

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 236**

51 Int. Cl.:

<b>C12Q 1/37</b>	(2006.01)
<b>C12Q 1/44</b>	(2006.01)
<b>C12Q 1/68</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/49</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/569</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/574</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2010 PCT/IB2010/055912**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2011 WO11077342**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2010 E 10813027 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 2516670**

54 Título: **Método**

30 Prioridad:

**23.12.2009 GB 0922485**  
**27.01.2010 US 298670 P**  
**06.08.2010 EP 10172171**  
**30.11.2010 GB 201020257**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.03.2017**

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS**  
**(100.0%)**  
**Langebrogade 1**  
**1411 Copenhagen K, DK**

72 Inventor/es:

**YU, SHUKUN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 605 236 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método

**Campo de la presente invención**

5 La presente invención se refiere a un método. En particular, la presente invención se refiere a un método para detectar actividad enzimática.

Más concretamente, en algunos aspectos, la presente invención se refiere a un método de detección de actividad fitasa o de la actividad proteasa utilizando una fase dispersa que comprende un componente polivalente y un componente iónico tal como una proteína o un ácido graso, en donde la fase dispersa se mantiene unida por una interacción intermolecular, a la utilización de semejante fase dispersa en un método para la detección de la actividad enzimática y a un kit para llevar a cabo tal método.

10

**Antecedentes de la presente invención**

Se conocen en la técnica diversos métodos para la detección de la actividad enzimática, también llamados análisis de actividad enzimática.

15 Los ejemplos de los análisis de actividad enzimática conocidos son los análisis para la detección de actividad fitasa y de actividad proteasa. Sin embargo, los métodos de análisis de la actividad fitasa conocidos se basan en la liberación de fosfato inorgánico por la fitasa a partir del fosfato de inositol. La cantidad de fosfato liberada a partir del fosfato de inositol por la fitasa se puede analizar por medio de numerosos métodos conocidos (por ejemplo, véanse Fiske (1925) y Lowry (1946)). Los kits para la realización de análisis de la actividad fitasa basados en la liberación de fosfato inorgánico a partir de fosfato de inositol están disponibles comercialmente (por ejemplo, el análisis de ácido fítico (fitato)/fósforo total disponible de Megazyme Internacional Ireland Limited).

20

Existen varias desventajas de los métodos de análisis de la actividad fitasa conocidos. Una desventaja es que son métodos de análisis de punto final, lo que significa que la cantidad de fosfato inorgánico sólo se puede medir después de que se haya detenido la reacción enzimática. Esto hace que sea difícil realizar estudios cinéticos de la actividad fitasa.

25 Otra desventaja de estos análisis conocidos es que el fondo del análisis se complica por el fosfato inorgánico que existe de forma natural en las muestras biológicas o que se añade a las mismas. Puesto que el nivel de fosfato inorgánico liberado por la fitasa se mide para evaluar la actividad fitasa, este nivel de fondo variable de fosfato inorgánico puede hacer que los resultados sean variables y poco fiables, particularmente cuando se utiliza en muestras biológicas.

30 Una tercera desventaja de algunos métodos de la técnica anterior es la naturaleza tóxica de los reactivos utilizados, tales como el molibdato y el vanadio.

La actividad fitasa también se puede medir basándose en el análisis de la liberación de inositol a partir del fosfato de inositol cuando éste es degradado por la fitasa. El inositol se analiza utilizando inositol deshidrogenasa por métodos conocidos (por ejemplo, véase Prestwich (1991)).

35 La desventaja de este método es que se necesita una enzima adicional denominada fosfatasa para hidrolizar el monofosfato de inositol a inositol, ya que las fitasas comerciales tienen poca o ninguna actividad sobre el monofosfato de inositol. El inositol del análisis también puede ser problemático debido a que muchas muestras biológicas tienen altos niveles de fondo de inositol, que es uno de los principales polioles en muchos sistemas biológicos.

40 La actividad fitasa también se puede analizar utilizando fitato de calcio como sustrato a pH 5,5 o superior. El fitato de calcio tiene una cierta turbidez y la hidrólisis de este sustrato por la fitasa hace que la turbidez disminuya. El sustrato se puede añadir a un gel de agarosa de manera que la fitasa se pueda analizar utilizando el análisis de difusión en placa. La desventaja de este método es que la turbidez del fitato de calcio es baja, y no tiene turbidez a pH más bajo. Además, el fitato de calcio no es un sustrato ideal para las fitasas ácidas de histidina comerciales. Otra desventaja del análisis en placa es que los microbios que producen producirán falsos resultados ya que el ácido producido disolverá el fitato de calcio formando de este modo halos claros (véase Howson y Davis 1983).

45

Un análisis de fitasa semi-cuantitativo basado en anticuerpos se describe en el documento WO2007001895. Este método utiliza anticuerpos que se pueden unir a la fitasa para analizar las fitasas. Sin embargo, un inconveniente de este método es que no puede diferenciar de manera fiable entre fitasa activa, parcialmente inactivada por calor e inactivada por calor, por ejemplo fitasa que ha sido inactivada por calor durante el proceso de alimentación. Los otros inconvenientes de esta tecnología son que resulta costosa de desarrollar, consume mucho tiempo, los resultados no son fiables, y puede conducir a resultados positivos falsos. Los resultados falsos positivos indican o bien que hay fitasa presente cuando no la hay, o bien que la fitasa presente no está activa. Esto puede conducir a la adición de menos fitasa de la necesaria para proporcionar la cantidad requerida de actividad fitasa. Si no se

50

encuentra presente suficiente actividad fitasa en el pienso, los animales alimentados con el piensos pueden no tener suficiente fosfato disponible.

5 Los piensos o los ingredientes para piensos o las mezclas de piensos (premezclas) pueden ser sometidos a ensayo para determinar si contienen fitasa y la cantidad de fitasa que contienen. Si no hay suficiente fitasa en el pienso o ingrediente para pienso, se puede añadir fitasa adicional. Los resultados falsos negativos en los ensayos de fitasa pueden conducir a que se añada al pienso un exceso de la fitasa, lo cual es costoso.

Existen muchos métodos conocidos para el análisis de la actividad proteasa. Muchos de ellos están basados en péptidos sintéticos o análogos de péptidos a menudo marcados con cromóforos o fluoróforos. La ventaja de estos métodos es su alta sensibilidad y su capacidad para controlar la actividad proteasa cinéticamente.

10 Una desventaja de estos métodos es que la información obtenida con péptidos sintéticos puede no estar relacionada con la obtenida con las proteínas naturales con un alto grado de certeza ya que las proteínas naturales a menudo tienen conformaciones complicadas que cambian con su entorno.

15 Otros métodos utilizan las proteínas naturales como sustrato para detectar la actividad proteasa. La desventaja de utilizar proteínas naturales como sustrato para proteasas en los métodos de la técnica anterior es que el control de la hidrólisis de proteínas se realiza generalmente por métodos indirectos. Esto significa que estos métodos son análisis de punto final que miden los productos de la reacción sólo después de que ésta se haya detenido. Estos métodos, por tanto, no se prestan a realizar estudios cinéticos sobre las proteínas naturales.

20 Un ejemplo de un análisis de la actividad proteasa que se realiza utilizando una proteína natural es un análisis de la actividad pepsina que se puede realizar utilizando hemoglobina como sustrato. La actividad pepsina puede estar relacionada con la liberación de ácido tricloroacético (TCA), aminoácidos aromáticos solubles y péptidos. El método tiene que ser un análisis de punto final, porque la reacción enzimática ha dejado de utilizar TCA antes de que sus productos se puedan analizar.

25 Lo mismo se cumple para los análisis de proteasa utilizando caseína, que a menudo se entrecruza con cromóforos. La reacción tiene que ser detenida por la elevación del pH con el fin de separar los cromóforos solubles del sustrato insoluble (por ejemplo, véase [www. Megazyme.com](http://www.Megazyme.com)).

La presente invención pretende proporcionar un método de análisis útil. En particular, la presente invención pretende proporcionar un método de análisis que es particularmente útil en el ensayo de piensos o ingredientes para piensos o mezclas de piensos (premezcla) para identificar si contienen fitasa y/o proteasa y, en algunos casos, el nivel de las mismas.

### 30 **Aspectos resumen de la presente invención**

Los aspectos de la presente invención se presentan en las reivindicaciones y en el comentario siguiente.

35 En un aspecto, la presente invención se refiere a un método de detección de una actividad fitasa o de una actividad proteasa que comprende las etapas de: (a) proporcionar un medio que comprende una fase continua y una fase dispersa, en donde la fase dispersa comprende: i) un primer componente que es un fitato o un ácido fítico ii) un segundo componente que es una proteína en donde el primer componente y el segundo componente se mantienen unidos en un complejo por medio de una o más interacciones intermoleculares; en donde la fase dispersa proporciona una propiedad detectable al medio; (b) proporcionar una muestra que comprende o se sospecha que comprende actividad fitasa y/o actividad proteasa, en donde la actividad fitasa y/o proteasa es capaz de afectar a la fase dispersa causando un cambio en la propiedad detectable del medio; (c) poner en contacto el medio con la muestra; (d) determinar si hay un cambio detectable en la propiedad detectable del medio.

40 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de análisis cuantitativo, semicuantitativo o cualitativo para la detección de la actividad de la enzima que comprende el método de acuerdo con el aspecto anterior.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un kit para la detección de la actividad fitasa o proteasa utilizando el método de acuerdo con los aspectos anteriores.

45 En otro aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de un método de acuerdo con el aspecto anterior o la utilización de un kit de acuerdo con el aspecto anterior para someter a ensayo la actividad enzimática en una muestra biológica - tal como una preparación de enzima, un caldo de fermentación, un alimento, un pienso, un ingrediente alimentario, una mezcla de ingredientes alimentarios, un ingrediente para pienso, un producto alimentario procesado o un producto para pienso procesado o en un extracto de uno cualquiera de los mismos.

### 50 **Breve descripción de las figuras**

En la presente memoria se hace referencia a las siguientes figuras:

La Figura 1a, que es un gráfico.

- La Figura 1b que es un gráfico.
- La Figura 2 que es un gráfico.
- La Figura 3 que es un gráfico.
- La Figura 4 que es un gráfico.
- 5 La Figura 5 que es un gráfico.
- La Figura 6 que muestra una serie de fotografías.
- La Figura 7 que es un gráfico.
- La figura 8a que es un gráfico.
- La figura 8b que es un gráfico.
- 10 La Figura 9 que es una tabla y una fotografía.
- La Figura 10 que es un gráfico.
- La Figura 11a que es un gráfico.
- La figura 11b que es un gráfico
- La Figura 11c que es un gráfico.
- 15 La figura 12a que es un gráfico.
- La figura 12b que es un gráfico.
- La Figura 13 que es una fotografía.
- La Figura 14 que son dos fotografías.
- La Figura 15 que es una serie de fotografías.
- 20 La Figura 16 que es un gráfico.
- La Figura 17 que es una fotografía.
- La Figura 18 que son dos fotografías.
- La Figura 19 que es una representación.
- La figura 20a que es una fotografía.
- 25 La figura 20b que es una fotografía.
- La Figura 21 que es un gráfico.
- La figura 22a que es un gráfico.
- La figura 22b que es un gráfico.
- La figura 23a que es un gráfico.
- 30 La figura 23b que es un gráfico.
- La Figura 24 que es un gráfico.
- La Figura 25 que es un gráfico.
- La Figura 26 que es un gráfico.
- La figura 27a que es un gráfico.
- 35 La figura 27b que es un gráfico.
- Las Figuras 28a-f son una serie de gráficos.
- Las Figuras 29a-e son una serie de gráficos.

Las figuras se describen a continuación con más detalle.

- 5 La **Figura 1a** muestra la formación de complejos de proteína de soja y  $\beta$ -caseína bovina como una función de la concentración de ácido fítico a pH 3,0 en glicina-HCl. El grado de formación de complejo se mide por un aumento en la turbidez de la solución medido por medio de la absorbancia de luz a una longitud de onda de 600 nm. Como se puede observar en la Figura 1a, la cantidad de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm a una concentración de ácido fítico dada depende del tipo de proteína utilizado. La beta-caseína proporciona una absorbancia mayor que la proteína de soja en el intervalo de concentraciones de ácido fítico de 0,04 a aproximadamente 0,14 mg/ml. La razón óptima de proteína con respecto a ácido fítico se puede someter a ensayo para cada tipo de proteína. La glicina-HCl es el tampón preferido para estas condiciones.
- 10 La **Figura 1b** muestra el efecto del pH sobre la absorbancia del complejo de ácido fítico-lisozima de pH 2,73 a pH 6,95 en tampones de glicina-HCl 40 mM, acetato, Mes-NaOH a hexakisfosfato de *mio*-inositol 0,3 mM (IP6) y 2,5 mg/ml de lisozima. Como se puede observar en la Figura 1b la absorbancia a 600 nm (también denominada DO600) cambia de acuerdo con el pH. Se puede determinar el pH óptimo para cada combinación de proteína y ácido fítico.
- 15 La **Figura 2** muestra la turbidez de las soluciones (que corresponden al medio) que contienen o bien un complejo de ácido fítico-proteína de soja (correspondiente a la fase dispersa) o bien un complejo de MIHS-proteína de soja como una función del pH de la solución. Como se puede observar en la Figura 2, la turbidez producida por el complejo de proteína varía con el pH. Se puede determinar el pH óptimo para cada combinación de proteína y ácido fítico.
- 20 La **Figura 3** muestra la turbidez de las soluciones que comprenden diferentes ésteres fosfato de inositol *mio*-monofosfato de inositol (IP1 (2)), bisfosfato de *mio*-inositol (IP2 (2,4)), trifosfato de *mio*-inositol (IP3 (1,4,5)), tetrakisfosfato de *mio*-inositol (IP4 (1,2,4,5)), pentaquifosfato de *mio*-inositol (IP5 (1,2,3,4,5)), hexakisfosfato de *mio*-inositol (IP6 (1,2,3,4,5,6)) e isómeros posicionales de IP5 pentakisfosfato de *mio*-inositol (IP5 (1,3,4,5,6)) y pentaquifosfato de *mio*-inositol (IP5 (1,2,4,5,6)) formando complejos con la proteína de soja. La formación del complejo provoca el aumento de la turbidez en la solución, que se mide por un aumento en la absorbancia de la luz a 600 nm por la solución. En particular, la Figura 3 muestra sorprendentemente la drástica disminución de la turbidez cuando IP6 se convertía en IP5, que forma la base para el desarrollo del método de análisis de fitasa actual. En la bibliografía se suele suponer que la capacidad quelante disminuye proporcionalmente cuando IP6 se convierte en IP5, IP4, IP3 e IP2 (Blaabjerg, K; Carlson, D.; Hansen-Møller, J.; Tauson, A.-H.; Poulsen, HD 2007).
- 25 La **Figura 4** muestra la turbidez de las soluciones que comprenden diferentes ésteres fosfato de inositol (IP1-IP6) e isómeros posicionales de IP5 que forman complejos con  $\beta$ -caseína. La formación del complejo provoca el aumento de la turbidez en la solución, que se mide por un aumento en la absorbancia de la luz a 600 nm por la solución. En particular, la Figura 4 muestra la drástica disminución de la turbidez cuando IP6 se convertía en IP5.
- 30 La **Figura 5** muestra el efecto de diferentes niveles de dosis de fitasa (0-1 U/ml) en la reducción de la turbidez de la solución causada por los complejos de proteína de soja y ácido fítico con el tiempo. Como se puede observar en la Figura 5, sin fitasa presente hay una tasa muy lenta de disminución de la turbidez (línea superior). Con concentraciones crecientes de fitasa la turbidez de la solución disminuye más rápidamente.
- 35 **Figura 6:** El panel superior más a la izquierda muestra los tubos que contienen la incubación durante la noche del extracto de pienso filtrado con el complejo proteína de soja y ácido fítico. Los tubos contienen fitasa (Phyzyme XP<sup>®</sup>), de izquierda a derecha, 0 (control), 186, 442, 1129, 2301 y 210.368 UFT/kg (UFT = unidades de fitasa). El panel superior derecho muestra un kit de ensayo de actividad proteasa o fitasa. El panel inferior izquierdo muestra un agitador que se puede utilizar en el análisis de actividad fitasa o proteasa. El panel derecho inferior muestra un turbidímetro y cubetas que se puede utilizar en el análisis de actividad proteasa o fitasa.
- 40 La **Figura 7** muestra el efecto del pH y el tiempo de incubación sobre la turbidez de soluciones que comprenden complejo de proteína de soja y ácido fítico en presencia de fitasa (Phyzyme XP<sup>®</sup>). Como se puede observar en la Figura 7, a mayor tiempo de incubación con fitasa más baja es la turbidez a todos los valores de pH sometidos a ensayo.
- 45 La **Figura 8a** muestra la disminución de la turbidez del complejo de lisozima y ácido fítico causada por la presencia de 0,1 UFT de fitasa como una función del tiempo de reacción. La reacción se controló por la disminución de la absorbancia a 600 nm y midiendo el fosfato inorgánico liberado simultáneamente. Se puede observar a partir de la Figura 8a que la disminución en la turbidez es co-temporal con el incremento de fosfato inorgánico libre liberado por la fitasa. Por lo tanto, la turbidez es un buen indicador de la actividad fitasa.
- 50 La **Figura 8b** muestra la disminución de la turbidez de la solución de complejo de proteína de soja y ácido fítico como una función del tiempo y la dosis de fitasa (UFT/kg) en el pienso a base de maíz/soja controlada por la disminución de la absorbancia a 600 nm.
- 55 La **Figura 9** muestra los resultados (mostrados en el panel superior) de los análisis de fitasa sobre muestras de pienso elaboradas en una microplaca (que se muestra en el panel inferior). En particular la Figura 9 muestra los datos de absorbancia en relación con las unidades de fitasa presentes en el pienso. Las muestras de pienso fueron seleccionadas al azar entre productos de pienso elaborados en Costa Rica (CR), China (CN), Francia (F) y Australia

(AU). Las unidades de fitasa se proporcionan después de los códigos del país. Como se puede observar en la Figura 9, la turbidez medida en este análisis varía entre las diferentes muestras de pienso.

5 La **Figura 10** muestra el efecto del pH y de la dosis de fitasa en la reducción de la turbidez de las soluciones que contienen el complejo de proteína de soja y ácido fítico. La mezcla de reacción contenía 0,1 ml de glicina-HCl 0,2 M con un pH de 1,9, 2,5 y 3,0, respectivamente, y 0,1 ml de producto filtrado de extracto de agua de pienso. La concentración final de fitato de sodio fue de 0,1 mM.

10 La **Figura 11a** y la **Figura 11b** muestran el cambio de turbidez en relación con la dosis de fitasa y el tiempo de reacción para 12 muestras de pienso Canadiense. Como se puede observar en la Figura 11a y la Figura 11b, la actividad fitasa medida por el presente método puede diferir de la fitasa medida por los métodos de la técnica anterior. Esto puede ser debido a la presencia de inhibidores de fitasa o al tipo de matriz del pienso en las muestras de pienso que se están sometiendo a ensayo. Se pueden utilizar controles para contabilizar las diferencias en la reacción causadas por los inhibidores de fitasa en la muestra o el tipo de matriz del pienso.

15 La **Figura 11c** muestra la utilización de complejo de lisozima y ácido fítico como sustrato en acetato de sodio 35 mM (pH 5,49) para el análisis de la variante de fitasa de *Aspergillus* (Natuphos). La mezcla de reacción contenía 35 µl de tampón 50 mM, lisozima (2,5 mg/ml), fitato de sodio (IP6) (0,3 mM) y fitasa en varias cantidades. La reacción se llevó a cabo a 22°C en una microplaca de 96 pocillos y estuvo seguida del control de la disminución de la absorbancia a 600 nm. Como se puede observar en la Figura 11c la velocidad de disminución de la absorbancia a 600 nm aumentó linealmente con el número de unidades de fitasa presentes. Los parámetros del análisis se pueden ajustar para asegurar que la velocidad de reacción es convenientemente medible en un kit para la medición de las muestras de pienso.

20

25 La **Figura 12a** muestra el uso de la proteína (lisozima)-ácido fítico como sustrato a pH 8,7 en Tris-HCl 35 mM para el análisis de la proteasa alcalina P-3000 (una variante de la subtilisina). La mezcla de reacción contenía 35 µl de tampón 50 mM, lisozima (2,5 mg/ml), fitato de sodio (IP6) (0,3 mM) y proteasa en diversas cantidades. La reacción se llevó a cabo a 22°C en una microplaca de 96 pocillos y estuvo seguida del control de la disminución de la absorbancia a 600 nm. Como se puede observar en la Figura 12a la velocidad de disminución de la absorbancia a 600 nm aumenta casi linealmente con el número de unidades de proteasa presentes. Los parámetros del análisis se pueden ajustar para asegurar que la velocidad de reacción es convenientemente medible en un kit para la medición de las muestras de pienso.

30 La **Figura 12b** muestra el efecto del pH sobre la actividad proteasa P-3000 utilizando complejo de proteína de soja y ácido fítico como sustrato como se indica por cambios en la turbidez solución. Se puede observar a partir de la figura 12b que esta proteasa es más activa a pH 3,0 que a pH 1,9 o pH 2,5. El pH utilizado en el análisis se puede seleccionar de acuerdo con el intervalo de pH al cual la enzima es activa, así como para asegurar que las proteínas que forman parte del complejo tienen la carga apropiada para formar un complejo.

35 La **Figura 13** muestra un ejemplo de un kit de análisis de la actividad proteasa y/o fitasa basado en una placa de Petri que se puede complementar con una mini-incubadora y una regla (no mostrado).

40 La **Figura 14** muestra los resultados de los análisis en placa de Petri para determinar la actividad fitasa, donde la concentración de ácido fítico en el gel es 0,3 mM (panel de la izquierda) y 0,4 mM (panel de la derecha). Los pocillos marcados con 0, 186, 233, 442, 1129 y 2301 contenían extracto de pienso a base de maíz/soja con la cantidad indicada de fitasa (UFT/kg). Los pocillos marcados con 836 y 1586 contenían extracto de pienso a base de trigo que tenía 836 y 1586 UFT/kg, respectivamente. Como se puede observar en la Figura 14, la concentración de ácido fítico final en el gel se puede ajustar para dar el mejor contraste entre la turbidez del gel y los halos claros que indican la actividad fitasa.

45 La **Figura 15** muestra análisis en placa de Petri para determinar la actividad fitasa con diferentes concentraciones de tampón (glicina-HCl, pH 3,0). De izquierda a derecha: glicina-HCl 0,1 M, 0,15 M, 0,20 M, 0,25 M. Los pocillos marcados con 0, 193, 233, 442, 1129 y 2301 contenían extracto de pienso a base de maíz/soja con la cantidad indicada de fitasa (UFT/kg).

50 La **Figura 16** muestra la relación entre el diámetro del halo o el área de aureola desarrollado a 23°C y el número de unidades de fitasa (UFT/kg) contenido en el extracto de pienso. Para cada grupo de 4 barras, las barras corresponden a 223, 442, 1129, 2301 UFT/kg (de izquierda a derecha). Como se puede observar en la Figura 16 existe una correlación positiva entre el diámetro o el área del halo y la concentración de fitasa.

La **Figura 17** muestra el efecto de la concentración de ácido fítico (0,1-0,4 mM) y el factor de dilución en agua del pienso sobre el tamaño del halo del gel de agarosa que contiene glicina-HCl 0,1 M pH 3,0 y proteína de soja 2 mg/ml.

55 La **Figura 18** muestra ejemplos de análisis de proteasa realizados por el método de placa de Petri. Los pocillos contenían 0 (control), 114, 570, 1.140, 2.280, 3.420 y 4.560 unidades de Dan (o GSU, Genencor Subtilisin Unit).

La **Figura 19** muestra una hidrólisis por etapas esquemática de los grupos fosfato del hexakisfosfato de *mio*-inositol

(IP<sub>6</sub>) con respecto a pentaquifosfato de *mio*-inositol (IP<sub>5</sub>), tetrakisfosfato de *mio*-inositol (IP<sub>4</sub>), trifosfato de *mio*-inositol (IP<sub>3</sub>), bisfosfato de *mio*-inositol (IP<sub>2</sub>) y monofosfato de *mio*-inositol (IP<sub>1</sub>) con la liberación concomitante de fosfato inorgánico en cada etapa. La primera etapa de IP<sub>6</sub> a IP<sub>5</sub> proporciona el cambio más grande en la turbidez y se correlaciona con la concentración de fitasa. Sin embargo, la hidrólisis de los grupos fosfato restantes, en particular IP<sub>5</sub> a IP<sub>4</sub> también se puede utilizar para medir la actividad fitasa.

La **Figura 20a** muestra el efecto del ácido fítico sobre la agregación de las proteínas de soja que producen turbidez de las soluciones y el aclaramiento de las soluciones turbias con fitasa B de la bacteria del suelo *Buttiauxella* sp. Tubo 0, proteína de soja solamente (solución clara). Tubos 1-7, proteína de soja a 0,15 mg/ml de ácido fítico (las soluciones de soja en todos los tubos están turbias). En los tubos 1-3 el producto agregado comienza a precipitar.

**Figura 20b:** Tubo 0, proteína de soja solamente (solución clara). Tubos 1-7, proteína de soja a 0,15 mg/ml de ácido fítico con adición de fitasa B: 0, 5, 10, 50, 100, 200 y 300 UFT/ml. La solución se volvió clara 1 min después de la adición de la fitasa. Como se puede observar en las Figuras 20a y 20b, la disminución de la turbidez puede ser observada a simple vista. La turbidez también corresponde a la Absorbancia a 600 nm.

La **Figura 21** muestra la relación entre el tamaño del área del halo y el número de unidades de fitasa añadido al pienso a base de maíz/soja o trigo. Como se puede observar en la Figura 21, el tamaño del halo producido en un análisis basado en gel o placa de Petri depende del tipo de pienso del que proviene la muestra, así como el número de unidades de fitasa y de las condiciones de reacción. Los resultados del análisis se pueden comparar con los patrones o controles para tener en cuenta esta diferencia. Esto es particularmente útil en análisis cuantitativos o semi-cuantitativos. Los análisis de piensos basados en trigo se pueden incubar durante más tiempo si es necesario ya que el halo se desarrolla más lentamente. El tiempo óptimo de incubación puede ser determinado para este ensayo en diferentes tipos de pienso.

La **Figura 22** muestra el efecto de la concentración de la fitasa sobre la reacción catalizada por fitasa utilizando complejo de ácido fítico (IP<sub>6</sub>)-lisozima como sustrato.

**Figura 23:** Efecto de IP<sub>6</sub> y de la concentración de lisozima sobre la turbidez de la solución de complejo de IP<sub>6</sub> y lisozima. El complejo se preparó en tampón acetato de sodio 50 mM pH 4 que contenía IP<sub>6</sub> 0-0,7 mM y lisozima a diferentes concentraciones: 30 μM (◆), 58 μM (■), 116 μM (▲), 174 μM (•), 231 μM (○), 289 μM (□), 347 μM (Δ), 405 μM (◊) y 463 μM (+) en un volumen total de 120 μl. Los detalles experimentales se describen en la sección de Materiales y Métodos.

**Figura 24:** Efecto del pH y la concentración de (a) de NaCl y (b) CaCl<sub>2</sub>, respectivamente, sobre la turbidez del complejo de IP<sub>6</sub> y lisozima (en una razón de 0,3 mM:0,23 mM) en tampón glicina-HCl 50 mM (pH 2,5 a 3,5), tampón acetato de sodio 50 mM (pH 3,5 a 5,5), y tampón Tris-maleato 50 mM (pH 5,5 a 8,5) que contenía IP<sub>6</sub> 0,3 mM, lisozima 0,23 mM (2,5 mg/ml) y (a) NaCl a diferentes concentraciones: 0 mM (◆), 5 mM (■), 10 mM (▲), 15 mM (•), 30 mM (○), y 45 mM (□), o (b) CaCl<sub>2</sub> a diferentes concentraciones: 0 mM (◆), 1 mM (■), 3 mM (▲), 5 mM (•), 7 mM (◊), 10 mM (□) y 15 mM (Δ) en un volumen total de 120 μl. Los detalles experimentales se describen en la sección de Materiales y Métodos.

**Figura 25:** Efecto de las concentraciones de EDTA y CaCl<sub>2</sub> sobre la turbidez del complejo de IP<sub>6</sub> y lisozima (0,3 mM:0,23 mM) en glicina-HCl 50 mM pH 3,5 que contenía IP<sub>6</sub> 0,3 mM, lisozima 0,23 mM y CaCl<sub>2</sub> a diferentes concentraciones: 0 mM (◆), 5 mM (■), y 10 mM (▲) en un volumen total de 120 μl.

**Figura 26:** Efecto de la concentración de fosfato sobre la turbidez del complejo de IP<sub>6</sub> y lisozima (0,3 mM:0,23 mM) en glicina-HCl 50 mM a pH 3,5 que contenía IP<sub>6</sub> 0,3 mM, lisozima 0,23 mM y diferentes concentraciones de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en un volumen total de 120 μl

**Figura 27:** Actividad de (a) variante 1 de fitasa de *E. coli* (0,1 UFT/ml) y (b) Fitasa de *A. Niger* (0,5 UFT/ml) con sustrato de IP<sub>6</sub> y lisozima basada en la reducción de la turbidez (◆) y P<sub>i</sub> liberado (■); con IP<sub>6</sub> basado en P<sub>i</sub> liberado (Δ); y con complejo de IP<sub>6</sub> y lisina basado en P<sub>i</sub> liberado (◊). Los tres sustratos se prepararon en glicina-HCl 50 mM (pH 3,5) que contenía IP<sub>6</sub> 0,3 mM (para sustrato de IP<sub>6</sub>) y, o bien lisozima 0,23 mM (para sustrato de IP<sub>6</sub>-lisozima) o bien lisina 23 mM (para sustrato de IP<sub>6</sub>-lisina) en un volumen total de 120 μl. Las reacciones se llevaron a cabo a 37°C durante 25 min con mezclado continuo. La turbidez de las reacciones se determinó cada 30 seg. Para la determinación de P<sub>i</sub>, las reacciones se detuvieron mediante la adición de 30 μl de HCl 2,5 M, se centrifugaron y los sobrenadantes se analizaron para determinar P<sub>i</sub> en Konelab.

**Figura 28:** Relación entre la reducción de la turbidez y la liberación de fosfato durante la reacción con diferentes concentraciones de fitasas: (a, b, c) variante 1 de fitasa de *E. coli*, 0,1 UFT/ml (◆), 0,2 UFT/ml (■), y 0,3 UFT/ml (▲), y (d, e, f) Fitasa de *A. niger*, 0,1 UFT/ml (◆), 0,15 UFT/ml (■), y 0,2 UFT/ml (▲), en tampón de acetato 50 mM (pH 5,5 a 37°C) con un volumen total de reacción de 120 μl. Las mediciones de la turbidez se muestran en la Figura 28a, la Figura 28d; el P<sub>i</sub> liberado en la Figura 28b y la Figura 28e; y la relación entre la reducción de la turbidez (mDO/min) y la liberación de P<sub>i</sub> (mM/min) en la Figura 28c y la Figura 28f.

**Figura 29:** Perfiles de pH de (a) variante 1 de fitasa de *E. coli*, (b) variante 2 de fitasa de *E. coli*, (c) fitasa de

*Bacillus*, (d) fitasa de *A. niger*, y (e) fitasa de *Peniophora Lycii* sobre el complejo de IP<sub>6</sub>-lisozima como sustrato. Las reacciones se llevaron a cabo en potasio-HCl 50 mM (pH 1,5 a 2,5), glicina-HCl 50 mM (pH 2,5 a 3,5), acetato de sodio 50 mM (pH 3,5 a 5,5) y Tris-maleato 50 mM (pH 5,5 a 8,5), respectivamente, que contenía IP<sub>6</sub> 0,3 mM y lisozima 0,23 mM en un volumen total de 120 µl a 37°C. La dosis de enzima para cada reacción fue de 0,1 UFT/ml basándose en P<sub>i</sub> liberado de IP<sub>6</sub> en el análisis de actividad fitasa convencional. En la Figura 7c, las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo sin CaCl<sub>2</sub> (◆) y con CaCl<sub>2</sub> 1 mM (■).

#### Aspectos detallados de la presente invención

En un aspecto amplio, la presente invención se refiere a un método de detección de la actividad fitasa o la actividad proteasa que comprende las etapas de:

- 10 (a) proporcionar un medio que comprende una fase continua y una fase dispersa, en donde la fase dispersa comprende: i) un primer componente que es un fitato o un ácido fítico ii) un segundo componente que es una proteína en donde el primer componente y el segundo componente se mantienen unidos en un complejo por medio de una o más interacciones intermoleculares; en donde la fase dispersa proporciona una propiedad detectable al medio; (b) proporcionar una muestra que comprende o se sospecha que comprende actividad fitasa y/o actividad proteasa, en donde la actividad fitasa y/o proteasa son capaces de afectar a la fase dispersa para causar un cambio en la propiedad detectable del medio; (C) poner en contacto el medio con la muestra; (d) determinar si hay un cambio detectable en la propiedad detectable del medio.

20 La presente invención proporciona un método de análisis útil para determinar si un pienso comprende una actividad enzimática en particular, preferiblemente fitasa. Al conocer si un pienso tiene o no tiene bajos niveles de fitasa es posible añadir fitasa al pienso. Esto es ventajoso ya que la fitasa rompe el fitato normalmente no nutricional para proporcionar entidades de fosfato nutricionales.

La detección de actividad de la enzima significa la obtención de una indicación de la presencia o ausencia de actividad de la enzima o de la cantidad de actividad de una enzima.

25 El método para la detección de actividad de la enzima puede ser un método cuantitativo, semicuantitativo o cualitativo. En una realización, el análisis puede proporcionar una indicación de la presencia o ausencia de actividad de la enzima. En otra realización, el método puede proporcionar una indicación de la cantidad de actividad de enzima en una muestra.

La actividad enzimática representa la capacidad para catalizar una reacción particular. La cantidad de sustrato consumido o de producto producido a partir de la reacción se puede observar o medir.

30 La cantidad de inhibición de la actividad de la enzima se puede medir mediante la comparación de la cantidad de actividad que se espera de una cantidad conocida de enzima en una muestra con la cantidad de actividad enzimática medida.

35 El ácido fítico (hexakisfosfato de *mio*-inositol, IP<sub>6</sub>) es un componente importante, por ejemplo, en cereales, legumbres y oleaginosas. La forma de sal, el fitato, es la principal forma de almacenamiento de fósforo en estas plantas. Las fitasas son útiles como aditivos para piensos animales donde mejoran la disponibilidad de fósforo orgánico para el animal y disminuyen la contaminación por fosfato del medio ambiente (Wodzinski R. J., (1996)). Los animales no producen de forma natural las enzimas para descomponer el fitato para obtener fosfato para la formación de los huesos y el crecimiento. La actividad de las fitasas vegetales varía con las especies y variedades de plantas y muchas fitasas vegetales no tienen una actividad óptima al pH encontrado en los sistemas digestivos de los animales. Las fitasas pueden ser inactivadas por calor durante el procedimiento de granulación del pienso o la actividad fitasa puede disminuir durante el almacenamiento. Por tanto, resulta ventajoso poder detectar la presencia, ausencia o cantidad de actividad fitasa en el pienso, los alimentos o los ingredientes para piensos.

En una realización de la presente invención, la actividad de la enzima puede ser fosfohidrolasa o fosfomonoesterasa, preferiblemente una actividad fitasa.

45 Según se utiliza en la presente memoria, el término actividad fitasa se refiere a la capacidad de una enzima o una muestra para catalizar las etapas de la descomposición del fitato (hexakisfosfato de *mio*-inositol) para proporcionar fosfato inorgánico (p. ej., ortofosfato). Las etapas se muestran en la Figura 19.

50 El término fitasa significa una proteína o polipéptido que son capaces de catalizar la hidrólisis de los ésteres de ácido fosfórico, que comprende fitato y la liberación de fosfato inorgánico, hexakisfosfato de *mio*-inositol + H<sub>2</sub>O ⇌ 1,2,3,5,6-pentaquifosfato de 1D-*mio*-inositol + fosfato (E.C.3.1.3.26). Algunas fitasas además del fitato, son capaces de hidrolizar por lo menos algunos de los fosfatos de inositol de grados intermedios de fosforilación lo que da como resultado la formación por etapas de pentakis-, tetrakis-, tris-, bis- y monofosfatos de *mio*-inositol, así como la liberación de fosfato inorgánico. Algunas de estas enzimas son, fosfatasa ácida de histidina (HAP), fosfatasa ácida de pH 2,5, fitasa de hélice enrollada (BPP) y fitasa fosfatasa ácida púrpura (PAP), por ejemplo, 3-fitasa (EC3.1.3.8), 4-fitasa (también conocida como 6-fitasa, EC3.1.3.26), o 5-fitasa (EC3.1.3.72), también fitasas neutras y fitasas alcalinas (principalmente de Bacilos) según la clasificación de acuerdo con el Comité de Nomenclatura de la Unión

Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBBM).

5 En una realización preferiblemente el componente polivalente de la fase dispersa es el hexakisfosfato de *mio*-inositol y la actividad fitasa hidroliza el hexakisfosfato de *mio*-inositol a pentaquifosfato de *mio*-inositol. La hidrólisis de hexakisfosfato de *mio*-inositol a pentaquifosfato de *mio*-inositol proporciona un cambio en la propiedad detectable del medio, por ejemplo, un cambio detectable en la turbidez.

En otra realización, el componente polivalente de la fase dispersa puede ser pentaquisfosfato de *mio*-inositol y la actividad de hidrólisis hidroliza el pentaquifosfato de *mio*-inositol a tetrakisfosfato de *mio*-inositol.

10 En otra realización, el componente polivalente de la fase dispersa puede ser un fosfato de inositol de grado intermedio tal como pentakis-, tetrakis-, tris-, bis- o monofosfato de *mio*-inositol y la actividad de hidrólisis elimina un fosfato lo que se traduce en la formación por etapas de tetrakis-, tris-, bis- y monofosfato de *mio*-inositol o inositol.

En otra realización, se puede añadir una combinación de enzimas a una muestra o a un pienso, alimento, ingrediente para pienso, mezcla de ingredientes para pienso (premezcla) o ingrediente alimentario para catalizar la hidrólisis del monofosfato de *mio*-inositol (IP1) a Inositol.

15 La actividad fitasa se puede medir en unidades de fitasa (UFT). Una UFT se define como la actividad fitasa que genera 1 micromol de fósforo inorgánico por minuto a partir de fitato de sodio 5,1 mM a pH 5,5 y a 37°C.

En algunas circunstancias, el número de unidades de fitasa medido en una muestra no se puede correlacionar con la cantidad de la enzima fitasa, porque pueden estar presentes inhibidores de fitasa. Por lo tanto, se pueden utilizar preferiblemente controles adecuados que comprenden una cantidad conocida de fitasa para comprobar la presencia y la cantidad de inhibidores de fitasa en la muestra.

20 En otra realización, la actividad enzimática de la presente invención puede ser la actividad proteasa. Según se utiliza en la presente memoria la actividad proteasa es la capacidad de catalizar la hidrólisis de enlaces peptídicos de proteínas o péptidos para liberar cadenas peptídicas más cortas o aminoácidos. Adecuadamente, la proteasa es una endoproteasa de microbios, plantas y otros organismos vivos.

Adecuadamente, la proteasa es capaz de hidrolizar lisozima,  $\beta$ -caseína, y/o proteína de soja.

25 En una realización, el método se puede utilizar para detectar la presencia, ausencia o cantidad de actividad enzimática, de manera adecuada la actividad proteasa o fitasa en una muestra. La muestra puede ser una solución enzimática acuosa o una muestra compleja tal como una muestra de un pienso, alimento, premezcla de pienso, ingrediente de pienso o ingrediente alimentario o un extracto de alimentario, alimento, ingrediente de pienso o ingrediente alimentario. Adecuadamente, el ingrediente de pienso o premezcla de pienso puede comprender o consistir en un microorganismo. Adecuadamente, el pienso puede ser un pienso a base de maíz/soja o un pienso a base de trigo. Adecuadamente, el extracto de pienso, la comida, la premezcla de pienso, el ingrediente de pienso o el ingrediente alimentario pueden ser un extracto acuoso.

30 La proteína en la fase dispersa de la presente invención puede ser cualquier proteína, siempre que sea capaz de formar una interacción intermolecular con el componente polivalente para formar una fase dispersa. Cuando el método, el uso o el kit son un método, un uso o un kit para la detección de actividad proteasa, la proteína debe ser también susceptible de ser hidrolizada por la proteasa de interés para destruir la fase dispersa.

35 Adecuadamente, la proteína puede ser una proteína natural o una proteína sintética con valores de pI preferiblemente por encima de pH 4,6, tal como proteína de soja, proteína de semilla de colza, proteína de mostaza,  $\beta$ -caseína bovina, caseína N,N-dimetilada (C9801), beta-lactoglobulina bovina, albúmina de suero bovina, lisozima, o hemoglobina porcina. La proteína puede ser modificada con un cromóforo por ejemplo, un cromóforo o un fluoróforo.

40 Según se utiliza en la presente memoria el término componente iónico representa cualquier componente cargado, preferiblemente un ion de carga múltiple. El componente iónico puede ser cualquier componente iónico siempre que sea capaz de formar una interacción intermolecular con el componente polivalente de la presente invención para formar una fase dispersa. El componente iónico puede ser una proteína o un ácido graso o un ácido graso con iones de calcio.

45 Cuando el método, el uso o el kit son un método, un uso o un kit para la detección de la hidrólisis catalizada por enzima del componente iónico, el componente iónico debe ser susceptible de ser hidrolizado por la enzima de interés para destruir la fase dispersa mediante hidrólisis intramolecular dentro del componente iónico en lugar de mediante ruptura de la interacción intramolecular. La fase dispersa se destruye cuando ya no proporciona una propiedad detectable al medio o hay un cambio en la propiedad detectable que la fase dispersa proporciona al medio.

50 Cuando la enzima de interés es una fitasa, el componente polivalente puede ser adecuadamente ácido fítico (hexakisfosfato de *mio*-inositol, IP6), pentaquifosfato de *mio*-inositol IP5, o polifosfato.

Cuando la enzima de interés es una proteasa, el componente polivalente puede ser adecuadamente ácido fítico

(hexakisfosfato de *mio*-inositol, IP6), FIMPM (hexasulfato de *mio*-inositol), pentaquisfosfato de *mio*-inositol, o polifosfato.

5 La fase dispersa de la presente invención comprende al menos una proteína o péptido y al menos un componente polivalente. En una realización, la fase dispersa puede ser un complejo o un agregado. En una realización, la fase dispersa puede ser un semisólido o un sólido.

En una realización, la fase dispersa es un agregado o un complejo, tal como un agregado de proteína y fitato o un complejo de proteína-fitato.

10 En una realización, la fase dispersa se proporciona dispersa en una fase continua para formar un medio que comprende una fase dispersa y una fase continua. La fase continua puede ser un líquido o un gel, adecuadamente un líquido acuoso o un gel acuoso, de manera adecuada un gel de agar o un gel de agarosa o un gel de poliacrilamida o un gel formado con otro polímero formador de gel. La presencia de la fase dispersa en la fase continua proporciona una propiedad detectable al medio, tal como turbidez, viscosidad, absorbancia de la luz o dispersión de la luz. Esta propiedad detectable se puede medir con referencia a una muestra de la fase continua que no comprende la fase dispersa. La cantidad de turbidez, viscosidad, absorción de la luz o la dispersión de la luz por el medio es proporcional a la cantidad de fase dispersa en el medio.

15 La destrucción o la degradación de uno o ambos miembros de la fase dispersa, es decir, el primer componente que es un componente polivalente, por ejemplo IP6 (= IP<sub>6</sub>) O el segundo componente que es un componente iónico, por ejemplo una proteína, por hidrólisis del IP6, por ejemplo, por la fitasa, o la hidrólisis de la proteína por la proteasa darán lugar a la destrucción de la fase dispersa. La destrucción de la fase dispersa conduce a una disminución en la turbidez, la viscosidad o la absorbancia del medio que es directamente proporcional a la actividad de la enzima.

20 En algunas realizaciones, la actividad enzimática es la actividad fitasa y el componente polivalente es preferiblemente IP6. Los complejos de proteína con IP6 proporcionan una mayor absorbancia a 600 nm que los complejos de otros ésteres fosfato e isómeros posicionales de IP5. Por lo tanto el cambio de absorbancia a 600 nm es mayor con la hidrólisis de 1 grupo fosfato inorgánico a partir de IP6 que a partir de otros ésteres fosfato e isómeros posicionales de IP5.

Los componentes de la fase dispersa de la presente invención pueden ser mantenidos juntos por medio de interacciones intermoleculares tales como las interacciones carga-carga (interacciones electrostáticas) o enlaces de hidrógeno.

30 En una realización, la proteína está a un pH por debajo de su punto isoeléctrico (pI) y está cargada positivamente. Preferiblemente, en este caso, el componente polivalente está cargado negativamente, por ejemplo IP6, y estos dos componentes forman una interacción carga-carga entre la proteína cargada positivamente y el IP6 cargado negativamente. La interacción carga-carga conduce a la formación de la fase dispersa.

En una realización el medio o la proteína están a un pH entre 1,8 y 7,5, preferiblemente a un pH entre 1,8 y 5,5.

35 En otra realización, el componente polivalente es ácido fítico o un componente de una sal de fitato. En una realización adicional la enzima es una fitasa.

40 En otra realización, la proteína está a un pH que está por encima de su pI y está cargada negativamente. Preferiblemente, en este caso, el componente polivalente está cargado positivamente, por ejemplo polilisina, quitina, quitosano o un oligómero de quitina o quitosano. Estos dos componentes forman un complejo mediante la interacción carga-carga entre la proteína cargada negativamente y el componente polivalente cargado positivamente.

En otra realización, la proteína está por encima de su pI y está cargada negativamente y el componente polivalente también está cargado negativamente. Estos dos componentes cargados negativa forman una fase dispersa entre sí por la interacción carga-carga con cationes monovalentes o divalentes o trivalentes cargados positivamente.

45 Según se utiliza en la presente memoria un catión monovalente es cualquier ion cargado positivamente que tiene solamente una carga positiva, por ejemplo, Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>, un catión divalente es cualquier ion cargado positivamente que tiene dos cargas positivas, por ejemplo, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>. Fe<sup>3+</sup>, un catión trivalente es cualquier ion cargado positivamente que tiene tres cargas positivas, por ejemplo, Fe<sup>3+</sup>.

50 La cantidad de fase dispersa en una solución o gel es proporcional a la turbidez, absorbancia o dispersión de luz de la solución o gel o la viscosidad de una solución. Por tanto, se puede obtener una indicación de la cantidad de fase dispersa en la solución o gel mediante la medición de la turbidez, absorbancia o dispersión de luz de la solución o gel o la viscosidad de una solución por cualquier mecanismo adecuado conocido en la técnica.

La cantidad de fase dispersa en la solución o gel después de la adición de la enzima o de la muestra depende de la cantidad de actividad enzimática. La presencia, ausencia o cantidad de actividad de la enzima pueden ser determinadas por la diferencia de turbidez, absorbancia o dispersión de luz de la solución o gel o la viscosidad de

una solución antes y después de la adición de la enzima o de la muestra o con y sin adición de la enzima o la muestra.

5 En una realización de turbidez se puede observar a simple vista o utilizando un turbidímetro. La turbidez de las soluciones puede ser observada a simple vista en cubetas o tubos como se muestra en la Figura 6, panel de la izquierda superior o se puede medir utilizando un turbidímetro. La turbidez de los geles también se puede observar a simple vista - por ejemplo, como se demuestra en las Figuras 13, 14 y 17. La turbidez de las soluciones en microplacas se puede observar a simple vista o se puede medir utilizando un lector de microplacas adecuado para un escrutinio de alto rendimiento.

10 En otra realización, la cantidad de fase dispersa en solución se mide por la absorbancia de la luz de la solución, de forma adecuada la absorbancia de la luz se puede medir a cualquier longitud de onda entre 200 y 800 nm, preferiblemente entre 350 y 700 nm, más preferiblemente de entre 400 y 600 nm y lo más preferiblemente a 600 nm. La absorbancia de muchas muestras se puede analizar y/o comparar en una microplaca mediante el uso de un lector de ELISA o un lector de microplacas.

15 En una realización, la señal proporcionada por la destrucción o la degradación de la fase dispersa se puede amplificar mediante el uso de una proteína está marcada covalentemente o no covalentemente con una sonda de fluorescencia, que cambia su intensidad de fluorescencia con el cambio de viscosidad de la solución o cuando la proteína forma parte de un complejo, producto agregado o fase dispersada. La proteína también puede estar marcado con un cromóforo, adecuadamente un fluoróforo.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para detectar la actividad fitasa como se reivindica.

20 En una realización, el ácido fítico es IP6 y la actividad fitasa hidroliza el IP6 a IP5. En realización la hidrólisis de IP6 a IP5 degrada la fase dispersa. En una realización, la fase dispersa proporciona turbidez al medio y la hidrólisis de IP6 a IP5 causa una disminución detectable en la turbidez del medio. Ventajosamente la actividad fitasa se puede detectar a partir de la hidrólisis de IP6 a IP5, que causa una disminución detectable en la turbidez del medio. Debido a que la disminución detectable de la turbidez del medio es observable a partir de la hidrólisis de IP6 a IP5, el cambio en la turbidez ocurre en un corto período de tiempo (10-60 minutos). El método de la presente invención puede proporcionar un método de análisis cinético rápido para determinar la actividad fitasa. En otra realización, la actividad fitasa hidroliza IP5 a IP4 o IP6 a IP5 luego a IP4. La hidrólisis de IP5 a IP4 o de IP6 a IP5 luego a IP4 causa una disminución detectable en la turbidez del medio.

25 En una realización, el método, el uso o el kit de la presente invención se pueden llevar a cabo en ausencia de anticuerpos.

30 En una realización, el método, el uso o el kit de la presente invención se pueden llevar a cabo en solución sobre una placa de microtitulación. Las ventajas de esta realización son que se pueden utilizar pequeñas cantidades de muestra, la placa puede ser leída de manera sencilla y con precisión utilizando un lector de microplacas. Esta realización se puede utilizar para los análisis cuantitativos, semi-cuantitativos o cualitativos, ventajosamente se pueden realizar análisis cuantitativos, utilizando controles en la misma placa de microtitulación.

35 En otra realización el método, el uso o el kit de la presente invención se pueden llevar a cabo en un gel en un recipiente adecuado, por ejemplo una placa de Petri. En esta realización el método puede ser cuantitativo, semi-cuantitativo o cualitativo, ventajosamente se pueden realizar análisis cualitativos con las áreas del gel que no se han expuesto a la actuación de la enzima o la muestra como controles. En esta realización, el gel comprende una fase dispersa y una continua. El gel puede estar turbio. Se pueden hacer numerosos agujeros o pocillos en el gel a los que se pueden añadir las muestras y los controles. Aparecen parches transparentes o halos en el gel alrededor de los pocillos que contienen la actividad enzimática, preferiblemente la actividad proteasa o fitasa, los halos se desarrollan (amplían) con el tiempo (el diámetro o tamaño del halo aumentan cinéticamente con el tiempo).

40 Ventajosamente, cuando la fase dispersa consiste esencialmente en complejos de fitato y proteína, la fase dispersa se puede degradar bien por una proteasa o bien por una fitasa. El mismo medio que comprende un complejo de proteína y fitato (fase dispersa) en un líquido o gel (fase continua) se puede usar para un análisis de proteasa o fitasa. Esto evita la necesidad de dos análisis o sustratos de análisis separados, uno para los análisis de fitasa y uno para los análisis de proteasa. Ventajosamente se puede producir un kit que comprende un medio que es turbio debido a que comprende complejos de proteína y fitato y esto se puede utilizar para llevar a cabo un análisis para determinar la actividad proteasa o bien la actividad fitasa.

45 En una realización, la razón del ácido fítico con respecto a la proteína en el complejo (fase dispersa, por ejemplo un complejo o producto agregado de fitato-proteína) está en el intervalo de 1-100:1-100.

50 Para algunas realizaciones, la razón del ácido fítico con respecto a la proteína en el complejo (fase dispersa, por ejemplo un complejo o producto agregado de fitato-proteína) está en el intervalo de 1-100:1-90, 1-100:1-80, 1-100:1-70, 1-100:1-60, 1-100:1-50, 1-100:1-40, 1-100:1-30, 1-100:1-20, 1-100:1-10, 1-100:1-5, 1-100:1. Para tales realizaciones, los ejemplos de una razón preferida de ácido fítico con respecto a proteína en el complejo están en el intervalo de 1-100:1, 1-70:1, 1-60:1, 1-50:1, 1-40:1, 1-30:1, 1-20:1, 1-10:1, 1-5:1, 1:1. Para tales realizaciones, una

razón preferida de ácido fítico con respecto a proteína en el complejo es de aproximadamente 70:1, 60:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1 o 1:1. Para tales realizaciones, una razón preferida de ácido fítico con respecto a proteína en el complejo es de aproximadamente 60:1.

5 En algunas realizaciones preferidas, la razón del ácido fítico con respecto a la proteína en el complejo (fase dispersa, por ejemplo un complejo o producto agregado de fitato-proteína) está en el intervalo de 1-90:1-100, 1-80:1-100, 1-70:1-100, 1-60:1-100, 1-50:1-100, 1-40:1-100, 1-30:1-100, 1-20:1-100, 1-10:1-100, 1-5:1-100, 1:1-100. Para tales realizaciones, los ejemplos de una razón preferida de ácido fítico con respecto a proteína en el complejo están en el intervalo de 1:1-100, 1:1-70, 1:1-60, 1:1-50, 1:1-40, 1:1-30, 1:1-20, 1:1-10, 1:1-5, 1:1. Para tales realizaciones, una razón preferida de ácido fítico con respecto a proteína en el complejo es de aproximadamente 1:70, 1:60, 1:50, 10 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:5 o 1:1.

Los ejemplos de una razón preferida del ácido fítico con respecto a la proteína en el complejo (fase dispersa, por ejemplo un complejo o producto agregado de fitato-proteína) están en el intervalo de 1:6-1:100, preferiblemente 1:20-1:70, más preferiblemente de 1:45-1:55, más preferiblemente 1:50. En otra realización, la razón del ácido fítico con respecto a la proteína en el producto agregado o complejo es de 1:6-1:100, preferiblemente de 1:10-1:70, más preferiblemente 1:15-1:30, más preferiblemente 1:15.

15

En una realización la concentración de ácido fítico es de 0,1-0,3 mM. Esta es menor que la concentración utilizada en otros análisis que miden la liberación de fosfato inorgánico. También es al menos 10 veces menor que el fitato encontrado en muchos cereales, que a menudo comprenden 0,2% de ácido fítico. Ventajosamente una concentración de ácido fítico inferior hace que el tiempo de reacción más corto y conduce a que la reacción sea de primer orden. Se pueden calcular fácilmente y con precisión las razones estequiométricas a partir de una reacción de primer orden conocida. Se pueden ajustar las velocidades de reacción mediante el ajuste de la concentración de IP6. Así, en el caso de una dosis más alta de fitasa o proteasa, se puede añadir mayor concentración de IP6 de modo que las velocidades de reacción se ralenticen para la comodidad de medición o la observación.

20

Ventajosamente, se puede llevar a cabo un análisis para la actividad proteasa o la actividad fitasa de acuerdo con la presente invención poniendo en contacto la muestra sospechosa de comprender actividad proteasa o actividad fitasa con el medio que comprende la fase dispersa, adecuadamente un complejo de proteína-fitato. La muestra y el medio se pueden mezclar si el medio es un líquido o parte de la muestra se puede aplicar a la superficie del medio si el medio es un gel. Se puede observar el aclaramiento de la turbidez del medio líquido o una zona clara o halo en un medio de gel.

25

Ventajosamente no se requieren más reactivos, que no sean el medio y la muestra para analizar la actividad proteasa o la actividad fitasa. Esto evita la necesidad de reactivos tóxicos o reactivos que son perjudiciales para el medio ambiente. Debido a que no son necesarios reactivos tóxicos en el análisis de la presente invención, este se puede realizar en condiciones que están próximas a las condiciones fisiológicas *in vivo*. Esto hace que el análisis sea adecuado para su uso en la modificación de la proteína fitasa, en las fábricas de piensos y laboratorios de análisis industriales para estimar la actividad fitasa antes de su uso en aplicaciones alimentarias y de piensos. El método de la presente invención también proporciona un análisis de una etapa para determinar la actividad proteasa cuando la muestra se mezcla con el medio y se observa el resultado. No se requieren etapas de reacción adicionales para analizar la actividad proteasa o fitasa. Por ejemplo, no hay ningún requisito para analizar el ácido fítico liberado del complejo. El análisis de la presente invención es adaptable para su uso en una microplaca.

30
35

Ventajosamente, debido a uno o más de los atributos del método de análisis de la presente invención, por ejemplo, un tiempo de reacción corto, un pequeño número de reactivos y una reacción de una sola etapa, la presente invención es adecuada para el escrutinio de alto rendimiento de actividad proteasa y/o fitasa.

40

En una realización en la que el medio es un gel, por ejemplo gel de agarosa en una placa de Petri, la fitasa o la proteasa formarán un halo claro sobre una placa de agarosa opaca que contiene el complejo de ácido fítico-proteína. El aumento en el tamaño del halo con el tiempo y la dosis de fitasa o proteasa se pueden observar a simple vista o se pueden medir mediante el uso de un robot de análisis de imágenes asistido por una cámara. Se puede añadir opcionalmente un reactivo de color a la placa para hacer más fácil de ver la zona clara. Si se añade un reactivo de color el método es un método de punto final ya que el reactivo de color por lo general detendrá la reacción de la fitasa o la proteasa.

45

El método de la presente invención se lleva a cabo preferiblemente en un intervalo de pH entre 2,5 y 8,5. En una realización, el intervalo de pH es un pH de 3 a 3,5. Este intervalo de pH es ventajoso porque, en este intervalo de pH, la fitasa es activa mientras que el sustrato es más estable y el análisis resulta menos afectado por las altas concentraciones de sustancias que interfieren, tales como diversas sales. En una realización, el pH del medio se puede ajustar al pH óptimo para la actividad fitasa o proteasa que se está sometiendo a ensayo.

50

En otro aspecto, la presente invención utiliza un kit para la detección de la actividad proteasa o fitasa utilizando el método de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores.

55

En una realización, el kit puede comprender una fase continua en forma de un gel y una fase dispersa. En esta realización, el kit puede comprender además un recipiente adecuado, por ejemplo una placa de Petri, para contener

el gel. El gel puede ser suministrado con pocillos o agujeros donde se pueden añadir las muestras que se van a someter a ensayo. El kit puede comprender uno o más controles o patrones. Estos se pueden suministrar en forma líquida, en forma seca o preservada o se pueden añadir previamente al gel.

5 En otra realización, el kit puede comprender una fase dispersa en forma de un líquido, y una fase continua. El kit puede comprender además una serie de tubos de reacción o una microplaca. En otra realización, el kit puede comprender una fase dispersa seca, o preservada, por ejemplo, secada por congelación o depositada en el interior de un tubo de reacción. En esta realización, el kit puede comprender también la fase continua en forma de líquido o de componente secado o preservado, por ejemplo, un polvo que puede formar la fase continua cuando se añade agua. La fase continua se puede depositar en el interior de un tubo de reacción. El kit también puede comprender 10 uno o más controles o patrones. Los controles o patrones pueden estar en forma líquida, en polvo o preservada.

Los kits de la presente invención pueden comprender además diagramas de color o patrones de turbidez para la comparación con las muestras.

Preferiblemente, el método, el uso o el kit de la presente invención son un método, un uso o un kit *in vitro*.

#### Definiciones

15 La actividad enzimática se define como la capacidad de una enzima para catalizar una reacción. Esto se relaciona con la cantidad de enzima activa en una muestra. Cualquier enzima que se encuentre en la muestra, pero esté inactiva no se mide por una medida de la actividad enzimática. Esto tiene la ventaja de que sólo la enzima activa se toma en cuenta y las enzimas inactivas, por ejemplo las enzimas desnaturalizadas o mal plegadas y aquellas unidas a inhibidores no se incluyen en la medida de la actividad enzimática. En una realización, la actividad de la enzima 20 puede ser una actividad de hidrólisis.

El medio es el sustrato en el que la reacción tiene lugar. El medio puede estar compuesto por una mezcla de sustancias y puede comprender dos sustancias en diferentes fases, por ejemplo un gel y un sólido o un líquido y un sólido.

25 En una realización, la fase continua puede ser un líquido, por ejemplo, agua o un tampón. En otra realización, esta puede ser un gel, por ejemplo un gel de agarosa o un gel de poliacrilamida o cualquier gel formado por una sustancia polimérica.

La fase dispersa puede consistir en partículas de un sólido o un gel dispersas en la fase continua. Las partículas pueden ser discretas entre sí. Cada partícula de la fase dispersa puede estar formada por dos o más componentes mantenidos juntos por una interacción intermolecular. La fase dispersa puede ser un complejo que comprende dos o 30 más componentes.

Una interacción entre dos o más partículas o moléculas puede ser, por ejemplo, una interacción electrostática o hidrófoba. En una realización, el medio comprende una fase dispersa en donde cada partícula de la fase dispersa se compone de al menos una molécula de proteína y al menos una molécula de fitato o sus productos de degradación. El fitato puede ser un éster fosfato de *mio*-inositol, por ejemplo, hexakisfosfato de *mio*-inositol (IP6) y sus productos 35 de degradación pentakis-, tetrakis-, tris-, bis-, y monofosfato de *mio*-inositol (IP5, IP4, IP3, IP2 e IP1). La proteína y el fitato y sus productos de degradación pueden estar unidos por una interacción electrostática en donde las una o más proteínas tienen uno o varios grupos de carga positiva, preferiblemente el medio está a un pH por debajo del punto isoeléctrico (pI) de la proteína y la proteína está cargada positivamente. La proteína puede formar una interacción electrostática con el ácido fítico cargado negativamente.

40 La muestra puede ser cualquier sustancia que se sospecha que comprende una actividad enzimática, por ejemplo, una actividad proteasa o una actividad fitasa. La muestra puede ser, por ejemplo, un alimento, un pienso, un ingrediente de pienso, un componente de un alimento, un componente de un alimento, una preparación de enzima, un caldo de fermentación o un medio de cultivo celular que contiene la enzima que se va a someter a ensayo.

45 La muestra puede ser un extracto de uno cualquiera o más de los ejemplos anteriores que puede ser extraída en agua o en otro disolvente, por ejemplo un tampón o un disolvente orgánico. El disolvente puede ser compatible con la fase continua utilizada en el mismo análisis, por ejemplo los disolventes deben ser miscibles y no sufrir reacciones entre sí que afecten adversamente al análisis. En una realización, el disolvente puede ser el mismo que se utiliza en la fase continua del mismo análisis.

50 La fase dispersa puede ser afectada por la hidrólisis de uno de los componentes de la fase dispersa. Por ejemplo, la hidrólisis de una proteína que forma parte de la fase dispersa o la hidrólisis de un grupo fosfato del fitato y sus productos de degradación que forman parte de la fase dispersa. En una realización la hidrólisis es de un grupo fosfato de hexakisfosfato de *mio*-inositol (IP6) para formar pentaquifosfato de *mio*-inositol (IP5).

55 La propiedad detectable del medio puede ser una propiedad óptica, por ejemplo, densidad óptica, turbidez o fluorescencia. La propiedad óptica puede ser detectada a simple vista o mediante el uso de un dispositivo óptico tal como un espectrofotómetro, turbidímetro, espectrofotómetro, fluorímetro.

El cambio detectable puede ser una reducción de la cantidad de turbidez, un cambio en la absorbancia de luz o un cambio en la propiedad de fluorescencia o fosforescencia del medio.

5 Un control negativo puede ser una parte del medio al que no se añade la muestra o a la que se añade una muestra de control, que se sabe que no comprende la actividad de la enzima, o donde la muestra que contiene la enzima o las enzimas se ha desactivado, por ejemplo, por medio de calentamiento o mediante la adición de un inhibidor de la enzima o un agente desnaturizante al medio o al gel. En una realización, el medio está en forma de un gel en una placa de Petri. La muestra se añade a una sección del gel y no se añade muestra o se añade una muestra de control a otra sección del gel. La sección del gel donde no se añade ninguna muestra o se añade una muestra de control puede ser comparada con la sección del gel donde se ha añadido la muestra para evaluar la diferencia de la turbidez. En un análisis líquido el medio líquido con la muestra añadida puede ser comparado con un medio líquido en el que no se ha añadido muestra o se ha añadido una muestra de control.

15 Un control positivo puede ser una parte del medio o una muestra que contiene una cantidad conocida de actividad enzimática. En una realización, se puede elaborar un control positivo mediante la inactivación de las enzimas en una porción de la muestra que se va a someter a ensayo, por ejemplo por medio de calentamiento, y después añadiendo una cantidad conocida de actividad enzimática. Esto tiene en cuenta los componentes de la muestra que pueden afectar a la velocidad de reacción, por ejemplo, la posible presencia de inhibidores, el tipo de pienso y el tipo de matriz de pienso en la muestra. En un análisis en placa de Petri con el medio en forma de gel, la muestra de control positivo puede añadir gota a gota sobre el medio y formará una zona clara en el medio turbio. El tamaño de la zona clara causada por la muestra de control puede ser comparado con el tamaño de la zona clara provocada por la muestra que se va a someter a ensayo.

20 Con respecto a los controles positivos, se pueden elaborar patrones de fitasa con cantidades conocidas de unidades de fitasa NaCl al 10% a un pH 2,5 a 7,5, preferiblemente a un pH de 4,5 o un pH de 5,5 en glicina-HCl 0,2 M, tampón de acetato, Mops-NaOH 0,1 M o en soluciones que contienen alcohol de azúcar, tal como sorbitol. Los patrones de fitasa pueden estar, alternativamente, en forma sólida, tal como en una forma recubierta, adsorbida en diversos portadores, tales como subproductos de cereales o depositados en el interior de un tubo de reacción.

25 Una placa de control negativo puede ser la misma que la placa de toma de muestra, excepto que, además, tiene fluoruro de sodio (5-50 mM), que será capaz de inhibir la actividad fitasa por completo. Esto significa que no se formarán halos (zonas claras) en esta placa debido a la actividad fitasa. Si se forma un halo, esto se debe muy probablemente sustancias que interfieren.

30 La propiedad detectable del medio puede ser comparada con muestras patrón con actividad fitasa conocida. Los patrones se pueden utilizar para construir una curva patrón o curva de calibración con la que se puede comparar la propiedad detectable del medio. El kit de la presente invención puede incluir uno o más patrones o curvas patrón o curvas de calibración. La curva de calibración puede tener un límite inferior de 300 UFT (unidades de actividad fitasa)/kg.

35 La sensibilidad de un análisis de fitasa realizado en una placa de Petri con agarosa o una microplaca se puede modular de acuerdo con la dosis de fitasa, se puede ajustar la velocidad de reacción o el tamaño del halo ajustando la concentración de IP6. De 0,1 mM a 0,2, 0,3, etc. Cuanto mayor sea la concentración de IP6 (fitato) más baja será la sensibilidad. En una realización la concentración de ácido fítico preferida es de 0,1 mM.

40 La razón óptima en ml/mg (peso) entre las proteínas (beta-caseína, proteínas de soja) y la lisozima es de 10-12, por lo que la razón entre la proteína y el fitato debe ser de 1000 a 0,01.

45 En una realización, para los análisis de actividad fitasa, se pueden añadir inhibidores de la proteasa al extracto de pienso o a la muestra que se va a someter a ensayo para evitar que la actividad proteasa afecte a los resultados del análisis. En otra realización las proteasas actúan sobre la fase dispersa significativamente más despacio que las fitasas, por lo tanto, el análisis se puede incubar durante un tiempo corto para evitar que la actividad proteasa afecte a los resultados.

En otra realización, para los análisis de proteasa, se pueden añadir inhibidores de fitasa al extracto de pienso o a la muestra que se va a analizar. En otra realización, para los ensayos de proteasa, la fase dispersa puede ser un complejo de proteína con un sulfato de inositol, por ejemplo hexasulfato de *mio*-inositol (MIHS). Esto puede evitar que la actividad fitasa afecte a los resultados del análisis de proteasa.

50 Según se utiliza en la presente memoria, el término "alimento" se emplea en un sentido amplio y abarca alimentos y productos alimentarios para seres humanos así como alimentos para animales (es decir, pienso). El término "pienso" se utiliza en referencia a los productos que se administran como alimento para los animales en la cría de ganado. En un aspecto preferido, el alimento o el pienso son de origen vegetal, por ejemplo a base de cereales. En una realización, el pienso es un pienso animal a base de soja/trigo o de soja/maíz.

55 El alimento o pienso puede ser en forma de una solución o en forma de un sólido dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

5 Según se utiliza en la presente memoria, el término "ingrediente alimentario o ingrediente de pienso" incluye una formulación, que está o se puede añadir a los alimentos o piensos e incluye formulaciones que se pueden utilizar a niveles bajos en una amplia variedad de productos. En una realización, el alimento o ingrediente de pienso puede comprender o consistir en un grano, tal como maíz o trigo, soja y/o un micro-organismo. Los ejemplos de ingredientes de pienso que comprenden productos de plantas que contienen fitato incluyen harina de maíz, harina de soja, harina de colza, harina de semilla de algodón, maíz, trigo, cebada y/o sorgo.

El ingrediente alimentario o ingrediente de pienso puede estar en la forma de una solución o en forma de un sólido - en función de la utilización y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

10 Las sustancias, por ejemplo sales, que pueden interferir en la interacción entre la proteína y el fitato o interferir en la actividad fitasa o proteasa pueden ser retiradas de extracto de la muestra mediante diversas técnicas de separación, por ejemplo, filtración en gel, intercambio iónico o utilización de una membrana de desalación.

Ventajas

Ya se han presentado algunas ventajas. A continuación se describen otras ventajas.

15 La presente invención proporciona un análisis de actividad fitasa o un análisis de actividad proteasa que se pueden llevar a cabo sin detener la reacción enzimática. El análisis también se puede realizar utilizando proteínas naturales.

Ventajosamente, los análisis para la actividad enzimática con los métodos, usos o usos de los kits de la presente invención pueden ser seguidos en tiempo real. El método no se basa en el análisis de los productos finales de la reacción y por lo tanto se pueden llevar a cabo estudios cinéticos.

20 Ventajosamente, los análisis para la actividad enzimática con los métodos, usos o usos de los kits de la presente invención se pueden llevar a cabo cuantitativamente, semi-cuantitativamente o cualitativamente.

25 Ventajosamente, los análisis de la actividad enzimática con los métodos, usos o usos de los kits de la presente invención se puede realizar rápidamente. En la presente invención la primera etapa de hidrólisis se puede medir, p.ej. hidrólisis de IP6 a IP5. Esto hace mas rápido el análisis porque no hay ningún requisito para que la reacción se complete con el fin de medir la actividad enzimática. El análisis de la presente invención puede medir la velocidad de reacción en lugar de los productos de una reacción completada. En la presente invención se puede obtener una indicación de actividad de la enzima a partir de la velocidad de reacción inicial. Esto hace que los análisis de actividad de la presente invención sean más rápidos debido a que se puede obtener una indicación de la actividad de la enzima a partir de la velocidad inicial de la hidrólisis. Los métodos de la técnica anterior son más lento debido a que la reacción tiene que completarse de manera que se puedan medir los productos de la reacción para proporcionar una indicación de la actividad enzimática.

30 Ventajosamente, la presente invención proporciona métodos para el análisis cinético de la actividad enzimática.

35 Ventajosamente, los análisis de la actividad enzimática con los métodos, usos o usos de los kits de la presente invención pueden ser seguidos a simple vista. En particular, se puede realizar un análisis cualitativo o semicuantitativo sobre placas de agar mediante la observación de los cambios en la turbidez a simple vista. Esto hace que el análisis sea simple de realizar.

Ventajosamente, los análisis de la actividad enzimática con los métodos, usos o usos de los kits de la presente invención se pueden realizar sobre polipéptidos de origen natural *in vitro*.

Ventajosamente, los análisis de la actividad enzimática con los métodos, usos o usos de los kits de la presente invención se pueden realizar utilizando reactivos no tóxicos.

40 Ventajosamente, los análisis de la actividad enzimática con los métodos, usos o usos de los kits de la presente invención se pueden realizar sobre extractos de piensos, alimentos o caldo de fermentación, por ejemplo extractos de pienso con una base acuosa, sin etapas de purificación adicionales.

45 Ventajosamente, los análisis de la actividad enzimática con los métodos, usos o usos de los kits de la presente invención se pueden realizar sobre muestras biológicas, por ejemplo extractos de pienso, sin que el fondo del análisis se complique por los productos químicos, tales como el fosfato inorgánico, que existen naturalmente en las muestras biológicas.

50 Ventajosamente, los análisis de la actividad enzimática con los métodos, usos o usos de los kits de la presente invención son altamente específicos, ya que miden directamente la reacción catalizada por la enzima en lugar de cuantificar la proteína la cantidad de proteína enzimática presente, que puede estar en forma tanto activa como inactiva, como en el caso del método basado en anticuerpos, por ejemplo se pueden realizar ImmunoStrip y ELISA sobre muestras biológicas, por ejemplo extractos de pienso, sin que el fondo del análisis se complique con por os productos químicos, tales como el fosfato inorgánico, que existen de naturalmente en las muestras biológicas.

Ventajosamente, los análisis de la actividad enzimática con los métodos, usos o usos de los kits de la presente

invención se pueden realizar sin el uso de anticuerpos.

5 En particular en fitato de pH ácido interacciona con las proteínas de la dieta conduciendo a la formación de productos agregados y precipitados de fitato y proteína que tienen una menor accesibilidad a las proteasas y pueden dar como resultado una digestión ineficaz de las proteínas. Ventajosamente, los análisis de la actividad enzimática con los métodos, usos o usos de los kits de la presente invención se pueden utilizar para estudiar la influencia del ácido fítico sobre la digestión de proteínas por las proteasas. En una realización de la presente invención, el sustrato sobre el que actúa la proteasa es una fase dispersa que comprende un complejo de proteínas con ácido fítico.

Ventajosamente, los análisis de la actividad enzimática con los métodos, usos o usos de los kits de la presente invención se pueden utilizar para analizar específicamente la actividad fitasa y distinguirla de la actividad fosfatasa.

10 Ventajosamente, los análisis de la actividad fitasa con los métodos, usos o usos de los kits de la presente invención se puede realizar muy rápidamente debido a que la hidrólisis de un solo grupo fosfato, por ejemplo la hidrólisis de IP6 a IP6, proporciona una propiedad detectable que se correlaciona con la actividad fitasa. No es necesario eliminar todos los grupos fosfato para proporcionar inositol con el fin de realizar el análisis.

15 Ventajosamente se puede obtener una indicación de la actividad de la enzima por la velocidad de reacción inicial, por lo tanto, no es necesario que todo el sustrato, por ejemplo IP6, sea hidrolizado con el fin de proporcionar una indicación de la actividad enzimática.

La presente invención se describirá a continuación a modo de ejemplo solamente.

### Ejemplos

20 **Abreviaturas:** UFT, unidad de actividad fitasa; IP<sub>6</sub>, ácido fítico, fitato de sodio; IP<sub>x</sub>, ésteres fosfato de *mio*-inositol, donde x denota el número de enlaces de éster fosfato; P<sub>i</sub>, fosfato inorgánico.

#### Sección Ejemplos - Parte A

##### 1. Preparación de las soluciones

1.1. Soluciones de ácido fítico (hexakisfosfato de *mio*-inositol (IP6)), pentakis-, tetrakis-, tris-, bis- y monofosfato de *mio*-inositol, 10 mM preparadas en agua.

25 1.2. Solución de sulfatos de inositol (hexasulfato de *mio*-inositol (MIHS)), 10 mM preparada en agua.

1.3. Solución de glicina-HCl 0,25 M (BG, Tampón G) con pH de 1,5 a 4,0.

1.4. Se prepararon solución de beta-caseína y solución de proteína de soja en BG a una concentración de 2 mg/ml. La solución de lisozima se preparó en glicina HCl 0,1 M (pH 3,0) a 2,5-43 mg/ml.

1.5. Phyzyme XP<sup>®</sup>, una variante de fitasa de *E. coli*.

30 1.6. Proteasa P-3000, una variante de subtilisina, una proteasa de *Bacillus subtilis*.

1.7. Extracto enzimático de pienso: se mezclaron 5 g de pienso con 45 ml de agua y se filtraron después a través de papel de filtro o un filtro de fibra de vidrio, que es mucho más rápido que el papel de filtro. El producto filtrado obtenido se utilizó como extracto de enzima (también referido como "producto filtrado" en estos ejemplos). Alternativamente, se mezclaron 12,5 g de pienso con 37,5 ml de agua. Después de reposar durante un par de minutos, el sobrenadante obtenido se aplicó directamente a los pocillos de las placas de Petri sin filtrado. En general, la razón de agua de pienso puede ser de 1:1 a 1:20. La separación del sobrenadante de las suspensiones de pienso se puede lograr por gravedad o por centrifugación a 4.000 rpm durante 20 min.

Los cócteles inhibidores de proteasa fueron de Roche (www.Roche.com), y contenían inhibidores para las 4 clases principales de proteasas (serina proteasa, cisteína proteasa, metaloproteasas, y ácido aspártico proteasa).

40 Todos los otros productos químicos se obtuvieron de Sigma Fine Chemicals; incluyendo todas las enzimas incluyendo la fitasa Phyzyme XP<sup>®</sup> y Protease P-3000<sup>®</sup> son productos comerciales de Danisco A/S (Brabrand, Dinamarca).

##### 2. Aparatos y utensilios de laboratorio

45 El espectrofotómetro de barrido para microplacas SpectraMax M5 se obtuvo de Molecular Devices Corp. (Sunnyvale, Estados Unidos). Se obtuvieron microplacas de diferentes formatos de Nunc AIS (www.nunc.com) y Corning (www.corning.com).

3. Sistemas de análisis.

3.1. El método del tubo de ensayo/cubeta:

A un tubo transparente o una cubeta se añadieron:

20 µl de IP6 10 mM (llamado Tubo de ensayo) o MIHS 15 µl (llamado Tubo de control);

5 1 ml de solución de enzima (p. ej., producto filtrado de extracto de enzima de pienso);

1 ml de glicina-HCl 0,25 M de manera que el pH final de la mezcla fuera un pH de alrededor de 3,0.

Después de mezclar, se leyó la DO a 600 nm utilizando un espectrofotómetro o un turbidímetro, o se observó a simple vista.

10 La presencia de fitasa en la solución de enzima provoca una disminución de la turbidez en presencia de IP6, pero no en presencia de MIHS, que puede actuar como un control negativo. La presencia de la proteasa tendrá el mismo efecto que la fitasa no sólo en presencia de IP6 sino también en presencia de MIHS.

15 Los ensayos análisis de la actividad fitasa también se pueden realizar en presencia de mezclas de inhibidores de proteasa (por ejemplo cóctel inhibidor de proteasa de Roche), EDTA a 10 mM, Tween 20 al 0,02% (p/v), pectina al 0,01-0,5% (p/v) y antimicrobianos tales como ácido benzoico a alrededor de 0,05-0,5% (p/v). No se encontró que ninguno de fuera inhibidor de la formación de complejo de IP6 o MIHS con proteína de soja y fitasa. Los análisis de proteasa se realizaron en ausencia de inhibidores de proteasa específicos para la proteasa analizada.

20 Los Tubos de ensayo y los Tubos de control que contenían IP6, MIHS, proteína de soja y uno o más de los aditivos mencionados anteriormente fueron alternativamente liofilizados. Cuando se pusieron en uso, se añadió el producto filtrado de extracto de pienso directamente a estos tubos que contenían el material seco y se mezcló para disolver el material. Después de la incubación, se observó la claridad de los Tubos de ensayo y los Tubos de control.

3.2. El método de microplacas:

A una microplaca con formato de 96 pocillos se le añadieron:

2 µl de IP6 10 mM o 1,5 µl de MIHS 10 mM;

0,1 ml de solución de enzima (p. ej., producto filtrado de extracto de enzima de pienso);

25 0,1ml glicina-HCl 0,25 M que contenía proteína de soja, beta-caseína o lisozima

30 de manera que el pH final de la mezcla fuera un pH de alrededor de 3,0. Después de mezclar, se leyó la DO a 600 nm espectrofotométricamente cada 1-5 min durante 10 min a 16 horas. La presencia de fitasa en la solución de enzima provocó una disminución de la absorbancia en presencia de IP6, pero no en presencia de MIHS, que actuaba como control. La presencia de la proteasa tuvo el mismo efecto que la fitasa no sólo en presencia de IP6 sino también en presencia de MIHS.

3.3. El método de la placa de Petri

35 Se elaboró una solución de proteína de soja a 2 mg/ml en glicina-HCl 0,1 M (pH 3,0) que contenía agarosa al 1,5% (p/v) y se calentó en un baño de agua para fundir la agarosa. A 1 ml de esta solución de proteína de soja con agarosa se le añadieron 10-40 µl de IP6 10 mM o 10 µl de MIHS, se mezclaron y se vertieron en placas de Petri de manera que cada placa de Petri de 9 centímetros de diámetro contenía alrededor de 9 ml que tenían una concentración de IP6 de 0,1-0,4 mM. La placa de gel de agarosa que tenía MIHS podía funcionar como un control negativo para el análisis de la actividad fitasa. Como alternativa, una placa de gel de agarosa con NaF 10 mM, que inhibía la fitasa se podía utilizar como un control negativo. Tanto MIHS como NaF son inhibidores reversibles de la fitasa. Si se desarrollaba un halo claro en poco tiempo en las placas de control negativo, este podía estar causado por sustancias que interfieren, tales como iones de carga positiva altamente solubles, por ejemplo  $Ca^{2+}$ , que compiten con las proteínas con carga positiva que se unen al ácido fítico de carga negativa conduciendo a la formación de halos claros.

45 Después de la gelificación mediante la colocación de la placa de Petri a temperatura ambiente (preferiblemente por debajo de 30°C), se hicieron agujeros (pocillos) en los geles de modo que cada agujero pudiera contener 20 µl de líquido. A cada uno de los agujeros se le añadieron 20 µl de extracto de pienso con o sin filtración. Para los controles negativos, se añadieron 20 µl de tampón de extracción o agua al agujero en lugar de solución de enzima. Para los controles positivos y con fines de cuantificación se añadió al agujero una cantidad conocida de fitasa o proteasa disuelta en el extracto de pienso en vez de extracto de pienso.

50 Las placas de agarosa en placa de Petri se incubaron a 5-35°C y se observó el aspecto y el tamaño de los halos a simple vista, se midió el diámetro con una regla o utilizando un sistema de formación de imágenes digital. Se podían

utilizar agar y otros polímeros formadores de gel en lugar de agarosa. Las placas de Petri pueden ser sustituidas por cualquier recipiente que tenga diferentes dimensiones e incluso pueden ser placas (20x20 cm por ejemplo).

5 La proteína de soja también se puede reemplazar por otra proteína, siempre que la proteína forme una interacción intermolecular con el componente polivalente para formar una fase dispersa que proporcione una propiedad detectable, tal como la turbidez, al medio o al gel.

En condiciones en las que la proteína está cargada positivamente, se puede sustituir IP6 por cualquier otro componente polivalente con carga negativa como MIHS. En los análisis para la detección de proteasa el IP6 puede ser sustituido por otros componentes polivalentes cargados negativamente tales como polilisina y oligómeros y polímeros de quitina y quitosano o cualquier proteína que tenga carga negativa en las condiciones de análisis.

10 4. Análisis de la fitasa en las muestras de pienso por métodos convencionales

15 Esto se llevó a cabo básicamente como describen esencialmente Engelen AJ, van der Heeft FC, Randsdorp PH, Smit EL. Se extrajeron 5 g de pienso con 50 ml de tampón ácido acético-acetato de Na 0,25 M (pH 5,5) que contenía, dihidrato de cloruro de calcio 0,0147% (p/v) y Tween 20 al 0,01%. Se mezclaron 0,25 ml de producto filtrado después de la filtración del extracto con 0,75 ml de tampón de extracción, y después se mezclaron con 2 ml de solución de sustrato de ácido fítico (250 ml de tampón de extracción que contenía 2,1 g de decahidrato de fitato de sodio). La mezcla se incubó a 37°C y se analizó para determinar la liberación de fosfato inorgánico por un método de análisis de fosfato tradicional utilizando los reactivos tóxicos molibdato-vanadato desarrolladas en los años 1920 y 1940 (por ejemplo por Fiske (1925) y Lowry (1946)). Una unidad de fitasa (UFT) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 micromol de fosfato inorgánico a partir de fitato de sodio 5,1 mM a 37°C.

20 5. Elaboración de patrones de fitasa para la fabricación de las curvas de calibración y para ser utilizados como controles positivos

Los patrones de fitasa se elaboraron mediante la dilución de la solución de partida de Phyzyme XP® de 7150 UFT/ml a 1 UFT/microlitro con agua. Se añadieron 0-26 microlitros a cada tubo (Tabla 1) y los tubos se colocaron en tubos Falcon de 50 ml en la campana extractora para secarlos al aire.

25 Tabla 1

Núm. de muestra o tubo.	UFT/kg	13 g pienso tienen UFT	Phyzyme XP® (1 UFT/microlitro) añadida al tubo
1	0	0	0
2	100	1,3	1,3
3	<b>200</b>	<b>2,6</b>	<b>2,6</b>
4	300	3,9	3,9
5	400	5,2	5,2
6	<b>500</b>	<b>6,5</b>	<b>6,5</b>
7	700	9,1	9,1
8	<b>1000</b>	<b>13</b>	<b>13</b>
9	1500	19,5	19,5
10	2000	26	26

30 Se añadieron 2-20 µl de solución de partida de Phyzyme XP® a un tubo Falcon de 50 ml y se sometieron a secado a temperatura ambiente, como se muestra en la tabla 1 anterior de manera que los tubos contenían fitasa en el intervalo de 0-26 UFT/kg. Se añadieron 13 g de un material de pienso diferente que no contenía fitasa o que contenía fitasa en una cantidad de menos de 50 UFT/kg a cada tubo que contenía Phyzyme XP® seco a 0-26 UFT. Se añadió agua para llevar el volumen a 50 ml y el pienso y el agua se mezclaron. Se colocaron muestras de 0.02 ml de cada tubo en los pocillos de una placa de Petri que contenía gel de agarosa que contenía IP6 0,1 mM y proteína de soja de 2 mg/ml. El análisis de la placa de Petri se desarrolló a 22°C durante 7 h, a continuación, se midió el diámetro o la zona de halo. Se trazó una curva de UFT/kg, frente a diámetro del halo o la zona del halo.

35 Alternativamente se pueden añadir 50 ml de agua a los tubos de 50 ml que contienen 1,3-26 UFT y mezclar. Se puede añadir una muestra de 20 microlitros a la placa de Petri que contiene gel de agarosa que contiene IP6 0,1 mM y proteína de soja de 2 mg/ml. Las soluciones de fitasa patrón deben ser capaces de causar halos claros en el plazo de 16 h. Si no se forma un halo claro en este tiempo el material de pienso o el agua utilizada pueden contener uno o varios inhibidores de fitasa.

## Resultados

1. Agregación de lisozima de proteína de soja,  $\beta$ -caseína bovina y clara de huevo de gallina como una función de la concentración de ácido fítico

5 En la Figura 1a se puede observar que, con el aumento de la concentración de ácido fítico en presencia de proteína de soja o  $\beta$ -caseína bovina, la turbidez medida a una DO de 600 nm aumentó linealmente al principio y luego se estabilizó. La mezcla de reacción consistió en ácido fítico (1 mg/ml) 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 o 20  $\mu$ l, de  $\beta$ -caseína o proteína de soja 100  $\mu$ l en glicina-HCl 0,25 M pH 2,5 (Tampón G), y tampón G a un volumen final de 120  $\mu$ l. La concentración de proteína final fue de 1,5 mg/ml. La mezcla se mezcló y se midió la DO a 600 nm inmediatamente.

10 En la Figura 1b, se puede observar que la lisozima y el ácido fítico pueden formar un complejo con turbidez razonable como se indica por la absorbancia a 600 nm desde pH 2,73 a pH 6,95 sometido a ensayo en 40 mM de diferentes tampones de glicina-HCl, acetato, Mes-NaOH a temperaturas entre 21 y 37°C. Esto indica que el complejo de lisozima (2,5 mg/ml) y ácido fítico (0,3 mM) se puede utilizar como sustrato para el análisis de la actividad fitasa o proteasa en un intervalo de pH de al menos pH 2,73 a pH 6,95 siguiendo la disminución de absorbancia a 600 nm como consecuencia de la reacción enzimática.

15 En la Figura 2 se puede observar que la turbidez del complejo de ácido fítico y proteína de soja y el complejo de MIHS y proteína de soja aumentaba con el pH. El sistema de ácido fítico y proteína de soja es aparentemente más sensible al pH a un pH superior a pH 2,5. La concentración final de ion poli-negativo (ácido fítico o MIHS) fue de 0,2 mM, la concentración de proteína de soja fue de 1,5 mg/ml. La turbidez del complejo de ácido fítico y proteína de soja aumentó linealmente a pH 3,8 y luego se estabilizó (datos no mostrados).

2. Relaciones entre el grado de fosforilación del inositol y su capacidad para agregar proteínas

25 Se observó que la hidrólisis de un único residuo de fosfato del ácido fítico disminuyó drásticamente su capacidad para formar un complejo con las proteínas como la proteína de soja (que es una mezcla de diferentes proteínas) y la  $\beta$ -caseína bovina. El *mio*-inositol con 4 o menos de 4 grupos fosfato tiene poca o ninguna capacidad de formar agregados con estas dos proteínas.

2.1. Formación de complejos de proteína de soja con ácido fítico y sus productos de degradación

30 Se sometieron a ensayo los efectos de diferentes ésteres fosfato de inositol e isómeros posicionales de IP5 sobre la agregación de proteína de soja. La mezcla de reacción consistió en 5  $\mu$ l de éster fosfato (30 nmoles/10  $\mu$ l), 15  $\mu$ l de Tampón G y 100  $\mu$ l de proteína de soja en Tampón G. La concentración final de IP1-IP6 fue de 125  $\mu$ M, la concentración final de  $\beta$ -caseína fue de 1,5 mg/ml. La turbidez como una medida del grado de agregación se controló a 600 nm. La concentración final de los ésteres de inositol fue de 125  $\mu$ M para IP1-IP6 y una concentración final de proteína de soja de 1,45 mg/ml. Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 3.

2.2 Formación de de complejos  $\beta$ -caseína con ácido fítico y sus productos de degradación

35 Se sometieron a ensayo los efectos de diferentes ésteres fosfato de inositol e isómeros posicionales de IP5 sobre la agregación de  $\beta$ -caseína bovina. La mezcla de reacción consistió en 5  $\mu$ l de ésteres fosfato (30 nmoles/10  $\mu$ l), 15  $\mu$ l de Tampón G y 100  $\mu$ l de  $\beta$ -caseína en Tampón G. La concentración final de IP1-IP6 fue de 125  $\mu$ M, la concentración final de  $\beta$ -caseína fue de 1,5 mg/ml. La turbidez como una medida del grado de agregación se controló a 600 nm. Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 4.

2.3 Adición de fitasa

40 En la Figura 5 se puede observar que la adición de la enzima fitasa (Phyzyme XP<sup>®</sup>) aclaraba el complejo de ácido fítico y proteína de soja turbio. Las condiciones de reacción fueron las mismas que en el apartado 2.1 anterior, excepto que la temperatura se fijó a 37°C en lugar de a 25°C. El tiempo necesario para que la solución del complejo de IP6 y proteína de soja se aclarara completamente utilizando diferentes concentraciones de fitasa añadida fue: 5 min para 1 U/ml, 12 min para 250 mU/ml, 20 min para 125 mU/ml, 40 min para 50 mU/ml, 1,6 h para 12,5 mU/ml, y 2 h para 6,25 mU/ml (1 U = 1 unidad de fitasa o 1 UFT, 1 U = 1000 mU).

3. Métodos desarrollados para el análisis de fitasa y proteasa utilizando complejo de proteína de soja con ácido fítico como sustrato

3.1. El método del tubo de ensayo/cubeta

50 La Figura 6 muestra el kit de análisis de la actividad fitasa o proteasa basado en tubo de ensayo (arriba, panel derecho), que se puede complementar con un aparato de sacudimiento (Abajo, panel izquierdo) y un turbidímetro con cubetas de forma redonda con un volumen que varía de 1 a 25 ml (abajo panel derecho). El panel superior izquierdo de la Figura 6 muestra tubos que contienen ensayos que han sido incubados durante la noche de producto filtrado de extracto de pienso con ácido fítico y proteína de soja. Desde la izquierda los tubos de la Figura 6 contienen: extracto de pienso que tiene 0 (control), 186, 442, 1129, 2301 y 210, 368 UFT/kg.

Procedimiento para el método del tubo de ensayo/cubeta de análisis rápido de la actividad fitasa

- 5 1) Añadir aproximadamente 45 ml de agua (puede ser agua del grifo, agua embotellada potable) a los tubos de pienso de 50 ml que contienen 5 g de pienso de manera que el volumen final sea de aproximadamente 50 ml o 90 ml de agua al recipiente de 100 ml que contiene 10 g de pienso, 180 ml de agua al recipiente que contiene 20 g de pienso.
- 2) Agitar los tubos/recipientes de modo que la pella de pienso o el pienso machacado se disuelvan (aproximadamente 5-10 minutos). Dejar que los tubos reposen durante un par de minutos para que el sobrenadante se separe de la masa de pienso.
- 10 3) Verter el sobrenadante en el embudo para que pueda ser filtrado mediante papel de filtro o un filtro de fibra de vidrio. Recoger unos 3 ml de producto filtrado.
- 4) Transferir 1 ml de producto filtrado utilizando una pipeta Pasteur graduada desechable al tubo marcado con "Control", que puede contener o bien 1 ml de líquido que contiene MIHS y proteína de soja o MIHS seco y material de proteína de soja, sacudir los tubos para mezclar las dos soluciones o disolver el material sólido en el tubo.
- 15 5) Transferir 1 ml de producto filtrado utilizando la pipeta Pasteur graduada a los tubos marcados como "Ensayo", los cuales pueden contener o bien 1 ml de líquido que contiene IP6 y proteína de soja o bien IP6 seco y el material de proteína de soja. Sacudir estos tubos.
- 6) Observación. Para el pienso basada en maíz/soja, la diferencia de turbidez entre el tubo de control y el tubo de ensayo que contiene extracto de alimentación puede ser visto en aproximadamente:
  - 5 minutos con nivel de dosis de fitasa por encima de 2000 UFT/kg de pienso;
  - 20 30 minutos con nivel de dosis de fitasa por encima de 1000 UFT/kg de pienso;
  - 5 horas con nivel de dosis de fitasa de 500 UFT/kg; y
  - Durante la noche con nivel de dosis de fitasa de alrededor de 200 UFT/kg.
- 25 La reacción entre el producto filtrado del extracto de pienso y el complejo de IP6 y proteína de soja se realiza preferiblemente mediante la colocación de los tubos en un aparato de sacudimiento como se muestra en Figura 6, panel inferior izquierdo.
- El tiempo necesario para observar la diferencia de claridad entre el Tubo de ensayo y los Tubos de control puede variar con diferentes matrices de pienso. Usualmente es más rápido con pienso a base de maíz/soja que con pienso a base de trigo.
- 30 Si no existe diferencia entre el tubo de ensayo y el tubo de control, no se puede excluir completamente que el pienso no tenga fitasa añadida debido a que el pienso puede contener inhibidores de fitasa desconocidos o no caracterizados, lo que a su vez puede afectar al rendimiento de fitasa *in vivo* después de la ingesta del pienso por los animales. Se puede realizar un control en el que se añade una cantidad conocida de la enzima fitasa al producto filtrado del extracto de pienso. Si el extracto de pienso con la enzima fitasa añadida no puede causar una disminución de la turbidez en el tiempo esperado, esto puede ser debido a la presencia de inhibidores de la fitasa.
- 35 Alternativamente, se puede comprobar el pH de la mezcla de reacción, que debe ser preferiblemente pH 2,9 pH-3,1 si se utiliza como sustrato el complejo de proteína de soja y ácido fítico.
- Si no se puede observar diferencia entre los Tubos de ensayo y de control el extracto de pienso puede contener inhibidor o inhibidores de fitasa intrínsecos. En tal caso, la fitasa en el producto filtrado de pienso puede ser separada del inhibidor o de los inhibidores mediante filtración en gel, intercambio iónico o cromatografía de afinidad
- 40 antes del análisis.
- La diferencia de claridad entre el Tubo de ensayo y el Tubo de control se puede leer utilizando un espectrofotómetro o un medidor de turbidez o simplemente observar a simple vista. La diferencia entre el Tubo de ensayo y el Tubo de control también se puede observar por medio de la cantidad de precipitación en el fondo de los tubos después de dejarlos reposar durante un cierto tiempo. Usualmente, el Tubo de ensayo no debe tener ningún precipitado o debe tener menos en comparación con el Tubo de control.
- 45

### 3.2. El sistema de microplacas

- El sistema de microplacas es una miniaturización del sistema del tubo de ensayo de manera que se pueden analizar muchas muestras en la misma placa de forma simultánea y se pueden verificar mediante el uso de un lector de ELISA o lector de microplacas para la cuantificación de la fitasa o la proteasa en cualquier longitud de onda entre
- 50 200 y 800 nm, preferiblemente entre 350 y 700 nm, más preferiblemente entre 400 y 600 nm. Puesto que las soluciones turbias pueden absorber luz en la región de longitud de onda visible, también es posible, e incluso puede

ser preferible utilizar lectores de microplacas con filtros en lugar de monocromadores. Además, se pueden añadir sondas de cromóforos o sondas de fluorescencia como tioflavina T y DCVJ [9-(dicianovinil)-julolidina] al sistema de reacción que convertirán la agregación de proteínas y los cambios de turbidez en señales de fluorescencia, que pueden ser controladas por medio de un fluorímetro ( también llamado un fluorómetro) o un espectrofotómetro de fluorescencia.

5

### 3.2.1 Complejo de proteína de soja con ácido fítico como sustrato para la fitasa

La Figura 7 muestra que para el pienso a base de maíz/soja, el pH del complejo de proteína de soja con ácido fítico debe estar preferiblemente entre pH 2,5 y pH 4,0, donde la diferencia de turbidez es la más grande. La Figura 7 muestra los resultados de un ensayo donde una solución que comprende complejo de proteína de soja con ácido fítico se mezcló con un volumen igual de extracto en agua del grifo de maíz/soja y se incubó a 25°C durante 5, 30 y 60 min.

10

La Figura 8 muestra que para el pienso a base de maíz/soja que tenía 2301 UFT/kg, llevó 4 min que la solución se volviera clara, para el pienso que tenía 1129 UFT/kg llevó 15 minutos, para el pienso que tenía 442 UFT/kg llevó 1,5 h. Para el pienso que tenía 233 o 184 UFT/kg, la solución todavía no era clara después de 5 h de incubación. Todos estos ensayos se realizaron a temperatura ambiente (25°C).

15

### 3.2.2 Comparación de la actividad de fitasa en diferentes muestras de pienso

En los siguientes ensayos, cada uno de los micropocillos contenía:

2 µl de IP6, 10 mM;

20 µl de agua;

20 100 µl de producto filtrado de extracto de pienso;

80 µl de proteína de soja.

En el blanco, se omitieron los 2µl de IP6 o el pienso que tenía fitasa a menos de 50 UFT/kg, que es el límite de detección por medio del método de análisis de fitasa convencional.

En el control negativo (Ctrl) 2 µl de IP6 10 mM se remplazaron por 2 µl de MIHS 10 mM.

25 Después de 2 horas de incubación a 25°C se registró la lectura a 600 nm. Las lecturas se muestran en la tabla de la Figura 9.

Los ensayos se realizaron sobre muestras de pienso seleccionadas al azar de diferentes países.

La tabla de la Figura 9 muestra el análisis de fitasa utilizando muestras de piensos seleccionadas al azar de fábricas de piensos de 4 países diferentes. Se puede observar que después de 2 horas a 25°C, la absorbancia de los pocillos en las filas A, B, C, E, F y G, que corresponde a 6 muestras de pienso de Costa Rica (CR), 3 de Australia (AU), y 4 de Francia (F) con Phyzyme XP<sup>®</sup> había disminuido al valor del blanco, que tenía una DO a 600 nm de alrededor de 0,060.

30

Las muestras de control correspondientes a cada muestra de pienso, pero sin Phyzyme XP<sup>®</sup> añadida se muestran en la fila D. Su absorbancia fue similar a la de los controles negativos.

35 Después de 2 horas de incubación a 25°C, 3 muestras seleccionadas al azar de China (CN), mostradas en los pocillos A8-D9, A11-D11, mostraron una DO 600 nm que también había disminuido, pero no tan significativamente como las muestras de los otros países. Fue necesaria una incubación durante la noche (aprox. 16 horas) para las muestras chinas antes de que sus valores de DO disminuyeran al valor del blanco.

40 La fotografía de la Figura 9 fue tomada después de 2 horas de incubación de la microplaca a 25°C y representa los resultados de la tabla de la Figura 9 visualmente.

La Figura 10 muestra los cambios de turbidez a lo largo del tiempo del complejo de proteína de soja con ácido fítico en solución de glicina 0,25 M a diferentes pH. El producto filtrado de extracto pienso se añadió al complejo y la turbidez de la solución se siguió a lo largo del tiempo. Las muestras de piensos utilizadas fueron dos muestras de piensos seleccionadas al azar de las fábricas de piensos canadienses que tienen 641 UFT/kg y 988 UFT/kg, respectivamente. Las reacciones se realizaron a 25°C.

45

Se puede observar que después de 4 horas de incubación la turbidez de los producto filtrados de los extractos de pienso incubados con solución de proteína de soja en glicina 0,25 M con un pH de 3,0 en presencia de IP6 (ácido fítico) no disminuyó sustancialmente.

Por el contrario, la turbidez disminuyó más rápidamente para la solución de proteína de la soja en glicina-HCl 0,25 M con pH 2,5 y aún más rápido a pH 1,9.

50

Estos resultados indican que el pH de la mezcla de reacción puede ser esencial para la hidrólisis catalizada por fitasa de ácido fítico en complejo con las proteínas de soja. Esto es debido a que el producto filtrado del extracto de pienso preparado en agua tiene una cierta cantidad de capacidad tamponadora. La capacidad tamponadora del extracto de pienso de diferentes piensos puede variar. Usualmente, el pienso a base de maíz/soja tiene mayor capacidad tamponadora que el pienso a base de trigo. Cuanto más próximo esté el pH final de la mezcla que comprende el producto filtrado, la solución de proteína de soja e IP6, a pH 3 más rápida será la reacción.

La Figura 11a y la Figura 11b muestran la relación entre el cambio de turbidez y la dosis de fitasa contenida en 12 diferentes muestras de pienso canadiense seleccionados al azar de las fábricas de piensos canadienses. Como se puede observar, dos de las 12 muestras, que se encontró que tenían actividad fitasa de 276 y 561 UFT/kg, respectivamente por medio de los métodos de ensayo tradicionales de fitasa, no cambiaron su turbidez de la solución después de una incubación de 2,5 horas.

Es posible que la muestra de pienso que se midió que tenía 561 UFT/kg por medio de métodos de ensayo de fitasa tradicionales contenga un fuerte inhibidor de la fitasa. Alternativamente, la cantidad de actividad fitasa medida puede ser afectada por la matriz de pienso. La velocidad de reacción es más rápida cuando este ensayo se utiliza con pienso a base de maíz/soja que con pienso a base de trigo/soja. Esto puede ser debido al tipo de polisacáridos en la matriz de pienso. Con el fin de explicar las diferencias en las velocidades de reacción debidas a la matriz de pienso o a la presencia de inhibidores de proteasa se pueden utilizar controles adecuados.

### 3.2.2. Complejo de proteína de soja con ácido fítico como sustrato para la proteasa P-3000®

La Figura 12 muestra complejo de la proteína de soja con ácido fítico como sustrato para la proteasa P-3000® supervisado mediante absorbancia a 600 nm como una función del tiempo de reacción y a diferentes valores de pH. La mezcla de reacción contenía IP6, extracto de pienso que contiene proteasa P-3000 y solución de proteína de soja en glicina-HCl 0,25 M pH 1,9, 2,5 y 3,0, respectivamente. Las condiciones fueron las mismas que anteriormente excepto que cada pocillo contenía 114 unidades de proteasa P-3000. Se puede observar que a pH 3,0 la turbidez disminuía con el tiempo, mientras que a pH 1,9 y 2,5 no se pudieron observar cambios significativos en la turbidez, lo que indica que P-3000 como proteasa alcalina no tenía actividad a pH demasiado bajo.

## 4. El método de placa de Petri:

### 4.1 Ventajas del método de la placa de Petri

El método de la placa de Petri es una alternativa importante al método del tubo de ensayo o de la cubeta y al método de microplacas.

Algunas de las ventajas del método de la placa de Petri son:

- 1) no siempre existe la necesidad de preparar un control negativo que contenga MIHS puesto que el agua en lugar del extracto de pienso puede funcionar como un control negativo;
- 2) sólo se requieren pequeños volúmenes de muestra, por ejemplo, esta técnica se puede realizar sólo con 0,02 ml de la muestra;
- 3) la etapa de filtración se puede evitar ya que también se pueden usar suspensiones de pienso puesto que las muestras pueden ser aplicadas directamente al pocillo de la muestra en la placa de Petri;
- 4) se pueden someter a ensayo muchas muestras ensayarse en paralelo en una sola placa;
- 5) el diámetro o el área del halo proporciona una indicación de cuántas unidades de fitasa hay en la muestra;
- 6) la comparación de los halo-diámetros entre diferentes muestras es más sencilla que la comparación de la turbidez de diferentes tubos;
- 7) todos los materiales utilizados para el método de placa de Petri son seguros y desechables.

El grado de la turbidez o el diámetro de los halos con respecto a la cantidad de fitasa presente sólo están proporcionalmente relacionados si la matriz de pienso o la composición de pienso son las mismas. Si hay la misma cantidad de fitasa pero la matriz de pienso es diferente el tamaño del halo puede ser diferente. Por ejemplo, el pienso a base de trigo a 836 UFT/kg tiene un tamaño de halo similar al pienso a base de maíz/soja a 442UFT/kg (Figura 14).

La matriz de pienso es la misma que la composición de pienso. Los agricultores siempre pueden formular su propia composición de pienso basándose en el coste de diferentes materias primas, y si quieren añadir aditivos adicionales, todos ellos pueden tener cierto efecto (grande o pequeño) sobre la velocidad de reacción de la fitasa en la degradación de ácido fítico presente en el complejo de proteína de soja con ácido fítico. Por ejemplo, el extracto de agua de pienso del pienso a base de trigo es mucho más viscoso que el pienso a base de maíz/soja. Semejante alta viscosidad puede contribuir al hecho de que a la misma dosis de fitasa el tamaño del halo es menor si la matriz de

pienso es a base de trigo en comparación con la matriz de pienso a base de maíz/soja. Por lo tanto, las muestras de control se pueden utilizar para cuantificar la cantidad de actividad de la enzima en una muestra particular.

Materiales utilizados para el método de placa de Petri (Figura 13):

- 5 1. Placa de Petri: La placa de Petri puede tener líneas de división de color negro y numeración. Las placas se pueden almacenar en bolsas de plástico cerradas preferiblemente a 8°C o por debajo, pero no congelar.
2. Pipeta: pipeta para succionar 20 µl de extracto de pienso. Puede ser una pipeta Pasteur de plástico desechable.
3. Tubos de plástico o recipientes para la extracción de piensos
4. Regla convencional.
- 10 5. Una mini-incubadora ajustada a 35°C puede ser ventajosa para la incubación de las placas de Petri de manera que el halo puede aparecer más rápido.

La Figura 14 muestra los resultados de un análisis realizado mediante el método de la placa de Petri de la siguiente manera. Se mezclaron 9 ml de solución de proteína de soja en glicina-HCl 0,25 M de pH 3,01 con 0,095 g de agarosa, se calentó, para disolver la agarosa, a continuación, se añadieron 0,27 ml o 0,36 ml de ácido fítico 10 mM de manera que la concentración final fuera 0,3 y 0,4 mM, respectivamente. Las soluciones se mezclaron y la mezcla se vertió en una placa de Petri para preparar una placa. Después de enfriar la placa se realizaron agujeros en el gel.

Se añadieron 5 g de pienso a base de maíz/soja que contenía fitasa de 0, 186, 233, 442, 1129 y 2301 UFT/kg o 5 g pienso a base de trigo que contenía 836 y 1586 UFT/kg, respectivamente, a 45 ml de agua del grifo y se sacudió durante 5-10 minutos para su disolución. La mezcla se dejó reposar durante 1-2 min y después se añadieron 20 µl de sobrenadante a cada pocillo de las placas de Petri. La tapa de la placa de Petri se reemplazó y se dejó que la placa reposara a temperatura ambiente durante varias horas hasta que se pudo observar el desarrollo de un halo (zona transparente en el gel opaco). El diámetro del halo debe ser proporcional a la cantidad de fitasa presente en el extracto. Para las dosis de fitasa superiores, por ejemplo 1000-2000 UFT, el anillo transparente podría verse en el plazo de 10-20 min.

En Figura 14 la placa se incubó a 35°C durante 4 h y a continuación a 23°C durante 15 h. Esto hizo que la placa "reaccionara en exceso", puesto que los halos se volvieron muy grandes y algunos de ellos se fusionaron entre sí a las dosis de fitasa más altas, es decir, 1129 y 2301 UFT/kg.

La Figura 14 también muestra que los resultados no difieren mucho cuando la concentración de ácido fítico final es 0,3 o 0,4 mM.

En Figura 14 los pocillos se marcan 0, 186, 233, 442, 1129 y 2301, que indica el número de unidades de fitasa por kg de pienso a base de maíz/soja. Los pocillos marcados 836 y 1586 se refieren a 836 y 1586 unidades por kg de pienso a base de trigo, respectivamente.

El tamaño de halo para las muestras de pienso a base de trigo es generalmente más pequeño que el de las muestras de pienso a base de maíz/soja puesto que el trigo a 836 UFT/kg tiene un tamaño de halo similar a maíz/soja a 442 UFT/kg. Esto podría estar relacionado con las diferencias en las matrices de pienso de estos dos piensos. La adición de xilanasas y pectinasas al extracto de trigo no mejora la actividad fitasa.

La Figura 15 muestra el efecto de la concentración del tampón en el tamaño del halo en el ensayo de la placa de Petri.

Los ensayos cuyos resultados se muestran en la Figura 15 fueron diseñados para ver si la concentración de tampón utilizada para preparar el gel tendría algún efecto sobre el tamaño del halo. La concentración de ácido fítico fue 0,4 mM, la agarosa fue al 1,5% (p/v). La proteína de soja fue 2 mg/ml. Los resultados indican que el tamaño del halo (relacionado con la actividad de Phyzyme XP®) fue similar para las 4 concentraciones de tampón. El fondo del gel se volvió más claro con el aumento de concentraciones de tampón. Se puede utilizar una concentración baja de tampón, por ejemplo glicina-HCl 0,10 M para proporcionar un buen contraste entre las zonas de halo aclaradas y el fondo.

El diámetro medio de halo (cm) y la zona de halo (cm<sup>2</sup>) medidos para las 4 placas P de las fotos en los paneles inferiores de la Figura 15 son aparentemente proporcionales a la cantidad de actividad de fitasa en el pienso a 0 (control), 193, 233, 442, 1129, y 2301 UFT/kg (Figura 15-16).

La Figura 17 muestra el efecto de la concentración de ácido fítico (0,1-0,4 mM) y del factor de dilución en agua del pienso en el tamaño de halo del gel de agarosa que contiene glicina-HCl 0,1 M de pH 3,0 y la proteína de soja a 2 mg/ml.

Los ensayos mostrados en la Figura 14 muestran que una concentración de IP6 final de 0,3 o 0,4 mM produjo más o menos los mismos resultados en tampón de glicina-HCl 0,25 M. La Figura 17 muestra datos adicionales para

## ES 2 605 236 T3

concentraciones de IP6 finales de 0,1 y 0,2 mM en glicina-HCl 0,1 M de pH 3,0, y también el efecto de diluciones de pienso (razón de volumen de agua (ml) a pienso (g)).

5 El pienso utilizado fueron 3 muestras peletizadas de trigo a 386 UFT/kg (pocillo 1 a 3), 537 UFT/kg (pocillo 1'-3'), 836 UFT/kg (pocillo 1''-3''), en diluciones 1:5, 1:4,1:3, respectivamente, es decir, a 2 g de pienso pulverizado se les añadieron 10, 8 y 6 ml de agua del grifo, respectivamente; un pienso a base de maíz/soja a 401 UFT/kg en diluciones 1:9, 1:6 y 1:3 en los pocillos CW1, CW2 y CW3, es decir, a 10 g de pienso fue de 90, 60 y 30 ml de agua del grifo, respectivamente. Las 4 placas de Petri (Placa 1-4) se incubaron a 35°C.

El contenido de los pocillos en la Figura 17 se describe a continuación.

10 Placa 1 (abajo a la izquierda, 0,1 mM IP6): sentido contrario a las agujas del reloj: 386 FTU/kg para W1 (1:5), W2 (1:4) y W3 (1:3); 537 FTU/kg para W1' (1:5), W2' (1:4), W3' (1:3); 836 FTU/kg para W1'' (1:5), W2'' (1:4), W3'' (1:3). Pocillos intermedios 401 FTU/kg, CW1 (1:9), CW (1:6), CW (1:3).

Placa 2 (abajo a la derecha, 0,2 mM IP6): sentido contrario a las agujas del reloj: 386FTU/kg para: W1 (1:5), W2 (1:4) y W3 (1:3); 537 FTU/kg para W1' (1:5), W2' (1:4), W3' (1:3); 836 FTU/kg para W1'' (1:5), W2'' (1:4), W3'' (1:3). Pocillos intermedios 401FTU/kg para CW1 (1:9), CW2 (1:6), CW3 (1:3).

15 Placa 3 (arriba a la derecha, 0,3 mM IP6): sentido contrario a las agujas del reloj.: 386FTU/kg para W1 (1:5), W2 (1:4), W3 (1:3). 537 FTU/kg para W1' (1:5), W2' (1:4), W3' (1:3). 836 FTU/kg para W1'' (1:5), W2'' (1:4), W3'' (1:3). Pocillos intermedios 401 FTU/kg para CW1 (1:9), CW (1:6), CW (1:3).

20 Placa 4 (arriba a la izquierda, 0,4 mM IP6): sentido contrario a las agujas del reloj: 386FTU/kg para W1 (1:5), W2 (1:4), W3 (1:3). 537 FTU/kg para W1' (1:5), W2' (1:4), W3' (1:3). 836 FTU para W1'' (1:5), W2'' (1:4), W3'' (1:3). Pocillos intermedios 401 FTU/kg para CW1 (1:9), CW2 (1:6), CW3 (1:3).

Observaciones (véase la Figura 17):

- 1). Opacidad de fondo con respecto a las concentraciones de IP6: el gel de agarosa de la Placa 1 con IP6 0,1 mM tiene un fondo más claro, mientras que los geles de agarosa en las Placas 2-4 que tienen IP6 0,2-0,4 mM muestran opacidad de fondo muy similar.
- 25 2). Tamaño de Halo con respecto a la concentración de IP6: Después de 1 hora a 35°C, comenzó a aparecer el halo. El tamaño de halo incrementó en general la disminución de la concentración IP6 de 0,4 a 0,1 mM, especialmente a los niveles de dosis de fitasa más bajos. Esto podría explicarse por el tiempo que toma para digerir el IP6 a 0,1 mM en la zona de halo.
- 30 3). Tamaño del halo con respecto al factor de dilución de pienso: En general, una menor dilución produjo un mayor tamaño de halo en todas las muestras de pienso sometidas a ensayo.

### 4.3 Análisis de la proteasa

El método de la placa de Petri también se puede utilizar para los análisis de la proteasa. Se prepararon geles de agarosa con proteína de soja con ácido fítico (0,4 mM) y con MIHS (0,2 mM) siguiendo el método descrito en el apartado 4.2 anterior. La cantidad de proteasa P-3000 añadida a cada gel fue: 0 (control), 114, 570, 1140, 2280, 3420 o 4560 unidades. Las condiciones de incubación fueron de 15 horas a 23°C. A partir de las fotos de la Figura 18, se puede observa que los halos en el gel que contiene ácido fítico 0,4 mM (foto de la izquierda en la Figura 18) tienen dos estructuras anulares de color blanco en comparación con el gel que contiene MIHS (mostrado a la derecha en la Figura 18), ambos de los cuales son drásticamente diferentes en apariencia de los halos formados con fitasa, que por lo tanto se pueden utilizar para distinguir si un halo se produce por la acción de fitasa o proteasa. Los anillos pueden estar formados por productos de hidrólisis de proteína de soja insoluble.

Tabla 2

Composición de los piensos a base de maíz/soja utilizados	
Composición del pienso a base de soja con maíz	Porcentaje (%)
Maíz	60,01
Harina de soja	31,52
Aceite de soja	4,00
Sal	0,40
DL Metionina	0,20
Piedra caliza	1,16
Fosfato dicálcico	1,46

## ES 2 605 236 T3

Composición de los piensos a base de maíz/soja utilizados	
Composición del pienso a base de soja con maíz	Porcentaje (%)
Vitaminas y minerales	1,25
Total	100,00

Las composiciones de los piensos a base de maíz/soja y los piensos a base de trigo/soja se recogen, respectivamente, en la Tabla 2 anterior y en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3

Composición de los piensos a base de trigo/soja utilizados	
Ingrediente	%
Trigo	72,33
Harina de soja	22,60
Aceite de soja	2,21
Dical (20% Ca; 18,5% P)	1,07
Piedra caliza (36% Ca)	0,30
Sal	0,30
Lisina·HCl	0,33
DL-Metionina	0,04
L-Treonina	0,13
Premezcla V/TM	0,70
TOTAL	100

Efecto del pH y la temperatura sobre la estabilidad del complejo de ácido fítico-lisozima

- 5 Es ventajoso que el sustrato de ácido fítico-proteína sea lo suficientemente estable de modo que se pueda utilizar un sustrato para el análisis de la fitasa. A partir de la Tabla 4 siguiente, se puede observar que la vida media ( $t_{1/2}$ ) de la reducción de la turbidez del complejo de IP<sub>6</sub>-lisozima es de 75 min a 37°C y 1,5 horas a 30°C. Estas estabilidades son más de lo que se necesita para el análisis de la fitasa, que está en el intervalo de 10 a 60min.

Tabla 4

Estabilidad del complejo de IP <sub>6</sub> -lisozima a diversos pH y temperaturas			
Temperatura	2,5 ≤pH <3,5	3,5 ≤pH <5,5	5,5 ≤pH
45°C	10 minutos	> 50 min	6 - 12 min
37°C	75 min	110 - 170 min	10-70 min
30°C	> 1,5 h	Estable durante 60 minutos	> 90 min
Temperatura ambiente (20 - 25°C)	16 días	40 - 45 días	12 - 13 días
Refrigeración (5 - 8°C)	84 días	No hay cambios en 2 meses	> 2 meses

- 10 El complejo de IP<sub>6</sub>-lisozima (0,3 mM:0,23 mM) se preparó en un volumen total de 120 µl en glicina-HCl 50 mM (pH 2,5 a 3,5), acetato de sodio 50 mM (pH 3,5 a 5,5) y Tris-maleato 50 mM (pH 5.5 a 8.5) que contenía IP<sub>6</sub> 0,3 mM y lisozima 0,23 mM. Los complejos de IP<sub>6</sub>-lisozima a diferentes valores de pH se incubaron a diferentes temperaturas y se siguió su turbidez. Los datos se presentan como semivida ( $t_{1/2}$ ) de la reducción de la turbidez del complejo de IP<sub>6</sub>-lisozima.
- 15 Efecto de la concentración de fitasa sobre la reacción catalizada por fitasa utilizando complejo de IP<sub>6</sub>-lisozima como sustrato
- A partir de la Figura 22, se puede observar que utilizando lisozima-ácido fítico (IP<sub>6</sub>) como sustrato a pH 3,5 y 30°C, la velocidad de reacción es lineal a la dosis de fitasa de la mezcla de reacción 0,05 a 0,85 UFT/ml de fitasa de *E. Coli* y de 0,05 a 1,3 UFT/ml de fitasa de *A. niger*.
- 20 La mezcla de reacción contenía 12 µl de lisozima (0,23 mM), 12 µl de IP<sub>6</sub> (3 mM), 60 µl de glicina-HCl (50 mM, pH

3,5), agua y variante 1 de fitasa de *E. Coli* (Phyzyme XP®) (a) o fitasa de *A. niger* (b). La mezcla de reacción se preincubó a 30°C y se mezcló rápidamente durante 2 minutos a 1400 rpm en un termomezclador Ependorf. La reacción se inició mediante la adición de fitasa en varias cantidades. El cambio de turbidez se registró cada 30 segundos durante el curso del tiempo de reacción. La velocidad de reacción se expresó como disminución de mili DO (mDO) a 600 nm por minuto.

Uso de ácido fítico-lisozima como sustrato para la evaluación de las fitasas comerciales

Se sabe que el ácido fítico está complejoado con sales minerales (lo que se denomina fitina) y proteínas en el material vegetal en forma de globoides. Es comercialmente importante que una fitasa pueda hidrolizar eficientemente ácido fítico en presencia de proteínas. La Tabla 5 muestra que Phyzyme XP es la enzima más eficiente entre las 4 fitasas sometidas a ensayo. Bajo las condiciones de ensayo la turbidez se puede convertir en  $\mu$ moles de liberación de Pi por unidad de tiempo (p. ej., por min). La razón es de 1:3, es decir, la DO600nm disminuye en un factor de 3 que equivale a 1  $\mu$ mol de Pi liberado.

Tabla 5:

Actividad de diferentes fitasas comerciales sobre el complejo de IP<sub>6</sub>-lisozima e IP<sub>6</sub>-proteína de soja en comparación con IP<sub>6</sub> como sustrato

Fitasas	Actividad relativa (%)		
	IP <sub>6</sub> -proteína de soja	IP <sub>6</sub> -lisozima	IP <sub>6</sub> -Na
Fitasa de <i>Escherichia coli</i> Phyzyme XP	164,3	229,0	100,0
Fitasa de <i>Escherichia coli</i> OptiPhos	137,8	151,8	102,7
Fitasa de <i>Aspergillus niger</i> Natuphos	31,8	23,1	37,0
Fitasa de <i>Peniophora Lycii</i> Ronozyme P-(CT)	24,5	13,0	9,8

El análisis se llevó a cabo en un volumen total de 120  $\mu$ l en glicina-HCl 50 mM de pH 3,0 a 37°C para las 5 fitasas diferentes añadidas a una dosis de 0,1 UFT/ml. Las velocidades de reacción en términos de liberación de Pi ( $\mu$ moles de Pi/ml/min) se midió deteniendo la reacción a diferentes intervalos de tiempo y analizando Pi en Konelab. La actividad de la variante 1 de fitasa de *E. coli* (0,096  $\mu$ moles de Pi/ml/min) en IP<sub>6</sub>-Na se estableció como 100%. Las actividades de las fitasas en los otros sustratos se presentan con respecto a la actividad de la variante 1 de la fitasa de *E. coli* sobre IP<sub>6</sub>-Na.

Tabla 6

Uso del método actual para el estudio del perfil de pH de la fitasa alcalina en hélice enrollada de *Bacillus sp.* en presencia o ausencia de CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM.

	Tampón Glicina-HCL		Tampón acetato			Tampón Tris-maleato				
	pH	2,5	3,5	3,5	4,5	5,5	5,5	6,5	7,5	8,5
Sin CaCl <sub>2</sub>	7,33	3,99	4,40	3,46	4,11	8,01	6,62	50,97	15,10	
mDO/min	0,43	0,16	0,05	0,02	0,07	0,39	0,070	4,57	1,17	
con 1mM				20,6	86,4					
CaCl <sub>2</sub>	7,69	5,71	6,47	6	0	100,10	10,50	3,25	2,47	
mDO/min	0,74	0,11	0,17	0,77	6,16	7,55	1,249	0,09	0,06	

Las reacciones se llevaron a cabo en glicina-HCl 50 mM (pH 2,5 a 3,5), acetato de sodio 50 mM (pH 3,5 a 5,5) y Tris-maleato 50 mM (pH 5,5 a 8,5), respectivamente, conteniendo IP<sub>6</sub> 0,3 mM y lisozima 0,23 mM en un volumen total de 120  $\mu$ l a 37°C. La dosis de enzima fue de 0.1 UFT/ml basándose en Pi liberado de IP<sub>6</sub> en el análisis de actividad fitasa convencional.

## Sección de Ejemplos - Parte B

Un ensayo cinético sencillo y rápido para fitasas utilizando complejo de ácido fítico-proteínas como sustrato

Materiales y métodos

Enzimas y productos químicos

- 5 Las fitasas bacterianas (EC 3.1.3.26) utilizadas en este estudio fueron: fitasa de *E. coli* a 10000 UFT/g (Phyzyme XP, Danisco, Brabrand, Dinamarca), a la cual se hace referencia aquí como variante 1 de la fitasa de *E. coli*, fitasa de *E. coli* a 2000 UFT/g (OptiPhos, JBS United, Indiana, EE.UU.), a la cual se hace referencia aquí como variante 2 de fitasa de *E. coli*, y fitasa MD2 *Bacillus* sp. a 163,5 UFT/ml, que se clonó y se expresó en los laboratorios de los autores de la presente invención [33]. Las fitasas fúngicas utilizadas en este estudio fueron: fitasa (EC 3.1.3.8) de *Aspergillus niger* a 5000 UFT/g (Natuphos, BASF Animal Nutrition, Alemania) y fitasa (EC 3.1.3.26) de *Peniophora Lycii* a 10000 UFT/g (Ronozyme P- (CT), DSM Nutritional Products Europe Ltd, Suiza). El fitato de sodio (IP<sub>6</sub>) y la lisozima de clara de huevo de gallina (CE 3.2.1.17) se adquirieron de Sigma-Aldrich y otros productos químicos de grado analítico se obtuvieron de Merck.

Extracción de fitasa y determinación de la actividad

- 15 Las cuatro fitasas comerciales se obtuvieron en forma granulada y se extrajeron como se describe a continuación, excepto la fitasa de *Peniophora*, que fue molida en primera lugar en un mortero para mejorar la extracción. Las enzimas granuladas o el polvo molido de fitasa de *Peniophora* (200-500 mg) se dispersaron en 50 ml de agua MilliQ en vasos de precipitados de 100 ml y se agitaron utilizando un agitador magnético a temperatura ambiente (22°C) durante 30 min. Las suspensiones se dejaron reposar durante la noche (16-18 h) a 5°C para permitir que las partículas se asentaran. El sobrenadante fue retirado suavemente utilizando pipetas Pasteur, y se diluyó con agua MilliQ a una concentración final de enzima de 20 UFT/ml basándose en los valores de UFT proporcionados por los fabricantes. Las soluciones de fitasa convencionales se almacenaron como soluciones de enzima de partida a -20°C para experimentos posteriores. La fitasa del pienso animal (12,5 g) se extrajo con agua MilliQ (37,5 ml), el sobrenadante se obtuvo por centrifugación y se analizó para determinar la actividad fitasa mediante el uso de IP<sub>6</sub> y complejo de IP<sub>6</sub>-lisozima como sustrato, respectivamente.

- Se determinó la actividad de las diferentes fitasas bacterianas y fúngicas comerciales basándose en la cantidad de P<sub>i</sub> liberado de IP<sub>6</sub> en tampón de acetato 0,25 M de pH 5,5 a 37°C [24, 25]. La actividad de la fitasa MD2 de *Bacillus* sp. se analizó en Tris-HCl 0,1 M (pH 7,0). Las soluciones de partida de enzimas se diluyeron a aproximadamente 0,03 UFT/ml en tampón de acetato 0,25 M (pH 5,5) para las fitasas ácidas de histidina o en tampón Tris-HCl 0,1 M (pH 7,0) que contenía CaCl<sub>2</sub> 1 mM y Tween 20 al 0,01% (v/v) para la Fitasa MD2 de *Bacillus* sp. Se añadieron 2 ml de IP<sub>6</sub> 7,5 mM en tampón de acetato 0,25 M (pH 5,5) a 1 ml de la solución de enzima pre-incubada a 37°C durante 5 min. La reacción se realizó durante 60 min seguido de la adición de 2 ml de reactivo de parada recién preparada que contenía una mezcla 1,5:1,5:1 de heptamolibdato de amonio al 10%, vanadato de amonio al 0,24% y ácido nítrico al 65%. Con posterioridad, las mezclas de reacción se centrifugaron a 8000 g a temperatura ambiente durante 10 min antes de registrar la absorbancia del sobrenadante a 415 nm. Se preparó una curva de calibración de P<sub>i</sub> por tratamiento estándar de soluciones de P<sub>i</sub> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0-4,0 mM sin fitasa añadida en las mismas condiciones que se han descrito anteriormente. Todas las muestras se analizaron por triplicado. La actividad fitasa se calculó a partir de la curva de calibración de la absorbancia (DO<sub>415</sub>) frente a la concentración (mM) de P<sub>i</sub>. Una unidad de actividad fitasa (UFT) se define como la cantidad de fitasa que libera 1 mol de P<sub>i</sub> por minuto bajo las condiciones de análisis. Los valores de actividad obtenidos para las cinco fitasas se utilizaron para diseñar todas las reacciones enzimáticas subsiguientes.

Preparación de complejo de sustrato de fitato

- Se prepararon complejos de sustrato de fitato-proteína en placas de 96 pocillos de fondo plano en un volumen total de 120 µl. Se añadieron a cada pocillo 60 µl de un tampón específico, 12 µl de lisozima de 25 mg/ml, 12 µl de IP<sub>6</sub> 3 mM y 36 µl de agua Milli-Q, y se mezclaron a 1400 rpm en un termomezclador Eppendorf (modelo: Comfort MTP) durante 2 minutos a temperatura ambiente para formar un complejo de IP<sub>6</sub>-lisozima homogéneo.

Otros complejos de sustrato (complejo de IP<sub>6</sub>-proteína de soja, IP<sub>6</sub>-lisina e IP<sub>6</sub>-Ca, respectivamente) se prepararon de la misma forma que IP<sub>6</sub>-lisozima variando la concentración final de IP<sub>6</sub> y los correspondientes ligandos (proteína de soja, lisina o calcio) para obtener la turbidez deseada.

- 50 Medición cinética de la reducción de la turbidez del complejo de sustrato catalizado por fitasas

- Los complejos de sustrato preparados como se ha descrito anteriormente se pre-calientan a 37°C con agitación vigorosa (1400 rpm) durante 2 min antes de la adición de 1 a 12 µl de fitasa para llegar a la concentración de enzima final deseada en UFT. La reacción se lleva a cabo a 37°C durante 20-60 min utilizando un lector de microplacas (PowerWave<sub>ex</sub>, BioTek Instruments, Vermont, EE.UU.). La reacción se controló a 600 nm y los datos se recogieron cada 30 segundos. Antes de cada lectura la microplaca se sacudió al máximo de escala durante 5 segundos. Las reacciones con agua MilliQ en lugar de las muestras de fitasa se utilizaron como controles para cada reacción

enzimática. Todas las muestras se analizaron por triplicado. La actividad de cada muestra de fitasa se calculó como el porcentaje de reducción de la turbidez del complejo de sustrato en la densidad milióptica a 600 nm ( $mDO_{600}$ ) por minuto.

Análisis del fosfato inorgánico mediante Konelab

5 Con el fin de medir el Pi liberado del complejo de sustrato en las reacciones descritas anteriormente, las reacciones se detuvieron a diferentes intervalos de tiempo mediante la adición de 30  $\mu$ l de HCl 2,5 N. Las microplacas que tenían los reactivos se centrifugaron a 8000 g durante 10 min, y 100  $\mu$ l de los sobrenadantes claros se transfirieron manualmente a copas de muestra de 0,5 ml para el análisis de Pi mediante Konelab™ Analyser (Thermo Scientific, Ulm, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todas las muestras se midieron por triplicado.

10 Análisis mediante HPLC de ésteres fosfato de inositol

El sustrato  $IP_6$  y sus productos de degradación ( $IP_{1-5}$ ) de las reacciones catalizadas por fitasa se analizaron en un sistema de cromatógrafo de iones Dionex DX-500 (Sunnyvale, CA, EE.UU.) con una columna Dionex CarboPac PA-100 (4 x 250 mm ) y una bobina tejida Dionex (75  $\mu$ l) para la reacción post-columna. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 30  $\mu$ l de HCl 2,5 N en un momento específico y las soluciones se filtraron a través de membranas de filtro de 96 pocillos (Pall life sciences, DeLand, Florida, USA) con un tamaño de poro de 0,45  $\mu$ m antes de ser inyectadas en el columna de HPLC con un volumen de inyección de 100  $\mu$ m. La separación se realizó mediante un gradiente lineal de HCl 1 N de 1 a 92% a una velocidad de flujo de 1 ml/min. El eluyente se mezcló en la cámara de mezcla post-columna con  $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$  al 0,1% en  $HClO_4$  al 2% [23] para la detección de los ésteres fosfato de inositol. Las muestras se analizaron por triplicado.

20 Resultados y discusión

Efecto de la concentración de ácido fítico y lisozima sobre la turbidez del complejo de ácido fítico-lisozima

La mayoría de las proteínas de origen vegetal, tales como los derivados de soja, cacahuete, semilla de algodón y semilla de colza, tienen sus puntos isoeléctricos (pI) en el intervalo ácido (alrededor de pH 4). Por lo tanto la solución del complejo de  $IP_6$  con estas proteínas desarrolla turbidez cuando el pH es inferior a su pI [34, 35]. Por ejemplo, la solución de complejo de  $IP_6$ -proteína de soja es turbia sólo cuando el pH de la solución se reduce por debajo de pH 4. Por otra parte, la lisozima de clara de huevo de gallina tiene un pI de alrededor de 11 [36] y es considerablemente estable en el intervalo de pH ácido. Se encontró que el complejo de  $IP_6$ -lisozima mostraba turbidez y estabilidad en un amplio intervalo de pH de pH 2,5 a pH 8,5.

La Figura 23 muestra que la turbidez del complejo de  $IP_6$ -lisozima aumenta con el aumento de las concentraciones de  $IP_6$  y lisozima a pH 4,0. A  $IP_6$  en torno a 0,5 mM y lisozima a 0,35 mM, los niveles de turbidez desaparecen. Se observa mayor turbidez de la solución a una razón molar de  $IP_6$ :lisozima > 1,5:1. La razón de  $IP_6$  0,3 mM:lisozima 0,23 mM (aproximadamente 2,5 mg de lisozima por ml) se eligió posteriormente para preparar un complejo de  $IP_6$ -lisozima para su uso como sustrato para diversos análisis de fitasa ya que mostró una alta turbidez ( $DO_{600} > 1$ ) y la reducción de la turbidez del complejo fue relacionada linealmente con la hidrólisis de  $IP_6$  en el complejo. Los cambios en el pH, la temperatura y la concentración de sal se examinaron posteriormente por su impacto en la turbidez y la estabilidad del complejo de  $IP_6$ - lisozima como se muestra a continuación.

Factores que afectan a la turbidez y la estabilidad del complejo de ácido fítico-lisozima

La Tabla 7 muestra la semivida del complejo de  $IP_6$ -lisozima basada en su turbidez a diferentes temperaturas y pH. Entre pH 2,5 y 5,5, el complejo era estable durante más de 10 días a temperatura ambiente (22-25°C) y durante dos meses a 5-8°C sin ninguna reducción significativa de la turbidez. Sin embargo, a temperaturas más elevadas (>30°C), la estabilidad del complejo se redujo drásticamente, en particular a un pH de 5,5 y por encima, debido a la inestabilidad de la lisozima en estas condiciones. Se observó que las proteínas desnaturalizadas incluyendo la lisozima no forman complejos estables con  $IP_6$  en parte debido a que las propias proteínas precipitan después de la desnaturalización.

45 La dependencia del pH de la turbidez del complejo de  $IP_6$ -lisozima se muestra adicionalmente en la Fig. 24. Como era de esperar, la turbidez fue alta ( $DO_{600}$  de 1 a 1,2) en la región ácida (pH de 3,5 a 5,5), y empezó a disminuir a aproximadamente pH neutro y se hizo constante en el nivel más bajo entre pH 7,0 a 8,5, que corresponde a aproximadamente 30% del valor más alto de la turbidez.

Tabla 7

Estabilidad del complejo de  $IP_6$ -lisozima a diversos pH y temperaturas.

Temperatura	2,5 $\leq$ pH <3,5	3,5 $\leq$ pH <5,5	5,5 $\geq$ pH
45°C	10 minutos	> 50 min	6 - 12 min
37°C	75 min	110 - 170 min	10-70 min

Estabilidad del complejo de IP<sub>6</sub>-lisozima a diversos pH y temperaturas.

Temperatura	2,5 ≤pH <3,5	3,5 ≤pH <5,5	5,5 ≥pH
30°C	> 1,5 h	Estable durante 60 minutos	> 90 min
Temperatura ambiente (20 - 25°C)	16 días	40 - 45 días	12 - 13 días
Refrigeración (5 - 8°C)	84 días	No hay cambios en 2 meses	> 2 meses

El complejo de IP<sub>6</sub>-lisozima (0,3 mM:0,23 mM) se preparó en un volumen total de 120 µl en glicina-HCl 50 mM (pH 2,5 a 3,5), acetato de sodio 50 mM (pH 3,5 a 5,5) y Tris-maleato 50 mM (pH 5,5 a 8,5) que contenía IP<sub>6</sub> 0,3 mM y lisozima 0,23 mM. Los complejos de IP<sub>6</sub>- lisozima a diferentes valores de pH se incubaron a diferentes temperaturas y se siguió su turbidez. Los datos se presentan como la semivida ( $t_{1/2}$ ) de reducción de la turbidez del complejo de IP<sub>6</sub>-lisozima.

A partir de la Fig. 24 se puede observar adicionalmente el efecto de algunas sales comunes, NaCl y CaCl<sub>2</sub>, que pueden estar presentes en los tampones de análisis y los extractos de bio-materiales, sobre la turbidez del complejo de IP<sub>6</sub>-lisozima. Se puede observar que la turbidez del complejo de IP<sub>6</sub>-lisozima era bastante estable a concentraciones de NaCl por debajo de 15 mM en la región ácida (pH 3-5,5) (Fig. 24a). El aumento de la concentración de NaCl a 30 y 45 mM dio como resultado una disminución significativa de la turbidez excepto a pH 3,5. La solución de complejo de IP<sub>6</sub>-lisozima se volvió clara en presencia de NaCl 100 mM en todos los valores de pH en el intervalo de 3,5 a 8,5.

La investigación del efecto de concentraciones crecientes de sal de calcio a diferentes pH mostró que la turbidez del complejo de IP<sub>6</sub>-lisozima era estable a pH 3-4 a CaCl<sub>2</sub> <3 mM, pero se redujo drásticamente a mayor concentración de CaCl<sub>2</sub>, especialmente a pH > 4,5 (Fig. 24b). Es bien sabido que iones metálicos divalentes y trivalentes tales como Zn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> tienen fuertes interacciones con IP<sub>6</sub> [10]. La Figura 25 muestra que EDTA (en forma de sal de sodio), el quelante usado comúnmente en tampones, no era capaz de restaurar la alta turbidez en presencia de Ca<sup>2+</sup> y a concentraciones superiores a 10 mM, el propio EDTA también contribuyó a la reducción de la turbidez de la solución. Debido a la mayor afinidad con el calcio o el hierro, se ha utilizado IP<sub>6</sub> como un agente quelante alternativo en la terapia para la urolitiasis de calcio [37] y para la inhibición de *Vibrio vulnificus* en ratones con septicemia inducida [38, 39].

El fosfato inorgánico es el principal producto de la reacción catalizada por fitasa, y potencialmente puede competir con fitato para unirse a la lisozima cargada positivamente. En el análisis cinético convencional de fitasa que tiene fitato a una concentración de 0,3 mM, el Pi final puede ser 1,5 mM cuando todas las moléculas de fitato se convierten en Pi y monofosfato de *myo*-inositol. Se encontró que a pH 3,5 en glicina-HCl 50 mM la turbidez del complejo de IP<sub>6</sub>-lisozima no se vio afectada a una concentración de P<sub>i</sub> de hasta 50 mM y la turbidez desapareció a P<sub>i</sub> 80 mM (Fig. 26). A pH 3,5 a 8,5, el P<sub>i</sub> hasta 5 mM no interfirió con la turbidez de los complejos de IP<sub>6</sub>-lisozima (datos no mostrados).

Los resultados anteriores sugieren que, a pesar de la variación en la turbidez con diferentes condiciones de ensayo, el complejo de IP<sub>6</sub>-lisozima puede ser un sustrato ideal para determinar la actividad fitasa siguiendo la disminución de la turbidez con la condición de que los controles negativos (sin fitasa o con fitasa desnaturalizada) para cada reacción enzimática se ejecuten simultáneamente. Bajo las condiciones de análisis ni las fitasas bacterianas ni las propias fitasas fúngicas en el intervalo de mezcla de reacción de 0,1 a 2,8 UFT/ml causaron turbidez detectable con IP<sub>6</sub>.

Una comparación de 5 fitasas microbianas para determina su actividad frente a IP<sub>6</sub> y diversos complejos de IP<sub>6</sub>-ligando

La Tabla 8 muestra que las cinco fitasas de origen bacteriano o fúngico fueron capaces de hidrolizar el IP<sub>6</sub> en los complejos de IP<sub>6</sub>-proteína, como se indica por la liberación de P<sub>i</sub> determinado mediante análisis Konelab. Se observa que las fitasas de *E. Coli* (variante 1 y 2 de fitasa de *E. coli*) hidrolizan IP<sub>6</sub>, así como IP<sub>6</sub>-lisozima e IP<sub>6</sub>-proteína de soja varias veces más rápido que las dos fitasas fúngicas (Tabla 8), lo que está de acuerdo con los datos de la bibliografía que muestran que la fitasa de *E. coli* tiene mayor actividad a pH 3 que sus homólogos fúngicos [40]. La actividad de una fitasa a pH a alrededor de 3 es un criterio importante para su eficacia como una enzima para piensos para la nutrición animal. Las fitasas de *Peniophora lycii* y *Bacillus* sp. MD2 mostraron la menor hidrólisis de los tres sustratos bajo estas condiciones de análisis. En contraste con la fitasa de *A. Niger*, las cuatro fitasas mostraron de 1,3 a 2,3 veces mayor actividad frente a IP<sub>6</sub>-lisozima e IP<sub>6</sub>-proteína de soja que IP<sub>6</sub> basándose en el Pi liberado. La diferencia en la preferencia de sustrato de estas cinco fitasas podría no estar relacionada con los enlaces éster que se hidrolizan primero puesto que la fitasas de *E. Coli* y *Peniophora lycii* inician su reacción de hidrólisis atacando el enlace éster de la 6<sup>a</sup> posición en la molécula de fitato [41, 42], mientras que la fitasa de *A. niger* hidroliza inicialmente en la posición 3 [43]. La fitasa de *Bacillus* es un híbrido 3/6-fitasa, que inicialmente ataca los grupos fosfato de la posición 3<sup>a</sup> y/o 6<sup>a</sup> [43] o cualquier posición del fosfato [44] en las moléculas de fitato. Las observaciones con la fitasa de *E. coli* mostradas en la Tabla 8 fueron apoyadas adicionalmente por el análisis de los productos de reacción mediante HPLC que separaron IP<sub>6</sub> y sus productos de degradación IP<sub>5</sub>, IP<sub>4</sub>, IP<sub>3</sub>, y IP<sub>2</sub> [22]. Se

5 confirmó que las fitasas de *E. Coli* mostraban mayor actividad en la degradación de IP<sub>6</sub> en el complejo de IP<sub>6</sub>-lisoizima que IP<sub>6</sub> en forma de fitato de sodio (datos no mostrados). La razón exacta por la que IP<sub>6</sub>-proteína puede ser un sustrato mucho mejor para las fitasas de *E. Coli* sigue siendo un enigma y necesita ser examinado mediante RMN <sup>31</sup>P. Por otra parte, puesto que IP<sub>6</sub> puede estar unido a proteínas de la semilla en semillas de plantas y a las proteínas de alimentos y piensos en las partes superiores de los tractos digestivos de los animales monogástricos que tienen un entorno ácido, la hidrólisis eficaz del IP<sub>6</sub> en el complejo de IP<sub>6</sub>-proteína en condiciones próximas a las condiciones *in vivo* es un requisito previo para una buena fitasa de pienso.

Tabla 8

Actividad de diferentes fitasas comerciales sobre el complejo de IP<sub>6</sub>-lisoizima e IP<sub>6</sub>-proteína de soja en comparación con IP<sub>6</sub> como sustrato.

Fitasas	Actividad relativa (%)		
	IP <sub>6</sub> -proteína de soja	IP <sub>6</sub> -lisoizima	IP <sub>6</sub> -Na
Fitasa de <i>Escherichia coli</i> Phyzyme XP	164,3	229,0	100,0
Fitasa de <i>Escherichia coli</i> OptiPhos	137,8	151,8	102,7
Fitasa de <i>Aspergillus niger</i> Natuphos	31,8	23,1	37,0
Fitasa de <i>Peniophora Lycii</i> Ronozyme P- (CT)	24,5	13,0	9,8

10 El análisis se llevó a cabo en un volumen total de 120 µl en glicina-HCl 50 mM de pH 3,0 a 37°C para las 5 fitasas diferentes añadido a una dosis de 0,1 UFT/ml. Las velocidades de reacción en términos de liberación de P<sub>i</sub> (µmol de P<sub>i</sub>/ml/min) se midió al detener la reacción a diferentes intervalos de tiempo y analizando el P<sub>i</sub> en Konelab. La actividad de la variante 1 de la fitasa de *E. coli* (0,096 µmoles de P<sub>i</sub>/ml/min) en IP<sub>6</sub>-Na se estableció como 100%. Actividades de las fitasas sobre los otros sustratos se presentan con respecto a la actividad de la variante 1 de la fitasa de *E. Coli* en IP<sub>6</sub>-Na.

15 La variante 1 de la fitasa de *E. coli* y la fitasa de *A. niger* como representativas de bacterias y hongos, fitasas 6, y 3, respectivamente, fueron elegidas para examinar adicionalmente su actividad frente al complejo de IP<sub>6</sub>-lisina. La lisina como aminoácido cargado positivamente y aditivo para alimentos y piensos fue elegida puesto que puede potencialmente formar complejo con IP<sub>6</sub> *in vivo* en el tracto digestivo. El complejo de IP<sub>6</sub>-lisina, a diferencia del complejo de IP<sub>6</sub>-lisoizima, no era turbio a todos los valores de pH entre 3,5 y 8,5. Por lo tanto, su papel como un complejo sustrato con IP<sub>6</sub> para la fitasa tuvo que ser evaluado mediante la liberación de P<sub>i</sub>. La Figura 27a muestra que mientras que la hidrólisis del complejo de IP<sub>6</sub>-lisoizima por la variante 1 de la fitasa de *E. coli* fue más rápida en comparación con IP<sub>6</sub>, en línea con los resultados mostrados en la Tabla 8, la hidrólisis del complejo de IP<sub>6</sub>-lisina fue más lenta. En contraste, la fitasa de *A. niger* no mostró mucha diferencia en sus velocidades de reacción iniciales con el complejo de IP<sub>6</sub>-lisina de dos sustratos e IP<sub>6</sub> (Fig. 27b). Cabe señalar en la Fig. 27a y la Fig. 27b que la fitasa de *A. niger* se aplicaron dosis 5 veces más altas que las de la fitasa de *E. coli* teniendo en cuenta su menor actividad a pH 3,5.

30 Aparte de los complejos de IP<sub>6</sub>-proteína, el complejo de IP<sub>6</sub>-Ca<sup>2+</sup> también puede desarrollar turbidez y por lo tanto puede ser utilizado para el análisis de fitasas siguiendo la disminución de la turbidez. Sin embargo, la turbidez del complejo de IP<sub>6</sub>-Ca<sup>2+</sup> fue baja (DO<sub>600</sub> <0,2), especialmente a valores de pH inferiores a pH 5,5. El complejo de IP<sub>6</sub>-Ca<sup>2+</sup> podría, sin embargo, ser utilizado como un sustrato alternativo a IP<sub>6</sub>-lisoizima para el análisis de fitasas neutras y alcalinas.

#### Relaciones entre la disminución de la turbidez y la liberación de fosfato

35 Si el análisis de la actividad fitasa basado en la reducción de la turbidez del complejo de IP<sub>6</sub>-lisoizima catalizada por las fitasas 3 y 6 puede reflejar la hidrólisis de IP<sub>6</sub>, es esencial que sea validado por medio del método bien establecido que mide la liberación de P<sub>i</sub>. La Figura 28 muestra que la reducción de la turbidez (DO<sub>600</sub>) de IP<sub>6</sub>-lisoizima en el análisis cinético desarrollado aquí se correlaciona bien con el P<sub>i</sub> liberado de la misma reacción enzimática utilizando fitasas tanto de *E. coli* (Fig. 28a y Fig. 28b) como de *A. niger* (Fig. 28d y la Fig. 28e). La actividad de fitasa en estos análisis podría por lo tanto ser medida como mDO/min, que es igual a la pendiente de reducción de la turbidez en el intervalo lineal (DO<sub>600</sub> = 0,1 a 0,9). La velocidad de reacción en mDO/min se podría convertir en la unidad común de la actividad fitasa (UFT/ml) mediante la correlación con el P<sub>i</sub> liberado (Fig. 28c y Fig. 28f). En la Fig. 28c y la Fig. 28f, se estima que cada 1 µmol de P<sub>i</sub> liberado por min basándose en los resultados del análisis Konelab está relacionado con un descenso de la unidad de DO de 3,03 ± 0,27 a 600 nm por min.

#### Efecto del sustrato y de la concentración de fitasa

45 Se encontró que la concentración óptima de sustrato era IP<sub>6</sub> 0,3 mM y 0,23 mM de lisoizima, que se utilizó en todos los análisis en este estudio. Con menor concentración de sustrato, la turbidez era baja, lo que hizo el intervalo lineal

de la reacción más corto, mientras que con una alta concentración de sustrato, la disminución de la turbidez no fue lineal con la concentración de sustrato. Cabe señalar que el análisis cinético de fitasa desarrollado aquí se basa en el seguimiento de la hidrólisis del sustrato en lugar de la formación del producto como en la mayoría de los análisis enzimáticos. Esta es también una de las razones por las que no se puede utilizar una alta concentración de sustrato. Debido a esto se encontró que este método cinético no era útil para la estimación de  $K_m$  y  $V_{max}$  de las fitasas al igual que el análisis de fitasas colorimétrico convencional. El método adecuado de estimación de  $K_m$  y  $V_{max}$  es mediante HPLC [22-23].

En un análisis de pH de 3 a 3,5, temperatura de análisis de 30°C y tiempo de reacción de 20 a 60 min, la concentración de fitasa adecuada para las fitasas de *E. coli* y *A. niger* estaba en el intervalo de mezcla de reacción de 0,1 a 0,8 UFT/ml. La actividad de fitasa de algunos cereales, tales como el centeno, triticale, trigo y cebada, está en el intervalo de 500 a 5000 UFT/kg [45], mientras se informó que los microbios de *Aspergilli*, *E. coli* y *Bacillus* sp. tenían una actividad fitasa de caldo de 0,1 a 1,8 UFT/ml [33, 41, 46]. En el estudio actual, se pudieron someter a ensayo muestras de pienso que contenían harina de maíz y de soja y variante 1 de fitasa de *E. coli* de 400 a 2300 UFT/kg mediante el método cinético, mientras que con el nivel de fitasa a 200 UFT/kg o más bajo en el pienso el método cinético no era adecuado puesto que la incubación durante la noche tenía que ser larga.

Perfiles de pH de cinco fitasas microbianas utilizando complejo de ácido fítico-lisozima como sustrato

Con el fin de evaluar la utilidad del método cinético desarrollado, también es importante someter a ensayo este método a un amplio intervalo de pH que sea relevante para las fitasas. La Figura 29 muestra las actividades de las cinco fitasas microbianas diferentes como una función del pH en el intervalo de pH 2 a 8,5 utilizando complejo de IP<sub>6</sub>-lisozima como sustrato. En general, los perfiles de pH obtenidos por medio del método cinético (Fig. 29a-29e) concuerdan bien con los referidos en la bibliografía utilizando IP<sub>6</sub> como sustrato [31, 32, 37, 41, 42, 40, 47]. A partir de la Fig. 29a y la Fig. 29b, se puede observar que las dos fitasas de *E. coli* mostraron perfiles de pH similares con complejo de IP<sub>6</sub>-lisozima como con IP<sub>6</sub> solo [41, 47] excepto para un pH óptimo extendida a la región ácida (pH 2-5,5). Esto podría significar que el complejo de IP<sub>6</sub>-lisozima como sustrato vuelve a la fitasa más estable y por lo tanto activo en la región ácida. En la Fig. 29a y la Fig. 29b, se puede señalar que, incluso al mismo pH la actividad medida variaba mucho debido a los diferentes tampones utilizados que tienen diferentes fuerzas iónicas que a su vez afectan a la turbidez del sistema. Utilizando el complejo de IP<sub>6</sub>-lisozima como sustrato, se observó que la fitasa MD2 de *Bacillus* sp., una enzima dependiente de calcio [31, 32], mostró un cambio de 2 unidades de pH en su pH óptimo hacia la región ácida en presencia de CaCl<sub>2</sub> 1 mM (Fig. 29c). La fitasa de *Aspergillus niger* mostró dos picos óptimos de actividad a pH 5,5 y pH 2 (Fig. 29d) como con IP<sub>6</sub>, excepto que el segundo pico de pH óptimo se desplazó 0,5 unidades hacia la región ácida (pH 2 en lugar de pH 2,5) en comparación con IP<sub>6</sub> solo como sustrato [37]. El perfil de pH de la fitasa de *Peniophora* mostró un óptimo alrededor de pH 4-5, que está de acuerdo con el referido anteriormente para la enzima con IP<sub>6</sub> [42]. La ampliación de pH óptimo en el caso de las fitasas de *E. Coli* y la fitasa de *A. niger*, y también el cambio de pH óptimo en el caso de la fitasa de *Bacillus* son obviamente ventajosos teniendo en cuenta el pH del tracto digestivo en los animales monogástricos que se encuentra generalmente en el intervalo de pH de 2,5 a 6,0.

#### Conclusiones

El complejo de IP<sub>6</sub> y lisozima a una concentración de 0,3 y 0,23 mM, respectivamente, forma una solución turbia y se puede utilizar para el análisis de la cinética de la actividad de las fitasas mediante el control de la disminución de la absorbancia. El deceso de la turbidez se correlaciona bien con la liberación de Pi. El método es útil para someter a ensayo las fitasas ácidas de histidina, representadas por todas las fitasas comerciales, y la fitasa de hélice enrollada sometida a ensayo en este estudio. También fueron investigados como sustratos otros complejos de IP<sub>6</sub>-ligando que incluían IP<sub>6</sub>-proteína de soja, IP<sub>6</sub>-lisina e IP<sub>6</sub>-Ca<sup>2+</sup>, pero fueron menos adecuados que el complejo de IP<sub>6</sub>-lisozima. En comparación con el método colorimétrico de punto final convencional basado en la medición de Pi, el análisis cinético descrito aquí es sencillo, rápido, seguro, adaptable a escrutinio de alto rendimiento, y también más cercano a las condiciones fisiológicas *in vivo*, haciéndolo más adecuado para su uso en la modificación genética de las proteínas fitasas, en las fábricas de piensos y laboratorios de análisis industriales para estimar la actividad fitasa antes de su uso en aplicaciones alimentarias y de piensos.

La utilidad de este método se ha demostrado adicionalmente en el estudio de los perfiles de pH de cinco fitasas diferentes. La principal limitación de este método es que la reacción enzimática debe ser mezclada bien antes de las mediciones para evitar la precipitación del complejo de IP<sub>6</sub>-lisozima, que puede conducir a una mayor desviación en la medición. El intervalo lineal de la turbidez a DO<sub>600</sub> (0,1-0,9) es bastante estrecho en comparación con el intervalo lineal para el análisis colorimétrico de liberación de Pi. Puesto que este método cinético se basa en la verificación del consumo de sustrato en lugar de en la formación del producto como en la mayoría de los análisis enzimático, éste no es adecuado para la estimación de  $K_m$  y  $V_{max}$  de los fitasas.

#### Resumen

Las fitasas ácidas de histidina constituyen un importante grupo de enzimas para las industrias de procesamiento de pienso y granos debido a su alta actividad específica y amplio óptimo de pH para la actividad [1]. La fitasa cataliza la hidrólisis secuencial de fitato (1,2,3,4,5,6-hexakisfosfato de mio-inositol; IP<sub>6</sub>), una forma principal de almacenamiento

de fósforo en los cereales y las legumbres, a derivados de mio-inositol menos fosforilados con liberación concomitante de fosfato inorgánico (P<sub>i</sub>) [1]. La hidrólisis de fitato supera varios de sus efectos negativos sobre la nutrición humana y animal [2-7] y sobre el medio ambiente [8, 9]. Está bien establecido que el ácido fítico une iones metálicos cargados positivamente [10] y biomoléculas [11] volviéndolos no disponibles como nutrientes. En el procesamiento de grano es importante añadir fitasa con el fin de volver el Ca<sup>2+</sup> disponible para la α-amilasa [12]. La interacción con proteínas de la dieta con carga positiva conduce a la formación de agregados y precipitados de fitato-proteína, lo que disminuye su accesibilidad a las proteasas, dando como resultado de este modo una digestión de proteínas ineficaz [13-18]. La disminución de la solubilidad de la proteína resulta del enmascaramiento de cargas positivas en las moléculas de proteína por el ácido fítico, que cambia los puntos isoeléctricos de las proteínas [16, 11].

Se han realizado estudios *in vitro* con fitasa referidos en la bibliografía con IP<sub>6</sub> como el sustrato y, se han seguido o bien la degradación de IP<sub>6</sub> o bien la cantidad de P<sub>i</sub> liberado. Este método para analizar la fitasa puede no proporcionar una imagen real de la actividad de la enzima ya que el ácido fítico *in vivo* puede no existir en su forma de ácido libre o de sal de sodio. Por otra parte, la determinación cuantitativa de la degradación de IP<sub>6</sub> es tediosa y lenta [19-21]. Se requiere el uso de técnicas cromatográficas con múltiples dispositivos, ya que ni IP<sub>6</sub>, IP<sub>1-5</sub> ni el P<sub>i</sub> se pueden detectar directamente mediante la absorbancia o fluorescencia, lo que pone limitaciones al desarrollo de esta técnica para un escrutinio de alto rendimiento [21-23]. La medición del P<sub>i</sub> liberado de IP<sub>6</sub> por la fitasa es un análisis de punto final que proporciona el desarrollo de color proporcional a la cantidad de P<sub>i</sub> liberado, pero requiere una elección adecuada de la dosis de enzima y el tiempo de análisis junto con el tedio y el cuidado en el manejo de los reactivos de vanadato y molibdato tóxicos [24-27]. El desarrollo del color puede variar con las condiciones de reacción tales como el pH. Se han hecho intentos para analizar cinéticamente fitasa utilizando fosfato de *p*-nitrofenilo o pirofosfato de *p*-nitrofenilo como sustrato. Sin embargo, es difícil diferenciar si el color amarillo producido tras la hidrólisis del sustrato se debe a la fitasa o la acción de fosfatasas que se producen ampliamente en los materiales biológicos [28-29]. Por otra parte, no todas las fitasas muestran una buena actividad frente a estos dos sustratos artificiales [30-32].

Debido a la importancia en la nutrición animal, la fitasa se convierte en una de las enzimas más analizadas en la investigación de piensos y en los laboratorios de análisis industriales de piensos, así como en las fábricas de piensos. Los laboratorios de investigación necesitan escrutar variantes de fitasa modificadas genéticamente a proteínas con rendimientos mejorados, especialmente estabilidad térmica y resistencia a pepsina, mientras que los criadores necesitan un análisis de fitasa con el fin de asegurarse de que la fitasa añadida a su pienso está todavía activo para que puedan salvar la adición del fosfato de calcio. Sin embargo, debido a las sustancias químicas tóxicas o los equipos específicos necesarios para el análisis de fitasa, no se ha realizado un análisis de fitasa de rutina fuera de un laboratorio bien equipado. Por lo tanto resulta evidente que existe una necesidad de un método simple y alternativo más rápido para el análisis de fitasas. Las pruebas preliminares de los autores de la presente invención han demostrado que las fitasas catalizan la hidrólisis de los complejos de proteína/péptido-fitato y, en menor medida, complejos con iones de calcio, liberando P<sub>i</sub> y reduciendo simultáneamente la turbidez de la solución de sustrato. En el presente estudio, se estableció el uso de complejo de IP<sub>6</sub>-lisozima como sustrato para determinar la actividad fitasa cinéticamente mediante el control de la reducción de la turbidez y se comparó con la del método tradicional. El método desarrollado se utilizó para la determinación de las actividades de diferentes fitasas bacterianas y fúngicas en un amplio intervalo de pH.

La fitasa (EC 3.1.3.) hidroliza el fitato (IP<sub>6</sub>) presente en los cereales y granos para liberar fosfato inorgánico (P<sub>i</sub>), volviéndolo así biodisponible. El método más comúnmente utilizado para analizar la fitasa, desarrollado hace casi un siglo, mide el P<sub>i</sub> liberado a partir de IP<sub>6</sub>. Este análisis de punto final tradicional consume mucho tiempo y es bien conocido por su complicación además de requerir precauciones especiales para el manejo de los reactivos tóxicos utilizados. En este trabajo se informa sobre un método cinético simple, rápido y no tóxico adaptable a un alto rendimiento para el análisis de fitasa utilizando IP<sub>6</sub>-lisozima como sustrato. El análisis se basa en el principio de que IP<sub>6</sub> forma complejos turbios estables con lisozima cargada positivamente en un amplio intervalo de pH y la hidrólisis de IP<sub>6</sub> en el complejo está acompañada de una disminución en la turbidez verificada a 600 nm. La disminución de la turbidez se correlaciona bien con el P<sub>i</sub> liberado de IP<sub>6</sub>. Se encontró que este método cinético era útil en el análisis de fitasas ácidas de histidina, incluyendo fitasas 3 y 6, una clase que representa todas las fitasas comerciales, y fitasa alcalina en hélice enrollada de *Bacillus* sp. Se examinaron las influencias de la temperatura, el pH, el fosfato y otras sales en el análisis cinético. Las sales incluyendo NaCl, CaCl<sub>2</sub>, y fosfato mostraron todas una interferencia dependiente de la concentración.

## Referencias

- [i.] Fiske, C. H. & Subbarow, Y. (1925). The Colorimetric Determination of Phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66, 375-400.
- [ii.] Lowry, O. H. & Lopez, J.A. (1946). The Determination of Inorganic Phosphate in the Presence of Labile Phosphate Esters. *J. Biol. Chem.* 162, 421-428.
- [iii.] Prestwich, S. O. y Bolton, T. B., Measurement of picomole amounts of any inositol phosphate isomer separable by h.p.l.c. by means of a bioluminescence assay, *Biochem. J.* (1991) 274, 663-672.

- [iv.] Wodzinski R. J., Ullah A. H. (1996), *Adv Appl Microbiol.* 42, 263-302.
- [v.] Michele Susan Yarnell y Lilian Zeitouni. Reagents, methods and kits for detecting feed enzymes. United State Patent application Publication, US2005/0009116A. Pub. Date: Jan. 13, 2005.
- 5 [vi.] Howson y Davis, Production of phytate-hydrolyzing enzyme by some fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 5(1983): 377-382. H.D. Bae et al., A novel staining method for detecting phytase activity, *Journal of Microbiological Methods* 39 (1999) 17-22
- [vii.] Blaabjerg, K; Carlson, D.; Hansen-Møller, J.; Tauson, A.-H.; Poulsen, H. D. In vitro degradation of phytate and lower inositol phosphates in soaked diets and feedstuffs, *Livestock Sci.* 2007, 109, 240-243
- 10 [viii.] Engelen AJ, van der Heeft FC, Randsdorp PH, Smit EL. Simple and rapid determination of phytase activity. *J AOAC Int.* 1994 May-Jun;77(3):760-4
- [1] B.C. Oh, W.C. Choi, S. Park, Y.O. Kim, T.K. Oh, Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytase, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63 (2004) 362-372.
- [2] H.W. Lopez, F. Leenhardt, C. Coudray, C. Remesy, Mineral and phytic acid interactions: is it a real problem for human nutrition, *Int. J. Food Sci. Technol.* 37 (2002) 727-739.
- 15 [3] V.T. Maddaiah, A.A. Kurnick, B.L. Reid, Phytic acid studies, *Proc. Soci. Exp. Biol. Med.* 115 (1964) 391-393.
- [4] K.B. Nolan, P.A. Duffin, D.J. Mc Weeny, Effect of phytate on mineral bioavailability. In vitro studies on Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> (also Cd<sup>2+</sup>) solubilities in the presence of phytate, *J. Sci. Food Agr.* 40 (1987) 79-85.
- [5] P. Vats, U.C. Banerjee, Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolase): an overview, *Enzyme Microb. Technol.* 35 (2004) 3-4.
- 20 [6] M. Cheryan, Phytic acid interaction in food systems, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutri.* 13 (1980) 297-335.
- [7] D.H. Kim, B.C. Oh, W.C. Choi, J.K. Lee, T.K. Oh, Enzymatic evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* phytase as a feed additive, *Biotechnol. Lett.* 21 (1999) 925-927.
- [8] M.A. Mallin, Impact of industrial animal production on river and estuaries, *American Sci.* 88 (2000) 26-73.
- 25 [9] A. Vohra, T. Satyanarayana, A cost-effective cane molasses medium for enhanced cell-bound phytase production by *Pichia anomala*, *J. Appl. Microbiol.* 97 (2004) 471-476.
- [10] C.M. Weaver, S. Kannan, Phytate and mineral availability, in: N.R. Reddy (Eds.), *Food Phytates*, CRC Press, Boca Raton, FL, 2002, pp. 211-223.
- [11] N.R. Reddy, M.D. Pierson, S.K. Sathe, D.K. Salunkhe, Interactions of phytate with proteins and minerals, in: *Phytate in Legumes and Cereals*, CRC press, Boca Raton, FL, 1989, pp. 57-70.
- 30 [12] T. Jacobsen, D.E. Slotfeldt, Phytic acid and metal availability: a study of Ca and Cu binding. *Cereal Chem.* 60 (1983) 392-395.
- [13] B.E. Knuckles, Effect of phytate and partially hydrolyzed phytate on in vitro protein digestibility, *J. Food Sci.* 50 (1985) 1080-1082.
- 35 [14] E. Carnovale, E. Lugaro, G. Lombardiboccia, Phytic acid in faba bean and pea-effect on protein availability, *Cereal Chem.* 65 (1988) 114-117.
- [15] I.A. Vaintraub, V.P. Bulmaga, Effect of phytate on the in vitro activity of digestive proteinases, *J. Agr. Food Chem.* 39 (1991) 859-861.
- [16] U. Konietzny, R. Greiner (Eds.), *Phytic acid and Nutritional Impact*, 2 ed., Elsevier Science, Amsterdam, 2003.
- 40 [17] A.K. Kies, L.H. De Jonge, P.A. Kemme, A.W. Jongbloed, Interaction between protein, phytate, and microbial phytase. In vitro studies, *J. Agr. Food Chem.* 54 (2006) 1753-1758.
- [18] A.J. Cowieson, P.H. Selle, V. Ravindran, Influence of dietary phytic acid and source of microbial phytase on ileal endogenous amino acid flows in broiler chickens, *Poultry Sci.* 87 (2008) 64-64.
- [19] R.U. Makower, Extraction and determination of phytic acid in beans (*Phaseolus-vulgaris*), *Cereal Chem.* 47 (1970) 288-295.
- 45 [20] D.B. Thompson, J.W. Erdman, Phytic acid determination in soybeans, *J. Food Sci.* 47 (1982) 513-517.

- [21] T. Ishiguro, T. Ono, K. Nakasato, C. Tsukamoto, S. Shimada, Rapid measurement of phytate in raw soymilk by mid-infrared spectroscopy, *Biosci. Biotech. Biochem.* 67 (2003) 752-757.
- [22] E. Skoglund, N.G. Carlsson, A.S. Sandberg, High-performance chromatographic separation of inositol phosphate isomers on strong anion exchange columns, *J. Agr. Food Chem.* 46 (1998) 1877-1882.
- 5 [23] Q.C. Chen, B.W. Li, Separation of phytic acid and other related inositol phosphates by high-performance ion chromatography and its applications, *J. Chromatogr. A* 1018 (2003) 41-52.
- [24] G. Gizzi, P. Thyregod, C. von Holst, G. Bertin, K. Vogel, M. Faurschou-Isaksen, R. Betz, R. Murphy, B.B. Andersen, Determination of phytase activity in feed: Interlaboratory study, *J. AOAC Int.* 91 (2008) 259-267.
- 10 [25] A.J. Engelen, F.C. Vanderheeft, P.H.G. Randsdorp, E.L.C. Smit, Simple and rapid determination of phytase activity, *J. AOAC Int.* 77 (1994) 760-764.
- [26] M. Shimizu, Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (nato) N-77, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56 (1992) 1266-1269.
- [27] S.J. Yoon, Y.J. Choi, H.K. Mint, K.K. Cho, J.W. Kim, S.C. Lee, Y.H. Jung, Isolation and identification of phytase producing bacterium, *Enterobacterium* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme, *Enzyme Microb. Technol.* 18 (1996) 449-454.
- 15 [28] R.M. Berka, M.W. Rey, K.M. Brown, T. Byun, A.V. Klotz, Molecular characterization and expression of a phytase gene from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 4423-4427.
- [29] J.K. Heinonen, R.J. Lahti, A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase, *Anal. Biochem.* 113 (1981) 313-317.
- 20 [30] Y.O. Kim, H.K. Kim, K.S. Bae, J.H. Yu, T.K. Oh, Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11, *Enzyme Microb. Technol.* 22 (1998) 2-7.
- [31] Y.M. Choi, H.J. Suh, J.M. Kim, Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10, *J. Protein Chem.* 20 (2001) 287-292.
- [32] J. Kerovuo, M. Lauraeus, P. Nurminen, N. Kalkkinen, J. Apajalahti, Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 2079-2085.
- 25 [33] T.T. Tran, G. Mamo, B. Mattiasson, H.-K. R., A thermostable phytase from *Bacillus* sp. MD2: cloning, expression and high-level production in *Escherichia coli*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37 (2010) 279-287.
- [34] K. Okubo, D.V. Myers, G.A. Iacobucci, Binding of phytic acid to glycinin, *Cereal Chem.* 53 (1976) 513-524.
- 30 [35] T.D. Fontaine, W.A. Pons, G.W. Irving, Protein-phytic acid relationship in peanuts and cottonseed, *J. Biol. Chem.* 164 (1946) 487-507.
- [36] G. Alderton, W.H. Ward, H.L. Fevold, Isolation of lysozyme from egg white *J. Biol. Chem.* 157 (1945) 43-58.
- [37] S. Ebisuno, S. Moimoto, T. Yoshida, T. Fukatani, Y. S., T. Ohkawa, Studies of phytin therapy for calcium urolithiasis with hypercalciuria. 1. Basal experiments, *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 71 (1986) 5-11.
- 35 [38] Y.H. Chung, C.H. Chun, S.H. Lee, C.H. Lim, Influence of septic in *Vibrio vulnificus* from phytic acid, *J. Agri. Sci.* 32 (2005) 71-80.
- [39] Y.H. Chung, W.W. Park, S.Y. Lee, S.W. Lee, C.H. Lim, M.H. Yoon, Effect of phytic acid on viability of *Vibrio vulnificus* and on septicemia-induced mice, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 49 (2006) 15-20.
- [40] A.H.J. Ullah, K. Sethumadhavan, E.J. Mullaney, Salt effect on the pH profile and kinetic parameters of microbial phytases, *J. Agr. Food Chem.* 56 (2008) 3398-3402.
- 40 [41] R. Greiner, U. Konietzny, K.D. Jany, Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*, *Arch. Biochem. Biophys.* 303 (1993) 107-113.
- [42] A.H.J. Ullah, K. Sethumadhavan, PhyA gene product of *Aspergillus ficuum* and *Peniophora lycii* produces dissimilar phytases, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 303 (2003) 463-468.
- 45 [43] J. Kerovuo, J. Rouvinen, F. Hatzack, Analysis of myo-inositol hexakiphosphate hydrolysis by *Bacillus* phytase: indication of a novel reaction mechanism, *Biochem. J.* 352 (2000) 623-628.
- [44] S. Shin, N.C. Ha, B.C. Oh, T.K. Oh, B.H. Oh, Enzyme mechanism and catalytic property of beta propeller phytase, *Structure* 9 (2001) 851-858.

[45] W. Eeckhout, M. De Paepe, Total phosphorus, phytase phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *An. Feed Sci. Technol.* 47 (1994) 19-29.

[46] T.R. Shieh, J.H. Ware, Survey of microorganism for the production of extracellular phytase. *Appl. Microbiol.* 16 (1968) 1348-1351.

5 [47] C.H. Stahl, D.B. Wilson, X.G. Lei, Comparison of extracellular *Escherichia coli* AppA phytases expressed in *Streptomyces lividans* and *Pichia pastoris*, *Biotechnol. Lett.* 25 (2003) 827-831.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para la detección de una actividad fitasa o una actividad proteasa que comprende las etapas de:
- (a) proporcionar un medio que comprende una fase continua y una fase dispersa, en donde la fase dispersa comprende:
- 5 i) un primer componente que es un fitato o un ácido fítico
- ii) un segundo componente que es una proteína
- en donde el primer componente y el segundo componente se mantienen juntos en un complejo por medio de una o más interacciones intermoleculares; en donde la fase dispersa proporciona una propiedad detectable al medio;
- 10 (b) proporcionar una muestra que comprende o se sospecha que comprende actividad fitasa y/o actividad proteasa, en donde la actividad fitasa y/o proteasa son capaces de afectar a la fase dispersa causando un cambio en la propiedad detectable del medio;
- (c) poner en contacto el medio con la muestra;
- (d) determinar si hay un cambio detectable en la propiedad detectable del medio.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la propiedad detectable es la turbidez.
- 15 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la proteína se selecciona del grupo que consiste en: caseínas, proteínas de soja, proteína de colza, proteína de mostaza, hemoglobinas porcinas, caseína N,N-dimetilada, beta-lactoglobulina bovina, albúmina de suero bovina o de cerdo, lisozima, una proteína modificada con un cromóforo, y cualquier combinación de las mismas.
- 20 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la razón del ácido fítico con respecto a la proteína en el complejo está en el intervalo de 1-100:1-100.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el medio está entre pH 1,8 y pH 8,5.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método comprende la comparación del cambio en la propiedad detectable del medio con respecto a un control.
- 25 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el medio es un líquido o un gel y está turbio.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la muestra es una muestra biológica, y preferiblemente en donde la muestra biológica es una preparación de enzima, un caldo de fermentación, un alimento, un pienso, un ingrediente alimentario, un ingrediente de pienso, un producto alimentario procesado o un
- 30 producto de pienso procesado o un extracto de uno cualquiera de los mismos.
9. El uso de un kit para la detección de la actividad proteasa y/o la actividad fitasa de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho kit comprende un medio que comprende una fase continua y una fase dispersa, en donde la fase dispersa comprende:
- i) un primer componente que es un fitato o un ácido fítico
- 35 ii) un segundo componente que es una proteína
- en donde el primer componente y el segundo componente se mantienen juntos en un complejo por una o más interacciones intermoleculares en un líquido o un gel; en donde la fase dispersa proporciona una propiedad detectable al medio.
- 40 10. El uso de un kit de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho kit comprende una composición líquida turbia o una composición en gel turbia, en donde la turbidez se puede reducir por la actividad fitasa y/o la actividad proteasa.
11. El uso de un kit de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho kit comprende una composición que se puede utilizar para detectar la actividad proteasa o la actividad fitasa.
- 45 12. El uso de un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o el uso de un kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, para someter a ensayo la actividad enzimática en una muestra biológica, preferiblemente para someter a ensayo la actividad fitasa y/o la actividad proteasa en una muestra biológica.

13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la muestra biológica es una preparación de enzima, un caldo de fermentación, un alimento, un pienso, un ingrediente alimentario, un ingrediente de pienso, un producto alimentario procesado o un producto de pienso procesado o un extracto de uno cualquiera de los mismos.

5 14. El uso de un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o el uso de un kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 para el escrutinio de actividades enzimáticas de nuevas moléculas de enzima.

Figura 1a

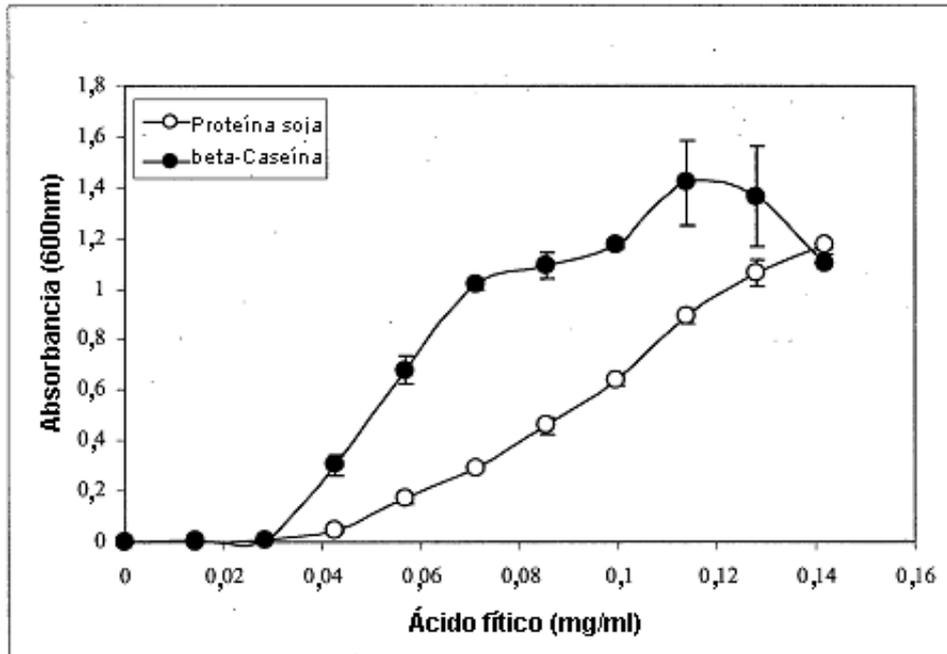


Figura 1b

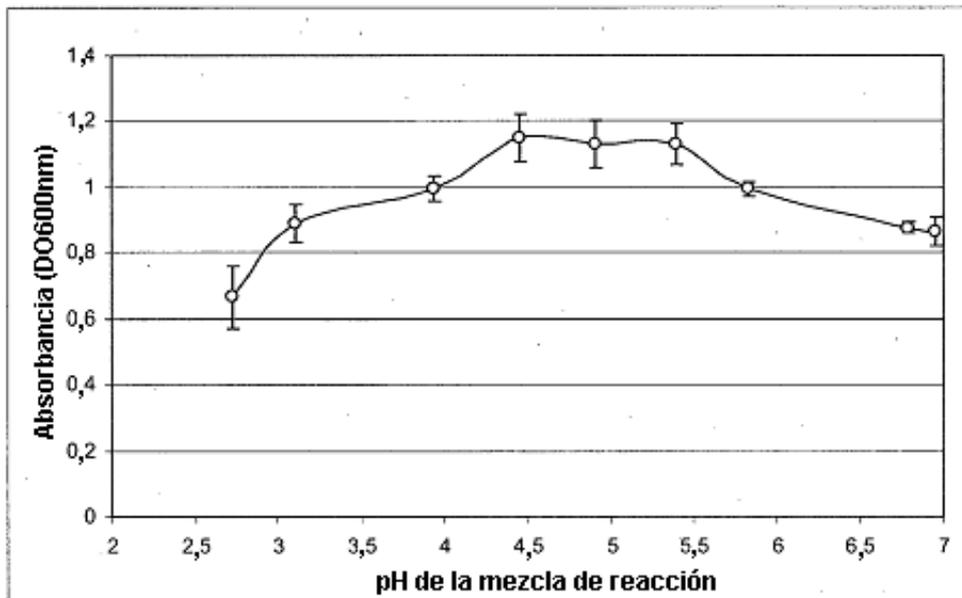


Figura 2

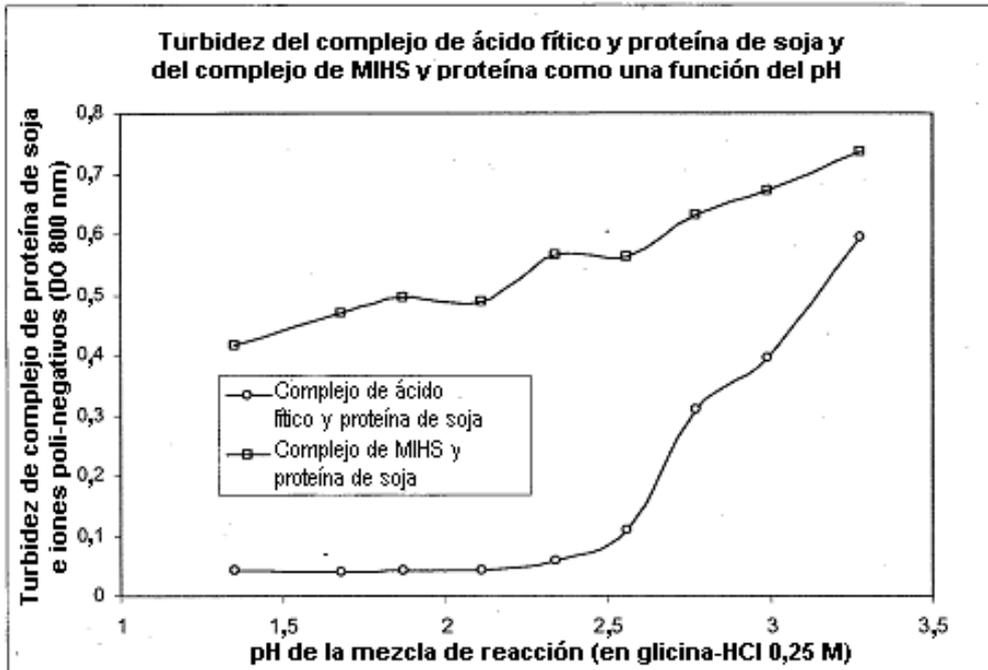


Figura 3

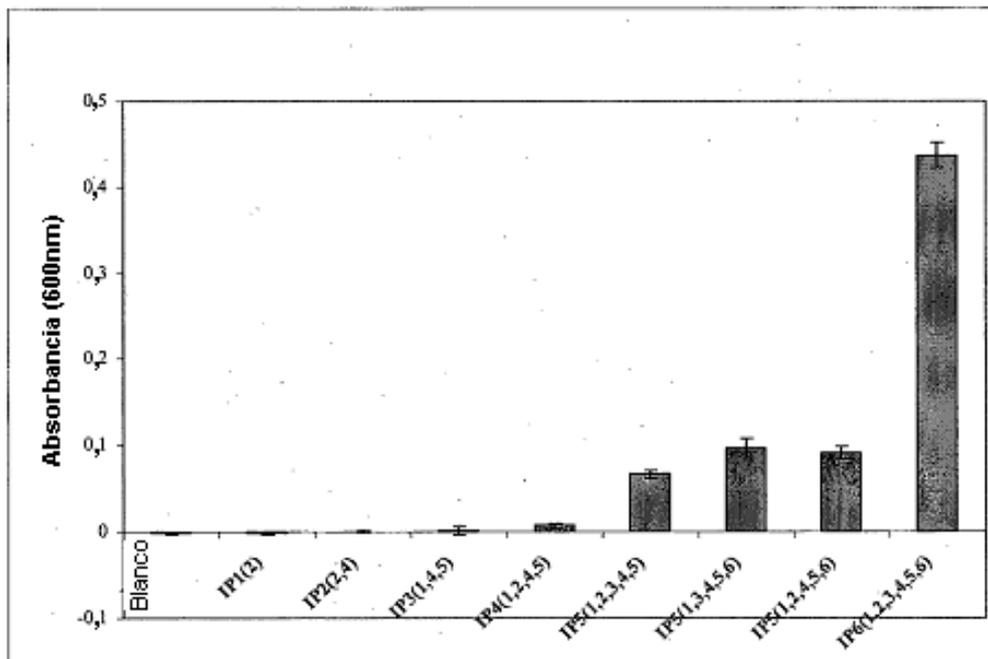


Figura 4

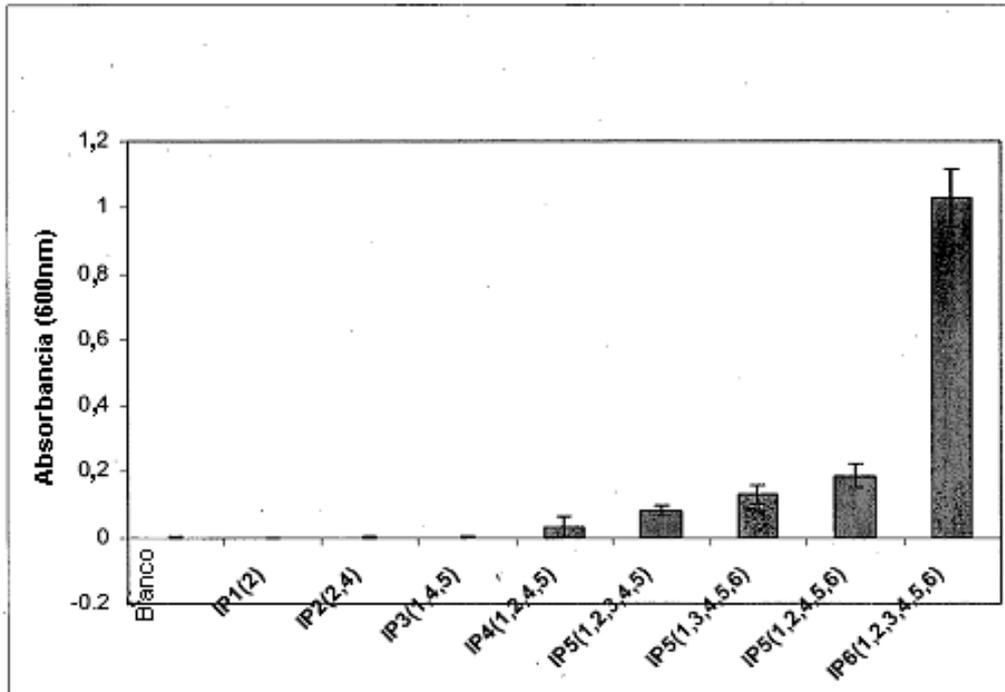


Figura 5

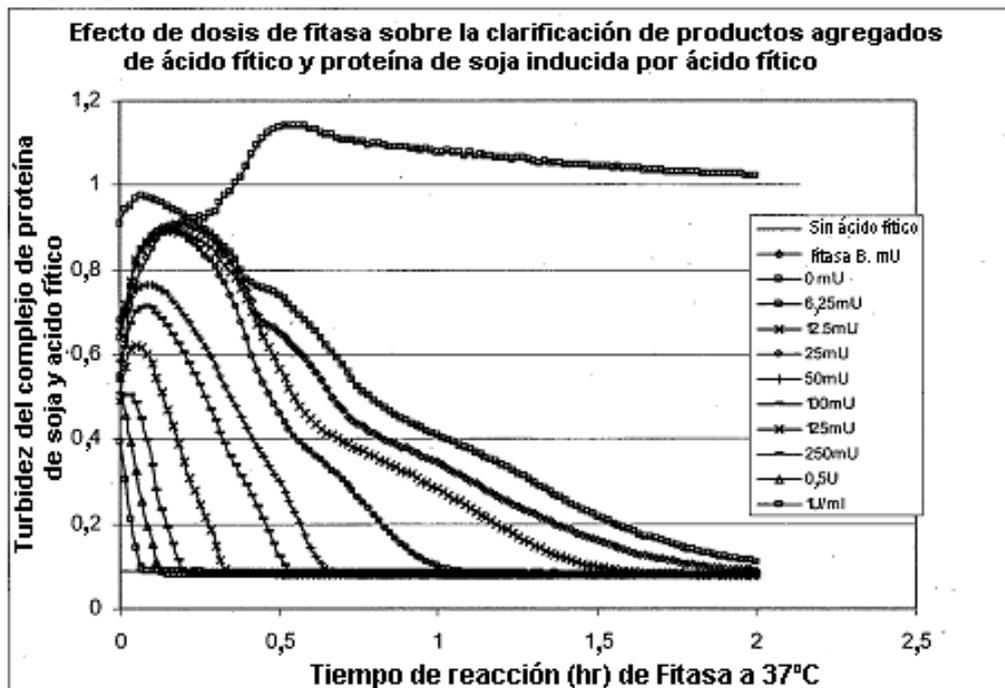


Figura 6

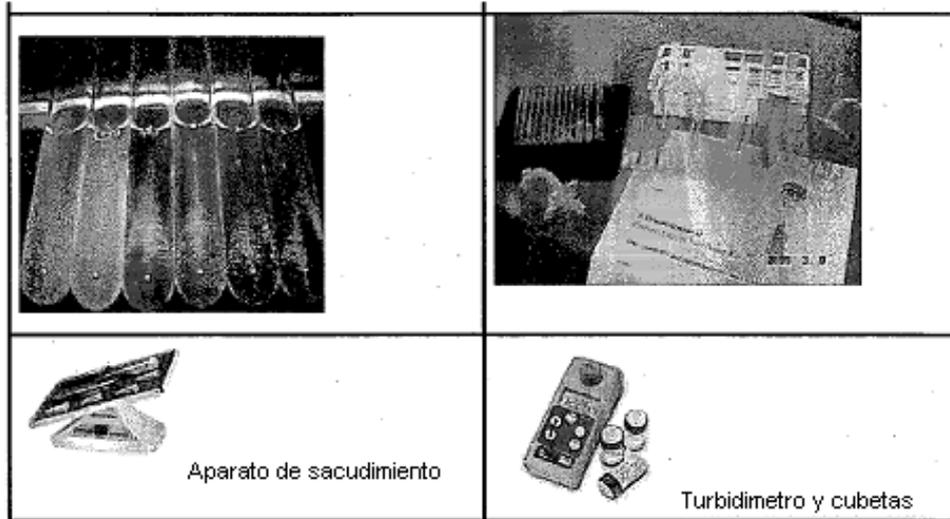


Figura 7

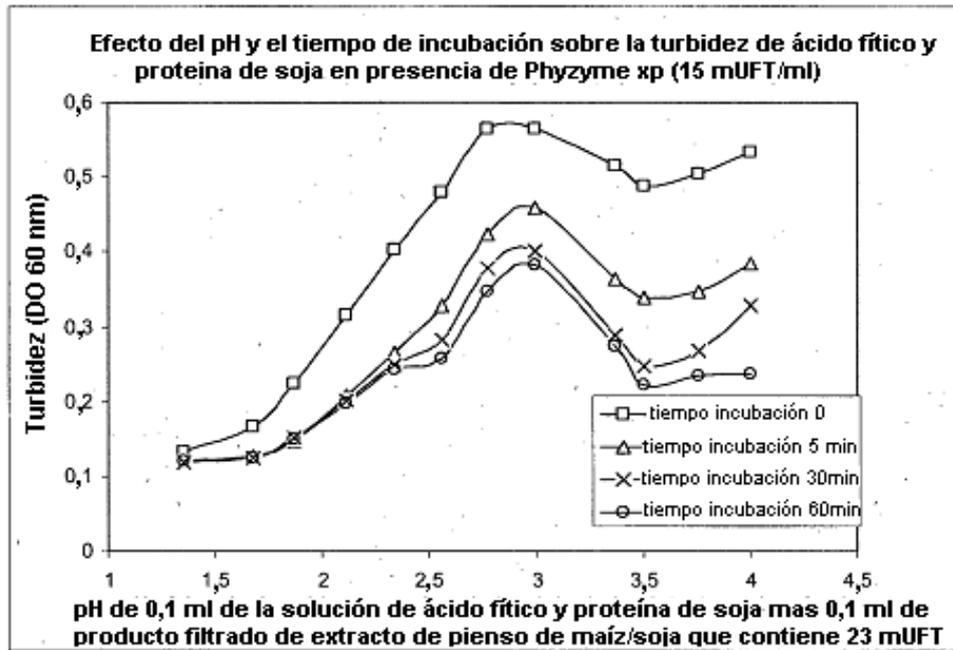


Figura 8a

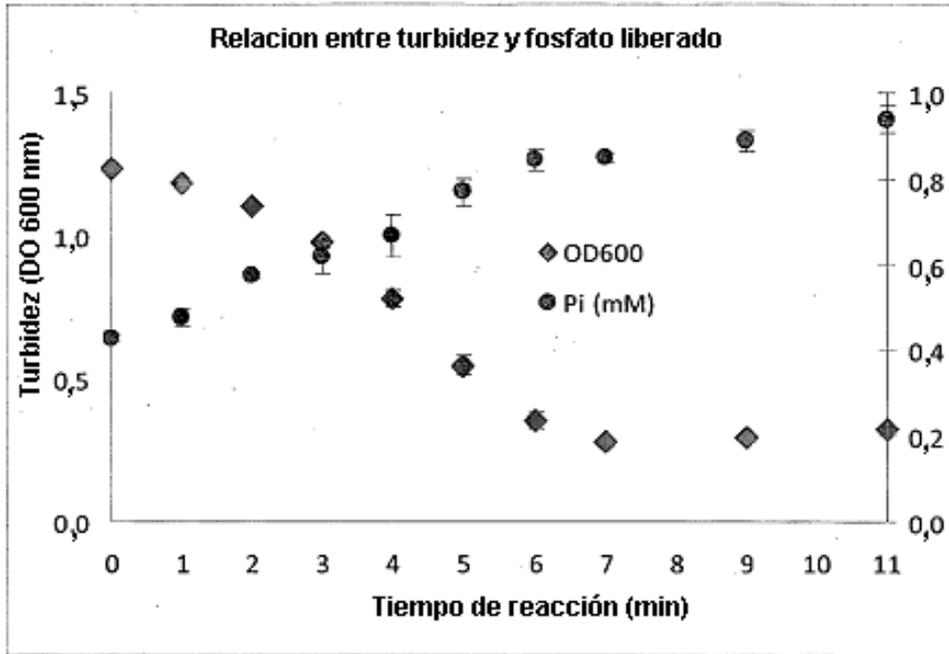


Figura 8b

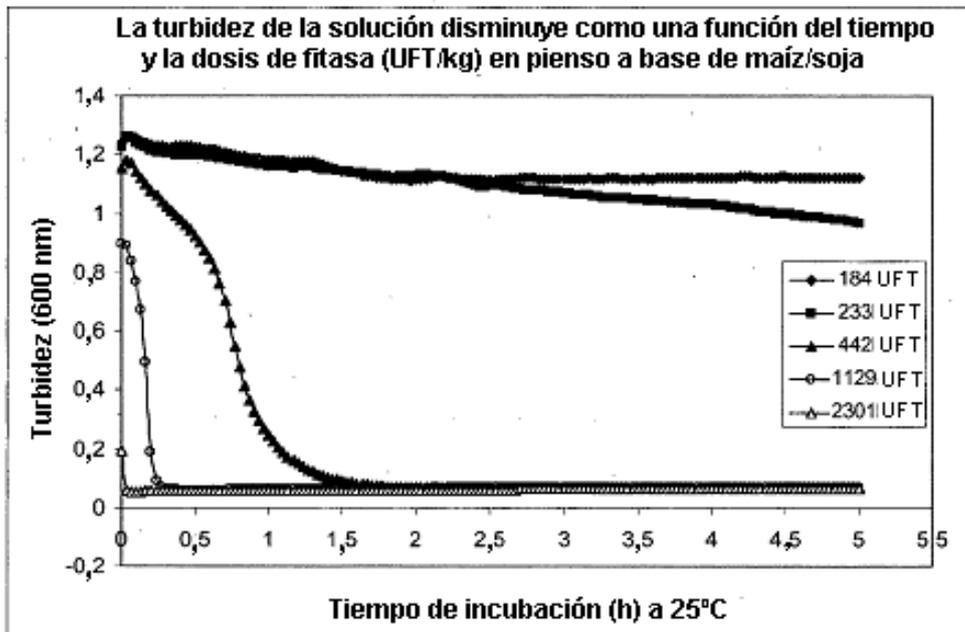


Figura 9

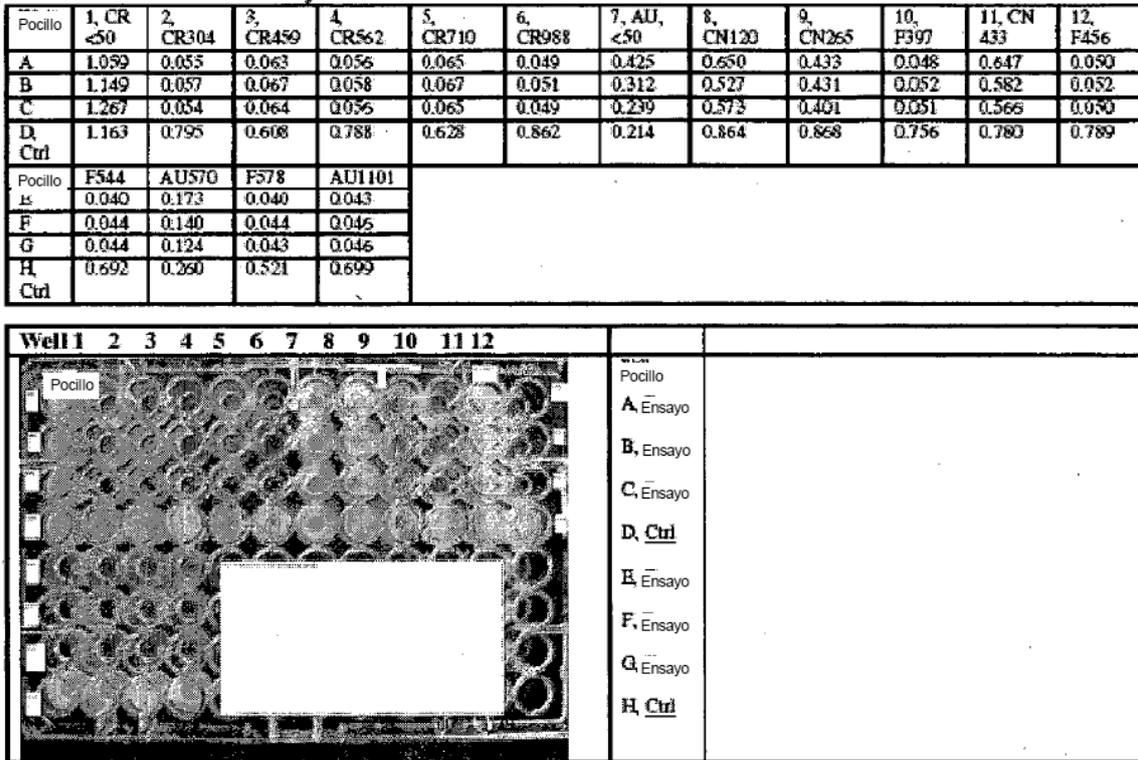


Figura 10

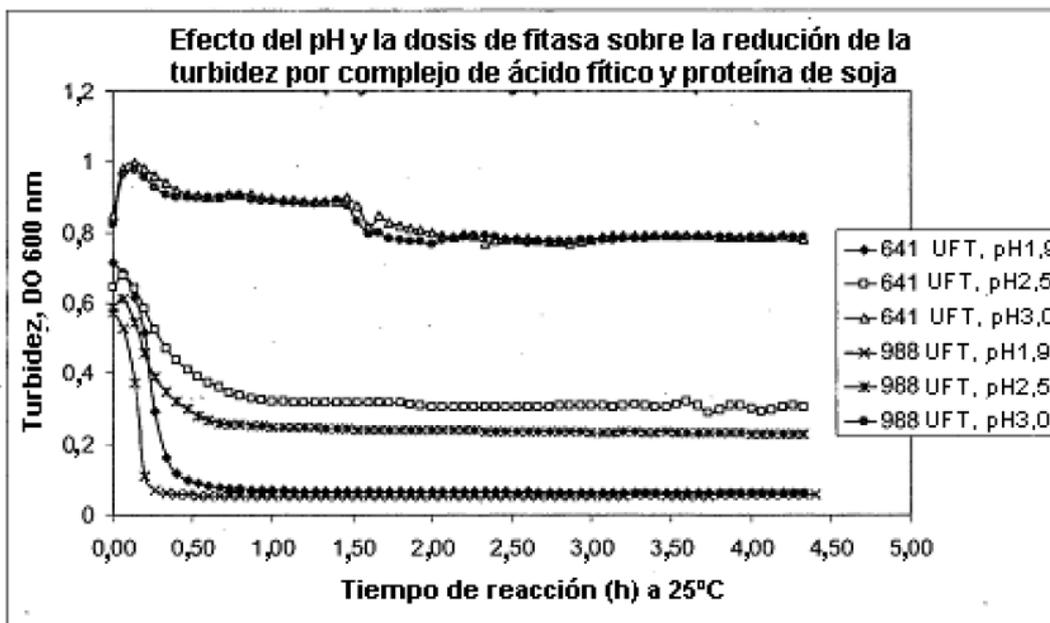


Figura 11a

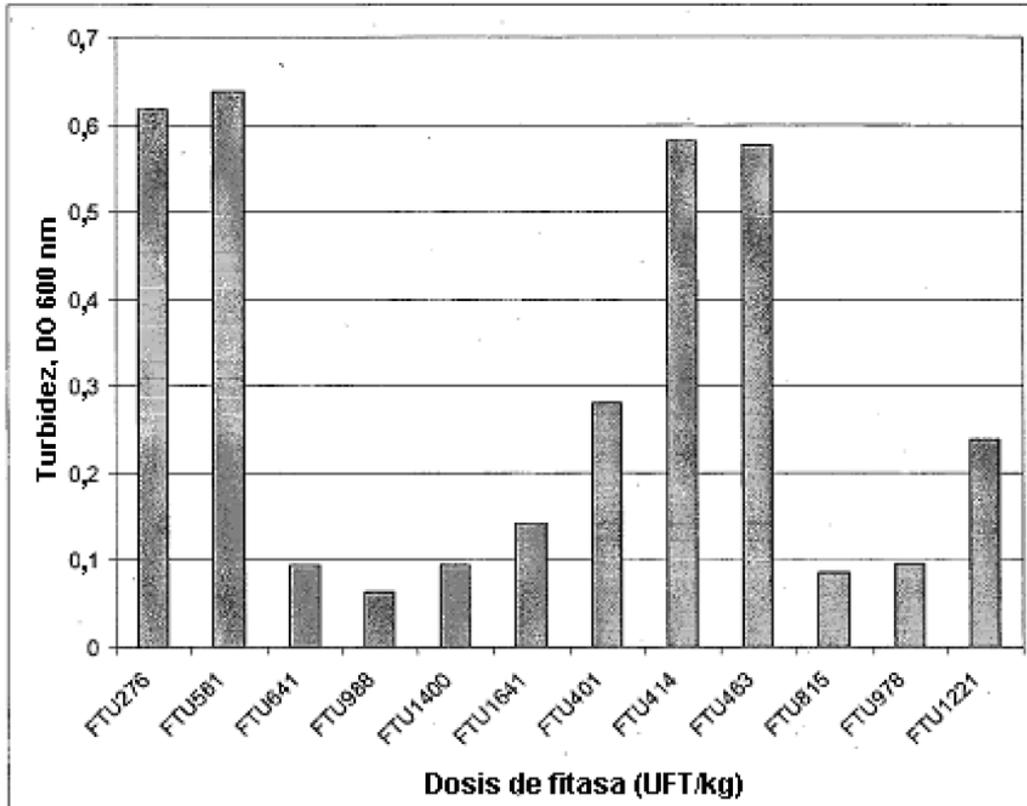


Figura 11b

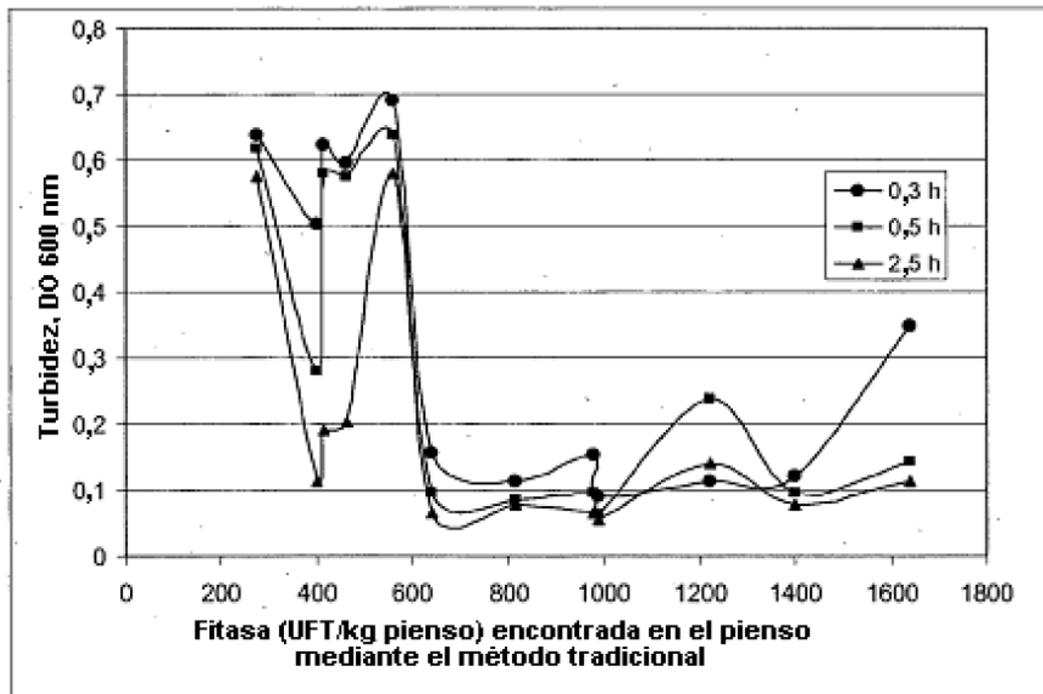


Figura 11c

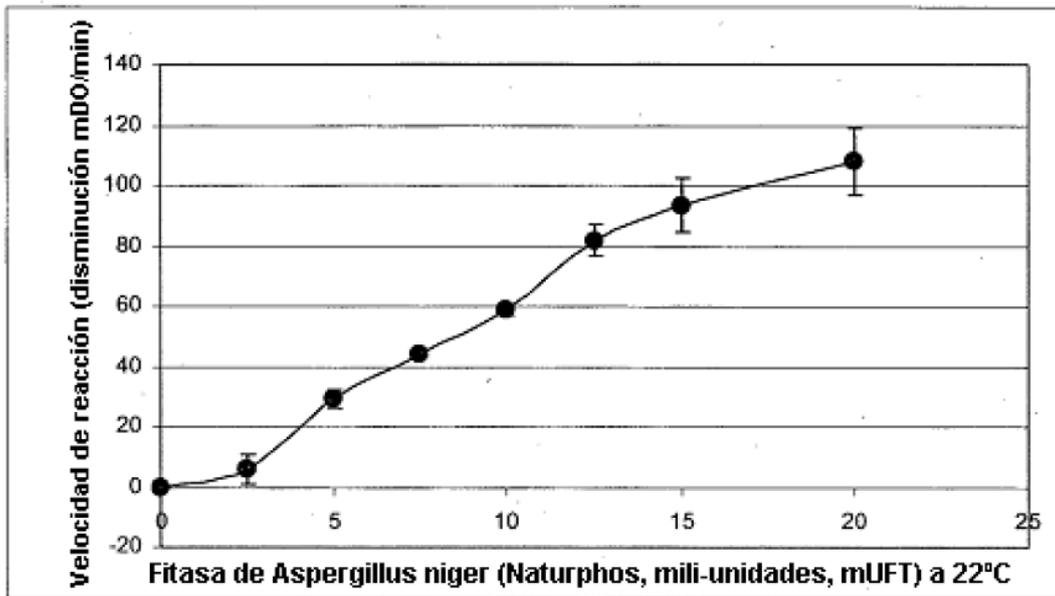


Figura 12a

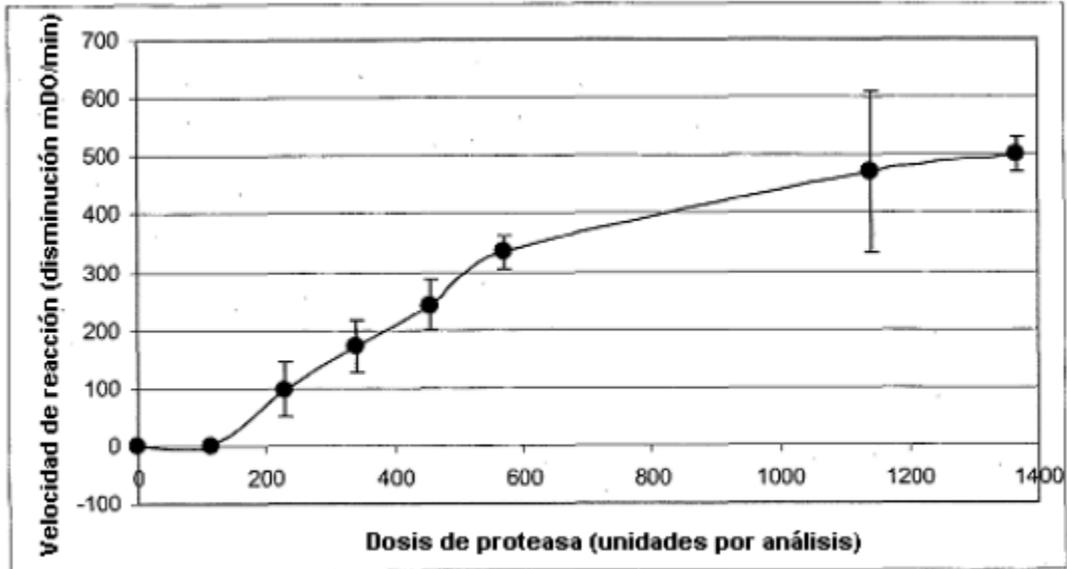


Figura 12b

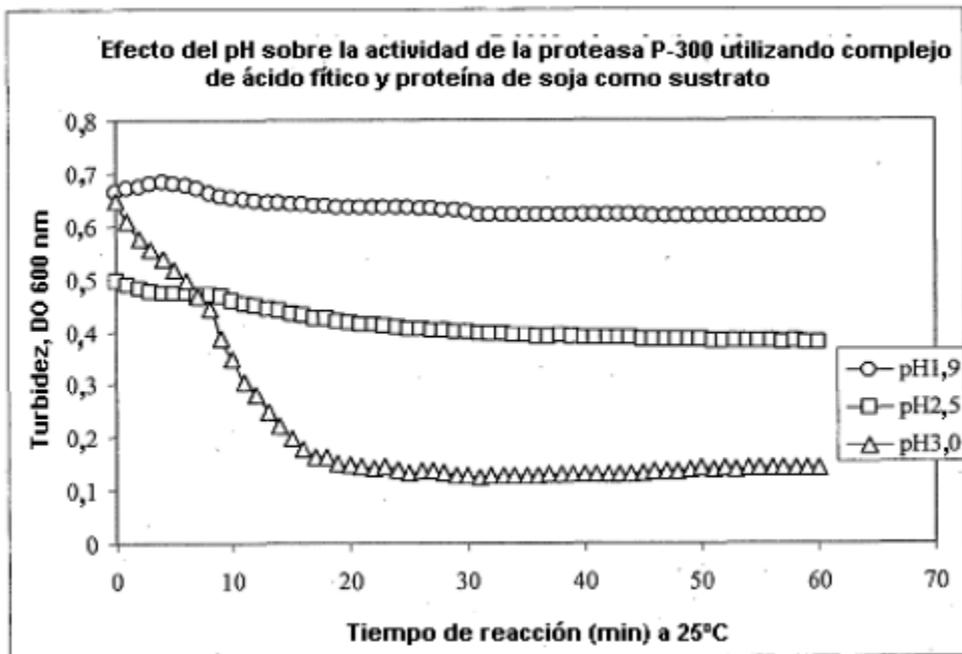


Figura 13

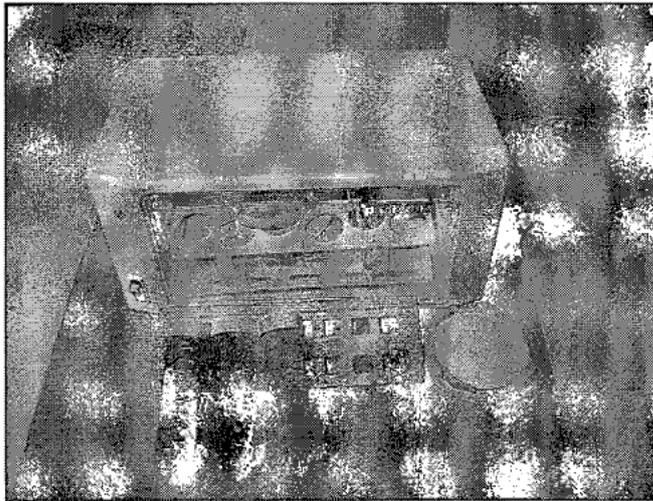


Figura 14

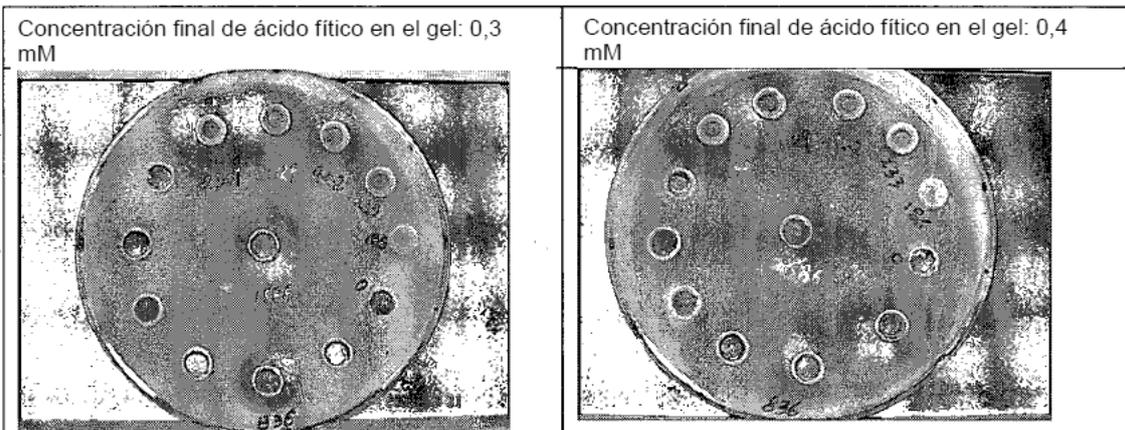


Figura 15

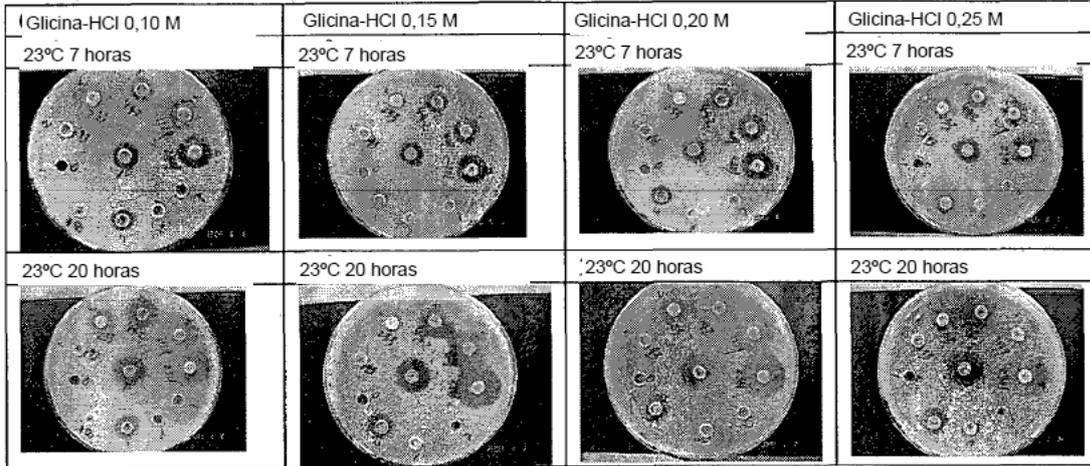


Figura 16

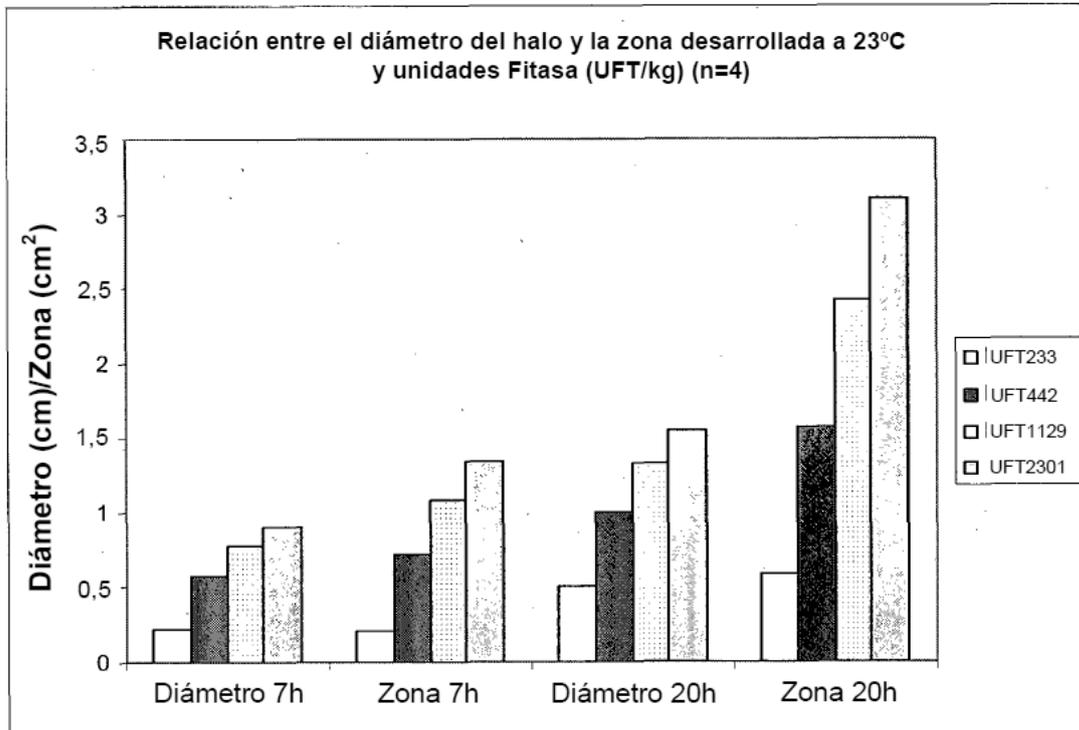


Figura 17

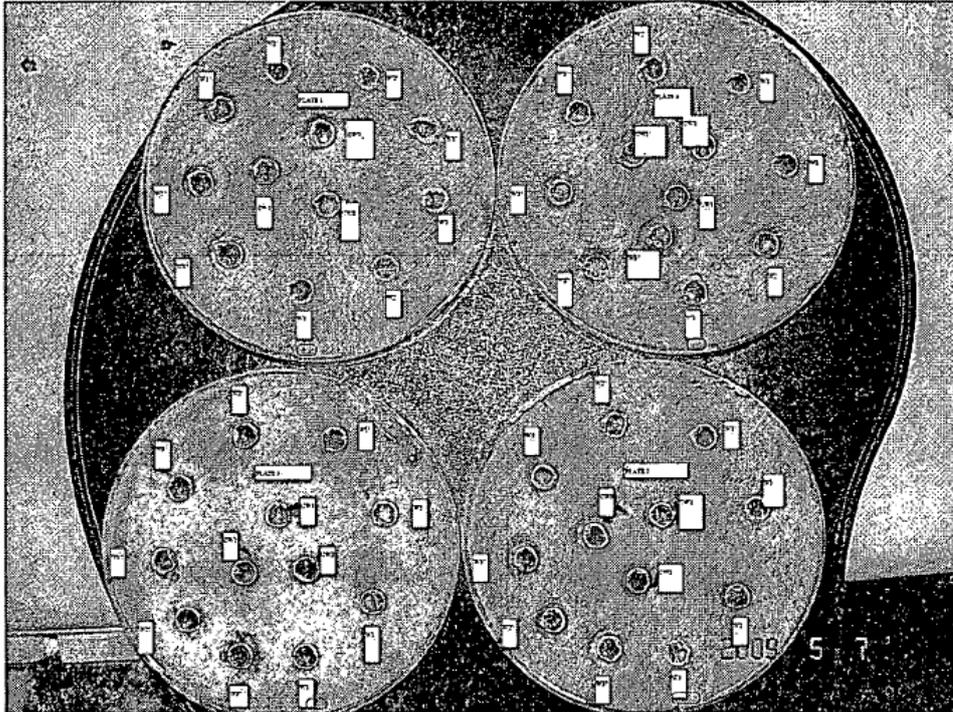


Figura 18

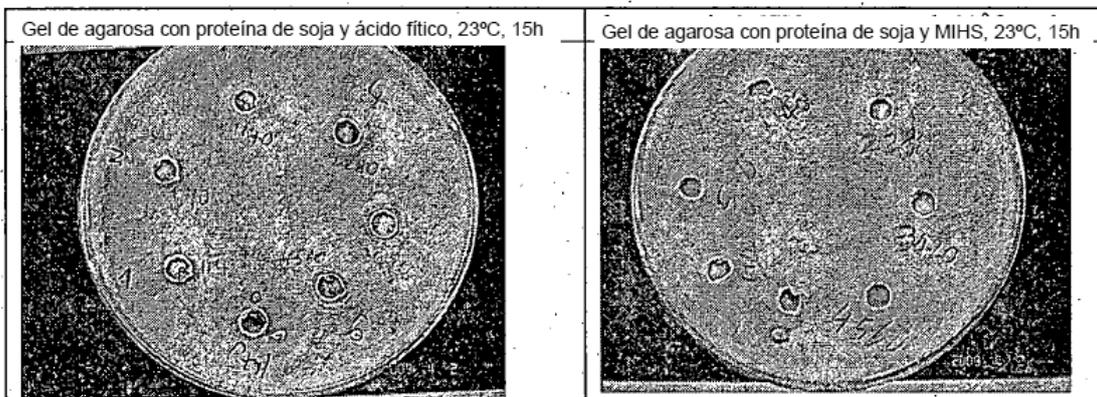


Figura 19

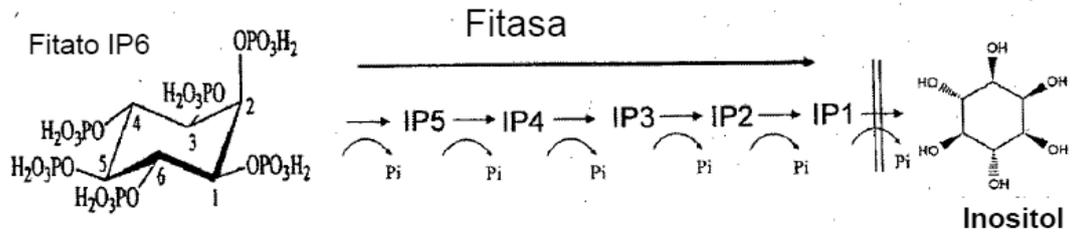


Figura 20a

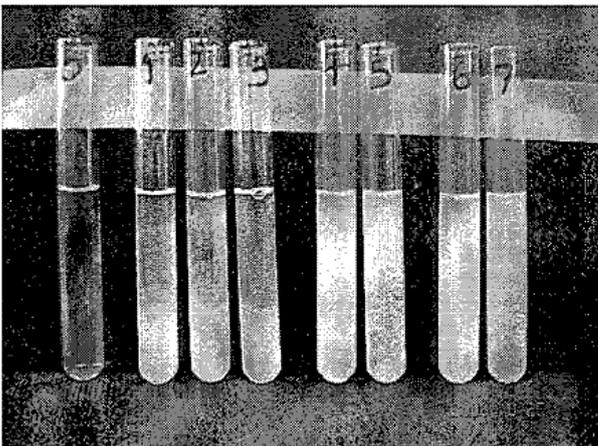


Figura 20b

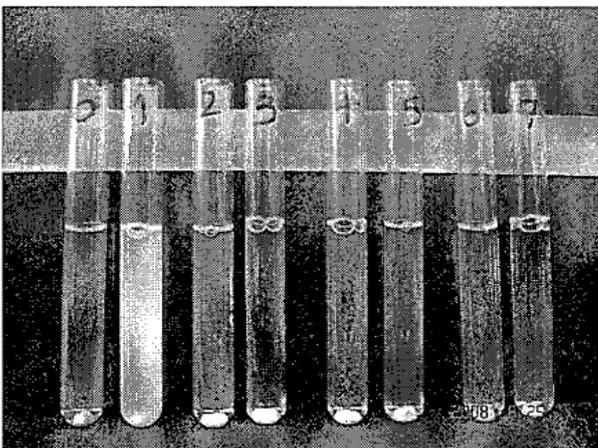


Figura 21

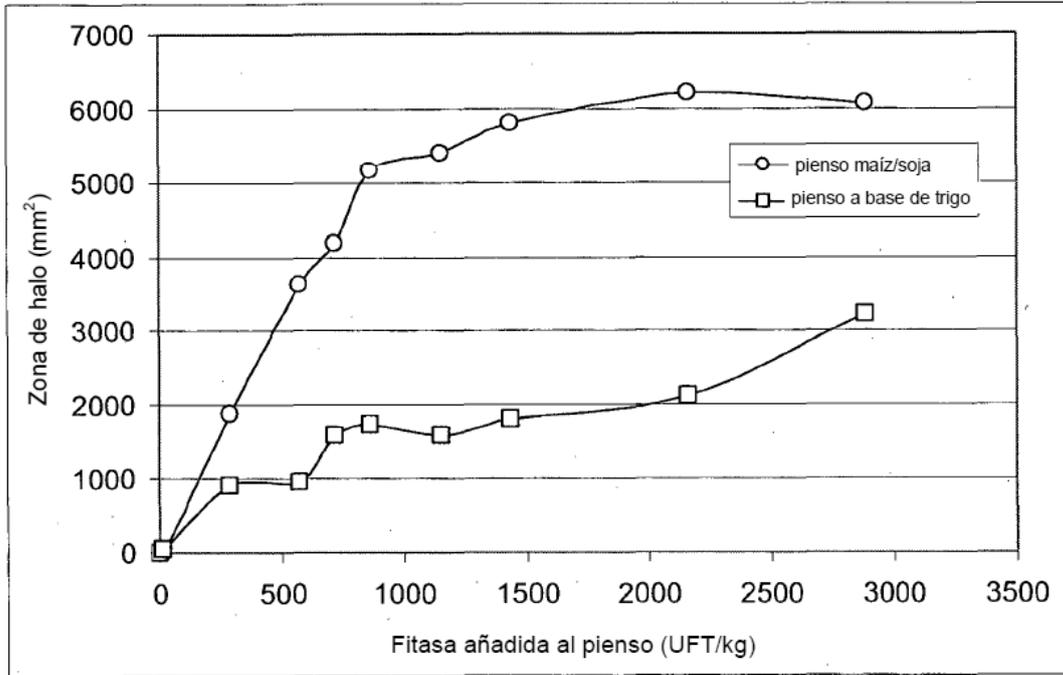


Figura 22

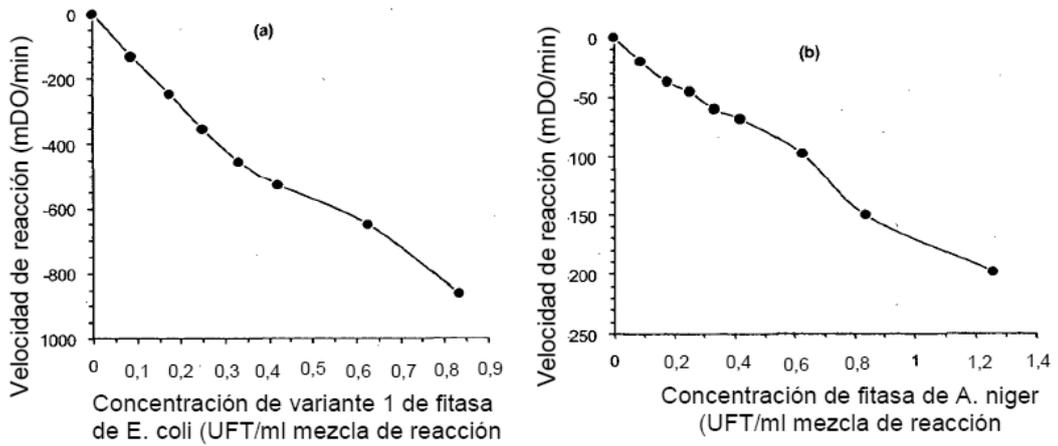


Figura 23

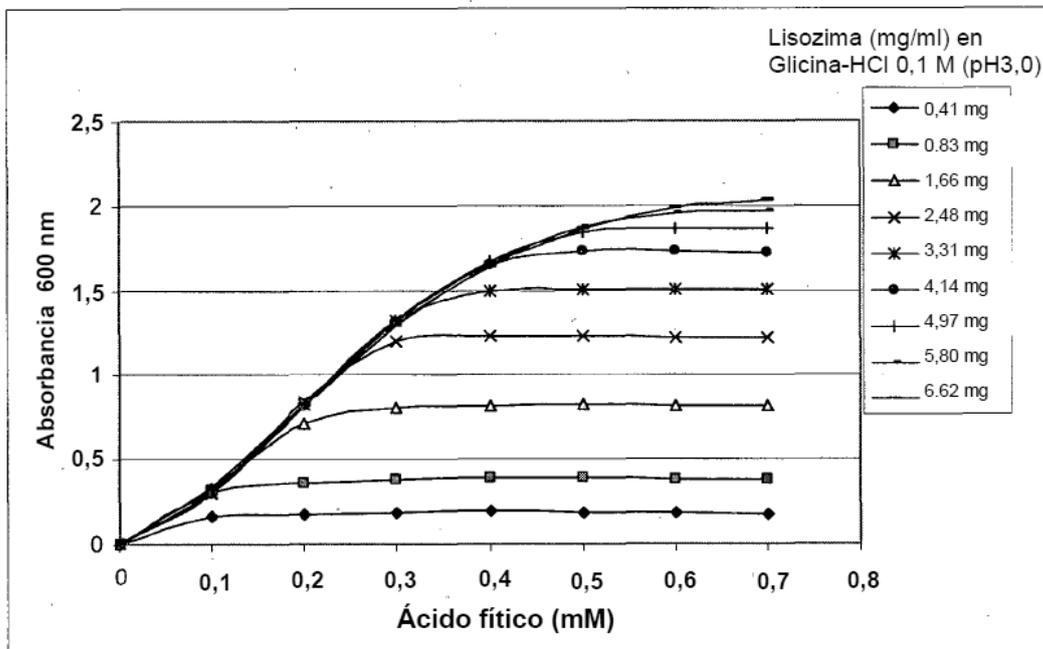
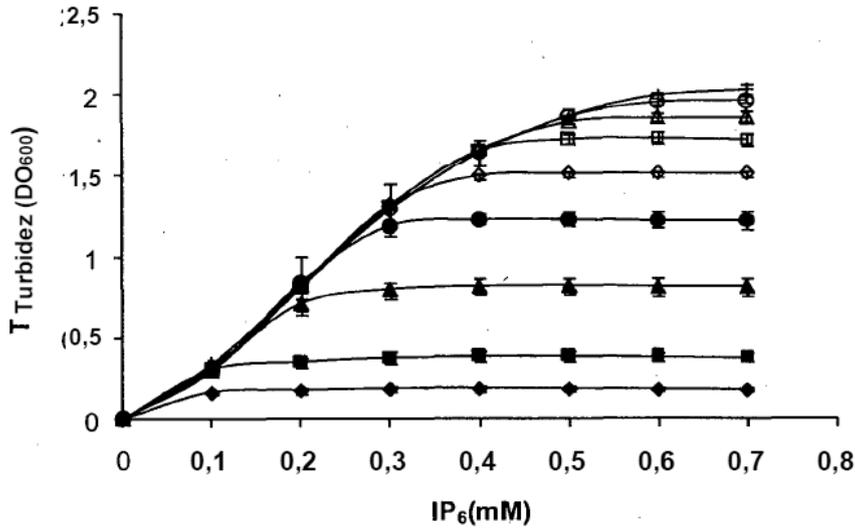


Figura 24

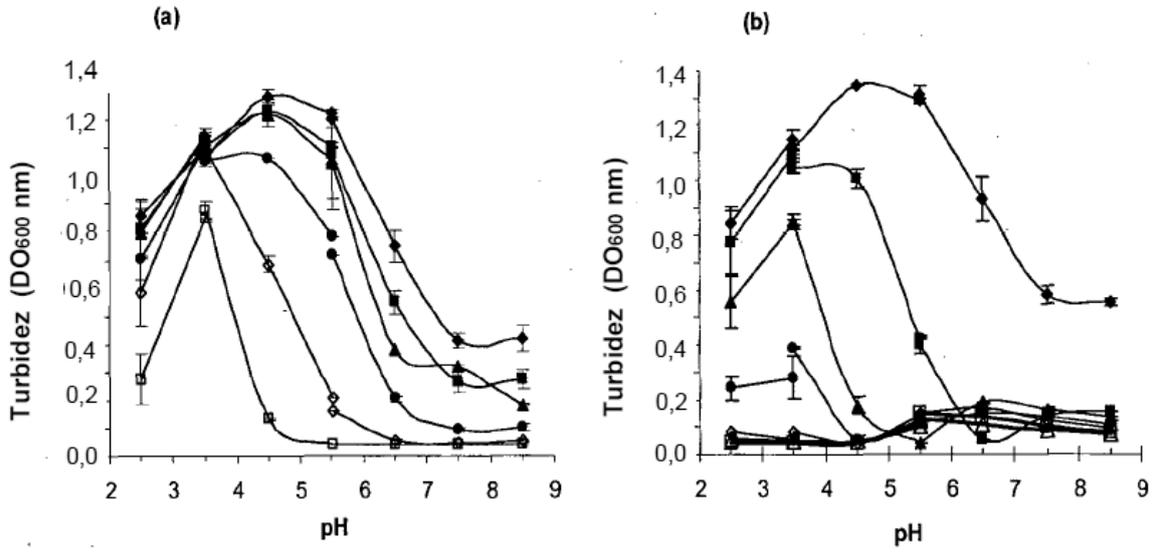


Figura 25

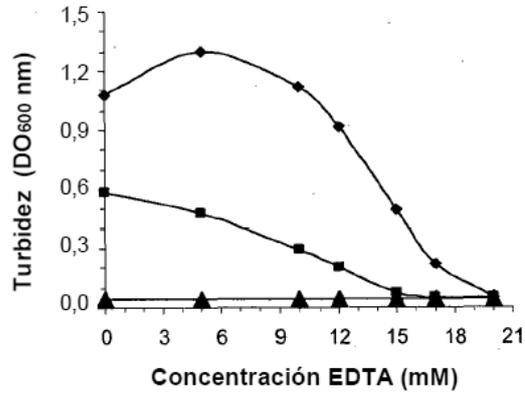


Figura 26

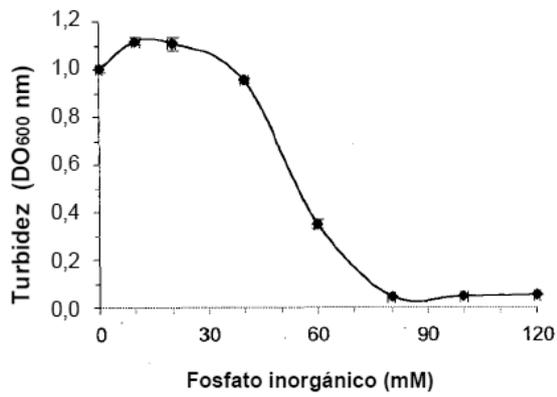


Figura 27

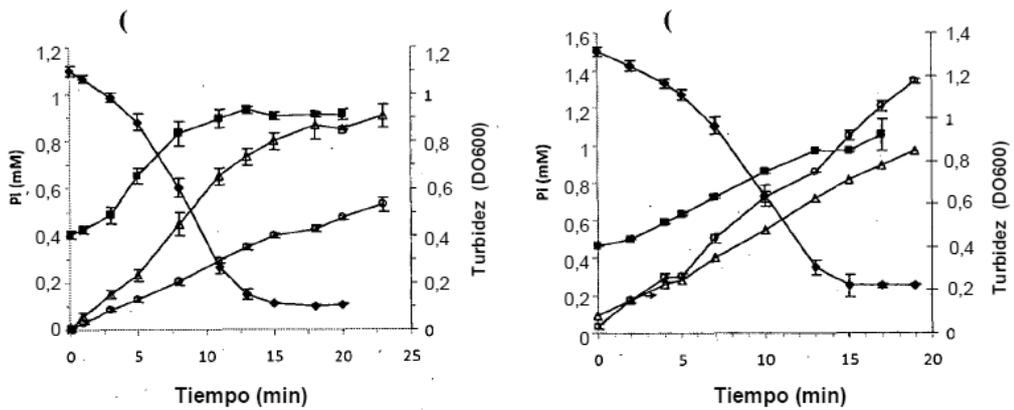


Figura 28

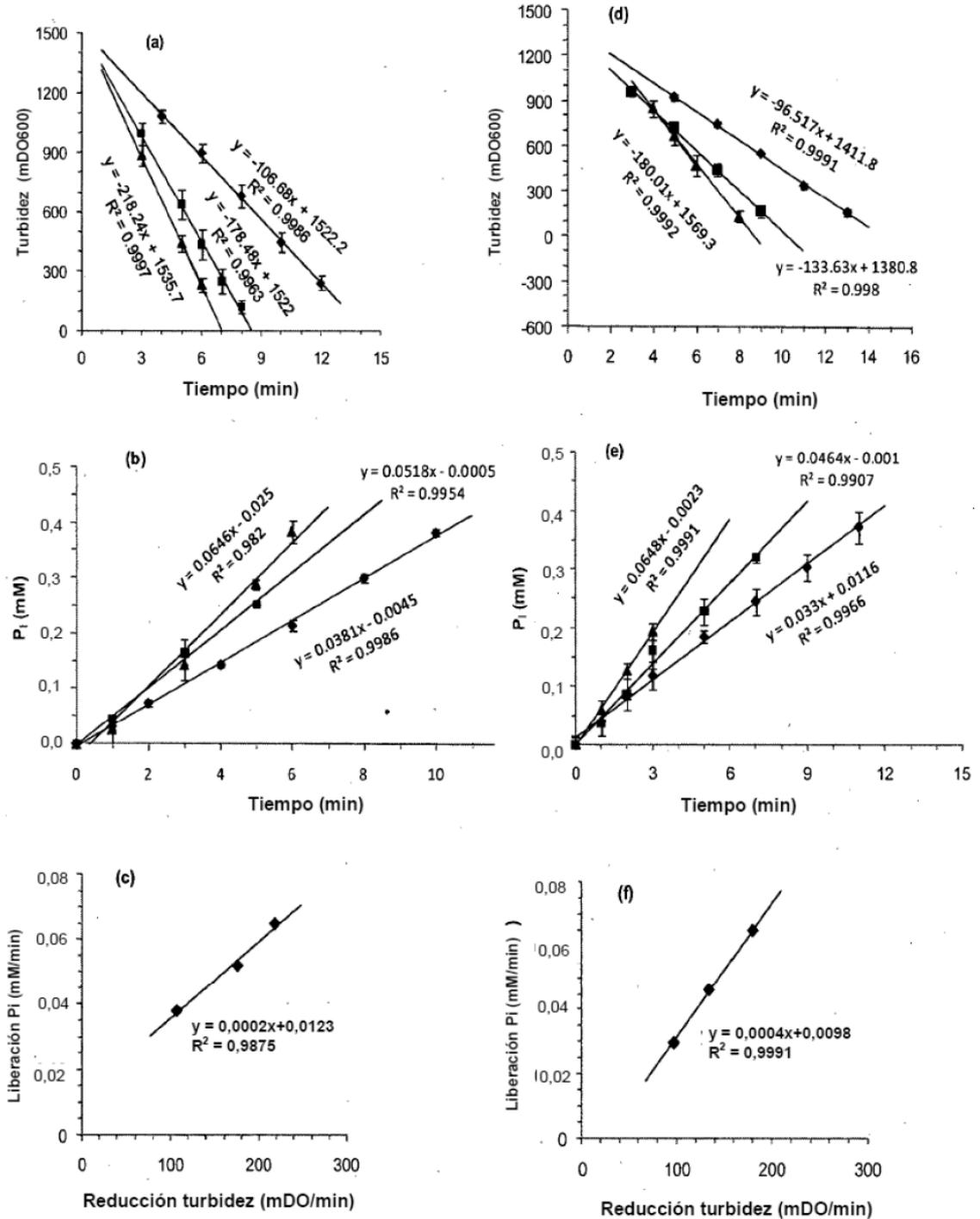


Figura 29

