórbico	176.13	<i>Fermont 03121</i>
Ácido tricloroacético	163.13	<i>Fermont 03701</i>

Azul brillante de coomassie G-250	854.00	<i>Sigma B-0770</i>
Alcohol etílico 96° G.L:	46.07	<i>Jalmek A-3380-16</i>
Ácido fosfórico 85%	98.00	<i>Fermont 01335</i>
Acido acetico glacial	60.05	<i>Fermont 03015</i>
Acrilamida	71.08	<i>Sigma A-8887</i>
Bis-acrilamida	154.20	<i>Research-Organics 9540M</i>
dodecil sulfato de sodio SDS	288.38	<i>Promega-H-5114</i>
Glicina	75.07	<i>Sigma G-7126</i>
Persulfato de amonio	228.20	<i>Gibco BRL 11039D</i>
N,N,N',N'-Tetrametilendiamina TEMED	116.20	<i>Sigma T-9281</i>

LITERATURA CITADA

Adeola O. 1999. Effect of supplemental phytase on trace mineral availability for swine. In: Coelho MB, Kornegay ET (eds) Phytase in animal nutrition and waste management, 2nd rev. edn. BASF, Mexico, pp 465–480.

Al Asheh S, Duvnjak Z. 1994 Characteristics of phytase produced by *Aspergillus carbonarius* NRC 401121 in canola meal. Acta Biotechnol 14: 223-233.

Amano Pharmaceuticals. 1995. Novel Phytase. Japan Pat. 07067635.

Asgard T, Shearer KD. 1997. The dietary phosphorus requirement of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) and its relationship to the phosphorus requirements reported for other fishes. Aquacult Nutr 3:17–23.

Bai DQ, Qiao XT, Wei D, Guo L, Qi HL. 2004. Effects of phytase on the performance of protein hydrolysis enzyme in the intestine and liver of common carp. J Chin Feed 2:34–38

Bajwa W, Meyhack B, Rudolph H, Schweingruber AM, Hinnen A. 1984. Structural analysis of the two tandemly repeated acid phosphatase genes in yeast. Nucleic Acids Res 12:7721–7739.

Barrientos L, Scott JJ, Murthy PP. 1994. Specificity of hydrolysis of phytic acid by alkaline phytase from lily pollen. Plant Physiol 106:1489–1495.

Baruah K, Sahu NP, Pal AK, Debnath D. 2004. Dietary phytase: an ideal approach for a cost effective and low-polluting aquafeed. NAGA World Fish Center Quart 27:15–19

Baten A, Ullah A, Tomazic VJ, Shamsuddin AM. 1989. Inositolphosphate-induced enhancement of natural killer cell activity correlates with tumor suppression. Carcinogenesis 10: 1595-1598.

Berridge MJ, Irvine RF. 1984. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. Nature 312 5992: 315–321.

Billington DC. 1993. The inositol phosphates. Chemical synthesis and biological significance. Verlag Chemie, Weinheim.

Bindu S, Somashekar D, Joseph R. 1998. A comparative study on permeabilization treatments for in situ determination of phytase of *Rhodotorula gracilis*. Lett Appl Microbiol 27:336–340.

Bogar B, Szakacs G, Pandey A, Abdulhameed S, Linden JC, Tengerdy RP. 2003a. Production of phytase by *Mucor racemosus* in solidstate fermentation. *Biotechnol Prog* 19:312–319.

Bogar B, Szakacs G, Tengerdy RP, Linden JC, Pandey A. 2003b. Optimization of phytase production by solid substrate fermentation. *J Ind Microbiol Biotech* 30:183–189.

Bradford MA. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principal of ptoein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Brenes PJ. 2002. Los enzimas en nutrición porcina II. Anaporc. <http://www.revista-anaporc.com/enzimar2.htm>.

Brinch-Pedersen H, Olesen A, Rasmussen S.K, Holm P.B. 2000. Generation of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) for constitutive accumulation of an *Aspergillus* phytase. *Mol. Breed.* 6:195-206.

Brink EJ, Dekker PR, van Beresteijn ECH, Beynen AC. 1991. Inhibitory effect of dietary soybean protein vs. casein on magnesium absorption in rats. *J Nutr* 121:1374–1381.

Cain KD, Garling DL. 1995. Pretreatment of soybean meal with phytase for salmonid diets to reduce phosphorus concentrations in hatchery effluents. *Progr Fish-Cult* 57:114–119.

Caldwell RA. 1992. Effect of calcium and phytic acid on the activation of trypsinogen and the stability of trypsin. *J Agric Food Chem* 40:43–46.

Caransa A, Simell M, Lehmuusaari M, Vaara M, Vaara T. 1988. A novel enzyme application in corn wet milling. *Starch* 40 409–411.

Casey A, Walsh G. 2003. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. *Bioresour. Technol.* 86:183-188.

CAST (Council for Agricultural Science and Technology). 2002. Animal diet modification to decrease the potential for nitrogen and phosphorus pollution. *Issue Paper* 21:1–16.

Castillo M. 2008. Evaluación de la producción de la Fitasas C de *Bacillus subtilis* en cepas recombinantes de *Picha pastoris* Tesis. Universidad Autónoma de Nuevo Leon. FCB IB.

Chang CW. 1967. Study of phytase and fluoride effects in germinating corn seed. *Cereal Chem* 44:129–142.

Chen CC, Wu PH, Huang CT, Cheng KJ. 2004. A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an *Escherichia coli* phytase. *Enzyme Microb Technol* 35:315–320.

Cheng ZJ, Hardy RW. 2003. Effects of extrusion and expelling processing, and microbial phytase supplementation on apparent digestibility coefficients of nutrients in full-fat soybeans for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 218(1):501–514.

Cheng ZJ. 2004. Apparent digestibility of dry matter and nutrients in rainbow trout fed phytase pretreated soybean meal diets. *J Feed Corner* 16:32–34.

Cheryan M. 1980. Phytic acid interactions in food systems. CRC. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 13:297-302.

Choi YM, Noh DO, Cho SH, Lee HK, Suh HJ, Chung SH. 1999. Isolation of a phytase-producing *Bacillus sp.* KHU-10 and its phytase production. *J Microbiol Biotechnol* 9:223–226.

Choi YM, Suh HJ, Kim JM. 2001. Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus sp.* KHU-10. *J Protein Chem* 20:287–292.

Correll DL. 1999. Phosphorus: a rate limiting nutrient in surface waters. *Poult Sci* 78:674–682.

Cosgrove DJ. 1970. Inositol phosphate phosphatases of microbiological origin. Inositol phosphate intermediates in the dephosphorylation of the hexaphosphates of myo-inositol, scylloinositol, and D-chiro-inositol by a bacterial (*Pseudomonas sp.*) phytase. *Aust J Biol Sci* 23:1207–1220.

Cosgrove DJ. 1980. *Inositol Phosphates: Their Chemistry, Biochemistry and Physiology*. Elsevier, New York.

Craxton A, Caffrey JJ, Burkhart W, Safrany ST, Shears S B. 1997. Molecular cloning and expression of a rat hepatic multiple inositol polyphosphate phosphatase. *Biochem. J.* 328: 75-81.

Dasgupta S, Dasgupta D, Sen M, Biswas S, Biswas BB. 1996. Interaction of myoinositol trisphosphate–phytase complex with the receptor for intercellular Ca²⁺ mobilization in plants. *Biochem* 35(15):4994–5001.

Davies MI, Motzok I. 1972. Properties of intestinal phytase. *Poult. Sci.* 51: 494-501.

Davis DA, Johnston WL, Arnold CR. 2000. El uso de suplementos enzimáticos en dietas para camarón. pp 452-462. En: Civera-Cerecedo, R., Perez-Estrada C.J., Ricque Marie Denis y Cruz-Suárez L.E. (eds.) Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposio Internacional en Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México.

De Angelis M, Gallo G, Corbo MR, McSweeney PLH, Faccia M, Giovine M, Gobetti M. 2003. Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Int J Food Microbiol* 87:259–270.

Debnath D, Pal AK, Sahu NP. 2005. Effect of dietary microbial phytase supplementation on growth and nutrient digestibility of *Pangasius pangasius* (Hamilton) fingerlings. *Aquacult Res* 36(2):180–187.

Delucca AJ, Dischinger C, Ullah AHJ. 1992. Identification of a phytase from *Citrobacter freundii*. *Abstr. Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.* 92 Meet. 385.

Deshpande SS, Cheryan M. 1984. Effects of phytic acid, divalent cations, and their interactions on alpha-amylase activity. *J Food Sci* 49:516–519.

Dossa E, Boquet PL. 1985. Identification of the gene *appA* for the acid phosphatase (pH optimum 2.5) of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 200:68–73.

Dossa J, Marck C, Boquet PL. 1990. The complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* gene *appA* reveals significant homology between pH 2.5 acid phosphatase and glucose-1-phosphatase. *J Bacteriol* 172:5497–5500.

Dox AW, Golden R. 1911. Phytase in lower fungi. *J. Biol. Chem.* 10: 183-185.

Dvorakova J, Volfova O, Kopecky J. 1997 Characterization of phytase produced by *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol* 42:349-352.

Dvorakova J, Kopecky J, Havlicek V, Kren V. 2000. Formation of myo-inositol phosphates by *Aspergillus niger* 3-phytase. *Folia Microbiol* 45(2):128–132.

Eeckhout W, De Paepe M. 1994. Total phosphorus, phytate phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Anim Feed Sci Technol* 47:19–29.

Elliott S, Chang CW, Schweingruber ME, Schaller J, Rickli EE, Carbon J. 1986. Isolation and characterization of the structural gene for secreted acid phosphatase from *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem.* 261:2936–2941.

Englen AJ, Heeft FC van der, Randsdrop PH, Smit EL. 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *J AOAC Int* 77:760–764.

Eskin NAM, Wiebe S. 1983. Changes in phytase activity and phytate during germination of two fababean cultivars. *J Food Sci* 48:270–271.

Esposito D, Gillette WK, Miller DA, Taylor TE, Frank PH, Hu R, Bekisz J, Hernandez J, Cregg JM, Zoon K, Hartley JL. 2005. Gateway cloning is compatible with protein secretion from *Pichia pastoris*. *Elsevier Protein Expression and Purification* 40: 424-428.

Ethrich KC, Montalbano BG, Mullaney EJ, Dischinger HC, Ullah AHJ. 1993. Identification and cloning of a second phytase gene (phyB) from *Aspergillus niger* (*ficcum*). *Biochem Biophys Res Commun* 195:53–57.

Farrell DJ, Martin EA, Du Preez JJ, Bongarts M, Betts M, Sudaman A, Thomson E. 1993. The beneficial effects of a microbial phytase in diets of broiler chickens and ducklings. *J Anim Physiol Anim Nutr* 69:278–283.

Forsberg CW, Phillips J.P, Golovan SP, Fan M.Z, Meidinger RG, Ajakaiye A, Hilborn D, Hacker RR. 2003. The Environpig 16 physiology, performance, and contribution to nutrient management advances in a regulated environment: The leading edge of change in the pork industry. *J. Anim. Sci.* 81(E. Suppl. 2):E68-E77.

Forster I, Higgs DA, Dosanjh BS, Rowshandeli M. 1999. Potential for dietary phytase to improve the nutritive value of canola protein concentrate and decrease phosphorus output in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) held in 11 °C fresh water. *Aquaculture* 179(1):109–125.

Freund WD, Mayr GW, Tietz C, Schultz JE. 1992. Metabolism of inositol phosphates in the protozoan *Paramecium*. *Eur. J. Biochem.* 207:359-367.

Furrer OJ, Stauffer W. 1987. P-Verlagerung im Boden und Auswaschung. In: FAC Oktobertagung 1987: Phosphat in Landwirtschaft und Umwelt, Eidgenössische Forschungsanstalt für Agrikulturchemie und Umwelthygiene. FAC, Liebefeld-Bern, pp 83–90.

Geier C, Figura K von, Pohlmann R. 1991. Molecular cloning of the mouse lysosomal acid phosphatase. *Biol Chem* 372:301–304.

Ghareib, M. 1990. Biosynthesis, purification, and some properties of extracellular phytase from *Aspergillus carneus*. *Acta Microbiol. Hung.* 37:412-418.

Gibson DM, Ullah AHJ. 1988. Purification and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* 260:503-513.

Gibson D.1987. Production of extracellular phytase from *Aspergillus ficuum* on starch media. *Biotechnol Lett* 9:305–310.

Gibson DM, Ullah AB. 1990. Phytase and their action on phytic acid in inositol metabolism in plants. *Arch Biochem Biophys* 262:77–92.

Goel M, Sharma CB. 1979. Multiple forms of phytase in germinating cotyledons of *Cucurbita maxima*. *Phytochemistry* 18:1939–1942.

Golovan S, Wang G, Zhang J, Forsberg CW. 2000. Characterization and overproduction of the *Escherichia coli* appA encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities. *Can J Microbiol* 46:59–71

Golovan SP, Meidinger RG, Ajakaiye A, Cottrill M, Wiederkehr MZ, Barney DJ, Plante C, Pollard JW, Fan MZ, Hayes MA, Laursen J, Hjorth JP, Hacker RR, Phillips JP, Forsberg, CW. 2001. Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nature Biotechnol.* 19:741-745.

Graf E, Eaton, JW. 1993. Suppression of colonic cancer by dietary phytic acid. *Nutr. Cancer* 19:11-19.

Greaves MP, Anderson G, Webley DM. 1967. The hydrolysis of inositol phosphates by *Aerobacter aerogenes*. *Biochim Biophys Acta* 132:412–418.

Greiner R, Konietzny U, Jany KD. 1993. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 303:107–113.

Greiner R, Haller E, Konietzny U, Jany KD. 1997. Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. *Arch Biochem Biophys* 341:201–206.

Greiner R, Carlsson NG, Larsson AM. 2000. Stereospecificity of *myo*-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytatedegrading enzyme of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 84:53-62.

Greiner R, Larsson AM, Carlsson NG. 2001. Stereospecificity of *myo*-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytatedegrading enzyme of baker's yeast. *J Agric Food Chem.* 49:2228–2233.

Greiner R, Farouk A, Larsson Alminger M, Carlsson NG. 2002. The pathway of dephosphorylation of *myo*-inositol hexakisphosphate by phytate-degrading enzymes of different *Bacillus* spp. *Can. J. Microbiol.* 48: 986-994.

Greiner R, Konietzny U. 2006. Phytase for Food Application. *Food Technol. Biotechnol.* 44(2) 125-140.

Ha NC, Oh BC, Shin S, Kim HJ, Oh TK, Kim YO, Choi KY, Oh BH. 2000. Crystal structures of a novel, thermostable phytase in partially and fully calcium-loaded states. *Nat Struct Biol* 7:147–153.

Haefner S, Knietzsch A, Scholten E, Braun J, Lohscheidt M, Zelder O. 2005. Biotechnological production and applications of phytases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68 588–597.

Han O, Failla M.L, Hill AD, Morris ER, Smith Jr. JC. 1994. Inositol phosphates inhibit uptake and transport of iron and zinc by a human intestinal cell line. *J. Nutr.* 124:580–587.

Han Y, Lei XG. 1999. Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (*phyA*) in *Pichia pastoris*. *Arch Biochem Biophys* 364:83–90.

Han Y, Wilson DB, Lei XG. 1999. Expression of an *Aspergillus niger* phytase gene (*phyA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 65:1915–1918.

Hara A, Ebina S, Kondo A, Funagua T. 1985. A new type of phytase from *Typha latifolia* L. *Agric Biol Chem* 49:3539–3544.

Hardy RW, Shearer KD. 1985 Effect of dietary calcium phosphate and zinc supplementation on whole body zinc concentration of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can J Fish Aquat Sci.* 42:181–184.

Hardy RW. 2000. New developments in aquatic feed ingredients, and potential of enzyme supplements. In: Cruz -Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Olvera-Novoa MA, Civera-Cerecedo R. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.* 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México.

Haros M, Rosell CM, Benedito C. 2001. Use of fungal phytase to improve breadmaking performance of whole wheat bread. *J Agric Food Chem* 49(11):5450–5454.

Hayakawa T, Suzuki K, Miura H, Ohno T, Igaue I, 1990. *Myo*-inositol polyphosphate intermediates in the dephosphorylation of phytic acid by acid phosphatase with phytase activity from rice bran. *Agric. Biol. Chem.*, 54: 279-286.

Hong K, Ma Y, Li M. 2001. Solid-state fermentation of phytase from cassava dregs. *Appl Biochem Biotechnol* 91–93:777–785.

Hou BY. 2001. Advance in enzyme utilization in feed industry. *Anim Sci Vet Med* 8(3):4–5.

Houde RL, Alli I, Kermasha S. 1990. Purification and characterisation of canola seed (*Brassica sp.*) phytase. *J Food Biochem* 14:331–351.

Howson SJ, Davis RJ. 1983. Production of phytate-hydrolysing enzyme by fungi. *Enzyme Microbiol. Technol.* 5:377–382.

Huebel F, Beck E. 1996. Maize root phytase. Purification, characterization, and localization of enzyme activity and its putative substrate. *Plant Physiol* 112:1429–1436.

Hughes KP, Soares JH. 1998. Efficacy of phytase on phosphorus utilization in practical diets fed to striped bass, *Morone saxatilis*. *Aquacult Nutr.* 4:133–140.

Hurrell RF, Reddy MB, Juillerat MA, Cook JD. 2003. Degradation of phytic acid in cereal porridges improves iron absorption by human subjects. *Am J Clin Nutr.* 77(5):1213–1219.

Hwang WZ. 1999. Screening of phytase-producing bacterial strains from soil and characterization of their phytase enzymes. *Guoli Zhongxing Daxue Nonglin Xuebao* 48:15–25.

Idriss EE, Makarewicz O, Farouk A, Rosner K, Greiner R, Bochow H, Richter T, Borriss R. 2002. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plantgrowth-promoting effect. *Microbiology* 148:2097–2109.

Inagawa J, Kiyosawa I, Nagasawa T. 1987. Effect of phytic acid on the digestion of casein and soyabean protein with trypsin, pancreatin and pepsin. *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi*, 40 367–373.

Irving GCJ, Cosgrove DJ. 1971. Inositol phosphate phosphatase of microbial origin. Observations on the nature of the active center of a bacterial (*Pseudomonas* sp.) phytase. *Austral. J. Biol. Sci.* 24:1559-1564.

Irving GC, Cosgrove DJ. 1972. Inositol phosphate phosphatases of microbiological origin: the inositol pentaphosphate products of *Aspergillus ficuum* phytases. *J Bacteriol* 112:434–438

Irving GCJ. 1980. In *Inositol Phosphates: Their Chemistry, Biochemistry and Physiology* Ed., Cosgrove, D. J. Elsevier, Amsterdam.

Jackson L, Li MH, Robinson EH. 1996. Use of microbial phytase in channel catfish *Ictalurus punctatus* diets to improve utilization of phytate phosphorus. *J World Aquacult Soc* 27(3):309–313.

Jareonkitmongkol S, Ohya M, Watanabe R, Takagi H, Nakamori S. 1997. Partial purification of phytase from a soil isolate bacterium, *Klebsiella oxytoca* MO-3. *J Ferment Bioeng* 83:393–394.

Jongbloed AW, Jonge L, Kemme PA, Mroz Z, Kies AK. 1997. Phytates, phytase, phosphorus, protein and performance in pigs. Proc. 6th Forum on Anim. Nutr., BASF, Ludwigshafen, Germany, pp 92–106.

Jongbloed AW, Kemme PA, Mroz Z. 1999. Effect of microbial phytase on apparent ileal digestibilities of nitrogen and amino acids in pig diets. In: Coelho MB, Kornegay ET (eds) *Phytase in animal nutrition and waste management*, 2nd rev edn. BASF, Mexico, pp 507–514.

Jonson LF, Tate ME. 1969. The conformational analysis of phytic acid based on NMR spectra. *J Chem* 47:63–73.

Kerovuo J, Lauraeus M, Nurminen P, Kalkkinen N, Apajalahti J. 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 64:2079–2085.

Kerovuo J. 2000a. *A Novel Phytase from Bacillus. Characterization and Production of the Enzyme*. Thesis. Faculty of Science of the University of Helsinki.

Kerovuo J, Lappalainen I, Peinikainen T. 2000b. The Metal Dependence of *Bacillus subtilis* Phytase. 268(2): 365-369.

Kerovuo J, Rouvinen J, Hatzack F. 2000c. Hydrolysis of phytic acid by *Bacillus* phytase. *Biochem. J.* 352: 623-628.

Kerovuo J, Rouvinen J, Hatzack F. 2000d. Analysis of myo-inositol hexakisphosphate hydrolysis by *Bacillus* phytase: indication of a novel reaction mechanism. *Biochem J* 352 Pt 3:623–628.

Kim YO, Kim HK, Bae KS, Yu JH, Oh TK 1998a. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus sp.* DS11. *Enzyme Microb Technol* 22:2–7.

Kim YO, Lee JK, Kim HK, Yu JH, Oh TK. 1998b. Cloning of the thermostable phytase gene (phy) from *Bacillus sp.* DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 162:185–191.

Kim DS, Godber JS, Kim HR. 1999a. Culture conditions for a new phytase-producing fungus. *Biotechnol Lett.* 21:1077–1081.

Kim YO, Lee JK, Oh BC, Oh TK. 1999b. High-level expression of a recombinant thermostable phytase in *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* 63:2205–2207.

Kim HW, Kim YO, Lee JH, Kim KK, Kim YJ. 2003. Isolation and characterization of a phytase with improved properties from *Citrobacter braakii*. *Biotechnol Lett* 25:1231–1234

Klein Holkenborg ABM, van der Lee AG, de Bot PHM, Hemke G, Kies AK. 2003. Effect of different phytase sources on ileal phosphorus digestibility in layers. *Proc 14th Eur Symp Poult Nutr, Lillehammer, Norway*, pp 40–41.

Knuckles BE, Betschart AA. 1987. Effect of phytate and other myo-inositol phosphate esters on alpha-amylase digestion of starch. *J. Food Sci.* 52:719–721.

Knuckles BE. 1988. Effect of phytate and other myo-inositol phosphate esters on lipase activity. *J. Food Sci.* 53:250–252.

Konietzny U, Greiner R, Jany KD. 1995. Purification and characterisation of a phytase from spelt. *J Food Biochem* 18:165–183.

Konietzny U, Greiner R. 2003. Phytic Acid: Nutritional Impact. In: *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, B. Caballero, L. Trugo, P. Finglas (Eds.), Elsevier, London, UK pp. 4555–4563.

Kornegay ET, Qian H. 1996. Replacement of inorganic phosphorus by microbial phytase for young pigs fed on a maize–soyabean-meal diet. *Br J Nutr* 76(4):563–78.

Kornegay ET. 1999. Effectiveness of Natuphos™ phytase in improving the bioavailabilities of phosphorus and other nutrients in corn–soybean meal diets for young pigs. In: Coelho MB, Kornegay ET (eds) *Phytase in animal nutrition and waste management*, 2nd rev edn. BASF, Mexico, pp 249–258.

Kostrewa D, Wyss M, D'Arcy A, Loon AP van. 1999 Crystal structure of *Aspergillus niger* pH 2.5 acid phosphatase at 2.4 Å resolution. *J Mol Biol.* 288:965–974.

Krishna C, Nokes SE. 2001. Predicting vegetative inoculum performance to maximize phytase production in solid-state fermentation using response surface methodology. *J Ind Microbiol Biotech* 26:161–170

Krystofova S, Varecka L, Vollek V, Grimova J, Betina V. 1994. Growth and conidiation of *Trichoderma viride* are affected by non-steroidal antiinflammatory agents. *Folia Microbiol (Prague)* 39(1):44–48.

Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertin A.M, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessières P, Bolotin A, Borchert R, Borriss L, Boursier A, Brans M, Braun SC, Brignell M, Bron S, Brouillet S, Bruschi CV, Caldwell B, Capuano V, Carter NM, Choi SK, Codani JJ, Connerton IF, Cummings NJ, Daniel RA, Denizot F, Devine KM, Düsterhöft A, Ehrlich SD, Emmerson PT, Entian KD, Errington J, Fabret C, Ferrari F, Foulger D, Fritz C, Fujita M, Fujita Y, Fuma S, Galizzi A, Galleron N, Ghim SY, Glaser P, Goffeau A, Golightly EJ, Grandi G, Guiseppi G, Guy BJ, Haga K, Haiech J, Harwood CR, Hénaut A, Hilbert H, Holsappel S, Hosono S, Hullo MF, Itaya M, Jones L, Joris B, Karamata D, Kasahara Y, Klaerr-Blanchard M, Klein C, Kobayashi Y, Koetter P, Koningstein G, Krogh S, Kumano M, Kurita K, Lapidus A, Lardinois S, Lauber J, Lazarevic V, Lee SM, Levine A, Liu H, Masuda S, Mauël C, Médigue C, Medina N, Mellado RP, Mizuno M, Moes D, Nakai S, Noback M, Noone D, O'Reilly M, Ogawa K, Ogiwara A, Oudega B, Park S-H, Parro V, Pohl TM, Portetelle D, Porwollik S, Prescott AM, Presecan E, Pujic P, Purnelle B, Rapoport G, Rey M, Reynolds S, Rieger M, Rivolta C, Rocha E, Roche B, Rose M, Sadaie Y, Sato T, Scanlan E, Schleich S, Schroeter R, Scoffone F, Sekiguchi J, Sekowska A, Seror SJ, Serror P, Shin B-S, Soldo B, Sorokin A, Tacconi E, Takagi T, Takahashi H, Takemaru K, Takeuchi M, Tamakoshi A, Tanaka T, Terpstra P, Tognoni A, Tosato V, Uchiyama S, Vandenbol M, Vannier F, Vassarotti A, Viari A, Wambutt R, Wedler E, Wedler H, Weitzenegger T, Winters P, Wipat A, Yamamoto H, Yamane K, Yasumoto K, Yata K, Yoshida K, Yoshikawa H-F,

Zumstein E, Yoshikawa H, Danchin A. 1997. The complete genome sequence of the grampositive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature 390:249–256.

Laboure AM, Gagnon J, Lescure AM. 1993. Purification and characterization of a phytase (myo-inositol- hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (*Zea mays*) seedlings during germination. Biochem J 295:413–419.

Lambrechts C, Boze H, Moulin G, Galzy P. 1992. Utilization of phytate by some yeast. Biotechnol. Lett. 14:61-66.

Lambrechts C, Boze H, Segueilha L, Moulin G, Galzy P. 1993. Influence of culture conditions on the biosynthesis of *Schwanniomyces castelli* phytase. Biotechnol Lett 15:399–404.

Lan GQ, Abdullah N, Jalaludin S, Ho YW. 2002. Optimization of carbon and nitrogen sources for phytase production by *Mitsuokella jalaludinii*, a new rumen bacterial species. Lett Appl Microbiol 35:157–161.

Lanari D, Agaro ED, Turri C. 1998. Use of nonlinear regression to evaluate the effects of phytase enzyme treatment of plant protein diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 161(1):345–56.

Lassen SF, Breinholt J, Peter RO, Brugger R, Bischoff A, Wyss M, Fuglsang CC. 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 S, Kim T, Stahl CH, Lei XG. 2005. Expression of *Escherichia coli* AppA2 phytase in four yeast systems. Biotechnol. Lett. 27 327-334.

Lehmann M, Pasamonets L, Lassen SF, Wyss M. 2000. The consensus concept for thermostability engineering of proteins. Biochim. Biophys. Acta 1543:408-415.

Lei XG, Stahl CH. 2001. Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57:474-481.

Lei, Z, 2002. *Phosphatases with improved phytase activity*. United States Patent application 09540149 2000-03-31. Jan. 2003 Cornell Research Foundation, Inc. (Ithaca, NY)

Li J, Hegemann CE, Hanlon RW, Lacy GH, Denbow M, Grabau EA. 1997. Secretion of active recombinant phytase from soybean cell-suspension cultures. Plant Physiol. 114:1103-1111.

Li MH, Robinson EH. 1997. Microbial phytase can replace inorganic phosphorus supplements in channel catfish *Ictalurus punctatus* diets. *JWorld Aquacult Soc* 28:402–406.

Liebert F, Htoo JK, Sunder A. 2005. Performance and nutrient utilization of laying hens fed low-phosphorus corn–soybean and wheat–soybean diets supplemented with microbial phytase. *Poult Sci* 84:1576–1583.

Liebert F, Portz L. 2005. Nutrient utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed plant based low phosphorus diets supplemented with graded levels of different sources of microbial phytase. *Aquaculture* 248:111–119.

Lim PE, Tate ME. 1973. The phytases: II. Properties of phytase fraction F1 and F2 from wheat bran and the *myo*-inositol phosphates produced by fraction F2. *Biochim. Biophys. Acta* 302:326–328.

Lim D, Golovan S, Forsberg CW, Jia Z. 2000. Crystal structures of *Escherichia coli* phytase and its complex with phytate. *Nat Struct Biol* 7:108–113.

Lindqvist Y, Schneider G, Vihko P. 1994. Crystal structures of rat acid phosphatase complexed with the transition-state analogs vanadate and molybdate. Implications for the reaction mechanism. *Eur J Biochem* 221:139–142.

Ling C, Weimin W, Chengtai Y, Yi Y, James DC, Amararatne Yakupitiyage B, Zhi L, Dapeng L. (2007). Application of microbial phytase in fish feed *Enzyme and Microbial Technology* 40:497–507.

Liu BL, Rafiq A, Tzeng YM, Rob A. 1998. The induction and characterization of phytase and beyond. *Enzyme Microbial Technol.* 22:415–424.

Loewus F. 2002. Biosynthesis of Phytate in Food Grains and Seeds. In: *Food Phytates*, N.R. Reddy, S.K. Sathe (Eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA pp. 53–61.

Lopez HW, Leenhardt F, Coudray C, Révész C. 2002. Minerals and phytic acid interactions: Is it a real problem for human nutrition. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37:727–739.

Maenz DD, Classen HL. 1998. Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. *Poult. Sci.* 77:557–563.

Maenz DD, Engele-Schaan CM, Newkirk RW, Classen HL. 1999. The effect 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.

Maiti IB, Majumber AL, Biswas BB. 1974. Purification and mode of action of phytase from *Phaseolus aureus*. *Phytochemistry*. 13:1047-1051.

Mandal NC, Burnman S, Biswas BB. 1972. Isolation, purification and characterization of phytase from germinating mung beans. *Phytochemistry* 11:495–502

Mandviwala TN, Khire JM. 2000. Production of high activity thermostable phytase from thermotolerant *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 24:237–243.

Martin CJ, Evans WJ. 1986. Phytic acid–metal ion interactions II. The effect of pH on Ca(II) binding. *J Inorg Biochem* 27:17–30.

Martin EA, Farrell DJ. 1994. The effect of microbial phytase in rice bran based diets fed to grower finisher diets. *Proc Aust Poult Sci Symp* 6:88–91.

Martin JA, Murphy RA, Power RFG. 2003. Cloning and expression of fungal phytases in genetically modified strains of *Aspergillus awamori*. *J Ind Microbiol Biotech* 30:568–576.

Mayer A.F, Hellmuth K, Schlieker H, Lopez-Ulibarri R, Oertel S, Dahlems U, Strasser AWM, van Loon APGM. 1999. An expression system matures: A highly efficient and cost-effective process for phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol. BioEng.* 63:373-381.

Michell RH. 1975. Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim Biophys Acta* 415(1):47–81.

Miksch G, Kleist S, Friehs K, Flaschel E. 2002. Overexpression of the phytase from *Escherichia coli* and its extracellular production in bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 685-694.

Mitchell DB, Vogel K, Weimann BJ, Pasamontes L, Loon AP van. 1997. The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. *Microbiology* 143:245–252.

Modlin, M. 1980. Urinary phosphorylated inositols and renal stone. *Lancet*, 2: 1113-1114.

Mohanna C, Nys Y. 1999. Changes in zinc and manganese availability in broiler chicks induced by vegetal and microbial phytases. *Anim Feed Sci Technol* 77:241–253.

Nagai M, Nishibu M, Sugita Y, Yoneyama Y. 1975. The effects of inositol hexaphosphate on the allosteric properties of two beta- 99-substituted abnormal hemoglobins, hemoglobin Yakima and hemoglobin Kempsey. *J Biol Chem.* 250:3169–3173.

Nakamura Y, Fukuhara H, Sano K. 2000. Secreted phytase activities of yeasts. *Biosci Biotechnol Biochem* 64:841–844.

Nakano T, Joh T, Narita K, Hayakawa T. 2000. The pathway of dephosphorylation of *myo*-inositol hexakisphosphate by phytases from wheat bran of *Triticum aestivum* L. cv. Nourin #61. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64:995-1003.

Nayini NRP. 1984a. The phytase of yeast. *Lebensm Wiss Technol* 17:24–26.

Nayini NR, Markakis P. 1984b. The phytase of yeast. *Food Sci. Technol.* 17, 126-132.

Nayini NR, Markakis P. 1986. Phytases: In *Phytic Acid: Chemistry and Applications*. Pilatus Press, Minneapolis.

Nout MJR, Rambouts FM. 1990. Recent developments in tempe research. A review. *J Appl Bacteriol* 69:609–633.

Oh BC, Chang BS, Park KH, Ha NC, Kim HK, Oh BH, Oh TK. 2001. Calcium-dependent catalytic activity of a novel phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* DS11. *Biochemistry* 40:9669–9676.

Oh BC, Choi WC, Park S, Kim Yo, Oh TK. 2004. Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases *Appl Microbiol Biotechnol* 63:362–372.

Ohkawa T, Ebisuno S, Kitagawa M, Morimoto S, Miyazaki Y, Yasukawa S. 1984. Rice bran treatment for patients with hypercalciuric stones: Experimental and clinical studies. *J. Urol.* 132:1140-1145.

Ostanin K, Harms EH, Stevis PE, Kuciel R, Zhou MM, Van Etten RL. 1992. Overexpression, site-directed mutagenesis, and mechanism of *Escherichia coli* acid phosphatase. *J Biol Chem* 267:22830–22836.

Ostanin K, Van Etten RL. 1993. Asp304 of *Escherichia coli* acid phosphatase is involved in leaving group protonation. *J Biol Chem* 268:20778–20784.

Paditz K, Kluth H, Rodehutsord M. 2004. Relationship between graded doses of three microbial phytases and digestible phosphorus in pigs. *Anim Sci* 78:429–438.

Pallauf J, Hoehler D, Rimbach G. 1992. Effect of microbial phytase supplementation to a maize–soya diet on the apparent absorption of Mg, Fe, Cu, Mn and Zn and parameters of Zn status in piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr* 68:1–9.

Papatryphon E, Howell RA, Soares JH. 1999. Growth and mineral absorption by striped bass *Morone saxatilis* fed a plant feedstuff based diet supplemented with phytase. *J World Aquacult Soc* 30:161–73.

Pasamontes L, Haiker M, Henriquez-Huecas M, Mitchell DB, Loon AP van. 1997a. Cloning of the phytases from *Emericella nidulans* and the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. *Biochim Biophys Acta* 1353:217–233.

Pasamontes L, Haiker M, Wyss M, Tessier M, van Loon APGM. 1997b. Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol* 63:1696–1700.

Paulton RJL. 1970. Analysis of the multiseptate potential of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 104 2:762-767

PCT WO 91/05053.

Pen J, Verwoerd TC, van Paridon PA, Beudeker RF, van den Elzen PJM, Geerse K, van der Klis JD, Versteegh H.J, van Ooyen AJJ, Hoekema A. 1993. Phytase-containing transgenic seeds as a novel feed additive for improved phosphorus utilization. *Bio/ Technol*. 11: 811-814.

Phillippy BQ, Mullaney EJ. 1997. Expression of an *Aspergillus niger* Phytase (phyA) in *Escherichia coli*. *J Agric Food Chem* 45:3337–3342.

Piddington CS, Houston CS, Paloheimo M, Cantrell M, Miettinen-Oinonen A, Nevalainen H, Rambosek J. 1993. The cloning and sequencing of the genes encoding phytase (phy) and pH 2.5 optimum acid phosphatase (aph) from *Aspergillus niger* var *awamori*. *Gene* 133:55–62

Pohlmann R, Houston CS, Paloheimo M, Cantrell M, Miettinen-Oinonen A, Nevalainen H, Rambosek J. 1988. Human lysosomal acid phosphatase: cloning, expression and chromosomal assignment. *EMBO J* 7:2343–2350.

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.

Pointillart A. 1988. Phytate phosphorus utilisation in growing pigs. In: Buraczewska L, Buraczewska S, Zebrowska T (eds) *Digestive physiology in the pig*. Proc. 4th International Seminar. Polish Academy of Science, Jablonna, Poland, pp 192–196.

Porvari KS, Herrala AM, Kurkela RM, Taavitsainen PA, Lindqvist Y, Schneider G, Vihko PT. 1994. Site-directed mutagenesis of prostatic acid phosphatase.

Catalytically important aspartic acid 258, substrate specificity, and oligomerization. *J Biol Chem* 269:22642–22646.

Powar VK, Jagannathan V. 1982. Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 151:1102–1108.

Ravindran V, Cabahug S, Bryden WL, Selle PH. 1999. The influence of microbial phytase on the bioavailability of protein and energy in broiler chickens. In: Coelho MB, Kornegay ET (eds) *Phytase in animal nutrition and waste management*, 2nd rev edn. BASF, México, pp 573–584.

Rehms H, Barz W. 1995. Degradation of stachyose, raffinose, melibiose and sucrose by different tempe-producing *Rhizopus* fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 44(1–2):47–52.

Rham De O, Jost T. 1979. Phytate-protein interactions in soybean extracts and low-phytate soy protein products. *J. Food Sci.* 44: 596-601.

Richardson AE, Hadobas PA. 1997. Soil isolates of *Pseudomonas spp.* that utilize inositol phosphates. *Can J Microbiol* 43:509–516.

Riche M, Trottier NL, Ku PK. 2001. Apparent digestibility of crude protein and apparent availability of individual amino acids in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed phytase pretreated soybean meal diets. *Fish Physiol Biochem.* 25:181–194.

Robinson EH, Li MH, Manning BB. 2002. Comparison of microbial phytase and dicalcium phosphate for growth and bone mineralization of pond-raised channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J Appl Aquacult* 12:81–88.

Rodehutsord M, Pfeffer E. 1995. Effects of supplemental microbial phytase on phosphorus digestibility and utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Water Sci Technol* 31(10):143–147.

Rodehutsord M. 2001. Current phosphorus evaluation systems for livestock in Germany. *Lohmann-Inf* 25:1–8.

Rodriguez E, Porres J.M, Han Y, Lei XG. 1999. Different sensitivity of recombinant *Aspergillus niger* phytase (r-phyA) and *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase (r-AppA) to trypsin and pepsin *in vitro*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 365:262-267.

Rodriguez E, Mullaney EJ, Lei XG. 2000a. Expression of the *Aspergillus fumigatus* phytase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 268:373–378.

Rodriguez E, Wood Z, Karplus A, Lei XG. 2000b. Site-directed mutagenesis improves catalytic efficiency and thermostability of *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase/phytase expressed in *Pichia pastoris*. Arch Biochem Biophys 382:105–112.

Rutherford SM, Edwards AC, Selle PH. 1997. Effect of phytase on lysine-rice pollard complexes. In: Cranwell PD (ed) Manipulating pig production VI. Australasian Pig Science Association, Canberra, pp 248-266.

Sabu A, Sarita S, Pandey A, Bogar B, Szakacs G, Soccol CR. 2002. Solid-state fermentation for production of phytase by *Rhizopus oligosporus*. Appl Biochem Biotechnol 102–103:251–260.

Sajjadi M, Carter CG. 2004. Effect of phytic acid and phytase on feed intake, growth, digestibility and trypsin activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquacult Nutr 10(2):135–142.

Samanta S, Dalal B, Biswas S, Biswas BB. 1993. Myoinositol trisphosphate–phytase complex as an elicitor in calcium mobilization in plants. Biochem Biophys Res Commun 191(2):427–434.

Sandberg AS, Brune M, Carlsson NG, Hallberg L, Skoglund E, Rossander-Hulthen L. 1999. Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans. Am J Clinical Nutr 70:240–246.

Sano K, Fukuhara H, Nakamura Y. 1999. Phytase of the yeast *Arxula adenivorans*. Biotechnol Lett 21:33–38.

Scott JJ. 1991. Alkaline phytase activity in nonionic detergent extracts of legume seeds. Plant Physiol 95:1298–1301.

Scott JJ, Loewus FA. 1986. A calcium-activated phytase from pollen of *Lilium longiflorum*. Plant Physiol 82:333–335.

Schaefer A, Koppe WM. 1995. Effect of a microbial phytase on utilization of native phosphorus by carp in a diet based on soybean meal. Water Sci Technol 31(1):149–155.

Schneider G, Lindqvist Y, Vihko P. 1993. Three-dimensional structure of rat acid phosphatase. EMBO J 12:2609–2615.

Schoener FJ, Hoppe PP. 2002. The effects of phytase in poultry nutrition. In: McNab JM, Boorman KN (eds) Poultry feedstuffs: supply, composition and nutritive value. CAB International, Wallingford, UK, pp 363–373.

Schroder B, Breves G, Rodehutsord M. 1996. Mechanisms of intestinal phosphorus absorption and availability of dietary phosphorus in pigs. *Dtsch Tieraerztl Wochenschr* 103:209–221.

Sebastian S, Touchburn SP, Chavez ER. 1998. Implications of phytic acid and supplemental microbial phytase in poultry nutrition: a review. *World's Poult Sci J* 54:27–47.

Segel IH. 1975. In: Segel IH (ed) *Enzyme kinetics: substrate–activator complex is the true substrate*. Wiley, New York, pp 242–272.

Segueilha L, Lambrechts C, Boze H, Moulin G, Galzy P. 1992. Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castellii*. *J Ferment Bioeng* 74:7–11.

Shah V, Parekh LJ. 1990. Phytase from *Klebsiella sp.* No. PG-2: purification and properties. *Indian J Biochem Biophys* 27:98–102.

Shamsuddin AM, Vucenic I, Cole KE. 1997. IP-6: A novel anti-cancer agent. *Life Sci.* 61:343–354.

Shamsuddin AM. 2002. Anti-cancer function of phytic acid. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37:769–782.

Shieh TR, Ware JH. 1968. Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. *Appl Microbiol* 16:1348–1351.

Shieh TR, Wodzinski RJ, Ware, JH. 1969. Regulation of the formation of acid phosphatase by inorganic phosphate in *Aspergillus ficuum*. *J. Bacteriol.* 100:1161–1165.

Shimizu M. 1992. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci Biotechnol Biochem* 56:1266–1269.

Shimizu M. 1993. Purification and characterization of phytase and acid phosphatase produced by *Aspergillus oryzae* K1. *Biosci Biotechnol Biochem* 57:1364–1365.

Shin S, Ha NC, Oh BC, Oh TK, Oh BH. 2001. Enzyme mechanism and catalytic property of beta propeller phytase. *Structure* 9:851–858.

Simon O, Igbasan F. 2002. *In vitro* properties of phytases from various microbial origins. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37:813–822.

Simons PC, Versteegh HA, Jongbloed AW, Kemme PA. 1990. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. *Br J Nutr* 64:525–540.

Singh M, Krikorian AD. 1982. Inhibition of trypsin activity *in vitro* by phytate. *J. Agric. Food Chem.* 30:799–800

Siren M. 1986a. Stabilized pharmaceutical and biological material composition. Pat. SE 003165.

Siren M. 1986b. New myo-inositol triphosphoric acid isomer. Pat. SW 052950.

Skowronski T. 1978. Some properties of partially purified phytase from *Aspergillus niger*. Acta Microbiol Pol 27:41–48.

Storebakken T, Shearer KD, Roem AJ. 1998. Availability of protein, phosphorus and other elements in fishmeal, soy-protein concentrate and phytase-treated soy-protein concentrate-based diets to Atlantic salmon, *Salmo salar*. Aquaculture 161(1):365–379.

Sugiura SH, Gabaudan J, Dong FM, Hardy RW. 2001 Dietary microbial phytase supplementation and the utilization of phosphorus, trace minerals and protein by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) fed soybean meal-based diets. Aquacult Res 32:583–592.

Sutardi M, Buckle KA. 1986. The characteristics of soybean phytase. J. Food Biochem. 10: 197-216.

Sutardi M, and Buckle KA. 1988. Characterization of extra- and intracellular phytase from *Rhizopus oligosporus* used in tempeh production. Int. J. Food Microbiol. 6:67-69.

Tambe SM, Kaklij GS, Kelkar SM, Parekh LJ. 1994. Two distinct molecular forms of phytase from *Klebsiella aerogenes*: evidence for unusually small active enzyme peptide. J Ferment Bioeng 77:23–27.

Temperton H, Dudley J, Pickering GL. 1965a. Phosphorus requirements of poultry. IV. The effects on growing pullets of feeding diets containing no animal protein or supplementary phosphorus. Br Poult Sci. 6:125–133.

Temperton H, Dudley J, Pickering GL. 1965b. Phosphorus requirements of poultry. V. The effects during the subsequent laying year of feeding growing diets containing no animal protein or supplementary phosphorus. Br Poult Sci 6:135–141.

Thiel U, Weigand E. 1992. Influence of dietary zinc and microbial phytase supplementation on Zn retention and zinc excretion in broiler chicks. Proc. XIX World's Poultry Congress, Vol 3. WPSA, Amsterdam, pp 460-468

Tye AJ, Siu FK, Leung TY, Lim BL. 2002. Molecular cloning and the biochemical characterization of two novel phytases from *B. subtilis* 168 and *B. licheniformis*. Appl Microbiol Biotechnol 59:190–197.

Ullah AH, Cummins BJ. 1987. Purification, N-terminal amino acid sequence and characterization of pH 2.5 optimum acid phosphatase (EC 3.1.3.2) from *Aspergillus ficuum*. Prep Biochem. 17:397–422.

Ullah AHJ, Gibson D.M. 1987. Extracellular phytase (EC 3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: Purification and characterization. Prep. Biochem. 17:83-91.

Ullah AH. 1988. *Aspergillus ficuum* phytase: partial primary structure, substrate selectivity, and kinetic characterization. Prep Biochem 18:459–471.

Ullah A, Shamsuddin AM. 1990. Dose-dependent inhibition of large intestinal cancer by inositol hexaphosphate in F344 rats. Carcinogenesis 11 2219-2222.

Ullah AHJ, Phillippy BQ. 1994. Substrate selectivity in *Aspergillus ficuum* phytase and acid phosphatase using *myo*-inositol phosphates. J. Agric. Food Chem. 42:423-425.

Ullah AHJ, Mullaney EJ. 1996. Disulfide bonds are necessary for structure and activity in *Aspergillus ficuum* phytase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 227:311-317.

Ullah AHJ, Sethumadhavan K. 1998. *Myo*-inositol hexasulfate is a potent inhibitor of *Aspergillus ficuum* phytase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 251:260-263.

Ullah AHJ, Sethumadhavan K, Mullaney EJ, Ziegelhoffer T, Austin-Philips S. 1999. Characterization of recombinant fungal phytase (*phyA*) expressed in tobacco leaves. Biochem. Biophys. Res. Commun. 264:201-206.

Ullah AH, Sethumadhavan K, Lei XG, Mullaney EJ. 2000. Biochemical characterization of cloned *Aspergillus fumigatus* phytase (*phyA*). Biochem Biophys Res Commun 275:279–285.

Ullah, AHJ, Sethumadhavan K. 2003. *PhyA* gene product of *Aspergillus ficuum* and *Peniophora lycii* produces dissimilar phytases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303:463-468.

Urbano G, Lopez-Jurado M, Aranda P, Vidal-Valverde C, Tenorio E, Porres J. 2000. The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function? J Physiol Biochem 56:283–294.

Van Etten RL, Davidson R, Stevis PE, MacArthur H, Moore DL. 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 der Klis JD, Versteegh HAJ. 1991. Ileal absorption of phosphorus in lightweight laying hens using microbial phytase and various calcium contents in laying hen feed. Spelderholt Publication No. 563. Spelderholt, Beekbergen, The Netherlands.

Van Hartingsveldt W, van Zeijl CMJ, Harteveld GM, Gouka RJ, Suykerbuyk MEG, Luiten RGM, van Paridon PA, Selten GCM, Veenstra AE, van Gorcom RFM, van den Hondel CAMJJ. 1993. Cloning, characterization and overexpression of the phytaseencoding gene (phyA) of *Aspergillus niger*. *Gene* 127:87–94.

Van Weerd JH, Khalaf KH, Aartsen EJ, Tijssen PA. 1999. Balance trials with African catfish *Clarias gariepinus* fed phytase-treated soybean meal-based diets. *Aquacult Nutr.* 5(2):135–142.

Vats P, Banerjee UC. 2005. Biochemical characterisation of extracellular phytase (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase) from a hyper-producing strain of *Aspergillus niger* van *Teighem*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32:141-147

Vielma J, Lall SP, Koskela J. 1998. Effects of dietary phytase and cholecalciferol on phosphorus bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 163(3):309–23.

Vielma J, Makinen T, Ekholm P, Koskela J. 2000. Influence of dietary soy and phytase levels on performance and body composition of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and algal availability of phosphorus load. *Aquaculture* 183:349-362.

Vielma J, Ruohonen K, Gabaudan J, Vogel K. 2004. Top-spraying soybean mealbased diets with phytase improves protein and mineral digestibility but not lysine utilization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquacult Res.* 35(10):955–64.

Vincent JB, Crowder MW, Averill BA. 1992. Hydrolysis of phosphate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions. *Trends Biochem Sci.* 17:105–110.

Vohra A, Satyanarayana T. 2002. Purification and characterization of a thermo-stable and acid-stable phytase from *Pichia anomala*. *World J Microbial Biotechnol* 18:687-691.

Vohra A, Satyanarayana T. 2003. Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications *Crit. Rev. Biotechnol.* 23 29-60.

Vohra A, Satyanarayana T. 2004. A cost-effective cane molasses medium for enhanced cell-bound phytase production by *Pichia anomala*. *J Appl Microbiol* 97:471–478.

Vucenik I, Sakamoto K, Bansal M, Shamsuddin AM. 1993. Mammary carcinogenesis inhibition by inositol compounds. *Cancer Lett.* 75:95-102.

Vucenik, I.; Shamsuddin, AM. 2003. Cancer inhibition by inositol hexaphosphate (IP6) and inositol: From laboratory to clinic. *J. Nutr.* 133: 3778S-3784S.

Wendt P, Rodehutschord M. 2004. Studies on the efficiency of two phytase preparations in pekin ducks. In: Rodehutschord M (ed) Tagungsband 8. Tagung Schweine- und Geflügelernährung. Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, pp 109–111.

Wodzinski RJ, Ullah AHJ. 1996. Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.* 42:263-302.

Wyss M, Brugger R, Kronenberger A, Remy R, Fimbel R, Oesterhelt G, Lehmann M, van Loon APGM. 1999a. Biochemical characterization of fungal phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase): Catalytic properties. *Appl. Environm. Microbiol.* 65:367-373.

Wyss M, Pasamontes L, Friedlein A, Remy R, Tessier M, Kronenberger A, Middendorf A, Lehmann M, Schnoebelen L, Röthlisberger U, Kuszniir E, Wahl G, Müller F, Lahm H-W, Vogel K, van Loon APGM. 1999b. Biophysical characterization of fungal phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase): Molecular size, Glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. *Appl. Environm. Microbiol.* 65:359-366.

Xiong AS, Yao Q-HRA, Peng RH, Li M, Fan HQ, Guo MJ, Zhang SL. 2004. Isolation, characterization, and molecular cloning of the cDNA encoding a novel phytase from *Aspergillus niger* 113 and high expression in *Pichia pastoris*. *J Biochem Mol Biol* 37:282–291.

Yamada K, Minoda Y, Yamamoto Y. 1968. Phytase from *Aspergillus terreus*. Production, purification and some general properties of the enzyme. *Agric. Biol. Chem.* 32:1275-1282.

Yan W, Reigh RC. 1997. Effects of fungal phytase on utilization of dietary protein and minerals, and dephosphorylation of phytic acid in the alimentary tract calcium: total phosphorus ratio in broiler diets. *Poult Sci* 76:37–46.

Yang G, Shamsuddin AM. 1995. IP-6-induced growth inhibition and differentiation of HT-29 human colon cancer cells: Involvement of intracellular inositol phosphates. *Anticancer Res.* 15:2479-2488.

Yang WJ, Matsuda Y, Inomata M, Nakagawa. 1991a. Developmental and dietary induction of 90 kDa subunit of rat intestinal phytase. *Biochim. Biophys. Acta* 1075, 83-87.

Yang WJ, Matsuda Y, Sano S, Masutani H, Nakagawa. 1991b. Purification and characterization of phytase from rat intestinal mucosa. *Biochim. Biophys. Acta* 1075:75-82.

Yanke LJ, Bae HD, Selinger LB, Cheng KJ. 1998. Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. *Microbiology (Reading)* 144:1565–1573.

- Yi Z, Kornegay ET. 1996. Sites of phytase activity in the gastrointestinal tract of young pigs. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 61:361-368.
- Yi Z, Kornegay ET, Denbow DM. 1996. Effect of microbial phytase on nitrogen and amino acid digestibility and nitrogen retention of turkey poult fed corn-soybean meal diets. *Poultry Sci* 75:979-990.
- Yin QQ, Zheng QH, Kang XT. 2007. Biochemical characteristics of phytases from fungi and the transformed microorganism. *Animal Feed Science and Technology.* 132:341-350.
- Yoon SJ, Choi YJ, Min HK, Cho KK, Kim JW, Lee SC, Jung YH. 1996. Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme Microbiol. Technol.* 18:449-454.
- Yoo GY, Wang XJ, Choi SM, Han KM. 2005. Dietary microbial phytase increased the phosphorus digestibility in juvenile Korean rockfish *Sebastes schlegeli* fed diets containing soybean meal. *Aquaculture* 243:315-22.
- Yu FN, Wang DZ. 2000. The effects of supplemental phytase on growth and the utilization of phosphorus by crucian carp *Carassius carassius*. *J Fish Sci Chin* 7(2):106-109.
- Zimmermann B, Lantzsch HJ, Mosenthin R, Schoener FJ, Biesalski HK, Drochner W. 2002. Comparative evaluation of the efficacy of cereal and microbial phytases in growing pigs fed diets with marginal phosphorus supply. *J Sci Food Agric* 82:1298-1304.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Jesús Gerardo Carreon Treviño

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con especialidad en Biotecnología

**Tesis: CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA FITASA C
DE *Bacillus subtilis* Y DE SUS FORMAS RECOMBINANTES**

Campo de Estudio: Biotecnología y Calidad Alimentaria

Datos Personales: Nacido en Monterrey Nuevo León , el 27 de Abril de 1978, hijo de Amelia Treviño Treviño y José Maria Carreón Leal.

Educación: Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León Grado obtenido: Químico Bacteriólogo Parasitólogo 1995-2001 (cédula 3735400).

Experiencia Profesional: Realización de tesis Doctoral: Caracterización bioquímica de la fitasa C de *Bacillus subtilis* y de sus formas recombinantes.(Febrero 2003-Julio 2008)

Presentaciones en congreso

M. Guerrero-Olazarán, L. Rodríguez-Blanco, J.G. Carreon-Treviño, J.A. Gallegos-López, M. Castillo-Galván, J.M. Viader-Salvadó Bacterial phytase produced in *Pichia pastoris*. 13th European Congress on Biotechnology, Barcelona, España. 16-19 Septiembre de 2007.

J. A. Gallegos-López, J. G. Carreón-Treviño, A. Rojo-Domínguez, M. Guerrero-Olazarán, J.M. Viader-Salvadó “Construcción de cepas recombinantes de *Pichia pastoris* productoras de una fitasa termoestable”. BioMonterrey06, Coordinación de Ciencia y Tecnología, Gobierno del Estado de Nuevo León, Monterrey, N.L., (México), 20-24 de Septiembre de 2006.

J. G. Carreón-Treviño, K. P. Contreras-Torres, J. M. Viader-Salvadó, M. Guerrero-Olazarán, “Biochemical comparison of five microbial phytases”. Second Internacional Congress of Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries. Saltillo, Coahuila, (México), 16-18 de Octubre de 2006.

Además ha sido publicado y aceptado para su publicación en:

M. Guerrero-Olazarán, L. Rodríguez-Blanco, J.G. Carreon-Treviño, J.A. Gallegos-López, M. Castillo-Galván, J.M. Viader-Salvadó. 2007. Bacterial phytase produced in *Pichia pastoris*. Journal of Biotechnology 131(2):S233-S234. ISSN: 0168-1656

Viader-Salvadó, J.M., Carreón-Treviño, J.G., Contreras-Torres, K.P., Guerrero-Olazarán, M. Biochemical comparison of five microbial phytases. En: Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries. Vol. 2. En impresión.