

---

EFECTO DE LA  
DIGESTIBILIDAD  
*in vitro* SOBRE LA  
ACTIVIDAD FITASA EN LA  
ALIMENTACIÓN DE  
ANIMALES  
MONOGÁSTRICOS

---

Trabajo fin de grado

Autora:

Paula Calvo López-Dávalos

Dirigido por:

Dra. Patricia Puig de Andrés Pinaluba S.A.

Dra. Jennifer Vázquez de Andrés Pinaluba S.A.

Tutor académico:

Dr. Ricardo Cordero del Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la URV

**Grado de Biotecnología  
2019**



UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI

Universitat Rovira i Virgili

Facultat de Enologia

Tarragona, junio 2019

Los resultados presentados en el presente trabajo fin de grado fueron obtenidos durante la estancia en prácticas en el departamento de investigación (APSA R&D) de la empresa Andrés Pintaluba S.A.



# INDICE

1. Resumen.....	- 5 -
2. Introducción.....	- 6 -
2.1. Fósforo.....	- 6 -
2.1.1. Importancia del fósforo para los animales monogástricos .....	- 6 -
2.1.2. Fuentes de fósforo y biodisponibilidad.....	- 6 -
2.1.3. Problemas medioambientales del fósforo .....	- 6 -
2.2. Ácido fítico .....	- 7 -
2.3. Fitasas .....	- 8 -
2.3.1. Tipos de fitasas.....	- 9 -
2.3.2. Fuente y obtención de fitasas .....	- 9 -
2.3.3. Factores que afectan la actividad fitasa.....	- 10 -
2.3.4. Efecto de las fitasas en la biodisponibilidad de nutrientes .....	- 14 -
2.4. Cereales utilizados en la alimentación de animales monogástricos .....	- 14 -
3. Objetivo e hipótesis .....	- 16 -
3.1. Objetivo principal .....	- 16 -
3.2. Objetivos específicos .....	- 16 -
3.3 Hipótesis .....	- 16 -
4. Material y métodos.....	- 17 -
4.1. Descripción de las fitasas .....	- 17 -
4.2. Preparación de las matrices utilizadas.....	- 17 -
4.3. Determinación de la actividad fitasa .....	- 17 -
4.3.1. Preparación de la muestra.....	- 17 -
4.3.2. Proceso analítico .....	- 18 -
4.4. Determinación temperatura óptima.....	- 18 -
4.5. Determinación ph óptimo .....	- 19 -
4.6. Determinación de la humedad de las muestras .....	- 19 -
4.7. Determinación de las cenizas totales de las muestras.....	- 20 -
4.8. Determinación de la resistencia a la pepsina.....	- 20 -
4.8.1. Resistencia a la pepsina en producto .....	- 20 -
4.8.2. Resistencia a la pepsina en matriz de cereal.....	- 21 -
4.8.3. Resistencia a la pepsina en fitato .....	- 21 -
4.9. Métodos estadísticos .....	- 21 -

5. Resultados .....	- 22 -
5.1. Caracterización de las muestras .....	- 22 -
5.1.1. Actividad enzimática .....	- 22 -
5.1.2. Determinación ph óptimo de las muestras .....	- 22 -
5.1.3. Determinación temperatura óptima de las muestras .....	- 23 -
5.1.4. Determinación de la materia seca y orgánica de las muestras .....	- 24 -
5.2. Resistencia a la pepsina del producto .....	- 24 -
5.3. Resistencia a la pepsina del producto en matriz de cereal .....	- 26 -
6. Discusión.....	- 29 -
7. Conclusiones.....	- 32 -
8. Autoevaluación.....	- 33 -
9. Bibliografía .....	- 34 -
Anexo 1 .....	- 36 -
Anexo 2 .....	- 41 -
Agradecimientos .....	- 42 -

## 1. RESUMEN

El fósforo es un mineral imprescindible para los animales monogástricos. No obstante, la mayoría del fósforo presente en los piensos animales se encuentra formando parte de las moléculas de ácido fítico, haciendo que el fósforo no sea biodisponible. Está demostrado que la adición de fitasas exógenas procedentes de microorganismos a los piensos animales mejora la biodisponibilidad de este mineral. En este trabajo se caracterizaron tres fitasas de diferente procedencia para su posible uso en alimentación animal. Así también, a través de ensayos *in vitro*, se evaluó como el paso de estas fitasas por la parte superior del tracto gastrointestinal de animales monogástricos afectaba a su actividad enzimática. Los resultados mostraron resistencia a la pepsina por parte de las fitasas evaluadas. Sin embargo, cuando la digestibilidad de las fitasas se llevó a cabo utilizando matrices de distintos cereales (trigo, soja, maíz y cebada) la actividad varió en función del cereal empleado.

Palabras clave:

Fósforo, ácido fítico, fitasa, animales monogástricos, caracterización enzimática y digestibilidad *in vitro*.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. FÓSFORO

#### 2.1.1. IMPORTANCIA DEL FÓSFORO PARA LOS ANIMALES MONOGÁSTRICOS

El fósforo es un macromineral imprescindible en la alimentación de animales monogástricos que debe ser administrado con la dieta. Es esencial para el desarrollo óseo y es un componente necesario en otras funciones fisiológicas (Gourley *et al.*, 2018). Aproximadamente, el 80% del fósforo presente en el organismo de los animales forma parte de los huesos. El 20% restante forma parte de diversos compuestos orgánicos que juegan un papel clave en el metabolismo (ATP, creatinina, enzimas), en los ácidos nucleicos (ADN, ARN) y en los fosfolípidos de membrana (Vitti y Kebreab, 2010).

#### 2.1.2. FUENTES DE FÓSFORO Y BIODISPONIBILIDAD

El fósforo contenido en la materia prima vegetal puede encontrarse en forma inorgánica y en forma orgánica. El fósforo inorgánico (Pi) se encuentra principalmente en forma de ortofosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) mientras que el fósforo orgánico forma parte de moléculas como ATP, ácidos nucleicos, fosfolípidos, fosfoproteínas y fosfoglúcidos. La única forma en que el animal pueda absorber el fósforo es en forma de fosfatos por lo que el fósforo orgánico solo puede ser absorbido tras la hidrólisis de las moléculas de las que forma parte (Rebolar y Mateos, 2005).

El fósforo vegetal obtenido a través de las materias primas vegetales de los piensos es insuficiente para cubrir las necesidades de este mineral en los animales monogástricos. Esto es debido a que las dos terceras partes del fósforo vegetal (60-80%) está ligado al ácido fítico, en forma de fitatos y no son biodisponibles para este tipo de animales (Quiles, 2002). En situaciones normales, el fósforo fítico consumido por el animal aparece en las heces casi por completo (Rebollar y Mateos, 2005).

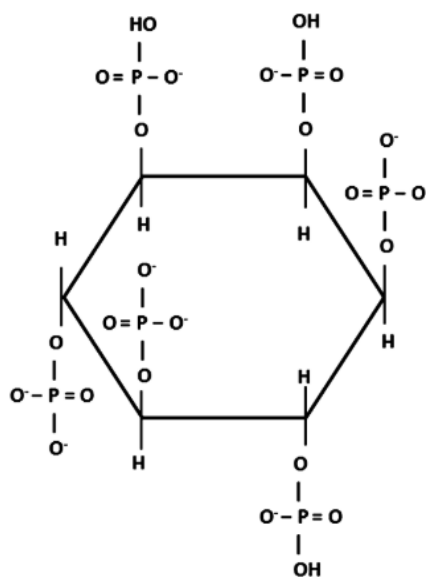
#### 2.1.3. PROBLEMAS MEDIOAMBIENTALES DEL FÓSFORO

El estiércol y los purines han tenido históricamente valor residual como fertilizantes de las tierras de cultivo por su aporte, entre otros nutrientes, de fósforo. Sin embargo, la intensificación de la producción ganadera y la concentración de esta en áreas

específicas durante las últimas décadas, han provocado que la concentración del fósforo sea excesiva. Las plantas tienen una capacidad limitada de extracción de minerales, un exceso de aporte sobre las necesidades de la planta resulta en contaminación ambiental. El fósforo del estiércol que llega al terreno en forma de fitatos es liberado por la acción enzimática de las fitasas procedentes de los microorganismos del suelo. El fósforo puede pasar del suelo a ríos y lagos, dando lugar a fenómenos de eutrofización de las corrientes de agua y de los reservorios acuáticos. Bajo estas circunstancias hay un crecimiento acelerado de las algas y un agotamiento del oxígeno del agua, provocando la muerte de la fauna acuática (Rebollar y Mateos, 2005; Humer, Schwarz y Schedle, 2015).

## 2.2. ÁCIDO FÍTICO

El ácido fítico o fitato (myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisdihidrogenofosfato,  $C_6H_{18}P_6O_{24}$ ) es una molécula que posee seis grupos fosfato que se esterifican con los grupos hidroxilo del alcohol cíclico del *myo*-inositol (Figura1).



**Fig.1** Estructura del ácido fítico a pH neutro (Humer, Schwarz y Schedle, 2015)

El ácido fítico es inestable en su forma libre y se presenta principalmente formando complejos con cationes metálicos como  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$  y  $Mn^{2+}$ . Estas sales son denominadas fitatos. El ácido fítico tiene 12 protones reemplazables, 6 de ellos son fuertemente ácidos ( $pK_a$  1,5), tres son débilmente ácidos ( $pK_a$  entre 5,7 y 7,6) y los otros tres son muy débilmente ácidos ( $pK_a > 10,0$ ). Esto implica que a pH del

estómago (pH ~ 2,0), el ácido fítico se encuentra cargado negativamente. Además, debido al pequeño tamaño de la molécula de inositol, el ácido fítico tiene una densidad de carga extremadamente negativa y, por ello, se asume que los fitatos no pueden atravesar la barrera lipídica de las membranas plasmáticas. Por el momento, no se han encontrado resultados significativos de que los fitatos puedan ser absorbidos durante la digestión (Humer, Schwarz y Schedle, 2015).

Moléculas como proteínas y almidón también pueden unirse a los fitatos. El ácido fítico cuando se une a los cationes para formar los correspondientes fitatos, provoca una reducción de la biodisponibilidad de estos. La mayor o menor biodisponibilidad va a depender de una serie de factores tales como el pH, la concentración, la asociación entre el ácido fítico con las proteínas y el almidón, el procesado del pienso o la presencia de otros iones en el alimento. Las proteínas unidas a los fitatos son menos susceptibles de ser atacadas por las proteasas que las proteínas libres, lo que provoca una reducción de la digestibilidad de estas. Por todo ello el fitato es considerado un anti-nutriente (Ariza *et al.*, 2013 ).

### 2.3. FITASAS

Las fitasas (*myo*-inositol hexafosfato fosfohidrolasas) son enzimas que catalizan la hidrólisis gradual del inositol hexafosfato (InsP6) a Pi y *myo*-inositol (Humer, Schwarz y Schedle, 2015). En las últimas dos décadas, el valor de las fitasas ha aumentado significativamente debido principalmente al aumento de su uso como alimento funcional en animales para poder hacer biodisponible el fósforo procedente del fitato. La adición de fitasas reduce la necesidad de suplementar la alimentación animal con Pi, un recurso costoso y no renovable (Ariza *et al.*, 2013; Gourley *et al.*, 2018). La digestibilidad del fósforo en función de la concentración de fitasas sigue ecuaciones no lineales (exponenciales o logarítmicas), de las cuales se puede deducir un incremento lineal del 0,016% en la digestibilidad el fósforo por unidad de fitasa (Quiles, 2002). La actividad fitasa se define en unidades de fitasa (FTU). Una FTU se refiere a la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de ortofosfato inorgánico por minuto a pH 5,5 y 37°C (Selle y Ravindran, 2008).

### 2.3.1. TIPOS DE FITASAS

Las fitasas se pueden clasificar según varios criterios, como su origen (vegetal, animal, bacteriano o fúngico), la posición del carbono en el anillo de inositol donde se inicia la hidrólisis (3-fitasa, 6-fitasa y 5-fitasa) o su pH (ácidas y alcalinas).

Según la posición del carbono en el anillo de inositol donde se inicia la hidrólisis, las fitasas pueden ser 3, 5 o 6-fitatas (EC 3.1.3.8, EC 3.1.3.72 y EC 3.1.3.26, respectivamente). Se han identificado muy pocas 5-fitatas (por ejemplo, las procedentes de *Selenomonas ruminantium*). Las 3-fitatas eliminan primero el grupo fosfato en la posición C3, mientras que las 6-fitatas lo hacen en la posición C6. Las 3-fitatas son principalmente de origen microbiano y las 6-fitatas han sido aisladas principalmente en plantas. Sin embargo, las fitasas eliminan de manera secuencial varios grupos fosfato del fitato, por lo que una definición simple de la especificidad del sustrato no es sencilla. Además, incluso en el primer paso, se pueden atacar diferentes posiciones. Una 6-fitasa puede producir tanto el producto principal Ins (1,2,3,4,5) P5 como adicionalmente Ins (1,2,4,5,6) P5 en la primera etapa de hidrólisis, donde los números entre paréntesis se refieren a las posiciones de los fosfatos (Ariza *et al.*, 2013; Humer, Schwarz y Schedle, 2015).

Según su pH óptimo, encontramos fitasas ácidas (pH óptimo 3,0 - 5,5) y fitasas alcalinas (pH óptimo 7,0 – 8,0). Las fitasas ácidas suelen liberar cinco de los seis fosfatos unidos al *myo*-inositol, dando lugar como producto de la degradación InsP1 o incluso Ins puro. Por otra parte, las fitasas alcalinas no aceptan como sustrato moléculas de *myo*-inositol que contengan menos de tres fosfatos unidos. Por tanto, el producto final de su degradación son InositolP3 (Humer, Schwarz y Schedle, 2015).

### 2.3.2 FUENTE Y OBTENCIÓN DE FITASAS

Existen cuatro posibles fuentes de fitasas para los animales monogástricos. Estas incluyen fitasas endógenas generadas por la mucosa del intestino delgado, fitasas generadas por la microbiota de los animales, fitasas exógenas presentes en los piensos animales que están compuestos por cereales y fitasas exógenas añadidas a los piensos animales (Selle y Ravindran, 2008).

Las fitasas de la mucosa tienen una actividad despreciable. Existe controversia sobre si en realidad la actividad fitasa de la mucosa se trata de una manifestación de actividad no específica ácida o de actividad fosfatasa (Humer, Schwarz y Schedle, 2015;

Vashishth, Ram y Beniwal, 2017; Cangussu *et al.*, 2018). Las fitasas de la microbiota de los animales pueden fermentar el fitato en el intestino grueso. Sin embargo, la absorción del fosfato ocurre en las partes iniciales del intestino delgado y, por tanto, el fósforo liberado en el intestino delgado y grueso es fisiológicamente irrelevante. La actividad fitasa procedente de fitasas intrínsecas de las plantas varía dependiendo de la especie de planta. Dietas que incluyen ingredientes con alto contenido en actividad fitasa, como salvado de trigo o centeno, promueven una mayor absorción de fosforo procedente de fitato. Sin embargo, durante los procesos de granulación y los tratamientos de calor que se suelen realizar en la producción de alimentos, la actividad fitasa se puede inactivar. Por su parte, las fitasas exógenas aisladas de microorganismos son las fitasas que se añaden a los piensos animales para aumentar la liberación de fósforo. Los avances en biotecnología han permitido mejorar las técnicas de modificación genética de microorganismos, haciendo posible obtener fitasas más eficaces y específicas. (Humer, Schwarz y Schedle, 2015).

### 2.3.3. FACTORES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD FITASA

Como ya se ha mencionado la actividad de la fitasa se mide FTUs, donde 1 FTU es la cantidad de fitasa que libera 1  $\mu\text{mol}$  de fosforo inorgánico por minuto a pH 5,5 y 37°C. La variación de estos parámetros hace variar la actividad de la fitasa (Tena y Jorrín, 2008).

- Efecto del pH: las alteraciones del pH en medio pueden cambiar el carácter iónico de los grupos amino y carboxilo de los diferentes aminoácidos que constituyen la proteína. Esto puede afectar al poder catalítico de la enzima.
- Efecto de la temperatura: temperaturas extremas pueden producir desnaturalización de la proteína y, por lo tanto, afectar al poder catalítico de estas.
- Efecto de la concentración de enzima [E]: la ratio de las reacciones enzimáticas es directamente proporcional a la [E], cuando aumentamos la [E] aumentamos la velocidad de la reacción. Se refleja con la fórmula:

$$V_{\max} = k_{\text{cat}} [E_0]$$

Donde:

$V_{\max}$ : velocidad máxima

$k_{\text{cat}}$ : constante catalítica

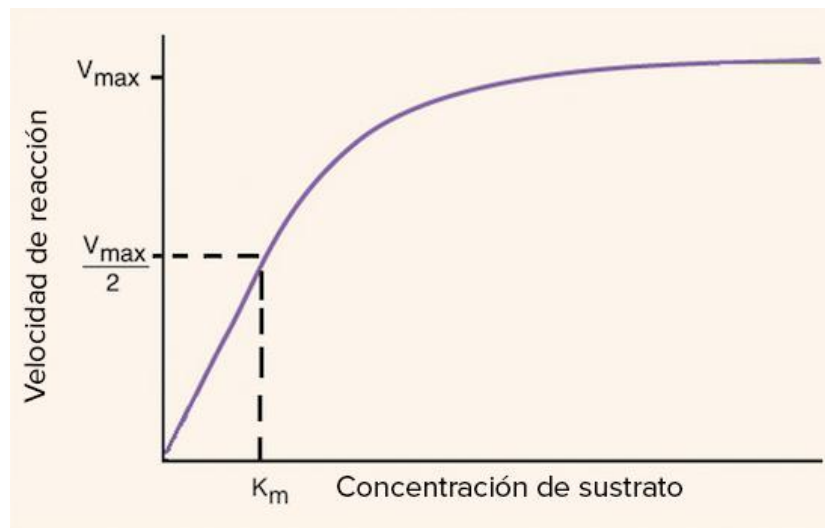
- Efecto del sustrato: el efecto de la concentración de sustrato [S] en la velocidad de la reacción enzimática a una [E] constante se ve reflejado en la Figura 2. Este comportamiento cinético, conocido como curva de saturación hiperbólica por el sustrato, constituye la norma seguida por la mayoría de los enzimas. Este modelo cinético se ajusta a la ecuación:

$$v = V_{\max} [S] / (K_m + [S])$$

Donde:

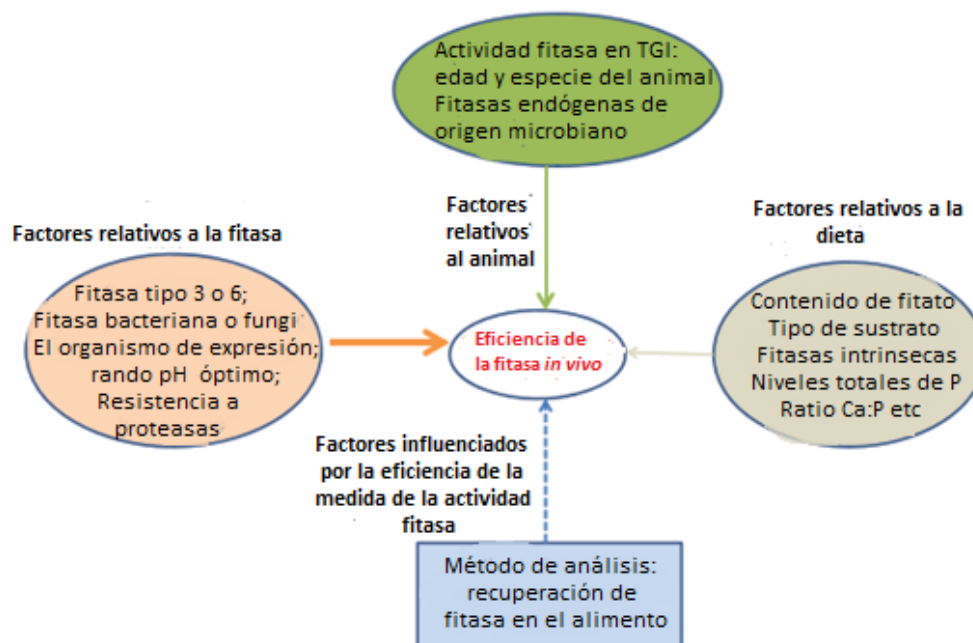
$K_m$ : constante de Michaelis-Mente

y se puede representar según la Figura 2:



**Fig. 2:** Diagrama de la velocidad de reacción según la cinética de Michaelis-Menten (Tena y Jorrín, 2008).

Cuando hablamos de factores que afectan a la actividad enzimática *in vivo*, podemos clasificarlos en: factores relativos a las enzimas, factores relativos a la dieta del animal y a factores relativos al tracto gastrointestinal del animal (Figura 3) (Dersjant-Li *et al.*, 2015).



**Fig. 3:** Esquema sobre los factores que influyen *in vivo* la actividad fitasa y factores que afectan la medida de la actividad fitasa (Dersjant-Li *et al.*, 2015).

#### *Factores relativos a la fitasa*

- Rango de pH óptimo. El pH del estómago (pH~2,0) es considerablemente inferior al pH 5,5, el pH usado para medir la actividad enzimática. El pH óptimo de la fitasa nos proporcionará una idea de la efectividad que tendrá la fitasa en el estómago y en el intestino delgado.
- Resistencia de la fitasa a proteasas endógenas. Las fitasas podrán ser hidrolizadas por pepsinas endógenas durante su paso por el tracto gastrointestinal del animal.
- Especificidad de la fitasa por el sustrato. La afinidad de la fitasa a los diferentes tipos de sustratos es un factor influyente en la eficacia de las fitasas.

#### *Factores relativos a la dieta del animal*

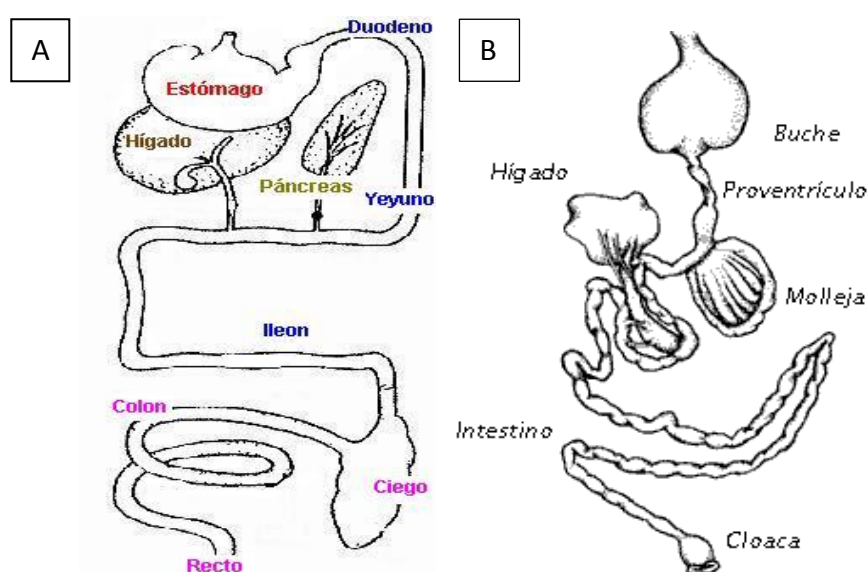
- Tipo y niveles de fitato, ratio enzima/sustrato. En la medición estándar de la actividad enzimática de la fitasa, el fitato de sodio se utiliza como sustrato, sin embargo, la tasa de hidrólisis del fitato a partir de los ingredientes de los alimentos naturales por la fitasa es diferente del fitato de sodio sintetizado químicamente. Debido a la diferencia en la composición, los niveles y la ubicación del fitato, así como la contribución de la fitasa intrínseca en algunos cereales y semillas oleaginosas, la tasa de hidrólisis del fitato por la fitasa procedente de

un microorganismo previamente suplementada puede variar en gran medida en estos ingredientes de origen vegetal.

- Otros factores relativos a la dieta. Muchos otros factores pueden tener impacto en la ratio de liberación de Pi. Algunos ejemplos son la ratio Ca:P, la concentración de cationes, los niveles de ácidos orgánicos y Na o la combinación de las fitasas con otras enzimas como xilanasas. Mientras que la presencia de cationes puede disminuir la absorción de fósforo, la presencia de ácidos orgánicos, como el ácido cítrico y la presencia de xilanasas, puede aumentar la eficacia de algunas fitasas.

#### *Factores relativos al tracto gastrointestinal del animal*

Los factores relativos al animal incluyen a la especie animal y la edad del animal. Dichos factores pueden afectar a la eficacia de las fitasas debido a que cada animal tiene un pH diferente en cada parte del tracto gastrointestinal. Los pollos y los cerdos que poseen tractos gastrointestinales similares (Figura 4), son los principales animales monogástricos de granja. En cerdos en los que no se le incluye fitasa en su alimentación presentan actividad fitasa principalmente en el colon. Mientras que cuando se suplementa los piensos con fitasas, la actividad fitasa se observa principalmente en el estómago (pH 2,0-2,5) y en la parte alta del intestino delgado (pH 3,5-5,5). En los pollos alimentados con piensos suplementados con fitasa, la actividad fitasa se observa principalmente en el buche (pH 5,2- 5,8) y en el proventrículo (pH 2,5) (Dersjant-Li *et al.*, 2015).



**Fig. 4:** Tractos gastrointestinales (A) de cerdos (B) de pollos.

*Métodos de análisis:*

Dependiendo del método de análisis utilizado la actividad medida puede variar considerablemente (Dersjant-Li *et al.*, 2015).

#### 2.3.4. EFECTO DE LAS FITASAS EN LA BIODISPONIBILIDAD DE NUTRIENTES

Un gran número de estudios han evaluado los efectos del uso de fitasas en la digestibilidad de animales de granja. Los estudios han demostrado que la adición de fitasas en la dieta mejora la digestibilidad del Pi y reduce su excreción (Dersjant-Li *et al.*, 2015). El 40-50% de la actividad fitasa procedente de la dieta se observa en el estómago y 16-31% en el intestino delgado anterior. Debido a la desfosforilación, también se ve mejorada la digestión y absorción de otros minerales, proteínas, aminoácidos y/o obtención de energía ya que las fitasas degradan los complejos fitatos-proteína-almidón de los vegetales. (Ariza *et al.*, 2013).

Las fitasas en primera instancia se utilizaron para liberar el P del fitato y así reducir la excreción del P al medio ambiente. Más adelante, se ha descubierto que existen ventajas adicionales en el uso de las fitasas como mejorar la digestibilidad de otros minerales y proteínas. Por ello, el contenido de minerales y proteínas de las diferentes materias primas también es interesante a tener en cuenta a la hora de elegir las para la producción de piensos (Dersjant-Li *et al.*, 2015).

## 2.4. CEREALES UTILIZADOS EN LA ALIMENTACIÓN DE ANIMALES MONOGÁSTRICOS

Los piensos utilizados en la alimentación de animales monogástricos son variados en cuanto a materias primas utilizadas. Dependiendo de las materias primas, el contenido de ácido fítico y fósforo varía en mayor o menor porcentaje. El contenido de estas moléculas también puede variar dependiendo de la temporada, la región donde se cultiven y los procesos utilizados para la preparación de los piensos. Procesos como la granulación o la extrusión pueden reducir los niveles de fitato (Humer, Schwarz y Schedle, 2015). En la Tabla 1 aparecen los porcentajes de fitato, P total, porcentaje de fitato respecto al fósforo total y actividad enzimática de diferentes ingredientes que se utilizan para elaborar pienso animal (Dersjant-Li *et al.*, 2015).

**Tabla 1.** Cantidad de fósforo, fitato, porcentaje de fitato sobre el fósforo total y actividad fitasa en los cereales más utilizados en la alimentación de animales monogástricos (Dersjant-Li *et al.*, 2015; Quiles, 2002).

<b>Cereal</b>	<b>Fósforo (g/kg)</b>	<b>Fitato (g/kg)</b>	<b>% Fitato/ Fósforo</b>	<b>Fitasa (FTU/kg)</b>
<i>Trigo</i>	2,00-3,08	1,60-2,20	72-80	255-1193
<i>Soja</i>	6,49-6,66	3,88-4,53	60-68	10-95
<i>Maíz</i>	2,40-2,62	1,70-2,05	72-85	24-25
<i>Cebada</i>	2,60-3,21	1,60-2,20	72-80	255-840

### 3. OBJETIVO E HIPÓTISIS

#### 3.1. OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo principal del presente trabajo es caracterizar bioquímicamente tres fitasas de uso en alimentación animal y evaluar su resistencia a la pepsina y al pH ácido del tracto gastrointestinal de los animales monogástricos.

#### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el pH óptimo de las distintas fitasas.
- Determinar la temperatura óptima de las distintas fitasas.
- Evaluar la pérdida de materia por desecación y materia orgánica.
- Determinar la resistencia de las fitasas a la pepsina.
- Determinar la resistencia de las fitasas al pH ácido (pH 2,0).
- Determinar la resistencia a la pepsina del producto enzimático usando diferentes cereales como matrices (trigo, soja, maíz y cebada).
- Determinar la resistencia de las fitasas al pH ácido (pH 2,0) usando diferentes cereales como matrices.

#### 3.3 HIPÓTESIS

Las fitasas aisladas recientemente resisten, sin pérdida de actividad enzimática, a la pepsina y el pH ácido (pH 2,0) presente en la parte superior del tracto gastrointestinal de los animales monogástricos.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. DESCRIPCIÓN DE LAS FITASAS

En el presente trabajo se trabaja con tres fitasas diferentes. Estas serán nombradas según la regulación interna de APSA R&D. Los nombres dados serán: RD2019.029, RD2019.046 y RD2018.369.

Cada fitasa tiene un origen diferente y se ha producido para tener unas características específicas. La fitasa RD.2019.029 tiene una mayor capacidad de hidrosolubilidad y la actividad teórica proporcionada por el proveedor es de 53062 U/g. Las fitasas RD.2019.046 y RD.2018.369 ofrecen mayor termoestabilidad y su actividad es de 11077 U/g y 10000 U/g respectivamente. La actividad enzimática de las muestras fue medida en condiciones de pH 5,5 y 37°C.

### 4.2. PREPARACIÓN DE LAS MATRICES UTILIZADAS

Para los ensayos de digestibilidad *in vitro* se utilizaron diferentes cereales como matrices (trigo, soja, maíz y cebada).

Los piensos comercializados en la empresa APSA S.A. incluyen fitasas para que el trigo tenga una actividad final entre 200 U/kg y 1000 U/kg. Para no tener problemas con el límite de cuantificación se escogió la dosis más alta y además, tal y como describen Zeng *et al.*, 2018 esta se multiplico X20, preparando finalmente las diferentes matrices a 20000 U/kg.

### 4.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FITASA

La determinación de la actividad fitasa se llevó a cabo utilizando el International Standard method 30024:2009 (ISO, 2009). El procedimiento, junto con los materiales y reactivos utilizados, se detallan en el Anexo 1. Los análisis se realizan por duplicado.

#### 4.3.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se pesa 1 g  $\pm$  0,01 mg de muestra, se disuelve con 100 mL de tampón acetato 0,25 M con 0,01% de Tween 20 y se agita durante 45 minutos. Las muestras se diluyen hasta llegar a una concentración final que este entre 0,15U/mL y 0,25U/mL.

#### 4.3.2. PROCESO ANALÍTICO

Se realizan tres determinaciones analíticas para cada una de las réplicas y dos para los blancos.

Se añaden 360  $\mu\text{L}$  de tampón acetato 0,25M con Tween 20 y 40  $\mu\text{L}$  de la muestra diluida en tubos de 10 mL. Los tubos se pre-incuban a 37°C durante 10 minutos. En los tubos que serán utilizados como muestra se añaden 0,8 mL del sustrato (solución de fitato) también pre-incubada 37°C. Se mantienen a 37°C durante 30 minutos exactos. Pasados los 30 minutos se añaden 0,8 mL de la solución STOP. En los tubos utilizados como blancos se añadirá primero 0,8 mL de la solución STOP y después 0,8 mL de la solución de fitato. Se centrifugan durante 5 minutos a 10000 g. En una placa de ELISA se añaden 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y utilizando el lector de placas Multiskan se mide la absorbancia a una longitud de onda de 415 nm.

La concentración de fósforo inorgánico se obtiene por la interpolación de la recta patrón, usando regresión lineal:

$$y = ax + b \quad \text{Abs (415 nm)} = a [\mu\text{mol/mL}] + b$$

$$[\text{Fosfato inorgánico } (\mu\text{mol/mL})] = \text{Abs (415 nm)} - b/a$$

La actividad enzimática (U/g producto) se calcula como:

$$\text{U/g producto} = [\mu\text{mol (fosfato inorgánico) /mL}] \times \text{Vd/t} * \text{g producto}$$

Donde:

$\mu\text{mol}$  (fosfato inorgánico) = concentración de fósforo inorgánico

Vd = dilución de cada muestra

t = tiempo de incubación

g producto = peso del producto en gramos

#### 4.4. DETERMINACIÓN TEMPERATURA ÓPTIMA

La determinación de actividad enzimática a diferentes temperaturas se lleva a cabo midiendo la actividad enzimática según el apartado 4,3, pero cambiando la temperatura a la que se lleva a cabo la reacción enzimática a 30, 40, 50, 60 y 70°C en un baño térmico durante 30 minutos y a pH 5,5.

Para comparar la actividad de las diferentes fitasas se calcula la actividad relativa, donde se considera que a 37°C la actividad es del 100%. Los cálculos se realizan utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad relativa \%} = \frac{U/g_i}{U/g_j}$$

Donde:

$U/g_i$  : actividad enzimática con modificaciones en las condiciones (p. ej.  $T^a= 30, 40, 50, 60, 70^\circ\text{C}$ )

$U/g_j$ : actividad enzimática con las condiciones originales (p.ej.  $T^a= 37^\circ\text{C}$ )

#### 4.5. DETERMINACIÓN PH ÓPTIMO

La determinación de actividad enzimática a diferentes pHs se lleva a cabo midiendo la actividad enzimática según el apartado 4.3, pero variando el pH al que se realiza la reacción enzimática (pHs: 3,0, 4,0, 5,0 y 6,0). Para ello, el tampón de incubación y el sustrato se ajustan a los diferentes pHs que se quiere estudiar. El resto de las condiciones no varían.

Para comparar la actividad de las diferentes fitasas se calcula la actividad relativa, donde se considera que a pH 5,5 la actividad es del 100%. Los resultados se obtienen a partir de la actividad relativa, utilizando la ecuación del apartado 4.4.

#### 4.6. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD DE LAS MUESTRAS

Para determinar la humedad de las muestras se utiliza un método gravimétrico a 103°C.

Se pesa un 1 gramo de muestra y se seca durante 4 horas a 103°C en un crisol previamente secado.

El % de humedad se calcula mediante la ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{((A+B)-C)*100}{B}$$

Donde:

A = peso del crisol vacío (g)

B = peso de la muestra (g)

C = peso del crisol más la muestra después de secarlo a 103°C

#### 4.7. DETERMINACIÓN DE LAS CENIZAS TOTALES DE LAS MUESTRAS.

Para determinar las cenizas totales de las muestras se utiliza un método gravimétrico a 550°C.

Se pesan 5 g de las muestras y se secan durante 6 horas a 200°C en crisoles previamente calcinados. A continuación, las muestras se calcinan. La calcinación comprende una rampa de temperatura donde se aumenta la temperatura progresivamente durante 4 horas hasta llegar a 550°C. Una vez alcanzada esta temperatura se mantiene durante 4 horas más.

Los resultados se expresan en % de cenizas. Para obtener los resultados utilizamos la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(P_{cr+ce} - P_{cr}) * 100}{P_{cr+m} - P_{cr}}$$

Donde:

$P_{cr+ce}$  : peso del crisol más el residuo (g)

$P_{cr}$  : peso del crisol vacío (g)

$P_{cr+m}$  : peso del crisol más la muestra (g)

#### 4.8. DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA PEPSINA

La determinación de la resistencia a la pepsina se lleva a cabo simulando *in vitro* las condiciones de estómago de los animales monogástricos.

Los materiales, reactivos y soluciones se detallan en el Anexo 2.

##### 4.8.1. RESISTENCIA A LA PEPSINA EN PRODUCTO

Se pesa 0,6 g del producto enzimático y se introduce en botella de 100 mL. Se añaden 68 mL de tampón fosfato sódico 0,1M, 28 mL de HCl 0,2M, 2,7mL de solución stock

de pepsina. Se ajusta a pH 2 utilizando HCl 1M y NaOH 1 M. Después se añade 1,3 mL de cloranfenicol 0,5% para evitar el crecimiento bacteriano.

Las botellas se incuban durante 1 hora y 15 minutos en un baño a 40°C con agitación. Tras la incubación se mide la actividad enzimática del contenido de la botella. Para ello, se coge una alícuota del contenido de la botella, se realizan las diluciones necesarias para tener una concentración cuantificable (entre 0,10U/mL y 0,25U/mL) con tampón acetato 0,25M con 0,01% de Tween 20 y se mide la actividad enzimática utilizando el método explicado en el apartado 4.3.

#### 4.8.2. RESISTENCIA A LA PEPSINA EN MATRIZ DE CEREAL

Se pesan 0,6 g de la matriz de cereal (trigo, soja, maíz y cebada) en una botella de 100 mL. Se añaden 120 µL de una solución stock de enzima a 100 U/mL, 25 mL de tampón fosfato sódico 0,1 M, 10 mL de HCl 0,2 M y 1 mL de solución de pepsina. Se ajusta el pH a pH 2 utilizando HCl 1M y NaOH 1 M. Después se añade 0,5 mL de cloranfenicol 0,5% para evitar el crecimiento bacteriano.

A continuación, las botellas son incubadas a las mismas condiciones que el apartado anterior y se sigue el mismo procedimiento para medir la actividad.

#### 4.8.3. RESISTENCIA A LA PEPSINA EN FITATO

Se realiza el mismo procedimiento que en el apartado anterior, pero sustituyendo la matriz por su contenido de ácido fítico (Tabla 1).

### 4.9. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

La actividad fitasa, el porcentaje de humedad y el porcentaje de materia orgánica se presenta en U/g o %  $\pm$  desviación estándar.

Para el análisis estadístico se utilizó la Anova de un factor mediante el programa XLS-TAT. Para evaluar las diferencias significativas se aplicó el test estadístico de Tukey con un  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

#### 5.1.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad enzimática de las fitasas fue comparada con la actividad teórica de estas (evaluada por el fabricante) para poder dar como válida su medida. En la Tabla 2 se observa como la actividad de cada una de las muestras junto con el porcentaje de recuperación en relación a la actividad teórica se pueden considerar igual ya que la recuperación es del 100 %.

**Tabla 2.** Actividad fitasa medida por el fabricante y durante el experimento.

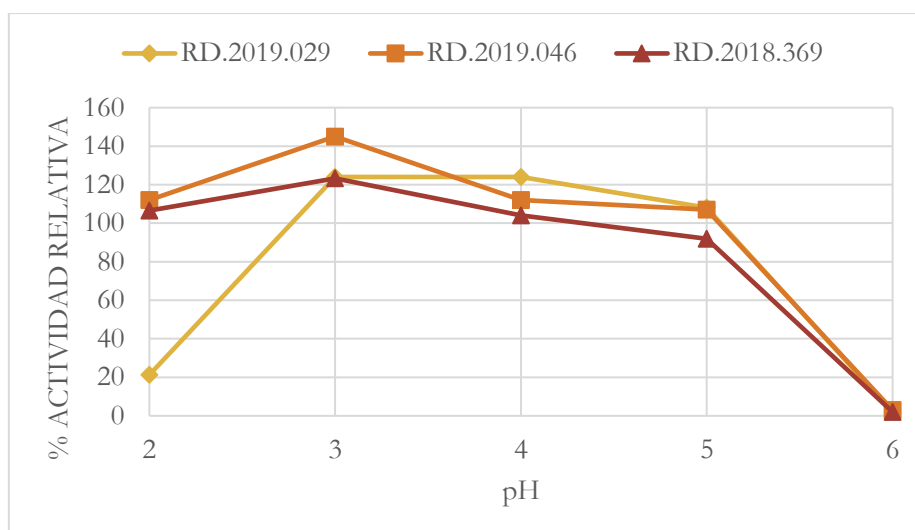
<b>Muestras</b>	<b>U/g teórica</b>	<b>U/g medida</b>	<b>%R</b>
<i>RD.2019.029</i>	51141	53062 ± 5768	104
<i>RD.2019.046</i>	11077	11106 ± 1406	100
<i>RD.2018.369</i>	10000	10204 ± 314	102

± hace referencia a la desviación estándar

#### 5.1.2. DETERMINACIÓN PH ÓPTIMO DE LAS MUESTRAS

Se cuantificó actividad fitasa de las distintas muestras a pH 2, 3, 4, 5 y 6. Para ello, se modificó el pH de los distintos tampones utilizados en el método (tampón del sustrato y tampón de incubación) y se mantuvieron el resto de las condiciones establecidas. La curva de pH para cada fitasa se realizó utilizando la actividad relativa.

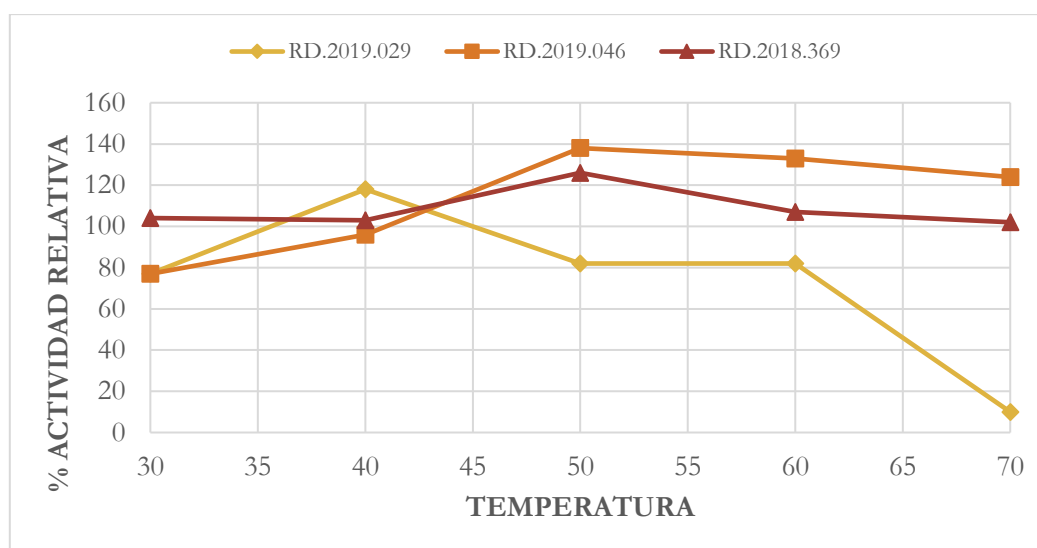
Tal y como se observa en la Figura 5, el pH óptimo para las tres fitasas está en torno a pH 3. Cabe destacar que la fitasa RD.2019.029 presenta una actividad prácticamente nula a pH estomacal (pH 2) y que las tres fitasas incluidas en este estudio tienen una actividad despreciable a pH 6.



**Figura 5.** Curvas de pH óptimo para las fitasas RD.2019.029, RD.2019.046 Y RD.2018.369.

### 5.1.3. DETERMINACIÓN TEMPERATURA ÓPTIMA DE LAS MUESTRAS

Se midió la actividad fitasa de las distintas muestras a las temperaturas de 30°C, 40°C, 50°C, 60°C y 70°C. Para ello, se modificó la temperatura de reacción y se mantuvieron el resto de las condiciones estandarizadas. La curva de temperatura para cada fitasa se realizó utilizando la actividad relativa.



**Figura 6.** Curvas de temperatura óptima de las fitasas RD.2019.029, RD.2019.046 y RD.2018.369.

Tal y como se observa en la Figura 6, la muestra RD.2019.029 tiene su máximo de actividad en torno a 40°C y con el aumento de temperatura esta, disminuye su actividad hasta ser casi despreciable a 70°C. Por el contrario, las muestras RD.2019.046

y RD.2018.369 presentan elevada actividad cuando la reacción se lleva a cabo a temperaturas altas.

#### 5.1.4. DETERMINACIÓN DE LA MATERIA SECA Y LA MATERIA ORGÁNICA DE LAS MUESTRAS

En la Tabla 3 se observa el porcentaje de humedad y de materia orgánica de cada una de las muestras. La determinación de materia orgánica se realiza tras el proceso de pérdida por desecación. Calcinando las muestras se obtiene la cantidad de materia inorgánica y la materia orgánica.

**Tabla 3.** Porcentaje de humedad y porcentaje de materia orgánica presente en las tres fitasas analizadas  $\pm$  desviación estándar (n=3).

<b>Muestras</b>	<b>%Humedad</b>	<b>%Materia orgánica</b>
RD.2019.029	1,57 $\pm$ 0,06	72,50 $\pm$ 0,03
RD.2019.046	1,25 $\pm$ 0,00	74,86 $\pm$ 0,05
RD.2018.369	1,34 $\pm$ 0,00	79,18 $\pm$ 0,01

El porcentaje de humedad es bajo y similar para las tres muestras lo que hace prever que las fitasas no tienen problemas de estabilidad.

## 5.2. RESISTENCIA A LA PEPSINA DEL PRODUCTO

La determinación de la resistencia a la pepsina se llevó a cabo simulando *in vitro* las condiciones del estómago de los animales monogástricos.

En primer lugar, el ensayo se llevó a cabo siguiendo el PNT (procedimiento normalizado de trabajo) de APSA R&D, ya validado en el laboratorio. Según este protocolo las fitasas se pesan y se introducen en bolsas filtrantes que se introducen en las botellas donde se simula la digestión *in vitro* (apartado 4.8.1). No obstante, se vio que parte de la muestra permanecía (teóricamente soluble en agua) dentro de la bolsa por lo que parte de la actividad se perdía. Para comprobar que la pérdida de actividad se debía a ello, se midió la actividad del contenido de la bolsa filtrante y se comprobó que había actividad pese a que no pudo cuantificarse. Por ello se procedió a introducir la fitasa directamente en las botellas.

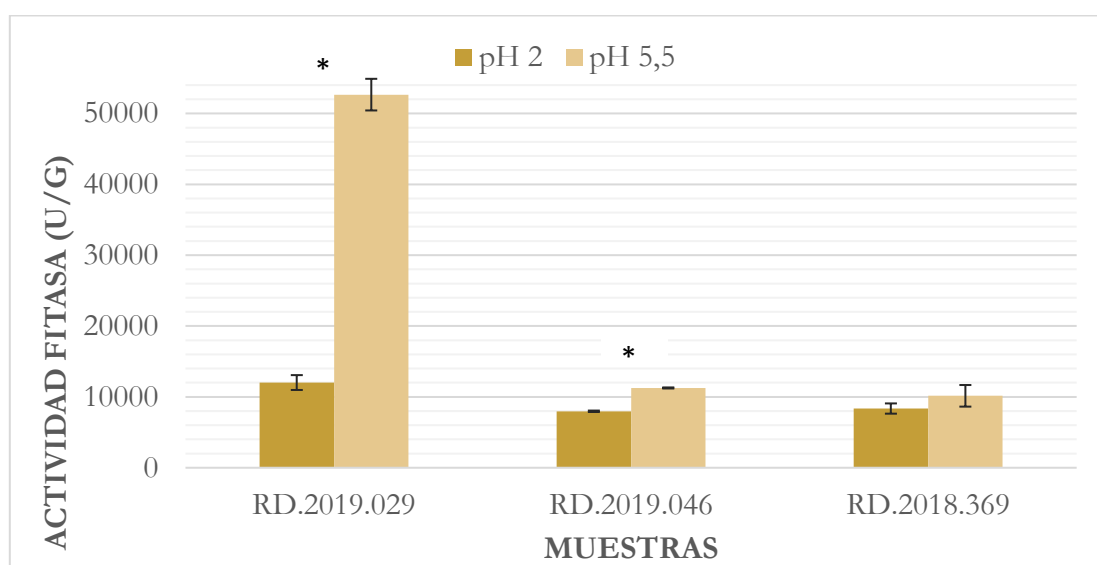
En la tabla 4 se observa la actividad enzimática de cada una de las muestras después de la digestión junto con su porcentaje de recuperación comparándolo con la actividad medida para cada una de las muestras sin realizar el ensayo de digestibilidad (actividad inicial).

Se observa que las fitasas son resistentes a la actividad proteasa de la pepsina ya que la recuperación de la actividad es prácticamente completa para las tres fitasas estudiadas.

**Tabla 4.** Actividad fitasa de las tres fitasas analizadas tras un ensayo de digestibilidad *in vitro*  $\pm$  desviación estándar (n=2).

<b>Muestras</b>	<b>U/g</b>	<b>%R</b>
RD.2019.029	52654 $\pm$ 2232	99
RD.2019.046	11259 $\pm$ 74	101
RD.2018.369	10150 $\pm$ 1525	99

Pese que a la digestibilidad se lleva a cabo a pH 2, la reacción de análisis se lleva a cabo a pH 5,5 (método estandarizado). Como se vio que a pH 2 la actividad de la fitasa RD.2019.029 disminuía considerablemente (Figura 5) se decidió comprobar que actividad se obtenía tras llevar a cabo el ensayo de digestibilidad con pH 2 y utilizando todos los tampones a pH 2.



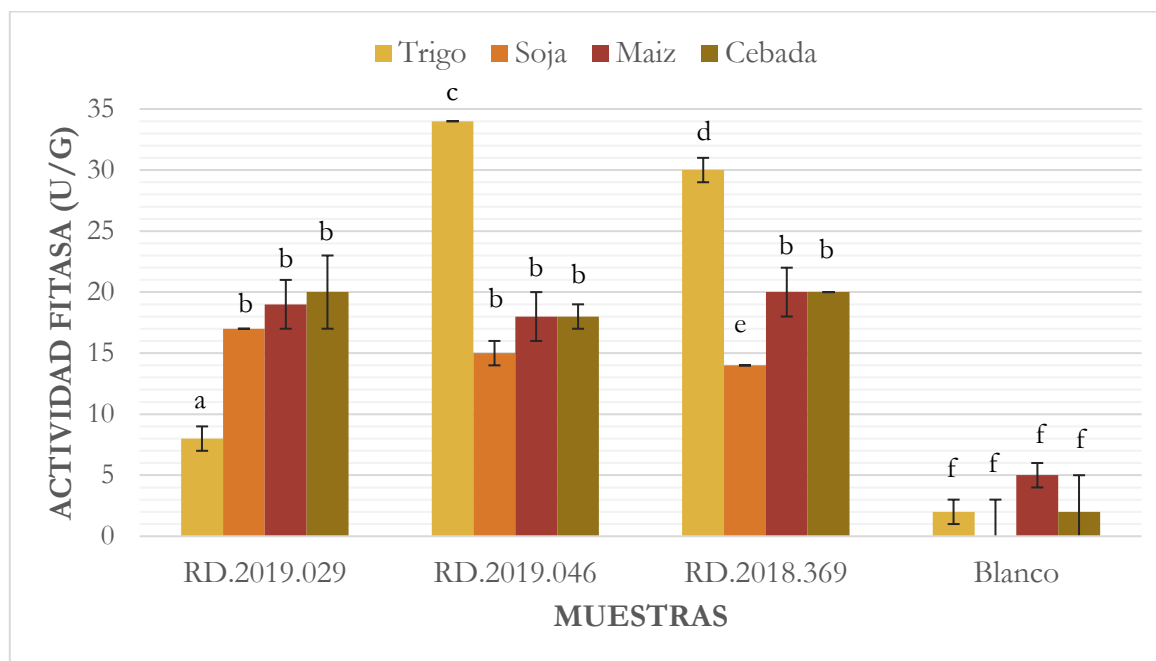
**Figura 7.** Comparación de la actividad medida a pH 2 y pH 5,5 tras ensayo de digestibilidad *in vitro*.

\*indica que se han encontrado diferencias significativas entre el pH 2 y el pH 5 ( $p < 0.05$ ) aplicando el test de Tukey.

En la Figura 7 se observan diferencias significativas cuando el análisis de actividad se realiza a pH 2 o 5,5 en dos de las tres fitasas analizadas. La fitasa RD.2019.029 disminuye drásticamente su actividad enzimática a pH 2 en comparación a las fitasas RD.2019.046 y RD.2018.369.

### 5.3. RESISTENCIA A LA PEPSINA DEL PRODUCTO EN MATRIZ DE CEREAL

Se comprobó la resistencia a la pepsina mediante la digestibilidad *in vitro* de las diferentes fitasas en presencia de distintos cereales (matriz en la que se ubicará la enzima) previamente preparados a una actividad de 20000 U/kg.



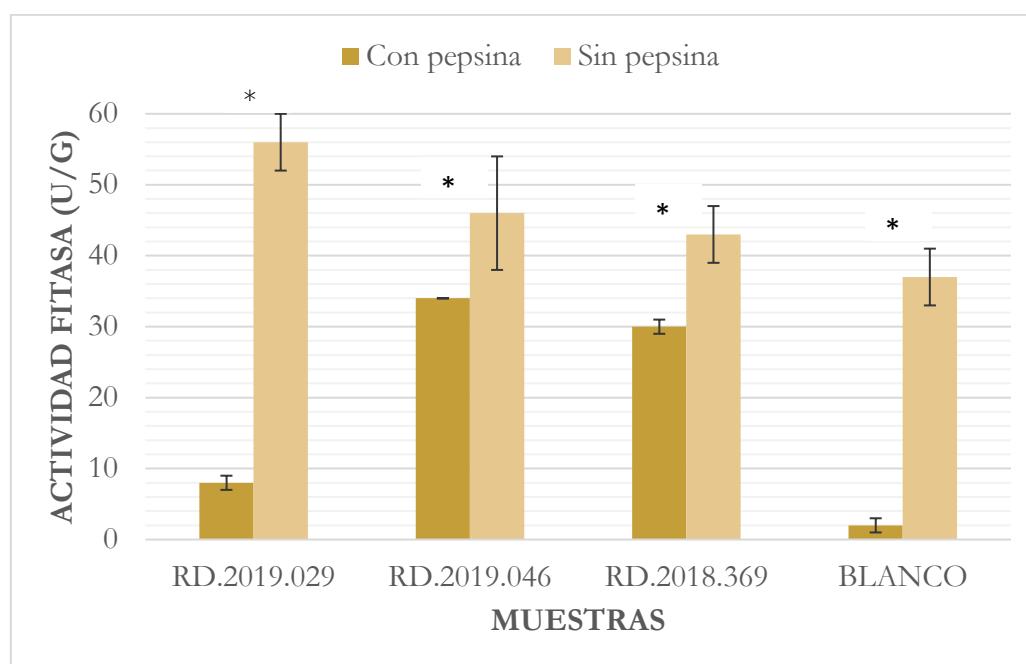
**Figura 8.** Comparación de la actividad fitasa tras ensayo de digestibilidad *in vitro* utilizando diferentes cereales como matrices.

Las letras en superíndice (a, b, c, d, e y f) representan las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) de las actividades enzimáticas para una misma fitasa en distintos cereales aplicando el test de Tukey.

En la Figura 8 se observa la comparación de las actividades de fitasa para las distintas matrices. Cuando se utiliza soja, maíz y cebada como cereal, todas las matrices se comportan similar, recuperándose cerca del 100% de la actividad. Sin embargo, cuando se utiliza trigo como matriz la actividad varía en gran medida dependiendo de

la fitasa utilizada. La fitasa RD.2019.029 disminuye su actividad mientras que las fitasas RD.2019.046 y RD.2018.369 la aumentan.

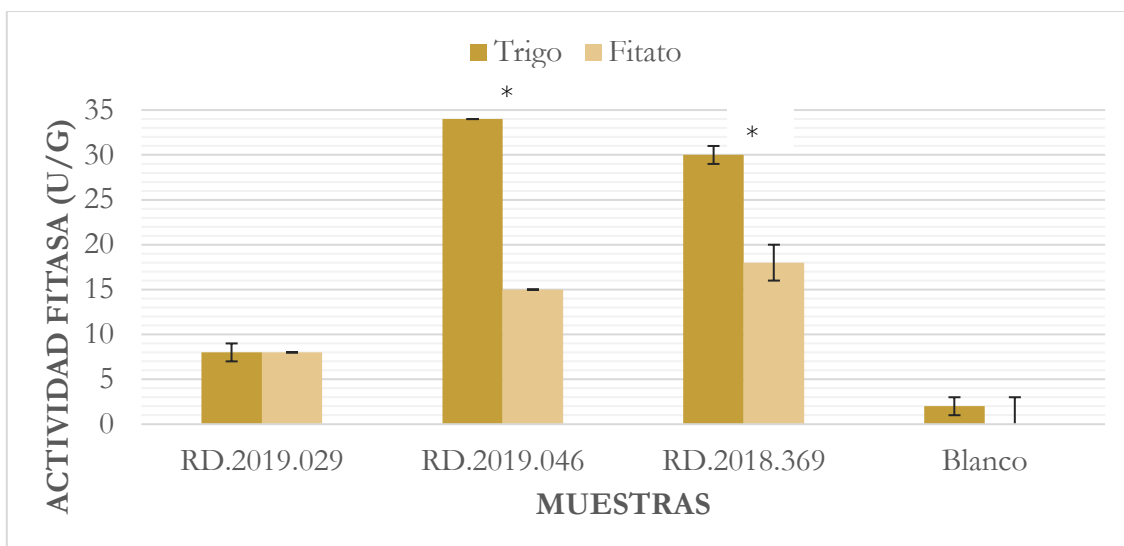
Así, se decidió realizar más ensayos con la matriz de trigo para estudiar el porqué de la variación de actividad. Se realizaron ensayos de digestibilidad en presencia y ausencia de la enzima pepsina (Figura 9). Se observa como cuando la digestibilidad *in vitro* se lleva a cabo sin utilizar pepsina la actividad fitasa en el trigo aumenta en las diferentes fitasas. Cabe destacar que el blanco de trigo también tiene actividad fitasa.



**Figura 9.** Comparación de actividad fitasa de las diferentes fitasas tras ensayo de digestibilidad *in vitro* utilizando trigo como matriz en presencia y ausencia de pepsina.

\*indica diferencias significativas entre la utilización o no de pepsina con un  $P < 0.05$  utilizando el test de Tukey.

Se realizó un ensayo de digestibilidad *in vitro* sustituyendo la matriz de trigo por la cantidad de ácido fólico que esta contenía (Figura 10). Utilizando la información de la Tabla 1 se decidió utilizar 20 mg ácido fólico/g de trigo. Se pesó 0.12 g de ácido fólico y se añadieron 100 mL de tampón acetato + tween 20 al 10% y pH 5,5, para obtener una solución stock de ácido fólico. Para llevar a cabo la digestibilidad se añadió 1 mL de la solución stock. La actividad fitasa disminuye cuando se utiliza ácido fólico en vez de trigo para las fitasas RD.2019.046 y RD.2018.369. En cambio, la fitasa RD.2019.029 mantiene su actividad.

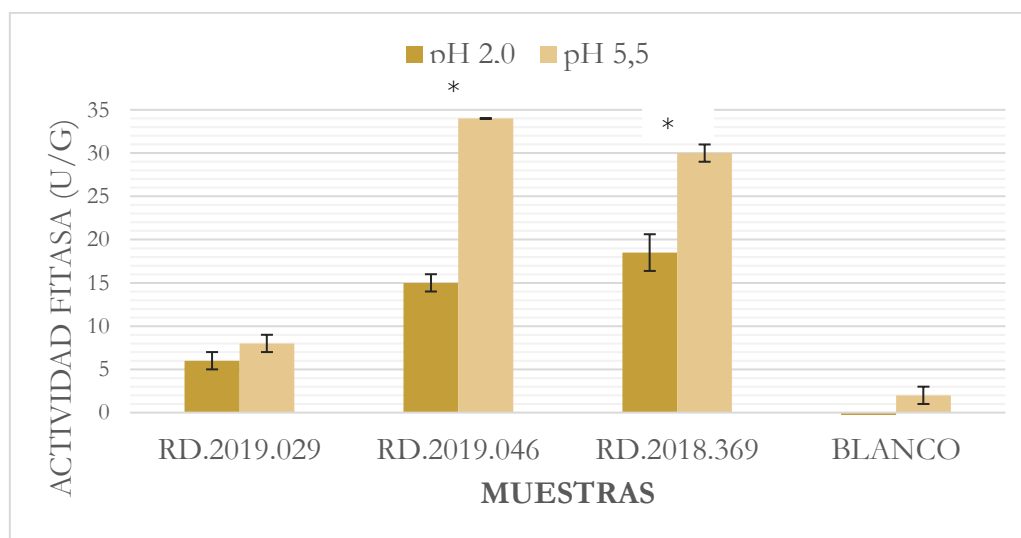


**Figura 10.** Comparación de actividad fitasa de las diferentes fitasas tras ensayo de digestibilidad *in vitro* utilizando trigo como matriz para las fitasas y la cantidad de fitato presente en el trigo.

\*indica que se han encontrado diferencias significativas entre utilizar trigo y fitato ( $p < 0.05$ ) aplicando el test de Tukey.

Por último, al igual que se realizó en la digestibilidad de producto sin matriz, se midió la actividad cuando la reacción se llevaba a cabo a pH 2.

Tal y como se observa en la Figura 11 la actividad fitasa disminuye cuando la reacción se lleva a cabo a pH 2 respecto al pH 5,5 (pH óptimo para el análisis estandarizado de fitasas).



**Figura 11.** Comparación de la actividad medida a pH 2 y pH 5,5 tras ensayo de digestibilidad *in vitro* utilizando trigo como matriz para las fitasas.

\*indica que se han encontrado diferencias significativas entre utilizar pH 2 y pH 5,5 ( $p < 0.05$ ) aplicando el test de Tukey.

## 6. DISCUSIÓN

En el trabajo se estudia la digestibilidad *in vitro* del estómago siguiendo el ensayo descrito por Boisen y Fernández, 1997. Este ensayo consta de 3 partes: simulación del estómago, del intestino delgado y del intestino grueso. Se decidió emular solo las condiciones del estómago ya que el 40-50% de la actividad de las fitasas exógenas suplementadas en la dieta se da en el estómago y el 16-31% en la parte superior del intestino delgado (Yi y Kornegay, 1996). Además, la absorción del P se lleva a cabo principalmente en la parte superior del intestino delgado (Humer, Schwarz y Schedle, 2015).

Pese a que las tres fitasas analizadas en el trabajo pertenecen a la misma clasificación enzimática las diferencias entre ellas son numerosas.

El pH es uno de los factores que más influye en la actividad enzimática de las fitasas analizadas. Las tres fitasas pueden clasificarse como fitasas ácidas (pH óptimo 3,0-5,5) (Humer, Schwarz y Schedle, 2015). Tras evaluar el pH óptimo podemos ver que la fitasa RD.2019.029 tiene muy poca actividad a pH 2. Esto es especialmente relevante ya que el pH del estómago de cerdos se encuentra entre 2,0 y 2,5 mientras que el proventrículo de los pollos está a pH 2,5 (Dersjant-Li *et al.*, 2015). Como se ha explicado anteriormente, la actividad enzimática se lleva a cabo principalmente en estas partes del tracto gastrointestinal de los animales, por ello, que la fitasa RD.2019.029 no muestre actividad a pH 2 nos indica que su eficiencia podría verse modificada en condiciones *in vivo*.

La actividad enzimática también se ve alterada por la temperatura. Cuando las fitasas se añaden a los piensos estas deben pasar por un proceso de granulación que se lleva a cabo a temperaturas elevadas (60-80°C). Debido a ello se busca que las fitasas sean termorresistentes y mantengan su actividad a temperaturas altas. Aunque en el presente trabajo no se ha evaluado la termorresistencia de las fitasas, el análisis de su actividad a diferentes temperaturas nos puede dar una idea de este fenómeno. Las fitasas RD.2019.046 y RD.2018.369 muestran una alta actividad a 60 y 70°C por lo que seguramente sean resistentes al proceso de granulación. Por otra parte, la fitasa RD.2019.029 pierde actividad una vez superados los 40°C, siendo despreciables a los 70°C. Esto puede indicarnos que si la fitasa se añade a piensos que después pasen por el proceso de granulación su actividad puede perderse. No obstante, como se indica en la descripción de las fitasas, esta fitasa tiene gran capacidad de

hidrosolubilidad y por ello sería mejor que se dosifica en agua de bebida en lugar de a los piensos.

En los ensayos de digestibilidad de producto podemos observar que las tres fitasas son resistentes a la pepsina y al pH ácido ya que tras simular *in vitro* las condiciones del estómago y después de medir su actividad utilizando el método estandarizado (pH 5,5) no se observa pérdida de actividad. Sin embargo, cuando utilizamos tampones a pH 2,0 además de para simular la digestión, para llevar a cabo la reacción enzimática, la actividad de las fitasas disminuye considerablemente, especialmente en la fitasa RD.2019.029. Como la reacción se lleva a cabo en el estómago, podemos deducir que la actividad se verá disminuida y su eficacia no será tan alta como cabría esperar. Por otra parte, cuando las fitasas son adicionadas a una matriz de cereal la actividad de las fitasas se ve alterada. El grado de alteración depende de la fitasa analizada y del cereal utilizado. Así bien, cuando se utilizan matrices de soja, maíz y cebada la actividad se mantiene cercana al 100 % de actividad sin haber grandes diferencias entre las fitasas analizadas. Cuando el cereal utilizado es el trigo se observan grandes variaciones entre fitasas deduciendo que la composición del trigo afecta a la actividad de las fitasas analizadas. Es probable que alguno de los componentes del trigo inhiba la actividad de la fitasa RD.2019.029 mientras otro componente produzca efecto matriz en las fitasas RD.2019.046 y RD.2018.369. Li *et al.*, 2016 demostraron que la eficiencia de las fitasas se veía afectada por las concentraciones de Ca, fósforo no ligado al fosfato (nPP) y fósforo ligado a fitatos PP.

Se ha descrito en los resultados, la inhibición de actividad enzimática de la fitasa RD.2019.029 puede ser debido al fitato del trigo ya que cuando el ensayo de digestibilidad se lleva a cabo cambiando el trigo por su contenido de fitato, la actividad no se ve modificada. Por otra parte, podemos intuir que el efecto matriz producido en las fitasas RD.2019.046 y RD.2018.369 no es debido al fitato. Se deberían estudiar el resto de los componentes del trigo para determinar cuál sería el componente que afecta a la actividad.

Otros trabajos han estudiado los moduladores de actividad fitasa. *Tamin et al.* determinó el porcentaje de degradación del fitato tras añadir Ca concluyendo que en dietas en las que se añadía el 0,5% de Ca, la degradación del fitato era del 25, 4% mientras que, cuando no se añadía Ca la degradación de fitato era del 69%. En dietas suplementadas con 500 FTU kg<sup>-1</sup> de dos fitasas diferentes, se obtuvo una degradación del 58,9% y 44,9% en presencia de 0,5% de Ca y el 79,5% y 76,2% de degradación de

fitato. *Wyss et al., 1999* estudiaron las diferencias en la actividad enzimática de tres fitasas con un alto porcentaje de homología en su secuencia de aminoácidos. Vieron que diferentes iones metálicos ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ ) afectaban de forma diferente en las diferentes fitasas analizadas.

Cuando el ensayo de digestibilidad *in vitro* se lleva a cabo sin añadir pepsina se puede observar que la actividad aumenta tanto en los ensayos realizados con las tres fitasas como en el ensayo con el blanco (solo matriz de trigo). El trigo tiene gran actividad de fitasas intrínsecas (Tabla 1). Según los resultados obtenidos en el ensayo con pepsina podemos deducir que las fitasas del trigo no son resistentes a la pepsina. También podemos pensar que existe una inhibición competitiva entre fitasas intrínsecas en el trigo y las fitasas exógenas añadidas, debido a que la actividad de las fitasas RD.2019.046 y RD.2018.369 no es tan alta como cabría esperar después de ver la actividad del blanco de cereal.

Cuando la digestión *in vitro* se da en presencia de trigo y a pH 2, la actividad obtenida es similar a la obtenida en presencia de fitato. Esto puede dar a entender que el efecto matriz se pierde a pH 2 (muestras RD.2019.046 y RD.2018.369).

El método oficial de medición de actividad fitasa se lleva a cabo a pH 5,5. Pese a que durante el experimento se midió la actividad de las fitasas a pH 2 cambiando los pH de los tampones utilizados para que se lleve a cabo la reacción, este método no está estandarizado. Tal y como reclaman autores como *Dersjant-Li et al., 2015* es necesario la estandarización de un método para poder comparar la actividad enzimática a pH ácido (pH 2-3) presente en las partes superiores del tracto gastrointestinal correctamente.

## 7. CONCLUSIONES

- Las tres fitasas analizadas son resistentes a la pepsina y a pH 2,0, pH presente en el tracto gastrointestinal de los animales monogástricos.
- Los cereales de los piensos tienen influencia en la actividad enzimática.
- Las fitasas estudiadas suplementadas en soja, maíz y cebada son resistentes a la pepsina y al pH 2.
- El trigo tiene influencia en la actividad fitasa de las tres fitasas analizadas. En función de la fitasa, la actividad enzimática puede ser inhibida por la cantidad de fitato del trigo o aumentada por un posible efecto matriz.

## 8. AUTOEVALUACIÓN

La realización del TFG ha sido un proceso largo y costoso, pero a la vez muy positivo y enriquecedor.

La mayor parte del trabajo fue realizado en APSA R&D. El personal del laboratorio me facilitó el trabajo en gran medida, enseñándome cómo trabajar en un laboratorio y resolviéndome dudas sobre el trabajo. Mi estancia allí, también me sirvió para conocer que hay trabajo de investigación más allá de las Universidades y Centros de investigación.

Por otra parte, el trabajo me ha servido para aprender sobre el trabajo de investigador, conocer todos los pasos que se realizan durante un estudio y como realizar un ensayo científico.

En resumen, estoy muy contenta con el trabajo realizado y con mi estancia en prácticas en APSA R&D aunque me hubiera podido estar más tiempo y realizar algún ensayo más para poder tener más conclusiones sobre el trabajo.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Ariza, A. *et al.* (2013) «Degradation of Phytate by the 6-Phytase from *Hafnia alvei*: A Combined Structural and Solution Study», *PLoS ONE*, 8(5). doi: 10.1371/journal.pone.0065062.
- Boisen, S. y Fernández, J. A. (1997) «Prediction of the total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by in vitro analyses», *Animal Feed Science and Technology*, 68(3-4), pp. 277-286. doi: 10.1016/S0377-8401(97)00058-8.
- Cangussu, A. S. R. *et al.* (2018) «Characterization of the Catalytic Structure of Plant Phytase, Protein Tyrosine Phosphatase-Like Phytase, and Histidine Acid Phytases and Their Biotechnological Applications», *Enzyme Research*. Hindawi, 2018, pp. 1-12. doi: 10.1155/2018/8240698.
- Dersjant-Li, Y. *et al.* (2015) «Phytase in non-ruminant animal nutrition: A critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors», *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(5), pp. 878-896. doi: 10.1002/jsfa.6998.
- Gourley, K. M. *et al.* (2018) «Determining the available phosphorus release of natuphos E 5,000 g phytase for nursery pigs», *Journal of Animal Science*, 96(3), pp. 1101-1107. doi: 10.1093/jas/sky006.
- Humer, E., Schwarz, C. y Schedle, K. (2015) «Phytate in pig and poultry nutrition», *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99(4), pp. 605-625. doi: 10.1111/jpn.12258.
- ISO, I. O. for S. (2009) «ISO 30024-2009 Animal feeding stuffs Determination of phytase activity Aliments», *International Organization for Standardization*, 2007, pp. 1-11. doi: 10.1021/es0620181.
- Li, W. *et al.* (2016) «Impacts of dietary calcium, phytate, and nonphytate phosphorus concentrations in the presence or absence of phytase on inositol hexakisphosphate (IP6) degradation in different segments of broilers digestive tract», *Poultry Science*, 95(3), pp. 581-589. doi: 10.3382/ps/pev354.
- Quiles, A. (2002) «Papel de las Fitases en la Alimentación Porcina», *Departamento de Producción Animal- Universidad de Murcia*.
- Rebollar, P. G. y Mateos, G. G. (2005) «Materias Primas Y Mejora De La Disponibilidad». Disponible en: [http://portal.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_agronomia/Fósforo\\_en\\_Alimentac](http://portal.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_agronomia/Fósforo_en_Alimentac)

ión\_Animal.pdf.

- Selle, P. H. y Ravindran, V. (2008) «Phytate-degrading enzymes in pig nutrition», *Livestock Science*, 113(2-3), pp. 99-122. doi: 10.1016/j.livsci.2007.05.014.
- Tena, M. y Jorrín, J. (2008) «Estudio cinético de la actividad invertasa de levadura de panadería», *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular*, pp. 1-14. Disponible en: [http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/32\\_INVERTASA\\_CINÉTICA.pdf](http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/32_INVERTASA_CINÉTICA.pdf).
- Vashishth, A., Ram, S. y Beniwal, V. (2017) «Cereal phytases and their importance in improvement of micronutrients bioavailability», *3 Biotech*. Springer Berlin Heidelberg, 7(1), pp. 1-7. doi: 10.1007/s13205-017-0698-5.
- Vitti, D. y Kebreab, E. (2010) *Phosphorus and calcium utilization and requirements in farm animals*. CABI.
- Wyss, M. *et al.* (1999) «Biochemical Characterization of Fungal Phytases (myo-Inositol Hexakisphosphate Phosphohydrolases): Catalytic Properties», 65(2), pp. 367-373.
- Zeng, Z. K. *et al.* (2018) «Improvement of in vitro ileal dry matter digestibility by non-starch polysaccharide degrading enzymes and phytase is associated with decreased hindgut fermentation», *Animal Feed Science and Technology*. Elsevier, 246(October), pp. 52-61. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2018.09.006.

## ANEXO 1

### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FITASA

#### MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.

##### *Equipos*

- Baño térmico programable.
- pHmetro.
- Agitadores magnéticos
- Balanza analítica
- Vórtex
- Centrifugadora (10000 rpm)
- Pipetas, electronicas y manuales, para medidas entre 10  $\mu$ l y 1000  $\mu$ l.
- Espectrofotómetro Multiskan go-Microplate (415nm)
- Reloj avisador
- Handystep
- Estufa de desecación (105 °C)
- Desecador relleno de gel de sílice

##### *Materiales*

- Tubos vidrio, 10 y 20 ml con rosca
- Erlenmeyers de 500 ml
- Espatula de acero inoxidable
- Vaso de precipitados 600 ml
- Probetas de 25 ml, 50 ml y 500 ml
- Pipetas Pasteur de plástico
- Matraces aforados de 50 y 100 ml
- Puntas micropipeta
- Puntas Handystep
- Varilla magnética

*Reactivos*

- Amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) 25%
- Heptamolibdato de amonio tetrahidratado ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )
- Vanadato amónico ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ )
- Ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) 65%
- Fitato de sodio hidratado ( $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_6\cdot x\text{Na}\cdot y\text{H}_2\text{O}$ )
- Tween 20
- Ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ ) 25%
- Acetato de sodio trihidratado ( $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )

*Soluciones*

- Reactivo de heptamolybdato de amonio: disolver 100 g  $\pm$  0.1 mg de heptamolybdato tetrahidratado en 800 ml de agua Milli-Q. Añadimos 10 ml de solución de amoníaco al 25% y enrasar con agua hasta 1 L. Almacenar a temperatura ambiente en oscuridad. Almacenar un tiempo máximo de 2 meses.
- Reactivo de vanadato de amonio: disolver completamente 2,35 g  $\pm$  0,1 mg de monovanadato de amonio en 400 ml de agua Milli-Q caliente. Añadir 20 ml de ácido nítrico diluido y enrasar con agua hasta 1 L. Almacenar a temperatura ambiente en oscuridad. Almacenar un tiempo máximo de 2 meses.
- Solución STOP molibdato/vanadato: mezclar 1 volumen de vanadato de amonio con 1 volumen de heptamolybdato de amonio y 2 volúmenes de ácido nítrico diluido. Mezclar y almacenar a temperatura ambiente. Almacenar durante un máximo de 1 día.
- Ácido nítrico diluido: diluir un volumen de ácido nítrico al 65% con 2 volúmenes de agua. Almacenar a temperatura ambiente. No tiene caducidad.
- Tween 20, 10 % fracción de masa: disolver 10 g  $\pm$  0,1 mg de tween 20 con agua y enrasar a 100mL. Almacenar a temperatura ambiente. Almacenar durante un máximo de 6 meses
- Tampón acetato pH 5,5, 0,25 M: disolver 34 g  $\pm$  0,1 mg de acetato de sodio trihidratado en 900 mL de agua. Ajusta a pH 5.5 con ácido clorhídrico al 25%. Enrasar hasta 1L. Almacenar a temperatura ambiente. Almacenar durante un máximo de 2 semanas.

- Tampón acetato pH 5,5, 0.25 M, con 0,01% de tween 20: disolver 34 g  $\pm$  0,1 mg de acetato de sodio trihidratado en 900 mL de agua. Ajusta a pH 5.5 con ácido clorhídrico al 25%. Añadir 1 mL de tween 20 al 10% en masa. Enrasar hasta 1L. Almacenar a temperatura ambiente. Almacenar durante un máximo de 2 semanas.
- Solución de sustrato de fitato, 7,5 mM: disolver 2,4  $\pm$  0,1 mg de ácido fítico sal de sodio hidratado en 200 mL de tampón acetato pH 5,5. Ajustar el pH a 5,5 con ácido clorhídrico. Enrasar con tampón acetato hasta 250 mL. Almacenar a temperatura ambiente. Almacenar un máximo de 2 semanas.
- Solución estándar de stock de fosfato para la recta de calibrado, 50 M: secar 10 g de potasio dihidrogenofosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) a 105°C durante 2 horas. Dejar enfriar en el desecador durante 30 minutos. Pesar 682 mg  $\pm$  0.1 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  secado y enrasar hasta 100 mL con tampón acetato 0.25 M con 0.01% de masa de tween 20. Almacenar a temperatura ambiente. Almacenar un máximo de 2 semanas.

## PROCESO ANALÍTICO

### PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN ESTÁNDAR DE FOSFATO Y LECTURA A 415NM

Para la realización de la curva de calibración estándar de fosfato se utiliza la solución stock de fosfato 50 M. Esta se diluye con tampón acetato 0,25 M pH 5,5 con 0,01% de Tween 20 según la Tabla 5.

Para preparar la recta se pipetea 360  $\mu\text{L}$  de tampón acetato 0,25 M con 0,01% de fracción de masa con Tween 20, y 40  $\mu\text{L}$  de la solución estándar de fosfato correspondiente. Para preparar los blancos se pipetearán 400  $\mu\text{L}$  del tampón. Se añade 0,8 mL de la solución de sustrato de fitato y 0,8 mL de solución STOP. Se centrifugan a 10000 rpm durante 5 minutos. En una placa de Elisa se añaden 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se mide la absorbancia a 415 nm.

Para cada dilución se realizan tres determinaciones y dos determinaciones para los blancos.

**Tabla 5.** Volúmenes necesarios para preparar la curva de calibración estándar de fosfato, junto con el factor de dilución y la concentración obtenida.

<b>Solución estándar</b>	<b>Volúmenes de solución estándar stock de fosfato</b>	<b>Volúmenes de 0,25M de tampón acetato con 0,01% de facción de masa de Tween 20</b>	<b>Factor de dilución</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{mol/mL}</math>)</b>
<b>A</b>	1	1	2	25
<b>B</b>	1	3	4	12,5
<b>C</b>	1	7	8	6,25
<b>D</b>	1	15	16	3,125
<b>E</b>	1	31	32	1,5625

#### PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se preparan dos replicas por cada muestra.

Se pesa  $1 \text{ g} \pm 0,01 \text{ mg}$  de muestra en dos matraces aforados de 100 mL y se enrasa con tampón acetato 0,25 M con 0,01% en masa de Tween 20. La muestra se diluye para tener una concentración final que esté entre los 0,15 U/mL y los 0,25U/mL.

#### ANÁLISIS DE LAS FITASAS (LIBERACIÓN DE FÓSFORO INORGÁNICO)

Se adiciona 360  $\mu\text{L}$  de tampón acetato 0,25 M pH 5,5 con 0,01% de Tween 20 al 10% y 40  $\mu\text{L}$  de la dilución de la muestra. Los tubos se pre-incuban a 37°C. En los tubos que serán utilizados como muestra, se adiciona 0,8 mL de sustrato fítico y se incuban durante 30 minutos. Pasado este tiempo se adicionan 0,8 mL de la solución Stop. En los tubos utilizados como blancos se adiciona primero 0,8 mL de la solución Stop y posteriormente 0,8 mL del sustrato fítico. Se centrifuga 5 minutos a 10000 rpm y por último, se lee la densidad óptica de cada tubo en el espectrofotómetro a 415 nm.

#### INTERPRETACIÓN Y VALIDEZ DE LOS RESULTADOS

El % RSD de dos análisis de la muestra no debe superar el 15%.

## CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados se expresan como media de dos análisis (U/g producto), desviación estándar (s) y desviación estándar relativa (%RSD) para cada actividad enzimática. La concentración de fósforo inorgánico se obtiene por la interpolación de la recta patrón, usando regresión lineal:

$$y = ax + b \quad \text{Abs (415 nm)} = a [\mu\text{mol/mL}] + b$$

$$[\text{Fosfato inorgánico } (\mu\text{mol/mL})] = \text{Abs (415 nm)} - b/a$$

La actividad enzimática (U/g producto) se calcula como:

$$\text{U/g producto} = [\mu\text{mol (fosfato inorgánico) /mL}] \times V_d/t \times g \text{ producto}$$

Donde:

$\mu\text{mol (fosfato inorgánico)}$  = concentración de fósforo inorgánico

$V_d$  = dilución de cada muestra

$t$  = tiempo de incubación

$g \text{ producto}$  = peso del producto en gramos

## EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Unidad de fitasa es la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de fosfato inorgánico de sustrato fítico por minuto a 37 °C y pH= 5.5.

## ANEXO 2

### DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA PEPSINA

#### MATERIALES, EQUIPOS, REACTIVOS Y SOLUCIONES

##### *Materiales*

- Erlenmeyer 100 ml.
- Botellas 100 ml.

##### *Equipos*

- Balanza analítica
- Baño térmico con agitación
- pHmetro
- Agitador magnético

##### *Reactivos*

- Cloranfenicol ( $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ )
- Hidrogenofosfato di-sodio anhídrido ( $Na_2HPO_4$ )
- Pepsina de tracto gástrico porcino
- Ácido clorhídrico (HCl) 37%
- Hidróxido de sodio (NaOH)

##### *Soluciones*

- Cloranfenicol 0.5%: se pesan 100 mg de cloranfenicol y se añade 20ml de etanol al 96%. Se almacena a  $-3^{\circ}C$  durante un máximo de 3 meses.
- Tampón fosfato de sodio 0.1M a pH 6: se disuelven 1.58 g de  $Na_2HPO_4$  y 29.44 g de  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  en 1.5 L de agua. Se ajusta el pH a 6 utilizando HCl y NaOH. Se enrasa a 2 L con agua. Se almacena a temperatura ambiente durante un máximo de 1 mes.
- HCl 0.2 M: se añaden 8.28 ml de HCl y se enrasa a 500 ml con agua. Se almacena a temperatura ambiente durante un máximo de 3 meses.
- Solución de pepsina 0.025g/ml: se disuelven 0.25g de pepsina en 10 ml de HCl 0.2M. Preparar justo antes de utilizar.

## AGRADECIMIENTOS

Primero de todo, me gustaría agradecer al personal de APSA R&D por ayudarme en todo el proceso de realización este trabajo. A Patricia Puig, por darme la oportunidad de formar parte del equipo de APSA y guiarme a la hora de realizar el trabajo; a Jennifer Vázquez por el asesoramiento y apoyo en las diferentes etapas del trabajo de investigación y durante la realización del trabajo; a Teresa Echevarría por asesorarme sobre la discusión del trabajo; al resto del equipo por su apoyo y simpatía durante mi estancia en prácticas y, a mis compañeros de prácticas, Ailende, José Luis y Marta por ayudarme en el laboratorio y darme su apoyo durante la estancia en prácticas.

Agradecer también, a Ricardo Cordero del departamento de Bioquímica y Biotecnología por guiarme y aconsejarme en la realización del trabajo.

Y por último agradecer a mi familia y amigos por el apoyo y ánimos mostrados mientras realizaba el trabajo.

Gracias.