

Identificación de biocatalizadores tipo fitasa en microorganismos aislados de suelo expuesto a
heces de caprino

Julieth Camila Maldonado Pava

Trabajo de Grado para optar al título de Bióloga

Director

Genis Andrés Castillo Villamizar

Dr. rer. nat.

Codirector

Jorge Hernández Torres

Doctorat ès Sciences

Codirector

Edinson Andrés Puentes Cala

Dr. rer. nat.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2023

Agradecimientos

A la Corporación para la Investigación de la Corrosión por permitirme realizar mi trabajo de grado.

A mi familia por alentarme a seguir mis sueños y darme la oportunidad de estudiar la carrera que escogí como profesión.

A mis amigos, especialmente a mi amigo más querido por su apoyo incondicional durante todas las veces que creí que no tenía las capacidades para lograrlo.

Al profesor Jorge Hernández Torres y la profesora Leidy Rocío Pico Martínez por las primeras enseñanzas en el campo de la biología molecular. Y por abrirme las puertas hacia mi proyecto de grado.

Agradezco de forma especial a los doctores Genis Andrés Castillo Villamizar y Edinson Andrés Puentes Cala por guiarme en la realización de este proyecto. Por inspirarme, enseñarme y mostrarme lo grandiosa que es la ciencia. En especial por estar presentes en todo momento y abrirme un espacio en el laboratorio, donde conocí a personas como Valentina, quienes fueron un apoyo y estuvieron dispuestas a enseñarme en todo momento.

A todos aquellos que me apoyaron y creyeron en mí, mis sinceros agradecimientos.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	11
1. Objetivos	14
1.1 Objetivo General.....	14
1.2 Objetivos Específicos.....	14
2. Cuerpo del Trabajo	15
2.1 Marco Teórico.....	15
2.2 Metodología	20
2.2.1 Aislamiento de los microorganismos.....	20
2.2.2 Caracterización genómica.....	21
2.2.2.1 Análisis del gen 16S rRNA.....	21
2.2.2.2 Extracción de ADN genómico y secuenciación.....	22
2.2.2.3 Construcción de librerías de fósmidos	22
2.2.3 Análisis bioinformático.....	23
2.2.3.1 Ensamble y anotación de los genomas.....	23
2.2.3.2 Análisis filogenético basado en genomas	24
2.2.3.3 Ensamble de los clones positivos e identificación de la enzima fitasa	24
2.2.4 Caracterización de la enzima fitasa.....	25
2.2.4.1 Preparación del extracto celular	25
2.2.4.2 Medición de la actividad fitasa	26
2.2.4.3 Purificación de la enzima.....	26
2.2.4.4 pH y temperatura óptima de la enzima purificada	26

2.2.4.5 Especificidad del sustrato y cinética enzimática.....	27
2.2.4.6 Ensayo de iones metálicos, agentes reductores y quelantes	27
2.3 Resultados	27
2.3.1 Aislamiento y caracterización morfológica	27
2.3.2 Análisis de secuencias del gen 16S rRNA	28
2.3.3 Análisis genómico.....	29
2.3.4 Identificación de los genes de actividad fitasa.....	36
2.3.5 Construcción de la librería genómica	38
2.3.6 Determinación de la actividad fitasa	40
2.3.7 Caracterización de la proteína fitasa	41
2.4 Discusión.....	48
3. Conclusiones	54
Referencias Bibliográficas	55
Apéndices.....	66

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Identidad de los aislados degradadores de fitato por medio del gen 16S rRNA	29
Tabla 2. Estadísticos de los ensamblajes genómicos	30
Tabla 3. Identidad nucleotídica (ANI) e hibridación digital ADN-ADN in silico (dDDH)	31
Tabla 4. Fosfatasas candidatas para la cepa <i>Chryseobacterium</i> sp. GCEP-77	36
Tabla 5. Fosfatasas candidatas para la cepa <i>Klebsiella pneumoniae</i> GCEP-84	37
Tabla 6. Actividad fitasa de los extractos crudos de los aislados <i>Chryseobacterium</i> sp. GCEP-77 y <i>K. pneumoniae</i> GCEP-84.....	41
Tabla 7. Tabla de purificación de la enzima fitasa de la cepa <i>K. pneumoniae</i> GCEP-84.....	42

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Estructura química del ácido fítico	16
Figura 2. Ilustración de la hidrólisis del 1D-mio-inositol hexakisfosfato por la fitasa AppA (HAPh) de <i>Escherichia coli</i>	17
Figura 3. Microorganismos representativos de los aislados degradadores de fitato en medio LB y SpM modificado.....	28
Figura 4. Porcentaje de identidad nucleotídica (ANI) de los aislados <i>Chryseobacterium</i> sp. GCEP-77 y <i>Klebsiella</i> sp. GCEP-84 con sus parientes cercanos	33
Figura 5. Árbol de evolución mínima basado en genoma completo de <i>Chryseobacterium</i> sp. GCEP-77	34
Figura 6. Árbol de evolución mínima basado en genoma completo de <i>Klebsiella</i> sp. GCEP-84	35
Figura 7. Digestión de los clones con actividad fitasa.....	39
Figura 8. Alineamiento de los motivos conservados de HAPs.....	40
Figura 9. SDS-PAGE al 12% de las fracciones con actividad fitasa de <i>K. pneumoniae</i> GCEP-84	42
Figura 10. Efecto del pH en la actividad relativa de la proteína purificada.....	44
Figura 11. Efecto de la temperatura en la actividad relativa de la proteína purificada.....	44
Figura 12. Especificidad de sustratos de la proteína purificada.....	46
Figura 13. Cinética enzimática de la proteína purificada bajo el modelo de Michaelis-Menten.	46
Figura 14. Efecto de los iones metálicos y agentes químicos en la actividad relativa de la enzima purificada	47

Lista de Apéndices

	pág.
Apéndice A. Resumen del resultado de la secuenciación por las plataformas Illumina y Nanopore de <i>Chryseobacterium</i> sp. GCEP-77 y <i>Klebsiella</i> sp. GCEP-84.....	66
Apéndice B. Representación del genoma de los aislados <i>Chryseobacterium</i> sp. GCEP-77 y <i>Klebsiella</i> sp. GCEP-84	67
Apéndice C. Clones positivos con actividad fitasa.	68
Apéndice D. Proteínas candidatas para <i>Klebsiella pneumoniae</i> GCEP-84.	69
Apéndice E. Fitasas comerciales disponibles y sus características.....	70

Resumen

Título: Identificación de biocatalizadores tipo fitasa en microorganismos aislados de suelo expuesto a heces de caprino*

Autor: Maldonado-Pava, Julieth Camila**

Palabras Claves: Animales monogástricos, Fitasas, Suelo, librería metagenómica

Descripción:

El fósforo es un elemento no renovable que constituye moléculas esenciales para el funcionamiento de los organismos. Los animales de cría monogástricos se alimentan con concentrados compuestos de diferentes granos ricos en fitato, un ácido orgánico compuesto de polifosfatos de inositol. Las enzimas capaces de hidrolizar el fitato son un grupo de fosfatasas llamadas fitasas. Los animales monogástricos carecen de estas enzimas, por lo cual, el fitato permanece intacto y es excretado en las heces. En consecuencia, el uso de fósforo inorgánico para la alimentación y el fitato excretado causan la eutrofización de los ecosistemas. Entonces, por su potencial biotecnológico, las fitasas representan una alternativa para solventar esta problemática. El presente trabajo tuvo como objetivo identificar biocatalizadores tipo fitasa a partir de microorganismos degradadores de fitato aislados en el municipio de Páramo, Santander, Colombia. Se aislaron 14 cepas potencialmente degradadoras de fitato de muestras de suelo contaminado con heces de caprino. Los candidatos se identificaron en medios con fitato como única fuente de fósforo y carbono. Con las secuencias del gen 16S rRNA los candidatos se identificaron en los géneros *Klebsiella* y *Chryseobacterium*. Los análisis de hibridación *in silico* y ANI de los dos aislados con mayor actividad indicaron una posible especie nueva para el género *Chryseobacterium* (GCEP-77) y la identidad de *K. pneumoniae* (GCEP-84). Además, se reportó, por primera vez, actividad fitasa en el género *Chryseobacterium*. A partir de una librería metagenómica y la purificación parcial de la enzima de *K. pneumoniae* (GCEP-84) se identificó una fitasa HAP periplasmática (G1Pasa). En general, la enzima demostró características similares a las reportadas para fitasas comerciales disponibles. Estos resultados demuestran el potencial de los suelos agroindustriales locales y la efectividad de continuar en la búsqueda biocatalizadores de interés.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Biología. Director: Genis Andrés Castillo Villamizar, Dr. rer. nat. Codirectores: Jorge Hernández Torres, Doctorat ès Sciences. Edinson Andrés Puentes Cala, Dr. rer. nat.

Abstract

Title: Identification of phytase-type biocatalysts in microorganisms isolated from soil exposed to goat feces*

Author: Maldonado-Pava, Julieth Camila**

Key Words: Monogastric animals, Phytases, Soil, Metagenomic library

Description:

Phosphorus is a non-renewable element required for synthesizing essential molecules for living organisms. Plant-based feeds of monogastric animals have a high content of phytate, an organic acid of inositol polyphosphates. The enzymes able to hydrolyze phytate belong to a specific group of phosphatases called phytases. Monogastric species cannot metabolize phytate by lacking these enzymes, leading to high fecal phytate content. Therefore, phosphorus supplements and the excreted phytate cause the eutrophication of land and aquatic ecosystems. Due to their biotechnological potential, phytases are considered an alternative to reduce this environmental and economic issue. This study aimed to identify phytase biocatalysts from phytate-degrading microorganisms isolated in Paramo, Santander, Colombia. We identified 14 strains described as potentially phytate-degrading from soil samples contaminated with goat feces. Bacterial candidates were placed in a modified SpM medium with phytate as the sole source of phosphorus and carbon. The 16S rRNA gene analysis grouped them in the genera *Klebsiella* and *Chryseobacterium*. *In silico* DNA-DNA hybridization and Average Nucleotide Identity values of both strains with the highest activity showed a potentially new species of *Chryseobacterium*. From a metagenomic library and the partial purification of a *K. pneumoniae* (GCEP-84) phytase activity, a periplasmic HAP-like phytase (G1Pasa) was hypothesized. The enzyme showed similar properties as described for commercial phytases. These results attest to the potential of local agro-industrial soils as a source of relevant biomolecules and microbes. Also, they highlight the effectiveness of searching for novel biocatalysts.

* Bachelor thesis

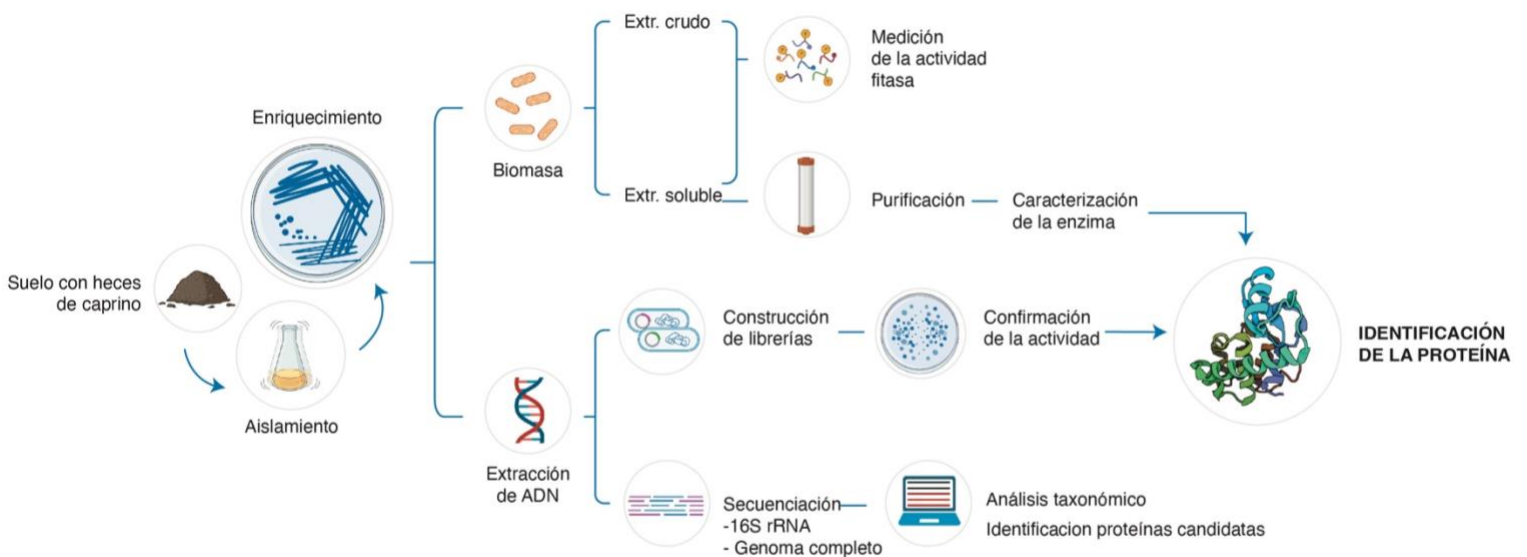
** Science Faculty. Biology School. Biology. Director: Genis Andrés Castillo Villamizar. Dr. rer. nat. Codirectors: Jorge Hernández Torres. Doctorat ès Sciences. Edinson Andrés Puentes Cala. Dr. rer. nat

Resumen gráfico metodológico

Título: Identificación de biocatalizadores tipo fitasa en microorganismos aislados de suelo expuesto a heces de caprino*

Autor: Maldonado-Pava, Julieth Camila**

Palabras Claves: Animales monogástricos, Fitasas, Suelo, librería metagenómica



* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Biología. Director: Genis Andrés Castillo Villamizar, Dr. rer. nat. Codirectores: Jorge Hernández Torres, Doctorat ès Sciences. Edinson Andrés Puentes Cala, Dr. rer. nat.

Introducción

Las fitasas (mioinositol hexakisfosfato fosfohidrolasas) son un tipo de enzimas fosfatasa que catalizan la hidrólisis de los enlaces éster del fitato, liberando fósforo inorgánico y compuestos de mioinositol con menor grado de fosforilación (Chen C. et al., 2015). El ácido fítico o fitato en su forma salina (mioinositol 1,2,3,4,5,6- hexakisfosfato) es el principal componente del fósforo orgánico en el suelo y, a su vez, la principal forma de almacenamiento de fósforo en legumbres, cereales, semillas oleaginosas y nueces. Este compuesto comprende entre 60 y 90% del fósforo presente en las plantas (Turner et al., 2002; Vats et al., 2005).

El fósforo es un mineral clave en el metabolismo y en la fisiología de los organismos (Kumar et al., 2015), al ser esencial en la biosíntesis de ácidos nucleicos y membranas celulares (Sapna et al., 2013). A pesar de lo anterior, los animales monogástricos no tienen la capacidad de asimilar el fósforo del fitato, debido a la carencia de las enzimas apropiadas (fitasas). En consecuencia, los procesos de cría masiva de estos animales con fines alimentarios requieren el suministro de suplementos nutricionales a base de fosfato inorgánico. En animales monogástricos como cerdos, conejos y aves de corral los requerimientos de fósforo son altos (Elkhalil et al., 2007; Kumar et al., 2014). El exceso de fosfato no absorbido, sumado al uso prolongado de fósforo como fertilizante, causan la acumulación del mineral en el suelo y la posterior contaminación de ecosistemas acuáticos por eutrofización (Bohn et al., 2008).

Como alternativa de solución a la problemática nutricional en animales monogástricos, se han utilizado fitasas recombinantes como aditivo alimentario para aumentar la disponibilidad del fósforo en la dieta y disminuir el suplemento de fósforo inorgánico (Elkhalil et al., 2007; Singh y Satyanarayana, 2015). En general, las enzimas con actividad fitasa se encuentran distribuidas en

plantas, animales y microorganismos (Singh y Satyanarayana, 2011). Animales rumiantes como las cabras sí utilizan efectivamente el fitato (Yanke et al., 1998); en efecto, un grupo abundante de fitasas se encuentra en el rumen de estos animales (Huang et al., 2010), por lo que el suelo expuesto a heces de caprinos podría albergar parte de esta diversidad de enzimas.

En la industria, este grupo de biocatalizadores tienen una variedad de aplicaciones como la producción de derivados de mioinositol fosfatos, el desarrollo de plantas transgénicas (Kumar et al., 2016), la producción de etanol, la eliminación de desechos industriales (Khullar et al., 2011), además del mejoramiento en la producción del pan integral y su valor nutricional (Buddrick et al., 2014). Entre las fitasas identificadas, las de mayor proyección en la biotecnología son las de origen bacteriano, debido a su afinidad por el fitato, alta eficiencia catalítica y resistencia a la proteólisis (Jain y Singh, 2016).

La utilización de fitasas en sectores específicos de la industria depende de su compatibilidad y desempeño bajo las condiciones fisicoquímicas requeridas en el proceso productivo (Rebello et al., 2017). Factores como la limitada termoestabilidad, perfil de pH y actividad específica hacen que la búsqueda de nuevos biocatalizadores con actividad fitasa sea una prioridad para diversos grupos e industrias alrededor del mundo (Boyce y Walsh, 2007; Costa et al., 2018; Ajith et al., 2019).

Tradicionalmente, Colombia ha sido un país dependiente de las importaciones biotecnológicas. Las enzimas más sencillas de uso industrial son producidas en el exterior y los biocatalizadores tipo fitasa no son la excepción. A pesar de que la tecnología de producción recombinante de este tipo de enzimas ha estado disponible, en nuestro conocimiento, Colombia no comercializa fitasas propias, dependiendo íntegramente de las importaciones.

Actualmente, China, Estados Unidos, Marruecos y Sahara Occidental producen ~82% del fósforo mundial (Jasinski, 2014). Obviamente, los yacimientos de este mineral no son renovables, por lo que en el futuro la explotación minera eventualmente se extinguirá. Esto último hace que la obtención de fuentes alternativas de fósforo sea de vital importancia para países importadores de los agroinsumos fosforados como Colombia. El uso de biocatalizadores tipo fitasa es una alternativa para garantizar la seguridad agrícola de los países productores (Mullaney et al., 2000). Las importaciones de fósforo han sufrido incrementos en los costos, que a su vez han repercutido en el aumento de precio de los alimentos. En razón de lo anterior, se planteó como objetivo de este trabajo de grado, identificar, por primera vez en Colombia, biocatalizadores tipo fitasas derivados de microorganismos degradadores de fitato, aislados de ambientes agroindustriales del municipio de Páramo, Santander. En el futuro, un banco de fitasas robusto permitirá bioprospectar las mejores enzimas para la generación de aplicaciones específicas y la producción local.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Identificar biocatalizadores tipo fitasa a partir de microorganismos degradadores de fitato aislados en el municipio de Páramo, Santander, Colombia.

1.2 Objetivos Específicos

- Aislar microorganismos potencialmente degradadores de fitato de suelo expuesto a heces de caprino.
- Determinar la actividad fitasa en extractos crudos de los microorganismos candidatos aislados.
- Asignar el máximo nivel taxonómico posible a los microorganismos degradadores de fitato mediante análisis de secuencias del gen 16S rRNA.
- Describir la composición genómica de los microorganismos candidatos aislados, priorizando la búsqueda de genes asociados con actividad fitasa.
- Caracterizar bioquímicamente al menos una enzima con actividad fitasa, obtenida a partir de librerías de genes derivadas de los genomas de los microorganismos aislados.

2. Cuerpo del Trabajo

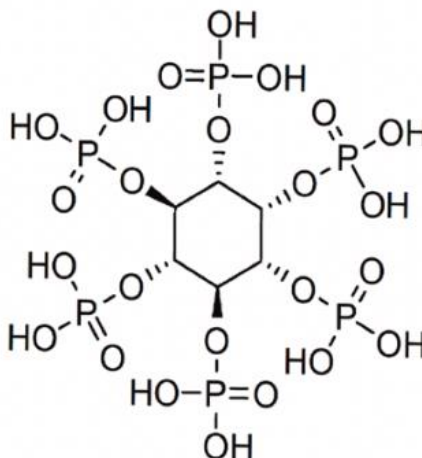
2.1 Marco Teórico

El fósforo es un nutriente esencial para los organismos como componente del material genético y las moléculas energéticas (e.g., ATP); contribuye en la conformación de membranas fosfolipídicas y cumple un rol regulatorio en el metabolismo y en procesos fisiológicos (Ruttenberg, 2014; Humer et al., 2015). Las minas de fosfato son un recurso no renovable del cual se prevé el agotamiento en los próximos años (Gilbert, 2009). El fósforo del lecho rocoso, el suelo y los sedimentos no es directamente asimilable por los organismos, por lo que es necesaria su conversión de metafosfatos o polifosfatos en ortofosfatos $[(\text{PO}_4)^{-3}]$, por procesos geoquímicos y bioquímicos (Ruttenberg, 2014).

Uno de los compuestos que actúa como un reservorio de fósforo orgánico y que, a la vez, no es fácilmente mineralizado, es el mio-inositol hexafosfato o ácido fítico (Lim et al., 2007) (Figura 1). En forma de ácido libre, el ácido fítico es inestable y forma complejos con diferentes cationes metálicos como Ca^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y Mn^{2+} , que se conocen como fitatos (Humer et al., 2015). Al actuar como quelante, el fitato se considera un antinutriente ya que disminuye la disponibilidad de los diferentes micronutrientes en los animales monogástricos (Sebastian et al., 1998). Entre los compuestos orgánicos de fósforo, el fitato es el más abundante (Sandberg y Andlid, 2002). Comprende la principal forma de almacenamiento de fosfato e inositol en las plantas, alcanzando 30% en las raíces y hasta 80% en los cereales (Haefner et al., 2005).

Figura 1

Estructura química del ácido fítico



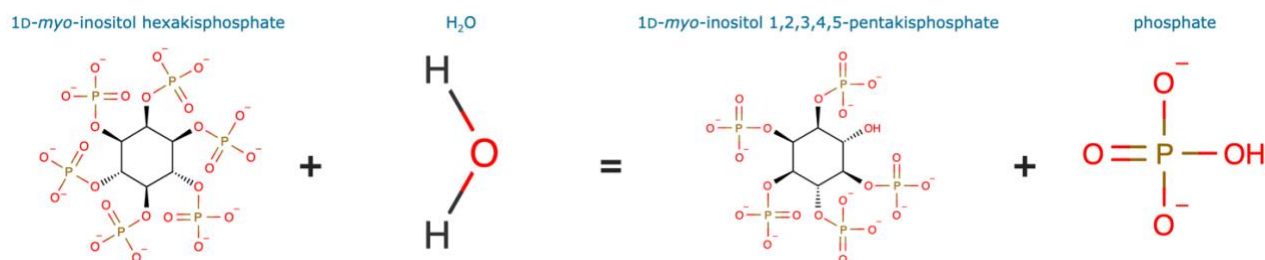
Nota. Adaptado de *Review of the beneficial and anti-nutritional qualities of phytic acid, and procedures for removing it from food products*, de Feizollahi, et al., 2021, Food Research International.

Las fitasas (mio-inositol hexafosfato fosfohidrolasas) son un grupo de fosfatasas que catalizan la hidrólisis del fitato, liberando al menos un grupo fosfato (Haefner et al., 2005). De acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada y la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUPAC-IUBMB), las fitasas se clasifican en 3-fitasas (EC 3.1.3.8), 4-fitasas (EC 3.1.3.26) y 5-fitasas (EC 3.1.3.72), según la posición en la que inician la desfosforilación. Alternativamente, basados en la estructura tridimensional y los mecanismos catalíticos, pueden clasificarse en cuatro clases: *histidine acid phosphatases* (HAPs) (Figura 2), *β-propeller phytases* (BPPs), *protein tyrosine phosphatases* (PTPs) y *purple acid phosphatases* (PAPs) (Chen C. et al., 2015). También se denominan *histidine acid phytase* (HAPhy), *β-propeller phytase* (BPPhy), *purple acid phytase* (PAPhy) y *protein tyrosine phytase* (PTPhy) (Lei et al.,

2013). Recientemente, los análisis metagenómicos sugieren la existencia de formas no descritas de enzimas con actividad fitasa (Castillo et al., 2019a; Castillo et al., 2019b).

Figura 2

Ilustración de la hidrólisis del 1D-mio-inositol hexakisfosfato por la fitasa AppA (HAPhy) de Escherichia coli.



Nota. Adaptado de *PPA_ECOLI (P07102)* [Imagen], de UniProt: the universal protein resource, 2022.

La aplicación de fósforo como fertilizante (Falkowski et al., 2000) y el desarrollo de dietas a base de cereales en la industria porcina y avícola han derivado en la eutrofización del suelo y el agua (Lei et al., 2013; Humer et al., 2015). Los animales monogástricos carecen de fitasas y, en consecuencia, no asimilan el fósforo del fitato, lo cual obliga a suplementar el alimento con fósforo inorgánico (Haefner et al., 2005; Lei et al., 2013). El fitato a su vez, es excretado hasta en 80% por este tipo de animales (Barnett, 1994).

Como una alternativa para anticiparse al agotamiento de las reservas de fósforo y reducir la contaminación ambiental, es necesario racionalizar el uso del fósforo disponible (Castillo et al., 2019b). Las tecnologías propuestas para solventar la problemática incluyen el desarrollo de cultivos bajos en fitato (Raboy, 2007), animales fitasa-transgénicos (Golovan et al., 2001a;

Golovan et al., 2001b) y el uso de fitasas como aditivo alimentario (Yi et al., 1996). Esta última opción ha adquirido atención, ya que las fitasas aumentan el fósforo asimilable de los cereales, reduce la eutrofización y la dependencia de fósforo inorgánico (Selle y Ravindran, 2008). El uso de las fitasas no se restringe a la alimentación de animales monogástricos, sino que también tienen aplicación en la industria alimentaria, en la producción de biocombustibles y en la desintoxicación de residuos industriales (Rebello et al., 2017).

Las fitasas se encuentran ampliamente distribuidas en animales, plantas y microorganismos (Sandberg y Andlid, 2002; Haefner et al., 2005). Entre las cuatro subclases, las HAPs, caracterizadas por albergar el motivo RHGXXR en su sitio activo, son las más estudiadas y comercializadas, debido a la eficiencia de la producción de fósforo inorgánico en la degradación de biomasa y su tolerancia proteolítica en el tracto gastrointestinal animal (Niu et al., 2017). A esta subclase pertenece la primera fitasa comercializada de *Aspergillus niger* var. *ficuum* (AnPhyA) y las fitasas bacterianas AppA1 y AppA2 de *E. coli* (Lei et al., 2013). Por otro lado, las BPPs se encuentran principalmente en bacterias del género *Bacillus* spp. Su interés biotecnológico recae en la termoestabilidad atribuida a su asociación con iones Ca^{2+} (Chen C. et al., 2015). Las PTPs se distinguen por un sitio activo con el motivo HCX5R (Puhl et al., 2007) y a pesar de sus características favorables para la industria, el sitio activo es susceptible a la inactivación por oxidación, lo que ha limitado su aplicación comercial (Chen C. et al., 2015). Por último, las PAPs corresponden a un grupo poco estudiado, generalmente de origen vegetal, con algunas excepciones reportadas en grupos bacterianos (Castillo et al., 2019b). Comparten los motivos conservados DXG, GDXXY, GNH[E/D], VXXH y GHXH (Klabunde et al., 1996; Olczak et al., 2003). Hasta el momento no hay reporte de alguna aplicación comercial para este tipo de fitasas.

Las características de una fitasa ideal para la industria pecuaria son la capacidad de hidrolizar el fitato directamente en el tracto digestivo de los animales, resistir temperaturas entre 65 y 80 °C durante el procesamiento del concentrado y tener un bajo costo de producción (Lei y Stahl, 2001). En la actualidad, en nuestro conocimiento, no existen fitasas comerciales que cumplan completamente con estos tres criterios, por lo que el interés en la identificación de nuevos y versátiles biocatalizadores que liberen fósforo a partir del fitato se encuentra vigente (Huang et al., 2009; Singh y Satyanarayana, 2011; Hou et al., 2020).

El suelo es de los ambientes más heterogéneos y poco explorados, por lo que es considerado como fuente de nuevos microorganismos y biocatalizadores (Sousa et al., 2022). Adicionalmente, dada la biodiversidad microbiana, se considera que la mayoría de especies residentes en este tipo de ecosistemas corresponde a linajes aún no descritos (Fierer, 2017). Actualmente, con el avance tecnológico y el desarrollo de la secuenciación de nueva generación (NGS), el uso de genomas completos, en contraposición al uso de un único gen como marcador filogenético, se ha configurado en una herramienta para la delineación taxonómica de microorganismos provenientes de ambientes complejos (Chun y Rainey, 2014; Garrity, 2016; Chun et al., 2018; Parks et al., 2018). Entre las técnicas más comunes para realizar tal clasificación se encuentran el análisis de hibridación DNA-DNA *in silico* (Auch et al., 2010; Meier-Kolthoff et al., 2013) y el cálculo del porcentaje de identidad nucleótido (ANI) (Goris et al., 2007).

Para el descubrimiento de nuevas fitasas se han abordado distintas estrategias como el *genome mining* y la metagenómica funcional. Ushasree et al. (2017) dividen el *genome mining* en dos vertientes: el *genome hunting*, que consiste en buscar las enzimas de interés directamente en el ensamble genómico del organismo específico. Y el *dubbed data mining*, que se refiere a la búsqueda de las enzimas a partir de alineamientos por homología en las bases de datos. El

screening funcional de librerías genómicas permite descubrir enzimas no detectables mediante búsquedas en bases de datos (Lam et al., 2015). Para la construcción de librerías metagenómicas el ADN de interés se clona en un vector (e.g., plásmido, cósmido o fósido) y se expresa en un huésped que, generalmente, es *E. coli* (Beloqui et al., 2008). El *screening* de las células transformadas se realiza por la aparición de halos hidrolíticos dada la degradación del sustrato en el medio de cultivo o la formación de color en las colonias al interactuar con sustratos cromogénicos (Guazzaroni et al., 2010). Este enfoque permite identificar proteínas no homólogas a las ya descritas. Paralelamente, se han implementado técnicas como la evolución dirigida y el diseño racional, para el desarrollo de fitasas con propiedades específicas (Shivange y Schwaneberg, 2017).

2.2 Metodología

2.2.1 Aislamiento de los microorganismos

La Corporación para la Investigación de la Corrosión (CIC) proporcionó 11 muestras de suelo expuesto a heces de caprino. La colecta se realizó en la finca Vista Hermosa (6°27'42.055"N, 73°9'4.33"O), en el municipio de Páramo, departamento de Santander. Las muestras fueron recolectadas de forma aséptica según los parámetros establecidos por los procedimientos técnicos de la CIC. Tanto el muestreo como el procesamiento microbiológico estuvieron amparados por el Otrosí N°1 del Contrato de Acceso a Recurso Genético N°167 de 2017 celebrado entre la CIC y el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible.

Dos gramos de cada muestra de suelo se homogeneizaron en 18 mL de solución salina. De cada mezcla se tomó una alícuota de 2.5 mL con la que se inocularon medios de enriquecimiento Sperber modificado (SpM) (0.5 g/L NH₄Cl, 0.1 g/L CaCl₂, 0.25 g/L MgSO₄ y 2.5 g/L ácido fítico)

suplementado con 2% v/v de glicerol (Villamizar et al., 2017). Los enriquecimientos fueron incubados a temperatura ambiente por 10 d con agitación constante a 200 rpm. Posteriormente, a partir del cultivo de enriquecimiento se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-8} con solución salina. Las diluciones 10^{-6} y 10^{-8} se sembraron por duplicado a razón de 100 μ L en medios SpM modificados sólidos (16 g/L agar-agar) con fitato como fuente exclusiva de fósforo y carbono. Adicionalmente, se empleó el *5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate* (BCIP) (25 μ g/mL), como indicador de la liberación de grupos fosfato por la degradación de fitato.

Las colonias típicas que exhibieron un color azul intenso fueron seleccionadas como potencialmente degradadoras de fitato. Estas fueron repicadas en medios sólidos SpM para su aislamiento y posterior comprobación de actividad degradadora de fitato. Simultáneamente, los aislados se transfirieron a medio Luria-Bertani (LB) sólido (16 g/L agar-agar) para la determinación de las características morfológicas macro y microscópicas.

2.2.2 Caracterización genómica

2.2.2.1 Análisis del gen 16S rRNA. De los aislados potencialmente degradadores de fitato se extrajo el ADN siguiendo el protocolo de Martín-Platero et al. (2007). La concentración y calidad del ADN se verificó por medio de un NanoPhotometer™ NP80 (IMPLEN, Alemania) y por electroforesis en 1% de agarosa. La amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA se llevó a cabo con el 16S Barcoding Kit 1-24 (SQK-16S024) (Oxford Nanopore Technologies (ONT), Oxford, UK). A partir de las lecturas de secuencia generadas, de cada aislado se obtuvo una secuencia consenso utilizando la plataforma Bugseq (Fan et al., 2021). Finalmente, los aislados fueron clasificados taxonómicamente de manera preliminar realizando un análisis con NCBI BLAST (Altschul et al., 1990).

2.2.2.2 Extracción de ADN genómico y secuenciación. La extracción del ADN genómico de los dos aislados seleccionados se realizó con el *Monarch® Genomic DNA Purification Kit* (Biolabs, Nueva Inglaterra). La calidad del ADN se confirmó con el NanoPhotometer™ NP80 (IMPLEN, Alemania) y en gel de 1% agarosa. Ambas genomas se secuenciaron con el *Ligation Sequencing Kit* (SQK-LSK109) en conjunto con el *Native Barcoding Expansion 1-12* (EXP-NBD104), utilizando un secuenciador MinION Mk1C (ONT). Así mismo, el material genético de los organismos se envió a secuenciación externa en Novogene Corporation Inc. (Stockton Blvd, California, USA), en la plataforma Illumina NovaSeq 6000 (PE150).

2.2.2.3 Construcción de librerías de fósmidos. La librería de fósmidos se construyó a partir del material genético de siete cepas con diferentes actividades de interés. El ADN genómico de las cepas GCEP-77 y GCEP-84 se extrajo con el Kit DNeasy PowerSoil Pro (QIAGEN, Alemania). Seguidamente, con el fin de obtener fragmentos de alrededor de 40 kb, los extractos de ADN fueron sometidos a tres ciclos de homogeneización a 3.500 rpm por 30 s y 15 s de reposo en un *BeadBug 6 homogenizer* (Benchmark Scientific, TEquipment Inc), previa adición de perlas de vidrio estériles (0.5 mm). La fragmentación fue confirmada con un gel de 1% agarosa. Los extremos de los fragmentos de ADN fueron reparados según las instrucciones del *Copy Control™ Fosmid Production Kit* (Epicentre Technologies, USA). Seguidamente, el ADN se purificó con 64 µL de perlas magnéticas (AMPure XP beads) (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) y se ligó en el vector pCC1FOS, según indicaciones del fabricante. Los fósmidos se empaquetaron en el *MaxPlax Lambda Packaging Extract* y se almacenaron en una mezcla de 25 µL de cloroformo en 1 mL de *Phage Dilution Buffer* (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) a 4 °C. Finalmente, células de *E. coli* EPI300-T1^R fueron transducidas con 50 µL del vector y sembradas

sobre placas de LB suplementado con 12.5 µg/mL cloranfenicol. Las placas se incubaron a 37 °C y la librería de clones obtenida se preservó en 20% glicerol a -80 °C.

El *screening* de la librería se llevó a cabo en medio LB preparado a una concentración 0.25x respecto a la composición estándar; fue suplementado con 6.25 µg/mL cloranfenicol y 25 µg/mL BCIP a 37 °C. Los clones azules, positivos para la actividad fitasa, se repicaron nuevamente en LB 0.25x con 6.25 µg/mL de antibiótico. Posteriormente, para la extracción de los fósmidos se creció una colonia de cada clon en 4 mL de medio líquido LB con 12.5 µg/mL cloranfenicol y 4 µL de la solución *CopyControl Fosmid Autoinduction* a 37 °C con agitación a 250 rpm.

La extracción del ADN fosmídico se realizó con el kit *Monarch® Plasmid Miniprep* (New England Biolabs). El ADN se empleó para el análisis de restricción con *Sma* I (Thermo Scientific) y para su secuenciación en la plataforma Nanopore con el *Ligation Sequencing Kit* (SQK-LSK109) en conjunto con el *Native Barcoding Expansion 1-12* (EXP-NBD104). Por último, el análisis de restricción se visualizó en gel 1% agarosa.

2.2.3 Análisis bioinformático

2.2.3.1 Ensamble y anotación de los genomas. Para el análisis de los genomas, los archivos fastq concatenados de Nanopore y los archivos F y R de Illumina, se cargaron en el servidor Galaxy Europe (<https://usegalaxy.eu/>) (Jalili et al., 2020). La calidad de las secuencias se determinó con FastQC v. 0.11.9 (Andrews, 2010) y Nanoplot v. 1.41.0 (de Coster et al., 2018). Para ambos aislados, se construyó un ensamble *de novo* híbrido con Unicycler v. 0.4.8 (Wick et al. 2017b) y se verificó la calidad con QUAST v. 5.0.2 (Mikheenko et al., 2018).

La anotación funcional del ensamble fue realizada con Prokka v. 1.14.6 (Seemann, 2014). Los genes anotados como fosfatasas se compararon contra la base de datos InterPro (Paysan-

Lafosse et al. 2023) y el *Conserved Domains Database* (CDD) (Lu et al. 2013) en busca de similitudes con familias de proteínas y dominios conocidos.

2.2.3.2 Análisis filogenético basado en genomas. Los ensamblados obtenidos para los dos genomas fueron analizados en la plataforma *Type Strain Genome Server* (TYGS) (<https://tygs.dsmz.de/>) (Meier-Kolthoff y Göker, 2019; Meier-Kolthoff et al., 2022). Las cepas tipo más cercanas se determinaron de dos formas complementarias: para el primer método, los ensamblados de los aislados GCEP-77 y GCEP-84 se compararon con los genomas disponibles en la base de datos del TYGS con el algoritmo MASH. Por cada aislado se seleccionaron los genomas de los diez microorganismos genéticamente más cercanos. El segundo método de análisis consistió en la selección de otras diez cepas utilizando como base los resultados del gen 16S rRNA complementado por búsquedas BLAST (Camacho et al., 2009), con las 18.470 cepas tipo disponibles en el TYGS (enero/23). A partir de las 20 cepas, las diez cepas tipo más cercanas se identificaron utilizando el *Genome BLAST Distance Phylogeny approach* (GBDP) (Meier-Kolthoff et al., 2013). Los valores de hibridación DNA-DNA (dDDH) e intervalos de confianza se calcularon con la configuración recomendada de GGDC 3.0 (Meier-Kolthoff et al., 2013, 2022). Por otro lado, se calculó el porcentaje de identidad nucleotídica (ANI) en el programa OAT v. 0.93.1 (Lee et al., 2016) con las cepas más cercanas. Finalmente, se construyó un árbol de inferencia filogenética en FASTME v. 2.1.6.1 (Lefort et al., 2015) con un *pseudobootstrap* de 100 réplicas.

2.2.3.3 Ensamble de los clones positivos e identificación de la enzima fitasa. El análisis bioinformático de los fósidos secuenciados se realizó en el servidor Galaxy Europe (<https://usegalaxy.eu/>) (Jalili et al., 2020). Se utilizó el ensamblador *de novo* Flye v. 2.9.1 (Lin et al., 2016) y se realizó el *polishing* del ensamblado con Medaka v. 1.7.2 (Oxford Nanopore

Technologies, 2020). Finalmente, la calidad de los ensamblajes se determinó con QUASt v. 5.0.2 (Mikheenko et al., 2018).

Con el fin de identificar la enzima fitasa clonada se realizó BLASTX (Altschul et al., 1990) contra las proteínas de GCEP-77 y GCEP-84. Aquellas que presentaron un porcentaje de identidad $\geq 95\%$ y un e-valor cercano o igual a cero, se escogieron como candidatas. La lista obtenida se restringió a 19 proteínas, que se compararon contra las bases de datos InterPro (Paysan-Lafosse et al. 2023) y el *Conserved Domains Database* (CDD) (Lu et al. 2013) en busca de dominios conservados de tipo fitasa.

Para confirmar los motivos conservados de la superfamilia HAP en la fitasa identificada, se construyó un alineamiento en el programa MEGA11 v. 11.0.13 (Koichiro et al., 2021). El alineamiento se realizó contra cuatro proteínas de la misma superfamilia disponibles en el NCBI con los códigos de acceso: KJ783401, AEI69378.1, AHA61669.1 y AF453254.

2.2.4 Caracterización de la enzima fitasa

2.2.4.1 Preparación del extracto celular. La medición *in vitro* de la actividad fitasa fue realizada con los aislados GCEP-77 y GCEP-84. Para ello, éstos fueron cultivados en medios SpM líquido con 10 mL/L de una solución de elementos traza (5 g/L EDTA, 0.83 g/L FeCl₃, 0.178 g/L ZnSO₄, 0.019 g/L CuO₄S₄, 0.01 g/L H₃BO₃, 0.04 g/L Na₂MoO₄, 0.001 g/L KI, pH 5.5), en agitación (250 rpm) a 37 °C. Luego de 24 h de crecimiento, los cultivos se centrifugaron a 5000 rpm por 30 min. La biomasa colectada se resuspendió en una relación 3:1 respecto a su peso húmedo con buffer 20 mM Tris-HCl, pH 7. La lisis celular se llevó a cabo en tubos de microcentrífuga de 2 mL con la adición de perlas de vidrio de 2.85-3.45 mm, 0.5 mm y 0.3 mm dejando un tercio del volumen del tubo vacío. Como primera medida, se realizaron cuatro ciclos de congelación (-20 °C) y descongelación, y seis ciclos de homogenización a 4.350 rpm por 1 min

en un *BeadBug 6 homogenizer* (Benchmark Scientific, TEquipment Inc, UK). Entre ciclos de homogeneización, las muestras fueron incubadas en hielo durante 30 s con el fin de evitar el calentamiento excesivo de los extractos. El extracto crudo obtenido se centrifugó a 20.000 g por 10 min para obtener la fracción soluble del extracto. Los extractos colectados se preservaron a –80 °C hasta su posterior análisis.

2.2.4.2 Medición de la actividad fitasa. La concentración de proteína de los extractos se determinó por el método de Bradford (1976) utilizando como estándar la albúmina de suero bovino (BSA). La actividad fitasa se midió siguiendo el protocolo modificado de Greiner (2004), utilizando como sustrato 1 mM Fitato de sodio. El tiempo de reacción fue de 30 min a 37 °C y la medición se llevó a cabo a A_{355} , sin la adición de ácido cítrico. Para calcular la actividad se realizó una curva de calibración en el rango de 0 a 50 mM de KH_2PO_4 . La actividad específica se expresó en nkatal/mg.

2.2.4.3 Purificación de la enzima. La fracción soluble del extracto en 20 mM Tris-HCL pH 7 se separó por una columna de cromatografía de intercambio aniónico (AEX) de 5 mL HiTrap QFF (Cytiva, Alemania). Las fracciones se eluyeron en un gradiente discontinuo de NaCl en concentraciones de 0, 100, 200 y 300 mM en 20 mM de Tris-HCL, pH 7 a temperatura ambiente. La actividad fitasa fue determinada en cada una de las fracciones colectadas. La fracción que presentó actividad fue concentrada en columnas Pierce™ Protein Concentrators PES, 3K (Thermo Scientific, Alemania). Posteriormente, el extracto crudo soluble y la enzima purificada se visualizaron en un gel 12% SDS-PAGE.

2.2.4.4 pH y temperatura óptima de la enzima purificada. Para determinar la influencia del pH en la actividad enzimática, se utilizó una batería de buffers superpuestos en la fracción activa de la columna AEX. Los buffers utilizados fueron: 50 mM Glicina-HCL (pH 2.2, 3.5), 50

mM acetato de sodio (pH 3.5, 4, 5, 6), 50 mM Tris-maleato (pH 6, 7, 8) y glicina-NaOH (pH 8, 9). Asimismo, se evaluó la temperatura óptima de la actividad enzimática en un rango de 10 °C a 90 °C utilizando un equipo termociclador (MiniAmp Thermal Cyclor, Thermo Fisher Scientific, USA).

2.2.4.5 Especificidad del sustrato y cinética enzimática. La especificidad del sustrato se determinó con fitato de sodio, β -NADP y 1 mM ADP, a pH y temperatura óptimos. Para obtener la cinética enzimática con el fitato de sodio, se utilizaron concentraciones de 0.05, 0.1, 0.15, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mM en el ensayo de actividad. Los valores de k_m y V_{max} se calcularon siguiendo el modelo de cinética enzimática de Michaelis–Menten en la plataforma MyCurveFit (<https://mycurvefit.com>).

2.2.4.6 Ensayo de iones metálicos, agentes reductores y quelantes. El efecto de diferentes cationes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) se evaluó a una concentración 1 mM en el ensayo de actividad descrito con anterioridad, a temperatura y pH óptimos. De igual forma, se evaluó el efecto de 1 mM EDTA y 2 mM beta-mercaptoetanol (BME).

2.3 Resultados

2.3.1 Aislamiento y caracterización morfológica

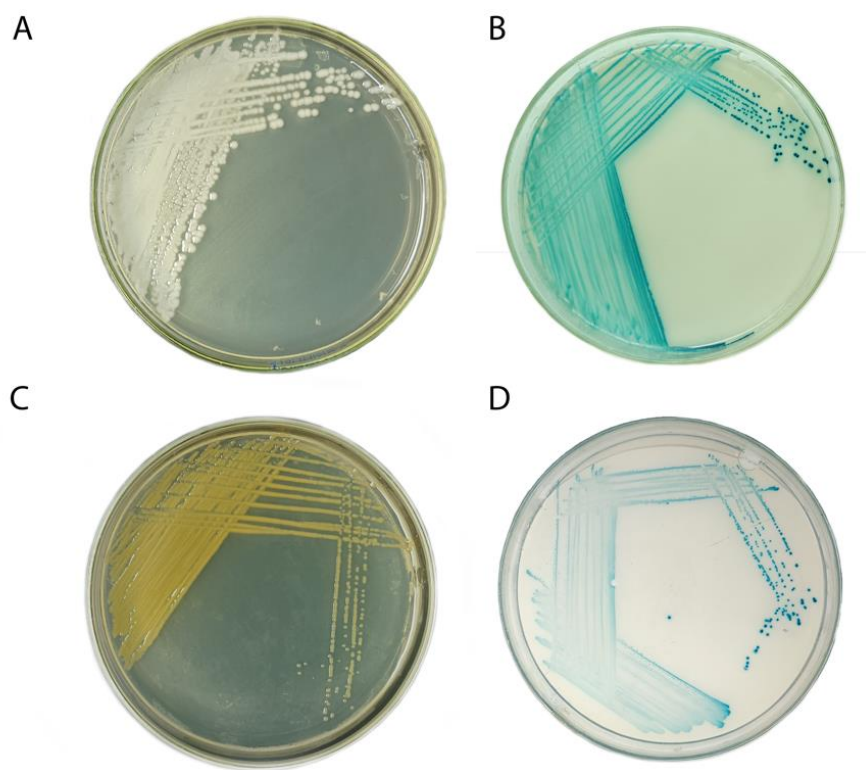
A partir de 11 muestras de suelo contaminado con heces de caprino, se aislaron 14 cepas potencialmente degradadoras de fitato. La actividad fitasa se determinó, preliminarmente, mediante la observación de una coloración azul intenso por parte de las colonias bacterianas. Esta coloración se produce por la reacción del BCIP con el fosfato liberado por las moléculas de fitato adicionadas como única fuente de fósforo y carbono al medio SpM modificado (Figura 3B, D). En todos los casos, los aislados presentaron una morfología circular, de borde entero, ligeramente

elevado y de tipo bacilo Gram negativo. El 79% se caracterizó por un color crema brillante, mientras que el 21% restante exhibió un color amarillo (Figura 3A, C).

Figura 3

Microorganismos representativos de los aislados degradadores de fitato en medio LB y SpM

Modificado



Nota. Aislados GCEP-84 (A, B) y GCEP-77 (C, D) en medio Luria-Bertani (LB) (A y C) y su confirmación como degradadores de ácido fítico en medio SpM modificado (B y D).

2.3.2 Análisis de secuencias del gen 16S rRNA

La determinación taxonómica preliminar de los 14 aislados se realizó mediante la secuenciación del gen 16S rRNA. Las secuencias evidenciaron una longitud entre 1.424 y 1.449

pb con un N50 > 1.443 pb. Para cada secuencia consenso se calculó el porcentaje de identidad y la cobertura utilizando la base de datos de nucleótidos del NCBI como referencia (Tabla 1). Los aislados con presunta actividad fitasa se agruparon en dos grupos definidos: once aislados con afiliación a cuatro especies del género *Klebsiella* y, tres aislados con afiliación a la especie *Chryseobacterium indologenes*. En todos los casos la determinación evidenció porcentajes de identidad >99%. Para el género *Klebsiella* se identificaron las especies: *Klebsiella variicola*, *K. aerogenes*, *K. oxytoca* y *K. pneumoniae*.

Tabla 1

Identidad de los aislados degradadores de fitato por medio del gen 16S rRNA

Espece relativa cercana	Código	Identidad (%)	Cobertura (%)	GenBank
<i>Chryseobacterium indologenes</i> strain StR 04	GCEP-77	99.35	100	CP045735.1
	GCEP-78	99.28	100	CP045735.1
	GCEP-79	99.28	100	CP045735.1
<i>Klebsiella aerogenes</i> strain FDAARGOS_327	GCEP-80	99.72	100	CP031756.1
<i>Klebsiella aerogenes</i> strain Ka30434	GCEP-81	99.64	100	CP073780.1
<i>Klebsiella oxytoca</i> strain FDAARGOS_500	GCEP-82	99.29	100	CP033844.1
	GCEP-83	99.43	100	CP033844.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain KP18-2113	GCEP-84	99.50	100	CP082029.1
	GCEP-85	99.50	100	CP082029.1
<i>Klebsiella variicola</i> strain 8917	GCEP-86	99.50	100	CP063403.1
<i>Klebsiella variicola</i> strain 13450	GCEP-87	99.64	100	CP026013.1
	GCEP-88	99.72	100	CP026013.1
<i>Klebsiella</i> sp. FDAARGOS_511	GCEP-89	99.79	100	CP033824.1
	GCEP-90	99.79	100	CP033824.1

2.3.3 Análisis genómico

Para los análisis genómicos posteriores, se seleccionaron las cepas GCEP-77 y GCEP-84. La selección se realizó a partir de un análisis visual cualitativo de la intensidad del color azul obtenido en el medio SpM con BCIP. Para ello, la intensidad del color desarrollado por las cepas en las placas se utilizó como indicativo de la capacidad de degradación del fitato.

La secuenciación en las plataformas Illumina y Nanopore permitieron el ensamble híbrido *de novo* de los dos aislados. La secuenciación utilizando la plataforma Illumina obtuvo 5.281.815 de *reads* para *Chryseobacterium* sp. GCEP-77 y 8.381.014 para *Klebsiella* sp. GCEP-84. La tecnología Nanopore permitió obtener más de 12.000 *reads* para cada una de las cepas, con un N50 > 26.000 pb. Los datos estadísticos de la secuenciación en las dos tecnologías se presentan en el Apéndice A.

En ambos casos, el ensamble híbrido resultó en un único *contig* circular con un tamaño de 5.13 Mb para *Chryseobacterium* sp. GCEP-77 y 5.17 Mb para *Klebsiella* sp. GCEP-84 (Apéndice B). El contenido de GC varió entre los aislados, con el porcentaje más bajo representado por 36.8% para *Chryseobacterium* sp. GCEP-77, en comparación con 57.7% para *Klebsiella* sp. GCEP-84. El número de CDS, tRNAs, rRNAs y tmRNAs fue similar en cada ensamble, como se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2

Estadísticos de los ensamblajes genómicos

Atributos	<i>Chryseobacterium</i> sp. GCEP-77	<i>Klebsiella</i> sp. GCEP-84
Tamaño del genoma	5.125.303	5.169.325
Numero de <i>contigs</i>	1	1

Contenido GC (%)	36.8	57.7
CDS	4.560	4.722
tRNAs	83	86
rRNAs	18	25
tmRNAs	1	1

Con el objeto de confirmar la identidad taxonómica de los dos aislados, se realizaron análisis a nivel de genoma completo. La Tabla 3 muestra las cepas seleccionadas para la comparación junto con los valores de hibridación para cada uno de los aislados. El análisis de hibridación DNA-DNA *in silico* (dDDH), demostró que la especie más cercana a GCEP-77 correspondió a *Chryseobacterium cucumeris* GSE06 con un valor de 42.1% y 62.9% para el d4 y d6, respectivamente. A su vez, para GCEP-84 se identificó *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 como la especie cercana con valores de 94.1% (d4) y 88.4% (d6).

Tabla 3

Identidad nucleotídica (ANI) e hibridación digital ADN-ADN in silico (dDDH)

Cepa de referencia	Cepa tipo	ANI (%)	Valores de hibridación			
			d4	I.C	d6	I.C
GCEP-77	<i>Chryseobacterium cucumeris</i> GSE06	90.38	42.1	[39.6 - 44.6]	62.9	[59.6 - 66.1]
	<i>Chryseobacterium candidae</i> JC507	89.15	38.7	[36.2 - 41.2]	52.6	[49.5 - 55.7]
	<i>Chryseobacterium gleum</i> NCTC 11432	86.95	34	[31.6 - 36.5]	49.9	[46.9 - 53.0]
	<i>Chryseobacterium gleum</i> ATCC 35910	86.91	33.9	[31.5 - 36.4]	49.7	[46.7 - 52.8]
	<i>Chryseobacterium rhizoplanae</i> DSM 29371	86.62	32.5	[30.1 - 35.0]	51.7	[48.6 - 54.8]

	<i>Chryseobacterium panacisoli</i> Gsoil 183	86.43	32.1	[29.7 - 34.6]	49.5	[46.4 - 52.5]
	<i>Chryseobacterium aureum</i> 17S1E7	86.06	31.2	[28.8 - 33.7]	48.5	[45.5 - 51.6]
	<i>Chryseobacterium viscerum</i> 687B-08	85.44	30.8	[28.4 - 33.3]	41.8	[38.9 - 44.9]
	<i>Chryseobacterium culicis</i> DSM 23031	85.53	30.6	[28.2 - 33.1]	48.9	[45.9 - 45.9]
	<i>Chryseobacterium flavum</i> KCTC 12877	82.09	26.6	[24.3 - 29.1]	33.5	[30.6 - 36.6]
	<i>Chryseobacterium arthrosphaerae</i> CC-VM-7	82.56	26.6	[24.3 - 29.1]	34	[31.0 - 37.0]
	<i>Chryseobacterium contaminans</i> C26	81.98	26.2	[23.9 - 28.7]	30.1	[27.2 - 33.2]
	<i>Chryseobacterium contaminans</i> DSM 27621	81.93	26	[23.6 - 28.5]	31.5	[28.5 - 34.5]
	<i>Chryseobacterium phosphatilyticum</i> ISE14	81.14	25	[22.7 - 27.5]	29.4	[26.5 - 32.5]
	<i>Chryseobacterium indologenes</i> DSM 16777	80.78	24.9	[22.6 - 27.4]	29.4	[26.5 - 32.5]
	<i>Chryseobacterium indologenes</i> NBRC 14944	80.89	24.9	[22.6 - 27.4]	29.7	[26.8 - 32.8]
GCEP-84	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	99.11	94.1	[92.3 - 95.4]	88.4	[85.5 - 90.8]
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM 30104	99.1	94.1	[92.3 - 95.4]	88.6	[85.7 - 91.0]
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i> ATCC 13884	98.96	92.8	[90.9 - 94.4]	83.9	[80.7 - 86.7]
	<i>Klebsiella africana</i> SB5857	94.97	61.3	[58.4 - 64.1]	86.3	[83.2 - 88.9]
	<i>Klebsiella variicola</i> DSM 15968	94.43	58.8	[56.0 - 61.5]	80.6	[77.2 - 83.6]
	<i>Klebsiella quasivariicola</i> KPN1705	93.85	56	[53.3 - 58.7]	71.7	[68.3 - 75.0]
	<i>Klebsiella variicola</i> subsp. <i>tropica</i> SB5531	93.93	55.9	[53.1 - 58.6]	79.7	[76.3 - 82.8]
	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> 07A044	93.73	54.6	[51.9 - 57.3]	82.6	[79.3 - 85.5]
	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> 01A030	93.48	53.8	[51.1 - 56.4]	77.4	[73.9 - 80.5]

Los valores de hibridación <70 , sugieren que la secuencia analizada para este aislado corresponde a una posible especie nueva o no descrita hasta el momento. Con el objetivo de corroborar las especies más cercanas asignadas para cada aislado por el dDDH, se calculó el porcentaje de identidad nucleotídico (ANI) (Tabla 3). Con éste se confirmó que *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 es la especie más cercana al aislado GCEP-84 con un valor ANI de 99.1% (Figura 4B), en concordancia con lo obtenido anteriormente en la hibridación *in silico*. De igual forma, para la GCEP-77 se corroboró la especie propuesta por el dDDH como la más cercana (*C. cucumeris* GSE06). Sin embargo, a diferencia del valor observado para GCEP-84, el ANI entre GCEP-77 y *C. cucumeris* GSE06 presentó un valor de 90.4%, demostrando incertidumbre en cuanto a la determinación taxonómica del aislado a nivel de especie (Figura 4A).

Conforme a lo obtenido con los valores de hibridación y el porcentaje ANI, se construyó un árbol filogenético de genoma completo (Figura 5,6). En éste, el aislado GCEP-77 se posicionó dentro del clado de *C. cucumeris* GSE06 con un bootstrap de 100. Por su parte, el GCEP-84 se identificó como parte del clado de *Klebsiella pneumoniae*, específicamente como el grupo hermano de *K. pneumoniae* ATCC 13884 y *K. pneumoniae* DMS 30104, con un bootstrap de 29.

Figura 4

Porcentaje de identidad nucleotídica (ANI) de los aislados Chryseobacterium sp. GCEP-77 (A) y Klebsiella sp. GCEP-84 (B) con sus parientes cercanos

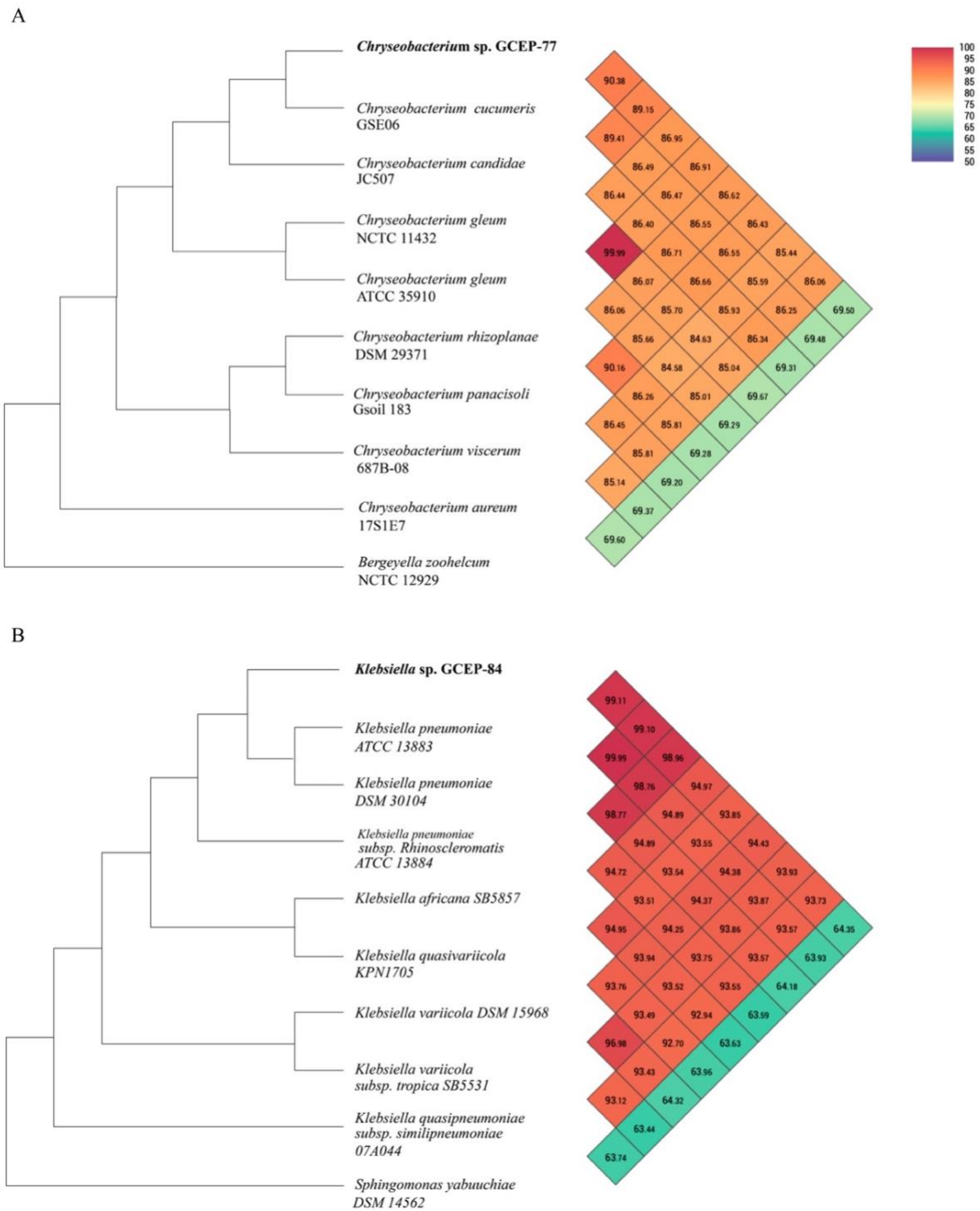


Figura 5

Árbol de evolución mínima basado en genoma completo de *Chryseobacterium* sp. GCEP-77

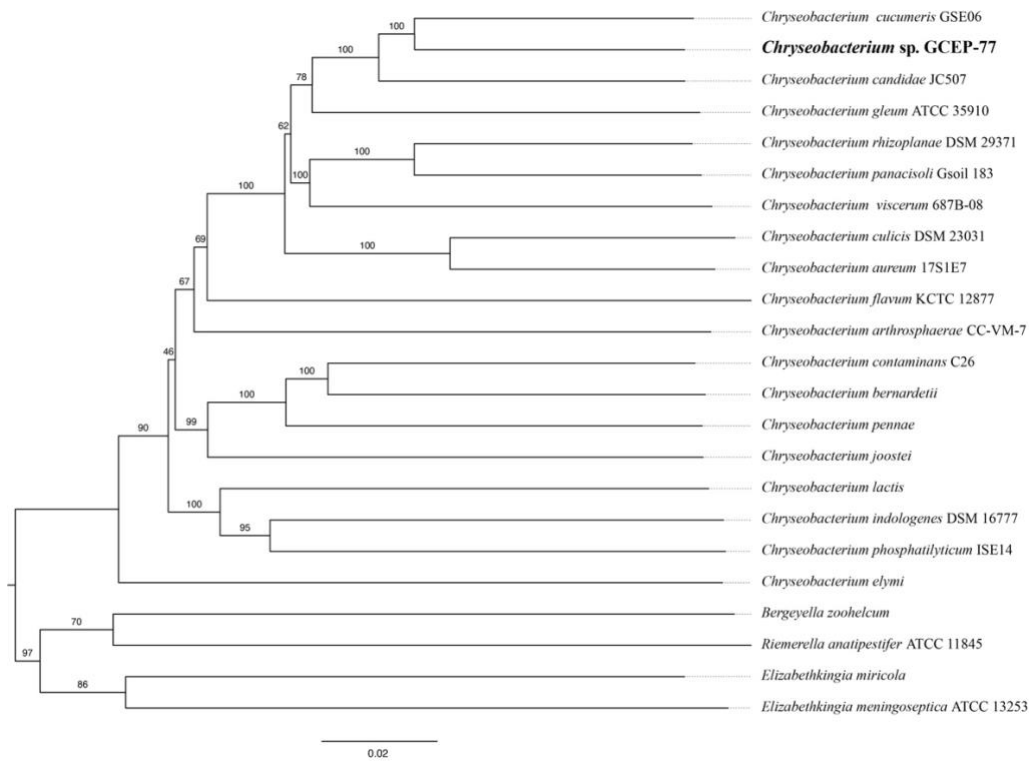
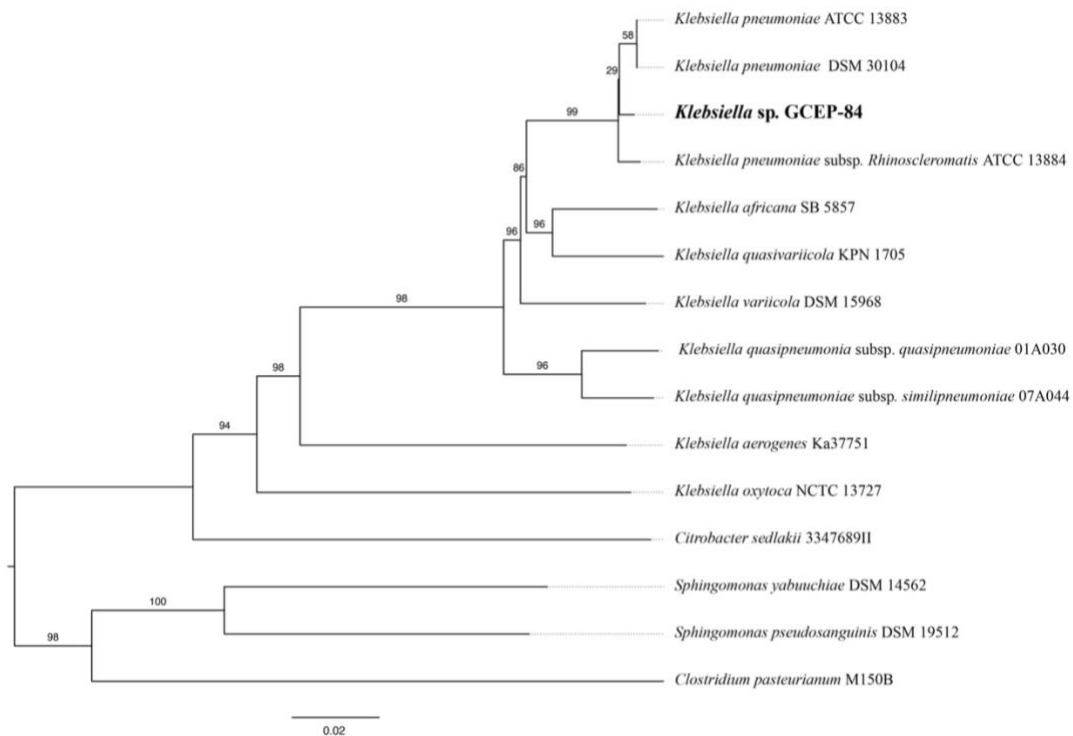


Figura 6

Árbol de evolución mínima basado en genoma completo de *Klebsiella* sp. GCEP-84



2.3.4 Identificación de los genes de actividad fitasa

Para cada genoma se realizó la anotación funcional. En ésta se identificaron 14 genes candidatos con actividad fosfatasa para *Chryseobacterium* sp. GCEP-77 (Tabla 4) y 15 para *K. pneumoniae* GCEP-84 (Tabla 5), abarcando un rango de 43 a 497 aminoácidos. Entre las fosfatasas candidatas de ambos géneros, siete de ellas presentaron péptidos señal; tres de ellas, se identificaron como proteínas de la familia fosfatasa alcalina (ALP). Las 29 proteínas de ambos aislados se clasificaron en 16 superfamilias. Para *Chryseobacterium* sp. GCEP-77, las enzimas clasificadas como haloácido deshalogenasas (HAD) fueron las más abundantes con cuatro representantes. Seguido por las fosfatasas alcalinas (ALP) y metalofosfatasas (MPP) con dos candidatas cada una. De igual modo, para *K. pneumoniae* GCEP-84 el grupo HAD predominó con tres candidatas. En conjunto con el grupo hidrolasas NUDIX y pirofosfatasas inorgánicas (Ppase) con dos candidatas para cada grupo.

Tabla 4

Fosfatasas candidatas para la cepa Chryseobacterium sp. GCEP-77

Superfamilia	Subfamilia/ Clase/Clado	Anotación	Péptido señal	No. de aa	CDS
ALP	PhoA	Alkaline phosphatase 4	Sí	465	KPMCEDBI_00872
	Subcl. SPAP	Alkaline phosphatase PafA	Sí	548	KPMCEDBI_02033
	PhoD	Alkaline phosphatase D	Sí		KPMCEDBI_03930
DHH	NrnA	Bifunctional oligoribonuclease and PAP phosphatase NrnA	No	354	KPMCEDBI_02651
HAD	Subfam. IA (REG-2- like)	Phosphoglycolate phosphatase	No	222	KPMCEDBI_03984
	Subfam. IA	Hexitol phosphatase B	No	215	KPMCEDBI_00272
	(Variante 3)	Pyrophosphatase PpaX	No	229	KPMCEDBI_00514

	Subfam. IIB	Sugar phosphatase YbiV	No	266	KPMCEDBI_00383
MPP	Fam. PPP	Serine/threonine-protein phosphatase 1	No	242	KPMCEDBI_03081
NUDIX hydrolase-like		GDP-mannose pyrophosphatase NudK	No	193	KPMCEDBI_01084
PhoB		Alkaline phosphatase synthesis transcriptional regulatory protein PhoP	No	227	KPMCEDBI_03735
Ppa	Ppa	Inorganic pyrophosphatase	No	203	KPMCEDBI_00542
PTP	Subfam. LMW	Putative low molecular weight protein-tyrosine-phosphatase	No	149	KPMCEDBI_00002
UppP		Undecaprenyl-diphosphatase	No	272	KPMCEDBI_04523

Tabla 5

Fosfatasas candidatas para la cepa Klebsiella pneumoniae GCEP-84

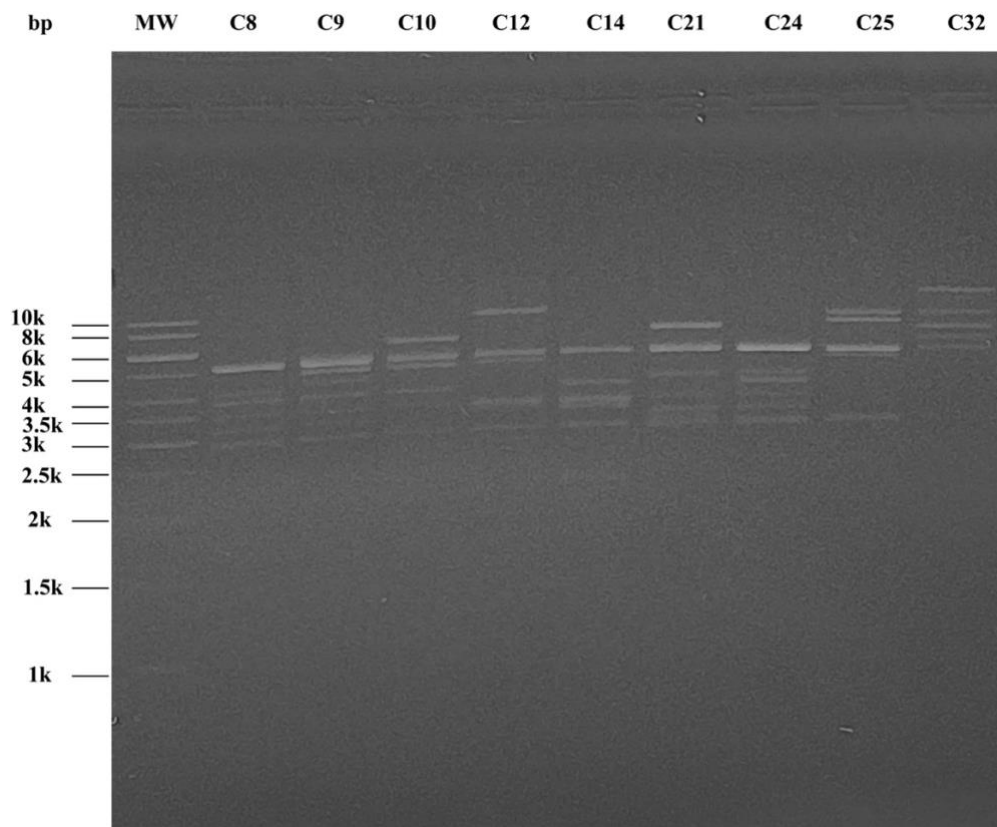
Superfamilia	Subfamilia/ Clase/Clado	Anotación	Péptido señal	No. de aa	CDS
ALP	PhoA	Alkaline phosphatase	Sí	471	CBGEPPIE_03741
HAD	Subfam. IB	Putative phosphatase	No	221	CBGEPPIE_03784
	Subfam. IIB	HMP-PP phosphatase	No	272	CBGEPPIE_03660
	Subfam. IIIB	Class B acid phosphatase	Sí	237	CBGEPPIE_04484
HP	Clado 1	Phosphohistidine phosphatase SixA	No	128	CBGEPPIE_01416
IMPases		Inositol-1-monophosphatase	No	267	CBGEPPIE_01227
LMWPTP		Low molecular weight protein-tyrosine-phosphatase Etp	No	43	CBGEPPIE_01626
NUDIX hydrolase-like		Dihydroneopterin triphosphate diphosphatase	Sí	147	CBGEPPIE_01760
		Phosphatase NudJ	No	152	CBGEPPIE_02927

PAP2	Major phosphate-irrepressible acid phosphatase	No	298	CBGEPPIE_02858
PhoB	Alkaline phosphatase synthesis transcriptional regulatory protein PhoP	No	245	CBGEPPIE_02069
PHP	Putative phosphatase YcdX	No	245	CBGEPPIE_03014
Ppase	Inorganic pyrophosphatase	Sí	497	CBGEPPIE_02277
Clase A	Inorganic pyrophosphatase	No	176	CBGEPPIE_04310
PPPase	Inorganic triphosphatase	No	432	CBGEPPIE_00662

2.3.5 Construcción de la librería genómica

Para identificar el gen codificante de la proteína fitasa de ambos aislados, se construyó una librería genómica con ADN de alto peso molecular en el vector pCC1FOS. Con el fin de optimizar el experimento, la librería se construyó con siete cepas correspondientes a diferentes actividades (fitasa, celulasa, lacasa, lipasa y proteasa). Para la actividad fitasa se emplearon las cepas anteriormente descritas (GCEP-77 y GCEP-84). De la librería, se recuperaron 3.305 clones, de los cuales el 7% correspondió a clones con el vector recircularizado, sin inserto.

En el *screening* de la librería se identificaron 32 clones positivos (Apéndice C). Las bandas esperadas en la digestión del fósido recircularizado (8.139 bp) con la enzima *Sma* I fueron de 5.003, 2.842 y 302 pb. En la Figura 7 se muestra el resultado del análisis de restricción de nueve clones con potencial actividad fitasa, cuyo perfil de bandas evidencia la efectiva inserción de ADN de interés en el vector.

Figura 7*Digestión de los clones con actividad fitasa*

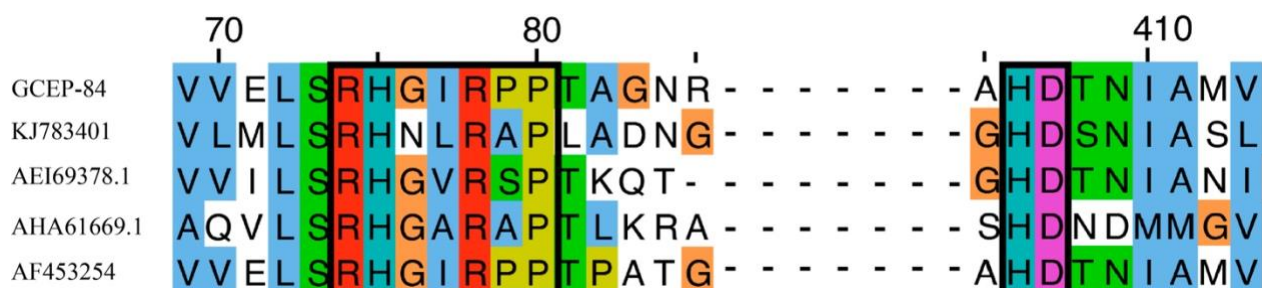
Nota. MW, Marcador de peso molecular 1 kb; C8-C32, Digestión de los clones con *Sma* I.

Como resultado de la secuenciación y ensamblaje de ocho clones positivos, se obtuvieron en cada caso *contigs* con tamaños superiores a 30.000 pb. En la búsqueda de las proteínas clonadas, los porcentajes de identidad ($\leq 45\%$) indicaron que no se clonó ninguna fitasa proveniente de *Chryseobacterium* sp. GCEP-77. En cuanto a *K. pneumoniae* GCEP-84 se identificaron 19 proteínas que fueron comunes en todos los clones (Apéndice D). Entre ellas, la enzima Glucose-1-fosfatasa (G1Pasa), que compartió el motivo (RHGXRX/HD) característico de la superfamilia histidina fosfatasa ácida (HAP) (Figura 8). La enzima mostró un peso estimado de 46.3 kDa (422

aa) y, además, se detectó en ella un péptido señal. Contra HAPs reportadas, la G1Pasa reportó identidad del 100% (*Klebsiella* spp.), 93.8% (*Klebsiella pneumoniae*), 27.3% (*Thermothelomyces thermophilus*), 30.4% (*Yersinia mollaretii*) y 31.4% (*Pantoea* sp.).

Figura 8

Alineamiento de los motivos conservados de HAPs



Nota. En los recuadros negros se indican los motivos conservados (RHGXRX/HD) de GCEP-84. GCEP-84, HAP de *Klebsiella pneumoniae*; KJ783401, Glucosa-1fosfatasa de *Pantoea* sp.; AEI69378.1, HAP de *Yersinia mollaretii* ATCC 43969; AHA61669.1, HAP de *Thermothelomyces thermophilus*; AF453254, HAP de *Klebsiella pneumoniae*.

2.3.6 Determinación de la actividad fitasa

En los dos aislados fue detectada la actividad fitasa en el extracto crudo (Tabla 6). Los dos aislados fueron cultivados en medio SpM modificado, asegurando la utilización del fitato como fuente única de carbono y fosfato. En este tipo de medio constituido principalmente por sales, el crecimiento de la cepa *Chryseobacterium* sp. GCEP-77 alcanzó una densidad óptica inferior ($OD_{600} = 0.168$) a lo observado para *K. pneumoniae* GCEP-84 ($OD_{600} = 0.348$) en un periodo de incubación de 24 h. Asimismo, la cantidad de proteína recuperada en los extractos fue mayor para la *K. pneumoniae* GCEP-84 con 36 mg/L de medio de cultivo centrifugado, en comparación con

los 5.9 mg obtenidos de *Chryseobacterium* sp. GCEP-77. Acorde con lo anterior, los valores de actividad total y específica más altos se presentaron en los extractos de *K. pneumoniae* GCEP-84. En los dos casos, la inoculación en medio LB líquido resultó en la generación de biomasa sin actividad fitasa, sugiriendo que la expresión de las proteínas involucradas en la degradación de fitato se encuentran potencialmente regidas por mecanismos de control de la expresión génica.

Tabla 6

Actividad fitasa de los extractos crudos de los aislados Chryseobacterium sp. GCEP-77 y K. pneumoniae GCEP-84

Extracto Crudo	Proteína total	Actividad total	Actividad específica
	mg	nkatal	nkatal/mg
<i>Chryseobacterium</i> sp. GCEP-77	5.9	20.6	3.5 (0.4)
<i>K. pneumoniae</i> GCEP-84	36	1468.8	40.8 (5)

Nota. Los valores en paréntesis corresponden a la desviación estándar de las tres réplicas.

2.3.7 Caracterización de la proteína fitasa

Con los resultados descritos anteriormente como base, se seleccionó *K. pneumoniae* GCEP-84 para producir y purificar la enzima fitasa. En consecuencia, la proteína soluble obtenida de la lisis celular del aislado GCEP-84 fue utilizada para la purificación de la fracción activa mediante cromatografía en columna de intercambio aniónico (Tabla 7).

Tabla 7

Tabla de purificación de la enzima fitasa de la cepa K. pneumoniae GCEP-84

Paso de la purificación	Proteína total	Actividad total	Actividad específica	Purificación	Yield
	mg	nkatal	nkatal/mg	<i>n-fold</i>	%
Extracto soluble	23.9	229.01	9.6 (3.2)	1	100
AEX	1.4	57.12	40.8 (0.9)	4.25	5.87

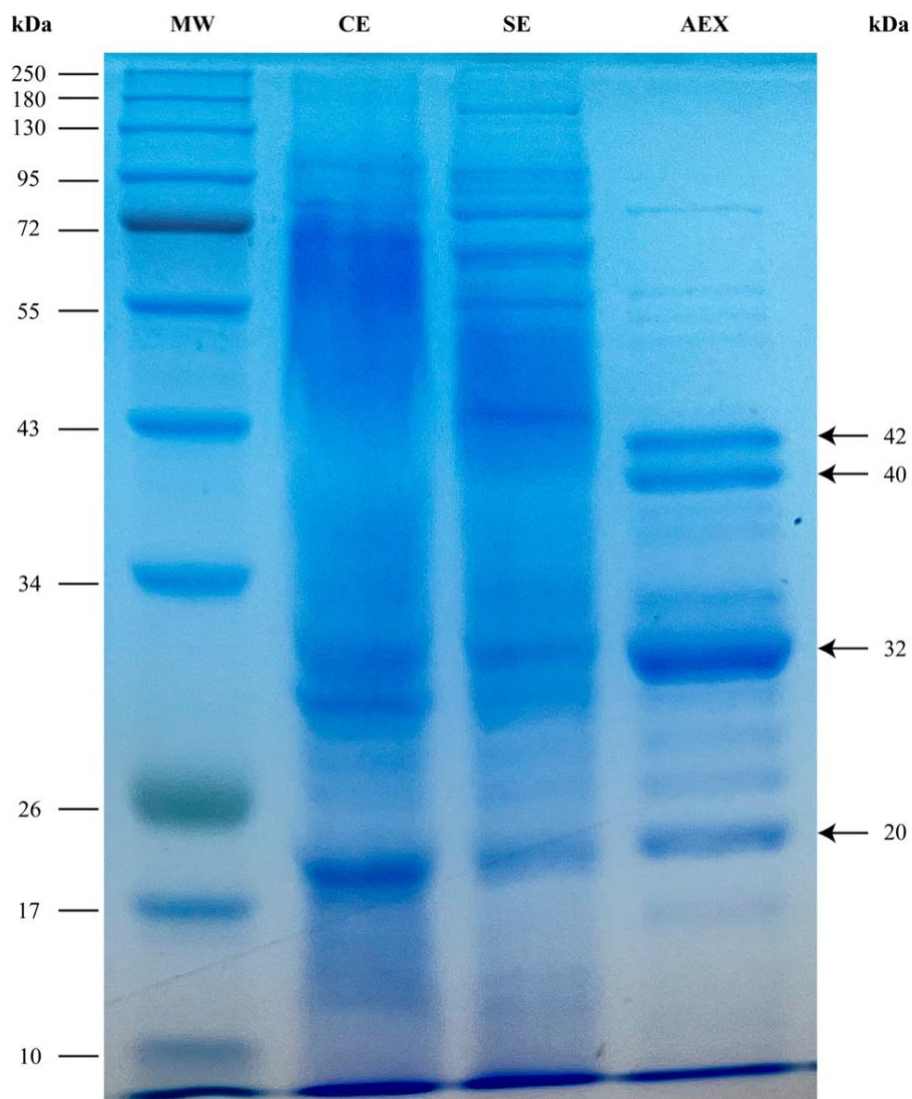
Nota: Los valores en paréntesis corresponden a la desviación estándar de las tres réplicas.

El uso de dicha columna de purificación se tradujo en un enriquecimiento de la actividad fitasa de 4.25 veces respecto al extracto soluble en la fracción eluída al aplicar el búfer con 100 mM NaCl.

Para visualizar el proceso de purificación de la enzima, se realizó un gel 12% SDS-PAGE con el extracto crudo, la fracción soluble y la fracción activa de la columna de intercambio aniónico (Figura 9). Al comparar el perfil de bandas presente en las tres fracciones, se identificó el enriquecimiento de cuatro bandas en la fracción activa de la columna de intercambio aniónico. En orden de aparición las cuatro bandas contaron con un peso molecular aproximado de 42, 40, 32 y 20 kDa.

Figura 9

SDS-PAGE al 12% de las fracciones con actividad fitasa de K. pneumoniae GCEP-84



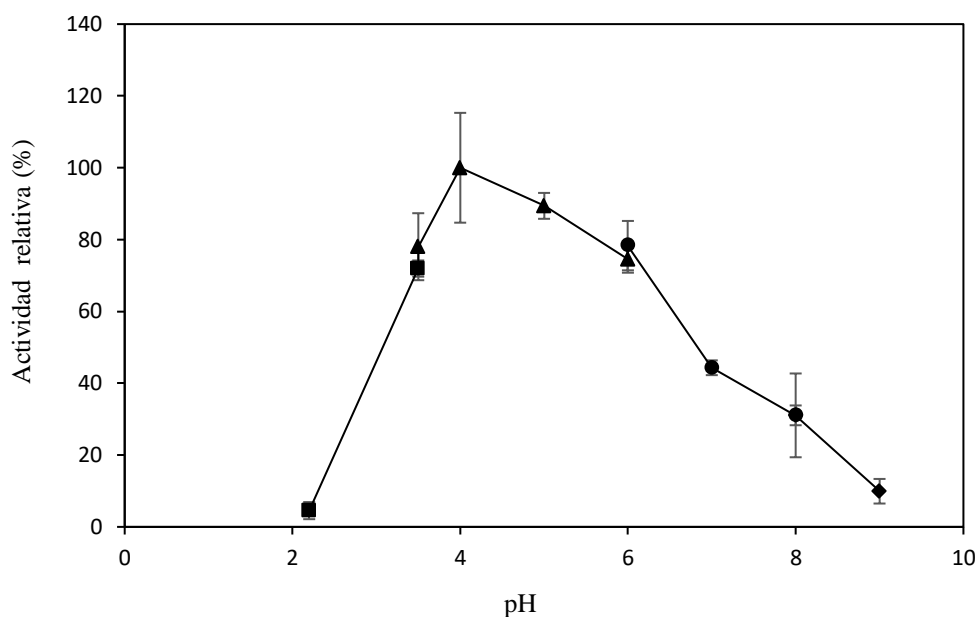
Nota. MW, Marcador molecular; CE, Extracto crudo; SE, Extracto soluble; AEX, Fracción activa de la columna de intercambio aniónico. Se señalan las cuatro proteínas enriquecidas, flecha negra.

Posteriormente, para la caracterización de la enzima parcialmente purificada se evaluaron parámetros fisicoquímicos (pH, temperatura y especificidad). Al evaluar el efecto del pH sobre la actividad fitasa, la enzima mostró los valores de actividad óptimos a pH 4 (Figura 10), manteniendo más del 80% de la actividad a pH 5. No obstante, a partir de un pH neutro se observó

una disminución en la actividad catalítica de más del 50%. De igual forma, se estimó el efecto de la temperatura en un rango de 10 °C a 90 °C a pH 4. La temperatura óptima fue a 50 °C (Figura 11). No obstante, se conservó alrededor del 60% de la actividad en los 30, 40 y 60 °C.

Figura 10

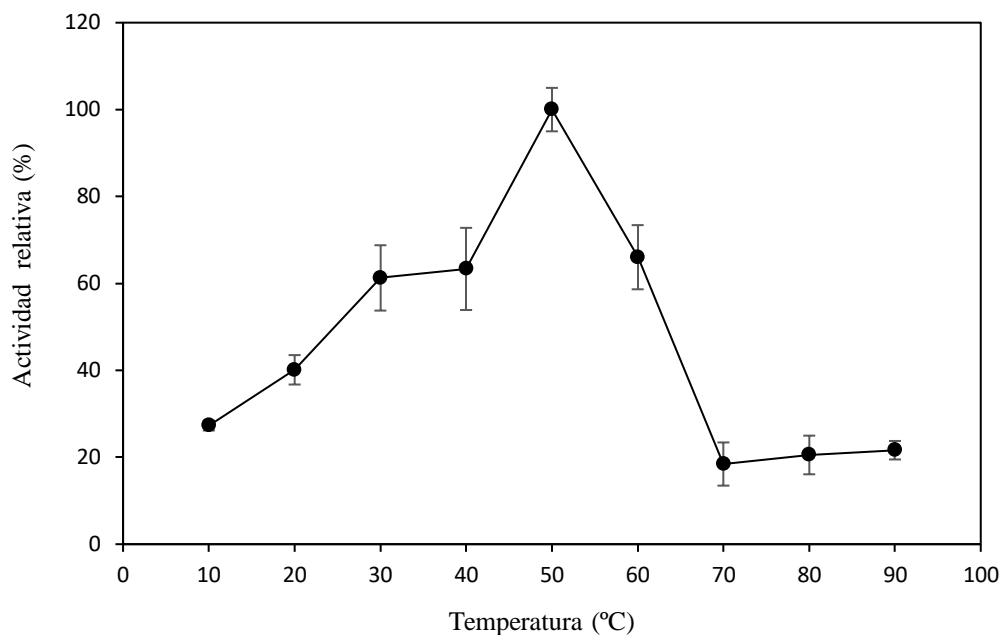
Efecto del pH en la actividad relativa de la proteína purificada



Nota: La medición se realizó con un sistema de buffers distintos. Los valores corresponden a la media de las tres réplicas. Buffer Glicina-HCL, ■; Buffer Acetato de sodio, ▲; Buffer Tris-Maleato, ●; Buffer Glicina-NaOH, ◆.

Figura 11

Efecto de la temperatura en la actividad relativa de la proteína purificada



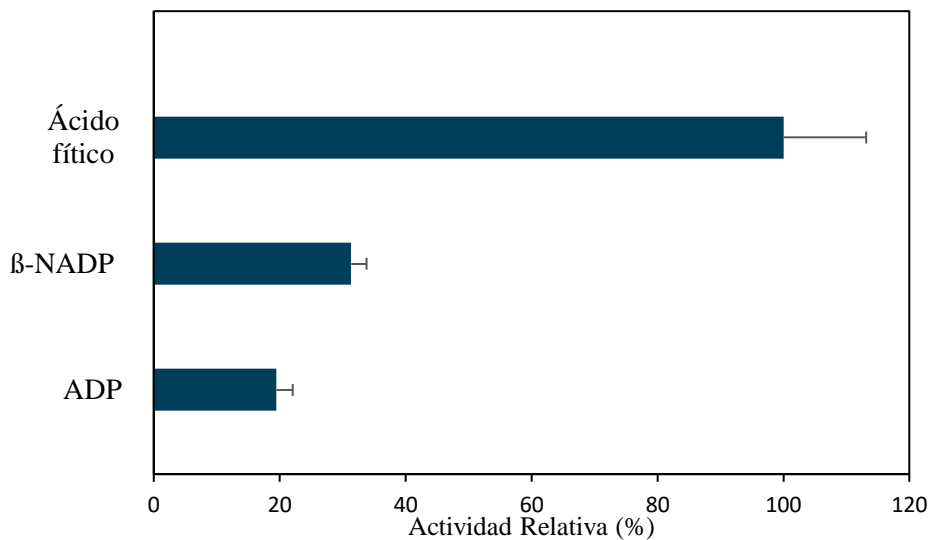
Nota. La medición se realizó según el ensayo de actividad estándar en el rango de temperatura de 10 °C a 90 °C. Los valores corresponden a la media de las tres réplicas.

En cuanto a la estabilidad de la enzima, al incubarla a 40 °C por 2 y 4 h, se mantuvo la actividad en 93% y 88%, respectivamente. Por su parte, la incubación a 50 °C por estos mismos periodos de tiempo se tradujo en pérdidas de la actividad específica en 50%.

Las fracciones activas de la purificación fueron evaluadas en términos de especificidad con dos sustratos fosforilados diferentes al fitato (Figura 12), siendo este último sobre el que se evidenció mayor actividad catalítica. En consecuencia, se realizó la determinación de las constantes cinéticas del biocatalizador utilizando fitato de sodio como sustrato en un rango de 0.05 a 1 mM. Como resultado se obtuvieron una K_m y una V_{max} de 0.019 mM (± 0.008) y 74.52 nkat (± 3.35), respectivamente (Figura 13), calculadas con el modelo de Michaelis-Menten.

Figura 12

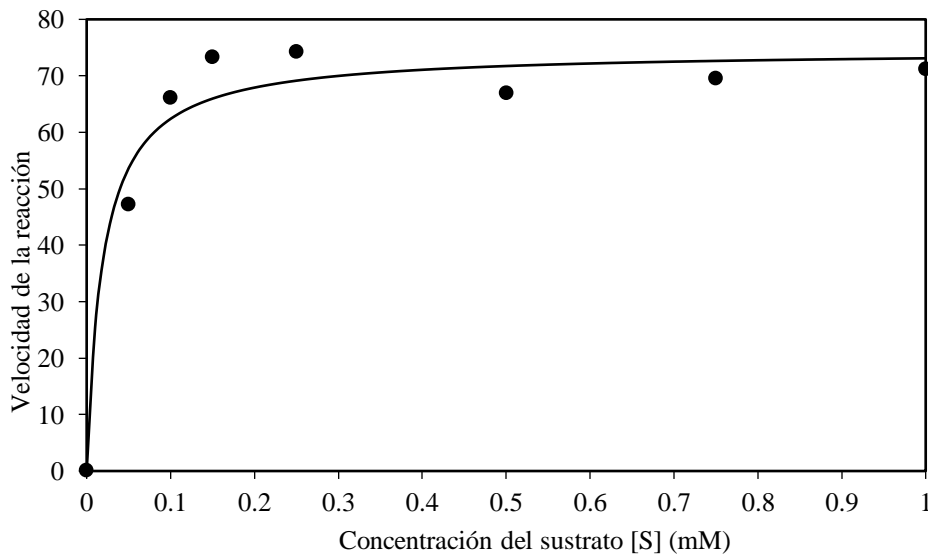
Especificidad de sustratos de la proteína purificada



Nota. La medición se realizó por triplicado a pH y temperatura óptima, con los tres sustratos fosforilados a 1 mM.

Figura 13

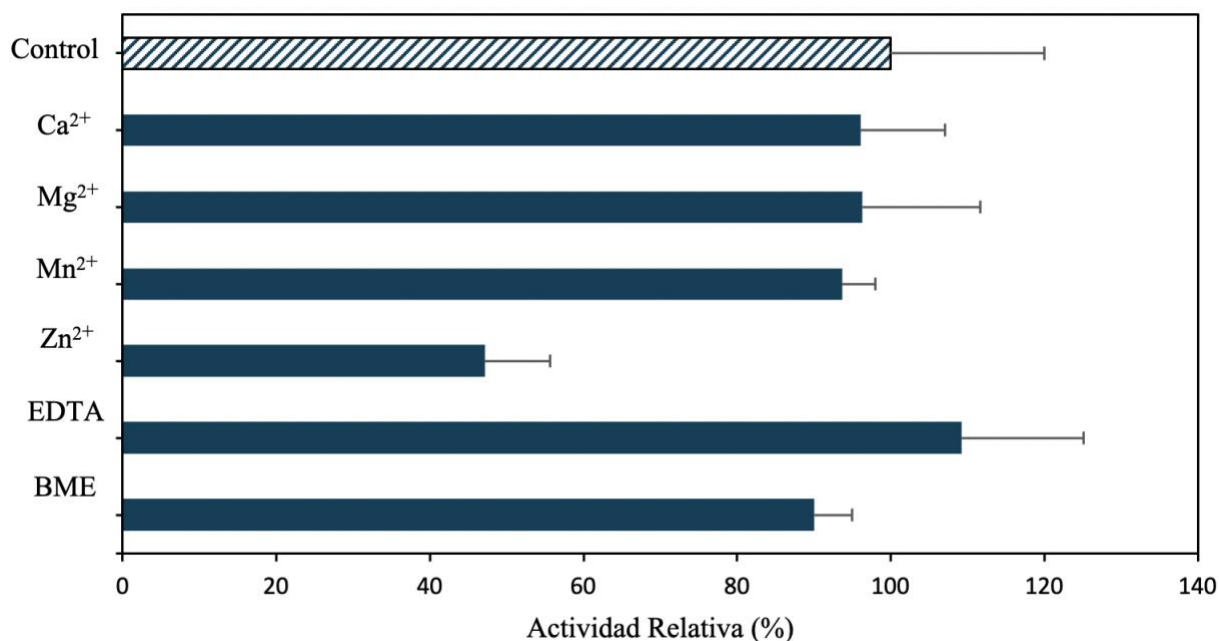
Cinética enzimática de la proteína purificada bajo el modelo de Michaelis-Menten



Por último, se evaluó el efecto de distintos iones metálicos y agentes quelantes y reductores. Si bien en los diferentes casos se observó un ligero efecto en la actividad específica, éste no se considera significativo al encontrarse entre el rango de las desviaciones estándar (Figura 14). La excepción la presentó el Zn^{2+} , pues se comportó como un posible inhibidor, reduciendo la actividad en aproximadamente en 50%.

Figura 14

Efecto de los iones metálicos y agentes químicos en la actividad relativa de la enzima purificada



Nota. La concentración de los iones metálicos y EDTA se emplearon a 1 mM, el beta-mercaptoetanol a 2 mM. La medición se realizó por triplicado a pH y temperatura óptima.

2.4 Discusión

En el presente trabajo de grado se lograron identificar 14 aislados con actividad fitasa provenientes de suelos contaminados con heces de caprino. Se identificaron aislados con afiliación a nivel del género *Chryseobacterium*, por primera vez, con actividad fitasa. Por último, se identificó y caracterizó la fitasa tipo HAP de *Klebsiella pneumoniae* GCEP-84.

En el estudio de microorganismos degradadores de fitato, el método de búsqueda se ha enfocado principalmente en el uso de medios de cultivo con fuentes de carbono variables y fitato como fuente de fósforo (Casey y Walsh, 2004; Wang et al., 2004; Olstorpe et al., 2009; Villamizar et al., 2017). En el presente, se utilizó por primera vez el medio SpM modificado utilizando fitato como única fuente de carbono y fósforo. El *screening* emplea un indicador cromogénico (BCIP), a diferencia de halos hidrolíticos comúnmente utilizados en la medición de la actividad fitasa (Escobin-Mopera et al., 2012). Este tipo de indicadores permite superar la limitación de los halos hidrolíticos y favorece la identificación de la actividad inicial proveniente de todo el arsenal metabólico y no únicamente de las enzimas extracelulares.

El medio modificado en este estudio permitió el aislamiento de 14 cepas de bacterias con actividad fitasa. Estas cepas demostraron la capacidad de hidrolizar no solo los enlaces éster del fitato, sino, además, el mioinositol para emplearlo como fuente de carbono y de fósforo, en los procesos metabólicos. El análisis del gen 16S rRNA permitió la identificación de los aislados, la cual se restringió a solo dos géneros bacterianos. De una parte, se identificaron miembros del género *Klebsiella*, una Enterobacteriaceae ampliamente distribuida con tendencia a generar patogenicidad (Nordmann et al., 2009; Wyres y Holt, 2018) y *Chryseobacterium*, una Flavobacteriaceae que habita en diversos ambientes (p. ej. suelo, cuerpos de agua y alimentos) (Bernardet et al., 2006). La identificación de este tipo de organismos a partir de muestras de suelo

concuera con estudios previos (Kämpfer et al., 2014; Du et al., 2015). Para ambos géneros se ha reportado la capacidad de solubilizar fósforo disponible, por lo que son consideradas como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Sang et al., 2018). Adicionalmente, *Chryseobacterium* spp. cumple un papel de biocontrol ante patógenos vegetales (Jeong et al., 2018). Tanto *Klebsiella* sp. como *Chryseobacterium* sp. son considerados organismos con potencial en la agroindustria para minimizar el uso de fertilizantes químicos en suelos agrícolas (Fatima et al. 2022).

El análisis cualitativo sobre las placas llevó a la selección de las dos cepas con mejor capacidad de degradación de fitato. Estas cepas se secuenciaron y ensamblaron utilizando un enfoque híbrido, con el fin de obtener una mínima cantidad de *contigs* de alta calidad (Tabla 2). Este uso de tecnologías de secuenciación complementaria permitió obtener genomas circularizados de un tamaño esperado de ~5 Mb para ambos casos (Apéndice B). En este tipo de ensamble, las lecturas largas (Nanopore) aportan la estructura de los genomas, mientras los fragmentos cortos de Illumina, favorecen el ensamble local, minimizando los errores (Wick et al., 2017a; Risse et al., 2015). Los porcentajes de GC para *Chryseobacterium* GCEP-77 (36.85%) y *Klebsiella* GCEP-84 (57.66%) se encontraron dentro del rango reportado para los representantes de estos géneros (Chen M. et al., 2015; Jeong et al., 2017). Estudios metagenómicos en suelos revelan que porcentajes de GC bajos y genomas de alto tamaño molecular podrían relacionarse con la capacidad de respuesta al estrés fisiológico y a su vez, como sinónimo de diversidad metabólica (Chuckran et al., 2023).

El porcentaje de identidad del gen 16S rRNA fue > 99%, para las dos cepas. Sin embargo, esta técnica es considerada únicamente como un primer paso en la determinación taxonómica (Tindall et al., 2010). La delimitación actual con valores $\geq 97\%$ utilizando el gen 16S rRNA

requiere de métodos como el dDDH y ANI, donde valores por debajo del 70% y 95%, respectivamente, indican una nueva especie bacteriana (Goris et al., 2007; Richter y Rosselló-Móra, 2009). En el caso del aislado GCEP-84, los parámetros mencionados permitieron identificarlo como estrechamente relacionado con *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (Tabla 3). Por otra parte, el análisis de GCEP-77 indicó la probable existencia de una especie nueva dentro del género *Chryseobacterium*. Este género es considerado heterogéneo y la rápida expansión del grupo en los últimos años ha llamado la atención. Para el 2005 se reportaban alrededor de 10 especies de *Chryseobacterium* (Shimomura et al., 2005) y al momento de escritura (marzo/23) se encuentran descritas 166 especies (<https://www.bacterio.net>). Para la validación, la candidata a especie nueva (GCEP-77) debe en el futuro describirse de forma detallada, incluyendo las características fisiológicas y bioquímicas en conjunto con el análisis genómico. Aun así, este resultado permite hipotetizar que ambientes poco explorados como los suelos agrícolas colombianos pueden representar una fuente de organismos, con características metabólicas de interés, no descritos hasta el momento.

Los esfuerzos en el estudio de fitasas en Colombia son limitados. Entre ellos, Ocampo et al. (2012) identificaron enzimas fúngicas potencialmente degradadores de fitato. Mientras que Costa et al. (2009) trabajaron en la expresión de una enzima fúngica presente en desechos agroindustriales. Sin embargo, los dos casos corresponden a estudios preliminares donde no se describieron las propiedades de los biocatalizadores, ni se caracterizaron bioquímicamente. Por tanto, en el presente se abordó desde la identificación de aislados bacterianos degradadores de fitato hasta la búsqueda de la enzima con actividad y sus propiedades bioquímicas.

En el presente trabajo se reporta por primera vez la actividad fitasa en el género *Chryseobacterium* (Tabla 6). Dado que las fosfatasa ácidas reportadas hasta el momento en especies del género no presentan actividad fitasa (Passariello et al., 2003), en los dos aislados analizados, la fitasa fue inducida por el fitato, por la ausencia de otra fuente de fósforo y carbono en el medio. Este tipo de expresión puede ser explicada por: 1) la escasez de fósforo, que conduce a la activación de una serie de genes asociados a un operón como el regulón *Pho* (Stosiek et al., 2020) ó 2) a la limitación de las fuentes de carbono, que desencadena la expresión de enzimas para la hidrólisis del fitato en busca del mioinositol, como ocurre en *Bacillus subtilis* (Antelmann et al., 2007).

En la búsqueda de biocatalizadores, técnicas como la microbiología tradicional, el *genome mining* y la metagenómica han permitido la identificación de nuevas enzimas de interés, entre ellas fitasas (Chan et al., 2012; Tan et al., 2014; Suleimanova et al., 2015b). En el presente estudio, se optó por un enfoque integrativo de estas herramientas, que permitieron la identificación de una enzima fitasa derivada de GCEP-84 considerada como la responsable de la actividad en este estudio. Inicialmente, en los genomas de los aislados se identificaron representantes de las superfamilias ALP, PAP2, PTP, HAD y NUDIX reportadas con actividad fitasa previamente (Zhang et al., 2010; Lei et al., 2013; Castillo et al., 2019a; Castillo et al., 2019b; Winward et al., 2020). No obstante, fue el *genome mining* de la librería metagenómica donde se identificó la enzima glucosa-1 fosfatasa de *Klebsiella pneumoniae* GCEP-84 como la candidata más opcionada a ser responsable de la actividad. Esta enzima es una HAP (*Branch 2*) homóloga a la previamente reportada para la especie, con el número de accesoión WP_225372272 del GenBank. La 1GPasa identificada concuerda con una de las bandas obtenidas en el proceso de purificación de la enzima de *K. pneumoniae* GCEP-84, con un peso molecular aproximado de 42 kDa (Mullaney y Ullah

2003; Kumar et al. 2012) (Figura 9). Además, el péptido señal identificado en la secuencia indica que la fitasa corresponde a una enzima periplasmática.

En *E. coli* y *Pantoea* sp. la HAP 1GPasa, asociada a la desfosforilación de la 1-glucosa, también se ha reportado con actividad fitasa (Golovan et al., 2000; Suleimanova et al., 2015a). Estos tipos de enzimas son interesantes ya que se asocian con procesos de patogenicidad. Particularmente, fosfatasas de la familia Enterobacteriaceae que son capaces de hidrolizar el mioinositol son translocadas por el sistema de secreción tipo III en la célula huésped, afectando las cascadas de fosforilación de la célula y permitiendo la supervivencia del patógeno (DeVinney et al., 2000). Recientemente, el mismo mecanismo de patogenicidad se indicó para la fitasa XopH de la especie *Xanthomonas campestris* (Blüher et al., 2017).

La HAP parcialmente purificada de *K. pneumoniae* GCEP-84 comparte características con las fitasas descritas para la especie (Wang et al., 2004; Escobin-Mopera et al., 2012). La actividad específica calculada, fue mayor (40.8 nkat/mg) en comparación con lo reportado para fitasas de *Aspergillus ficuum* NTG-23 (2.5 nkat/mg), *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959 (11.82 nkat/mg) y *K. pneumoniae* 9-3B (22.66 nkat/mg) (Casey y Walsh, 2004; Zhang et al., 2010; Escobin-Mopera et al., 2012). Destacándose para este estudio una alta actividad fitasa de origen bacteriano sobre otras fitasas fúngicas previamente caracterizadas.

La enzima mostró un pH y temperatura óptima a 4.0 y 50 °C, respectivamente, similar a la fitasa tipo HAP de *K. pneumoniae* 9-3B y la fitasa tipo PTP de *Bdellovibrio bacteriovorus* (Escobin-Mopera et al., 2012; Gruninger et al., 2014). En nuestro caso, la enzima cuenta con un único pH y temperatura óptima; no obstante, en *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* XY-5 se ha indicado un perfil de pH (3.7 - 5.5) y temperatura bimodal (37 °C - 55 °C) (Wang et al., 2004).

Las características fisicoquímicas son susceptibles al sistema de expresión empleado, en su mayoría las fitasas comerciales son expresadas en huéspedes eucariotas (Greiner y Konietzny, 2012). En comparación con lo recopilado por Dersjant-Li et al. (2015) para las fitasas comerciales disponibles, la 1GPasa de *K. pneumoniae* GCEP-84 demostró un perfil de pH similar y una temperatura óptima cercana (Apéndice E). Con ello, se semeja en mayor medida a las enzimas de *Peniophora lycii*, *E. coli* y *Buttiauxella* spp. No obstante, la temperatura óptima en estas fitasas supera a la de *K. pneumoniae* GCEP-84. Por último, la 1GPasa de *K. pneumoniae* GCEP-84 demostró ser más estable que la enzima de *Saccharomyces cerevisiae* CY, por su estabilidad a 40 °C durante 4 h y mantener el 50% de actividad a 50 °C en el mismo periodo de tiempo (In et al., 2009).

La fitasa 1GPasa exhibió una especificidad de sustrato reducida (Figura 12). La afinidad del biocatalizador respecto al fitato ($K_m = 19 \mu\text{M}$), fue superior a lo reportado para las fitasas comerciales de *E. coli* (173 - 386 μM), *P. lycii* (73 - 81 μM) y *Aspergillus niger* (73 - 81 μM) (pH 3.0 y 37 °C) (Greiner y Konietzny, 2012). En comparación con otras enzimas tipo fitasa, en presencia de iones metálicos, no se evidenció aumento en la actividad enzimática (Rao et al., 2009; Suleimanova et al., 2015a). Sin embargo, como ocurre para algunas HAPs la actividad fue inhibida por los iones Zn^{2+} (Escobin-Mopera et al., 2012). El uso de agentes quelantes como el EDTA demostró un ligero efecto positivo en la actividad fitasa, potenciándola hasta en un 10% (Zhang et al., 2010). Este fenómeno se explica por la capacidad del EDTA de interactuar con los iones metálicos, potencialmente inhibidores, presentes en la muestra.

La fitasa tipo HAP de *K. pneumoniae* GCEP-84 demostró características interesantes para una futura aplicación en la industria. Esto último dado por sus similitudes en el perfil de pH y temperatura con las enzimas comerciales disponibles.

3 Conclusiones

Los resultados de la investigación representan el primer paso en el estudio de microorganismos con actividad fitasa y la caracterización de este tipo de biocatalizadores en Colombia. Estudios en esta área contribuyen al desarrollo biotecnológico de herramientas para solventar la futura escasez del fósforo.

El método de screening en el medio SpM modificado con fitato como fuente única de fósforo y carbono, demostró ser efectivo para el aislamiento de especies bacterianas degradadoras de fitato provenientes de suelos agroindustriales.

Los análisis genómicos dDDH y ANI indicaron una nueva especie perteneciente al género *Chryseobacterium*, que, además, demostró por primera vez actividad fitasa. Esto sugiere que ambientes poco explorados como los suelos agrícolas colombianos son reservorios de organismos no descritos con perfiles metabólicos de interés.

La HAP derivada de *Klebsiella pneumoniae* GCEP-84 presentó potencial para su aplicación industrial, ya que exhibió características similares a las reportadas para las enzimas comerciales. Por la afinidad al sustrato demostrada, estudios futuros enfocados en la expresión heteróloga e ingeniería de proteínas podrían conducir a la obtención del primer biocatalizador comercial de tipo fitasa en Colombia.

Referencias Bibliográficas

- Ajith, S., Ghosh, J., Shet, D., ShreeVidhya, S., Punith, B. D., y Elangovan, A. V. (2019). Partial purification and characterization of phytase from *Aspergillus foetidus* MTCC 11682. *AMB Express*, 9(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0725-x>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Andrews, S. (2010). *FastQC. A quality control tool for high throughput sequence data.* <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Antelmann, H., Töwe, S., Albrecht, D., y Hecker, M. (2007). The phosphorus source phytate changes the composition of the cell wall proteome in *Bacillus subtilis*. *Journal of Proteome Research*, 6(2), 897–903. <https://doi.org/10.1021/pr060440a>
- Auch, A. F., von Jan, M., Klenk, H. P., y Göker, M. (2010). Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Standards in Genomic Sciences*, 2, 117–134. <https://doi.org/10.4056/sigs.531120>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., y Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Barnett, G. M. (1994). Phosphorus forms in animal manure. *Bioresource Technology*, 49(2), 139–147. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)90077-9](https://doi.org/10.1016/0960-8524(94)90077-9)

- Beloqui, A., Zumárraga, M., Alcalde, M., Golyshin, M., y Ferrer, M. (2008). Microbes and enzymes: recent trends and new directions to expand protein space. En S. Lutz., y U. T. Bornscheur (Eds.) *Handbook of Protein Engineering* (pp. 233–264). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9783527634026.ch9>
- Bernardet, J. F., Hugo, C. J., y Bruun, B. (2006). The genera *Chryseobacterium* and *Elizabethkingia*. En M. Dworkin., S. Falkow., E. Rosenberg., K. H. Schleifer., y E. Stackebrandt (Eds.) *The Prokaryotes*. Springer. https://doi.org/10.1007/0-387-30747-8_25
- Blüher, D., Laha, D., Thieme, S., Hofer, A., Eschen-Lippold, L., Masch, A., Balcke, G., Pavlovic, I., Nagel, O., Schonsky, A., Hinkelmann, R., Wörner, J., Parvin, N., Greiner, R., Weber, S., Tissier, A., Schutkowski, M., Lee, J., Jessen, H.,... Bonas, U. (2017). A 1-phytase type III effector interferes with plant hormone signaling. *Nature Communications*, 8(1), 2159. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02195-8>
- Bohn, L., Meyer, A. S., y Rasmussen, S. K. (2008). Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Journal of Zhejiang University Science B: Biomedicine & Biotechnology*, 9(3), 165–191. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0710640>
- Boyce, A., y Walsh, G. (2007). Purification and characterisation of an acid phosphatase with phytase activity from *Mucor hiemalis* Wehmer. *Journal of Biotechnology*, 132(1), 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.08.028>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

- Buddrick, O., Jones, O. A., Cornell, H. J., y Small, D. M. (2014). The influence of fermentation processes and cereal grains in wholegrain bread on reducing phytate content. *Journal of Cereal Science*, 59(1), 3-8. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.11.006>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., y Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10, 1-9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Casey, A., y Walsh, G. (2004). Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. *Journal of Biotechnology*, 110(3), 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.03.001>
- Castillo Villamizar, G. A., Funkner, K., Nacke, H., Foerster, K., y Daniel R. (2019a). Functional metagenomics reveals a new catalytic domain, the metallo- β -lactamase superfamily domain, associated with phytase activity. *mSphere*, 4(3). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00167-19>
- Castillo Villamizar, G. A., Nacke, H., Boehning, M., Herz, K., y Daniel, R. (2019b). Functional metagenomics reveals an overlooked diversity and novel features of soil-derived bacterial phosphatases and phytases. *mBio*, 10(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.01966-18>
- Chan, G. F., Gan, H. M., Ling, H. L., y Rashid, N. A. (2012). Genome sequence of *Pichia kudriavzevii* M12, a potential producer of bioethanol and phytase. *Eukaryotic cell*, 11(10), 1300–1301. <https://doi.org/10.1128/EC.00229-12>
- Chen, C.-C., Cheng, K.-J., Ko, T.-P., y Guo, R.-T (2015). Current progresses in phytase research: Three-dimensional structure and protein engineering. *ChemBioEng Reviews*, 2(2), 76–86. <https://doi.org/10.1002/cben.201400026>

- Chen, M., Li, Y., Li, S., Tang, L., Zheng, J., y An, Q. (2015). Genomic identification of nitrogen-fixing *Klebsiella variicola*, *K. pneumoniae* and *K. quasipneumoniae*. *Journal of Basic Microbiology*, 56(1), 78–84. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500415>
- Chow, J., y Streit, W. R. (2016). Screening of enzymes: novel screening technologies to exploit noncultivated microbes for biotechnology. En L. Hilterhaus., A. Liese., U. Kettling., y G. Antranikian. (Eds.) *Applied Biocatalysis: From Fundamental Science to Industrial Applications* (pp. 13–30). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9783527677122.ch2>
- Chuckran, P. F., Flagg, C., Propster, J., Rutherford, W. A., Sieradzki, E. T., Blazewicz, S. J., Hungate, B., Pett-Ridge, J., Schwartz., y Dijkstra, P. (2023). Edaphic controls on genome size and GC content of bacteria in soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 178, 108935. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108935>
- Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D. R., da Costa, M. S., Rooney, A. P., Yi, H., Xu, X.-W., de Meyer, S., y Trujillo, M. E. (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(1), 461-466. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002516>
- Chun, J., y Rainey, F. A. (2014). Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Part 2), 316-324. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.054171-0>
- Costa, L. E. de O., Corrêa, T. L. R., Teixeira, J. A., Araújo, E. F. de, y Queiroz, M. V. de. (2018). Endophytic bacteria isolated from *Phaseolus vulgaris* produce phytases with potential for

- biotechnology application. *Brazilian Journal of Biological Sciences*, 5(11), 657–671.
<https://doi.org/10.21472/bjbs.051105>
- Costa, M., Lerchundi, G., Villarroel, F., Torres, M., y Schöbitz, R. (2009). Producción de enzima fitasa de *Aspergillus ficuum* con residuos agroindustriales en fermentación sumergida y sobre sustrato sólido. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1), 73-83.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752009000100008&lng=en&tlng=es.
- de Coster, W., D’Hert, S., Schultz, D. T., Cruts, M., y van Broeckhoven, C. (2018). NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics*, 34(15), 2666-2669.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty149>
- Dersjant-Li, Y., Awati, A., Schulze, H., y Partridge, G. (2015). Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(5), 878-896.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.6998>
- DeVinney, R., Steele-Mortimer, O., y Finlay, B. B. (2000). Phosphatases and kinases delivered to the host cell by bacterial pathogens. *Trends in Microbiology*, 8(1), 29–33.
[https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(99\)01657-1](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(99)01657-1)
- Du, J., Ngo, H. T., Won, K., Kim, K. Y., Jin, F. X., y Yi, T. H. (2015). *Chryseobacterium solani* sp. nov., isolated from field-grown eggplant rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(8), 2372–2377.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.000266>

- Elkhalil, E. A. I., Männer, K., Borriss, R., y Simon, O. (2007). *In vitro* and *in vivo* characteristics of bacterial phytases and their efficacy in broiler chickens. *British Poultry Science*, 48(1), 64-70. <https://doi.org/10.1080/00071660601148195>
- Escobin-Mopera, L., Ohtani, M., Sekiguchi, S., Sone, T., Abe, A., Tanaka, M., Meevootisom, V., y Asano, K. (2012). Purification and characterization of phytase from *Klebsiella pneumoniae* 9-3B. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113(5), 562-567. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.12.010>
- Falkowski, P., Scholes, R. J., Boyle, E., Canadell, J., Canfield, D., Elser, J., Gruber, N., Hibbard, K., Högberg, P., Linder, S., Mackenzie, F. T., Moore III, B., Pedersen, T., Rosenthal, Y., Seitzinger, S., Smetacek, V., y Steffen, W. (2000). The global carbon cycle: a test of our knowledge of earth as a system. *Science*, 290(5490), 291–296. <https://doi.org/10.1126/science.290.5490.291>
- Fan, J., Huang, S., y Chorlton, S. D. (2021). BugSeq: a highly accurate cloud platform for long-read metagenomic analyses. *BMC Bioinformatics*, 22(160), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04089-5>
- Fatima, F., Ahmad, M. M., Verma, S. R., y Pathak, N. (2022). Relevance of phosphate solubilizing microbes in sustainable crop production: a review. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 19(9), 9283-9296. <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03425-9>
- Feizollahi, E., Mirmahdi, R. S., Zoghi, A., Zijlstra, R. T., Roopesh, M. S., y Vasanthan, T. (2021). Review of the beneficial and anti-nutritional qualities of phytic acid, and procedures for removing it from food products. *Food Research International*, 143. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110284>

- Garrity, G. M. (2016). A new genomics-driven taxonomy of Bacteria and Archaea: are we there yet?. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(8), 1956-1963.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00200-16>
- Gilbert, N. (2009). Environment: the disappearing nutrient. *Nature*, 461(7265), 716–718.
<https://doi.org/10.1038/461716a>
- Golovan, S. P., Hayes, M. A., Phillips, J. P., y Forsberg, C. W. (2001a). Transgenic mice expressing bacterial phytase as a model for phosphorus pollution control. *Nature Biotechnology*, 19(5), 429–433. <https://doi.org/10.1038/88091>
- Golovan, S. P., Meidinger, R. G., Ajakaiye, A., Cottrill, M., Wiederkehr, M. Z., Barney, D. J., Plante, C., Pollard, J. W., Fan, M. Z., Hayes, M. A., Laursen, J., Hjorth, J. P., Hacker, R. R., Phillips, J. P., y Forsberg, C. W. (2001b). Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nature Biotechnology*, 19(8), 741–745.
<https://doi.org/10.1038/90788>
- Golovan, S., Wang, G., Zhang, J., y Forsberg, C. W. (2000). Characterization and overproduction of the *Escherichia coli* appA encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(1), 59–71.
<https://doi.org/10.1139/cjm-46-1-59>
- Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., y Tiedje, J. M. (2007). DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(1), 81-91. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64483-0>

- Greiner, R. (2004). Purification and properties of a phytate-degrading enzyme from *Pantoea agglomerans*. *The Protein Journal*, 23(8), 567–576. <https://doi.org/10.1007/s10930-004-7883-1>
- Greiner, R., y Konietzny, U. (2012). Update on characteristics of commercial phytases. En N. Scheers y A.-S. Sandberg (Eds.), *Usefulness of microbial phytases to improve zinc and iron bioavailability* (pp. 96-107). AB Vista. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1192.6242>
- Gruninger, R. J., Thibault, J., Capeness, M. J., Till, R., Mosimann, S. C., Sockett, R. E., Selinger, B. L., y Lovering, A. L. (2014). Structural and biochemical analysis of a unique phosphatase from *Bdellovibrio bacteriovorus* reveals its structural and functional relationship with the protein tyrosine phosphatase class of phytase. *PLOS ONE*, 9(4), e94403. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094403>
- Guazzaroni, M. E., Beloqui, A., Vieites, J. M., Al-ramahi, Y., Cortés, N. L., Ghazi, A., P. N. Golyshin., y Ferrer, M. (2010). Metagenomic mining of enzyme diversity. En K. Timmis (Ed.) *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. (pp. 2911–2927). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_216
- Haefner, S., Knietsch, A., Scholten, E., Braun, J., Lohscheidt, M., y Zelder, O. (2005). Biotechnological production and applications of phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(5), 588–597. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0005-y>
- Herrmann, K. R., Ruff, A. J., Infanzón, B., y Schwaneberg, U. (2019). Engineered phytases for emerging biotechnological applications beyond animal feeding. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(16), 6435–6448. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09962-1>
- Hou, X., Shen, Z., Li, N., Kong, X., Sheng, K., Wang, J., y Wang, Y. (2020). A novel fungal beta-propeller phytase from nematophagous *Arthrobotrys oligospora*: characterization and

- potential application in phosphorus and mineral release for feed processing. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 84. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01346-9>
- Huang, H., Shao, N., Wang, Y., Luo, H., Yang, P., Zhou, Z., Zhan, Z., y Yao, B. (2009). A novel beta-propeller phytase from *Pedobacter nyackensis* MJ11 CGMCC 2503 with potential as an aquatic feed additive. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(2), 249–259. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1835-1>
- Huang, H., Zhang, R., Fu, D., Luo, J., Li, Z., Luo, H., Shi, P., Yang, P., Diao, Q., y Yao, B. (2011). Diversity, abundance and characterization of ruminal cysteine phytases suggest their important role in phytate degradation. *Environmental microbiology*, 13(3), 747–757. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02379.x>
- Humer, E., Schwarz, C., y Schedle, K. (2015). Phytate in pig and poultry nutrition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99(4), 605–625. <https://doi.org/10.1111/jpn.12258>
- In, M. J., Seo, S. W., Kim, D. C., y Oh, N. S. (2009). Purification and biochemical properties of an extracellular acid phytase produced by the *Saccharomyces cerevisiae* CY strain. *Process Biochemistry*, 44(1), 122-126. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.10.006>
- Jain, J., Sapna, y Singh, B. (2016). Characteristics and biotechnological applications of bacterial phytases. *Process Biochemistry*, 51(2), 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.12.004>
- Jalili, V., Afgan, E., Gu, Q., Clements, D., Blankenberg, D., Goecks, J., Taylor, J., y Nekrutenko, A. (2020). The galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2020 update. *Nucleic Acids Research*, 48(W1), W395-W402. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa434>

- Jasinski, S. M. (2014). Phosphate rock. *US Geological Survey Mineral Commodity Summaries 2014*. https://mineralsmakelife.org/assets/images/content/resources/Minerals_Commodities_Summary_2014.pdf
- Jeong, J. J., Lee, D. W., Park, B., Sang, M. K., Choi, I. G., y Kim, K. D. (2017). *Chryseobacterium cucumeris* sp. nov., an endophyte isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.) root, and emended description of *Chryseobacterium arthrosphaerae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(3), 610-616. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001670>
- Jeong, J.-J., Sang, M. K., Pathiraja, D., Park, B., Choi, I.-G., y Kim, K. D. (2018). Draft Genome Sequence of Phosphate-Solubilizing *Chryseobacterium* sp. Strain ISE14, a Biocontrol and Plant Growth-Promoting Rhizobacterium Isolated from Cucumber. *Genome Announcements*, 6(26), e00612-18. <https://doi.org/10.1128/genomea.00612-18>
- Jones, P., Binns, D., Chang, H. Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., Pesseat, S., Quinn, A. F., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Yong, S. Y., Lopez, R., y Hunter, S. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9), 1236–1240. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031>
- Kämpfer, P., Poppel, M. T., Wilharm, G., Busse, H. J., McInroy, J. A., y Glaeser, S. P. (2014). *Chryseobacterium gallinarum* sp. nov., isolated from a chicken, and *Chryseobacterium contaminans* sp. nov., isolated as a contaminant from a rhizosphere sample. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(4), 1419-1427. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.058933-0>

- Koichiro, T., Glen, S., y Sudhir, K. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027, <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Khullar, E., Shetty, J. K., Rausch, K. D., Tumbleson, M. E., y Singh, V. (2011). Use of phytases in ethanol production from e-mill corn processing. *Cereal Chemistry Journal*, 88(3), 223–227. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-04-10-0058>
- Klabunde, T., Sträter, N., Fröhlich, R., Witzel, H., y Krebs, B. (1996). Mechanism of Fe(III) – Zn(II) purple acid phosphatase based on crystal structures. *Journal of Molecular Biology*, 259(4), 737–748. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0354>
- Kumar, A., Chanderman, A., Makolomakwa, M., Perumal, K., y Singh, S. (2016). Microbial production of phytases for combating environmental phosphate pollution and other diverse applications. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 46(6), 556–591. <https://doi.org/10.1080/10643389.2015.1131562>
- Kumar, V., Sangwan, P., Verma, A. K., y Agrawal, S. (2014). Molecular and biochemical characteristics of recombinant β -propeller phytase from *Bacillus licheniformis* strain PB-13 with potential application in aquafeed. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(2), 646–659. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0871-9>
- Kumar, V., Singh, D., Sangwan, P., y Gill, P. K. (2015). Management of environmental phosphorus pollution using phytases: current challenges and future prospects. En G. Kaushik (Ed.), *Applied Environmental Biotechnology: Present Scenario and Future Trends* (pp. 97-114). Springer. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2123-4_7
- Kumar, V., Singh, G., y Verma, A. K. (2012). In silico characterization of histidine acid phytase sequences. *Enzyme Research*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/845465>

- Lam, K. N., Cheng, J., Engel, K., Neufeld, J. D., y Charles, T. C. (2015). Current and future resources for functional metagenomics. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01196>
- Lee, I., Kim, Y. O., Park, S.-C., y Chun, J. (2016). OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(2), 1100-1103. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000760>
- Lefort, V., Desper, R., y Gascuel, O. (2015). FastME 2.0: a comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program. *Molecular Biology and Evolution*, 32(10), 2798–2800. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv150>
- Lei, X. G., Weaver, J. D., Mullaney, E., Ullah, A. H., y Azain, M. J. (2013). Phytase, a new life for an “old” enzyme. *Annual Review of Animal Biosciences*, 1(1), 283–309. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-031412-103717>
- Lei, X., y Stahl, C. (2001). Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(4), 474–481. <https://doi.org/10.1007/s002530100795>
- Lim, B. L., Yeung, P., Cheng, C., y Hill, J. E. (2007). Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. *The ISME Journal*, 1(4), 321–330. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.40>
- Lin, Y., Yuan, J., Kolmogorov, M., Shen, M. W., Chaisson, M., y Pevzner, P. A. (2016). Assembly of long error-prone reads using de Bruijn graphs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(52), E8396–E8405. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604560113>
- Lu, S., Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Yang, M., Zhang, D.,

- Zheng, C., Lanczycki, C. J., y Marchler-Bauer, A. (2020). CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Research*, *48*(D1), D265–D268. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz991>
- Marchler-Bauer, A., Zheng, C., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, L. Y., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Lanczycki, C. J., Lu, F., Lu, S., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Zhang, D., y Bryant, S. H. (2013). CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), D348–D352. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1243>
- Martín-Platero, A. M., Valdivia, E., Maqueda, M., y Martínez-Bueno, M. (2007). Fast, convenient, and economical method for isolating genomic DNA from lactic acid bacteria using a modification of the protein “salting-out” procedure. *Analytical Biochemistry*, *366*(1), 102–104. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.03.010>
- Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H. P., y Göker, M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics*, *14*, 1-14. <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/14/60>
- Meier-Kolthoff, J. P., Carbasse, J. S., Peinado-Olarte, R. L., y Göker, M. (2022). TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acids Research*, *50*(D1), D801-D807. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab902>
- Meier-Kolthoff, J. P., y Göker, M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3>

- Mikheenko, A., Prjibelski, A., Saveliev, V., Antipov, D., y Gurevich, A. (2018). Versatile genome assembly evaluation with QUASt-LG. *Bioinformatics*, 34(13), i142-i150. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty266>
- Mullaney, E. J., Daly, C. B., y Ullah, A. H. J. (2000). Advances in phytase research. *Advances in Applied Microbiology*, 47, 157-199. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(00\)47004-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(00)47004-8)
- Mullaney, E. J., y Ullah, A. H. (2003). The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312(1), 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.176>
- Niu, C., Yang, P., Luo, H., Huang, H., Wang, Y., y Yao, B. (2017). Engineering the residual side chains of HAP phytases to improve their pepsin resistance and catalytic efficiency. *Scientific Reports*, 7(1), 42133. <https://doi.org/10.1038/srep42133>
- Nordmann, P., Cuzon, G., y Naas, T. (2009). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, 9(4), 228–236. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70054-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70054-4)
- Ocampo-Betancur, M., Patiño-Cervantes, L. F., Marín-Montoya, M., Salazar-Yepes, M., y Gutiérrez-Sánchez, P. A. (2012). Isolation and characterization of potential phytase-producing fungi from environmental samples of Antioquia (Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 65(1), 6291-6303. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472012000100001&lng=en&tlng=en.
- Olczak, M., Morawiecka, B., y Watorek, W. (2003). Plant purple acid phosphatases - genes, structures and biological function. *Acta Biochimica Polonica*, 50(4), 1245–1256. https://doi.org/10.18388/abp.2003_3648

- Olstorpe, M., Schnürer, J., y Passoth, V. (2009). Screening of yeast strains for phytase activity. *FEMS Yeast Research*, 9(3), 478-488. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00493.x>
- Oxford Nanopore Technologies, Ltd. (2020). *medaka*, Versión 1.7.2. <https://github.com/nanoporetech/medaka>
- Park, Y.-J., Park, J., Park, K.-H., Oh, B.-C., y Auh, J.-H. (2011). Supplementation of alkaline phytase (DS11) in whole-wheat bread reduces phytate content and improves mineral solubility. *Journal of Food Science*, 76(6), C791–C794. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02206.x>
- Parks, D. H., Rinke, C., Chuvochina, M., Chaumeil, P.-A., Woodcroft, B. J., Evans, P. N., Hugenholtz, P. y Tyson, G. W. (2017). Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life. *Nature Microbiology*, 2(11), 1533–1542. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0012-7>
- Passariello, C., Schippa, S., Iori, P., Berlutti, F., Thaller, M. C., y Rossolini, G. M. (2003). The molecular class C acid phosphatase of *Chryseobacterium meningosepticum* (OlpA) is a broad-spectrum nucleotidase with preferential activity on 5'-nucleotides. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1648(1-2), 203-209. [https://doi.org/10.1016/S1570-9639\(03\)00147-X](https://doi.org/10.1016/S1570-9639(03)00147-X)
- Paysan-Lafosse, T., Blum, M., Chuguransky, S., Grego, T., Pinto, B. L., Salazar, G. A., Bileschi, M. L., Bork, P., Bridge, A., Colwell, L., Gough, J., Haft, D. H., Letunić, I., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D. A., Orengo, C. A., Pandurangan, A. P., Rivoire, C., ... Bateman, A. (2023). InterPro in 2022. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D418-D427. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac993>

- Puhl, A. A., Gruninger, R. J., Greiner, R., Janzen, T. W., Mosimann, S. C., y Selinger, L. B. (2007). Kinetic and structural analysis of a bacterial protein tyrosine phosphatase-like *myo*-inositol polyphosphatase. *Protein Science*, 16(7), 1368–1378. <https://doi.org/10.1110/ps.062738307>
- Raboy, V. (2007). Seed phosphorus and the development of low-phytate crops. En B. L. Turner., A. E. Richardson., y E. J. Mullaney (Eds.), *Inositol phosphates: Linking agriculture and the environment* (pp. 111-133). Centre for Agricultural Bioscience International.
- Rao, D. E. C. S., Rao, K. V., Reddy, T. P., y Reddy, V. D. (2009). Molecular characterization, physicochemical properties, known and potential applications of phytases: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 29(2), 182–198. <https://doi.org/10.1080/07388550902919571>
- Rebello, S., Jose, L., Sindhu, R., y Aneesh, E. M. (2017). Molecular advancements in the development of thermostable phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(7), 2677–2689. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8195-7>
- Richter, M., y Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(45), 19126-19131. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906412106>
- Risse, J., Thomson, M., Patrick, S., Blakely, G., Koutsovoulos, G., Blaxter, M., y Watson, M. (2015). A single chromosome assembly of *Bacteroides fragilis* strain BE1 from Illumina and MinION nanopore sequencing data. *Gigascience*, 4(1), s13742-015. <https://doi.org/10.1186/s13742-015-0101-6>
- Ruttenberg, K. C. (2014). The global phosphorus cycle. En H. D. Holland y K. K. Turekian (Eds.), *Treatise on Geochemistry* (2ª ed., Vol. 10, pp. 499–558). Elsevier.

- Sandberg, A.-S., y Andlid, T. (2002). Phytogetic and microbial phytases in human nutrition. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(7), 823–833. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00641.x>
- Sang, M. K., Jeong, J.-J., Kim, J., y Kim, K. D. (2018). Growth promotion and root colonisation in pepper plants by phosphate-solubilising *Chryseobacterium* sp. strain ISE14 that suppresses Phytophthora blight. *Annals of Applied Biology*, 172(2), 208–223. <https://doi.org/10.1111/aab.12413>
- Sapna, Singh, B., Singh, D., y Sharma, K. K. (2013). Microbial phytases in skirmishing and management of environmental phosphorus pollution. En R. C. Kuhad y A. Singh (Eds.), *Biotechnology for Environmental Management and Resource Recovery* (pp. 239–260). Springer. https://doi.org/10.1007/978-81-322-0876-1_13
- Sayers, E. W., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., Chan, J., Comeau, D. C., Connor, R., Funk, K., Kelly, C., Kim, S., Madej, T., Marchler-Bauer, A., Lanczycki, C., Lathrop, S., Lu, Z., Thibaud-Nissen, F., Murphy, T., Phan, L., Skripchenko, Y., ... Sherry, S. T. (2022). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D20–D26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>
- Sebastian, S., Touchburn, S. P., y Chavez, E. R. (1998). Implications of phytic acid and supplemental microbial phytase in poultry nutrition: a review. *World's Poultry Science Journal*, 54(1), 27–47. <https://doi.org/10.1079/WPS19980003>
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Selle, P. H., y Ravindran, V. (2008). Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. *Livestock Science*, 113(2–3), 99–122. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.05.014>

- Shimomura, K., Kaji, S., y Hiraishi, A. (2005). *Chryseobacterium shigense* sp. nov., a yellow-pigmented, aerobic bacterium isolated from a lactic acid beverage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5), 1903-1906. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63690-0>
- Shivange, A. V., y Schwaneberg, U. (2017). Recent advances in directed phytase evolution and rational phytase engineering. En M. Alcade (Ed.), *Directed Enzyme Evolution: Advances and Applications* (pp. 145–172). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50413-1_6
- Singh, B., y Satyanarayana, T. (2011). Phytases from thermophilic molds: their production, characteristics and multifarious applications. *Process Biochemistry*, 46(7), 1391–1398. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.03.009>
- Singh, B., y Satyanarayana, T. (2015). Fungal phytases: characteristics and amelioration of nutritional quality and growth of non-ruminants. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99(4), 646–660. <https://doi.org/10.1111/jpn.12236>
- Sousa, J., Silvério, S. C., Costa, A. M. A., y Rodrigues, L. R. (2022). Metagenomic approaches as a tool to unravel promising biocatalysts from natural resources: soil and water. *Catalysts*, 12(4), 385. <https://doi.org/10.3390/catal12040385>
- Stosiek, N., Talma, M. y Klimek-Ochab, M. (2020). Carbon-phosphorus lyase—the state of the art. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 190(4), 1525–1552. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03161-4>
- Suleimanova, A. D., Beinhauer, A., Valeeva, L. R., Chastukhina, I. B., Balaban, N. P., Shakirov, E. V., Greiner, R., y Sharipova, M. R. (2015a). Novel glucose-1-phosphatase with high phytase activity and unusual metal ion activation from soil bacterium *Pantoea* sp. strain

- 3.5.1. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(19), 6790–6799.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01384-15>
- Suleimanova, A. D., Toymentseva, A. A., Boulygina, E. A., Kazakov, S. V., Mardanova, A. M., Balaban, N. P., y Sharipova, M. R. (2015b). High-quality draft genome sequence of a new phytase-producing microorganism *Pantoea* sp. 3.5.1. *Standards in Genomic Sciences*, 10, 1-9. <https://doi.org/10.1186/s40793-015-0093-y>
- Tan, H., Mooij, M. J., Barret, M., Hegarty, P. M., Harington, C., Dobson, A. D., y O'Gara, F. (2014). Identification of novel phytase genes from an agricultural soil-derived metagenome. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(1), 113–118.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1307.07007>
- Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H. J., Ludwig, W., y Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1), 249-266.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.016949-0>
- Turner, B. L., Papházy, M. J., Haygarth, P. M., y Mckelvie, I. D. (2002). Inositol phosphates in the environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 357(1420), 449–469. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0837>
- UniProt: the universal protein resource. (2022). PPA_ECOLI (P07102) [Imagen].
<https://www.uniprot.org/uniprot/P07102>
- Ushasree, M. V., Shyam, K., Vidya, J., y Pandey, A. (2017). Microbial phytase: impact of advances in genetic engineering in revolutionizing its properties and applications. *Bioresource Technology*, 245 (Part B), 1790–1799. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.060>

- Vandamme, P., Bernardet, J. F., Segers, P., Kersters, K., y Holmes, B. (1994). New perspectives in the classification of the Flavobacteria: description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(4), 827-831. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-827>
- Vats, P., Bhattacharyya, M. S., y Banerjee, U. C. (2005). Use of phytases (myo - inositolhexakisphosphate phosphohydrolases) for combatting environmental pollution: a biological approach. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 35(5), 469–486. <https://doi.org/10.1080/10643380590966190>
- Villamizar Castillo, G. A., Nacke, H., y Daniel, R. (2017). Function-based metagenomic library screening and heterologous expression strategy for genes encoding phosphatase activity. En W. Streit y R. Daniel. (Eds.) *Metagenomics Methods in Molecular Biology* (pp. 249-260). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6691-2_16
- Walker, B. J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S., Cuomo, C. A., Zeng, Q., Wortman, J., Young, S. K., y Earl, A. M. (2014). Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLOS ONE*, 9(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112963>
- Wang, X., Upatham, S., Panbangred, W., Isarangkul, D., Summpunn, P., Wiyakrutta, S., y Meevootisom, V. (2004). Purification, characterization, gene cloning and sequence analysis of a phytase from *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* XY-5. *ScienceAsia*, 30, 383-390. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2004.30.383>
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., y Holt, K. E. (2017a). Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing. *Microbial genomics*, 3(10). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000132>

- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., y Holt, K. E. (2017b). Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLOS Computational Biology*, 13(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
- Winward, L., Kilari, R. S., Safrany, S. T. (2020). Characterizing enzymes of the diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase (DIPP) family. En G. Miller. (Ed.) *Inositol Phosphates. Methods in Molecular Biology* (Vol. 2091). Humana. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0167-9_6
- Wyres, K. L., y Holt, K. E. (2018). *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 45, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.04.004>
- Yanke, L. J., Bae, H. D., Selinger, L. B., y Cheng, K. J. (1998). Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. *Microbiology*, 144(6), 1565–1573. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-6-1565>
- Yi, Z., Kornegay, E. T., Ravindran, V., Lindemann, M. D., y Wilson, J. H. (1996). Effectiveness of Natuphos® phytase in improving the bioavailabilities of phosphorus and other nutrients in soybean meal-based semipurified diets for young pigs. *Journal of Animal Science*, 74(7), 1601-1611. <https://doi.org/10.2527/1996.7471601x>
- Zhang, G. Q., Dong, X. F., Wang, Z. H., Zhang, Q., Wang, H. X., y Tong, J. M. (2010). Purification, characterization, and cloning of a novel phytase with low pH optimum and strong proteolysis resistance from *Aspergillus ficuum* NTG-23. *Bioresource Technology*, 101(11), 4125–4131. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.001>

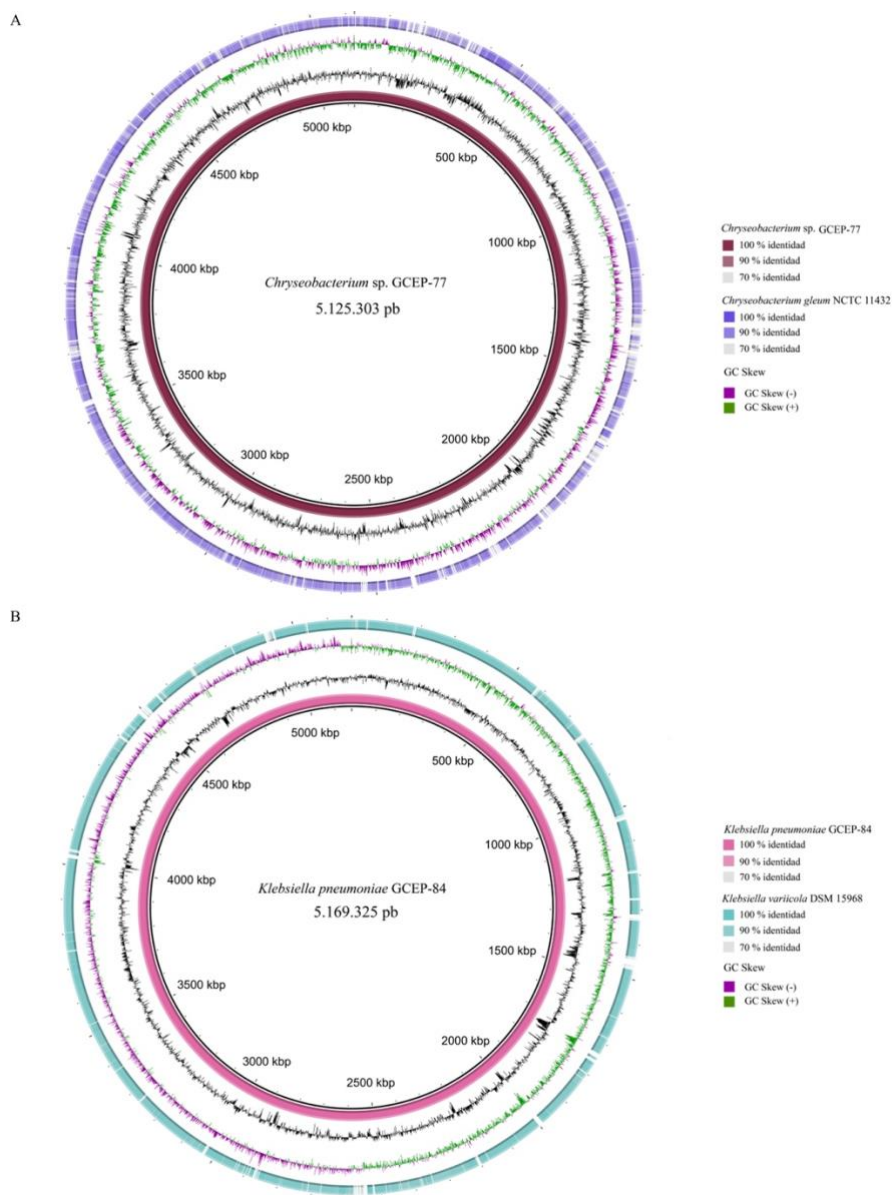
Apéndices

Apéndice A. Resumen del resultado de la secuenciación por las plataformas Illumina y

Nanopore de *Chryseobacterium* sp. GCEP-77 y *Klebsiella* sp. GCEP-84

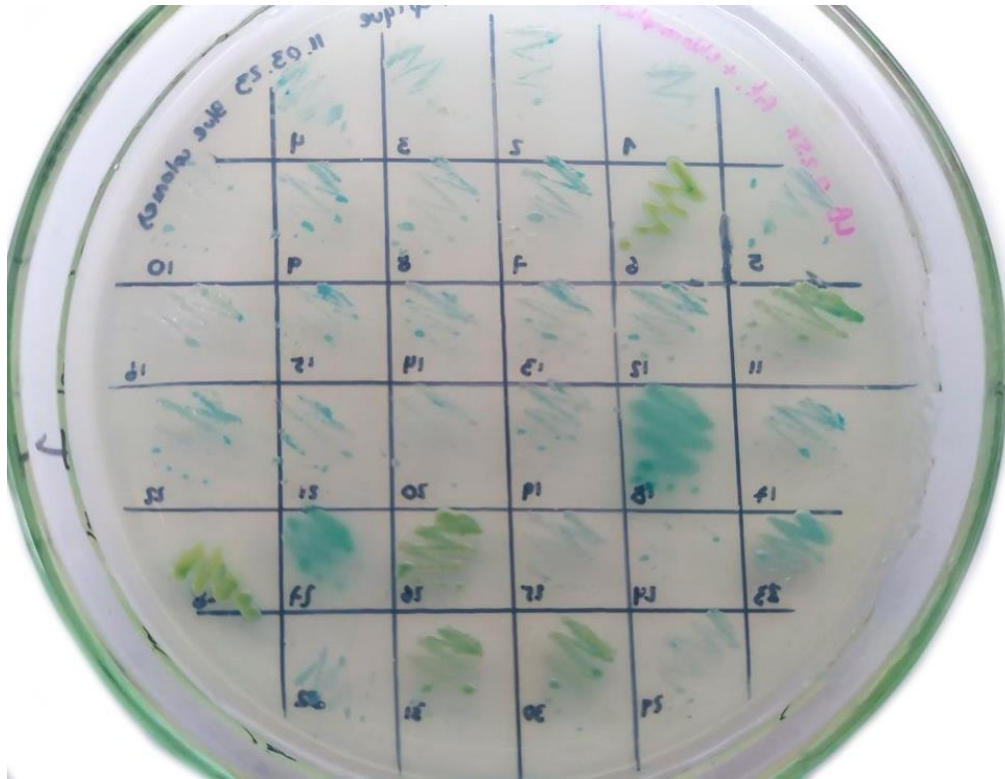
Illumina	GCEP-77	GCEP-84
	R1/R2	
Secuencias totales	5.281.815	8.381.014
Secuencias de baja calidad	0	0
Longitud de las secuencias	150	35-301
% GC	36	57
Nanopore		
	GCEP-77	GCEP-84
Número de lecturas	12.007	95.230
Número de bases	151.978.189	926.444.247
<i>Median read length</i>	6.824	5.317
Longitud media	12.657,5	9.728,5
Desviación estándar	14.143,5	12.284,1
N50	26,107	19,310
Calidad media	13,1	13,5
<i>Median quality</i>	13,2	13,7

Apéndice B. Representación del genoma de los aislados *Chryseobacterium* sp. GCEP-77 y *Klebsiella pneumoniae* GCEP-84.



Nota. Genoma completo de GCEP-77 (A) (rojo) en comparación con el genoma completo disponible de la especie *Chryseobacterium gleum* NTC 11432 (morado). Comparación de genoma completo del aislado GCEP-84 (B) (rosado) con la especie *Klebsiella variicola* DMS 15968 (azul).

Apéndice C. Clones positivos con actividad fitasa.



Apéndice E. Fitasas comerciales disponibles y sus características.

Tipo	Organismo nativo	Expresión	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	Marca comercial
-	<i>K. pneumoniae</i> *	<i>K. pneumoniae</i> no recombinante	4,0	50	-
3	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	2; 5-5,5	65	Natuphos®
3	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> , no recombinante	6,0	-	Allzyme® SSF
3	<i>A. niger</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	2,5	-	Finase® P/L
6	<i>E. coli</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (ATCC 5233)	4,5	55	Phyzyme® XP
6	<i>E. coli</i>	<i>Pichia pastoris</i>	4,5	-	Quantum®
6	<i>E. coli</i>	<i>Trichoderma reesei</i>			Quantum Blue®
6	<i>E. coli</i>	<i>Pichia pastoris</i>	3,4;5,0	58	OptiPhos®
6	<i>Penipophora lycii</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	4,0-4,5	50-55	Ronozyme®
6	<i>Citrobacter braakii</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	-	-	Ronozyme Hiphos®
6	<i>Buttiauxella</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	3,5-4,5	60	Axtra® PHY

Nota. En negrita se presenta la fitasa identificada en el presente estudio. Adaptado de: Dersjant-Li et al. (2015).