

Producción de enzima fitasa de *Aspergillus ficuum* con residuos agroindustriales en fermentación sumergida y sobre sustrato sólido

Phytase production by *Aspergillus ficuum* in submerged and solid state fermentation using agroindustrial waste as support

Marcia Costa¹, Gerhard Lerchundi¹, Francisco Villarroel¹, Marcelo Torres¹, Renate Schöbitz¹

Resumen

Se describe la producción de fitasa mediante cultivos del tipo sumergido (SmF) y sobre sustrato sólido (SSF) con *Aspergillus ficuum* DSM 932 en medios de cultivos basados en residuos de la agroindustria. La actividad enzimática fitásica se usó como medida indirecta de la producción de la enzima. En SmF, pH 5,3 y 25 °C, se trabajó en fermentadores de diferentes volúmenes y con el mayor se operó con diferentes niveles de aireación y agitación. En SSF a 25 °C se usaron placas de Petri. En SmF con un medio basado en cereales se presentó la mejor actividad neta (0,25 FTU/mL) al sexto día para 300 rpm y 0,5 vvm. En SSF, la torta de canola resultó ser el mejor sustrato con una actividad fitásica neta máxima al tercer día de 6,79 FTU/mL de extracto, equivalente a 33,96 FTU/g de sustrato sólido o 56,43 FTU/g de sustrato seco. Aplicando tecnologías de membrana se concentró un extracto de fitasa a partir de una SmF en medio basado en cereales y también fue posible purificar 6,33 veces un extracto de fitasa producido en SSF con torta de canola, diafiltrando tres veces consecutivas el retenido de 100 kDa. La enzima fitasa de la cepa *A. ficuum* DSM 932 mostró tener un tamaño ≥ 100 kDa.

Palabras clave: fitasa, enzimas en piensos, *Aspergillus ficuum*, torta de canola, fermentación en sustrato sólido.

Abstract

Phytase production by submerged fermentation (SmF) and solid state fermentation (SSF) using *Aspergillus ficuum* DSM 932 in agro-waste-based culture media is described here. Phytase enzyme activity was used for the indirect measurement of enzyme production. Fermentation was carried out in SmF, pH 5.3 at 25 °C with two fermenters having different volumes; the largest one had different levels of aeration and agitation. Petri dishes were used for SSF at 25 °C. A cereal-based medium obtained the best net activity (0.25 FTU mL⁻¹) for

¹ Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia. Chile. mcosta@uach.cl . mecotalobo@gmail.com

SmF on the sixth day at 300 rpm at 0.5 vvm. Canola cake was the best substrate for SSF, having maximum net phytase activity on the third day: 6.79 FTU mL⁻¹ extract, equivalent to 33.96 FTU g⁻¹ solid substrate or 56.43 FTU g⁻¹ dry substrate. A phytase extract was concentrated from an SmF-based medium in cereals by applying membrane technologies. A phytase extract produced in SSF with canola cakes was purified 6.33 times using three consecutive diafiltrations of the 100 kDa retentate. *A. ficuum* DSM 932 phytase was \geq 100 kDa in size.

Keywords: phytase; feed enzyme, *Aspergillus ficuum*, canola cake, solid substrate fermentation.

Recibido: febrero 25 de 2009

Aprobado: junio 30 de 2009

Introducción

Un importante factor en la industria de alimentos para animales lo constituyen las fuentes proteicas vegetales que contienen ácido fítico (AF) y sus sales, por ser la principal forma de almacenamiento de fósforo (P) en cereales y leguminosas. En los animales “monogástricos” la presencia de enzimas fitasas degradantes de las formas en que se presenta el ácido fítico es nula o mínima en sus tractos gastrointestinales, lo que provoca que la baja biodisponibilidad del P presente en ingredientes de origen vegetal, sea un problema a nivel de este tipo de alimentación (Cromwell y Coffey, 1991; Tomshy et ál., 2000).

El ácido fítico presente en los piensos elaborados con proteínas vegetales se presenta como un factor antinutricional para los animales monogástricos, al formar complejos con proteínas y una variedad de iones metálicos, causando una disminución en la disponibilidad de estos nutrientes (Reddy et ál., 1982; Wodzinski y Ullah, 1996). Debido a estos problemas, hay mucho interés en la degradación enzimática de las formas en que se presenta el ácido fítico en los alimentos de origen vegetal (Wyss et ál., 1999). Por ello, el uso y la aplicación de la enzima fitasa se ha generalizado en la industria elaboradora de alimentos de aves y cerdos, como una estrategia para mejorar la biodisponibilidad de fosfato. A nivel comercial, se buscan alternativas económicas de producción de estas fitasas.

Las fitasas son enzimas que pertenecen a la subfamilia de las fosfatasas ácidas de alto peso molecular (Ullah y Gibson, 1987). La mayoría de las fitasas conocidas pertenecen a las 3-fitasas (EC 3.1.3.8) o 6-fitasas (EC 3.1.3.26) (Lassen et ál., 2001).

En relación con las fitasas bacterianas, se ha detectado que se producen por una gran variedad de estos microorganismos: *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas* sp. (Wodzinski y Ullah, 1996), *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. (Nagasihima et ál., 1999). Los inconvenientes de las fitasas bacterianas son su bajo rendimiento productivo y su pH neutro-alcalino que hacen prácticamente inútil su empleo como aditivos para piensos (Wodzinski y Ullah, 1996). Las fitasas de la flora microbiana del intestino grueso, aunque tienen actividad hidrolítica sobre los fitatos, no ejercen ningún efecto beneficioso para el animal porque el fósforo liberado no se absorbe y es totalmente excretado (Brenes et ál., 2002).

Dentro de las fitasas producidas por hongos se destacan las de levaduras como *Schwanniomyces Castellii*, *Saccharomyces cerevisiae* (Nagasihima et ál., 1999) y las producidas por hongos como *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Emericella nidulans*, *Myceliophthora thermophila* y *Talaromyces thermophilus* (Wyss et ál., 1999). *Aspergillus ficuum* produce la fitasa extracelular más activa (Wodzinski y Ullah, 1996) y por ello es el organismo más utilizado en la producción industrial de fitasas comerciales (Brenes et ál., 2002). Estos

hongos producen enzimas extracelulares del tipo 3-fitasa con capacidad hidrolítica del AF sobre el grupo ortofosfato situado en posición 3 de la molécula, dando lugar a D-mioinositol 1,2,4,5,6-pentaquisfosfato y una molécula de ortofosfato (Brenes et ál., 2002). Estas fitasas no hidrolizan completamente el AF, pues son incapaces de degradar el éster monofosfórico del inositol monofosfato (Wodzinski y Ullah, 1996).

La producción comercial de la enzima fitasa fúngica del género *Aspergillus* ha sido lograda tradicionalmente con diversos sustratos y medios a través de cultivos del tipo sumergido (SmF) y más recientemente en modalidad de fermentación sobre sustrato sólido (SSF) (Bogar et ál., 2003; Ramachandran et ál., 2005; Chantasartramee et ál., 2005; Roopesh et ál., 2006).

La fermentación sobre sustrato sólido (SSF), si bien presenta varias ventajas sobre la SmF, debido a la complejidad que reviste su naturaleza heterogénea, muestra desventajas asociadas al modelamiento para el escalamiento y el control de las operaciones y variables del proceso (Pérez-Guerra et ál., 2003).

En el presente documento se describe la producción de fitasa en SSF y SmF a partir de medios de cultivos basados en desechos y otros subproductos de la agroindustria, además de la breve descripción de la concentración y purificación parcial de dos extractos enzimáticos producidos en estos medios.

Materiales y métodos

Sustratos y medios de cultivo

Los sustratos usados en esta investigación fueron seleccionados por su mínimo o nulo valor comercial al tratarse de subproductos, productos de descarte, residuos o desechos de la agroindustria, a saber: harina gruesa de maíz, afrechillo de trigo, torta de canola y pomaza de cranberries. La idea central fue probar su efectividad en la producción de enzimas con miras a agregarles valor.

Todas las fermentaciones se realizaron con los medios detallados en la tabla 1 luego de ser esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo

Ingrediente ↓	SmF ¹	SSF		
	①Base cereal, g/L	②Base cereal, g/placa 110 mm	③Base canola, g/placa 150 mm	④Pomaza cranberries, g/placa 150 mm
Harina gruesa de maíz	5	10; 180		
Torta de canola			65	
Pomaza cranberries				150
Afrechillo de trigo	2,5	4,5; 80		
Harina integral de trigo	2,5	4,5; 80		
Sulfato de amonio	0,5	1; 18	3	3
Base seca sustrato ² , g Ss/g S (%)	0,9975	62,5	60,18	60,99

¹ Se aforó a 1 L con agua

² (Gramos de sustrato seco/gramos de sustrato total ya inoculado) x 100

Cepa y preparación de inóculo

El microorganismo usado para la producción de fitasa en todas las fermentaciones realizadas fue la cepa *Aspergillus ficuum* DSM 932 (*A. niger* NRRL 3135).

El inóculo primario se obtuvo a partir de una suspensión de las esporas extraídas desde una placa de cultivo del hongo (figura 1-A) de ≈ 20 días a 25 °C de Agar Papa Dextrosa (Merck), lo que resultó en una concentración de $3,5 \times 10^5$ esporas/mL.

Los ensayos en SmF fueron inoculados al 10% luego de una primera propagación realizada en un medio líquido denominado caldo de activación (Bacto-Dextrosa 20 g/L, Difco y Extracto de Levaduras 4 g/L, Difco) al 1% desde el inóculo primario.

En los ensayos en SSF con sustrato base cereal se usaron placas de 110 mm de diámetro inoculadas con 10 mL de una suspensión de micelio de morfología pellet de ≈ 1 mm de diámetro (pellet₁) proveniente de esporas germinadas en caldo de activación (180 rpm a 25 °C, 20 h) sembradas al 1% desde el inóculo primario, lo que resultó en $\approx 3,5 \times 10^4$ pellet₁/placa de 110 mm de diámetro que contenían 20 g de la mezcla de cereal, es decir, ≈ 1750 pellet₁/g.

Por otra parte, los cultivos SSF sobre canola y pomaza de cranberries también fueron inoculados con micelio germinado de morfología pellet (figura 1-B) pero de ≈ 3 mm de

diámetro (pellet₃ de 180 rpm a 25 °C, 36 h), alcanzándose en cada oportunidad al inicio del proceso un número de éstos de ≈ 120 pellet₃/placa de 150 mm de diámetro con 65 g de torta de canola seca, lo que resulta en ≈ 2 pellet₃/g.

Medición de actividad

La actividad enzimática fitásica se usó como medida indirecta de la producción de la enzima por parte del *A. ficuum*. Se definió como producción neta a la diferencia de actividad obtenida en el tiempo de muestreo y actividad inicial (tiempo 0) que corresponde a actividad fitásica nativa o endógena del sustrato.

La actividad fitásica se determinó mediante el método descrito por Harland y Harland (1980) modificado, el cual hace uso del reactivo de Taussky - Shorr, que permite detectar el fosfato inorgánico (Pi), a través de la medición de la absorbancia a 660 nm producida por el sulfato ferroso formado durante la reducción del ácido fosfomolibdico a partir del fosfato inorgánico en disolución (Taussky y Shorr, 1953). La mezcla de reacción contempla 1,0 mL MgSO₄ 0,1M en buffer acetato 0,2 M pH 5,15, 0,6 mL del extracto con la enzima (muestra) y 2,4 mL de solución de ácido fítico 6,82 mM en buffer acetato 0,2 M pH 5,15, mezcla que se incubaba en un baño de agua termostático a 55° C durante 60 min; transcurrido el periodo de incubación se agregan 0,5 mL de ácido tricloroacético al 10% y 1,0 mL agua destilada; se

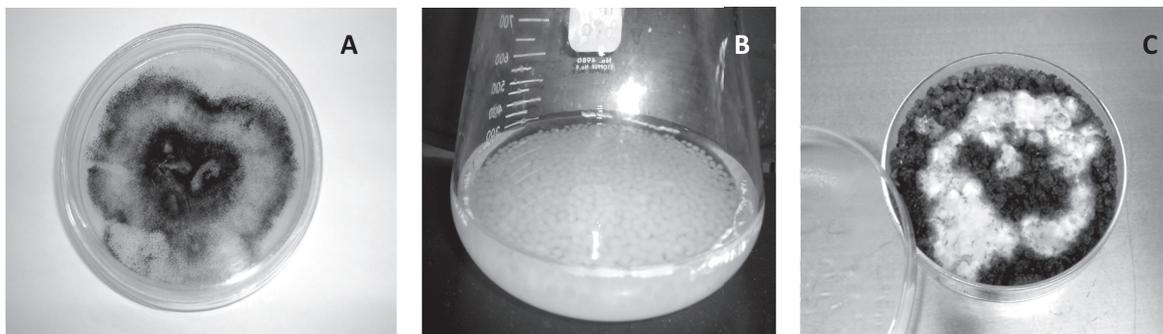


Figura 1. Aspecto del hongo *Aspergillus ficuum* DSM 932. A. en agar papa dextrosa; B. inóculo, micelio en morfología de pellet; C: en SSF sobre torta de canola.

refrigera durante 20 min y se agregan 2,4 mL del reactivo de Taussky y Shorr, procediendo a medir la absorbancia a 660 nm luego de 30 min. La curva de calibración se obtiene utilizando un rango de 1,00 a 0,04 $\mu\text{mol/mL}$ de Pi a partir de una solución de KH_2PO_4 , con lo cual se define una unidad de actividad de fitásica (FTU) como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μmol de fósforo inorgánico por minuto, bajo las condiciones del ensayo.

Se determinó la actividad de las muestras de SmF del caldo de cultivo libre de sólidos (sobrenadante de 7500xG, 10 min, 4 °C) y del extracto crudo de SSF (figura 2). Los resultados se expresan en FTU en el extracto para el caso de SSF o caldo libre de sólidos para el caso de SmF (FTU/mL), y en FTU por gramo de sustrato sólido seco (FTU/g Ss).

Fermentación en sustrato sólido (SSF)

Las fermentaciones en estado sólido se efectuaron con diferentes medios, en dos modalidades a 25 °C. Se usaron placas de Petri de 110 mm de diámetro con el medio ② y de 150 mm con los medios ③ y ④ (figura 1-C), ubicadas dentro de una cámara de cultivo a $25 \pm 0,1$ °C con circulación de aire filtrado y humidificado a saturación. Se usaron placas de Petri al igual que otros autores (Blandino et ál., 2005; Yang et ál., 2001; Botella et ál., 2007). Cabe señalar que en cada oportunidad, junto a la inoculación se agregó agua destilada estéril para lograr una humedad de 37 a 40% al inicio del proceso. Los ensayos en SSF se efectuaron en triplicado, tomándose muestras diarias a la misma hora y en forma aleatoria sobre cada placa; las determinaciones de actividad fitásica se realizaron a extractos crudos obtenidos como se indica en la figura 2.

Fermentación sumergida (SmF)

Se realizaron fermentaciones en modalidad de cultivo sumergido en duplicado en dos tamaños diferentes, a saber, de 0,8 L y de 11 L, durante 6 días. En ambos se usó el medio de cultivo detallado en ① de la tabla 1, operados a

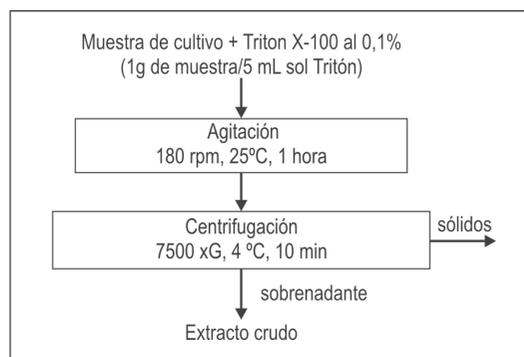


Figura 2. Diagrama del proceso de obtención del extracto crudo a partir de las muestras de cultivo SSF

pH 5,3 y 25° C. Para las fermentaciones de volumen menor se usó un fermentador modular de sobremesa (Gallekamp, FB2-200-W) de 1 L, con 0,8 L, agitación constante de 200 rpm y aireación de 1 vvm, y para las de volumen mayor un fermentador Microferm (New Brunswick Sci. Co., USA) de 14 L, con 11 L, operando a velocidades del rotor de 200 y 300 rpm y la aireación de 0 y 0,5 vvm. Se tomaron muestras diarias del cultivo a la misma hora durante una semana, las que fueron centrifugadas a 7500 x G, 10 min, 4° C y se determinó la actividad enzimática al sobrenadante (caldo de cultivo libre de sólidos). Todos los ensayos y análisis se realizaron en duplicado, siendo la variable de respuesta la actividad enzimática presente en el caldo de cultivo libre de sólidos en FTU/mL (e.d. por mL de caldo).

Los resultados fueron analizados mediante un Andeva multifactorial en donde los factores fueron velocidad del rotor, aireación y tiempo, siendo la variable de respuesta la actividad enzimática.

*Obtención de extractos concentrados de fitasa de *A. ficuum**

Un primer concentrado fue obtenido desde el caldo de SmF que fue filtrado a través de una tela de muselina y microfiltrado (0,45 μ) usando un equipo Spintrex™ (New Brunswick Sci. Co., USA) operado en modalidad de batch

con recirculación; posteriormente, el permeado fue ultrafiltrado dos veces usando un equipo Millipore con membranas de polietersulfona de 150 mm de diámetro primero de 100 kDa de cut-off, determinándose la actividad enzimática en cada etapa.

Un segundo concentrado, esta vez semipurificado, se logró a partir de un extracto crudo desde una SSF en canola, el cual fue microfiltrado ($0,45 \mu$) y ultrafiltrado-diafiltrado $\times 3$ en una celda de ultrafiltración (Amicon 8050, Millipore USA) con membranas polietersulfona de 45 mm de diámetro y 100 kDa de cut-off, esto último con la finalidad de purificar parcialmente el extracto enzimático; se determinó la actividad enzimática y la actividad específica midiendo la concentración de proteínas (Bradford), en cada etapa. La figura 3 muestra el esquema de ambos procesos.

Resultados y discusión

Fermentación en sustrato sólido (SSF)

Los resultados de las fermentaciones en SSF en placas se presentan en la figura 4, donde es posible apreciar las notables diferencias

en los niveles de actividad fitásica logrados con los diferentes sustratos; es así como la torta de canola resultó ser el mejor sustrato (6,79 FTU/mL de extracto, equivalente a 33,96 FTU/g S de sustrato sólido o 56,43 FTU/g Ss de sustrato seco), superando 10 veces a lo alcanzado en el medio base cereal (0,695 FTU/mL⁻¹ de extracto, equivalente a 5,56 FTU/g Ss). Igualmente, es posible apreciar que sobre canola la máxima actividad se alcanzó al tercer día, un día antes que sobre el medio base cereal, y ocho días antes que sobre pomaza de cranberries. Se logró la mayor producción en canola no obstante la menor concentración de inóculo aplicada, concordando con Krishna y Nokes (2001) que señalan que el tamaño del inóculo no interfiere en la producción de la enzima. Es probable que el retraso de un día en las placas sobre sustrato cereal en alcanzar el máximo de producción se deba al estado de madurez del inóculo (pelleti). Sobre canola se observó sólo un leve decaimiento en la actividad luego de alcanzar el máximo de producción menor a lo observado por Ramachandran et ál. (2005).

Bogar et ál. (2003) realizaron ensayos en SSF con *A. ficuum*, *M. racemosus* y *R. oligosporus*, sobre distintos sustratos, a saber, torta de ca-

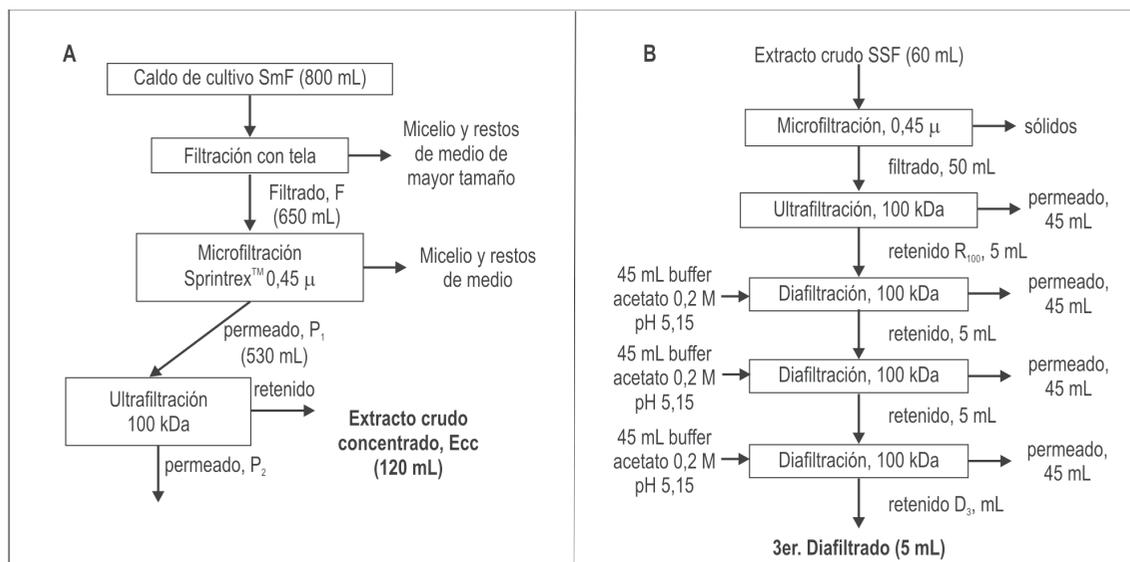


Figura 3. Diagramas del proceso de obtención de extractos de fitasa concentrados. A) A partir de una fermentación en SmF, base cereal. B) A partir de una SSF en canola.

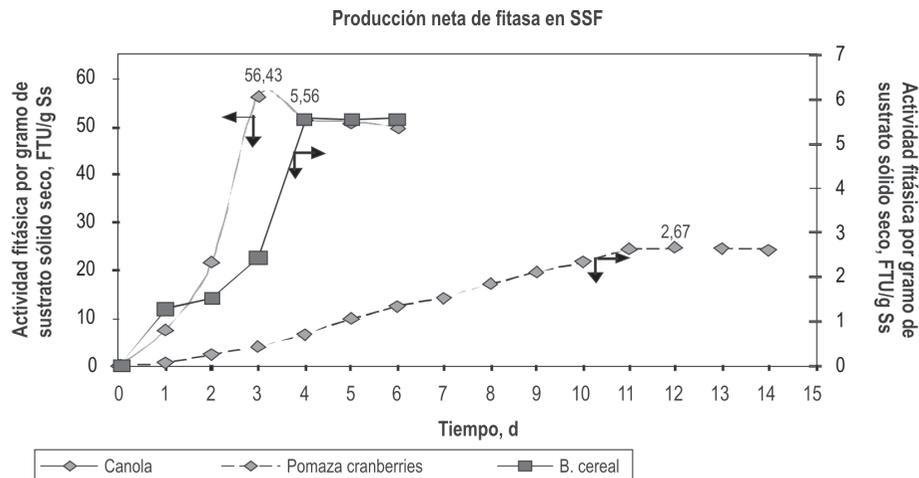


Figura 4. Evolución de la actividad fitásica neta en fermentaciones sobre sustrato sólido (SSF) con tres diferentes sustratos, torta de canola, base cereal y pomaza de cranberries.

nola, salvado de trigo, maíz y soya chancados, obteniendo los mayores niveles de actividad fitásica con *A. ficuum* sobre torta de canola con 60% de humedad al cuarto día, pero con niveles de actividad inferiores a los obtenidos en la presente investigación. Así mismo, Chantasartramee et ál. (2005) en SSF de *A. oryzae* sobre medio basado en un triturado de soya (77%) y harina de arroz (23%), lograron un máximo de 16 FTU/g al cuarto día. Así también, Roopesh et ál. (2006) en SSF con diversos sustratos y combinación de ellos, lograron un máximo de 30 FTU/gSs (por g de sustrato seco) al tercer día con torta de sésamo y 32,2 FTU/gSs también al tercer día con una mezcla 1:1 de torta de sésamo con paja de trigo, aunque esta última como sustrato individual resultó 3,5 veces menor. Comparando esos resultados con los de la presente investigación (donde se determinó actividad enzimática con el mismo método) y al referirlos sobre la misma base, lo logrado es de 56,43 y 5,56 FTU/gSs para torta de canola y medio base cereal, respectivamente, confirmando la excelente capacidad de la torta de canola. Se presentó actividad fitásica neta tardía de 2,64 FTU/gSs en la pomaza de cranberries, no obstante que se trata de un residuo muy pobre en nutrientes y con una elevada acidez.

Fermentación sumergida (SmF)

La figura 5 muestra los resultados obtenidos en las fermentaciones sumergidas de *A. ficuum* efectuadas con el medio base cereal respecto de la actividad enzimática neta obtenida en el caldo de cultivo. Los mayores niveles se logran al sexto día para los cultivos de mayor volumen. En el análisis estadístico se aplicó un Andeva multifactorial a los datos obtenidos y sus repeticiones para actividad enzimática, lo que indicó que existen diferencias significativas entre las muestras evaluadas con un 95% de confiabilidad, y al aplicar el Test de Rangos Múltiples mostró que al sexto día, con 300 rpm y 0,5 vvm, se logró la mayor actividad enzimática.

Papagianni et ál. (2001), a partir de una SmF con *A. ficuum* utilizando un medio semi-sintético lograron al máximo nivel de actividad al cuarto día, y Gargova y Sariyska (2003) con *A. niger* en un medio líquido basado en almidón de maíz lograron los máximos niveles de actividad al séptimo día, habiendo inoculado con esporas sin germinar. Estos últimos investigadores encuentran una relación directa entre la edad de las esporas y los niveles máximos de actividad logrados. Bhavsar et ál. (2009) en SmF con residuos agrícolas pretratados para

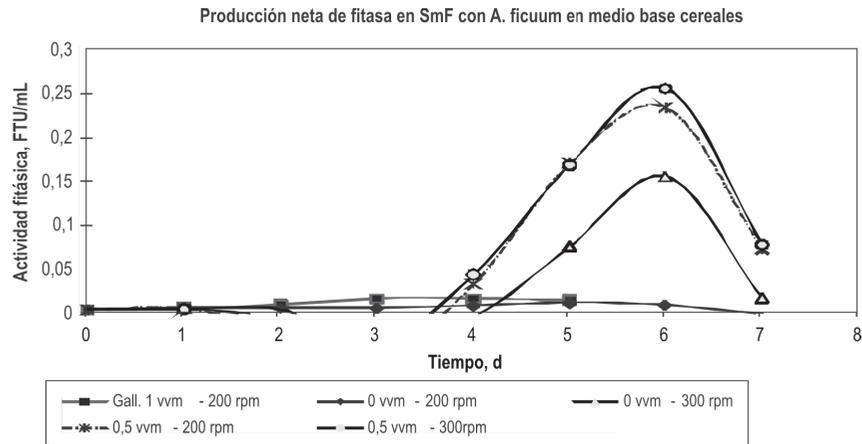


Figura 5. Evolución de la actividad fitásica neta en cultivos de *A. ficuum* en SSF, ensayos realizados en Microferm con 11 L a 0 y 0,5 vvm, y en fermentador Gallenkamp con 0,8 L a 1 vvm.

rebajarles el contenido de fósforo inorgánico logran los máximos niveles de actividad fitásica en el décimo primer día para salvado de trigo y maíz, sustrato similares a los usados en esta investigación.

Productividad

La tabla 2 resume los resultados obtenidos en SmF y SSF para alcanzar la máxima actividad fitásica, el periodo de tiempo empleado y la productividad volumétrica. En SmF, no

obstante el retraso de 3 días, la mayor productividad volumétrica se logra a escala mayor. En tanto que en SSF la máxima productividad volumétrica se logra con canola. Las diferentes modalidades no permiten hacer comparaciones entre sistemas.

*Obtención de extractos concentrados de fitasa de *A. ficuum**

Fue posible concentrar 2,79 veces (tabla 3, 0,265/0,095) un extracto de fitasa proveniente

Tabla 2. Resultados de actividad fitásica y de productividad volumétrica máxima en SmF y SSF, distintos sustratos

Modalidad			FTU/mL extracto o caldo	FTU/gSs	Tiempo hasta máxima actividad enzimática		Productividad volumétrica FTU/mL h
Medio	Operación	d			h		
SmF	Base cereal	Ferm. Gallenkamp 1 vvm, 200 rpm	0,013	1,24	3	72	0,00017
	Base cereal	MicroFerm NBSc. 0,5 vvm, 300 rpm	0,252	24,06	6	144	0,0018
SSF	Base cereal	Placas 110 mm	0,695	5,56	4	96	0,0072
	Canola	Placas 150 mm	6,79	56,43	3	72	0,0943
	Pomaza cranberries	Placas 150 mm	0,33	2,64	12	288	0,0011

Tabla 3. Resultados de los procesos de concentración de fitasa desde: "A" cultivo en SmF, base cereal y desde "B" cultivo en SSF en torta de canola

Cultivo de origen	Muestra	Vol, mL	FTU/mL	Prot. (Bradford), mg/mL	FTU total	Prot. Total, mg	Act. Específica, FTU/mg	Purificación ^a (veces)	Rendimiento, %
"A" de SmF, base cereal	Filtrado del cultivo	650	0,0425	nsd	27,625	-	-	-	-
	Microfiltrado Spintrex	530	0,095	nsd	50,35	-	-	-	100,00
	Retenido 100 kDa	120	0,265	nsd	31,80	-	-	-	63,16 ^b
	Permeado 100 kDa	410	0,00	nsd	0,00	-	-	-	0,00
"B" de SSF, canola	Extracto crudo	60	4,54	3,81	272,40	228,60	1,19	1,00	100,00
	Microfiltrado de 0,45µ	50	5,42	4,28	271,00	214,00	1,27	1,06	99,49 ^c
	Retenido 100 kDa	5	17,88	5,63	89,40	28,15	3,18	2,67	32,82 ^c
	3er. Diafiltrado	5	7,83	1,04	39,15	5,20	7,53	6,33	14,37 ^c

nsd: no se determinó

a Incremento de la actividad específica en relación con el extracto crudo

b Actividad fitásica remanente en relación a la actividad total en el microfiltrado Spintrex (%)

c Actividad fitásica remanente en relación con la actividad total en el extracto (%)

de una SmF en base cereal mediante ultrafiltración con membranas de 100 kDa de *cut-off*, donde sólo el retenido presentó actividad fitásica, lo que es indicativo de que la enzima tiene un tamaño ≥ 100 kDa.

Así mismo, se concentró y purificó parcialmente 6,33 veces el extracto de una SSF en canola, mediante tecnologías de membrana y diafiltrando tres veces consecutivas el retenido de 100 kDa. En la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos siendo posible apreciar el aumento de la actividad específica durante todo el proceso, y el gran efecto de la diafiltración (3,18 \rightarrow 7,53).

Conclusiones

En SmF la mayor producción de fitasa se logró el sexto día en medio basado en cereales.

La torta de canola resultó ser un sustrato muy bueno para SSF presentando una actividad fitásica neta máxima al tercer día de 6,79 FTU/mL de extracto (56,43 FTU/gSs), niveles 10 veces superiores a los logrados con sustratos basados en cereales.

La enzima fitasa de la cepa *A. ficuum* DSM 932 mostró tener un tamaño ≥ 100 kDa pues al ultrafiltrar extractos enzimáticos por membranas de 100 kDa de *cut-off*, sólo se presenta actividad en el retenido.

Aplicando tecnologías de membrana (microfiltración y ultrafiltración-diafiltración x3), fue posible purificar 6,33 veces un extracto de fitasa producido en SSF con torta de canola.

Agradecimientos

Este trabajo fue posible a través del Proyecto DID-UACH S-2006-34, igualmente se agradece a las empresas Oleotop y Cran Chile.

Referencias bibliográficas

Bhavsar, K., Shah, P., Soni, S. K., Khire, J. M. 2008. Influence of pretreatment of agriculture residues on phytase

production by *Aspergillus niger* NCIM 563 under submerged fermentation conditions. African Journal of Biotechnology 7 (8): 1101-1106.

Blandino, A., Botella, C., De Ory, I., Webb, C., Cantero, D. 2005. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. Biochemical Engineering Journal 26: 100-106.

Bogar, B., Szakacs, G., Linden, J. C., Pandey, A., Tengerdy, R. P. 2003. Optimization of phytase production by solid substrate fermentation. J Ind Microbiol Biotechnol 30: 183-189.

Botella, C., Díaz, A., De Ory, I., Webb, C., Blandino, A. 2007. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. Process Biochemistry 42: 98-101.

Brenes, J., Viveros, A., Brenes, A. 2002. Las enzimas en nutrición porcina (II) Producción Animal 181: 4-18.

Chantasartrasamee, K., Israngkul Na Ayuthaya, D., Intarareugsorn, S., Dharmsthiti, S. 2005. Phytase activity from *Aspergillus oryzae* AK9 cultivated on solid state soybean meal medium. Process Biochemistry 40: 2285-2289.

Cromwell, G. L., Coffey, R. D. 1991. Phosphorus—a key essential nutrient, yet a possible major pollutant—its central role in animal nutrition. In: T. P. Lyons (ed.). Biotechnology in the Feed Industry. Alltech Technical Publications. Nicholasville, KY, pp. 133-145.

Gargova, S., Sariyska, M. 2003. Effect of culture conditions on the biosynthesis of *Aspergillus niger* phytase and acid phosphatase. Enzyme and Microbial Technology 32: 231-235.

Harland, B. F., Harland, J. 1980. Fermentative reduction of Phytase in rye, white, and whole wheat breads. Cereal Chem 57: 226-229.

Krishna, C., Nokes, S. E. 2001. Influence of inoculum size on phytase production and growth in solid-state fermentation by *Aspergillus niger*. Transactions of the ASAE 44 (4): 1031-1036.

Lassen, S. F., Breinholt, P. J., Ostergaard, R., Brugger, R., Bischoff, A., Wyss, M., Fuglsang, C. C. 2001. Expression, Gene Cloning, and Characterization of Five Novel Phytases from Four Basidiomycete Fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, a *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens*. Appl Environ Microbiol 67: 4701-4707.

Nagashima, T., Tange, T., Anazawa, H. 1999. Dephosphorylation of Phytate by Using the *Aspergillus niger* Phytase with a High Affinity for Phytate. Appl Environ Microbiol 65 (10): 4682-4684.

- Papagianni, M., Nokes, S. E., Filer, K. 2001. Submerged and Solid-State Phytase Fermentation by *Aspergillus niger*: Effects of Agitation and Medium Viscosity on Phytase Production, Fungal Morphology and Inoculum Performance. *Food Technol Biotechnol* 39 (4): 319-326.
- Pérez-Guerra, N., Torrado-Agrasar, A., López-Macías, C., Pastrana, L. 2003. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. *Electrón J Environ Agric Food Chem* 2 (3): 343-350.
- Ramachandran, S., Roopesha, K., Nampoothiria, K. M., Szakacs, G., Pandey, A. 2005. Mixed substrate fermentation for the production of phytase by *Rhizopus* spp. using oilcakes as substrates. *Process Biochemistry* 40: 1749-1754.
- Reddy, N. R., Sathe, S. K., Salunkhe, D. K. 1982 Phytates in legumes and cereals. *Adv. Food Res* 28: 1-92.
- Roopesh, K., Ramachandran, S., Nampoothiri, M., Szakacs, G.; Pandey, A. 2006. Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*. *Bioresource Technology* 97: 506-511.
- Tausky, H., Shorr, E. 1953. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J Biol Chem* 202 (2): 675-685.
- Tomschy, A., Tessier, M., Wyss, M., Brugger, R., Broger, C., Schnoebelen, L., Van Loon A. P. G. M., Pasamontes, L. 2000. Optimization of the catalytic properties of *Aspergillus fumigatus* phytase based on the three-dimensional structure. *Protein Sci* 9: 1304-1311.
- Ullah, A. H., Gibson, D. M. 1987. Extracellular phytase (E.C. 3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization. *Prep Biochem* 17 (1): 63-91.
- Wodzinski, R. J., Ullah, A. H. J. 1996. Phytase. *Adv Appl Microbiol* 42: 263-302.
- Wyss, M., Pasamontes, L., Friedlein, A., Rémy, R., Tessier, M., Kronenberger et ál. 1999. Biophysical characterization of fungal phytases (*myo*-inositol hexakis phosphate phosphohydrolases): molecular sizes, glycosylation patterns, and engineering of proteolytic resistance. *Appl Environ Microbiol* 65: 359-366.
- Yang, X., Chen, H., Gao, H., Li, Z. 2001. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. *Bioresource Technology* 78: 277-280.