

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



Determinación y Cuantificación de Actividad Fitasa en Microorganismos
Aislados de Rumen Bovino

Por:

MARÍA CONCEPCIÓN SANTIAGO GARCÍA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre de 2015.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Determinación y Cuantificación de Actividad Fitasa en Microorganismos
Aislados de Rumén Bovino

Por:

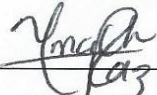
MARÍA CONCEPCIÓN SANTIAGO GARCÍA

TESIS

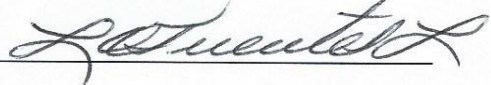
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

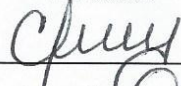
Aprobada



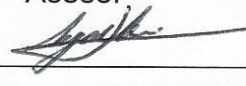
Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez
Director



Lic. Laura Olivia Fuentes Lara
Asesor



M.C. Gustavo López Guarín
Asesor

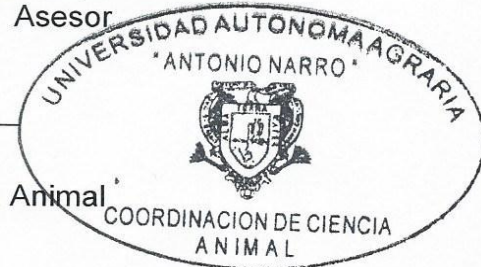


M.C. Humberto Sepúlveda Palacios
Asesor



Dr. José Dueñez Alanís
Coordinador de la División de Ciencia Animal

Saltillo, Coahuila, México.
Diciembre de 2015.



AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de vivir, por darme salud, y la oportunidad de seguir adelante con mis estudios.

A mi Alma Mater por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de adentrarme a este bello mundo y maravilloso del saber.

A mi familia por su amor y apoyo incondicional, por sus consejos que me han servido para seguir adelante en mi vida personal y profesional.

A la Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por su apoyo, paciencia y dedicación, así como también su enseñanza y sencillez.

A mis asesores Lic. Laura Olivia Fuentes Lara, M.C. Gustavo López Guarín y al M.C. Humberto Sepúlveda Palacios.

Al Dr. Mario Alberto Cruz Hernández por su apoyo y consejo brindado.

Al Dr. Edmundo Rodríguez Campos por su apoyo y profesionalismo.

A la M.C. Laura Maricela Lara López por su atención y apoyo brindado.

A los maestros del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos por sus conocimientos y enseñanzas brindadas.

DEDICATORIA

A mis padres con todo el amor y cariño. Gracias por darme la vida, por todo su esfuerzo para poder alcanzar mis sueños, por confiar en mi y estar conmigo en cada momento de mi vida, ustedes son mi mejor ejemplo a seguir, ustedes que han luchado por darme bienestar y me han dado todo lo que han podido sin pedirme nada cambio..

A mis hermanos quienes me han dado su amor y cariño, gracias por ser mis mejores amigos.

A mis familiares por sus consejos y motivaciones brindadas para seguir adelante en mis estudios.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA	ii
RESUMEN.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Justificación	2
1.2 Hipótesis.....	2
1.3 Objetivo General	3
1.4 Objetivos Específicos	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Enzimas.....	4
2.1.1 Función	5
2.1.2 Factores que Afectan la Actividad Enzimática	6
2.2 Microorganismos del Rumen.....	6
2.3 El Fósforo	7
2.4 El Fitato	8
2.4.1 Estructura del Ácido Fítico	9
2.5 Fitasa.....	10
2.5.1 Fitasa microbiana	11
2.5.2 Fitasa Animal	11

2.5.3 Fitasa Vegetal.....	11
2.5.4 Clasificación de la Fitasa	12
2.5.5 Modo de Acción	13
2.5.6 Aplicación biotecnológica.....	13
2.5.7 Producción de Fitasa Microbiana.....	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1 Ubicación Geográfica del Área de Estudio	16
3.2 Experimento	16
3.3 Etapa I: Purificación de las Bacterias aisladas	16
3.3.1 Preparación de Medio de Cultivo Agar Schaedler (AS)	16
3.3.2 Siembra en Medio AS.....	17
3.3.3 Caracterización Macroscópica y Microscópica	17
3.4 Etapa II: Evaluación de las 38 Cepas para la Producción de una Enzima	18
3.4.1 Ensayo (Screening) en un Medio Especifico Sólido para Producción de Fitasa.....	18
3.4.2 Ensayo (Screening) en un Medio Natural de Cereales	20
3.5. Etapa III: Producción de la Enzima Fitasa.....	21
3.5.1 Preparación de Medio Líquido Inductor	21
3.5.2 Siembra	22
3.5.3 Determinación de la Curva de Crecimiento	22

3.5.4	Determinación de Proteína Extracelular por el Método de Biuret	23
3.5.5	Cuantificación de la Actividad Enzimática.....	25
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1.	Etapa I: Purificación de las Bacterias Aisladas en Agar Schaedler	28
4.1.1.	Descripción Macroscópica y Microscópica	28
4.2.	Etapa II Evaluación de las 38 Cepas para la Producción de una Enzima	32
4.2.1.	Caracterización Macroscópica en un Medio Específico Sólido.....	32
4.2.2.	Descripción Macroscópica en un Medio Natural de Cereales.....	35
Etapa III	Producción de la Enzima Fitasa.....	35
4.3.1.	Cinética de crecimiento de la cepa seleccionada (<i>Bacillus sp</i>) en el Medio Específico para inducción de fitasa.....	35
4.3.2.	Determinación de Proteína Extracelular (Concentración de Enzima) por el Método de Biuret	36
4.3.3.	Cuantificación de la Actividad Enzimática.....	37
5.	CONCLUSIONES	39
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	40

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 3.1. Composición química del medio sólido específico para el ensayo de la degradación del ácido fítico.....	19
Cuadro 3.2. Composición química del medio líquido específico para producir fitasa	22
Cuadro 3.3. Datos para la curva de calibración	26
Cuadro 4.1. Descripción macroscópica y microscópica de las bacterias aisladas en agar Schaedler.....	29
Cuadro 4.2. Descripción macroscópica de las bacterias aisladas en un medio específico sólido.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Estructura del ácido fítico en la forma completamente desprotonada.	9
Figura 3.1. Medio Agar-Schaedler.	17
Figura 3.2. Medio específico sólido.....	19
Figura 3.3. Colonia pura en un medio específico sólido.....	20
Figura 3.4. Cámara con luz ultravioleta para la esterilización de harina de maíz, harina de trigo y cascarilla.	21
Figura 3.5. Cajas Petri con medio natural de cereales estéril.	21
Figura 3.6. Espectrofotómetro Thermo Scientific GENESYS 20.....	23
Figura 3.7. Centrífuga Labnet International, Inc.....	24
Figura 3.8. Baño María marca Napco utilizado para el análisis de proteína.	25
Figura 3.9. Tubos eppendorf que contienen los extractos enzimáticos.	27
Figura 3.10. Solución de ácido fítico.	27
Figura 3.11. Vortex marca Labnet.....	27
Figura 4.1. Crecimiento bacteriano en un medio de cultivo específico.	32
Figura 4.2. <i>Bacillus sp.</i> en un medio de cultivo específico.....	32
Figura 4.3. Crecimiento bacteriano en el medio natural de cereales.	35
Figura 4.4. Curva de crecimiento de la cepa <i>Bacillus sp.</i>	36
Figura 4.5. Determinación de proteína extracelular por el método de Biuret de la cepa <i>Bacillus sp.</i>	37
Figura 4.6. Cuantificación de la actividad enzimática de la cepa <i>Bacillus sp.</i>	38

RESUMEN

La fitasa es una enzima de gran importancia por su función en la alimentación animal. Existen diversas fuentes para la obtención de esta enzima, una de ellas son los microorganismos. Los rumiantes tienen la capacidad de asimilar el fósforo, debido a que en el rumen hay presencia de microorganismos que producen la enzima fitasa, esta enzima hidroliza el fitato para liberar el fósforo. Por tal motivo, en el presente trabajo se purificaron bacterias provenientes del rumen bovino, para lograrlo, primero se purificaron los microorganismos en un medio específico para anaerobios (agar-Schaedler), en el cual hubo crecimiento de bacterias y también se encontró una gran diversidad de estas, logrando purificar un total de 38 cepas, posteriormente a través de medios específicos se evaluaron todas las cepas para detectar cuál de ellos eran candidatos para ser evaluados para la producción de la enzima, para ello se sembraron en dos medios de cultivo, una en un medio específico usando el ácido fólico como fuente de carbono y otro medio a base de cereales; en el medio específico hubo algunas cepas con buen crecimiento y se eligió una cepa (*Bacillus sp.*); en el medio natural de cereales mostró muy poco crecimiento. Posteriormente se realizó una inducción de la bacteria seleccionada en un medio líquido específico diseñado para la producción de la enzima fitasa empleando como fuente de carbono el ácido fólico, se tomaron muestras cada 24 horas, para continuar con la evaluación. Se realizó una curva de crecimiento el cual presentó una velocidad específica de 0.0002 DO/h. Además se determinó la cantidad de proteína extracelular por el método de Biuret, en donde se observó una máxima cantidad de proteína de 164.12 mg/mL a las 168 horas de fermentación. Finalmente se cuantificó la actividad enzimática, aquí se apreció que la máxima actividad se observó de las 120 horas de fermentación a las 168 horas.

Palabras clave: Enzima, fitasa, fósforo, ácido fólico, bacterias ruminales.

1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas son moléculas proteicas que se sintetizan en muchos organismos y que cumplen diversas funciones importantes para su desarrollo. Existen diferentes tipos de enzimas y la fuente de éstos también es diverso. Algunas enzimas intervienen en el proceso digestivo de los animales, estas enzimas ayudan a digerir los nutrientes y aprovecharlos.

Una enzima que desempeña varias e importantes funciones es la fitasa, esta enzima permite liberar el fósforo de otras moléculas. La fitasa se encuentra en plantas, animales y microorganismos; cada una desempeña funciones específicas.

Los animales rumiantes poseen microorganismos en su sistema digestivo que participan activamente en el procesamiento de los alimentos. Algunas bacterias de este medio producen la enzima fitasa, la cual permite desdoblar el fósforo contenido en los alimentos vegetales ya que este elemento se encuentra en una forma no disponible, es decir, formando parte de una molécula, el fitato.

La enzima fitasa puede ser añadida a alimentos destinados a otros animales como los no rumiantes, de esta manera se logra una mejor nutrición ya que el fósforo estaría disponible para su aprovechamiento.

Correo electronico; María Concepción Santiago García,
stgogarcia@outlook.com

1.1 Justificación

Los seres vivos requieren una serie de nutrientes para su crecimiento y desarrollo, uno de estos nutrientes es el fósforo, el cual cumple con varias funciones en los animales y en el ser humano. Este elemento forma parte de la estructura ósea de los animales, es parte de importantes biomoléculas como los ácidos nucleicos, es componente de las membranas celulares y de moléculas de alta energía.

El fósforo contenido en fuentes vegetales está en forma de fitato, éste compuesto no puede ser desdoblado fácilmente por algunos animales, sobre todo por los no rumiantes, por lo que este tipo de animales no pueden obtener el fósforo de sus alimentos lo que conduce a una desnutrición.

Otra de las consecuencias del bajo aprovechamiento del fósforo en la alimentación de los animales, sobre todo en la producción intensiva de ganado es que el fósforo excretado se convierte en un contaminante de los mantos freáticos.

Para combatir la desnutrición por deficiencia de fósforo y reducir la contaminación de los depósitos de agua es necesario lograr la degradación del fitato, esto puede llevarse a cabo por una enzima llamada fitasa, la cual puede desdoblar el fitato y liberar el fósforo haciéndolo disponible. La fitasa es producida de manera natural por los microorganismos del rumen, por lo que el estudio y conocimiento de éstos y de la enzima permitirá aprovechar este catalizador en diferentes ámbitos además de los ya mencionados.

1.2 Hipótesis

Es posible la producción de la enzima fitasa a partir de microorganismos bacterianos de líquido ruminal.

1.3 Objetivo General

Producir la enzima fitasa a partir de microorganismos bacterianos ruminales.

1.4 Objetivos Específicos

- a) Purificar las bacterias del rumen de vacas raza Holstein.
- b) Caracterizar macroscópicamente las diferentes cepas bacterianas aisladas.
- c) Evaluar dos medios de cultivo para la inducción de la producción de fitasa.
- d) Realizar un screening y seleccionar las bacterias productoras de fitasa.
- e) Evaluar la producción de fitasa en una de las cepas productoras.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Enzimas

Las enzimas son proteínas que se comportan como catalizadores; es decir, aceleran la velocidad con la que las reacciones se llevan a cabo sin alterar el equilibrio y son responsables de las transformaciones metabólicas en los seres vivos. Desde el punto de vista fisicoquímico y como consecuencia de su estructura proteica, la actividad catalítica de las enzimas depende del pH y de la temperatura de reacción, característica que resulta de fundamental importancia que pueden adquirir estos dos parámetros en la aplicación en la industria alimentaria (García, Quintero y López, 1993).

Las enzimas son extremadamente eficientes y catalizadores altamente específicos. Hay varias clases de enzimas, según la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular se clasifican:

- a) Oxidorreductasas, catalizan la transferencia de electrones de una molécula donadora a otra aceptora.
- b) Transferasas, llevan a cabo la transferencia de un grupo, tal como un glucosil, de un compuesto a otro.
- c) Hidrolasas, catalizan el rompimiento de enlaces específicos que incluyen carbono-oxígeno, carbono-nitrógeno, enlaces carbono-carbono y enlaces oxígeno-fósforo. Esencialmente estas son reacciones de transferencia donde el agua es la molécula aceptora. Muchas de las enzimas actualmente usadas en aplicaciones en la industria alimentaria, tales como las amilasas, xilanasas, celulasas, proteasas y fosfatasas, son hidrolasas.

d) Liasas, pueden romper enlaces similares a las que rompen las hidrolasas pero por un mecanismo de eliminación que resulta en la formación de dobles enlaces o anillos.

e) Isomerasas, llevan a cabo cambios estructurales dentro de una molécula.

f) Ligasas, catalizan el acoplamiento de dos molécula en conjunción con la hidrólisis de un enlace fosfato de alta energía como el ATP (Bedford y Partridge, 2001).

2.1.1 Función

Las enzimas tienen una gran variedad de funciones dentro de los organismos. Son indispensables para la transducción de señales y la regulación celular, a menudo vía cinasas y fosfatasas. También generan movimiento, ya que generan la contracción muscular (Whitehurst y Oort, 2010).

Tienen una importante función en el sistema digestivo de mamíferos y otros animales. Las enzimas tales como las amilasas rompen grandes moléculas de almidón; las proteasas desdoblan grandes moléculas proteicas. Varias enzimas digieren las sustancias de los alimentos. Los rumiantes producen enzimas como la celulasa para romper la celulosa de las paredes celulares de las fibras vegetales. Otras enzimas pueden trabajar juntas en un orden específico, creando rutas metabólicas. Estas enzimas son las que determinan cuales pasos se llevarán a cabo en tales rutas (Whitehurst y Oort, 2010).

El proceso de activación de las reacciones químicas realizadas por las enzimas se llama catálisis. En las reacciones enzimáticas las moléculas presentes al inicio de la reacción se llaman sustratos. Las enzimas convierten los sustratos en diferentes moléculas llamadas productos. Las enzimas son selectivas con los sustratos y por lo tanto catalizan sólo pocas reacciones de entre muchas posibles (Whitehurst y Oort, 2010).

2.1.2 Factores que Afectan la Actividad Enzimática

Cualquier cambio en la cantidad de producto formado en un periodo de tiempo específico dependerá del nivel de enzima presente. La cantidad de enzima presente en una reacción es medida por la actividad que cataliza. La relación entre la actividad y la concentración es afectada por muchos factores tales como la temperatura, pH, etc. La actividad enzimática más alta se encuentra cuando la concentración del sustrato es ilimitado (Whitehurst y Oort, 2010).

Se ha encontrado experimentalmente que si la cantidad de enzima se mantiene constante y la concentración del sustrato se incrementa gradualmente, la velocidad de reacción se incrementará hasta alcanzar un máximo. Después de este punto, un incremento en la concentración en el sustrato no incrementará la velocidad (Whitehurst y Oort, 2010).

2.2 Microorganismos del Rumen

El rumen es una cámara de fermentación predominantemente anaeróbica. Tiene un pH variable, producto de la misma fermentación microbiana y del metabolismo corporal. Además es una fuente continua de sustratos (alimento, saliva, metabolitos microbianos, etc), con una continua remoción de productos ya sea por absorción, crecimiento microbiano, paso a otros compartimientos, eructo, etc. (Mora, 2007).

La microbiota ruminal está formada principalmente por bacterias y protozoarios, teniendo ambos muchas características funcionales comunes, así como algunas diferencias notables. Están presentes también hongos y levaduras, aunque su número es menor. Las bacterias muestran una gran diversidad de género y especies, reflejando también la diversidad de alimentos existentes (Mora, 2007).

Existen alrededor de 200 especies distintas de bacterias en el rumen y son los microorganismos más abundantes y los responsables de la mayor parte

de la degradación del alimento. Las encontramos a concentraciones que van desde 1,000 a 10,000 millones por ml de líquido ruminal. Se trata de una población activa y compleja que se encuentra en su mayoría adherida a las partículas de alimento y que junto con éstas llegan al abomaso donde son digeridas (Caravaca *et al.*, 2005).

Para la obtención de enzimas a gran escala, es de gran importancia seleccionar el organismo adecuado (bacteria, hongo, planta, animal, etc.) y el órgano, tejido o tipo celular apropiado que sea capaz de sintetizar una gran cantidad de la enzima deseada. Normalmente se utilizan microorganismos (bacterias, levaduras y hongos), ya que son una fuente apropiada de la mayoría de las enzimas industriales y son fáciles de manipular y cultivar (Castillo *et al.*, 2005).

La población microbiana del rumen representa una fuente rica de enzimas con tremendo potencial para aplicaciones industriales. Las actividades enzimáticas que existen en el rumen son diversas e incluyen enzimas que degradan polímeros de la pared celular como las celulasas, xilanasas, amilasas, y otras que también desdoblan diversas sustancias como las proteasas y fitasas (Selinger *et al.*, 1996).

2.3 El Fósforo

El fósforo es un nutriente crítico para todos los organismos vivos como un componente de los fosfolípidos de las membranas, ácidos nucleicos, ATP y muchas otras moléculas biológicas. La disponibilidad del fósforo juega un papel clave en cuestiones de fertilidad del suelo y producción de cultivos, nutrición y salud animal, así como el manejo de residuos y calidad del agua (Rukma y Sathe , 2002).

El fósforo es importante para el desarrollo del hueso y diversos procesos metabólicos en animales (Bedford y Partridge, 2001). Además de sus funciones en el tejido óseo, el elemento forma parte esencial de las moléculas de los

fosfolípidos, los ácidos nucleicos, las fosfoproteínas, las coenzimas y las moléculas con enlaces altas en energía (Mora Brautigán, 2007).

En el mundo existen grandes áreas deficientes en fósforo, especialmente en las zonas tropicales y subtropicales, pudiendo considerarse la deficiencia de este elemento, como el problema más extendido y de mayor importancia económica de todas las deficiencias minerales que afecta al ganado en pastoreo (McDonald *et al.*, 2006).

Algunas manifestaciones de la deficiencia de fósforo en conjunto con otros minerales como el calcio son el raquitismo y osteomalacia, es decir huesos pobremente mineralizados; osteoporosis, pérdida de masa ósea lo cual trae como consecuencia una reducción del tamaño y resistencia de los huesos; hipertiroidismo secundario, principalmente en caballos; cascarón frágil, lo que hace que los huevos de las gallinas no lleguen al mercado (Mora Brautigán, 2007).

2.4 El Fitato

El fitato (*mio*-inositol hexaquisfosfato) es la principal forma de almacenamiento de fósforo en semillas vegetales y un factor principal que limita la disponibilidad del fósforo en las dietas de muchos animales, incluyendo la de los humanos. El fitato no puede ser digerido eficientemente por los no rumiantes y es excretado como desecho. La pérdida concomitante de minerales complejos exagera el impacto antinutricional del fitato. Las estrategias para mejorar la disponibilidad del fósforo y minerales incluyen la adición de fitasa a los alimentos, el uso de componentes genéticamente modificados en los piensos con genes que expresen fitasa, o la reducción en la síntesis o acumulación de fitato en las semillas (Rukma y Sathe, 2002).

El ácido fítico (*mio*-inositol hexaquisfosfato, fitato) es la principal forma de almacenamiento de fósforo en cereales, oleaginosas y leguminosas (Hosseinkhani, Emtiazi, y Nahvi, 2009). El ácido fítico se encuentra en su forma de fitato y forma complejos con minerales (tales como calcio, magnesio, zinc y

fierro), haciéndolos indisponible para su absorción directa (Bedford y Partridge, 2001).

2.4.1 Estructura del Ácido Fítico

Estructuralmente, el ácido fítico consiste de un anillo de mio-inositol completamente fosforilado (Figura 2.1) que existe en una conformación de silla en solución diluída. La molécula contiene un total de doce sitios de disociación de protones. Seis de estos sitios son fuertemente ácidos, tres sitios son débilmente ácidos y los otros tres son muy débilmente ácidos. El ácido fítico fácilmente forma complejos con cationes multivalentes, con el Zn^{+2} forma los complejos más estables seguidos por el Cu^{+2} , Ni^{+2} , Co^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2} y Fe^{+2} . El complejo fitato-mineral puede existir como quelatos solubles o complejos insolubles que precipitan fuera de la solución, dependiendo de las concentraciones del ácido fítico y minerales y del pH de la solución (Bedford y Partridge, 2001).

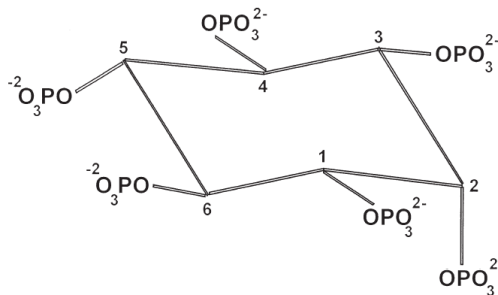


Figura 2.1. Estructura del ácido fítico en la forma completamente desprotonada.

El ácido fítico actúa como un agente antinutricional formando complejos con proteínas y varios iones de metales, por lo tanto disminuye la biodisponibilidad de estos nutrientes en la dieta (Hosseinkhani, Emtiazi y Nahvi, 2009).

La liberación paso por paso del fosfato de fitato, es iniciado por una clase de enzimas que han sido conjuntamente llamadas fitasas (Konietzny y Greiner, 2004).

El fósforo en la forma de fitato está pobremente disponible para los no rumiantes debido a la falta de fitasa, la enzima que rompe los grupos o-fosfato de la molécula de fitato (Cromwell *et al.*, 1993).

Los animales no rumiantes tales como cerdos, aves de corral y humanos no son capaces de metabolizar el fósforo del fitato debido a la falta de enzimas digestivas que hidrolizan al sustrato, y por lo tanto el fósforo inorgánico es agregado a su dieta para satisfacer el requerimiento del fósforo, mientras que el fósforo del fitato ingerido es excretado en el estiércol y se convierte en un problema de contaminación serio de fósforo, contribuyendo a la eutroficación de fuentes de agua en áreas de producción de ganado intensivo (Hosseinkhani, Emtiazi y Nahvi, 2009).

2.5 Fitasa

Las fitasas son enzimas capaces de hidrolizar ácido fítico a derivados de mio-inositol menos fosforilados (Kerovuo *et al.*, 1998).

Las enzimas de este tipo se han encontrado en salvado de trigo, en varias semillas, en órganos de almacenamiento de las plantas tales como papa, en hojas de tabaco y han sido obtenidos de microorganismos (Shie y Ware, 1968).

Las fitasas tienen una distribución amplia en plantas, microorganismos, y en algunos tejidos animales (Konietzny y Greiner, 2004).

En general, hay cuatro fuentes: fitasa vegetal, fitasa microbiana (fitasa fúngica y bacteriana), fitasa generada por la mucosa intestinal en cerdos y humanos y fitasa microfloral asociada al intestino (Kumar *et al.*, 2010).

2.5.1 Fitasa microbiana

Muchos hongos, bacterias y levaduras producen la enzima fitasa (Simons *et al.*, 1990). Dvorakova (1998; Citado por Bedford y Partridge, 2001) listó 29 especies de hongos, bacterias y levaduras que tienen actividad fitasa. De las 29 especies listadas, 21 produjeron fitasa extracelular.

Los hongos y bacterias son las fuentes más importantes de fitasa. El primer reporte sobre fitasa de levaduras fue en 1984. Más tarde, varias cepas de hongos fueron examinados por su habilidad para hidrolizar fitatos y entre todos, los más extensivamente son *Aspergillus niger*, *A. ficcum* y *A. fumigatus* de los cuales se originaron las fitasas comercialmente producidas. Entre las fitasas de levaduras, la de *Saccharomyces cerevisiae* es de particular importancia para la elaboración del pan (Kumar *et al.*, 2010).

2.5.2 Fitasa Animal

Se ha demostrado en varios estudios que la hidrólisis del fitato ocurre en pequeñas preparaciones de mucosas intestinales de pollos, humanos, becerros y ratas (Bedford y Partridge, 2001). Se sabe que los animales utilizan una porción del fósforo del fitato sin la suplementación con fitasa en su dieta. Además se conoce que la utilización del fósforo del fitato y la actividad de las enzimas también está influenciada por el estatus nutricional de los animales (Bedford y Partridge, 2001).

2.5.3 Fitasa Vegetal

Casi todas las plantas contienen un poco de actividad fitasa, aunque el nivel y la significancia de la hidrólisis del fitato por la enzima dentro de las semillas varía considerablemente entre plantas. La actividad fitasa se encontró en cereales tales como centeno, triticale, trigo y cebada y en otras especies tales como la soya también se detectaron niveles marginales de fitasa (Bedford y Partridge, 2001).

En estudios realizados por (Barrier Guillot, *et al.*, 1996) encontraron una correlación entre la actividad fitasa en el trigo y la retención de fósforo en pollos de engorda. La alta actividad de fitasa que se ha encontrado en trigo y cebada es significativa y contribuye a la digestibilidad del fitato (Bedford y Partridge, 2001).

2.5.4 Clasificación de la Fitasa

La fitasa ha sido categorizada de dos maneras, dependiendo del sitio donde la hidrólisis se inicia en la molécula del fitato y con base al pH de la actividad. La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada y la Unión Internacional de Bioquímica (IUPACIUB) reconoció que la fitasa cae en dos categorías, dependiendo del sitio donde la hidrólisis de la molécula del fitato es iniciado (Kumar *et al.*, 2010). Estos son 3-fitasa (EC 3.1.3.8 o mio-inositol hexaquisfosfato 3-fosfohidrolasa) y 6-fitasa (EC 3.1.3.26 o mio-inositol hexaquisfosfato 6- fosfohidrolasa). El primero libera el fosfato en la posición C3, mientras que el último lo libera en la posición C6 del anillo hexafosfato del mio-inositol (Kumar *et al.*, 2010).

Las fitasas también pueden ser categorizadas de manera amplia en dos clases principales basado en su pH óptimo: las fosfatasas ácidas de histidina y fitasas alcalinas. El primero muestra la actividad óptima a un pH alrededor de 5, mientras que los últimos son más pronunciadas a un pH cercano a 8. Con la excepción de *Bacillus*, la mayoría de las enzimas microbianas que degradan fitato, y también la fitasa vegetal pertenecen al tipo ácido (Kumar *et al.*, 2010).

En años recientes, se han hecho esfuerzos considerables para mejorar el valor nutritivo de forraje animal a través de la suplementación con enzimas exógenas. Las enzimas actualmente usadas en piensos pueden ser divididos dentro de dos grupos principales: las hemicelulasas, incluyendo b-glucanasa capaz de degradar polisacáridos y las fitasas (Pasamontes *et al.*, 1997).

2.5.5 Modo de Acción

La fitasa es una fosfatasa. Las fosfatasas son capaces de catalizar la hidrólisis de un fosfato-éster. Esto significa que un grupo fosfato es separado de una molécula. Existen muchas fosfatasas que juegan un papel importante en el metabolismo de plantas y animales, incluyendo al hombre. Las fitasas son capaces de catalizar la hidrólisis de uno o más grupos fosfatos del fitato. Como existen diferentes clases de fitasas, su modo de acción también es diferente (Coelho y Kornegay, 1996). Durante la hidrólisis un grupo fosfato es transferido del sustrato a la enzima y de la enzima al agua, por lo que el proceso sólo se lleva a cabo en solución acuosa (Coelho y Kornegay, 1996).

Venekamp *et al.*, (1995; citado por Coelho y Kornegay, 1996) encontró un orden del rompimiento del fitato por fitasa de *Aspergillus*, observaron que después del rompimiento del grupo fosfato de la posición 3, el orden fue 4,5,6 y 1 (Coelho y Kornegay, 1996).

Las fitasas no hidrolizan los grupos fosfatos en orden aleatorio. Las enzima actúan en una forma bien definida.

2.5.6 Aplicación biotecnológica

Las fitasas son de gran interés para las aplicaciones biotecnológicas, en particular para la reducción del contenido del fitato en piensos y alimentos (Konietzny y Greiner, 2004).

Se han ideado diferentes estrategias para reducir o eliminar la necesidad de la suplementación mineral de fósforo en las dietas para cerdos. La estrategia más practicada es la suplementación con fitasa. Esta práctica ha permitido reducir la cantidad de fósforo desechado en las heces hasta en un 56% (Golovan *et al.*, 2001).

Los ingredientes vegetales usados para formular dieta para cerdos pueden contener de 0.7 a 3.5% de fitato en forma de sales de Ca-Mg, K-Mg o mono-férrico del ácido fítico pobremente solubles (Suttle, 1983; Citado por

(Mroz, Jongbloed y Kemme, 1994). Estas sales no son disponibles para la absorción en el tracto gastrointestinal (Morric y Ellis, 1976; Citado por (Mroz, Jongbloed y Kemme, 1994).

El ácido fítico también es capaz de formar complejos con proteínas (Honig y Wolf, 1991; Citado por (Mroz, Jongbloed y Kemme, 1994) e inhibir α -amilasas, tripsina, tirosinasa y pepsina (Caldwell, 1992; citado (Mroz, Jongbloed y Kemme, 1994). La hidrólisis parcial del ácido fítico en dietas prácticas para cerdos puede ser obtenido mediante la adición de fitasa microbiana purificada (Jongbloed et al., 1992; Citado por Mroz, Jongbloed y Kemme, 1994).

Dependiendo de la aplicación, una fitasa en la cual hay interés comercial debería cumplir una serie de criterios de calidad. Las enzimas usadas como aditivos alimentarios debería ser efectiva en liberar el fosfato del fitato en el tracto digestivo, estable para resistir la inactivación por calor del procesamiento y almacenamiento de los alimentos, y baratas para producirlas (Konietzny y Greiner, 2004).

Los piensos para aves de corral y cerdos contienen principalmente ingredientes de origen vegetal. Cerca de dos terceras partes del fósforo en estos productos está presente como fitato (Simons, 1990).

Hasta ahora la fitasa ha sido principalmente usado como un suplemento alimenticio en dietas en gran parte para puercos y pollos (Hosseinkhani, Emtiazi y Nahvi, 2009).

Suplementando el pienso con fitasa, éste libera minerales unidos al fitato, proteínas y almidón, el cual puede entonces ser digerido y absorbido por el animal para mejorar la eficiencia de producción de carne y huevo. Las fitasas también reducen el riesgo de contaminación del medio ambiente en corrientes de agua por exceso de fósforo excretado por cerdos y pollos (Bedford y Partridge, 2001; Gizzi *et al.*, 2008).

2.5.7 Producción de Fitasa Microbiana

Hosseinkhani, Emtiazi, y Nahvi (2009) aislaron cinco cepas *Pseudomonas sp* de excremento de pollos en un medio específico usando como fuentes de carbono fitina y glucosa, y encontraron una cepa con alta actividad de fitasa.

En un estudio realizado por Yanke *et al*, (1998), se encontró que varias cepas de bacterias ruminales mostraron actividad fitasa, de las 22 especies las que mostraron mayor actividad fueron las cepas de *Selenomonas ruminantum*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación Geográfica del Área de Estudio

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Producción Animal de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, la cual se encuentra ubicada en la ciudad de Saltillo, Coahuila, México; cuyas coordenadas geográficas son 25° 22' latitud Norte y 101° 1' longitud Oeste, con una altitud de 1742 msnm.

3.2 Experimento

El trabajo experimental fue una continuación de un proyecto, en el cual se trabajó con ganado bovino de la raza Holstein sometidos a dietas especiales, de los cuales se obtuvieron muestras de líquido ruminal y posteriormente se aislaron y purificaron las bacterias ruminales con las que se trabajó en este experimento. Para una mayor facilidad en la ejecución del trabajo, éste se realizó por etapas.

3.3 Etapa I: Purificación de las Bacterias aisladas

3.3.1 Preparación de Medio de Cultivo Agar Schaedler (AS)

Para realizar la purificación de las 38 cepas de bacterias que se habían aislado en estudios anteriores se preparó un medio de cultivo sólido con Agar Schaedler (DICKINSON). El medio de cultivo se preparó diluyendo 41.9 g de agar Schaedler en 1000 ml de agua destilada, homogenizando la solución para solubilizarlo calentándolo con ayuda de un mechero hasta que quedara cristalino. Posteriormente se esterilizó en una autoclave a 121°C, a 15 lb durante 15 minutos; una vez transcurrido este tiempo se apagó la autoclave y se esperó a que la presión y temperatura disminuyeran para poder sacar el matraz con el medio de cultivo (Figura 3.1) y así poder vaciar de 20-25 ml por cada caja Petri, se dejó que se enfriaran, una vez solidificado, se taparon y guardaron para su posterior uso.

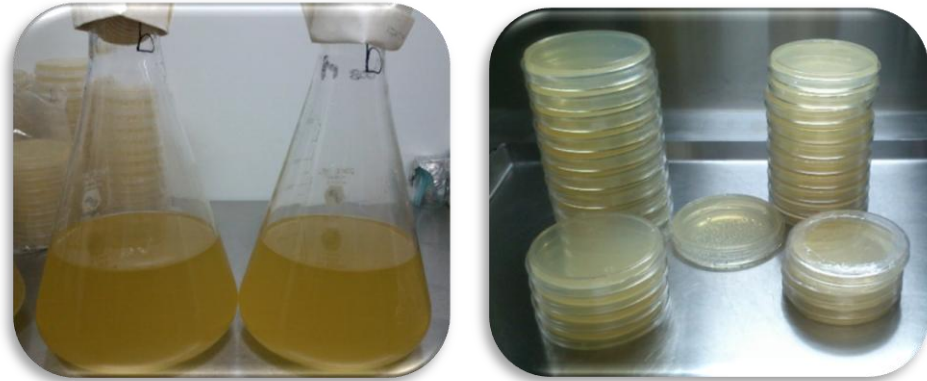


Figura 3.1. Medio Agar-Schaedler.

3.3.2 Siembra en Medio AS

Una vez que se tenía el medio en las cajas Petri se procedió a sembrar tomando una colonia de cada cepa con un asa bacteriológica previamente esterilizada y sembrándolas por el método de estría abierta cruzada, luego las cajas fueron incubadas en frascos con anaerobiosis a 40°C y se monitoreó cada 24 horas, aunque algunas cepas mostraron crecimiento antes de este tiempo, posteriormente se hizo la tinción de Gram.

3.3.3 Caracterización Macroscópica y Microscópica

Después de que se observó crecimiento se procedió a describir las características de las colonias tales como la forma, el color, tamaño, borde, consistencia, etc. Para hacer la descripción microscópica se procedió a realizar la tinción de Gram. Primero se preparó un extendido (frotis) por cada cepa, para ello se colocó una gota de agua destilada sobre el portaobjetos y se diluyó una muestra. Se dejó que la dilución se secase. Posteriormente se añadió 1 o 2 gotas de cristal violeta hasta cubrir la preparación, se dejó actuar por 1 minuto y se enjuagó con agua destilada con la ayuda de una pizeta. Después se le colocó 1 o 2 gotas de lugol y se dejó actuar nuevamente para lavarlo con agua destilada después de 1 minuto. A continuación se decoloró con alcohol-acetona y se lavó inmediatamente con agua destilada, se escurrió el agua y se añadió safranina y se dejó actuar durante 30 segundos, para después enjuagarla

nuevamente con agua destilada; se escurrió, se dejó secar al aire y finalmente se observó con el microscopio, primero enfocando con el objetivo 10X, y se ubicó la zona con menor número de bacterias con el objetivo 40X, y utilizando aceite de inmersión se observó con el objetivo 100X para hacer la identificación microscópica observando el color y forma de las bacterias. Así, aquellas bacterias Gram positivas deberían presentar un color morado y las Gram negativas se tiñen de rojo, también se observaron y anotaron las diferencias entre las bacterias por su morfología (cocos, bacilos, espirilos).

3.4 Etapa II: Evaluación de las 38 Cepas para la Producción de una Enzima

En esta etapa se evaluaron las cepas utilizando dos medios de cultivo, un medio específico sólido y un medio natural de cereales como se describe a continuación.

3.4.1 Ensayo (Screening) en un Medio Especifico Sólido para Producción de Fitasa

Se realizó un ensayo a las 38 cepas puras para verificar la degradación del ácido fítico. Para ello se preparó un medio específico sólido (Cuadro 3.1). Se disolvieron agar bacteriológico, NaCl, NaNO₃, KCl, MgSO₄ en un matraz aforado a 300 ml de agua destilada, posteriormente se solubilizó y esterilizó a 121°C por 15 min. Una vez que la temperatura del medio disminuyó se adicionó ácido fítico (fuente de carbono), la cual había sido previamente disuelta en 100 ml de agua destilada estéril y filtrado por 0.45 µm y posteriormente se aseguró la homogenización. Se vaciaron de 20 a 25 ml de medio en cajas Petri (Figura 3.2). Se hizo la siembra de cada una de las cepas por el método de estría abierta y se incubaron a 40° C en condiciones de anaerobiosis, monitoreando el crecimiento cada 24 horas. Una vez que se observó el crecimiento uniforme de cada cepa se caracterizaron macroscópicamente.

Cuadro 3.1. Composición química del medio sólido específico para el ensayo de la degradación del ácido fítico.

Componente	Cantidad (%)
Agar Bacteriológico	2%
NaCl	0.5%
NaNO ₃	0.3%
KCl	0.5%
Ácido fítico (Fuente de C)	1%
MgSO ₄	0.01%

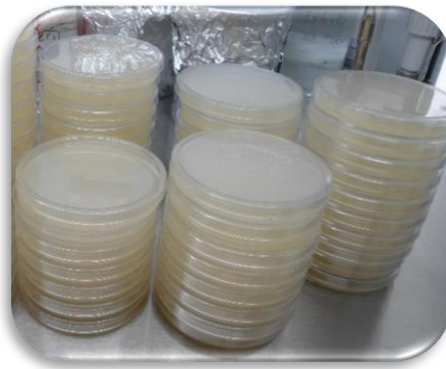


Figura 3.2. Medio específico sólido.

3.4.1.1 Caracterización Macroscópica

Una vez que se observó crecimiento de cada cepa, se hizo una descripción macroscópica, es decir, se registró la forma de la colonia, elevación, tipo de borde, consistencia, color ect. (Figura 3.3).

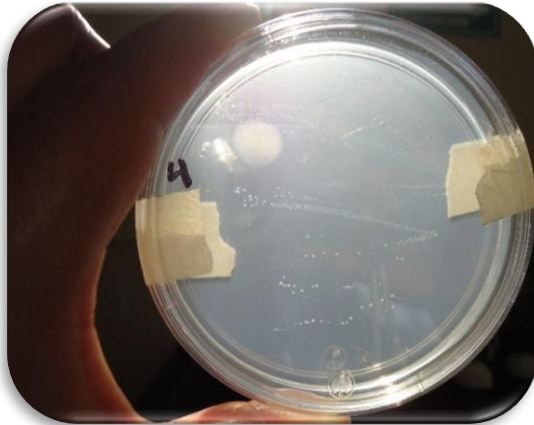


Figura 3.3. Colonia pura en un medio específico sólido.

3.4.2 Ensayo (Screening) en un Medio Natural de Cereales

Para la preparación de este medio, se usaron dos tipos de harinas de diferente cereal y cascarilla de trigo previamente esterilizados en una cámara de luz ultravioleta (Figura 3.4). En un matraz con 400 ml de agua destilada se disolvieron 8 g de agar bacteriológico, calentándolo para su disolución, después se dejó enfriar un poco para agregar 8.4 g de harina integral de trigo, se agitó hasta suspender perfectamente; luego se adicionaron 18 g de harina de maíz (chuchoca), asegurándose de disolverlos; posteriormente se agregaron 8.4 g de cascarilla de trigo (afrechillo) y 0.92 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; finalmente se esterilizó en autoclave. Una vez esterilizado se depositó en cajas Petri (Figura 3.5). Después de que el medio se solidificó, se procedió a sembrar cada una de las cepas por estría abierta y las cajas se incubaron a 40°C en anaerobiosis, monitoreando el crecimiento cada 24 horas (Figura 3.6). Después se procedería a la caracterización macroscópica como se mencionó anteriormente, sin embargo, debido a los resultados se omitió.



Figura 3.4. Cámara con luz ultravioleta para la esterilización de harina de maíz, harina de trigo y cascarilla.

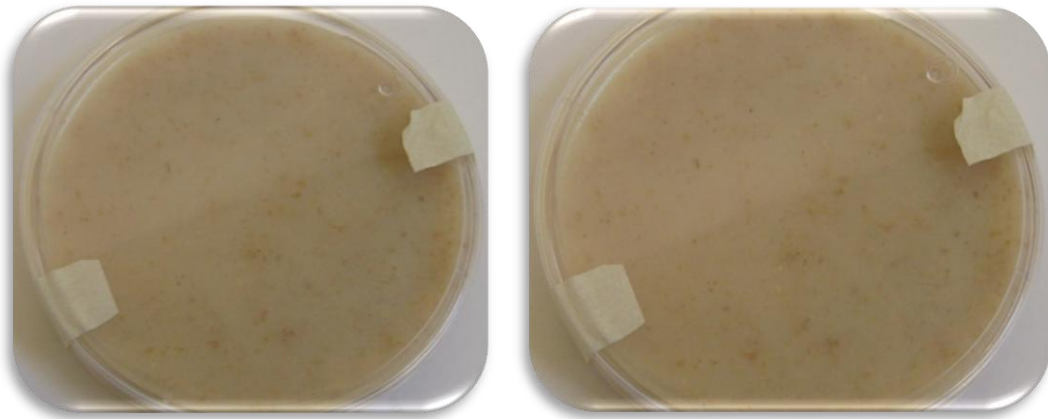


Figura 3.5. Cajas Petri con medio natural de cereales estéril.

3.5. Etapa III: Producción de la Enzima Fitasa

3.5.1 Preparación de Medio Líquido Inductor

Después de realizar el ensayo (screening) de las 38 cepas en un medio específico sólido, se eligió una sola cepa (*Bacillus sp.*) que tuvo mayor crecimiento y en menor tiempo (a las 24 horas), para así continuar con los estudios posteriores.

Se preparó el medio líquido específico (Cuadro 3.2) para inducir al microorganismo a producir la enzima fitasa. En dos matraces Erlenmeyer de 250 ml se disolvieron NaCl, NaNO₃, KCl, MgSO₄, y se aforó a 75 ml con agua destilada en cada uno y posteriormente se solubilizaron y esterilizaron (121°C-

15 lb-15 min). Una vez que disminuyó la temperatura del medio mineral se agregó ácido fólico (fuente de carbono) previamente disuelto en 100 ml de agua destilada. Cabe mencionar que este medio se preparó por duplicado con la finalidad de tener uno como control (medio líquido específico sin inocular).

Cuadro 3.2. Composición química del medio líquido específico para producir fitasa

Componente	Cantidad (%)
NaCl	0.5%
NaNO ₃	0.3%
KCl	0.5%
Ácido fólico (Fuente de C)	1%
MgSO ₄	0.01%

3.5.2 Siembra

Con la ayuda de un asa bacteriana previamente estéril se tomó una colonia de la cepa (*Bacillus sp.*) y se sembró en uno de los matraces y el otro se usó como control (sin muestra), posteriormente se incubaron los matraces a 40° C y se realizó anaerobiosis, monitoreando el crecimiento a diferentes tiempos (0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264, 288, 312 hasta las 336 hrs). Se tomaron 1.5 ml de cultivo (alícuota) por duplicado depositándolos en tubos eppendorf en los diferentes tiempos mencionados anteriormente, de igual manera se hizo con el control (por duplicado), después de cada muestreo se congelaron las alícuotas.

3.5.3 Determinación de la Curva de Crecimiento

Una vez que se terminó de muestrear (tomar alícuotas del cultivo) en el medio líquido específico se procedió con lo siguiente.

Las alícuotas (cultivo bacteriano) obtenidas en los diferentes tiempos de crecimiento se descongelaron gradualmente y se leyeron mediante la técnica de turbidimetría empleando un espectrofotómetro (Marca Thermo Scientific GENESYS 20) a 590 nm (Figura 3.6), previamente ajustado con un blanco (medio de cultivo sin inóculo).



Figura 3.6. Espectrofotómetro Thermo Scientific GENESYS 20.

3.5.4 Determinación de Proteína Extracelular por el Método de Biuret

Una vez realizada la curva de crecimiento, las alícuotas fueron centrifugadas a 10000 rpm (Labnet International, Inc) por 20 minutos durante dos ciclos (Figura 3.7). El sobrenadante obtenido de cada una de las muestras se depositó en otro tubo eppendorf estéril, y se empleó como extracto enzimático para realizar la determinación de proteína empleando un kit para cuantificación de proteínas totales (RANDOX) por el método de Biuret.

Se agregaron 20 μ L de extracto enzimático de los diferentes tiempos de fermentación en tubos de ensaye (duplicado) y 1000 μ L de Biuret en un baño María (Figura 3.8) una temperatura de 25°C por 30 minutos (incluyendo un blanco y un patrón) posteriormente se agitó y se leyó la absorbencia a 546 nm. Las muestras fueron preparadas de la siguiente manera:

Blanco:

20 µL de agua destilada + 1000 µL de Biuret

Patrón:

20 µL de solución patrón + 1000 µL de Biuret

Muestra:

20 µL de extracto enzimático + 1000 µL de Biuret

Para el análisis de datos se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Conc. de proteína. Tot.} = \frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{patrón}}} \times \text{Conc. Patrón}$$

A= Absorbancia



Figura 3.7. Centrífuga Labnet International, Inc.



Figura 3.8. Baño María marca Napco utilizado para el análisis de proteína.

3.5.5 Cuantificación de la Actividad Enzimática

Preparación de la solución de Ácido Fítico al 1 % en buffer de acetato de sodio 0.1 M a un pH 5.

3.5.5.1 Preparación de reactivos de Taussky-Shorr

Primeramente se preparó la solución Stock Molibdato de Amonio al 10%, para ello, en un matraz se agregaron 10 g de amonio heptamolibdato ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y se aforó a 100 ml de H_2SO_4 10 N agitándolo constantemente para prevenir solidificación y se guardó en un frasco oscuro.

Para la preparación del ácido sulfúrico 10 N, en un matraz se depositaron 51 ml de ácido sulfúrico al 96.1% p/p (19.596 N) y se aforó a 100 ml con H_2O .

El Reactivo de Taussky-Shorr se preparó agregando 20 ml de la solución stock molibdato de amonio al 10% a un matraz, diluyendo en 150 ml de H_2O , después se agregaron 10 g de $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, se agitó hasta su completa disolución y finalmente se aforó a 200 ml con H_2O .

Nota: La solución a usar en las mediciones debe ser fresca.

3.5.5.2 Curva de calibración para la Actividad Fitasa

Cuadro 3.3. Datos para la curva de calibración

No. Tubos	Concentración (ppm)	Solución Stock (ml)	Ac. Tricloroacético (ml)	VF (ml)
Blanco		0	3	3
1	5	0.03	2.97	3
2	10	0.06	2.94	3
3	30	0.18	2.82	3
4	50	0.3	2.7	3
5	80	0.48	2.52	3
6	120	0.72	2.28	3
7	140	0.84	2.16	3

3.5.5.3 Cinética Enzimática

Los extractos obtenidos después de centrifugar cada uno de los cultivos (alícuotas) en los diferentes tiempos de fermentación fueron utilizados para la cinética enzimática (Figura 3.9). Se tomaron 125 μ L de cada uno de los extractos, se depositaron en un tubo de ensaye y se agregaron 125 μ L de solución de ácido fítico al 1% (Figura 3.10). Los tubos se incubaron a 37°C durante diferentes tiempos: 0, 5, 15, 30, 45, 60 y 120 minutos. A cada tubo se le agregaron 250 μ L de ácido tricloroacético a una concentración de 12%, se agitó en vortex por 1 minuto (Figura 3.11), si se observaba un precipitado o polvo se centrifugaba a 4000 rpm por 5 minutos a 4°C y se decantaba en un tubo nuevo y limpio. Posteriormente a cada tubo se le agregaron 250 μ L de solución de trabajo (Tausky Shorr), se agitó en vortex por 1 minuto y se dejó reposar durante 10 minutos para finalmente leer la absorbancia en el espectrofotómetro a 820 nm.

Una unidad de actividad fitasa (U) fue definida como la cantidad de fósforo inorgánico liberado en mg/ml en un tiempo de 60 minutos empleando el ácido fítico al 1% como sustrato.



Figura 3.9. Tubos eppendorf que contienen los extractos enzimáticos.



Figura 3.10. Solución de ácido fítico.



Figura 3.11. Vortex marca Labnet.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Etapa I: Purificación de las Bacterias Aisladas en Agar Schaedler

4.1.1. Descripción Macroscópica y Microscópica

En el Cuadro 4.1 se puede apreciar que las bacterias aisladas mostraron una gran diversidad de características. En cuanto a las formas, las que prevalecieron fueron la irregular y circular, la mayoría de las colonias que se observaron mostraron una coloración beige. También se registró el tipo de elevación que exhibían las colonias, donde predominaron la plana y la convexa. El aspecto de las colonias fue otra característica que se observó, se pudo notar que la mayoría de las colonias mostraron un aspecto húmedo y de consistencia suave.

Para hacer la descripción macroscópica se utilizó la técnica de la tinción de Gram se pudo observar la morfología de las colonias con la ayuda de un microscopio y pudo determinarse qué tipo de bacterias se tenían con base a su morfología, encontrándose cocos y bacilos, así como bacterias Gram positivas y Gram negativas (Cuadro 4.1)

Cuadro 4.1. Descripción macroscópica y microscópica de las bacterias aisladas en agar Schaedler.

CODIFICACIÓN	FORMA	TAMAÑO	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	BORDES	COLOR	ASPECTO	CONSISTENCIA	LUZ REFLEJADA	LUZ TRANSMITIDA	#	GRAM
1003-2 VC	Irregular	----	Plana	Lisa	Regulares	Beige claro	Húmedo	Cremosa	Brillante	Translúcida	2	Cocos Gram+
2606-2 VA	Circular	----	Plana	Lisa	Regulares	Amarillo	Húmedo	Suave	Brillante	Opaca	2	Cocos Gram+
3505-3 VC	----	----	Plana	Lisa	Enteros	Beige	Húmedo	Cremosa	Brillante	Opaca	3	Cocos Gram+
1003-3 VC	----	----	Plana	Lisa	Regulares	Blanco	Húmedo	Suave	Brillante	Transparente	3	Cocos Gram+
2606-3 VA	----	----	Plana	Lisa	Regulares	Beige	Seco	Suave	Brillante	Opaca	3	Cocos Gram+
901-3 VC	----	----	Plana	Lisa	Regulares	Beige	Húmedo	Suave	Brillante	Translúcida	3	Cocos Gram+
1003-5 VC	Irregular	----	Plana	Lisa	Enteros	Blanco	Húmedo	Suave	Brillante	Transparente	5	Cocos Gram+
3505-5 VC	Irregular	----	Plana	Lisa	Enteros	Blanco	Húmedo	Suave	Brillante	Transparente	5	Cocos Gram+
2506-3 VC	Irregular	----	Plana	Lisa	Enteros	Blanco	Húmedo	Suave	Brillante	Traslúcida	3	Cocos Gram+
205-1 VAM	Circular	----	Convexa	Lisa	Enteros	Café Claro	Húmedo	Suave y viscosa	Brillante	Traslúcida	11	Bacilos Gram-
205-2 VAM	Circular	----	Convexa	Lisa	Enteros	Beige	Húmedo	Suave y viscosa	Brillante	Traslúcida	1	Bacilos Gram-
205-5 VAM	Irregular	----	Plana	Rugosa	Irregulares	Beige	Húmedo	Suave y viscosa	Brillante	Traslúcida	2	Cocobacilos Gram-
1502-4 VAM	Irregular	----	Plana	Lisa	Enteros	Beige intenso	Húmedo	Suave y viscosa	Brillante	Opaca	1	Cocobacilos Gram-
1502-6M	Circular	----	Convexa	Lisa	Enteros	Beige	Húmedo	Suave y viscosa	Brillante	Traslúcida	1	Bacilos Gram-
1502-7 VAM	Irregular	----	Plana	Lisa	Irregulares	Beige	Húmedo	Suave y viscosa	Brillante	Opaca	1	Bacilos Gram-
4906-3 VAM	Circular	----	Convexa	Granular	Irregulares	Amarillo opaco	Húmedo	Suave y viscosa	Brillante	Opaca	1	Cocos Gram+
4906-5 VAM	Irregular	----	Convexa	Lisa	Irregulares	Beige	Húmedo	Suave y viscosa	Brillante	Traslúcida	4	Bacilos Gram-

Continuación Cuadro 4.1.

CODIFICACIÓN	FORMA	TAMAÑO	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	BORDES	COLOR	ASPECTO	CONSISTENCIA	LUZ REFLEJADA	LUZ TRANSMITIDA	#	GRAM
1004-2 VAM	Circular	----	Convexa	Lisa	Enteros	Blanco	Húmedo	Suave y viscosa	Mate	Traslúcida	4	Cocos Gram+
513-1 VML	Irregular	----	Convexa	Lisa	Enteros	Beige	Húmedo	Suave	Mate	Opaca	3	Cocobacilos Gram-
513-2 VML	Circular	4 mm	Convexa	Lisa	Enteros	Blanco	Húmedo	Suave	Mate	Opaca	8	Cocobacilos Gram-
513-5 VML	Irregular	----	Plana	Lisa	Irregulares	Blanco	Húmedo	Suave	Mate	Opaca	1	Cocos Gram-
513-7 VML	Circular	5 mm	Plana	Rugosa	Enteros	Marrón	Húmedo	Suave	Mate	Opaca	1	Cocos Gram-
953-8 VML	Circular	5 mm	Pulvinada	Lisa	Enteros	Rosa pálido	Húmedo	Suave	Mate	Opaca	14	Bacilos Gram-
953-9 VML	Circular	1 mm	Pulvinada	Lisa	Enteros	Blanco	Húmedo	Suave	Mate	Opaca	38	Cocos Gram+
953-10 VML	Irregular	----	Convexa	Lisa	Enteros	Beige	Húmedo	Suave	Mate	Opaca	2	Bacilos Gram-
643-12 VML	Irregular	----	Umbonada	Rugosa	Irregulares	Beige	Húmedo	Suave	Mate	Opaca	2	Bacilos Gram+
643-13 VML	Circular	----	Convexa	Lisa	Enteros	Anaranjado pálido	Húmedo	Suave	Mate	Opaca	1	Bacilos Gram-
193-16 VML	Circular	5 mm	Plana	Lisa	Enteros	Blanco	Húmedo	Suave	Mate	Opaca	17	Bacilos Gram-
332-1 VLI	Circular	7 mm	Convexa	Lisa	Enteros	Beige	Húmedo	Suave	Brillante	Opaca	9	Cocobacilos Gram-
332-3 VLI	Circular	2 mm	Convexa	Lisa	Enteros	Beige	Húmedo	Suave	Brillante	Opaca	20	Cocobacilos Gram-
572-3 VLI	Circular	6 mm	Plana	Lisa	Enteros	Beige	Húmedo	Suave	Mate	Opaca	13	Cocobacilos Gram-
572-4 VLI	Irregular	----	Convexa	Lisa	Enteros	Beige	Húmedo	Suave	Brillante	Transparente	2	Bacilos Gram-
652-2 VLI	Irregular	----	Convexa	Lisa	Irregulares	Café pálido	Húmedo	Suave	Brillante	Opaca	4	Cocos Gram+

Continuación Cuadro 4.1.

CODIFICACIÓN	FORMA	TAMAÑO	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	BORDES	COLOR	ASPECTO	CONSISTENCIA	LUZ REFLEJADA	LUZ TRANSMITIDA	#	GRAM
932-1 VLI	Circular	6 mm	Convexa	Rugosa	Enteros	Anaranjado	Húmedo	Suave	Brillante	Opaca	3	Bacilos Gram-
932-2 VLI	Circular	14 mm	Convexa	Lisa	Enteros	Anaranjado	Húmedo	Suave	Brillante	Opaca	4	Bacilos Gram-
932-3 VLI	Circular	15 mm	Umbonada	Rugosa	Enteros	Beige	Húmedo	Suave	Brillante	Opaca	1	Bacilos Gram-
932-4 VLI	Circular	5 mm	Umbonada	Rugosa	Enteros	Beige	Húmedo	Suave	Mate	Opaca	3	Bacilos Gram-
932-5 VLI	Irregular	----	Umbonada	Rugosa	Irregulares	Beige	Húmedo	Suave	Brillante	Opaca	1	Bacilos Gram-

4.2. Etapa II Evaluación de las 38 Cepas para la Producción de una Enzima

4.2.1. Caracterización Macroscópica en un Medio Específico Sólido

La gran mayoría de las cepas evaluadas en este medio no crecieron a pesar de que se dejaron incubar 12 días, solo algunos presentaron crecimiento (Figura 4.1). La cepa identificada como *Bacillus sp* (Llamas-Rivarola, 2011) creció a las 24 horas de haber sido incubado, razón por la cual se decidió trabajar con esta (Figura 4.2). De acuerdo al Cuadro 4.2 se puede apreciar que la mayoría de las bacterias presentaron crecimiento con forma circular, elevación plana, superficie lisa y coloración beige.

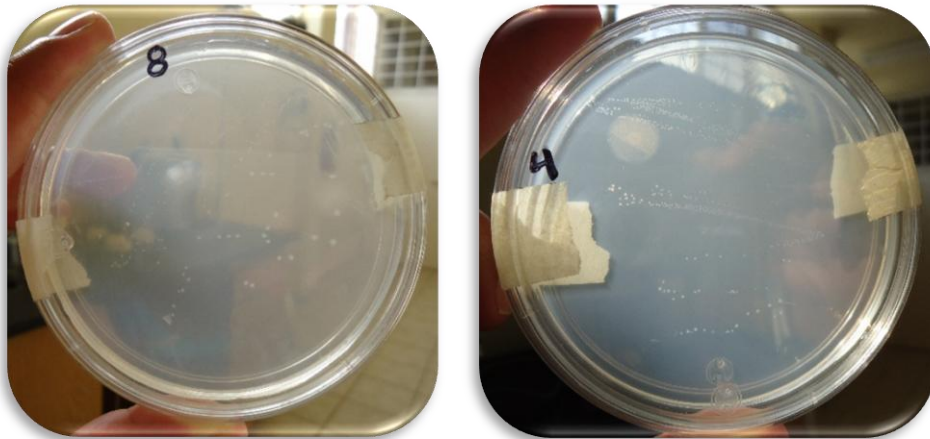


Figura 4.1. Crecimiento bacteriano en un medio de cultivo específico.

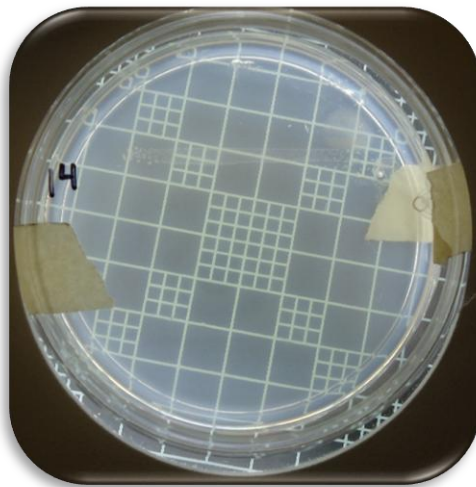


Figura 4.2. *Bacillus sp.* en un medio de cultivo específico.

Cuadro 4.2. Descripción macroscópica de las bacterias aisladas en un medio específico sólido.

# Caja	Codificación	Forma	Elevación	Superficie	Borde	Color	Aspecto	Consistencia
1	1003-2 VC	-	-	-	-	-	-	-
2	2606-2 VA	-	-	-	-	-	-	-
3	3505-3 VC	-	-	-	-	-	-	-
4	1003-3 VC	Circular	Plana	Lisa	Desgastado	Beige	Seco	suave
5	2606-3 VA	-	-	-	-	-	-	-
6	901-3 VC	-	-	-	-	-	-	-
7	1003-5 VC	-	-	-	-	-	-	-
8	3505-5 VC	Circular	Plana	Lisa	Liso	Cristalino	Seco	suave
9	2506-3 VC	Puntiforme	Plana	Lisa	Liso	Cristalino	Seco	suave
10	205-1 VAM	Circular	Plana	Lisa	Desgastado	Beige	Seco	Suave
11	205-2 VAM	Circular	Plana	Lisa	Desgastado	Beige	Seco	suave
12	205-5 VAM	-	-	-	-	-	-	-
13	1502-4 VAM	Irregular	Plana	Lisa	Liso	Beige	Seco	Suave
14	1502-6 VAM	Circular	Plana	Lisa	Desgastado	Beige	Seco	Suave
15	1502-7 VAM	-	-	-	-	-	-	-
16	4906-3 VAM	-	-	-	-	-	-	-
17	4906-5 VAM	-	-	-	-	-	-	-
18	1004-2 VAM	-	-	-	-	-	-	-
19	513-1 VML	-	-	-	-	-	-	-
20	513-2 VML	-	-	-	-	-	-	-
21	513-5 VML	Irregular	Plana	Lisa	Desgastado	Beige	Rugoso	Suave
22	513-7 VML	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 4.2. Continuación.

# Caja	Codificación	Forma	Elevación	Superficie	Borde	Color	Aspecto	Consistencia
23	953-8 VML	-	-	-	-	-	-	-
24	953-9 VML	-	-	-	-	-	-	-
25	953-10 VML							
26	643-12 VML	-	-	-	-	-	-	-
27	643-13 VML	Irregular	Plana	Lisa	Desgastado	Beige	Rugoso	Suave
28	193-16 VML	-	-	-	-	-	-	-
29	332-1 VLI	-	-	-	-	-	-	-
30	332-3 VLI	-	-	-	-	-	-	-
31	572-3 VLI	-	-	-	-	-	-	-
32	572-4 VLI							
33	652-2 VLI	-	-	-	-	-	-	-
34	932-1 VLI							
35	932-2 VLI	-	-	-	-	-	-	-
36	932-3 VLI	-	-	-	-	-	-	-
37	932-4 VLI							
38	932-5 VLI	-	-	-	-	-	-	-

- : No hubo crecimiento

4.2.2. Descripción Macroscópica en un Medio Natural de Cereales

En esta fase no se observó crecimiento de las colonias bacterianas esperadas, se notó crecimiento de otros microorganismos contaminantes (Figura 4.3), a pesar de repetir varias veces el procedimiento y de tener cuidado de esterilizar las harinas de trigo y maíz y la cascarilla de trigo con rayos ultravioleta y de esterilizar el medio una vez preparado no se logró evitar la contaminación (este medio fermentaba y se producía mucha humedad y olor putrefacto en las cajas Petri a las 24 horas de haber sido sembrado) por consecuencia no se hizo la descripción macroscópica correspondiente, motivo por el cual se descartó para seguir trabajando con este medio y se decidió trabajar sólo con el medio específico sólido.

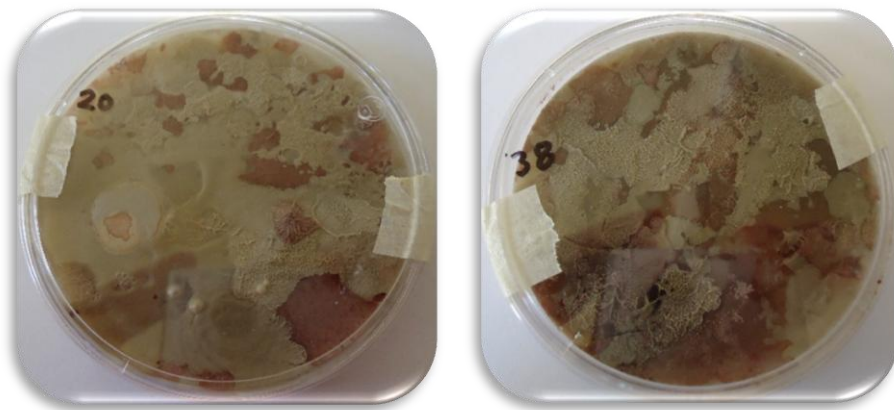


Figura 4.3. Crecimiento bacteriano en el medio natural de cereales.

Etapas III Producción de la Enzima Fitasa

4.3.1. Cinética de crecimiento de la cepa seleccionada (*Bacillus sp*) en el Medio Específico para inducción de fitasa

En la Figura 4.4 se puede apreciar la curva típica de crecimiento microbiano, donde se observa que la fase exponencial se registra durante las primeras 12 h, con una velocidad específica de crecimiento de 0.0002 DO/h. En esta fase el microorganismo se encuentra en su máxima expresión metabólica donde hay una duplicación como 2^n . Posteriormente a partir de las 12 h se presenta una meseta y se aprecia la fase estacionaria, donde se equilibra la cantidad de microorganismos que se reproducen con la cantidad de

microorganismos que mueren. Finalmente a partir de las 96 h los microorganismos entraron en fase de muerte, posiblemente por la acumulación de tóxicos, escasez de nutrientes, etc.

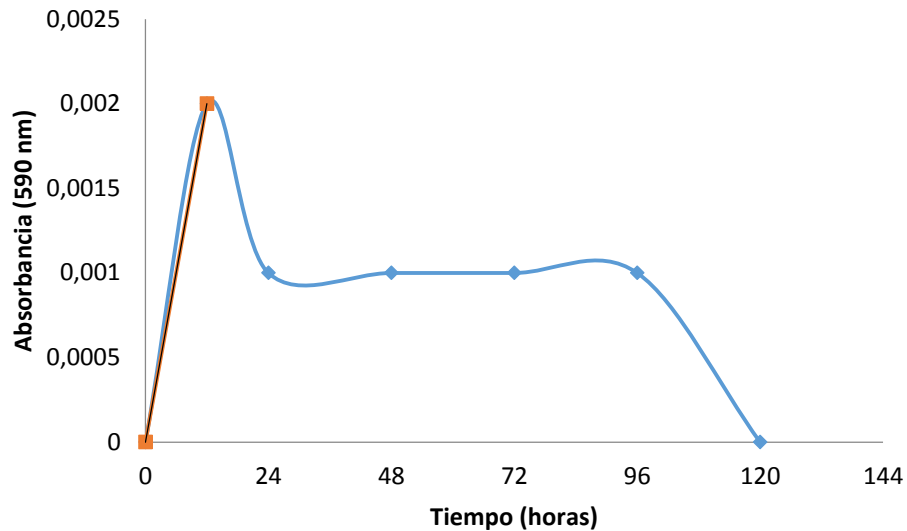


Figura 4.4. Curva de crecimiento de la cepa *Bacillus sp.*

El microorganismo identificado como *Bacillus sp* fue capaz de producir la fitasa en las primeras 12 h de fermentación, lo que indica que el medio diseñado en el laboratorio fue apto para su crecimiento.

4.3.2. Determinación de Proteína Extracelular (Concentración de Enzima) por el Método de Biuret

En la Figura 4.5 se observa que la máxima cantidad de proteína extracelular producida fue de 164.1276 mg/mL a las 168 horas de fermentación, sin embargo después de este tiempo la cantidad de proteína empieza a disminuir observándose a las 192 horas de fermentación una disminución gradual.

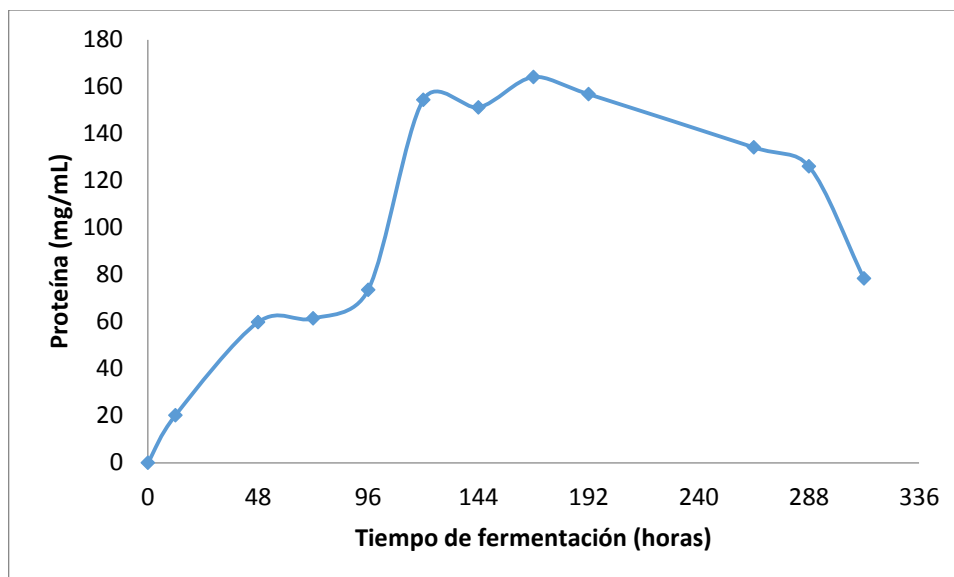


Figura 4.5. Determinación de proteína extracelular por el método de Biuret de la cepa *Bacillus sp.*

4.3.3. Cuantificación de la Actividad Enzimática

En la Figura 4.6 se puede apreciar que la actividad enzimática se presenta a las 12 horas de fermentación a los 10 minutos de transcurrido la reacción. Se puede observar que la mayor actividad enzimática se presentó entre las 120 horas de fermentación a las 168 horas, con un valor máximo de 20300 mg/ml presentándose una actividad constante de las 120 horas a las 216 horas de fermentación sin presentar variabilidad estadística.

Una unidad de actividad fitasa (U) fue definida como la cantidad de fósforo inorgánico liberado en mg/ml en un tiempo de 60 minutos empleando el ácido fítico al 1% como sustrato.

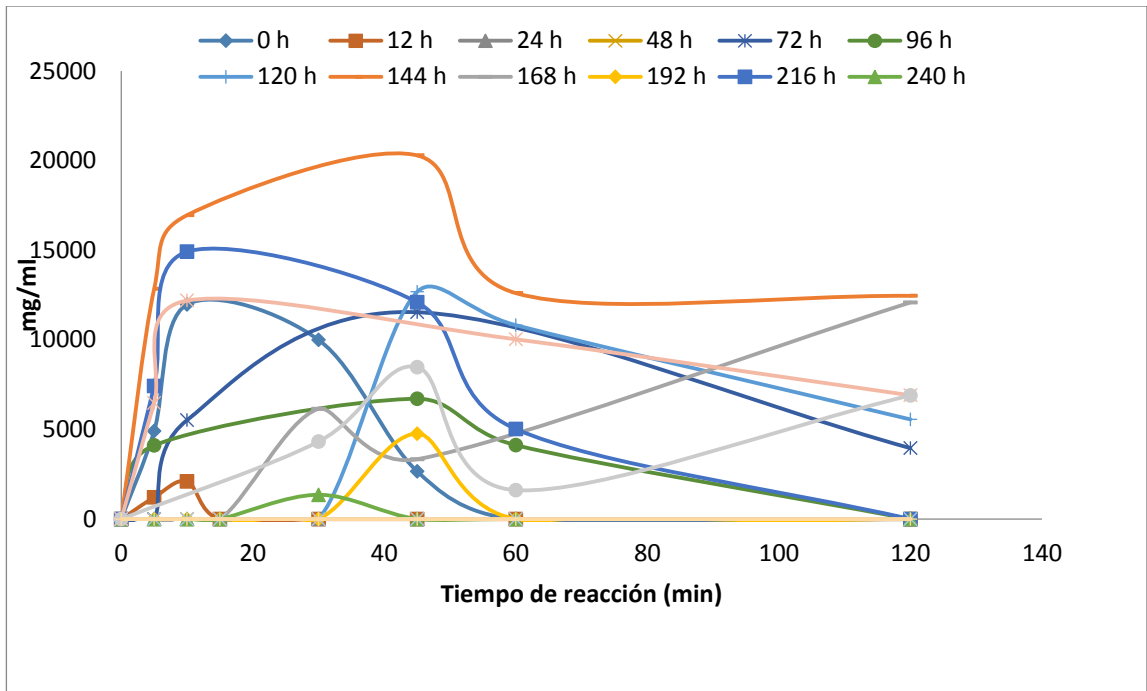


Figura 4.6. Cuantificación de la actividad enzimática de la cepa *Bacillus sp.*

5. CONCLUSIONES

Existe una gran diversidad de bacterias en el líquido ruminal, ésta diversidad se ve reflejada en la variabilidad de diferentes características morfológicas.

En la caracterización macroscópica de las 38 cepas purificadas se observó que prevalecieron las colonias con forma irregular y circular, con elevación plana y convexa, coloración beige; la mayoría de ellos mostraron aspecto húmedo y consistencia suave, en cuanto a la caracterización microscópica se identificaron cocos y bacilos Gram positivos y negativos.

En el medio de cultivo a base de cereales hubo muy poco crecimiento y mucha contaminación, lo que indica que otras variables como la humedad influyeron en el desarrollo de las bacterias. Esto demostró que las bacterias que producen la enzima fitasa requieren de factores específicos que favorezcan (induzcan) la producción de esta enzima.

Los microorganismos ruminales son capaces de producir la enzima fitasa, sin embargo, es indispensable su inducción en un medio específico para lograr su expresión.

En el medio líquido inductor la cepa caracterizada como *Bacillus sp* mostró buen crecimiento, con esto se confirma que esta bacteria produjo la enzima fitasa.

El líquido ruminal es una fuente de microorganismos con la capacidad de producir la enzima fitasa, la cual puede tener muchas aplicaciones en el procesamiento de alimentos para consumo animal y humano.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Bedford, M., & Partridge, G. (2001). *Enzymes in farm animal nutrition*. London: CABI.
- Caravaca Rodríguez, F. P., Castel Genís, J. M., Guzmán Guerrero, J. L., Delgado Pertíñez, M., Mena Guerrero, Y., Alcalde Aldea, M. J., & González Redondo, P. (2005). *Bases de la producción animal*. Huelva, España.
- Castillo Rodríguez, F., Roldán Ruiz, M. D., Blasco Plá, R., Huertas Romera, M. J., Caballero Domínguez, F. J., Moreno Vivián, C., & Luque Romero, M. M. (2005). *Biotechnología ambiental*. Madrid, España: Tébar.
- Coelho, M. B., & Kornegay, E. T. (1996). *Phytase in animal nutrition and waste management*. Virginia: Basf.
- Cromwell, G. L., Stahly, T. S., Coffey, R. D., Monegue, R. D., & Randolph, J. H. (1993). Efficacy of phytase in improving the bioability of phosphorus in soybean meal and corn-soybean meal diets for pigs. *Journal of Animal Science*(71), 1831-1840.
- García Garibay, M., Quintero Ramírez, R., & López Muguía, A. (1993). *Biotechnología alimentaria*. Distrito Federal, México: Limusa.
- Gizzi, G., Thyregod, P., Von Holst, C., Bertin, G., Vogel, K., Faurschoul-Isaksen, M., . . . Andersen, B. B. (2008). Determination of phytase activity in feed: interlaboratory study. *Journal of AOAC International*, 91(2), 259-267.
- Golovan, S. P., Meidinger, R. G., Ajakaiye, A., Cottrill, M., Wiederkehr, M. Z., Barney, D. J., . . . Forsberg, C. W. (2001). Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nature Biotechnology*, 19, 741-745.

- Hosseinkhani , B., Emtiazi, G., & Nahvi, I. (2009). Analysis of phytase producing bacteria (*Pseudomonas* sp.) from poultry faeces and optimization of this enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 8(17), 4229-4232.
- Kerovuo , J., Laureaus , M., Nurminen, P., Kalkkinen, N., & Apajalahti, J. (1998). Isolation, characterization, molecular gene cloning and sequencing of a novel phytate from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2079-2085.
- Konietzny, U., & Greiner, R. (2004). Bacterial phytase: potential application, in vivo function and regulation of its synthesis. *Journal of Microbiology*(35), 11-18.
- Kumar, V., Sinha, A., Makkar, H., & Becker, K. (2010). Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chemistry*, 945-p59.
- McDonald, P., Edwards , R. A., Greenhalgh, J. F., & Morgan, C. A. (2006). *Nutrición animal*. Zaragoza, España: Acribia.
- Mora Brautigán, I. (2007). *Nutrición animal*. San José, Costa Rica: EUNED.
- Mroz, Z., Jongbloed , A. W., & Kemme, P. A. (1994). Apparent digestibility and retention of nutrients bound to phytate complexes as influenced by microbial phytase and feeding regimen in pigs. *Journal of Animal Science*(72), 126-132.
- Nelson, T. S., Shieh, T. R., & Wodzinski , R. J. (1971). Effect of supplemental phytase on the utilization of phytate phosphorus chicks. *Journal of Nutrition*(101), 1289-1294.
- Pasamontes, L., Haiker , M., Wyss, M., Tessier, M., & Van Loon, A. P. (1997). Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(5), 1696-1700.

- Rukma Reddy, N., & Sathe K, S. (2002). *Food Phytates*. Estados Unidos de América: CRC Press.
- Selinger, L. B., Forsberg, C. W., & Cheng, K. J. (1996). The rumen: a unique source of enzymes for enhancing livestock production. *Anaerobe* 2, 263-284.
- Shie, T. R., & Ware, J. H. (1968). Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. *Applied Microbiology*, 16(9), 1348-1351.
- Simons, P. C., Versteegh, H. A., Jongbloed, A. W., Kemme, P. A., Slump, K. D., Bos, K. D., . . . Verschoor, G. J. (1990). Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. *British Journal of Nutrition*(64), 525-540.
- Whitehurst J, R., & Oort, M. (2010). *Enzymes in food technology*. Singapur: Wiley-Blackwell.
- Yanke, L. J., Bae, H. D., Selinger, L. B., & Cheng, K. J. (1998). Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. *Microbiology*(144), 1565-1573.