

Desarrollo de una Fitasa Bacteriana Recombinante para su Aplicación en la Nutrición Acuícola

M. Guerrero-Olazarán*, J.G. Carreon-Treviño, L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie,
K.P. Contreras-Torres, J.A. Gallegos-López, E.L. Cab-Barrera, J.M. Viader-
Salvadó

Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo
León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. 66450 E-mail: mguerrer@fcb.uanl.mx

Resumen

Las fitasas son importantes aditivos de alimentos que incrementan la disponibilidad de fósforo y otros minerales debido a la hidrólisis enzimática del ácido fítico, un factor anti-nutricional presente en la mayoría de los alimentos a base de cereales o leguminosas. En este trabajo se desarrolló una forma recombinante de la fitasa C de *Bacillus subtilis* (PhyC-R) producida en *Pichia pastoris* y se evaluó su potencial para su aplicación en la nutrición animal comparando sus propiedades contra dos fitasas comerciales de origen fúngico. La PhyC-R mostró ser una proteína glicosilada y con actividad a intervalos más amplios de pH (5.5 a 9) y temperatura (25 a 70°C) que las fitasas comerciales. Además, mostró mayor actividad residual a 80°C por 10 min ($85 \pm 2\%$) que las dos fitasas comerciales (65 ± 6 y $48 \pm 3\%$) y mayor que la reportada y evaluada para la forma nativa. Todas las fitasas fueron estables a las enzimas digestivas de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) y tripsina porcina con valores de actividad residual de 67 a 100%. Con la PhyC-R se logró disponer de 3.2 ± 0.2 µg P/mg de harina (16-22 % menos que las fitasas comerciales) en soya y en harina de chícharo 4.7 ± 0.2 µg P/mg (0-15% menos que las fitasas comerciales). PhyC-R es una alternativa viable para aplicarse como aditivo para incrementar la disponibilidad de fósforo fítico y otros nutrientes en alimentos para camarón y en especies con características fisiológicas semejantes, también podría ser empleada en procesos industriales en condiciones suaves (pH neutros y bajas temperaturas) para disponer del fósforo fítico en harinas de origen vegetal.

Introducción

El 60-80% del fósforo en alimentos derivados de plantas se encuentra en forma de ácido fítico, el cual químicamente es un inositol esterificado con seis grupos fosfatos (1,2,3,4,5,6-hexafosfato de *myo*-inositol, IP6). Las sales del ácido fítico son conocidas como fitatos.

El fitato es considerado como un factor antinutricional debido a su acción quelante sobre cationes divalentes, como Ca^{2+} , Zn^{2+} y Fe^{2+} , y la interacción con proteínas nutricionalmente importantes disminuyendo la biodisponibilidad de ambos tipos de nutrientes (Urbano *et al.*, 2000).

Las fitasas o fosfohidrolasas del hexafosfato de inositol son de gran interés por su aplicación en la reducción del contenido de fitato en alimentos para animales y consumo humano (Lei & Stahl, 2001; Vohra & Satyanarayana, 2003), incrementando además la disponibilidad de fósforo y otros minerales nutricionalmente importantes debido a la hidrólisis enzimática del ácido fítico. Las fitasas se encuentran en una gran variedad de microorganismos y plantas, y en algunos tejidos de animales (Liu *et al.*, 1998). Estas enzimas han sido clasificadas de acuerdo a un análisis filogenético de sus secuencias aminoacídicas y a sus propiedades bioquímicas en dos clases principales: las fosfatasas ácidas de histidina (HAP) y las fitasas alcalinas (Oh *et al.*, 2004).

La mayoría de las fitasas bacterianas, fúngicas y de plantas pertenecen a las fosfatasas ácidas de histidina (HAP; EC 3.1.3.2). Todos los miembros de esta familia comparten un sitio activo conservado con la secuencia RHGXRXP, la cual está presente solo en esta clase de enzimas (Van Etten *et al.*, 1991). Las fitasas del grupo HAP, presentan actividad a valores de pH ácidos (2.5 a 6) y a temperaturas de 40 a 60°C. Además, tienen una amplia especificidad de sustrato e hidrolizan al fitato libre hasta inositol monofosfato (IP₁).

De acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada y la Unión Internacional de Bioquímica (IUPAC-IUB 1975) las enzimas HAP se pueden dividir en dos grupos según la posición específica del fitato donde inicia la hidrólisis. Las 3-fitasas (hexafosfato de inositol 3-fosfohidrolasas, EC 3.1.3.8) hidrolizan primero el grupo fosfato de la posición 3, mientras que las 6-fitasas (hexafosfato de inositol 6-fosfohidrolasas, EC 3.1.3.26) hidrolizan primero el grupo fosfato de la posición 6, dando lugar al 1,2,4,5,6-pentafosfato de inositol y el 1,2,3,4,5-pentafosfato de inositol, respectivamente.

Las fitasas alcalinas difieren de las fitasas ácidas (HAP) en el peso molecular, estructura terciaria, pH óptimo de actividad, especificidad del sustrato y el requerimiento de iones calcio para la

catálisis enzimática. Basada en sus diferencias bioquímicas y en sus datos filogenéticos, las fitasas alcalinas de bacterias del género *Bacillus* y de algunas semillas de plantas pueden ser clasificadas en un nuevo grupo. Las fitasas de este grupo no contienen la secuencia conservada RHGXRP del sitio activo de las HAP (Oh *et al.*, 2004) y comprende las enzimas fitato-específicas de *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* (Kim *et al.*, 1998; Idriss *et al.*, 2002, Kerovuo *et al.*, 1998; Tye *et al.*, 2002) y de algunas plantas, tales como el polen de *Typha latifolia* (Hara *et al.*, 1985), polen de *Lilium longiflorum* (Barrientos *et al.*, 1994) y algunas semillas de leguminosas (Scott, 1991).

El empleo de las fitasas en la industria de los piensos como aditivos comestibles para animales monogástricos, principalmente aves y cerdos, es actualmente un hecho. Su uso ha mostrado una mejor disponibilidad de minerales, elementos traza y proteínas, además de la consecuente reducción del deterioro ambiental asociado a la contaminación causada por fósforo (Lei & Sthal, 2001).

La inclusión de fitasa en la dieta a base de harinas de origen vegetal para la nutrición de peces y otras especies de interés en la acuicultura, ha sido sugerida para reducir la excreción de fosfato hacia el agua y disminuir el efecto contaminante. En diversos estudios se ha mostrado que la adición de fitasa en dietas a base de soya incrementa el coeficiente aparente de digestibilidad (ACD) en fósforo en diversas especies de peces tales como: truchas (*Oncorhynchus mykiss*), salmón del atlántico (*Salmo salar L.*), tilapia, *Oreochromis niloticus* (Sugiura *et al.*, 2001; Sajjadi & Carter, 2004; Liebert & Portz, 2005). La adición de fitasa en dosis de 500 y 1000 U/kg en dietas a base de soya puede liberar de un 20% hasta un 80% de fósforo (Schaefer & Koppe, 1995, Yu & Wang, 2000).

Por otro lado, los resultados de los estudios sobre el efecto de fitasa en el crecimiento de diversas especies de peces usando dietas basadas total o parcialmente en proteínas de origen vegetal son inconsistentes. Muchos estudios reportan que la adición de fitasas en dietas deficientes en fósforo favorece el crecimiento (Yu & Wang, 2000), tal es el caso del pez gato africano, *Clarias gariepinus* (Van Weerd *et al.*, 1999), trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss* (Vielma *et al.*, 1998), salmón del atlántico (Sajjadi & Carter, 2004) y el pez piedra de Korea, *Sebastes schlegeli* (Yoo *et al.*, 2005). La adición de fitasas también ha sido correlacionada con un incremento significativo en la retención de energía (Debnath *et al.*, 2005), lo que explicaría el incremento en el crecimiento. Sin embargo, en otros estudios no han encontrado diferencias significativas en el

crecimiento empleando dietas suplementadas o carentes de fitasa (Robinson *et al.*, 2002). Por otro lado, no se ha observado un efecto negativo en la sobrevivencia causada por la suplementación de fitasa (Robinson *et al.*, 2002), indicando la ausencia de toxicidad de esta enzima.

Las fitasas incrementan la disponibilidad del fósforo proveniente de los alimentos a base de harina de soya en peces, sin embargo los resultados de los estudios realizados sobre la disponibilidad de proteínas y aminoácidos aún son controversiales. Es probable que la variación de los resultados de los diferentes estudios realizados se deba a diversos factores como: la variación del contenido de fitato en las dietas, las especies sujetas a estudio, características inherentes de los ingredientes, presencia o ausencia de estómago en las diferentes especies de peces y que además la actividad de fitasa es dependiente de valor pH del medio, el cual puede ser diferente en cada tracto digestivo (Baruah *et al.*, 2004).

Estudios en trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss* (Sugiura *et al.*, 2001, Vielma *et al.*, 2004) y en carpas (Bai *et al.*, 2004) mostraron el efecto positivo de la suplementación de fitasas en la digestibilidad de proteínas. En contraste, otros estudios (Papatryphon *et al.*, 1999) han mostrado que la suplementación de fitasas a niveles de 1000 FTU/kg no ejerce algún efecto. Resultados semejantes han sido descritos en tilapia, *Oreochromis niloticus* (Riche *et al.*, 2001) y salmón *Salmo salar* (Storebaken *et al.*, 1998).

El costo de añadir fitasa al alimento del bagre es aproximadamente igual que el ahorro asociado con la eliminación de la suplementación de fósforo inorgánico (Li & Robinson, 1997). Algunos estudios han mostrado que el empleo de fitasas en la alimentación de peces ha tenido un efecto positivo en la disminución de los niveles de fósforo fecal asociado con la contaminación acuática, estando relacionada con los niveles de fitasa empleada (Jackson *et al.*, 1996). A pesar de los resultados positivos obtenidos hasta el momento en el empleo de fitasa en la alimentación de peces y otras especies de interés en la acuicultura, es necesario optimizar las características de las fitasas para esta aplicación específica, ya que las fitasas que actualmente son disponibles de forma comercial han sido optimizadas principalmente para su empleo en la producción de cerdos y aves.

Como en los casos de otras especies acuáticas, el empleo de fitasas en preparaciones nutrimentales para camarón ofrece una alternativa para resolver los efectos antinutricionales de los fitatos presente en las harinas vegetales. Sin embargo, en camarón se han realizados pocos

estudios (Davis *et al.*, 2000; Ricque *et al.*, 2004). De acuerdo a las características fisiológicas de esta especie, las fitasas adecuadas para la alimentación del camarón deberían tener actividad a valores de pH de 7 a 8, y a un intervalo de temperatura de 26-32°C, debido a las condiciones presentes en el aparato digestivo de esta especie y en el medio de cultivo. Además, se requiere que éstas posean resistencia al ataque proteolítico de las enzimas digestivas camarón, estabilidad a las temperaturas empleadas en el procesado de los alimentos, y una baja lixiviación de la fitasa presente en las preparaciones extruidas e introducidas en el medio acuoso de los tanques de incubación.

Dependiendo de la aplicación, una fitasa de interés comercial debe de cumplir con una serie de criterios de calidad. Éstas deben de ser efectivas en la liberación del fósforo fítico en el tracto digestivo, estables y resistentes a las altas temperaturas empleadas durante el procesado del alimento y durante el almacenamiento, y estables a enzimas digestivas, además que su producción sea de bajo costo.

Otra característica que determina la eficiencia o limitaciones en la suplementación de las fitasas es la especificidad del sustrato. Experimentos *in vitro* sugieren que las fitasas que presentan un especificidad amplia por diversos sustratos son más apropiadas para su aplicación en la nutrición animal (Wyss *et al.*, 1999a) que las fitasas con una estrecha especificidad. Desafortunadamente una amplia especificidad por el sustrato está relacionada con una baja actividad específica. Finalmente, las fitasas son competitivas si se pueden producir con un alto rendimiento y purificar con estrategias relativamente baratas, por lo cual actualmente existe una carrera muy competitiva en la sobre-expresión y secreción de fitasas por microorganismos recombinantes (Mayer *et al.*, 1999; Miksch *et al.*, 2002).

Las investigaciones sobre las fitasas llevan más de 87 años, desde su descubrimiento hasta su comercialización en Europa en 1993-1994 por Gist-Brocades. El interés de la comercialización de la primera fitasa se debió a razones ambientales. Recientemente, debido al interés económico y de protección ambiental, se ha incrementado considerablemente la producción de fitasas para su empleo en preparaciones alimenticias para consumo animal en Europa y EU, y su venta se ha introducido con éxito en Latinoamérica, China y otros países asiáticos. Actualmente el volumen del mercado de las fitasas se estima en 150 millones euros (Haefner *et al.*, 2005).

En la actualidad, la mayoría de las fitasas producidas a gran escala para su comercialización son enzimas modificadas por ingeniería genética y producidas en hongos filamentosos

recombinantes. Las tres fitasas comúnmente empleadas como aditivos en alimentos son la 3-fitasa de *A. niger* y dos 6-fitasas, la de *Peniophora lycii* y la de *Escherichia. coli*. En general, las fitasas de distintos orígenes naturales presentan características diferentes que se deben considerar para su empleo en las dietas de las diferentes especies animales.

De acuerdo a sus características bioquímicas, las fitasas del género *Bacillus* son candidatas potenciales para su empleo como aditivo en la alimentación de animal; sin embargo, es indispensable evaluar las propiedades bioquímicas que ofrecen éstas para cada aplicación específica. La fitasa de la bacteria *Bacillus subtilis* (fitasa C) tiene su máxima actividad a pH neutro, pero los niveles de producción directamente en esta bacteria son bajos (Kerovuo *et al.*, 1998). *Pichia pastoris* ofrece múltiples ventajas respecto a la producción de proteínas recombinantes habiendo mostrado ya resultados satisfactorios con la producción de otras fitasas. Recientemente nuestro grupo de trabajo ha construido cepas recombinantes de *Pichia pastoris* capaces de producir y secretar la fitasa C de *B. subtilis* (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2007). En el presente trabajo, se evaluaron las propiedades bioquímicas de la forma recombinante de la fitasa C de *B. subtilis* (PhyC-R) producida en *P. pastoris* y se compararon con las propiedades bioquímicas de dos fitasas comerciales de origen fúngico. Se evaluó el efecto del pH y temperatura en la actividad de fitasa, así como la estabilidad térmica a 80°C y estabilidad a las enzimas digestivas del camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) y tripsina porcina. Además, se evaluó la disponibilidad de fósforo en harina de soya (*Glycine max*) y chícharo (*Pisum sativum*) tratadas con cada una de las fitasas.

Materiales y Métodos

Preparaciones de la fitasa C nativa y recombinante y dos fitasas comerciales

La preparación de fitasa C nativa (PhyC-N) se obtuvo a partir de cultivos de la cepa *Bacillus subtilis* VTT E-68013 (*Culture Collection of the Technical Research Centre of Finland*) mediante precipitación del medio de cultivo con solventes orgánicos empleando técnicas previamente reportadas (Powar & Jagannathan, 1982). La fitasa C recombinante (PhyC-R) se obtuvo de cultivos de una cepa recombinante de *Pichia pastoris* portando el gen de la fitasa C nativa (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2007). La preparación enzimática de PhyC-R se obtuvo por ultrafiltración a partir del medio de cultivo libre de células de un cultivo en matraz o de

fermentador (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2007, Viader-Salvadó *et al.*, 2008). Las enzimas comerciales Natuphos (5000 FTU, BASF/DSM) y Allzyme SSF (1000 FTU, Alltech, Inc.) se resuspendieron en una solución amortiguadora de acetatos 360 mM (pH 5.5) y 1 mM CaCl₂, 20 mg/mL Tween 20. Las cuatro preparaciones enzimáticas se caracterizaron determinando actividad de fitasa, concentración de proteínas y electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Actividad enzimática de fitasa y análisis por SDS-PAGE

La actividad de fitasa se determinó en 1.6 mM de fitato de sodio, 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) y 1 mM CaCl₂ e incubando a 37°C por 30 min. La reacción se detuvo con un volumen de ácido tricloroacético al 15% y se determinó el fosfato liberado mediante el método del ácido ascórbico (Fiske y Subbarow, 1925). En todos los ensayos se evaluó un blanco de muestra (muestra sin sustrato) y un blanco de la solución de sustrato. Se consideró una unidad de fitasa como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol de fosfato en un minuto en las condiciones del ensayo.

El perfil electroforético de las preparaciones enzimáticas se determinó en un gel de poliacrilamida al 12% teñido con colorante de Coomassie.

Efecto del pH y temperatura en la actividad de fitasa

Para todos los ensayos realizados se emplearon las siguientes soluciones amortiguadoras: 250 mM glicina-HCl, pH 2.5; 360 mM acetatos, pH 5.5; y 100 mM Tris-HCl, pH 7.5 y 9.0, en todos los casos con 1 mM CaCl₂. Para evaluar el efecto del pH, se determinó la actividad de fitasa de cada preparación enzimática en una solución amortiguadora definida para cada valor de pH evaluado (2.5, 5.5, 7.5 y 9.0). El efecto de la temperatura se evaluó midiendo la actividad de cada preparación enzimática a temperaturas entre 25-80°C a pH 7.5 para la PhyC-N y PhyC-R, y pH 5.5 para las fitasas comerciales. Se calculó el porcentaje de actividad relativa respecto al valor de actividad enzimática más alto obtenido para la misma preparación enzimática al mismo valor de pH o temperatura.

Estabilidad a la temperatura

La termoestabilidad se evaluó determinando la actividad enzimática de fitasa después de un tratamiento térmico por 10 min a 80°C. Para la PhyC-R, el tratamiento térmico se realizó a pH 7.5 y 5.5 y a dos concentraciones de CaCl₂ (1 y 5 mM). Para el caso de las fitasas comerciales, el tratamiento térmico se realizó a pH 5.5. La estabilidad térmica se expresó como actividad residual, porcentaje de actividad relativa después del tratamiento térmico respecto al valor de actividad enzimática antes del tratamiento térmico.

Evaluación de la estabilidad a la proteólisis por enzimas digestivas

La susceptibilidad a las enzimas digestivas de camarón se determinó incubando a 37°C por 30 min una mezcla de la preparación enzimática de fitasa (0.08 U/mL) y 1X (0.045 U BAPNA/mL de tripsina a 37°C), 10X ó 40X de una preparación cruda de las enzimas digestivas del camarón blanco del Pacífico, en 100 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂, pH 7.5. Se realizó un ensayo similar con cada preparación enzimática de fitasa para determinar la susceptibilidad a tripsina porcina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) empleando 0.12 (1X) ó 1.20 U BAPNA/mL (10X) de esta enzima. Se determinó la actividad enzimática de fitasa residual de forma similar a los ensayos de estabilidad a la temperatura.

Evaluación de la disponibilidad de fósforo de dos harinas tratadas con fitasa

Todos los ensayos se realizaron con 250 mg de harina de soya (*Glycine max*) o chícharo (*Pisum sativum*) que se resuspendieron en una solución amortiguadora (pH 5.5 ó 7.5) o agua MilliQ (pH 6.5) en presencia o ausencia de una de las preparaciones enzimáticas de fitasa a evaluar. La suspensión se incubó con agitación constante a una temperatura y tiempo determinado. La reacción enzimática se detuvo con un volumen de ácido tricloroacético al 15%. Del sobrenadante recuperado se determinó la concentración de fosfato mediante el método del ácido ascórbico. La disponibilidad de fósforo se expresó como µg de fósforo liberado por mg de harina tratada (µg P/mg harina).

Para el caso de la PhyC-R se empleó una solución amortiguadora a pH 7.5 (100 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂) y para las fitasas comerciales una solución amortiguadora a pH 5.5 (360 mM acetatos, 1 mM CaCl₂). En ambos casos también se hizo el ensayo en agua MilliQ en lugar de la solución amortiguadora. En el ensayo control (harina sin enzima) se evaluaron los tres valores de pH. Cada reacción se llevó a cabo a dos temperaturas (30 y 50°C), dos concentraciones de enzima (1600 y 3200 U/kg), a tres condiciones de humedad (5, 1 y 0.5 mL de solución amortiguadora o agua), correspondientes a relaciones agua:harina de 20:1, 4:1 y 2:1, y cinco tiempos de incubación (0, 0.5, 1, 2 y 3 h). Con estos ensayos, se evaluó el efecto del pH, concentración de enzima, humedad, temperatura y tiempo de incubación en la liberación de fosfato de las harinas empleadas por las preparaciones enzimáticas de fitasa.

Análisis de resultados

Todos los ensayos realizados para la evaluación del efecto del pH y temperatura en la actividad de fitasa, estabilidad a la temperatura y a la proteólisis por enzimas digestivas, y disponibilidad de fósforo en las harinas tratadas con fitasa, se hicieron al menos por triplicado y se compararon entre sí mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un factor o multifactorial y una prueba de comparación de medias de Tuckey.

Resultados

Preparados de fitasas sujetas a evaluación

Las actividades y actividades específicas determinadas para las preparaciones de las fitasas fueron las siguientes: PhyC-N 46 FTU y 1.36 U/mg; PhyC-R, 3 U/mL y 7 U/mg; Natuphos, 30 U/mL (3000 FTU) y 37 U/mg; y Allzyme SSF, 9 U/mL (900 FTU) y 13 U/mg. El perfil electroforético (Fig. 1) de PhyC-R mostró una banda ancha de 45-70 kDa (carril 3), mientras que la Natuphos mostró una banda ancha de 45-66 kDa (carril 4) y la preparación de Allzyme SSF mostró un barrido amplio con una zona intensa localizada en 60-70 kDa (carril 5). Como referencia, se analizó una preparación enzimática de la fitasa C nativa de *B. subtilis* (PhyC-N), y se observó la presencia de dos bandas de 41 y 44 kDa (carril 2).

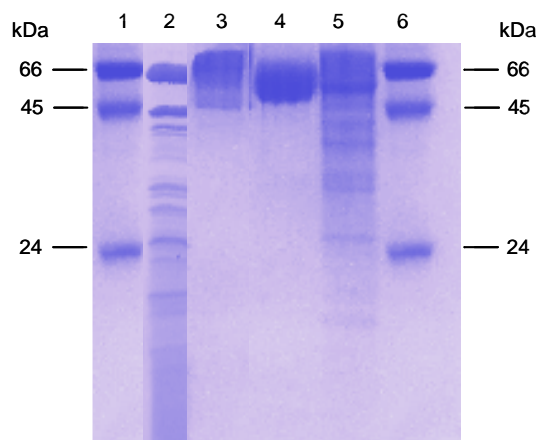


Figura 1. Análisis por SDS-PAGE al 12% de las preparaciones de las fitasas en estudio. Carriles 1 y 6: marcador de peso molecular de proteínas, carril 2: PhyC-N, carril 3: PhyC-R, carril 4: Natuphos, carril 5: Allzyme SSF.

Efecto del pH y temperatura en la actividad de fitasa

Las fitasas comerciales presentaron actividad a valores de pH ácidos (Fig. 2, izquierda), con un máximo a pH 5.5 y ausencia total de actividad a valores neutros y básicos, mientras que PhyC-N y PhyC-R presentaron actividades de fitasa a un intervalo de pH más amplio (Fig. 2, derecha) y un máximo a pH de 9 para el caso de la PhyC-R (más alto que la actividad a pH 7.5, $p < 0.05$), mientras que la PhyC-N registró el máximo de actividad a pH 7.5 y un 93% de actividad relativa a pH 9.

Las dos fitasas comerciales presentaron actividades en un intervalo de temperatura más estrecho que la PhyC-R, y el valor máximo de actividad a 45°C, mientras que la PhyC-N y PhyC-R presentaron el máximo de actividad a 55°C (Fig. 2, derecha). Las actividades de las fitasas comerciales disminuyeron rápidamente al aumentar la temperatura a valores superiores de 55°C, inactivándose casi por completo a 70°C, mientras que PhyC-R y PhyC-N conservaron un 11 y 36 % de su actividad, respectivamente, a esa temperatura.

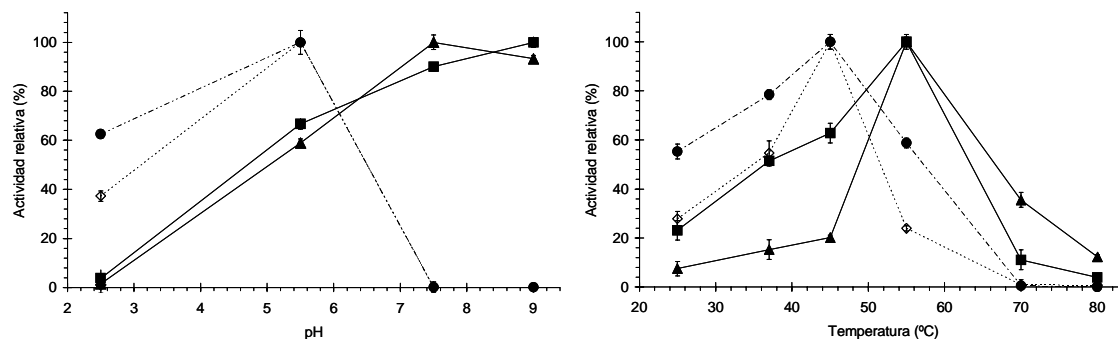


Figura 2. Efecto del pH (izquierda) y temperatura (derecha) en la actividad de fitasa de las tres preparaciones enzimáticas: PhyC-R (■), PhyC-N (▲), Natuphos (●), Allzyme SSF (◇). Un punto representa la media de al menos tres determinaciones (C.V.<5%).

Estabilidad a la temperatura

En la Figura 3 se muestra la actividad residual después del tratamiento térmico por 10 min a 80°C a dos valores de pH. La PhyC-R presentó la mayor actividad residual a 80°C ($85 \pm 2\%$, pH 5.5, 5 mM CaCl_2 , $p < 0.05$), seguida por la Allzyme SSF ($65 \pm 6\%$ pH 5.5, 1 mM CaCl_2) y la Natuphos ($48 \pm 3\%$ pH 5.5, 1 mM CaCl_2). La estabilidad térmica de PhyC-R dependió del pH y la concentración de calcio, siendo el pH de 5.5 y 5 mM de CaCl_2 las condiciones más favorables de tratamiento térmico de la PhyC-R, ya que a 1 mM perdió totalmente su actividad a pH 5.5. Las actividades residuales de la PhyC-R a pH de 7.5 no mostraron diferencias significativas a las dos concentraciones de calcio evaluadas ($36 \pm 7\%$, $p > 0.05$). La PhyC-N presentó estabilidad solo a pH de 7.5 y a 5 mM de CaCl_2 ($68 \pm 4\%$).

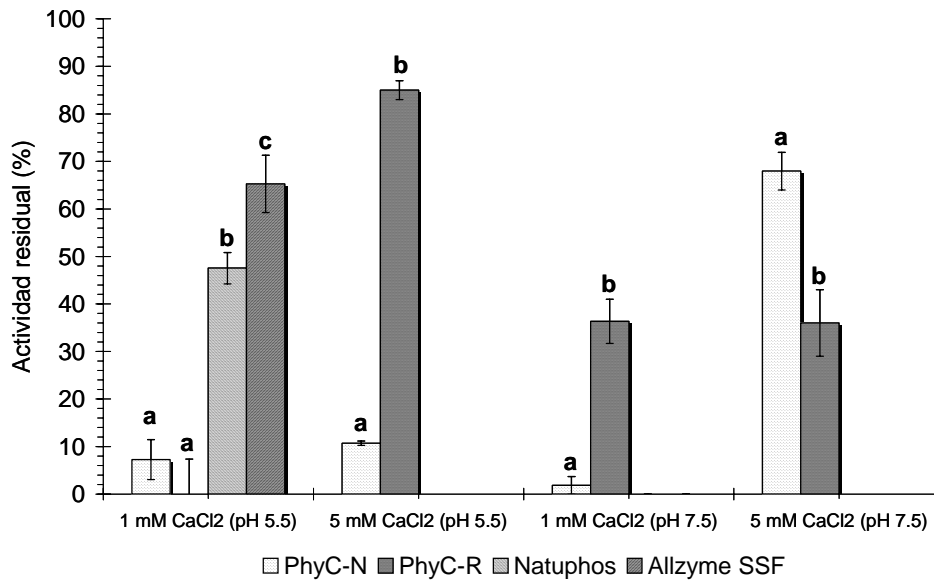


Figura 3. Actividad residual de las cuatro preparaciones enzimáticas después de un tratamiento térmico por 10 min a diferentes condiciones de pH y concentración de CaCl₂: PhyC-R pH 5.5, 1 y 5 mM de CaCl₂, PhyC-R pH 7.5, 1 y 5 mM CaCl₂, Natuphos pH 5.5 y 1 mM CaCl₂, Allzyme SSF pH 5.5 y 1 mM CaCl₂. Literales diferentes indican diferencias significativas entre la actividad residual de las fitasas a igualdad de condiciones experimentales ($p < 0.05$).

Estabilidad a la proteólisis por enzimas digestivas

La actividad residual de la PhyC-R y Natuphos fue dependiente de la concentración de enzimas digestivas de camarón empleada (Fig 4). En ambas preparaciones enzimáticas, la actividad residual se incrementó al aumentar la concentración de las enzimas digestivas de camarón de 1 a 10X para la PhyC-R y de 10 a 40X para Natuphos. La fitasa Allzyme SSF siempre presentó una actividad residual mayor al 100%. La actividad residual más baja (67 ± 3) la presentó PhyC-R a la concentración de enzimas de camarón 40X.

PhyC-N fue estable al tratamiento con 10X de Hp hasta los 120 minutos, sin embargo PhyC-R, Natuphos y Allzyme SSF presentan una disminución en su actividad residual a los 120 minutos de incubación con 10X de Hp, tal como se muestra en la Figura 5, mostrando valores de actividad residual de $60 \pm 5\%$, $39 \pm 7\%$, $78 \pm 5\%$, respectivamente.

Los controles (preparaciones enzimáticas sujetas a las mismas condiciones de incubación en ausencia de las enzimas digestivas de camarón), permanecieron con valores próximos al 100 %

de actividad residual durante los 120 min de incubación, confirmando la estabilidad de las enzimas al tratamiento sin enzimas digestivas (Fig. 5).

Todas las fitasas fueron estables al tratamiento con tripsina porcina, con actividades residuales cercanas al 100%, sin diferencias significativas en todas las condiciones probadas.

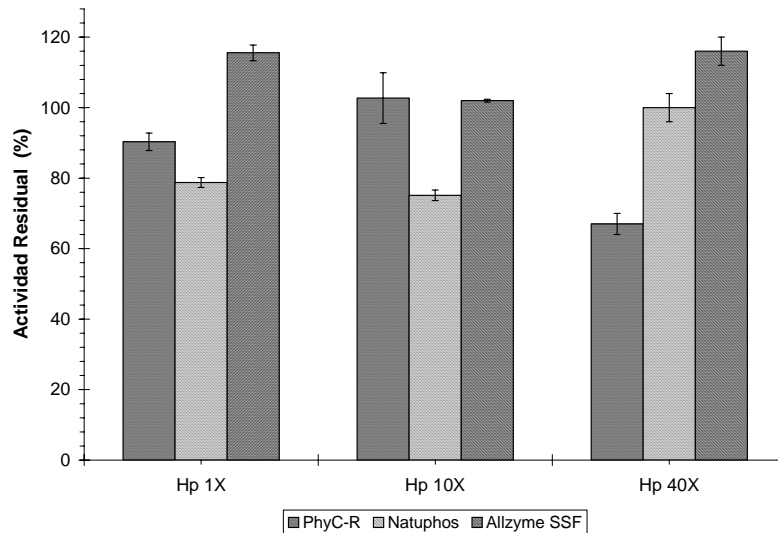


Figura 4. Estabilidad a la proteólisis de tres preparaciones enzimáticas (PhyC-R, Natuphos y Allzyme SSF) por la acción de las enzimas digestivas del camarón blanco del Pacífico (izquierda). Literales minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre las actividades residuales de cada preparación enzimática a una concentración de proteasa determinada ($p < 0.05$). Literales mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre la actividad residual de una preparación enzimática a diferente concentración de proteasas ($p < 0.05$). Hp 1X: enzimas digestivas de camarón con una actividad de tripsina de 0.18 U BAPNA/mL a 37°C. Hp 10X y 40X: enzimas digestivas de camarón 10 y 40 veces más concentradas que Hp 1X.

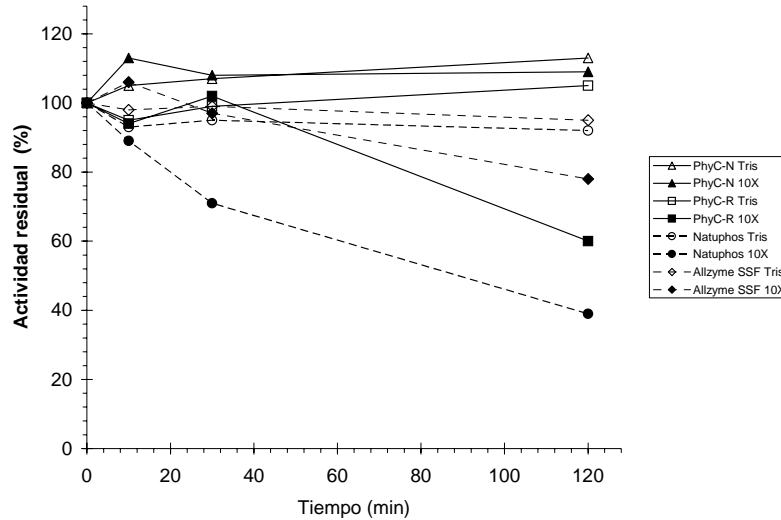


Figura 5. Estabilidad de las preparaciones enzimáticas (\blacktriangle -PhyC-N, \blacksquare -PhyC-R, \bullet -Natuphos y \blacklozenge -Allzyme SSF) por la acción de las enzimas digestivas del camarón blanco del Pacífico a diferentes tiempos de incubación con 10X de Hp. Controles: actividades residuales sin tratamiento con Hp (PhyC-N-control Δ , PhyC-R-control \square , Natuphos-control \circ y Allzyme SSF-control \diamond). Hp 1X: enzimas digestivas de camarón con una actividad de tripsina de 0.18 U BAPNA/mL a 37°C. Hp 10X: enzimas digestivas de camarón 10 veces más concentradas que Hp 1X. Un punto representa la media de al menos tres determinaciones (C.V.<5%).

Disponibilidad de fósforo de harinas tratadas con fitasa

Tanto para la harina de soya como para la harina de chícharo, el ANOVA global de todos los factores evaluados dio como resultado diferencias significativas para las todas las interacciones posibles entre las variables evaluadas (diferentes fitasas, concentración de la enzima, humedad, temperatura, pH, y tiempo de incubación).

Los niveles de fósforo liberado en la harina de soya fueron siempre menores de 0.5 $\mu\text{g P/mg}$ de harina en todas las condiciones evaluadas. Sin embargo, en la harina de chícharo, éstos variaron en un intervalo de 0.3 a 1.8 $\mu\text{g P/mg}$ de harina (Fig. 6). Estos resultados indican que la harina de chícharo evaluada posee factores endógenos que favorecen la disponibilidad del fósforo según sea las condiciones del tratamiento y sin adición de fitasa.

Los tratamientos de la harina de soya y chícharo (Fig. 6 y 7) con las diferentes fitasas presentaron en todos los casos mayor disponibilidad de fósforo que el tratamiento control (sin fitasa).

El pH afectó de forma significativa (Fig. 6) en los tratamientos de ambas harinas, conduciendo a niveles de fósforo liberado más altos a valores de pH favorable para cada fitasa (pH 5.5 para las fitasas comerciales y pH 7.5 para PhyC-R).

El tratamiento control no mostró diferencias significativas a los diferentes condiciones de pH manteniéndose con un volar constante en la disponibilidad de fósforo en ambas harinas a los valores de pH evaluados (Fig. 6).

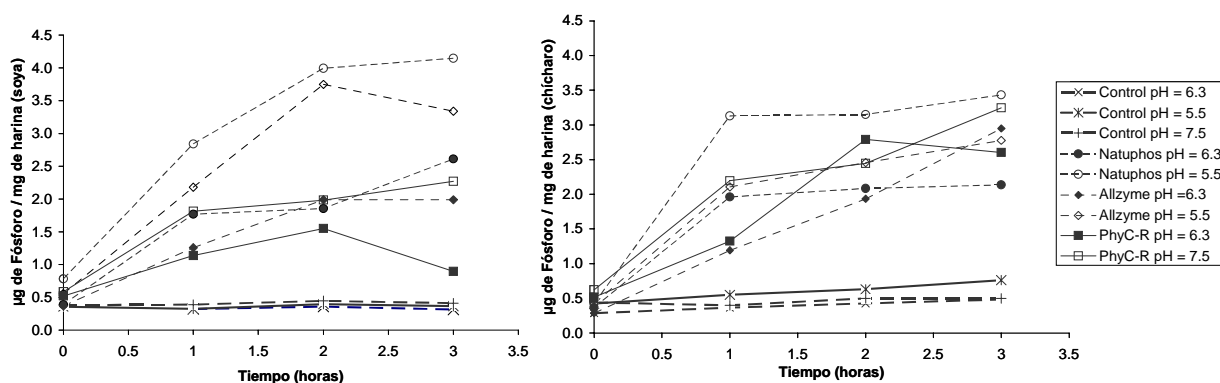


Figura 6. Efecto del pH en la disponibilidad de fósforo en harina de soya (izquierda) y harina de chícharo (derecha). Tratamiento con 1600 U/kg de fitasa a 30°C, humedad (4:1) y diferentes condiciones pH.

El aumento de la concentración de fitasa no generó un aumento significativo de la liberación de fósforo en harina de soya con todas las fitasas y bajo las condiciones evaluadas. Sin embargo, en la harina de chícharo, el aumento de la concentración de fitasas (1600 a 3200 U/Kg de harina) generó un aumento significativo de la liberación de fósforo a una hora de incubación. Para Natuphos se observó un incremento del 19%, 18 % para PhyC-R y 76% para Allzyme SSF. La disponibilidad de fósforo en harina de chícharo por el tratamiento con Allzyme SSF fue claramente más alta a mayor concentración de enzima en todos los tiempos evaluados.

En la Figura 7 se muestra el tratamiento de las harinas a dos condiciones de humedad (20:1 ó 4:1 agua:harina), empleando agua (pH 6.3) sin amortiguar la reacción y a 30°C. La humedad y el tiempo de incubación afectaron de forma significativa el fósforo liberado en los tratamientos de ambas harinas, obteniendo los niveles más altos en aquellos con mayor contenido de agua y a mayor tiempo de incubación. Los resultados muestran que a mayor proporción de agua y a más

tiempo de reacción se logró liberar niveles más altos de fósforo, en ambas harinas. Los niveles más altos de fósforo disponibles en soya se obtiene en el tratamiento de 20:1 de humedad con Natuphos ($4.0 \pm 0.2 \mu\text{g P/mg}$ de harina), seguido de Allzyme SSF y PhyC-R con niveles de 3.1 ± 0.2 y de $3.2 \pm 0.2 \mu\text{g P/mg}$ respectivamente y a tres horas de tratamiento. Eliminando el fósforo disponible por el tratamiento control (harina sin enzima) y tomando en consideración el contenido de fósforo fítico en soya, Natuphos libera en soya hasta un 87% de fósforo fítico, Allzyme SSF y PhyC-R un 66 y 68%, respectivamente. Para el caso de la harina de chícharo los niveles más altos se obtuvieron con valores de $5.5 \pm 0.1 \mu\text{g P/mg}$ de harina con Natuphos, seguido de Allzyme SSF y PhyC-R con niveles de $4.7 \pm 0.2 \mu\text{g P/mg}$ para ambas enzimas en el tratamiento de 20:1 humedad. Estos niveles de fósforo representan un 80% de fósforo fítico en el tratamiento con Natuphos y el 66% para el tratamiento con Allzyme SSF y PhyC-R.

En el caso del efecto de la temperatura, los niveles de fósforo liberado disminuyeron a mayor temperatura (50°C) a la hora de incubación para la harina de soya, con Natuphos a 50°C a liberó un 22% menos de fósforo que a 30°C y en el caso de Allzyme SSF, hasta un 72% menos a 50°C que a 30°C . En el caso del tratamiento con PhyC-R, los niveles de fósforo liberado fueron iguales a 30 y 50°C ($3.1 \pm 0.2 \mu\text{g P/mg}$).

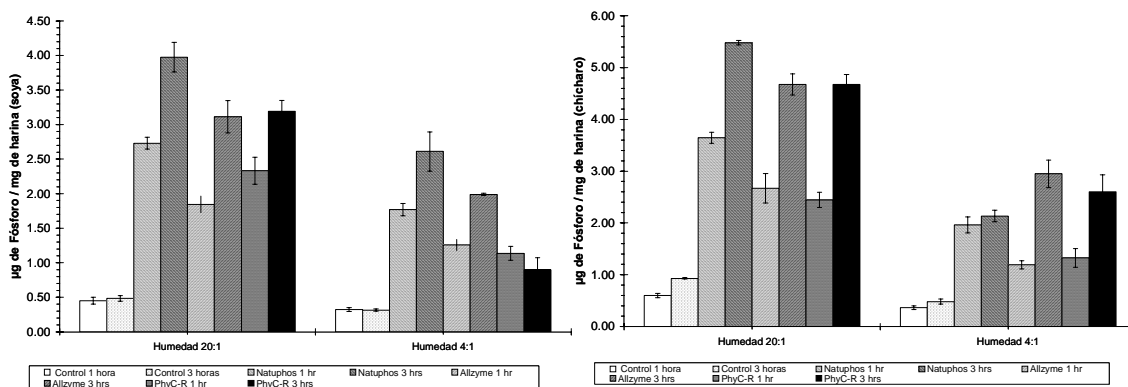


Figura 7. Efecto de la humedad en la disponibilidad de fósforo en harina de soya (izquierda) y harina de chícharo (derecha). Tratamiento con 1600 U/kg de fitasa a 30°C , a pH 6.3 a diferentes condiciones humedad 20:1 ó 4:1 agua:harina. Las alturas de las barras representan la media de al menos tres determinaciones (C.V.<5%).

Para el caso de harina de chícharo, los tratamientos a 30 y 50°C a una hora de incubación mostraron diferencias significativas con niveles de fósforo liberado más altos a 50°C , con

incrementos del 15% para Natuphos, 13% para Allzyme SSF y 44% para PhyC-R. A las 3 horas de incubación los niveles de fósforo liberado fueron iguales a 30 y 50°C para todas las enzimas. Los tratamientos de la harina de soya a pH 5.5 a 30°C por tres horas con una relación de agua:harina 4:1 con Natuphos y Allzyme SSF obtuvieron la mayor disponibilidad de fósforo con valores de $4.1 \pm 0.6 \mu\text{g P/mg}$ de harina para Natuphos y $3.8 \pm 0.4 \mu\text{g P/mg}$ de harina para Allzyme SSF. En el caso PhyC-R los mejores resultados se obtuvieron a pH 6.3, 30°C por tres horas con una relación de agua:harina 20:1 disponiendo de $3.2 \pm 0.2 \mu\text{g P/mg}$ harina. El tratamiento de harina de chícharo a 30°C por 3 horas al pH del agua (6.3), en una relación de 20:1 (agua:harina), fue la condición experimental en la que se logró la mayor disponibilidad de fósforo con cada una de las fitasas evaluadas. Bajo esta condiciones con Natuphos se obtuvieron niveles de $5.5 \pm 0.1 \mu\text{g P/mg}$ de harina (80 % del fósforo liberado por acción de Natuphos); con Allzyme SSF y PhyC se liberaron $4.7 \pm 0.2 \mu\text{g P/mg}$ de harina (66 % del fósforo liberado por acción de las fitasas).

Discusión

Las diferencias en el perfil electroforético entre PhyC-N y PhyC-R probablemente se debe a la glicosilación presente en la forma recombinante. La PhyC-N cuenta con de N-glicosilación teóricos, los cuales pueden ser empleados por el sistema de glicosilación de *P. pastoris*, a pesar que la proteína nativa no esté glicosilada, tal como ha sido descrito para otras proteínas (Han *et al.*, 1999).

El intervalo de pH en el cual las fitasas comerciales Natuphos y Allzyme SSF mostraron actividad está en concordancia con el descrito (2.5 a 6) para la mayoría de las fitasas del género *Aspergillus* (Vohra & Satyanarayana, 2003). La PhyC-R presentó actividad a intervalos más amplios de pH (5.5 a 9) y temperatura (25 a 70°C) que las fitasas comerciales, con un máximo de actividad a pH 9 y conservando hasta un 68% de actividad a pH 5.5. Este es un comportamiento característico de las fitasas del género *Bacillus* (Kerovuo *et al.*, 1998).

En general, la PhyC-R mostró mayor estabilidad al tratamiento térmico a 80°C que las dos fitasas comerciales e incluso que la PhyC-N a pH 5.5. La estabilidad térmica de la PhyC-R dependió del

pH y de la concentración de calcio presente. La estabilidad térmica dependiente de la concentración de calcio fue reportada para PhyC-N (Kerovuo *et al.*, 2000) con una actividad residual a 80°C (10 min) de 43% en presencia de 5 mM de CaCl₂. En el caso de PhyC-R, el valor de la actividad residual a 80°C se incrementó al doble (85%) que el descrito para la PhyC-N y fue semejante a los reportados para las fitasas más termoestables (Tye *et al.*, 2002). El aumento de la estabilidad térmica de PhyC-R respecto a lo reportado para la forma nativa pudo ser debido a la glicosilación presente en PhyC-R, generada durante su síntesis en *P. pastoris*, lo cual concuerda con lo reportado por otros autores (Han & Lei, 1999). En este estudio, se realizaron por primera vez ensayos de susceptibilidad de fitasas a enzimas digestivas de camarón. Todas las fitasas fueron estables a las enzimas digestivas de camarón y a la tripsina porcina. El aumento de la actividad residual debido al tratamiento con enzimas proteolíticas ha sido descrito previamente para la fitasa r-AppA de *Escherichia coli* (Rodríguez *et al.*, 1999) tratada con pepsina, concluyendo que se generaron polipéptidos de r-AppA con actividad de fitasa estables a la pepsina. La estabilidad de PhyC-N frente a proteasas (Kerovuo *et al.*, 2000) se mantiene en PhyC-R frente a tripsina porcina y a las enzimas digestivas de camarón con valores de actividad residual hasta del 100%. Tanto las fitasas comerciales como la PhyC-R son estables al tratamiento por 30 min con el extracto de enzimas digestivas de camarón, el cual contiene una mezcla de tripsina, quimiotripsina, elastasa y catepsina, presentando mayor actividad específica de quimiotripsina.

Los tratamientos de ambas harinas con fitasas mostraron niveles de fósforo liberado superiores a los presentados por el control, indicando la acción de las fitasas durante los tratamientos. Hasta un 20% del total del fósforo liberado en harina de chícharo se debió a factores endógenos, justificando la presencia de fitasas o fosfatasa endógenas en esta leguminosa (Fredrikson *et al.*, 2001). Los valores de fósforo disponible en este estudio se aproximaron al valor del fósforo fítico presente en harina de soya. Eliminando el valor de fósforo liberado por la acción de factores endógenos, se logró liberar hasta un 96, 84 y 68% del fósforo fítico en los tratamientos de la harina de soya con Natuphos, Allzyme SSF y PhyC-R, respectivamente, y hasta un 80% (Natuphos) y 66% (Allzyme SSF y PhyC-R) del fósforo fítico en los tratamientos de harina de chícharo.

PhyC-R ofrece una alternativa viable para mejorar las propiedades nutrimentales de harinas de origen vegetal, mediante su acción *in vitro* o *in vivo* en especies como el camarón blanco del Pacífico y aquellas con fisiología semejante con tractos digestivos neutros o básicos, o bien en especies agástricas como algunos peces y crustáceos (Ling *et al.*, 2007).

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo económico por parte del CONACYT-SAGARPA (2003-02-141) y PAICYT (CN1114-05). JGCT, KPCT y JAGL agradecen la beca del CONACYT.

Bibliografía

- Bai DQ, Qiao XT, Wei D, Guo L, Qi HL. 2004. Effects of phytase on the performance of protein hydrolysis enzyme in the intestine and liver of common carp. *J. Chin. Feed* 2: 34–38.
- Barrientos L, Scott JJ, Murthy PP. 1994. Specificity of hydrolysis of phytic acid by alkaline phytase from lily pollen. *Plant Physiol.* 106: 1489–1495.
- Baruah K, Sahu NP, Pal AK, Debnath D. 2004. Dietary phytase: an ideal approach for a cost effective and low-polluting aquafeed. *NAGA World Fish Center Quart.* 27: 15–19.
- Davis DA, Johnston WL, Arnold CR. 2000. El uso de suplementos enzimáticos en dietas para camarón. pp 452-462. En: Civera-Cerecedo, R., Perez-Estrada C.J., Rique Marie D. y Cruz-Suárez L.E. (eds.) *Avances en Nutrición Acuicola IV. Memorias del IV Simposio Internacional en Nutrición Acuicola.* Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México.
- Debnath D, Pal AK, Sahu NP. 2005. Effect of dietary microbial phytase supplementation on growth and nutrient digestibility of *Pangasius pangasius* (Hamilton) fingerlings. *Aquacult Res* 36(2): 180–187.
- Fiske CH, Subbarow Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375-400.
- Fredrikson M, Alminger ML, Carlsson NG, Sandberg AS. 2001. Phytate content and phytate degradation by endogenous phytase in pea (*Pisum sativum*). *J. Sci. Food Agric.* 81: 1139-1144.
- Guerrero-Olazarán M, Rodríguez-Blanco L, Viader-Salvadó JM. 2007. Producción de una fitasa recombinante en *Pichia pastoris*. *CIENCIA UANL* 10(4): 413-418.
- Haefner S, Knietzsch A, Scholten E., Braun J, Lohscheidt M, Zelder O. 2005. Biotechnological production and applications of phytases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 588–597.
- Han Y, Wilson DB, Lei XG. 1999. Expression of an *Aspergillus niger* phytase gene (*phyA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1915–1918.
- Hara A, Ebina S, Kondo A, Funagua T. 1985. A new type of phytase from *Typha latifolia* L. *Agric. Biol. Chem.* 49: 3539–3544.
- Idriss EE, Makarewicz O, Farouk A, Rosner K, Greiner R, Bochow H, Richter T, Borriss R. 2002. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant growth-promoting effect. *Microbiology* 148: 2097–2109.
- Jackson L, Li MH, Robinson EH. 1996. Use of microbial phytase in channel catfish *Ictalurus punctatus* diets to improve utilization of phytate phosphorus. *J. World. Aquacult. Soc* 27(3): 309–313.
- Kerovuo J, Lauraeus M, Nurminen P, Kalkkinen N, Apajalahti J. 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2079–2085.
- Kerovuo J, Lappalainen I, Peinikainen T. 2000. The metal dependence of *Bacillus subtilis* phytase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268(2): 365-369.
- Kim YO, Lee JK, Kim HK, Yu JH, Oh TK. 1998. Cloning of the thermostable phytase gene (*phy*) from *Bacillus sp.* DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 162: 185–191.

- Lei XG, Stahl CH. 2001. Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 474-481.
- Li MH, Robinson EH. 1997. Microbial phytase can replace inorganic phosphorus supplements in channel catfish *Ictalurus punctatus* diets. *J. World Aquacult. Soc* 28: 402-406.
- Ling C, Weimin W, Chengtai Y, Yi Y, James DC, Amararatne Yakupitiyage B, Zhi L, Dapeng L. 2007. Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme Microbial Technol.* 40: 497-507.
- Liu BL, Rafiq A, Tzeng YM, Rob A. 1998. The induction and characterization of phytase and beyond. *Enzyme Microbial Technol.* 22: 415-424.
- Mayer A.F, Hellmuth K, Schlieker H, Lopez-Ulibarri R, Oertel S, Dahlems U, Strasser AWM, van Loon APGM. 1999. An expression system matures: A highly efficient and cost-effective process for phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol. Bioeng.* 63: 373-381.
- Miksch G, Kleist S, Friehs K, Flaschel E. 2002. Overexpression of the phytase from *Escherichia coli* and its extracellular production in bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 685-694.
- Oh BC, Choi WC, Park S, Kim Yo, Oh TK. 2004. Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 362-372.
- Papatryphon E, Howell RA, Soares JH. 1999. Growth and mineral absorption by striped bass *Morone saxatilis* fed a plant feedstuff based diet supplemented with phytase. *J. World Aquacult. Soc.* 30: 161-173.
- Powar VK, Jagannathan V. 1982. Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 151: 1102-1108.
- Riche M, Trottier NL, Ku PK. 2001. Apparent digestibility of crude protein and apparent availability of individual amino acids in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed phytase pretreated soybean meal diets. *Fish Physiol. Biochem.* 25: 181-194.
- Ricque-Marie D, Cruz-Suarez LE, Zavala-Chavez BM, Nieto-Lopez M, Guajardo C, Tapia-Salazar McCallum IM and Newkirk R. 2004. Effect of a phytase product on protein and phosphorus digestibility in shrimp *Litopenaeus vannamei* fed an air classified pea protein flour (Ppf) based diet. In: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U. y González, M. 2004. Avances en Nutrición Acuicola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.
- Robinson EH, Li MH, Manning BB. 2002. Comparison of microbial phytase and dicalcium phosphate for growth and bone mineralization of pond-raised channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Appl. Aquacult.* 12: 81-88.
- Rodriguez E, Porres JM, Han Y, Lei XG. 1999. Different sensitivity of recombinant *Aspergillus niger* phytase (r-phyA) and *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase (r-AppA) to trypsin and pepsin *in vitro*. *Arch. Biochem. Biophys.* 365(2): 262-267.
- Sajjadi M, Carter CG. 2004. Effect of phytic acid and phytase on feed intake, growth, digestibility and trypsin activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquacult. Nutr.* 10(2): 135-142.
- Schaefer A, Koppe WM. 1995. Effect of a microbial phytase on utilization of native phosphorus by carp in a diet based on soybean meal. *Water Sci. Technol.* 31(1): 149-155.

- Scott JJ. 1991. Alkaline phytase activity in nonionic detergent extracts of legume seeds. *Plant Physiol.* 95: 1298–1301.
- Storebakken T, Shearer KD, Roem AJ. 1998. Availability of protein, phosphorus and other elements in fishmeal, soy-protein concentrate and phytase-treated soy-proteinconcentrate-based diets to Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 161(1): 365–379.
- Sugiura SH, Gabaudan J, Dong FM, Hardy RW. 2001 Dietary microbial phytase supplementation and the utilization of phosphorus, trace minerals and protein by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) fed soybean meal-based diets. *Aquacult. Res.* 32: 583–592.
- Tye AJ, Siu FK, Leung TY, Lim BL. 2002. Molecular cloning and the biochemical characterization of two novel phytases from *B. subtilis* 168 and *B. licheniformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 190–197.
- Urbano G, Lopez-Jurado M, Aranda P, Vidal-Valverde C, Tenorio E, Porres J. 2000. The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function? *J. Physiol. Biochem.* 56: 283–294.
- Van Etten RL, Davidson R, Stevis PE, MacArthur H, Moore DL. 1991. Covalent structure, disulfide bonding, and identification of reactive surface and active site residues of human prostatic acid phosphatase. *J Biol Chem* 266:2313–2319.
- Van Weerd JH, Khalaf KH, Aartsen EJ, Tijssen PA. 1999. Balance trials with African catfish *Clarias gariepinus* fed phytase-treated soybean meal-based diets. *Aquacult. Nutr.* 5(2): 135–142.
- Viader-Salvadó JM, Castillo-Galván M, Guerrero-Olazarán M. 2008. Desarrollo de un proceso para la producción de una fitasa recombinante. Memoria en extenso IV Simposio Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Villahermosa Tabasco, México, 24-26 de septiembre de 2008.
- Vielma J, Lall SP, Koskela J. 1998. Effects of dietary phytase and cholecalciferol on phosphorus bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 163(3): 309–23.
- Vielma J, Ruohonen K, Gabaudan J, Vogel K. 2004. Top-spraying soybean mealbased diets with phytase improves protein and mineral digestibility but not lysine utilization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquacult. Res.* 35(10): 955–964.
- Vohra A, Satyanarayana T. 2003. Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 23(1): 29-60.
- Wyss M, Brugger R, Kronenberger A, Remy R, Fimbel R, Oesterhelt G, Lehmann M, van Loon APGM. 1999. Biochemical characterization of fungal phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase): Catalytic properties. *Appl. Environm. Microbiol.* 65: 367-373.
- Yoo GY, Wang XJ, Choi SM, Han KM. 2005. Dietary microbial phytase increased the phosphorus digestibility in juvenile Korean rockfish *Sebastes schlegeli* fed diets containing soybean meal. *Aquaculture* 243: 315–322.
- Yu FN, Wang DZ. 2000. The effects of supplemental phytase on growth and the utilization of phosphorus by crucian carp *Carassius carassius*. *J. Fish Sci. Chin.* 7(2): 106–109.