



PURIFICACION PARCIAL Y ESTABILIZACION DE ENZIMA FITASA PRODUCIDA POR FERMENTACION EN MEDIO SÓLIDO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

Alberto A. Neira^a, Cristóbal N. Aguilar^a, Anna Iliná^b, Georgina Michelena^c, José L. Martínez^b

^a Departamento de Investigación en Alimentos, ^b Cuerpo Académico de Nanobiociencias, Universidad Autónoma de Coahuila. Blvd. V. Carranza S/N. Col. República, CP 25280, Saltillo, Coahuila, México. ^c Facultad de Ing. Química, Instituto Superior Politécnico José Antonio Echeverría, La Habana, Cuba. C.P. 19390 Email: jose-martinez@uadec.edu.mx

Palabras clave: fitasa, ultrafiltración, estabilización.

Introducción. Las fitasas son enzimas hidrolíticas (EC 3.1.3.8) que facilitan biodisponibilidad del fósforo presente en la molécula de fitato y se aplican como aditivo alimenticio en la producción a gran escala de animales monogástricos, principalmente cerdos y aves de granja (1). Éstas se producen principalmente por fermentación en medio sólido (FMS). La recuperación y concentración de la enzima después de FMS es una etapa importante antes de su aplicación como un aditivo funcional (2). Aunado a esto, la estabilización de la enzima representa un gran impacto a nivel comercial debido a que permite retrasar el tiempo de inactivación prolongando su vida útil.

El presente trabajo tiene como objetivo realizar la purificación parcial y definir los factores que permiten la estabilización de la enzima fitasa obtenida por FMS de residuos agroindustriales.

Metodología. La fermentación fue llevada a cabo bajo las condiciones descritas por Costa y col. (1), utilizando residuos de triticale como sustrato. La extracción de la enzima se realizó usando 5 mL de agua destilada por 1 g de sustrato fermentado. El extracto crudo se sometió a ultrafiltración en membranas de celulosa de 300 KDa (1). Para seleccionar los factores que impactan la estabilidad de enzima, se elaboró un diseño de experimentos tipo Box-Hunter (Tabla 1) cuatro variables a dos niveles cada uno (T1–T8): la temperatura de almacenado, glicerina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (FMSF) como inhibidor de proteasas y maltosa como estabilizantes de las fitasas. La actividad fitasa se determinó mediante la técnica Harland y Harland (3) la cual cuantifica el fosforo liberado a partir del ácido fitico por la actividad de la enzima presente en la mezcla de reacción.

Tabla 1. Diseño experimental Box-Hunter aplicado en el ensayo de estabilización de enzima

Tratamiento	Temperatura (°C)	Glicerina % v/v	FMSF mM	Maltosa % p/v
1	4	30	200	20
2	25	15	125	40
3	4	15	125	20
4	4	15	200	40
5	4	30	125	40
6	25	30	125	20
7	25	30	200	40
8	25	15	200	20

Resultados. La fracción obtenida después de ultrafiltración por la membrana de 300 kDa se caracterizó por un rendimiento de 60% y el factor de purificación de

1.7 veces. La Figura 1 presenta el porcentaje de actividad fitasa residual para cada uno de los tratamientos aplicados (Tabla 1) a una fracción del extracto ultrafiltrado y almacenado durante 20 días. Se demuestra que bajo los tratamientos 1 y 4 (Tabla 1) la pérdida de la actividad enzimática durante 20 días de almacenamiento es no mayor de 15%.

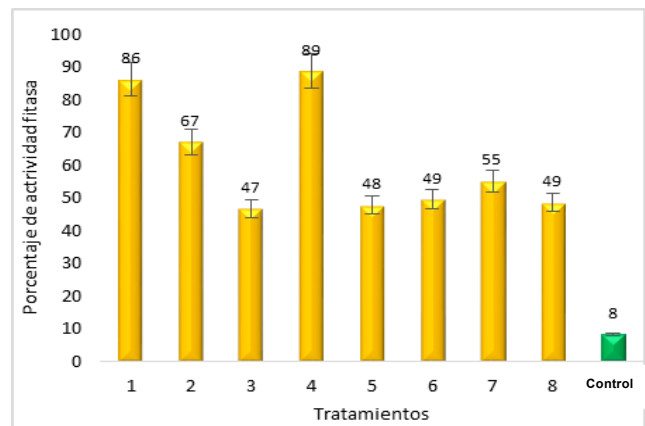


Figura 1. Actividad fitasa residual (%) en un extracto semipurificado de enzima fitasa (300 kDa) con diferentes tratamientos a los 20 días.

Al aplicar un análisis de muestras pareadas a los resultados obtenidos, permiten seleccionar las condiciones aptas para estabilizar la enzima de interés durante almacenamiento a 4°C: 1) glicerina a 35% (v/v), FMSF 125 mM, maltosa 20% (p/v); 2) glicerina a 15% (v/v), FMSF 200 mM, maltosa 40% (p/v).

Conclusiones. La ultrafiltración por membrana de 300 kDa permite una purificación parcial del extracto obtenido mediante la FMS manteniendo rendimientos altos. El uso de aditivos como la glicerina, inhibidor de serina-proteasas y la maltosa, en combinación con una temperatura de almacenado baja (4 °C) prolonga la vida útil de un extracto enzimático de fitasas.

Agradecimiento. AL CONACYT por el financiamiento del proyecto Fomix clave: COAH- 2012-C20/1888837 y beca de postgrado.

Bibliografía.

- Costa M., Torres M., Magariños H., & Reyes A. (2010) *Rev. Colomb. Biotecnol.*, *XII*(2), 163–175.
- Rodríguez D., Parada J., Medeiros A., Carvalho J., Lacerda L., Rodríguez J. & Soccol C. (2013) *Process Biochem.*, *48*, 374–379.
- Harland B. y Harland J. (1980) *Cereal Chem.*, *57*, 226-229.