



DISPONIBILIDAD DE FÓSFORO EN DOS HARINAS VEGETALES TRATADAS CON UNA FITASA BACTERIANA RECOMBINANTE Y CON DOS FITASAS FÚNGICAS COMERCIALES

Karen P. Contreras-Torres, L. Elizabeth Cruz-Suárez, José M. Viader-Salvadó, Martha Guerrero-Olazarán
Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL,
Av. Pedro de Alba s/n, Col. Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L., México, 66450.
(81) 83294000 ext. 6439, mguerrer@fcb.uanl.mx

Palabras clave: Fitasas, disponibilidad de fósforo, soya, chícharo.

Introducción. El bajo contenido de fitasas endógenas en vegetales y su baja o nula acción en el tracto gastrointestinal de los animales limita la disponibilidad de fósforo en harinas de origen vegetal con alto contenido de fitato. Actualmente, se adicionan fitasas exógenas, la mayoría fúngicas y activas a pH ácidos, para aumentar el fósforo disponible en preparaciones nutrimentales con estas harinas.

Con el fin de evaluar la eficacia de una fitasa alcalina de origen bacteriano (*Bacillus subtilis*) y producida de forma recombinante (PhyC-R) en *Pichia pastoris* (1), en el presente trabajo, se evaluó la disponibilidad de fósforo en harinas de soya (*Glycine max*) y chícharo (*Pisum sativum*), tratadas con la PhyC-R y dos fitasas ácidas comerciales de origen fúngico bajo diferentes condiciones de reacción.

Metodología. Cada harina (250 mg) fue sometida a cuatro tratamientos, tres de ellos con las fitasas evaluadas (Natuphos, Allzyme SSF y PhyC-R) y uno sin fitasa como tratamiento control, bajo diferentes condiciones de pH, concentración de la enzima, humedad, temperatura y tiempo de reacción. Cada suspensión de harina se incubó con agitación constante a una temperatura y tiempo determinado, se detuvo la reacción enzimática con un volumen de TCA al 15%, se centrifugó y con el sobrenadante recuperado se determinó el fosfato liberado mediante el método colorimétrico del ácido ascórbico. La disponibilidad de fósforo fue expresada como μg de fósforo liberado por mg de harina tratada ($\mu\text{g P/mg}$ harina). Para determinar el efecto del pH se emplearon soluciones amortiguadoras a pH 7.5 (100 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl_2), y a pH 5.5 (360 mM acetato de sodio, 1 mM CaCl_2) o agua MilliQ (pH 6.3). Cada reacción se llevó a cabo a dos temperatura (30 y 50°C), a dos concentraciones de enzima (1600 U/kg ó 3200 U/kg de harina), a tres condiciones de humedad (20:1, 4:1 y 2:1 agua:harina) y cinco tiempos de incubación (0, 0.5, 1, 2 y 3 horas). Todos los ensayos se hicieron al menos por triplicado y se compararon entre sí mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un factor o multifactorial y una prueba de comparación de medias de Tuckey.

Resultados y discusión. Los tratamientos de ambas harinas con fitasas mostraron niveles de fósforo liberado superiores a los presentados por el control, indicando la

acción de las fitasas exógenas. La harina de chícharo sin la adición de fitasas exógenas liberó un 20% del total del fósforo fítico, debido a la presencia probable de fosfatasas endógenas. El tratamiento a diferentes valores de pH con cada fitasa mostró valores más altos de fósforo disponible al valor de pH favorable de cada enzima, 5.5 para las fitasas comerciales y 7.5 para PhyC-R a una relación agua:harina 4:1 y 30°C. El aumento de la concentración de las fitasas fue significativo en fósforo disponible sólo en la harina de chícharo. En ambas harinas, a mayor proporción de agua y a más tiempo de reacción con las fitasas se lograron liberar niveles más altos de fósforo. La temperatura afectó de forma diferente en los tratamientos para cada harina con cada enzima, siendo la PhyC-R la menos afectada negativamente por el aumento de la temperatura. Eliminando el valor de fósforo liberado por la acción de factores endógenos de cada harina, se logró liberar hasta un 96% ($3.8 \pm 0.6 \mu\text{g P/mg}$), 84% ($3.4 \pm 0.4 \mu\text{g P/mg}$) y 68% ($2.7 \pm 0.1 \mu\text{g P/mg}$) del fósforo fítico en los tratamientos de la harina de soya con Natuphos (30°C, pH 5.5, 4:1 agua:harina y 3 h), Allzyme SSF (30°C, pH 5.5, 4:1 agua:harina y 2 h) y PhyC-R (30-50°C, pH 6.3, 20:1 agua:harina y 2 h), respectivamente. Para la harina de chícharo se obtuvieron valores de hasta un 80% ($4.6 \pm 0.1 \mu\text{g P/mg}$) para Natuphos, 66% ($3.7 \pm 0.2 \mu\text{g P/mg}$) para Allzyme SSF y 66% ($3.8 \pm 0.6 \mu\text{g P/mg}$) para PhyC-R bajo las mismas condiciones de reacción (30°C, pH 6.3, 20:1 agua:harina y 3 h). A diferencia de las dos fitasas comerciales, la PhyC-R es altamente específica para fitato, por lo cual se puede considerar que en el caso de esta enzima el fósforo liberado proviene solamente del fitato.

Conclusiones. PhyC-R ofrece una alternativa viable para disponer del fósforo fítico de harinas vegetales.

Agradecimientos. Agradecemos los apoyos por parte de los fondos CONACYT-SAGARPA (2003-02-141) y PAICYT, y el apoyo técnico brindado por el Q.B.P. J. Gerardo Carreón-Treviño. KPCT agradece la beca del CONACYT.

Bibliografía.

1. Guerrero-Olazarán, M., Rodríguez-Blanco, L., Carreón-Treviño, J.G., Gallegos-López, J.A., Castillo-Galván, M. y Viader-Salvadó, J.M. (2007). Bacterial phytase produced in *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* 131(2): S233-S234.