

Caracterización bioinformática y funcional de la enzima fitasa derivada de *Klebsiella pneumoniae*

Wendy Nathalia Triana Ayala

Trabajo de Grado para Optar el Título de Bióloga

Director

Genis Andrés Castillo Villamizar

Dr. rer. nat.

Codirector

Jorge Hernández Torres

Doctorat ès Sciences

Codirectora

Julieth Camila Maldonado Pava

Bióloga

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2025

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a mis padres, José Triana y Rosalba Ayala, por confiar en mí desde el principio, por brindarme su amor incondicional y apoyarme en cada paso de mi vida. Sus enseñanzas y consejos han permitido convertirme en la persona que soy. A mi hermana Laura, por sus palabras de ánimo en los momentos que más lo necesité, por iluminar mi camino con su compañía y por recordarme cada día las razones para seguir adelante. A Zoe, que, aunque sin saberlo, con su sola presencia me alegraba el día. A mi abuela Evangelina y a toda mi familia, quienes con pequeños gestos pusieron ese granito de arena que hizo este logro posible.

Mi más sincera gratitud al profesor Jorge Hernández Torres y a la profesora Leidy Rocío Pico Martínez por enseñarme el inmenso mundo de la biología molecular y por abrirme las puertas del laboratorio CINBIN. Gracias por su disposición constante en resolverme dudas y acompañarme a afrontar cada dificultad.

A los doctores Genis Andrés Castillo Villamizar y Edinson Andrés Puentes Cala por su valiosa guía, conocimiento y orientación en la ejecución de este proyecto de grado. También a Julieth Maldonado Pava, cuya investigación sentó las bases para este trabajo, por su tiempo, su paciencia y generosidad al compartir su conocimiento conmigo. A la Corporación para la Investigación de la Corrosión, por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de grado, en donde conocí personas muy especiales que contribuyeron de diferentes maneras a este logro.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, en especial Harold, Alejandro y Diego, por escucharme, aconsejarme, ofrecerme soluciones y compartir su conocimiento.

Al laboratorio CINTROP, por su disposición a ayudarme y facilitarme el uso de equipos esenciales para el desarrollo de mi investigación.

Al grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología GIBIM por el uso del FPLC, equipo adquirido con recursos del Sistema General de Regalías, código BPIN 2021000100331.

A todos ustedes que me ayudaron y creyeron en mí, ¡Muchísimas gracias!

Tabla de Contenido

Introducción	12
1. Objetivos	15
1.1 Objetivo General	15
1.2 Objetivos Específicos.....	15
2. Cuerpo del Trabajo	16
2.1 Marco teórico	16
2.2 Metodología	20
2.2.1 Análisis bioinformático.....	20
2.2.1.1 Análisis de la secuencia y selección de la fitasa control.....	20
2.2.1.2 Modelamiento de la estructura 3D de la proteína y validación del modelo.....	20
2.2.2 Diseño y construcción del vector de expresión recombinante con el gen Fitasa de <i>Klebsiella</i> y Fitasa de <i>E. coli</i>	21
2.2.3 Transformación de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	22
2.2.4 Expresión heteróloga del gen de fitasa de <i>Klebsiella</i> en <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	22
2.2.5 Expresión homóloga del gen de fitasa de <i>E. coli</i> en BL21(DE3)	23
2.2.6 Lisis celular	24
2.2.7 Medición de la actividad fitasa	24
2.2.8 Purificación de la proteína recombinante	25
2.2.9 Caracterización bioquímica de las fitasas Fit_ <i>K. pneumoniae</i> y Fit_ <i>E. coli</i>	25
2.2.9.1 pH y temperatura óptima de la enzima purificada	25

2.2.9.2 Ensayo de iones metálicos, agentes reductores y quelantes	26
2.2.9.3 Cinética enzimática.....	26
2.3 Resultados.....	26
2.3.1 Análisis bioinformático.....	26
2.3.1.1 Análisis de la secuencia y selección de la fitasa control.....	26
2.3.1.2 Modelamiento de la estructura 3D de la proteína y validación del modelo.....	29
2.3.2 Diseño y construcción del vector de expresión recombinante con el gen fitasa de <i>K. pneumoniae</i> y fitasa de <i>E. coli</i>	32
2.3.3 Transformación de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	34
2.3.4 Expresión de la fitasa en <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	35
2.3.5 Purificación de la proteína recombinante y caracterización de las enzimas	38
2.3.5.1 Ensayo de iones metálicos, agentes reductores y quelantes	41
2.3.5.2 Cinética enzimática.....	42
2.4 Discusión.....	43
3. Conclusiones.....	49
Referencias Bibliográficas	50
Apéndices.....	61

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la fitasa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Fit_KP) y de <i>Escherichia coli</i> (Fit_EC)	27
Tabla 2. Características de los motivos conservados encontrados en InterPro.....	29
Tabla 3. Validación de las estructuras obtenidas en los diferentes servidores.	30
Tabla 4. Actividad enzimática de los extractos crudos de Fit_KP (<i>Klebsiella pneumoniae</i>) y Fit_EC (<i>Escherichia coli</i>).....	38
Tabla 5. Tabla de purificación de las fitasas Fit_K. <i>pneumoniae</i> y Fit_E. <i>coli</i> usando columnas de afinidad.	39

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Fórmula estructural de ácido fítico.....	16
Figura 2. Composición de aminoácidos en la fitasa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Fit_KP) y de <i>Escherichia coli</i> (Fit_EC) determinadas con el servidor ProtParam	28
Figura 3. Modelos 3D de Fit_KP y de Fit_EC.....	30
Figura 4. Mapa de los plásmidos recombinantes pET-20b(+)_Fit <i>K. pneumoniae</i> y pET-20b(+)_Fit <i>E. coli</i>	32
Figura 5. Análisis de restricción de los plásmidos pET-20b(+)_Fit <i>K. pneumoniae</i> y pET-20b(+)_Fit <i>E. coli</i>	34
Figura 6. Expresión de la fitasa <i>K. pneumoniae</i> y su localización en las fracciones celulares.....	35
Figura 7. Expresión de la fitasa <i>E. coli</i> y su localización en las fracciones celulares	37
Figura 8. Efecto del pH en la actividad relativa de Fit_ <i>K. pneumoniae</i> y Fit_ <i>E. coli</i>	40
Figura 9. Efecto de la temperatura en la actividad relativa de Fit_ <i>K. pneumoniae</i> y Fit_ <i>E. coli</i> .	40
Figura 10. Efecto de iones metálicos, agentes reductores y quelantes en la actividad relativa de Fit_ <i>K. pneumoniae</i> y Fit_ <i>E. coli</i>	43
Figura 11. Cinética enzimática de Fit_ <i>K. pneumoniae</i> y Fit_ <i>E. coli</i> usando el modelo de Lineweaver-Burk	42

Lista de Apéndices

Apéndice A. Gen de la fitasa de <i>K. pneumoniae</i>	61
Apéndice B. Gen de la fitasa de <i>Escherichia coli</i>	62
Apéndice C. Validación de los modelos resultantes de Fit_KP y Fit_EC, mediante las herramientas ProSA web	63
Apéndice D. Validación de los modelos resultantes de Fit_KP y Fit_EC, mediante la herramienta Verify 3D	64
Apéndice E. Diagrama de Ramachandran del modelo 3D de Fit_KP	65
Apéndice F. Diagrama de Ramachandran del modelo 3D de Fit_EC	67
Apéndice G. Clones positivos con actividad fitasa.....	67
Apéndice H. Purificación y concentración de la fitasa usando un Amicon.....	68
Apéndice I. Cromatograma de purificación por afinidad de la fitasa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> en el sistema ÄKTA pure	70
Apéndice J. Cromatograma de purificación por afinidad de la fitasa de <i>Escherichia coli</i> en el sistema ÄKTA pure	71

Resumen

Título: Caracterización bioinformática y funcional de la enzima fitasa derivada de *Klebsiella pneumoniae**

Autor: Wendy Nathalia Triana Ayala **

Palabras Clave: Fitasa, animales monogástricos, nutrición animal, expresión recombinante.

Descripción:

El fitato es el principal compuesto de reserva de fósforo (P) en las plantas y presenta baja biodisponibilidad por la formación de complejos que dificultan su aprovechamiento. Las fitasas, enzimas que catalizan la hidrólisis del fitato, se usan ampliamente en la industria animal porque optimizan la absorción de fósforo y minimizan la contaminación derivada de los desechos. Los animales monogástricos carecen de estas enzimas, por lo que, el fitato no se degrada y es excretado intacto a través de las heces. La suplementación alimenticia con fitasas surge como una alternativa biotecnológica eficaz para liberar el fósforo en el tracto digestivo y reducir el impacto ambiental asociado. El presente trabajo caracterizó una fitasa de *Klebsiella pneumoniae* (Fit_KP) frente a una fitasa control de *Escherichia coli* (Fit_EC) con el fin de compararlas y determinar su potencial en la industria. Análisis *in silico* evidenciaron que ambas proteínas tenían pesos moleculares de 46-48 kDa y el motivo conservado RHGXRXP HD, confirmando su pertenencia a las fosfatasas ácidas de histidina (HAP), además de modelos estructurales de alta confianza. Seguidamente, se construyeron plásmidos pET-20b(+) con los genes de interés (Fit_KP y Fit_EC), añadiendo el péptido señal y la etiqueta de histidina. Las proteínas se expresaron en *E. coli* BL21 (DE3), se purificaron usando columnas de afinidad HisTrap FF y se caracterizaron. Ambas fitasas mostraron actividades específicas de 77 U/mg (Fit_KP) y 71.2 U/mg (Fit_EC), pH óptimo de 4.0 y temperaturas óptimas de 50 °C (Fit_KP) y 60 °C (Fit_EC). El Zn²⁺ fue inhibitorio, mientras que el EDTA incrementó de forma marcada la actividad. La integración de análisis *in silico-in vitro* demostró viabilidad para obtener fitasas recombinantes funcionales, en donde Fit_KP se destaca como una candidata sólida para su uso en la nutrición animal.

* Trabajo de grado.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Biología. Director: Genis Andrés Castillo Villamizar, Dr. rer. nat. Codirector: Jorge Hernández Torres, Doctorat ès Sciences. Codirectora: Julieth Camila Maldonado Pava, Bióloga.

Abstract

Title: Bioinformatic and functional characterization of the phytase enzyme derived from *Klebsiella pneumoniae**

Author: Wendy Nathalia Triana Ayala**

Key Words: Phytase, monogastric animals, animal nutrition, recombinant expression.

Description: Phytate is the major storage form of phosphorus (P) in plants and has low bioavailability because it forms complexes that hinder its utilization. Phytases, enzymes that catalyze the hydrolysis of phytate, are widely used in the animal feed industry because they improve phosphorus absorption and reduce phosphorus pollution from animal waste. Monogastric animals lack these enzymes; consequently, phytate is not degraded and is excreted essentially intact in feces. Dietary supplementation with phytases therefore represents an effective biotechnological strategy to release phosphorus in the digestive tract and mitigate the associated environmental impact. This study characterized a phytase from *Klebsiella pneumoniae* (Fit_KP) in comparison to a reference phytase from *Escherichia coli* (Fit_EC) to evaluate their performance and assess their industrial potential. *In silico* analyses indicated molecular weights of 46–48 kDa and the conserved RHGXRX_P–HD motif, confirming membership in the histidine acid phosphatase (HAP) family, and yielded high-confidence structural models. We subsequently constructed pET-20b(+) plasmids carrying the genes of interest (Fit_KP and Fit_EC), adding a signal peptide and a histidine tag. The proteins were expressed in *E. coli* BL21(DE3), purified using HisTrap FF affinity columns, and characterized. Both phytases showed specific activities of 77 U/mg (Fit_KP) and 71.2 U/mg (Fit_EC), an optimal pH of 4.0, and optimal temperatures of 50 °C (Fit_KP) and 60 °C (Fit_EC). Zn²⁺ acted as an inhibitor, whereas EDTA markedly increased activity. The integration of *in silico* and *in vitro* analyses demonstrated the feasibility of obtaining functional recombinant phytases, with Fit_KP emerging as a solid candidate for application in animal nutrition.

* Degree thesis

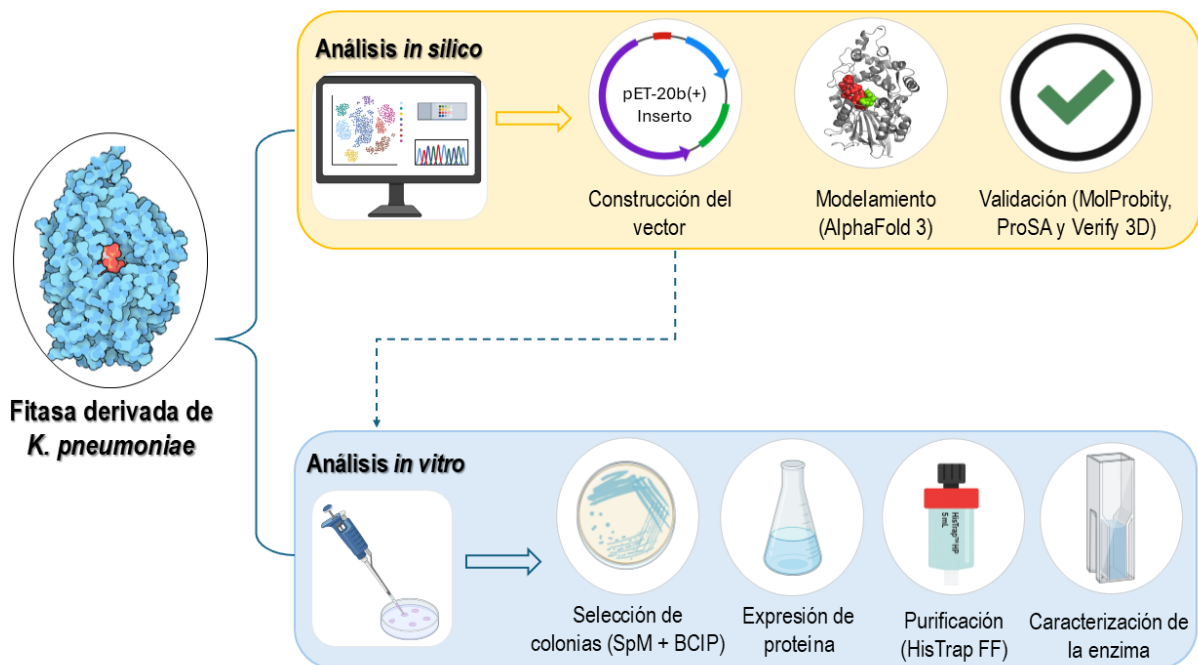
** Faculty of Sciences, School of Biology, Biology program. Director: Genis Andrés Castillo Villamizar, Dr. rer. nat.; Codirector: Jorge Hernández Torres, Doctorat ès Sciences; Codirector: Julieth Camila Maldonado Pava, Biologist.

Resumen gráfico metodológico

Título: Caracterización bioinformática y funcional de la enzima fitasa derivada de *Klebsiella pneumoniae**

Autor: Wendy Nathalia Triana Ayala **

Palabras Clave: Fitasa, animales monogástricos, nutrición animal, expresión recombinante.



* Trabajo de grado.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Biología. Director: Genis Andrés Castillo Villamizar, Dr. rer. nat. Codirector: Jorge Hernández Torres, Doctorat ès Sciences. Codirectora: Julieth Camila Maldonado Pava, Bióloga.

Introducción

El fitato, también conocido como sal de ácido fítico, es la principal forma de almacenamiento de fósforo en las plantas, especialmente en semillas (Cosgrove, 1966). El fósforo, a su vez, es un elemento que juega un papel esencial para la vida ya que participa en funciones clave como síntesis de ácidos nucleicos, metabolismo energético (ATP) y membranas celulares (Ruttenberg, 2014). No obstante, los animales monogástricos, como aves y cerdos, son incapaces de degradar el fitato por la ausencia de las enzimas en su tracto digestivo (Kumar, V. et al., 2014). Como resultado, el fósforo no puede ser absorbido y el fitato es excretado, lo que aumenta la cantidad de fósforo orgánico no asimilable en el ambiente debido a que a través de las heces se dirige fácilmente hacia los cuerpos de agua, promoviendo el crecimiento descontrolado de algas y otros organismos fotosintéticos, lo que contribuye a la contaminación y la eutrofización (Bomans et al., 2005). Para compensar esta deficiencia nutricional, se suplementa fósforo inorgánico a las dietas, como fosfatos minerales extraídos de minas no renovables; esta práctica no solo aumenta los costos de producción agropecuaria, sino que además representa una amenaza a la sostenibilidad, ya que las reservas mundiales de fósforo son limitadas (Stewart et al., 2005). Las fitasas son enzimas capaces de degradar el fitato y liberar fosfato (Yao et al., 2012). Las fitasas pueden encontrarse en plantas, animales, hongos y bacterias, siendo estas últimas especialmente interesantes por su diversidad funcional y su fácil manipulación genética. Durante las últimas décadas estas enzimas han traído interés en la industria, porque han surgido como una alternativa biotecnológica prometedora en el aprovechamiento de los recursos y protección del medio ambiente (Konietzny & Greiner, 2004). Existen diferentes tipos de fitasa, las cuales se pueden diferenciar de acuerdo con su sitio activo, entre las que resaltan son las HAP (Histidine acid

phosphatase) (Lei, Xin et al., 2007), debido a su estabilidad y eficiencia en condiciones ácidas, siendo esto compatible con el entorno digestivo propio de los animales monogástricos (Oh et al., 2003). En el ámbito de la nutrición, las fitasas bacterianas se han empleado como suplementos para mejorar la calidad nutricional de los alimentos vegetales, aumentando la absorción del fósforo en los animales monogástricos (Hussin et al., 2007).

La inclusión de fitasas como aditivos en la alimentación animal se debe a dos factores principales: a las limitaciones futuras en el suministro de fosfato y la preocupación social por el ambiente. Las fitasas permiten mejorar la absorción del fósforo orgánico vegetal, reduciendo el coste en la cría de los animales y el impacto ambiental. A pesar de que son evidentes las ventajas del uso de este tipo de enzimas, hasta donde se conoce, Colombia no cuenta con biocatalizadores tipo fitasas propios. Por lo que se mantiene la dependencia del país hacia las importaciones de esta enzima.

El mercado de las fitasas está valorado en 350 millones de dólares y cerca del 75% de las dietas de los animales monogástricos contienen esta enzima (Shivange et al., 2012). El estudio de estas enzimas promueve el desarrollo a futuro de una industria nacional de biocatalizadores, lo que permitirá reducir la dependencia de fuentes externas y aprovechar el potencial de las enzimas provenientes de la diversidad del país. Así mismo, existe la necesidad de identificar fitasas con propiedades mejoradas. Esto incluye: mayor actividad enzimática, mayor estabilidad en condiciones de pH y temperatura extremas, así como una mayor especificidad hacia el fitato. El impacto potencial de este trabajo de grado en la industria de la alimentación animal es prometedor, debido a las propiedades previamente identificadas de la enzima. Con la caracterización de la fitasa se espera sentar una base de conocimiento y una experimentación reproducible que, a futuro,

permita aprovechar la diversidad biológica del país y reducir la dependencia externa de biocatalizadores orientados a la nutrición animal.

Dentro de esta perspectiva comercial, la búsqueda de nuevas fitasas con propiedades funcionales específicas es una prioridad. Específicamente, se buscan isoformas que puedan hidrolizar eficientemente el sustrato en el pH ácido del jugo gástrico y que, a su vez, posean termoestabilidad durante la producción de concentrado animal. Las fitasas de *Klebsiella sp.*, de la familia histidina fosfatasa, han demostrado una buena estabilidad térmica y una alta tolerancia al pH (Pramanik et al., 2018).

En este trabajo se caracterizó, mediante enfoques *in silico* e *in vitro*, la fitasa tipo HAP identificada en *Klebsiella pneumoniae* aislada de suelos de Santander. Pese a la reconocida diversidad microbiana de Colombia, se constató un vacío de conocimiento: escaseaban caracterizaciones bioquímicas y estructurales comparables (bajo protocolo único) de fitasas provenientes de cepas colombianas, y no existían comparaciones directas con controles de referencia en condiciones equivalentes que incluyeran desempeño en pH 2–5 y temperaturas de proceso relevantes. Con base en esa brecha y en la evidencia preliminar de Maldonado (2024), se planteó la hipótesis de que la fitasa de *K. pneumoniae*, expresada recombinante en *Escherichia coli*, retenía actividad en pH ácido, exhibía estabilidad térmica suficiente y mostraba parámetros cinéticos (K_m , V_{max} , k_{cat}) no inferiores a los de un control definido cuando se evaluaba con el mismo sustrato y condiciones experimentales. Para poner a prueba esta hipótesis, se cuantificó la actividad específica, óptimos de pH y temperatura, estabilidad térmica y cinética enzimática, y se contrastaron los resultados con el control especificado en la Metodología, aportando una línea base rigurosa que contribuyó a cerrar la brecha sobre fitasas de origen local.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Caracterizar *in silico* e *in vitro* las propiedades estructurales, fisicoquímicas y funcionales de la enzima fitasa derivada del genoma de *Klebsiella pneumoniae*

1.2 Objetivos Específicos

Analizar *in silico* las propiedades estructurales de la fitasa derivada del genoma de *Klebsiella pneumoniae*.

Determinar las principales propiedades bioquímicas de la fitasa recombinante de *Klebsiella pneumoniae*.

Comparar las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las fitasas de *Klebsiella pneumoniae* y control.

2. Cuerpo del Trabajo

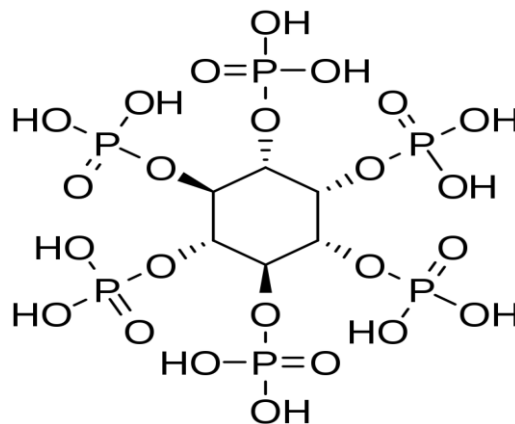
2.1 Marco teórico

El fósforo [P] es un macronutriente esencial que desempeña un papel axial en el metabolismo energético, la biosíntesis de ácidos nucleicos, las funciones fisiológicas, las membranas celulares y la regulación enzimática (Valsami-Jones, 2005). El fosfato (PO_4^{3-}) es la principal forma de almacenamiento de P inorgánico y es la fuente usual para la producción de fertilizantes fosforados (Dodds & Whiles, 2010; Kumar, V. et al., 2015).

Por otro lado, el ácido fítico (mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisfosfato) también conocido como fitato (Figura 1), es el principal compuesto de reserva de P en las plantas, fuente de P orgánico en el suelo y puede representar entre el 60 y 80 % del P total de los alimentos vegetales (Lei, Xin Gen et al., 2013; Lopez et al., 2002). El fitato se encuentra en legumbres y cereales, y se acumula en capas celulares como la aleurona y en forma de cristales globoides (Reddy et al., 1982; Tyagi et al., 1998). No obstante, la absorción intestinal de este compuesto se dificulta debido a la formación de complejos con cationes multivalentes presentes en la dieta (Kumar, V. et al., 2015).

Figura 1

Fórmula estructural del ácido fítico



Nota: Adaptado de *Application of Inositol Hexaphosphate and Inositol in Dental Medicine: An Overview*, de Druzijanic et al., 2023, *Biomolecules*, 13(6), 913.

Cuando el fitato se presenta en estado iónico, forma complejos muy estables con cationes multivalentes (Dost & Tokul, 2006). Por la capacidad quelante del fitato con varios elementos minerales (p.ej. Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+}) se forman complejos fitato-mineral y fitato-proteína (Sapna et al., 2013). Los animales monogástricos son incapaces de hidrolizar el complejo fitato-mineral, por la carencia de enzimas fitasas en el tracto digestivo y, por tanto, el fosfato no es asimilado. Como resultado, se presenta una doble problemática, por un lado, una pérdida de nutrientes esenciales; y por el otro un impacto ambiental significativo, pues los minerales son excretados, contaminando las aguas y causando eutrofización (Kumar, V. et al., 2014). La proliferación de algas, la hipoxia y la muerte de animales acuáticos pueden resultar de la eutrofización por P de cuerpos de agua dulce y sistemas costeros (Mallin & Cahoon, 2003). En consecuencia, la industria alimentaria debe recurrir al fosfato inorgánico extraído de las minas para su uso como suplemento nutricional. Al ser un recurso no renovable, se ha advertido un posible agotamiento en los próximos 50 años a medida que aumente su demanda (Lei, Xin Gen et al., 2013).

Las fitasas (mio-inositol hexakisfosfato fosfohidrolasa) son enzimas que catalizan la hidrólisis del fitato, convirtiéndolo en fosfato inorgánico y derivados del fosfato de mio-inositol (Roopesh et al., 2006). Existen diversos tipos de fitasas, según los criterios de clasificación. Por su pH óptimo, se categorizan como fitasas alcalinas o ácidas. También, según sus mecanismos catalíticos, se destacan las fosfatasa ácida de histidina (HAP), la fosfatasa de hélice β (BPP), la fosfatasa ácida púrpura (PAP) y la cisteína fosfatasa (CP) (Lei et al., 2007). Por último, otro criterio

de clasificación depende de la posición de la primera desfosforilación del fitato, lo que da lugar a las 3-fitasas (EC 3.1.3.8), 6-fitasas (EC 3.1.3.26) y 5-fitasas (EC 3.1.3.72) (Yao et al., 2012).

Complementar la alimentación animal con fitasa representa una forma eficaz de suministrar P a los animales (pollo, cerdo y pescado), mejorando así el rendimiento animal (Kumar et al., 2015). La demanda de enzimas fitasa aumenta de forma sostenible en diversas industrias, incluida la biotecnología agrícola (Dahiya et al., 2009; Escobin-Mopera et al., 2012). Las fitasas son enzimas que se encuentran en una variedad de fuentes, como plantas, bacterias, hongos, levaduras y animales. Sin embargo, entre los microorganismos, la actividad fitasa se ha explorado con mayor frecuencia en los hongos, especialmente en las especies de *Aspergillus* (Kim et al., 1998). La primera fitasa disponible comercialmente fue identificada en 1991, en un aislado de *Aspergillus niger* NRRL 3135 (ATCC 66876) (Haefner et al., 2005). Se ha encontrado que las fitasas de origen bacteriano son más útiles que las fúngicas, debido a su mayor capacidad catalítica, una mejor especificidad al sustrato y una mayor resistencia proteolítica (Konietzny & Greiner, 2004). Muchas fitasas provenientes de diferentes fuentes como *Aspergillus niger*, *Bacillus sp.*, *Klebsiella* y *Escherichia coli* han sido clonadas, purificadas y estudiadas por su potencial biotecnológico. Entre las que destaca la fitasa de *E. coli*, clasificada como una fosfatasa ácida de histidina (HAP), por la especificidad de sustrato, alta actividad específica y estabilidad a pH ácido, unas propiedades especialmente valiosas para la industria alimentaria (Golovan et al., 2000; Greiner, R. et al., 1993). Siendo todas las características mencionadas anteriormente, un motivo por el cual le dan una base a algunas fitasas comerciales como (Finase EC, OptiPhos, Phyzyme XP) (Greiner & Konietzny, 2012).

Desde una perspectiva estructural, el estudio tridimensional de las fitasas es importante para orientar su aplicación en la industria y mejorar sus propiedades, mediante su clasificación, el

entendimiento de sus funciones y la modificación de su secuencia (Xing et al., 2023). Las HAP se caracterizan por tener un motivo de secuencia conservado de RHGXRX^HD en el sitio activo, y se encuentra localizado entre la interfaz de α/β -dominio conservado y el α -dominio variable. Su catálisis se separa por un proceso de dos pasos, el cual consiste en un ataque nucleofílico en un átomo de fósforo por la histidina en el motivo del sitio activo, seguido de la hidrólisis del resultado de un fosfo-histidina intermedio (Lim et al., 2000).

La fitasa ideal para la industria alimenticia se define como aquella que posee al menos estas tres propiedades: hidrolizar el fitato a pH ácido del tracto digestivo animal, presentar termoestabilidad durante la producción de concentrado y permitir costos de producción competitivos. Por ahora, ninguna fitasa comercial cumple satisfactoriamente estos requisitos. Por lo tanto, existe un interés continuo en el estudio de nuevos microorganismos, incluidas las bacterias, en busca de isoformas nuevas y más eficientes (Lei, X. G. & Stahl, 2001).

Los avances en la secuenciación de nueva generación y técnicas de metagenómica funcional han permitido descubrir nuevas enzimas a partir de librerías de metagenomas (Nacke & Daniel, 2013). Paralelamente, la implementación de las herramientas bioinformáticas ha facilitado el análisis y la interpretación de la complejidad biológica (Kumar, A. & Chordia, 2017). Las predicciones de interacción enzima-sustrato (*docking*), la dinámica molecular y el diseño y testeo *in silico* de mutantes aceleran el hallazgo de isoformas de enzimas con propiedades específicas (Gholizade et al., 2018).

Investigaciones previas revelan la existencia de nuevas fitasas con diversas características (Villamizar et al., 2019). En un estudio reciente entre la Corporación para la Investigación de la Corrosión (CIC) y el Centro de Innovación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIN), se identificó una fitasa de *Klebsiella pneumoniae* con potencial en la industria en

relación con las enzimas comerciales (Maldonado, 2024). Las fitasas de *Klebsiella sp.* han demostrado ser candidatas óptimas para la industria alimentaria, por su termoestabilidad y su alta tolerancia al pH (Pramanik et al., 2018). A juzgar por las pruebas preliminares, la fitasa previamente identificada ostenta un potencial suficiente para avanzar en su caracterización y, de pronto, explorar su uso como biocatalizador comercial de tipo fitasa en Colombia.

2.2 Metodología

2.2.1 Análisis bioinformático

2.2.1.1 Análisis de la secuencia y selección de la fitasa control

La secuencia de la fitasa de *Klebsiella pneumoniae* fue compartida por la Corporación para la Investigación de la Corrosión (CIC) (RefSeq: WP_225372272). La predicción de las características fisicoquímicas de la proteína se realizó utilizando herramientas como ProtParam (ExPASy, acceso: 2025-03-03) (Gasteiger et al., 2005). Se analizaron propiedades tales como el perfil de hidrofobicidad, el índice de estabilidad y otros parámetros para la caracterización estructural. Adicionalmente, se evaluó la presencia de un péptido señal mediante el algoritmo del servidor SignalP 6.0 (modelo Gram-negative/Sec/SPI; acceso: 2025-02-24) (Teufel et al., 2022).

La fitasa de *E. coli* (PDB 1DKL; UniProt: P07102) fue seleccionada como la enzima control para este estudio, ampliamente caracterizada y de uso comercial (Lim et al., 2000). Una vez seleccionadas las secuencias de ambas fitasas, se delimitaron los potenciales dominios con la base de datos de InterPro v101.0 (acceso: 2025-03-03) (Blum et al., 2025).

2.2.1.2 Modelamiento de la estructura 3D de la proteína y validación del modelo.

La predicción de la estructura 3D se realizó utilizando el método de modelado por homología mediante la herramienta AlphaFold 3 (Abramson et al., 2024). Posteriormente, se

validó la calidad estructural de los modelos obtenidos utilizando las herramientas MolProbity (Chen et al., 2010), ProSA web (Wiederstein & Sippl, 2007) y Verify 3D (Eisenberg et al., 1997). Las estructuras se visualizaron y analizaron con el software PyMOL v3.1 (Schrodinger, 2025).

2.2.2 Diseño y construcción del vector de expresión recombinante con el gen Fitasa de Klebsiella y Fitasa de E. coli

Para la construcción de los plásmidos recombinantes pET-20b(+)_Fit_KP y pET-20b(+)_Fit_EC, se utilizaron las secuencias correspondientes de una fitasa de *Klebsiella pneumoniae* (RefSeq: WP_225372272) y de *Escherichia coli* (PDB 1DKL; UniProt: P07102), respectivamente. Ambos genes fueron optimizados para la expresión en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3), se eliminó el péptido señal nativo de las enzimas y se conservó el péptido señal pelB del vector de expresión. Se retiró el codón de terminación en los insertos para permitir la adición de una etiqueta de histidina en el extremo C-terminal. El marco de lectura abierto (ORF) de la fitasa de *K. pneumoniae* tuvo una longitud de 1272 pb, insertado en el vector pET-20b(+), dando lugar a un plásmido recombinante de 4899 pb; el ORF de la fitasa de *E. coli* presentó 1323 pb, insertado en el mismo vector pET-20b(+), para un total de 4947 pb. Los insertos fueron clonados entre los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI*, dando lugar a plásmidos recombinantes pET-20b(+)_Fit_KP y pET-20b(+)_Fit_EC. La síntesis de los constructos fue contratada por la empresa MacroGen Inc., que suministró un reporte de la secuencia de los vectores recombinantes. También, se confirmó la eficiencia de la síntesis mediante un análisis de restricción: para el plásmido correspondiente a pET-20b(+)_Fit_EC se usó la enzima *BshNI*; para el plásmido correspondiente a pET-20b(+)_Fit_KP se utilizaron las enzimas *EcoRI* y *BglII*.

2.2.3 Transformación de *E. coli* BL21 (DE3)

Se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) mediante la técnica de choque térmico en presencia de CaCl₂, siguiendo el protocolo de Sambrook et al. (1989). Los plásmidos que se utilizaron en la transformación fueron: pET-20b(+)_Fit-KP (fitasa de *Klebsiella pneumoniae*), pET-20b(+)_Fit-EC (fitasa de *Escherichia coli*) y pET-20b(+)_NR (control negativo).

Posteriormente, las células transformadas se sembraron en medio sólido LB (Luria-Bertani) suplementado con 100 µg/mL ampicilina y cultivadas a 37°C overnight. Se seleccionaron colonias individuales para ser evaluadas en medio Sperber modificado (SpM) (0.5 g/L NH₄Cl, 0.1 g/L CaCl₂, 0.25 g/L MgSO₄, 1 g/L glucosa y 2.5 g/L ácido fítico), con fitato como única fuente fósforo y glucosa como fuente de carbono, 1 mM de IPTG, y con BCIP 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) (25 µg/mL), como indicador cromogénico (Villamizar et al., 2019). Dado que el BCIP detecta fosfatasas no específicas, se mantuvieron controles como el vector no recombinante y el cultivo no inducido.

Una vez se observaban colonias azul oscuro, se interpretaba como indicativas de liberación de fosfato por hidrólisis de fitato y, por tanto, se seleccionaban como potenciales degradadoras de fitato. Las colonias positivas se replicaban en medio LB sólido para su aislamiento y posterior criopreservación según el protocolo de Novagen (pET system manual TB055 8th edition 02/99 Novagen 1).

2.2.4 Expresión heteróloga del gen de fitasa de *Klebsiella* en *E. coli* BL21(DE3)

Las células de *Escherichia coli* BL21(DE3) transformadas con el vector pET-20b(+)_Fit_KP fueron sembradas en placas de agar de LB suplementado con 100 µg/mL de

ampicilina y cultivadas a 37 °C *overnight*. Posteriormente, se preparó un precultivo a partir de colonias individuales, en 20 mL de medio líquido LB con ampicilina a 100 µg/mL a 250 rpm *overnight* (o hasta que alcanzara un OD600 nm de 0.7). Seguidamente, a partir del precultivo se transfirieron 2 mL a 200 mL de medio LB líquido suplementado con 100 µg/mL de ampicilina en un matraz de 1 L (relación 1:100). Cuando el cultivo alcanzó un OD600 nm de 0.6, se indujo la expresión con 0.5 mM IPTG. El cultivo se incubó a 30 °C durante aproximadamente 16 horas, siguiendo las recomendaciones del manual del sistema pET (pET system manual TB055 8th edition 02/99 novagen 1), para proteínas dirigidas al espacio periplasmático, con el fin de favorecer el plegamiento óptimo de la proteína recombinante. En paralelo, se mantuvieron otros cultivos bajo las mismas condiciones sin IPTG, como control no inducido, y con el vector pET-20b(+)_NR, como control negativo tanto de transformación como de expresión.

Todos los cultivos fueron centrifugados a 4000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante fue descartado y los pellets celulares obtenidos se almacenaron a -80 °C para análisis posteriores.

2.2.5 Expresión homóloga del gen de fitasa de *E. coli* en BL21(DE3)

El precultivo fue elaborado siguiendo el protocolo anterior y se transfirió en una relación 1:100 a un medio de autoinducción (6 g/L Na₂HPO₄, 3 g/L KH₂PO₄, 10 g/L Triptona, 5 g/L Extracto de levadura, 5 g/L NaCl, 0.5 % Glicerol, 0.05 % Glucosa, y 0.2 % lactosa) (Studier, 2005) líquido suplementado con 100 µg/mL de ampicilina en un matraz de 1 L (relación 1:100) incubado a 37 °C durante 10 horas. Adicionalmente, se cultivaron células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el vector pET-20b(+)_NR, también bajo las mismas condiciones, como control negativo tanto de transformación como de expresión.

Todos los cultivos fueron centrifugados a 4000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante fue descartado y los pellets celulares obtenidos se almacenaron a -80 °C para análisis posteriores.

2.2.6 Lisis celular

El pellet celular obtenido tras centrifugar se resuspendió con un buffer de lisis (25 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, 0.2% Tween-20) en una relación 2:1 (v/p) respecto a su peso húmedo. Se sonicó en hielo (volúmenes de 8 mL de pellet celular) a una amplitud del 70 %, pulsos de 20 segundos ON/60 segundos OFF durante un total de 15 minutos usando un procesador ultrasónico de aguja (Cole-Parmer 130-Watt Ultrasonic Processor).

El lisado o extracto curdo (EC) se centrifugó a 17.000 x g durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente, se reparó la fracción soluble o sobrenadante (FS) y fracción insoluble o pellet (FI), el cual se resuspendió en el mismo buffer de la enzima (50 mM de acetato de sodio pH 4.0). La concentración de proteína de las fracciones se midió usando el kit Qubit™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para finalmente analizar las fracciones mediante un gel de SDS-PAGE al 12%.

2.2.7 Medición de la actividad fitasa

La actividad enzimática de las fitasas se determinó según el protocolo modificado descrito por (Greiner, Ralf, 2004) de fitato de sodio. El tiempo de reacción fue de 30 minutos a 37 °C y se detuvo y reveló usando una mezcla fresca de acetona/H₂SO₄ 5 N/molibdato de amonio 10 mM 2:1:1 (v/v). La liberación de fosfato inorgánico, que formaba el complejo fosfo-molibdato, fue cuantificada midiendo la absorbancia a 355 nm (A₃₅₅). Para la estimación de la cantidad de fosfato liberado, se realizó una curva de calibración de KH₂PO₄ entre un rango de 0 a 50 mM. La actividad

específica se expresó en U/mg, donde una unidad (U) se define como la cantidad de enzima capaz de liberar un μmol de fosfato inorgánico por minuto.

2.2.8 Purificación de la proteína recombinante

La fracción soluble fue filtrada con un filtro de celulosa de 0.22 μm y posteriormente, equilibrada con buffer de unión (50 mM Tris-HCL, 0.5 M de NaCl, 20 mM de imidazol pH 7.4). La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna HisTrap FF 5 mL (Cytiva) con un flujo de 1.0 mL/min. La elución de la proteína se realizó con tres volúmenes de buffer de elución (50 mM Tris-HCL, 0.5 M de NaCl, 500 mM de imidazol, pH 7,4) en un flujo de 1.0 mL/min. Finalmente, se recuperaron las fracciones eluidas y se concentraron usando un filtro de centrifuga Amicon Ultra-4 (30K MWCO, Millipore) a 4000 x g durante 10 minutos.

2.2.9 Caracterización bioquímica de las fitasas Fit_K. pneumoniae y Fit_E. coli

2.2.9.1 pH y temperatura óptima de la enzima purificada

Para evaluar el efecto del pH sobre la actividad enzimática, se usaron distintos tampones abarcando un amplio rango de pH. Se utilizaron los siguientes buffers a 50 mM: ácido (glicina-HCL, pH 2.2, 3.5) y (acetato de sodio, pH 3.5, 4, 5, 6), neutro (Tris, pH 6, 7, 8) y alcalino (glicina-NaOH, pH 8, 9). Adicionalmente, la temperatura óptima de la actividad enzimática fue evaluada en un rango de 10°C a 90°C, usando un termociclador (MiniAmp Thermal Cyclers, Thermo Fisher Scientific) y baño seco con calentamiento y agitación (Thermo Fisher Scientific).

2.2.9.2 Ensayo de iones metálicos, agentes reductores y quelantes

Para analizar la influencia de ciertos cationes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) y de agentes quelantes como el EDTA sobre la actividad enzimática, cada compuesto se evaluó a una concentración final de 5 mM en el ensayo de actividad descrito previamente, con temperatura y pH óptimos.

2.2.9.3 Cinética enzimática

Para obtener la cinética enzimática con el fitato de sodio, se utilizaron concentraciones de 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 y 4 mM en el ensayo de actividad. Los valores de k_m y V_{max} se calcularon siguiendo el modelo de cinética enzimática de lineweaver-burk (Lineweaver & Burk, 1934).

2.3 Resultados.

2.3.1 Análisis bioinformático

2.3.1.1 Análisis de la secuencia y selección de la fitasa control

La secuencia de la fitasa de *Klebsiella pneumoniae*, referida en este trabajo como fit_KP, fue proporcionada por la Corporación para la Investigación de la Corrosión (CIC). Mediante el uso de los servidores ProtParam (ExPASy, acceso: 2025-03-03) se analizaron las propiedades fisicoquímicas de las enzimas, cuyos resultados se muestran en la Tabla 1. Fit_KP presentó un peso molecular calculado de 46.4 kDa y un pI de 8.98. Como referencia se seleccionó una fitasa control derivada de *Escherichia coli*, denominada Fit_EC, que presentó un peso molecular estimado de 47.8 kDa y un pI de 6.59.

Para ambas proteínas se calcularon el índice de inestabilidad y el índice alifático, parámetros para evaluar la estabilidad estructural de las proteínas en condiciones *in vitro*. El índice de inestabilidad (II) se caracteriza por analizar la presencia de dipéptidos críticos para la estabilidad

en la secuencia. Valores <40 se asocian con proteínas estables, mientras que valores >40 indican una inestabilidad potencial (Guruprasad et al., 1990). En este caso, Fit_KP obtuvo un valor de 39.29, mientras que Fit_EC obtuvo 37.05, lo que las clasificó como proteínas estables. Por otra parte, el índice alifático mide la proporción de residuos alifáticos (Ala, Val, Ile y Leu) (Figura 2) y se emplea como estimador de la termoestabilidad de proteínas globulares (Ikai, 1980). Los valores obtenidos fueron 87.07 para Fit_KP y 90.73 para Fit_EC, sugiriendo que ambas enzimas tienen un potencial para mantener su conformación estructural a elevadas temperaturas. Asimismo, se calculó el valor de GRAVY (*Grand Average of Hydropathy*), parámetro que representa la media del índice de hidropatía de cada aminoácido que conforma la proteína (Kyte & Doolittle, 1982). Valores negativos indican mayor afinidad por sistemas acuosos, mientras que valores positivos sugieren afinidad por residuos hidrofóbicos. Tanto Fit_KP como Fit_EC presentaron valores negativos de -0.294 y -0.217, respectivamente, evidenciando una tendencia medios acuosos. Concordando con la posibilidad de expresión en el periplasma bacteriano. Finalmente, se estimó la vida media en vivo para las dos proteínas en *E. coli*, siendo en ambos casos superiores a 10 horas.

Tabla 1

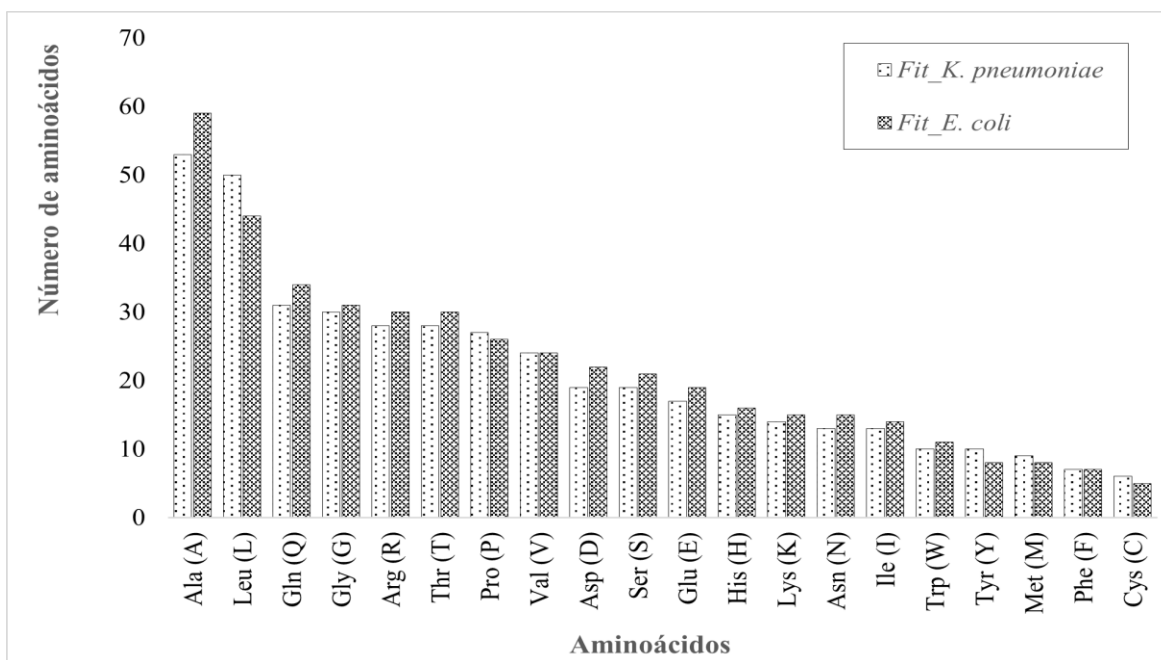
Propiedades fisicoquímicas de la fitasa de Klebsiella pneumoniae (Fit_KP) y de Escherichia coli (Fit_EC)

Propiedades fisicoquímicas	Valor estimado Fit_KP	Valor estimado
		Fit_EC
Peso molecular (kDa)	46.4	47.8
Punto isoeléctrico	8.98	6.59

Índice de inestabilidad	39.29	37.05
Índice alifático	87.07	90.73
Gran promedio de hidropatía (GRAVY)	-0.294	-0.217
Vida media estimada	>10 horas (<i>E. coli</i>)	>10 horas (<i>E. coli</i>)

Figura 2.

Composición de aminoácidos en la fitasa de Klebsiella pneumoniae (Fit_KP) y de Escherichia coli (Fit_EC) determinadas con el servidor ProtParam



Nota: El análisis muestra diferencias en la frecuencia relativa de ciertos aminoácidos, destacándose Ala y Leu como los más abundantes en ambas enzimas. Los valores fueron obtenidos mediante el análisis *in silico* con ProtParam (Gasteiger et al., 2005) y Benchling (Benchling, 2023).

Mediante análisis bioinformáticos se utilizó SignalP 6.0 (modelo Sec/SPI; acceso: 2025-02-24) para identificar la presencia de un péptido señal en las secuencias de Fit_KP y Fit_EC. La

predicción dio una probabilidad de 0.9738 para Fit_KP y 0.9684 para Fit_EC bajo el sistema Sec/SPI, el cual sugiere que la proteína es secretada por la vía Sec, con escisión por peptidasa tipo I. Además, el sitio de escisión de fit_KP fue predicho entre los residuos 28 y 29 (Wang, 2004), con una confianza de 0.8153, indicando que los primeros 27 aminoácidos conforman probablemente el péptido señal (Nielsen et al., 1997; Sajidan et al., 2004)

La predicción de motivos y dominios conservados mediante la herramienta InterPro reveló que tanto Fit_KP como Fit_EC comparten los motivos conservados RHGXRX HD, características típicas de las fitasas que pertenecen a la familia de la fosfatasa ácida de histidina (InterPro: IPR050645). Es decir, la presencia de estos dominios y motivos sustentó la anotación funcional, sin implicar por sí misma identidad estructural tridimensional (Tabla 2).

Tabla 2

Características de los motivos conservados encontrados en InterPro

Fitasas	Familia de proteínas	Posición (inicio-fin)	Motivos conservados
Fit_KP	Fosfatasa ácida de Histidina	27-352	RHGXRX HD
Fit_EC	Fosfatasa ácida de Histidina	30-375	RHGXRX HD

2.3.1.2 Modelamiento de la estructura 3D de la proteína y validación del modelo.

La estructura tridimensional de las fitasas Fit_KP y Fit_EC fue modelada usando AlphaFold3 (Figura 3A, B). Los modelos de Fit_KP y Fit_EC seleccionados mostraron pLDDT >90 casi en toda la estructura y un pTM de 0.95 en ambas proteínas. La validación arrojó MolProbity score de 1.17 (99th) y 1.05 (100th), Z-score ProSA de -9.22 y -9.73, y Verify3D de 90.75 % y 85.58 %, respectivamente (Tabla 3). Estos resultados respaldaron la calidad estereoquímica, la coherencia entre el entorno tridimensional y la identidad de los residuos a lo

largo de la cadena, y se encuentran dentro de los rangos típicos en concentrados en proteínas resultantes experimentalmente por cristalografía X (Wiederstein & Sippl, 2007).

Tabla 3

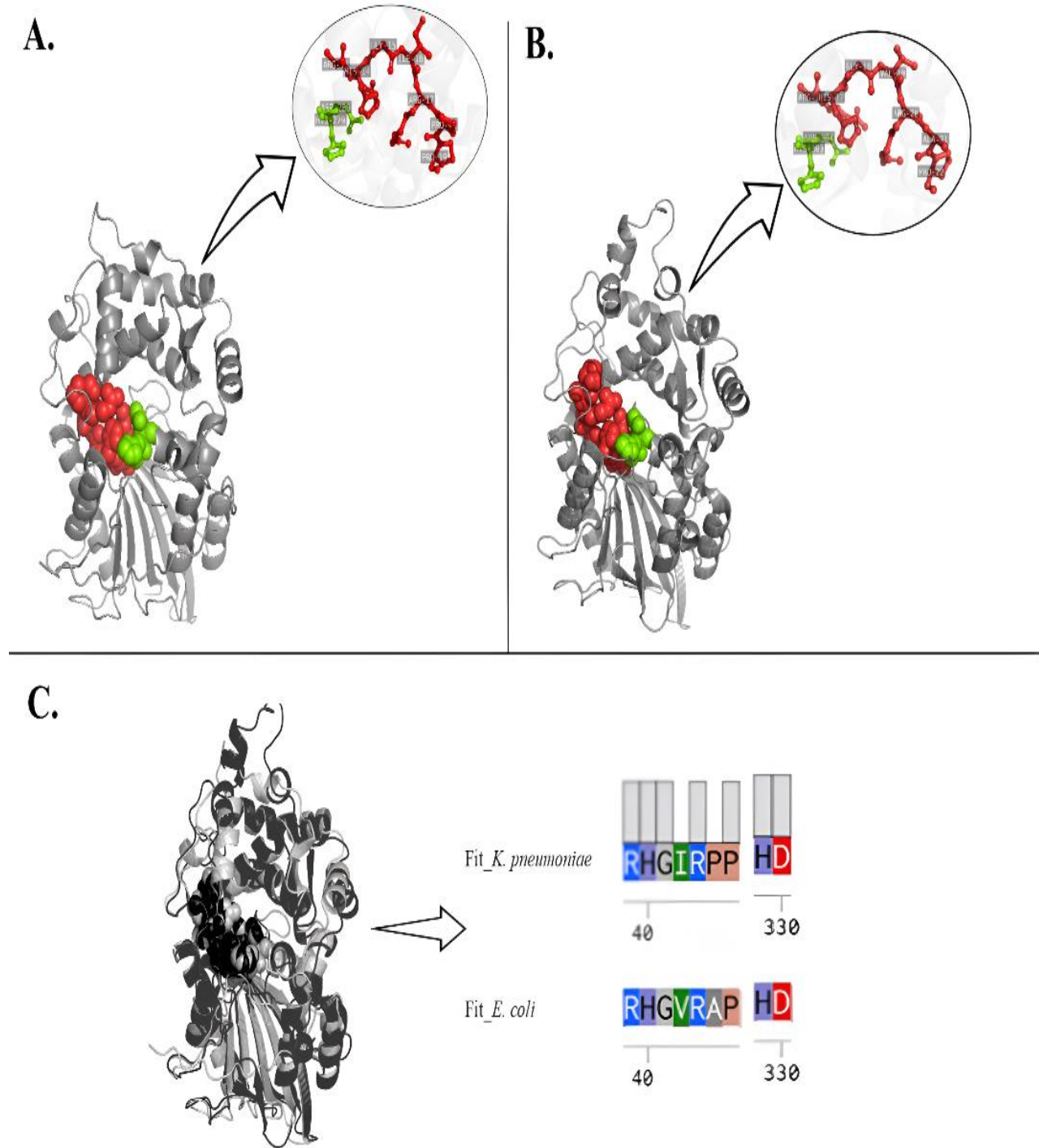
Validación de las estructuras obtenidas en los diferentes servidores

Servidor	Parámetros	Fit_KP	Fit_EC
	Rotámeros pobres (%)	0.62	0
	Rotámeros favorecidos (%)	97.85	99.14
	Ramachandran Outliers (%)	0	0
MolProbity	Ramachandran Favorecidos (%)	97.49	98.55
	Ramachandran Z-score	0.11 ± 0.39	0.01 ± 0.39
	MolProbity Score (percentil)	1.17 (99 th)	1.05 (100 th)
ProSaWeb	Z- score	-9.22	-9.73
Verify3D	% de residuos que tiene en promedio 3D-1DScore>=0.1	90.75	85.58

Finalmente, los modelos tridimensionales fueron visualizados en PyMOL, herramienta que permitió tanto identificar los residuos del sitio activo de ambas fitasas como un alineamiento estructural entre ellas y arrojó un RMSD de 1,558 Å sobre 1.674 átomos. Este valor refleja una alta similitud a nivel estructural, en donde la mayor parte de la cadena se alineó correctamente (Figura 3C).

Figura 3

Modelos 3D de Fit_KP y Fit_EC



Nota: Modelos resultantes de Alphafold 3. A. Modelamiento de la fitasa de *Klebsiella pneumoniae*, señalando su sitio activo. B. Modelamiento de la fitasa de *Escherichia coli* señalando

su sitio activo. C. Superposición de estructuras 3D de los modelos fit_KP (Gris) y fit_EC (Negro) con el alineamiento de los motivos conservados de cada enzima.

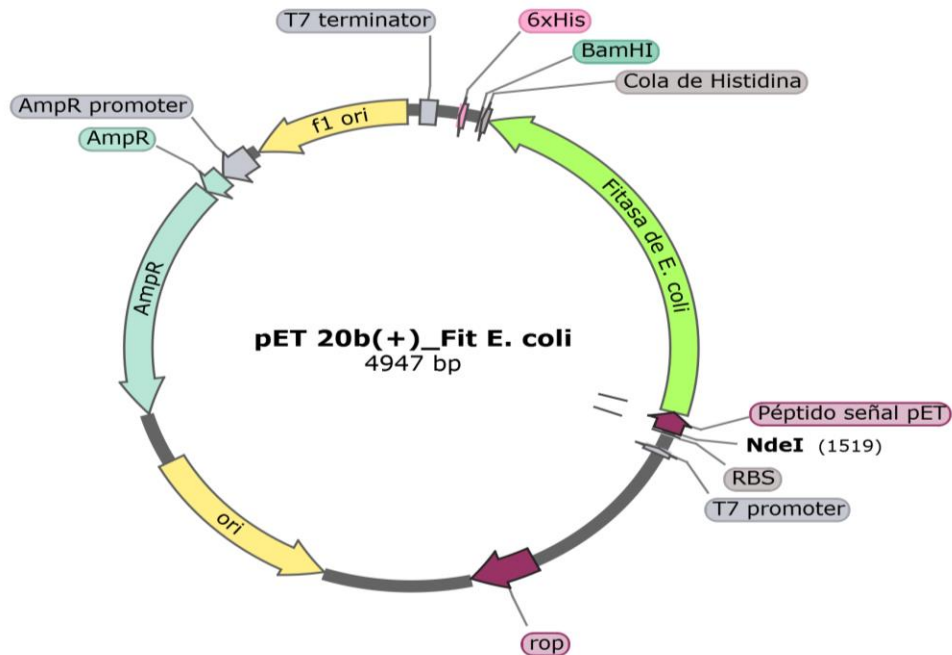
2.3.2 Diseño y construcción del vector de expresión recombinante con el gen Fitasa de *K. pneumoniae* y Fitasa de *E. coli*

En el diseño de los dos constructos plasmídicos, se tuvo en cuenta tomando como referencia una fitasa de *Klebsiella pneumoniae* (RefSeq: WP_225372272), basada en la secuencia resultante del estudio realizado por Maldonado et al. (2024), y la de la fitasa de *Escherichia coli* (PDB: 1DKL; UniProt: P07102). El gen Fit_KP constó de 1272 pb y codifica una proteína de 424 aa. El gen de Fit_EC tuvo 1323 pb y codifica una proteína de 441 aa. Los sitios de clonación fueron *NdeI* y *BamHI*. Como resultado, se obtuvieron dos plásmidos recombinantes: uno con pET-20b(+)_Fit_KP (Figura 4B) y otro con pET-20b(+)_Fit_EC (Figura 4A).

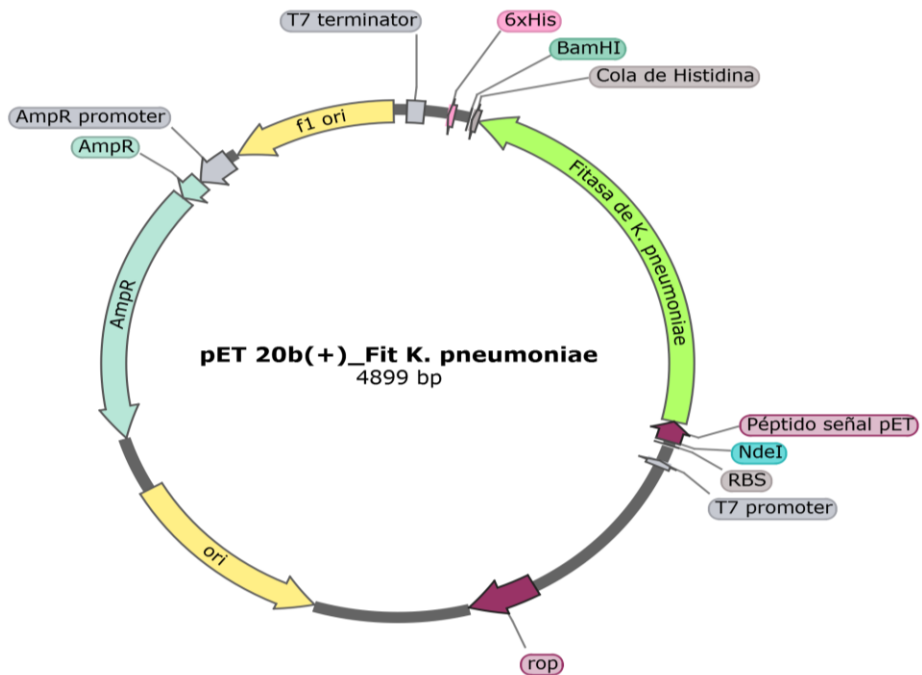
Figura 4

Mapa de los plásmidos recombinantes pET-20b(+)_Fit_KP y pET-20b(+)_Fit_EC

A.



B.



Nota: Los genes de las fitasas están representados en color verde, donde se evidencian elementos como el péptido señal, los sitios de restricción, la etiqueta de histidina y el gen de la resistencia a

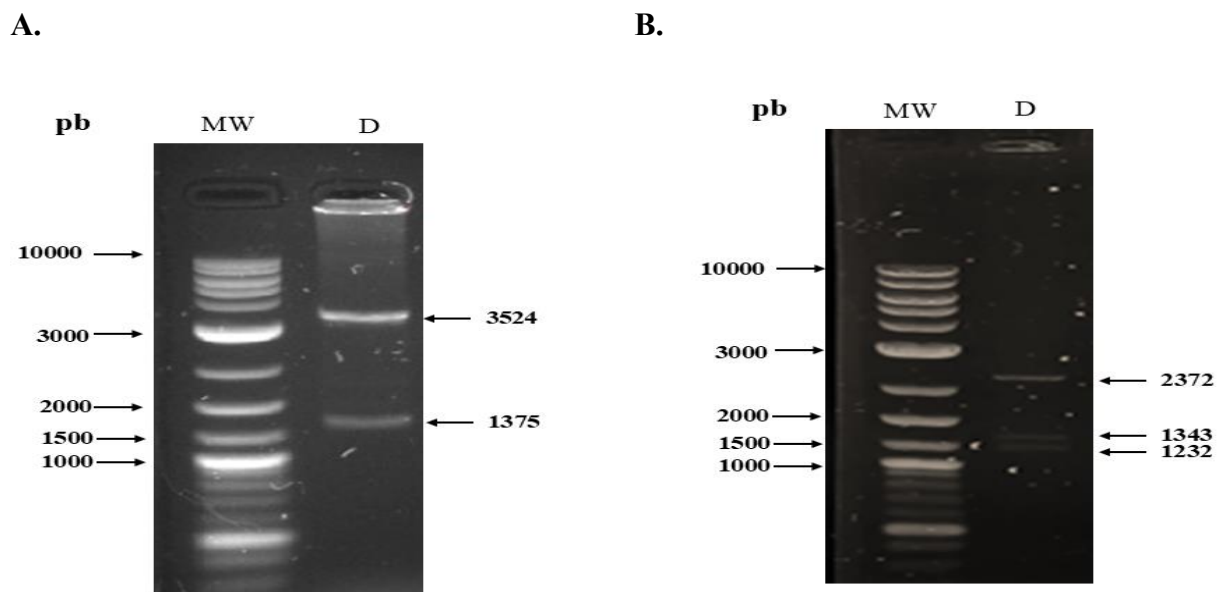
ampicilina. Otros elementos importantes del vector pET-20b(+): como el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación.

2.3.3 Transformación de *E. coli* BL21 (DE3)

Para confirmar la transformación bacteriana se realizó un análisis de restricción para cada uno de los plásmidos recombinantes. Las células con pET-20b(+)_Fit_KP, se digirieron con enzimas *EcoRI* y *BglII*, dando 3 bandas con estos pesos moleculares, de 2372, 1343 y 1232 pb. Por otro lado, el análisis con pET-20b(+)_Fit_EC se digirió con la enzima *BshNI*, la cual permitía la visualización de 2 bandas de 3524 y 1375 pb. Los productos fueron visualizados en un gel de 1% de agarosa (Figura 5), en el que se comprobó que los tamaños estimados del vector y el inserto coinciden con los tamaños reales por la comparación con digestiones *in silico*.

Figura 5

Análisis de restricción de los plásmidos pET-20b(+)_Fit_KP y pET-20b(+)_Fit_EC



Nota: Gel de agarosa al 1%. A. MW marcador de peso molecular; D pET-20b(+)_Fit_KP digerido con *EcoRI* (3524 pb) y *BglII* (1375 pb). B. MW marcador de peso molecular; D pET-20b(+)_Fit_KP digerido con *BshNI* (2372, 1343 y 1232 pb).

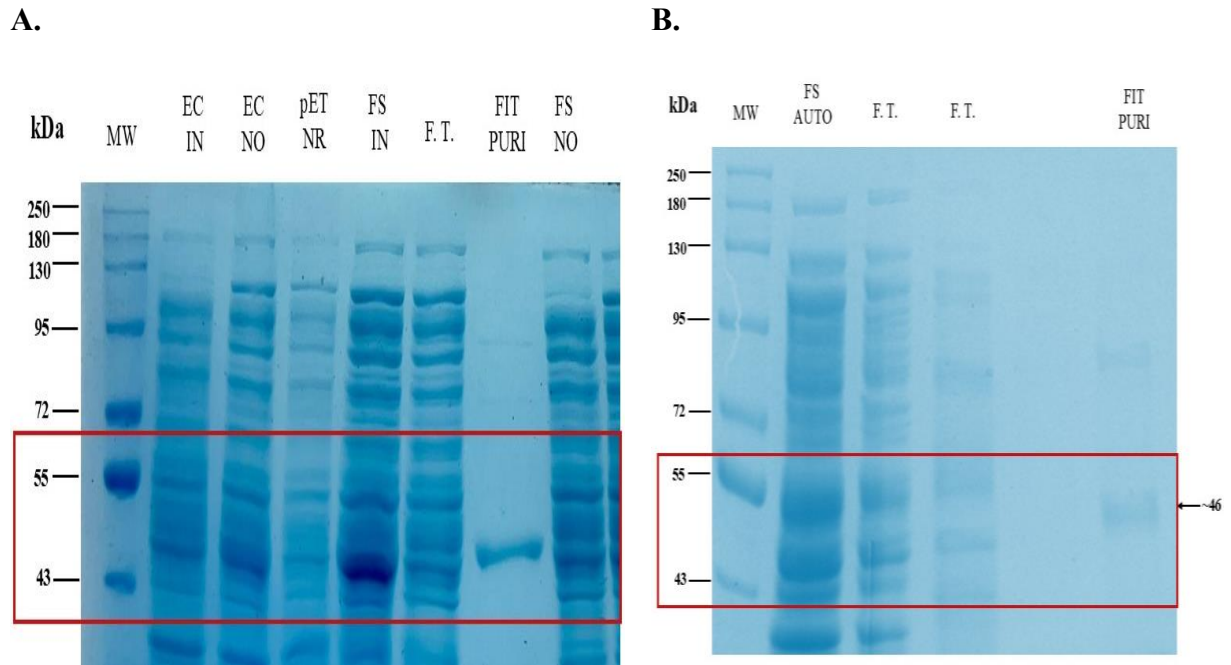
2.3.4 Expresión de la fitasa en *E. coli* BL21(DE3)

La expresión del gen fitasa de *Klebsiella pneumoniae* en BL21(DE3) fue inducida con 0.5 mM IPTG cuando el cultivo alcanzó un OD_{600 nm} de 0.6 durante 16 horas a 30 °C. Al finalizar la expresión, se realizó la lisis celular mediante sonicación y se separaron las fracciones soluble e insoluble mediante centrifugación. La inducción de Fit_KP con IPTG mostró una banda intensa de ~46 kDa en la fracción inducida (FS IN) con respecto a la fracción insoluble no inducida (FS NO) y en el control de vector no recombinante (pET NR) (Figura 6A). Tras la purificación se produjo una banda mayoritaria en ~46 kDa (FIT PURI). Con el medio de autoinducción, la proteína se detectó consistente en FS AUTO y se recuperó como una banda después de la purificación (Figura 6B).

Posteriormente, la inducción de la enzima en las distintas fracciones celulares se confirmó mediante un gel de SDS-PAGE (Figura 6). En las fracciones evaluadas, se identificó la sobreexpresión de una proteína con un peso aproximado de 46 kDa (Figura 6).

Figura 6

*Expresión de la fitasa *K. pneumoniae* y su localización en las fracciones celulares*



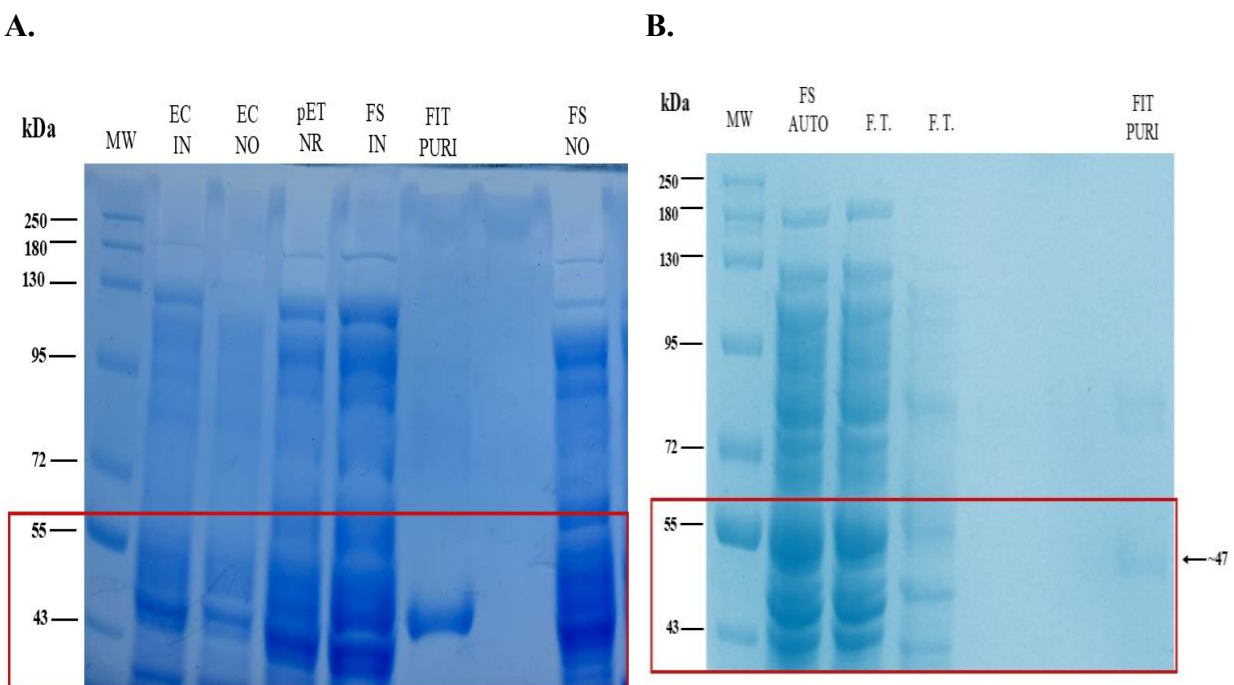
Nota: A. Expresión y purificación de la fitasa recombinante fit_KP usando IPTG, evidencia una banda correspondiente a una proteína de aproximadamente 46 kDa, correspondiendo al tamaño teórico esperado. MW, marcador de peso molecular; EC IN, extracto crudo inducido; EC NO, extracto crudo no inducido; pET NR, vector de expresión pET-20b(+) no recombinante; FS IN, extracto crudo no inducido; pET NR, vector de expresión pET-20b(+) no recombinante; FS IN, fracción soluble inducida; FT, *Flow through* resultante de purificación; FIT PURI, fitasa purificada usando columnas de afinidad *HisTrap FF*; FS NO, fracción soluble no inducida. B. Expresión y purificación de la fitasa recombinante fit_KP usando medio de autoinducción. MW, marcador de peso molecular; FS AUTO, fracción soluble medio autoinducido; FT, *Flow through* resultante de purificación; FIT PURI, fitasa purificada usando columnas de afinidad *HisTrap FF*.

Para Fit_EC, la inducción con IPTG generó una banda esperada de ~47 kDa, pero de baja intensidad en la fracción soluble y sin diferencias claras entre condiciones inducida y no inducida (Figura 7A). En contraste, con la autoinducción, se observó una banda nítida en la fracción soluble

autoinducida (FS AUTO) y una banda mayoritaria en ~ 47 kDa tras la purificación (FIT PURI) (Figura 7B). A cada una de las fracciones resultantes se le midió la actividad fitasa usando el protocolo de Greiner (2004) (Tabla 4).

Figura 7

Expresión de la fitasa E. coli y su localización en las fracciones celulares



Nota: A. Expresión y purificación de la fitasa recombinante fit_EC usando IPTG, evidencia una banda correspondiente a una proteína de aproximadamente 47 kDa, correspondiendo al tamaño teórico esperado. MW, marcador de peso molecular; EC IN, extracto crudo inducido; EC NO, extracto crudo no inducido; pET NR, vector de expresión pET 20b no recombinante; FS IN, fracción soluble inducida; FIT PURI, fitasa purificada usando columnas de afinidad *HisTrap FF*; FS NO, fracción soluble no inducida. B. Expresión y purificación de la fitasa recombinante fit_EC

usando medio de autoinducción. MW, marcador de peso molecular; FS AUTO, fracción soluble medio autoinducido; FT, *Flow through* resultante de purificación; FIT PURI, fitasa purificada usando columnas de afinidad *HisTrap FF*.

Tabla 4

Actividad enzimática de los extractos crudos de Fit_KP (Klebsiella pneumoniae) y Fit_EC (Escherichia coli)

Extracto crudo	Proteína total	Actividad total	Actividad específica
	mg	U	U/mg
Fit_ <i>K. pneumoniae</i>	160	16.5	0.103 (0.007)
Fit_ <i>E. coli</i>	136	17.1	0.126 (0.03)

Nota. Se presentan los valores de proteína total, actividad total y actividad específica (U/mg) de los extractos crudos. Los valores entre paréntesis corresponden al error estándar de la media de las tres réplicas.

2.3.5 Purificación de la proteína recombinante y caracterización de las enzimas

La fracción soluble fue seleccionada para la purificación mediante columnas de afinidad HisTrap FF, mediante el uso de la etiqueta de histidina. Este paso de purificación permitió un enriquecimiento de la actividad fitasa: para Fit_KP se observó un aumento de 211 veces, y para Fit_EC de 228 veces, en comparación con las fracciones solubles respectivas de cada fitasa. Además, se evidenció una mejora notable en las actividades específicas de las enzimas, aumentó de 0.365 U/mg a 77 U/mg para Fit_KP y de 0.31 U/mg a 71.2 U/mg para Fit_EC (Tabla 5). En

términos generales, la fitasa de *K. pneumoniae* mostró una mayor actividad que la fitasa de *E. coli* luego de la purificación.

Tabla 5

Tabla de purificación de las fitasas Fit_K. pneumoniae y Fit_E. coli usando columnas de afinidad

Paso de purificación	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Purificación (n-fold)	Yield (%)
Fit_K. pneumoniae					
F. soluble	31.2	11.4	0.365 (0.07)	1	100
His-trap FF	0.102	7.85	77(4)	211	3.3
Fit_E. coli					
F. soluble	36	11.23	0.31(0.02)	1	100
His-trap FF	0.0768	5.47	71.2 (3)	228	2.1

Nota. Se presentan los valores de proteína total, actividad total, actividad específica, factor de purificación (*n-fold*) y *yield* (%). Los valores entre paréntesis corresponden al error estándar de la media de las tres réplicas.

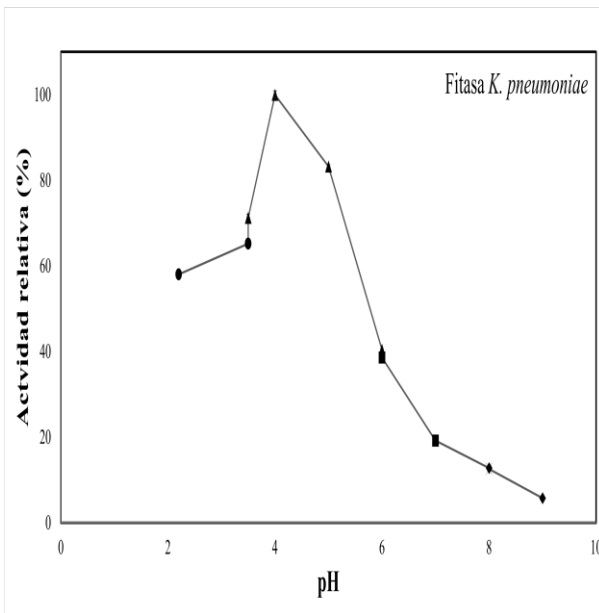
Previo a los ensayos de caracterización, se establecieron para Fit_KP y Fit_EC curvas de actividad (U) - cantidad de proteína (μg) para definir un tramo lineal de respuesta. La cantidad de proteína seleccionada para los ensayos enzimáticos fue de 0.25 μg por reacción. Bajo estas condiciones, se evaluó el efecto del pH sobre la actividad enzimática de Fit_KP y Fit_EC (Figura 7) utilizando diferentes buffers en un rango de pH de 2.2 a 9.0. Fit_KP presentó un pH óptimo de 4.0 y conservó aproximadamente el 60 % de su actividad a pH de 2.2, mientras que, por encima de pH 6.0 se registró una disminución notable en la actividad. Fit_EC, por su parte, también

presentó un pH óptimo de 4.0, con menor tolerancia a pH 2.2 en comparación con Fit_KP; a pH 6.0, conservó el 60 % de la actividad, mientras que a pH básico su actividad disminuyó.

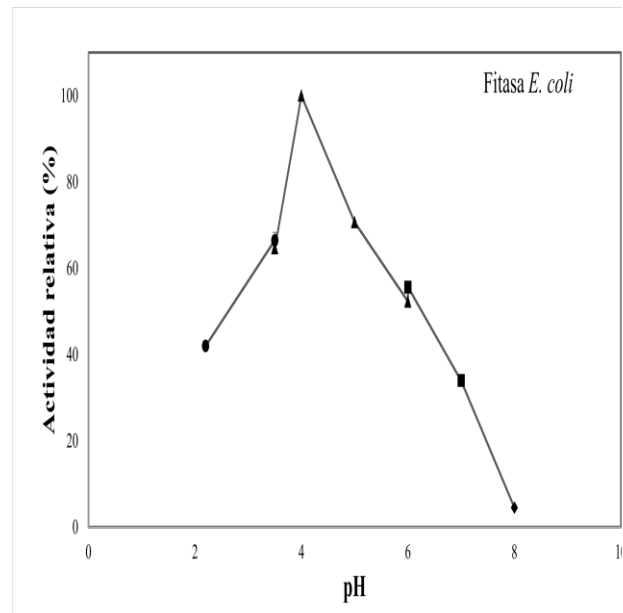
Figura 8

Efecto del pH en la actividad relativa de Fit_K. pneumoniae y Fit_E. coli

A.



B.



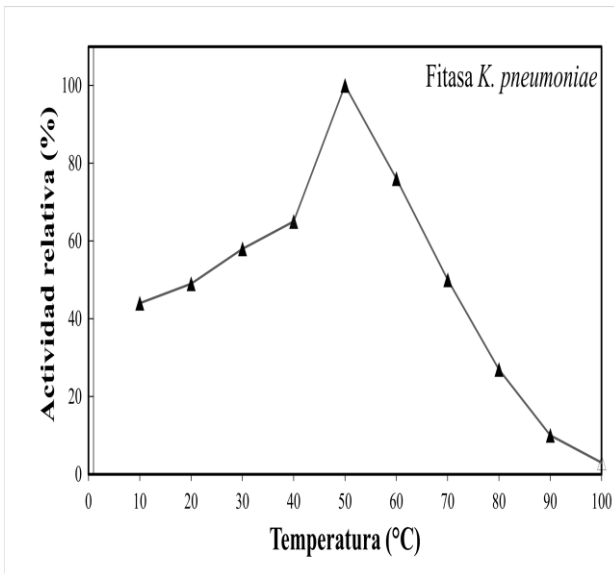
Nota. La medición se realizó en un rango de pH 2.2–9 empleando diferentes buffers. Los valores corresponden a la media de tres réplicas independientes. Buffer Glicina-HCl (●), Buffer Acetato de sodio (▲), Buffer Tris-BASE (■), Buffer Glicina-NaOH (◆).

Dado que ambas enzimas presentaron un pH óptimo de 4.0, se procedió a evaluar el efecto de la temperatura en un rango de 10 °C a 100 °C. En general, los resultados de la actividad relativa frente a la temperatura fueron muy similares entre las dos fitasas, con la diferencia de que Fit_KP alcanzó su temperatura óptima de 50 °C, mientras que la de Fit_EC es de 60 °C (Figura 9).

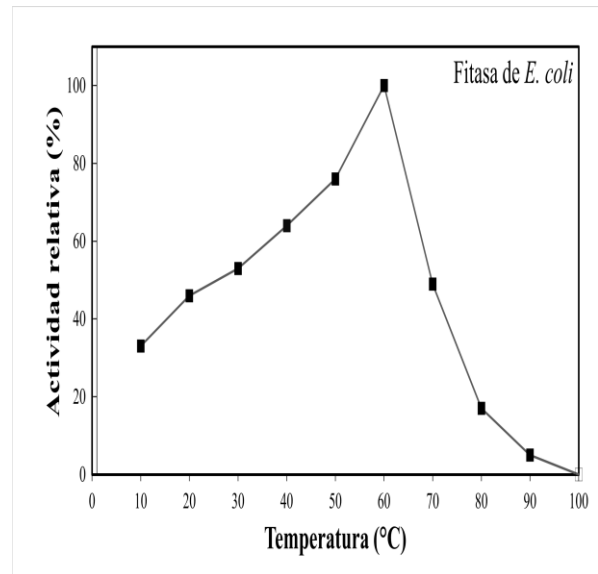
Figura 9

Efecto de la temperatura en la actividad relativa de Fit_K. pneumoniae y Fit_E. coli

A.



B.



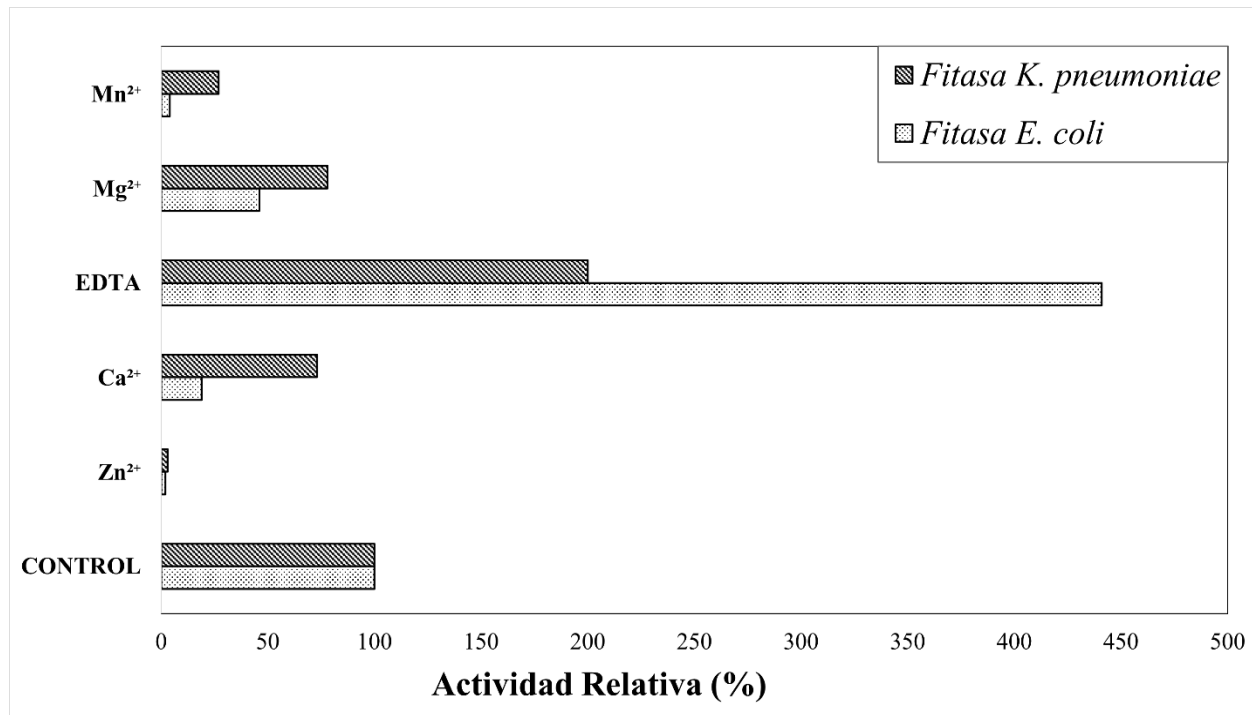
Nota. A) Fitasa de *Klebsiella pneumoniae* (▲). B) Fitasa de *Escherichia coli* (■). La actividad enzimática se evaluó entre 10–100 °C. Los valores corresponden a la media de tres réplicas independientes.

2.3.5.1 Ensayo de iones metálicos, agentes reductores y quelantes

Se evaluó el efecto de diferentes iones metálicos (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) y del agente quelante EDTA sobre la actividad enzimática de Fit_KP y Fit_EC. La mayoría de los iones no incrementaron la actividad relativa de las enzimas. Entre los iones, el Zn^{2+} provocó la mayor inhibición en ambas fitasas, reduciendo su actividad a valores cercanos a cero. Por el contrario, el tratamiento con EDTA resultó en un incremento drástico en la actividad relativa: para Fit_KP aproximadamente del 200% y para Fit_EC un 400% (Figura 9).

Figura 10

Efecto de iones metálicos, agentes reductores y quelantes en la actividad relativa de Fit_K. pneumoniae y Fit_E. coli



Nota. La concentración de los iones metálicos y EDTA fue de 5 mM. La actividad se midió por triplicado bajo las condiciones óptimas de pH y temperatura de cada enzima. ▨ Fitasa de *K. pneumoniae*; ▩ Fitasa de *E. coli*.

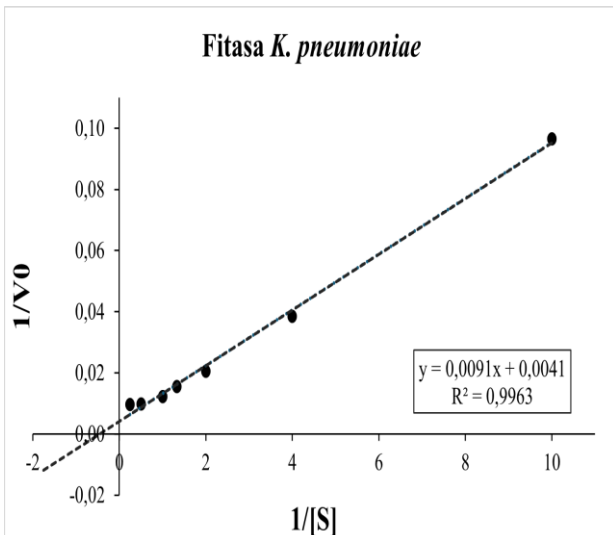
2.3.5.2 Cinética enzimática

Se determinó la cinética enzimática usando como sustrato fitato de sodio a diferentes concentraciones 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 y 4 mM. Para Fit_KP la V_{max} fue de 242 U/mg y el K_m de 2.2 mM, mientras que para la Fit_EC el V_{max} fue 126 U/mg y el K_m de 0.624 mM. Calculadas usando el modelo de linealización de Lineweaver-Burk.

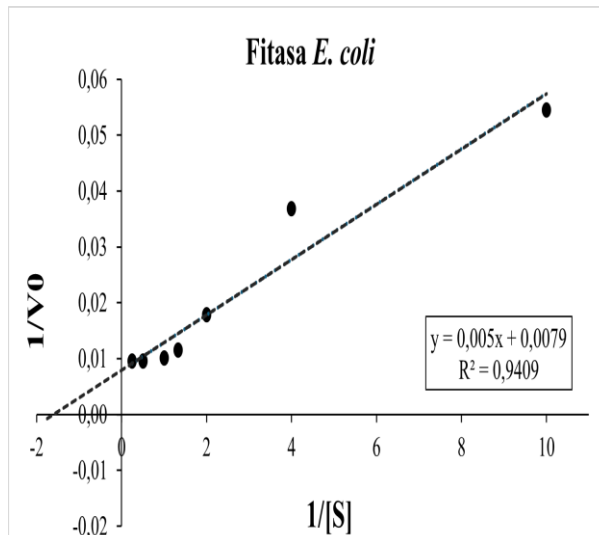
Figura 11

Cinética enzimática de Fit_K. pneumoniae y Fit_E. coli usando el modelo de Lineweaver-Burk

A.



B.



Nota. Linealización de los datos de cinética enzimática bajo el modelo de Lineweaver-Burk para A) Fitasa de *Klebsiella pneumoniae*, B) Fitasa de *Escherichia coli*.

2.4 Discusión

En este estudio se logró identificar las características fisicoquímicas de dos fitasas bacterianas recombinantes: una derivada de *Klebsiella pneumoniae* (Fit_KP) y otra de *Escherichia coli* (Fit_EC), que fue escogida como control. A través de los análisis bioinformáticos se predijeron propiedades fisicoquímicas, motivos conservados y sus estructuras tridimensionales, respaldando que ambas enzimas pertenecen a la familia de las fosfatasas ácidas de histidina (HAP). Posteriormente, las proteínas se expresaron y purificaron para medir la actividad fitasa bajo diferentes condiciones de pH y temperatura, así como la influencia de iones metálicos y agentes quelantes.

El análisis *in silico* predijo que las dos enzimas tenían pesos moleculares entre 46 kDa (Fit_KP) y 48 kDa (Fit_EC), lo que coincidió con los valores reportados para fitasas de *E. coli* (Greiner, R. et al., 1993) y de *K. pneumoniae* (Wang et al., 2004). En cuanto al punto isoeléctrico,

Fit_KP es de 8.98 mientras que Fit_EC es de 6.59, valores muy próximos a los informados por Golovan et al. (2000) y Pramanik et al. (2018) para fitasas de estas especies. La predicción de un péptido señal y su localización periplasmática sugirieron que estas enzimas son exportadas hacia el espacio periplásmico; sin embargo, esta localización no fue verificada experimentalmente mediante fraccionamiento celular.

Las propiedades de estabilidad calculadas *in silico* sugirieron que ambas proteínas son estructuralmente estables. El índice de inestabilidad predicho fue < 40 para las dos enzimas. Por otro lado, el índice alifático resultó ligeramente mayor en Fit_EC (90.73) en comparación con Fit_KP (87.07) (Tabla 1). Esta diferencia podría estar relacionada con la mayor proporción de residuos alifáticos, como alanina e isoleucina, presentes en Fit_EC (Figura 2), ya que, se ha propuesto que un índice alifático elevado contribuye a la termoestabilidad de las proteínas (Ikai, 1980).

Ambas enzimas conservaron el motivo conservado RHGXRXD-HD, característico de la familia HAP (Oh et al., 2003). Este motivo constituye el sitio activo de la enzima y ha sido descrito para la hidrólisis de fitato. Su mecanismo catalítico se divide en dos pasos: primero el residuo de histidina actúa como nucleófilo y ataca al átomo de fósforo del fitato, lo que forma un intermediario fosfo-histidina; y segundo, este intermediario es hidrolizado, liberando el grupo fosfato (Kumar, V. et al., 2012; Mullaney & Ullah, 2007; Vincent et al., 1992).

La predicción estructural mediante AlphaFold 3 mostró pLDDT mayoritariamente > 90 y pTM = 0.95 para Fit_KP y Fit_EC, lo que indicó la consistencia de la posición de la mayoría de los residuos y el pliegue global propuesto para el monómero. La calidad de los modelos generados fue evaluada mediante MolProbity. Observándose porcentajes > 97.5 % en regiones favorecidas de Ramachandran en ambas enzimas, es decir, que ambas estructuras presentan una alta

confiabilidad con los modelos generados. De otra forma concordante, ProSA web arrojó Z-scores de -9.22 y -9.73 dentro del rango típico de proteínas nativas de tamaño similar (Tabla 3). Verify 3D indicó compatibilidad secuencia-estructura a lo largo de la cadena, con 90.75 % y 85.58 % de residuos con 3D-1D score ≥ 0.1 para Fit_KP y Fit_EC. Aunque las dos fitasas pertenecen a la misma familia, la superposición de sus estructuras en PyMOL evidenció diferencias locales en las regiones superficiales y en la conformación del sitio activo.

La expresión heteróloga de Fit_KP en *E. coli* BL21 (DE3) usando IPTG como inductor fue exitosa, evidenciando una banda de aproximadamente 46 kDa consistente con lo descrito por Escobin-Mopera et al. (2012), en donde se observa una clara diferencia de la expresión entre la muestra inducida y no inducida (Figura 6). En contraste, la expresión de Fit_EC en la misma cepa resultó deficiente. Según lo descrito por (Golovan et al., 2000; Rao et al., 2008), inducir con IPTG puede favorecer la formación de cuerpos de inclusión, lo que conduce a un mal plegamiento y agregación de la proteína, resultando en una enzima no funcional. Es por tal razón que posiblemente al usar este tipo de inducción para Fit_EC no se observarán diferencias entre las células inducidas y no inducidas (Figura 7A).

Considerando esa limitación, se prefirió usar una alternativa basada en el medio de autoinducción, el cual se caracteriza por usar lactosa como inductor natural de la expresión (Golovan et al., 2000), siendo además una opción menos costosa. Los resultados obtenidos con esta estrategia mostraron en la fracción soluble una banda robusta aproximada de 47 kDa que podría corresponder a Fit_EC. La presencia de esta banda sugiere una mejora en la inducción de la proteína y su óptimo plegamiento, reflejada en el gel de SDS-PAGE (Figura 7B).

Tras la purificación, mediante cromatografía de afinidad con columnas de HisTrap FF, se obtuvieron enzimas de alta pureza, con un aumento de la actividad específica. En particular,

Fit_KP alcanzó una actividad específica de 77 U/mg y Fit_EC de 71 U/mg después de la purificación, lo que representa aumentos en el *n-fold* de 211 veces para y 228 veces, respectivamente, en comparación con sus fracciones solubles (Tabla 5). Este resultado refleja la eficiencia de implementar las etiquetas de histidina, siendo ampliamente reconocidas por su alta capacidad para obtener proteínas puras. La actividad específica obtenida para Fit_KP (77 U/mg) es notablemente alta, con respecto a lo reportado para la fitasa nativa de *K. pneumoniae* por Maldonado et al. (2024), aproximadamente 2.4 U/mg. Esta diferencia sugiere que la expresión heteróloga en BL21 (DE3) contribuye al aumento de la actividad fitasa, tras el proceso de purificación, favoreciendo la recuperación de una enzima pura y correctamente plegada.

Al comparar la actividad específica de Fit_KP (77 U/mg) y Fit_EC (71 U/mg) con las reportadas por otras fitasas bacterianas y fúngicas como: *Klebsiella oxytoca* 45.3 U/mg (Jareonkitmongkol et al., 1997), *Bacillus sp.* de 16 U/mg (Rao et al., 2008), *Bacillus amyloliquefaciens* 27 U/mg (Boukhris et al., 2015) y fitasas fúngicas como *Aspergillus niger* de 22.59 U/mg (Vats & Banerjee, 2005) resultaron en valores superiores. Cabe destacar que estas comparaciones deben interpretarse con precaución, ya que las condiciones experimentales varían entre estudios (sustrato empleado, el pH y la temperatura, la definición de una unidad enzimática o el nivel de purificación de la proteína). Algunos autores señalan que valores elevados de actividades específicas pueden reflejar la variabilidad en las metodologías empleadas, ya sea por sobreestimación de la concentración de proteína o el uso de protocolos de purificación más extensos que combinan técnicas de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica o de alta resolución (Escobin-Mopera et al., 2012; Golovan et al., 2000; Greiner, R. et al., 1993; Rodriguez et al., 1999; Wang et al., 2004). En este estudio, las mediciones

se realizaron bajo condiciones estandarizadas, lo que asegura que Fit_KP y Fit_EC contrastan de forma equitativa, al menos en términos de actividad específica.

El análisis del pH reveló que tanto Fit_KP como Fit_EC presentan un pH óptimo de 4.0 (Figura 8). Fit_KP mantuvo el 60 % y Fit_EC el 40 % de su actividad a pH 2.2. En contraste, por lo descrito por Escobin-Mopera (2012), Golovan (2000) y Greiner (1993), que reportaron que a pH 2.2 la actividad se encontraba por debajo del 20 %. Sin embargo, en condiciones de pH neutro, Fit_KP perdió cerca del 80% de su actividad. El hecho de que ambas enzimas tengan un pH óptimo de 4.0, les otorga una ventaja funcional para su implementación como suplemento en la nutrición de animales monogástricos, debido a que el estómago es el principal sitio funcional de la fitasa suplementaria (Lei, X. G. & Stahl, 2001).

En cuanto al efecto de la temperatura, Fit_KP alcanzó una actividad máxima a 50 °C, mientras que Fit_EC lo hizo a 60 °C (Houshyar et al., 2024) (Figura 9). Estos valores se ubican dentro del rango conocido de las HAP (Oh et al., 2003). Las fitasas de *Bacillus* son las que se caracterizan por soportar altas temperaturas (Borgi et al., 2014; Boukhris et al., 2015). La diferencia de 10 °C entre Fit_KP y Fit_EC probablemente refleja algunas diferencias estructurales que afectan la termoestabilidad. De hecho, estudios señalan que usando técnicas como mutaciones sitio dirigidas para la formación de puentes disulfuro mejora la termoestabilidad de la fitasa (Lim et al., 2000; Xing et al., 2023).

El efecto de los iones metálicos y de los agentes quelantes sobre la actividad enzimática mostró respuestas contrastantes entre Fit_KP y Fit_EC (Figura 10). En ambos casos, la adición de Zn^{2+} provocó una inhibición casi total de la actividad, lo cual coincide con lo que se ha descrito en otras fitasas bacterianas y fúngicas, donde este ion interfiere directamente con el sitio activo o con la unión enzima-sustrato (Rao et al., 2008). Un hallazgo llamativo fue la fuerte estimulación de la

actividad cuando las proteínas se trataron con EDTA, ya que para Fit_KP se incrementó hasta un 200 % y la de Fit_EC cerca de un 400 % con respecto a la muestra control sin la presencia de iones. Este comportamiento aparente de actividad con EDTA debe interpretarse con cautela, ya que puede ser explicado porque el EDTA, al secuestrar los metales, mejora la disponibilidad del fitato, eliminando inhibidores y evitando la formación de complejos metal-fitato que reducen la disponibilidad del sustrato libre (Wang et al., 2004; Wyss et al., 1999). No obstante, cabe considerar que el EDTA podría estar interfiriendo con el método colorimétrico de detección de fósforo libre. Nuestros ensayos incluyeron blancos con EDTA para restar posibles interferencias en las mediciones, pero sería recomendable dializar la enzima para repetir el experimento y utilizar un método alternativo de cuantificación de fósforo inorgánico. Por otro lado, la adición de Ca^{2+} no se observó diferencias respecto al control, sugiriendo que el mecanismo catalítico de Fit_KP y Fit_EC no requiere a Ca^{2+} , en comparación con fitasas como la de *Bacillus*, donde la actividad y estabilidad estructural dependen estrechamente de este ion (Rao et al., 2008).

Este estudio presenta ciertas limitaciones principales que definen líneas claras para un trabajo futuro. En primer lugar, la cuantificación de fosfato mediante el ensayo colorimétrico basado en la formación del complejo fosfo-molibdato puede verse afectada por las interferencias por agentes quelantes como EDTA u otros iones; aunque se incluyeron en el ensayo blancos con EDTA, es importante repetir la medición con un método alternativo no sensible a quelantes y dializar. También, los perfiles de pH y temperatura describen solo óptimos instantáneos, es decir, no se evalúa la estabilidad temporal. Es necesario implementar incubaciones o curvas de inactivación para determinar la resistencia a la exposición prolongada a condiciones extremas. Finalmente, la localización periplásmica se infirió *in silico* pero no se demostró experimentalmente

con las fracciones resultantes. Se propone usar un método de lisis como choque osmótico, ideal para extraer el contenido periplasmático y verificar mediante un gel SDS-PAGE.

3. Conclusiones

Este estudio integró de manera coherente el análisis *in silico* y la caracterización *in vitro* para evaluar dos fitasas bacterianas recombinantes: Fit_KP (*Klebsiella pneumoniae*) y Fit_EC (*E. coli*). Los análisis computacionales confirmaron que ambas pertenecen a la familia de fosfatasas ácidas de histidina (HAP), con la señal de exportación y modelos estructurales consistentes. También se logró expresar las proteínas en el sistema de vector pET-20b(+)/BL21(DE3), implementando dos métodos de inducción. La purificación mediante columnas de afinidad HisTrap FF permitió recuperar enzimas con alta pureza y un aumento en la actividad específica con respecto a la fitasa control (Fit_EC).

La caracterización bioquímica evidenció un pH óptimo ácido (4.0) y una temperatura óptima de 50 °C, parámetros importantes que vuelven a la fitasa de *K. pneumoniae* adecuada en la nutrición animal. Los ensayos con iones revelaron inhibición por Zn^{2+} y un incremento aparente de la actividad con EDTA. Este último hallazgo requiere de una verificación metodológica futura.

En conjunto, ambas enzimas se perfilan como candidatas viables para aplicaciones biotecnológicas. Sin embargo, se recomienda: (i) confirmar la localización periplásmica y optimizar la expresión de la proteína; (ii) evaluar la estabilidad a largos periodos de tiempo bajo pH y temperaturas extremas; (iii) repetir la cuantificación de fosfato con un método alternativo sin interferencia con agentes quelantes; y (iv) explorar ingeniería de proteínas orientada a reforzar la termoestabilidad y afinidad.

Referencias Bibliográficas

- Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Ronneberger, O., Willmore, L., Ballard, A. J., Bambrick, J., Bodenstein, S. W., Evans, D. A., Hung, C., O'Neill, M., Reiman, D., Tunyasuvunakool, K., Wu, Z., Žemgulytė, A., Arvaniti, E., . . . Jumper, J. M. (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, 630(8016), 493–500. 10.1038/s41586-024-07487-w
- Acquistapace, I. M., Thompson, E. J., Kühn, I., Bedford, M. R., Brearley, C. A., & Hemmings, A. M. (2022a). *Insights to the structural basis for the stereospecificity of the Escherichia coli phytase, AppA*. MDPI AG. 10.3390/ijms23116346
- Benchling. (2023). Benchling [Biology software]. <https://benchling.com>
- Blum, M., Andreeva, A., Florentino, L. C., Chuguransky, S. R., Grego, T., Hobbs, E., Pinto, B. L., Orr, A., Paysan-Lafosse, T., Ponamareva, I., Salazar, G. A., Bordin, N., Bork, P., Bridge, A., Colwell, L., Gough, J., Haft, D. H., Letunic, I., Llinares-López, F., . . . Bateman, A. (2025). *InterPro: The protein sequence classification resource in 2025*. Oxford University Press (OUP). 10.1093/nar/gkae1082
- Böhm, K., Herter, T., Müller, J. J., Borriss, R., & Heinemann, U. (2010). *Crystal structure of Klebsiella sp. ASR1 phytase suggests substrate binding to a preformed active site that meets the requirements of a plant rhizosphere enzyme*. Wiley. 10.1111/j.1742-4658.2010.07559.x
- Bomans, E., Fransen, K., Gobin, A., Mertens, J., Michiels, P., Vandenriessche, H., & Vogels, N. (2005). Addressing phosphorus-related problems in farm practice. *Final Report to the European Commission, DG Environment, 21*, 2005.

- Borgi, M. A., Khila, M., Boudebbouze, S., Aghajari, N., Szukala, F., Pons, N., Maguin, E., & Rhimi, M. (2014). Erratum to: The attractive recombinant phytase from *Bacillus licheniformis*: Biochemical and molecular characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(13), 6161. 10.1007/s00253-014-5845-x
- Boukhris, I., Farhat-Khemakhem, A., Blibech, M., Bouchaala, K., & Chouayekh, H. (2015a). Characterization of an extremely salt-tolerant and thermostable phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* US573. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 581–587. 10.1016/j.ijbiomac.2015.07.014
- Castillo Villamizar, G. A., Nacke, H., Boehning, M., Herz, K., & Daniel, R. (2019). Functional metagenomics reveals an overlooked diversity and novel features of soil-derived bacterial phosphatases and phytases. *mBio*, 10(1), e01966–18. 10.1128/mBio.01966-18
- Chen, V. B., Arendall, W. B. 3., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2010). MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 66(Pt 1), 12–21. 10.1107/S09074444909042073
- Cosgrove, D. J. (1966). Synthesis of the hexaphosphates of myo-, scyllo-, neo-, and D-inositol. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 17(12), 550–554. 10.1002/jsfa.2740171206
- Dahiya, S., Singh, N., & Rana, J. S. (2009). Optimization of growth parameters of phytase-producing fungus using RSM. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 68(11), 955.
- Dodds, W., & Whiles, M. (2010). Nitrogen, sulfur, phosphorus, and other nutrients. (pp. 345–373)10.1016/B978-0-12-374724-2.00014-3

- Dost, K., & Tokul, O. (2006). Determination of phytic acid in wheat and wheat products by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 558(1), 22–27. 10.1016/j.aca.2005.11.035
- Druzijanic, A., Kovic, M., Roguljic, M., Cigic, L., Majstorovic, M., & Vucenik, I. (2023). Application of Inositol Hexaphosphate and Inositol in Dental Medicine: An Overview. *Biomolecules*, 13(6), 913. 10.3390/biom13060913
- Eisenberg, D., Luethy, R., & Bowie, J. (1997). VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods in Enzymology*, 277, 396–404. 10.1016/S0076-6879(97)77022-8
- Escobin-Mopera, L., Ohtani, M., Sekiguchi, S., Sone, T., Abe, A., Tanaka, M., Meevootisom, V., & Asano, K. (2012). *Purification and characterization of phytase from Klebsiella pneumoniae 9-3B*. Elsevier BV. 10.1016/j.jbiosc.2011.12.010
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In J. M. Walker (Ed.), *The proteomics protocols handbook* (pp. 571–607). Humana Press. 10.1385/1-59259-890-0:571
- Gholizade, M., Nassiry, M. R., Saberi, M. R., & Haddad-Mashadrizeh, A. A. (2018). Bioinformatics analysis of upstream region and protein structure of fungal phytase gene. *Archives of Razi Institute*, 73(3), 229–237. 10.22092/ari.2017.109655.1115
- Golovan, S., Wang, G., Zhang, J., & Forsberg, C. W. (2000). *Characterization and overproduction of the Escherichia coli appA-encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities*. Canadian Science Publishing. 10.1139/w99-084

- Greiner, R., Konietzny, U., & Jany, K. D. (1993). Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303(1), 107–113. 10.1006/abbi.1993.1261
- Greiner, R. (2004). Purification and properties of a phytate-degrading enzyme from *Pantoea agglomerans*. *The Protein Journal*, 23(8), 567–576. 10.1007/s10930-004-7883-1
- Greiner, R., & Konietzny, U. (2012). Update on characteristics of commercial phytases. *Int Phytase Summit*, 96–107.
- Guruprasad, K., Reddy, B. V., & Pandit, M. W. (1990). Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: A novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering*, 4(2), 155–161. 10.1093/protein/4.2.155
- Haefner, S., Knietzsch, A., Scholten, E., Braun, J., Lohscheidt, M., & Zelder, O. (2005). Biotechnological production and applications of phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(5), 588–597. 10.1007/s00253-005-0005-y
- Houshyar, M., Saki, A. A., Alikhani, M. Y., Bedford, M. R., Soleimani, M., & Kamarehei, F. (2024). Characterization of recombinant phytase of *Klebsiella sp.* and the influence of novel 3-phytase on mineral solubility in broiler diets under an *in vitro* digestion assay. *Protein Expression and Purification*, 220, 106489. 10.1016/j.pep.2024.106489
- Hussin, A. S. M., Farouk, A., Greiner, R., Salleh, H. M., & Ismail, A. F. (2007). Phytate-degrading enzyme production by bacteria isolated from Malaysian soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 23(12), 1653–1660. 10.1007/s11274-007-9412-9
- Ikai, A. (1980). Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *Journal of Biochemistry*, 88(6), 1895–1898.

- Jareonkitmongkol, S., Ohya, M., Watanabe, R., Takagi, H., & Nakamori, S. (1997). Partial purification of phytase from a soil isolate bacterium, *Klebsiella oxytoca* MO-3. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83(4), 393–394.
- Johnson, K. A., & Goody, R. S. (2012). *The original Michaelis constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten paper*. American Chemical Society (ACS). 10.1021/bi201284u
- Kim, Y., Kim, H., Bae, K., Yu, J., & Oh, T. (1998). Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(1), 2–7. 10.1016/S0141-0229(97)00096-3
- Konietzny, U., & Greiner, R. (2004). Bacterial phytase: Potential application, in vivo function, and regulation of its synthesis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35
- Kumar, A., & Chordia, N. (2017). Role of bioinformatics in biotechnology. *Res Rev Biosci*, 12(1), 116.
- Kumar, V., Sangwan, P., Verma, A. K., & Agrawal, S. (2014). *Molecular and biochemical characteristics of recombinant β -propeller phytase from *Bacillus licheniformis* strain PB-13 with potential application in aquafeed*. Springer Science and Business Media LLC. 10.1007/s12010-014-0871-9
- Kumar, V., Singh, D., Sangwan, P., & Gill, P. K. (2015). Management of environmental phosphorus pollution using phytases: Current challenges and future prospects. In G. Kaushik (Ed.), *Applied environmental biotechnology: Present scenario and future trends* (pp. 97–114). Springer India. 10.1007/978-81-322-2123-4_7
- Kumar, V., Singh, G., Verma, A. K., & Agrawal, S. (2012). *In Silico Characterization of histidine acid phytase sequences*. Hindawi Limited. 10.1155/2012/845465

- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105–132. 10.1016/0022-2836(82)90515-0
- Lei, X. G., & Stahl, C. H. (2001). Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(4), 474–481. 10.1007/s002530100795
- Lei, X. G., Weaver, J. D., Mullaney, E., Ullah, A. H., & Azain, M. J. (2013). Phytase, a new life for an "old" enzyme. *Annual Review of Animal Biosciences*, 1, 283–309. 10.1146/annurev-animal-031412-103717
- Lei, X., Porres, J., Mullaney, E., & Brinch-Pedersen, H. (2007). Phytase: Source, structure, and application. (pp. 505–529)10.1007/1-4020-5377-0_29
- Lim, D., Golovan, S., Forsberg, C. W., & Jia, Z. (2000). Crystal structures of *Escherichia coli* phytase and its complex with phytate. *Nature Structural Biology*, 7(2), 108–113. 10.1038/72371
- Lineweaver, H., & Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56(3), 658–666. 10.1021/ja01318a036
- Lopez, H. W., Leenhardt, F., Coudray, C., & Remesy, C. (2002). Minerals and phytic acid interactions: Is it a real problem for human nutrition? *International Journal of Food Science and Technology*, 37(7), 727–739. 10.1046/j.1365-2621.2002.00618.x
- Maldonado-Pava, J., Tapia-Perdomo, V., Estupinan-Cardenas, L., Puentes-Cala, E., & Castillo-Villamizar, G. A. (2024). Exploring the biotechnological potential of novel soil-derived *Klebsiella sp.* and *Chryseobacterium sp.* strains using phytate as sole carbon source. Frontiers Media SA. 10.3389/fbioe.2024.1426208

- Mallin, M. A., & Cahoon, L. B. (2003). Industrialized animal Production—A major source of nutrient and microbial pollution to aquatic ecosystems. *Population and Environment*, 24(5), 369–385. 10.1023/A:1023690824045
- Mullaney, E. J., & Ullah, A. (2007). Phytases: Attributes, catalytic mechanisms and applications. *CABI*, 97–110. 10.1079/9781845931520.0097
- Nacke, H., & Daniel, R. (2013). Approaches in metagenome research: Progress and challenges. In K. E. Nelson (Ed.), *Encyclopedia of metagenomics* (pp. 1–7). Springer New York. 10.1007/978-1-4614-6418-1_790-3
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., & von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*, 10(1), 1–6. 10.1093/protein/10.1.1
- Oh, B., Choi, W., Park, S., Kim, Y., & Oh, T. (2003). *Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases*. Springer Science and Business Media LLC. 10.1007/s00253-003-1345-0
- Pramanik, K., Pal, P., Soren, T., Mitra, S., Ghosh, P. K., Sarkar, A., & Maiti, T. K. (2018). *In silico* structural, functional and phylogenetic analysis of *Klebsiella* phytases. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 27(3), 362–372. 10.1007/s13562-018-0445-y
- Rao, D. E. C. S., Rao, K. V., & Reddy, V. D. (2008). Cloning and expression of the *Bacillus* phytase gene (phy) in *Escherichia coli* and recovery of the active enzyme from inclusion bodies. *Journal of Applied Microbiology*, 105(4), 1128–1137. 10.1111/j.1365-2672.2008.03833.x
- Reddy, N. R., Sathe, S. K., & Salunkhe, D. K. (1982). Phytates in legumes and cereals. *Advances in Food Research*, 28, 1–92. 10.1016/s0065-2628(08)60110-x

- Rodriguez, E., Han, Y., & Lei, X. G. (1999). Cloning, sequencing, and expression of an *Escherichia coli* Acid phosphatase/phytase gene (appA2) isolated from pig colon. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 257(1), 117–123. 10.1006/bbrc.1999.0361
- Roopesh, K., Ramachandran, S., Nampoothiri, K. M., Szakacs, G., & Pandey, A. (2006). Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid-state fermentation by *mucor racemosus*. *Bioresource Technology*, 97(3), 506–511. 10.1016/j.biortech.2005.02.046
- Ruttenberg, K. C. (2014). *The global phosphorus cycle*. Elsevier. 10.1016/b978-0-08-095975-7.00813-5
- Sajidan, A., Farouk, A., Greiner, R., Jungblut, P., Müller, E., & Borriss, R. (2004). Molecular and physiological characterisation of a 3-phytase from soil bacterium *klebsiella* sp. ASR1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(1), 110–118. 10.1007/s00253-003-1530-1n
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning : A laboratory manual* (2nd ed.). Cols Spring Harbor Laboratory Press.
- Sapna, Singh, B., Singh, D., & Sharma, K. K. (2013). Microbial phytases in the skirmishing and management of environmental phosphorus pollution. In R. C. Kuhad, & A. Singh (Eds.), *Biotechnology for environmental management and resource recovery* (pp. 239–260). Springer India. 10.1007/978-81-322-0876-1_13
- Scheers, N., Sandberg, A. S., Kragten, S. A., Becker, P., Bedford, M., Brearley, C., Caldwell, R., Duliński, R., Flanagan, S., Graham, H., Greiner, R., Gutzwillern, A., Harland, B., Hill, G., Jones, R., Józefiak, D., Jozeia, D., Konietzny, U., Letourneau-Montminy, M. P., . . . Zyla,

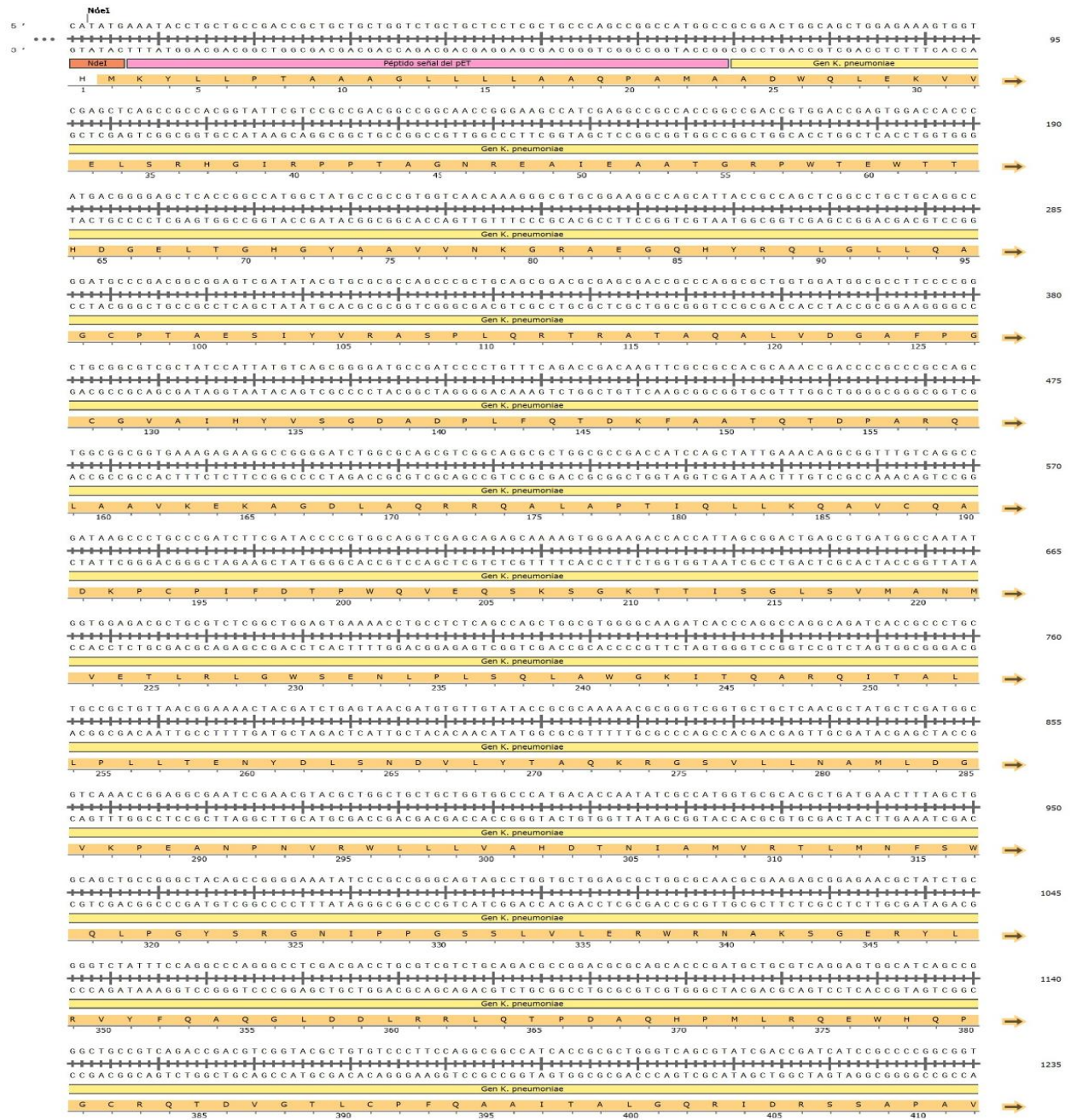
- K. (2015). *Usefulness of microbial phytases to improve zinc and iron bioavailability* 10.13140/RG.2.1.1192.6242
- Schrodinger, L. (2015). *The AxPyMOL molecular graphics plugin for microsoft PowerPoint Version~1.8*. Unpublished manuscript.
- Shivange, A. V., Serwe, A., Dennig, A., Roccatano, D., Haefner, S., & Schwaneberg, U. (2012). Directed evolution of a highly active *Yersinia mollaretii* phytase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(2), 405–418. 10.1007/s00253-011-3756-7
- Stewart, W. M., Hammond, L. L., & Van Kauwenbergh, S. J. (2005). Phosphorus as a natural resource. *Phosphorus: Agriculture and the environment* (pp. 1–22) 10.2134/agronmonogr46.c1
- Studier, F. W. (2005). *Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures*. Elsevier BV. 10.1016/j.pep.2005.01.016
- Teufel, F., Almagro Armenteros, J. J., Johansen, A. R., Gíslason, M. H., Pihl, S. I., Tsirigos, K. D., Winther, O., Brunak, S., Von Heijne, G., & Nielsen, H. (2022). *SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models*. Springer Science and Business Media LLC. 10.1038/s41587-021-01156-3
- Tyagi, P. K., Tyagi, P. K., & Verma, S. (1998). Phytate phosphorus content of some common poultry feedstuffs. *Indian Journal of Poultry Science*, 33(1), 86–88.
- Valsami-Jones, E. (2005). *Phosphorus in environmental technology: Principles and applications*. IWA Publishing. 10.2166/9781780402758
- Vats, P., & Banerjee, U. C. (2005). Biochemical characterisation of extracellular phytase (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase) from a hyper-producing strain of *Aspergillus*

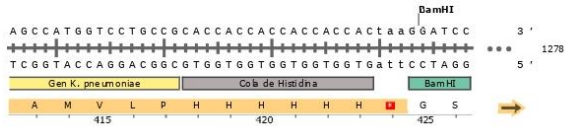
- niger* van teighem. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(4), 141–147.
10.1007/s10295-005-0214-5
- Vincent, J. B., Crowder, M. W., & Averill, B. A. (1992a). Hydrolysis of phosphate monoesters: A biological problem with multiple chemical solutions. *Trends in Biochemical Sciences*, 17(3), 105–110. 10.1016/0968-0004(92)90246-6
- Vincent, J. B., Crowder, M. W., & Averill, B. A. (1992b). Hydrolysis of phosphate monoesters: A biological problem with multiple chemical solutions. *Trends in Biochemical Sciences*, 17(3), 105–110. 10.1016/0968-0004(92)90246-6
- Wang, X., Upatham, S., Panbangred, W., Isarangkul, D., Summpunn, P., Wiyakrutta, S., & Meevootisom, V. (2004). *Purification, characterization, gene cloning, and sequence analysis of a phytase from Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae XY-5*
- Westheimer, F. H. (1987). Why nature chose phosphates. *Science (New York, N.Y.)*, 235(4793), 1173–1178. 10.1126/science 2434996
- Wiederstein, M., & Sippl, M. J. (2007). *ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins*. Oxford University Press (OUP).
10.1093/nar/gkm290
- Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Rémy, R., Fimbel, R., Oesterhelt, G., Lehmann, M., & van Loon, A. P. (1999). Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): Catalytic properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 367–373. 10.1128/AEM.65.2.367-373.1999
- X., L., & C., S. (2001). *Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection*. Springer Science and Business Media LLC.
10.1007/s002530100795

- Xin, G., Lei, Porres, J. M., Mullaney, E. J., & Brinch-Pedersen, H. *Phytase: Source, structure and application*
- Xing, H., Wang, P., Yan, X., Yang, Y., Li, X., Liu, R., & Zhou, Z. (2023). *Thermostability enhancement of Escherichia coli phytase by error-prone polymerase chain reaction (epPCR) and site-directed mutagenesis*. *Frontiers Media SA*. 10.3389/fbioe.2023.1167530
- Yao, M., Zhang, Y., Lu, W., Hu, M., Wang, W., & Liang, A. (2012). *Phytases: Crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications*. *Journal of Applied Microbiology*, 112(1), 1–14. 10.1111/j.1365-2672.2011.05181.x

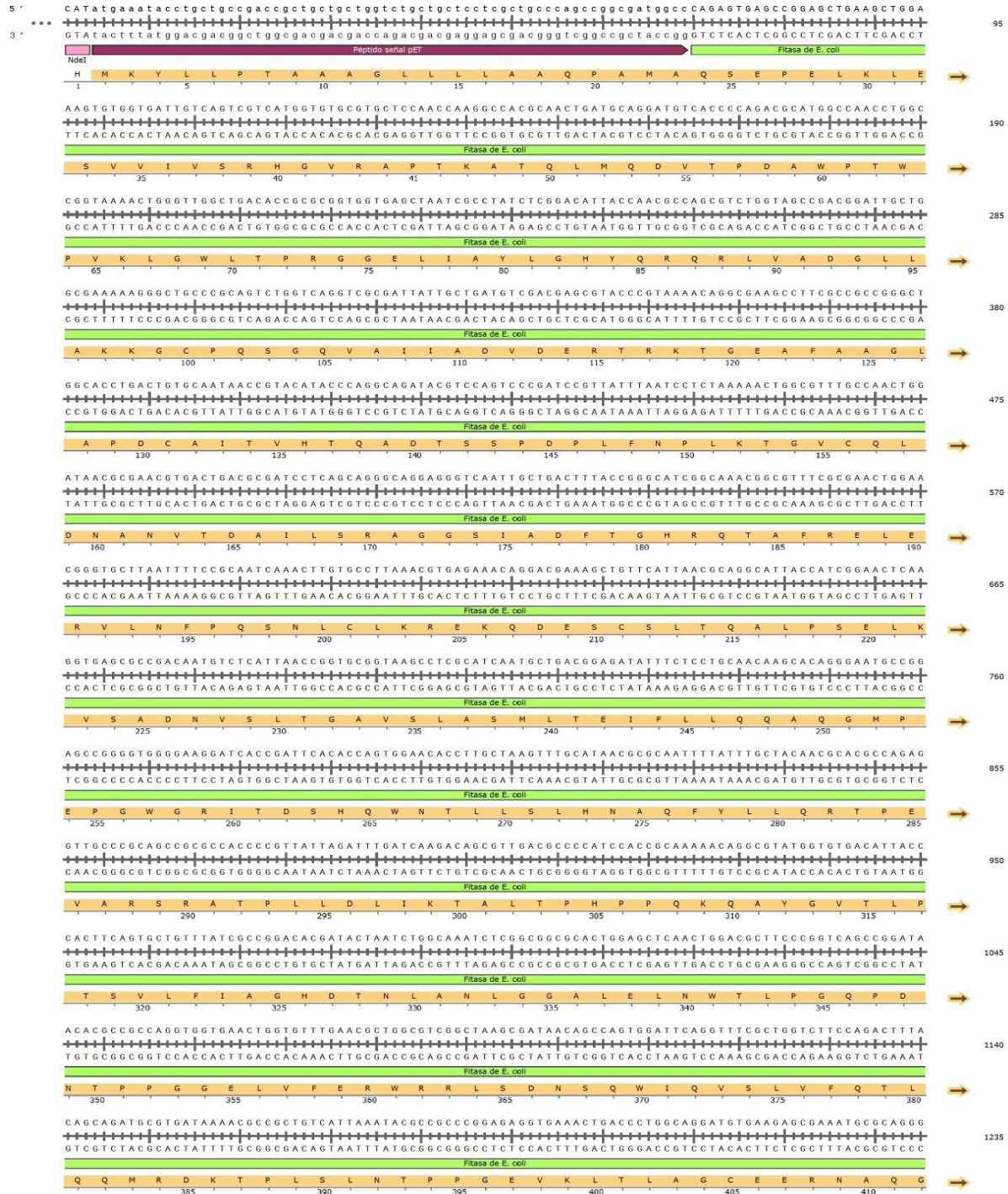
Apéndices

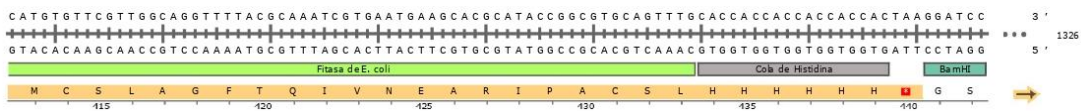
Apéndice A. Gen de la fitasa de *K. pneumoniae*





Apéndice B. Gen de la fitasa de *Escherichia coli*

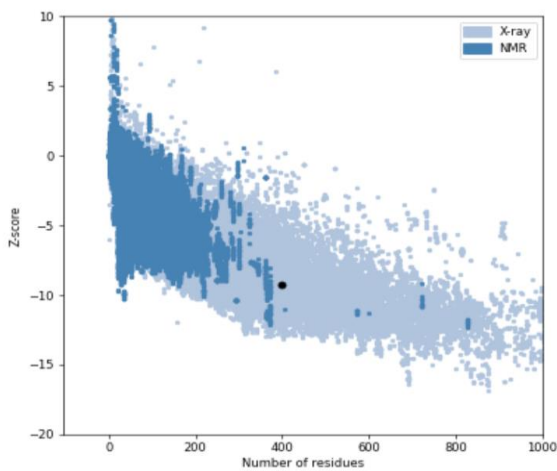




Apéndice C. Validación de los modelos resultantes de Fit_KP y Fit_EC, mediante las herramientas ProSA web

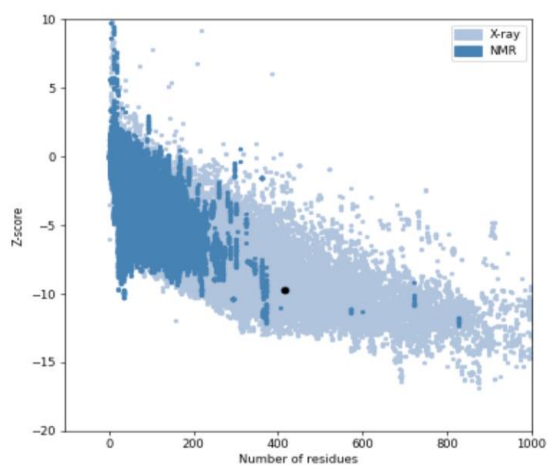
A.

Z-Score: **-9.22**



B.

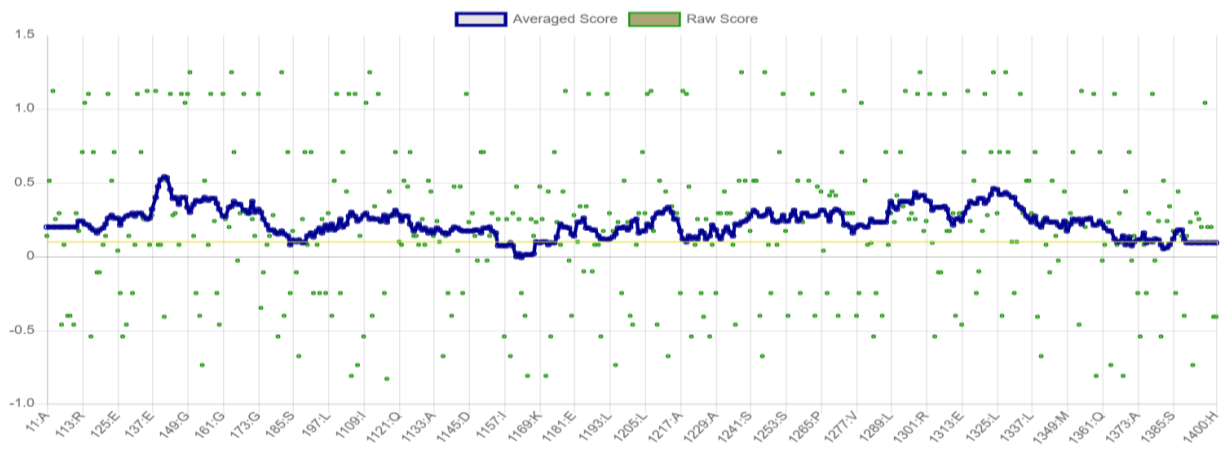
Z-Score: **-9.73**



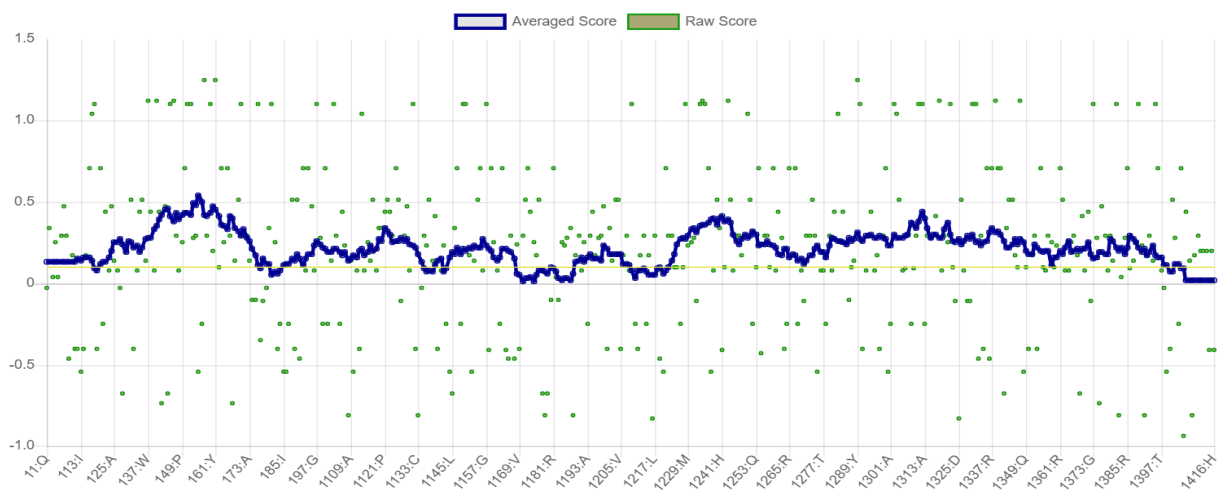
Nota. Validación con ProSA-web. El punto negro marca el modelo predicho A. Fit_KP, Z-score = -9.22 y B. Fit_EC, Z-score = -9.73.

Apéndice D. Validación de los modelos resultantes de Fit_KP y Fit_EC, mediante la herramienta Verify 3D

A.

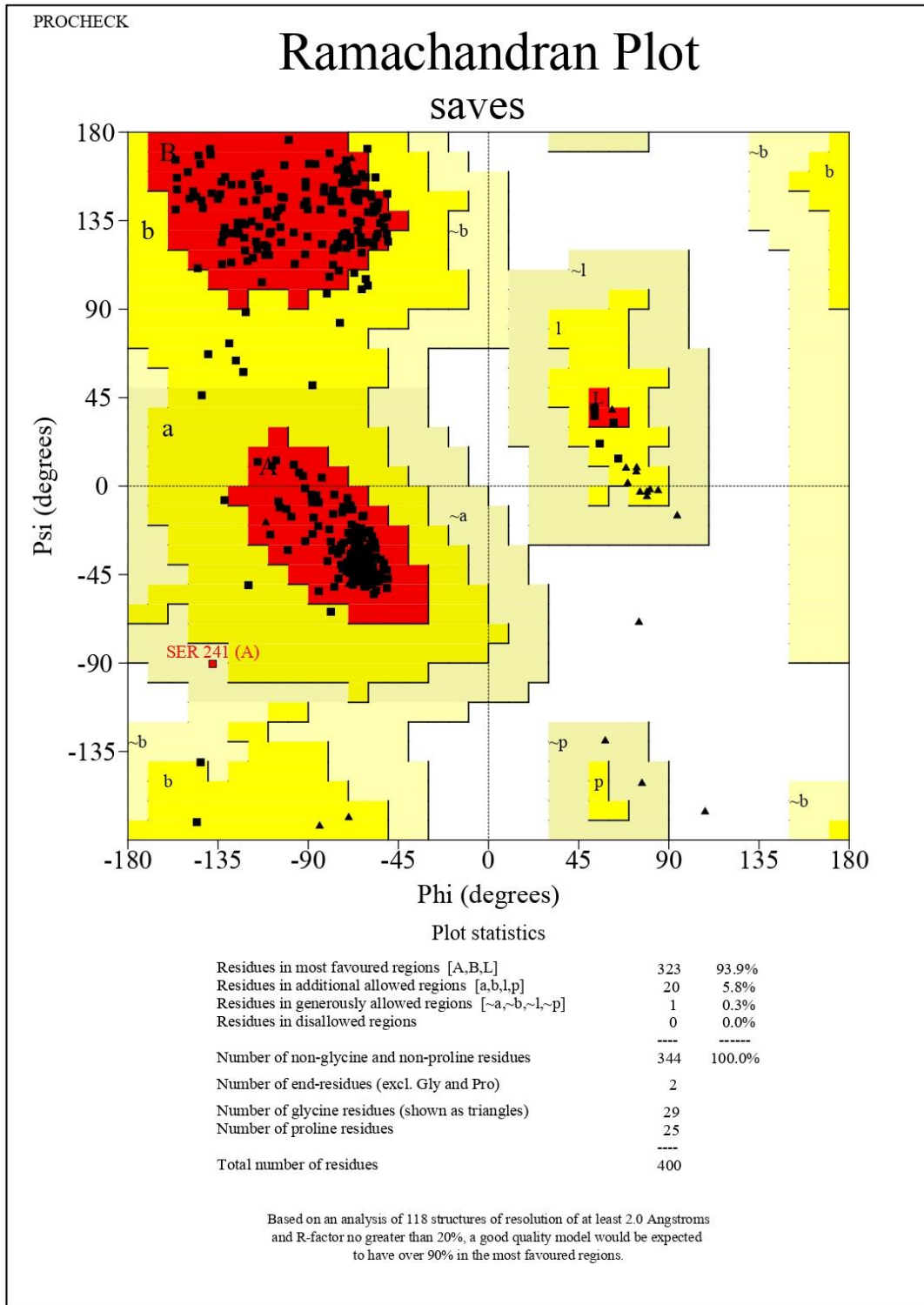


B.

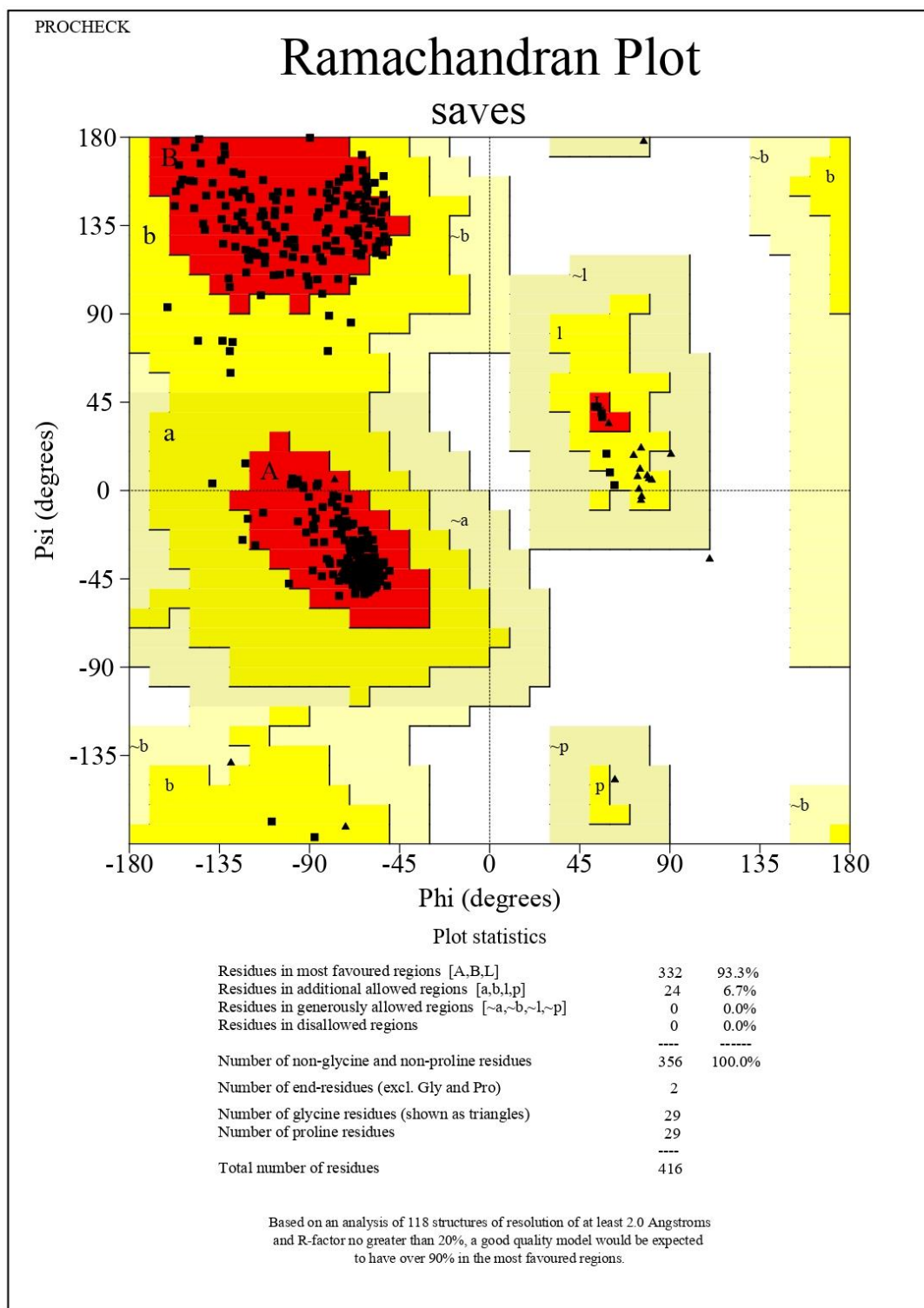


Nota. Se Validación local por Verify3D. A) Fit_KP y B) Fit_EC. 90.75 % para Fit_KP y 85.58 % para Fit_EC,

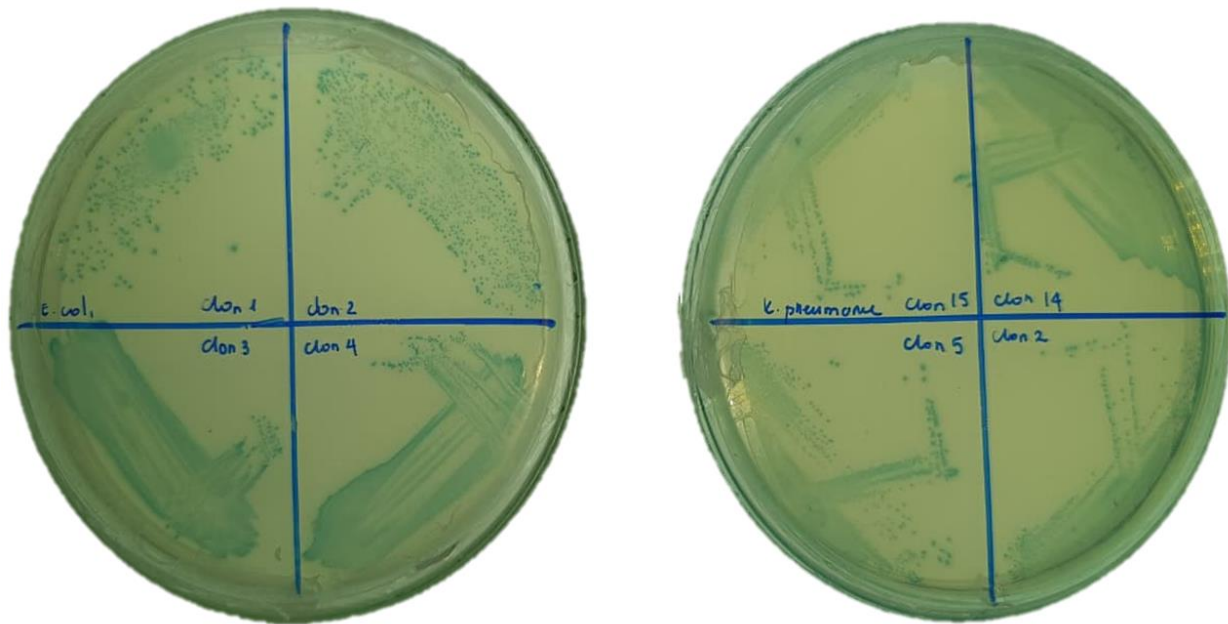
Apéndice E. Diagrama de Ramachandran del modelo 3D de Fit_KP



Apéndice F. Diagrama de Ramachandran del modelo 3D de Fit_EC

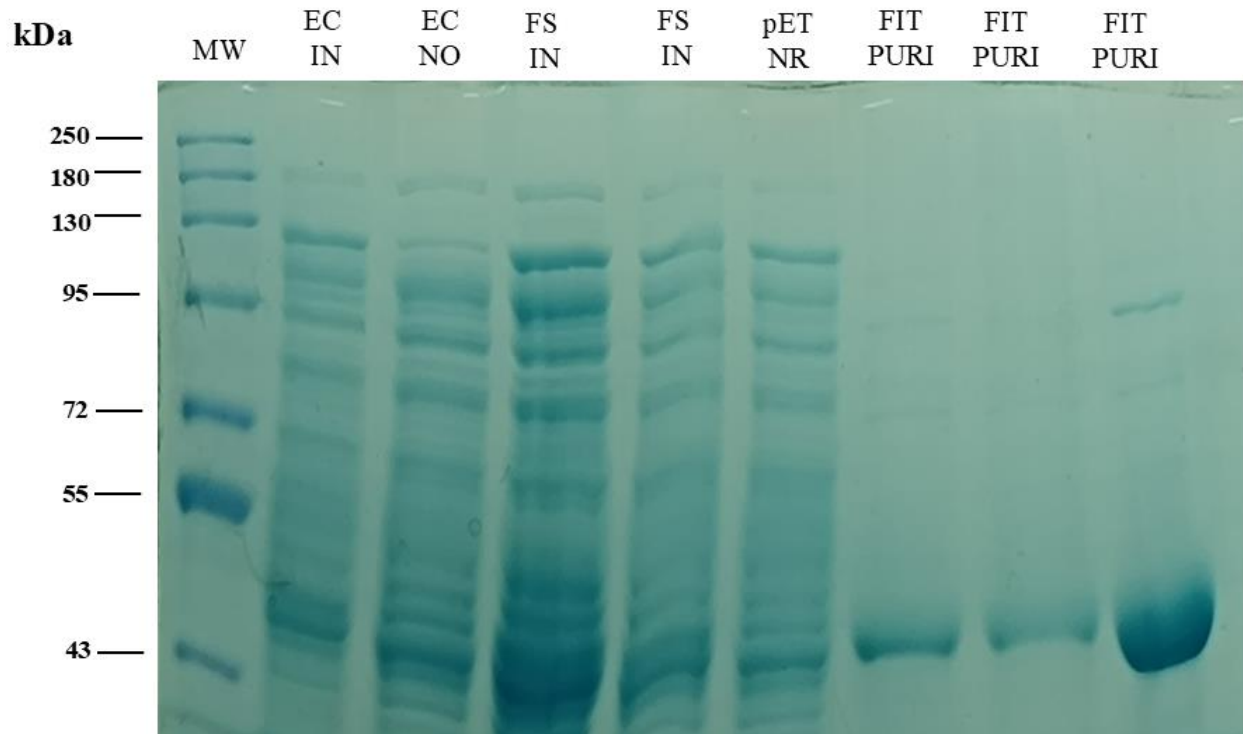


Apéndice G. Clones positivos con actividad fitasa



Nota. Se realizó un análisis cualitativo de la actividad fitasa de fit_*K. pneumoniae* y fit_*E. coli* en un medio SpM con BCIP como indicativo.

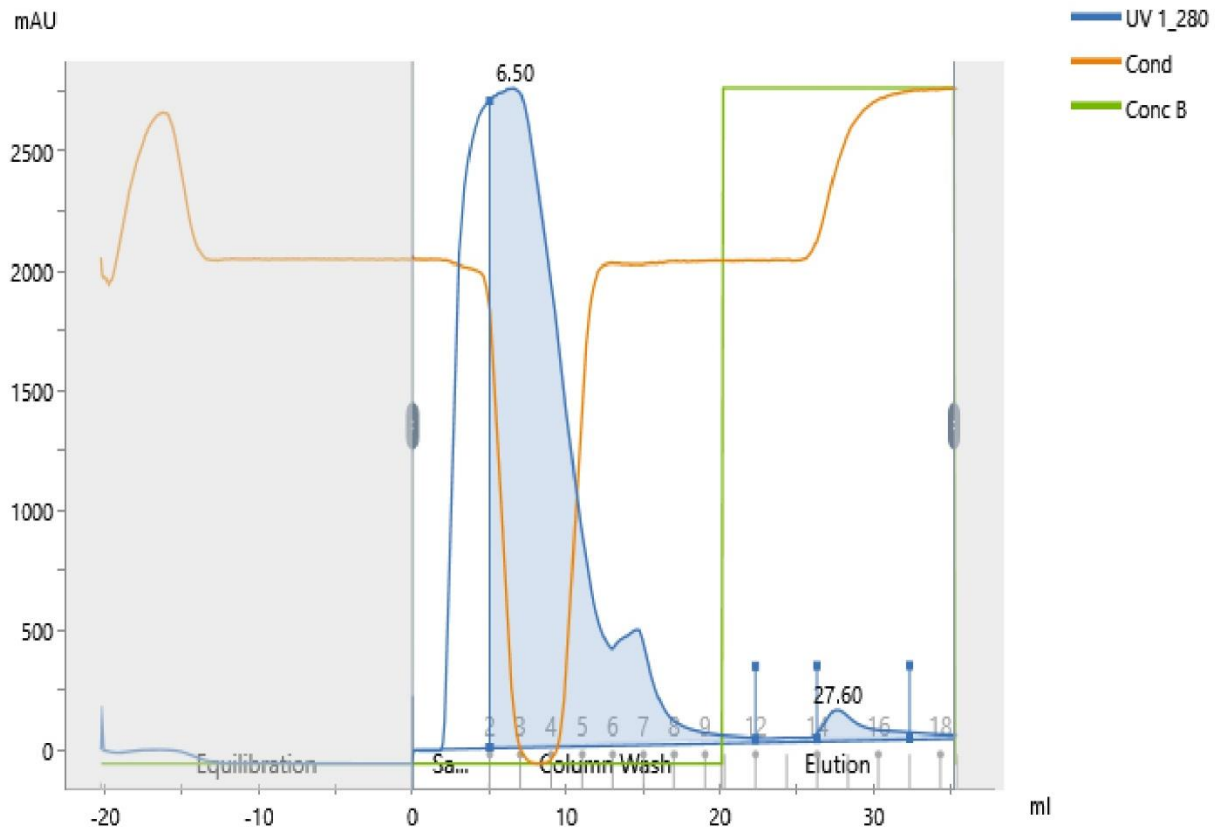
Apéndice H. Purificación y concentración de la fitasa usando un Amicon



Nota. La enzima purificada se concentró usando un filtro de centrifuga Amicon Ultra-4 (30K MWCO, Millipore) y se visualizó en un gel 12 % SDS-PAGE.

Apéndice I. Cromatograma de purificación por afinidad de la fitasa de *Klebsiella pneumoniae* en el sistema ÄKTA pure

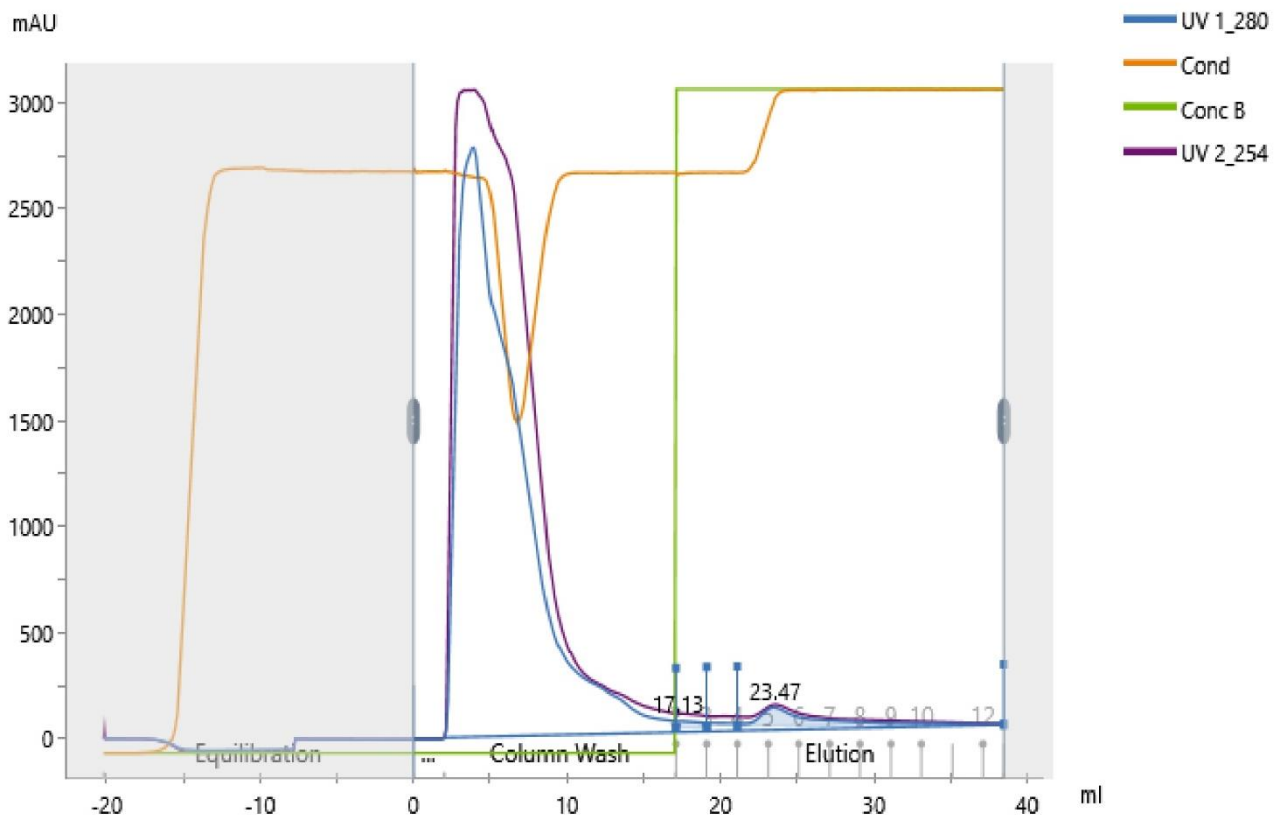
Fitasa KP 001



Nota. Purificación en columna HisTrap FF 5 mL (Cytiva). Buffer de unión : 50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 7.4. Elución con gradiente de imidazol hasta llegar a 500 mM. La absorbancia A280 (línea azul); la conductividad (línea naranja); la concentración del buffer de elución o B (línea verde). Las fracciones de elución se recolectaron y se evaluaron por SDS-PAGE.

Apéndice J. Cromatograma de purificación por afinidad de la fitasa de *Escherichia coli* en el sistema ÄKTA pure

Fitasa E.coli 04-06 001



Nota. Purificación en columna HisTrap FF 5 mL (Cytiva). Buffer de unión: 50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 7.4. Elución con gradiente de imidazol hasta llegar a 500 mM. La absorbancia A280 (línea azul); la conductividad (línea naranja); la concentración del buffer de elución o B (línea verde). Las fracciones de elución se recolectaron y se evaluaron por SDS-PAGE.