

Empleo de fitasas como ingrediente funcional en alimentos

Carmen Frontela, Gaspar Ros, Carmen Martínez

Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.
Campus de Espinardo, Murcia, España

RESUMEN. Algunos métodos empleados durante el procesado industrial de cereales y leguminosas producen una reducción en la concentración de ácido fítico presente, sin embargo, ésta reducción o inactivación es sólo parcial. Con la finalidad de mejorar la hidrólisis del ácido fítico, se ha comprobado que la adición de fitasas exógenas (myo-inositol hexafosfato fosfohidrolasas) procedente de diferentes orígenes puede tener una importante eficacia en alimentación animal. Diversos estudios sobre el empleo de fitasas exógenas en alimentación humana han demostrado un gran potencial para su empleo en mejora de la disponibilidad mineral, pudiendo esta capacidad ser utilizada para reducir el elevado riesgo que presentan ciertos grupos de la población expuestos a padecer déficits minerales como los vegetarianos, los niños alimentados con fórmulas infantiles elaboradas con soja o los habitantes de países en vías de desarrollo en los que alimentos ricos en ácido fítico como los cereales y las leguminosas son la base de su nutrición. No obstante, en los últimos años han surgido evidencias que demuestran que el ácido fítico ejerce una importante acción beneficiosa sobre el organismo.

Palabras clave: Acido fítico, fitasas, disponibilidad mineral, alimento funcional.

INTRODUCCION

Los granos de cereales y las semillas de leguminosas contienen cantidades considerables de ácido fítico (1%-2%), cuya principal función es almacenar fósforo como fuente de energía para la planta (1). El ácido fítico (myo-inositol hexafosfato) posee la capacidad de establecer fuertes uniones iónicas con minerales esenciales en la nutrición formando quelatos insolubles que no pueden ser absorbidos por el organismo (2). Está demostrado que el ser humano presenta una limitada capacidad de hidrolizar el ácido fítico, produciéndose como consecuencia una importante disminución en la absorción de los minerales implicados (3). Para producir la hidrólisis del ácido fítico de una manera eficaz, se hace necesaria la presencia de unas enzimas con actividad fosfohidrolasa llamadas fitasas. Estas enzimas hidrolizan el ácido fítico a derivados de inositol fosfato con un menor número de fosfatos (Figura 1) e incluso a inositol libre y que presentan una menor capacidad de unirse a minerales. Las fitasas se encuentran de forma común en la naturaleza, pudiendo ser de origen microbiano, vegetal o animal (4). Varias de estas fitasas han sido clonadas y caracterizadas

SUMMARY. Application of phytases as functional ingredient in foods. Various food processing and preparation methods result in a reduction in the phytate content of cereals and legumes. However, in general during these processes, phytate is not fully hydrolysed. To alleviate the aforementioned problems in the production of animal feeds, exogenous phytases (myo-inositol hexaphosphate phosphohydrolases) have been widely used. There is great potential, therefore, to use this class of enzymes in the processing and manufacturing of food for human consumption given the capacity to improve mineral bioavailability. This is seen as a way to reduce the risk of mineral deficiency in vulnerable groups including; child-bearing women; strict vegetarians; babies consuming soy-based infant formulas; and the inhabitants of developing countries. There is, however, growing evidence to demonstrate the beneficial role played by phytic acid in all human organisms.

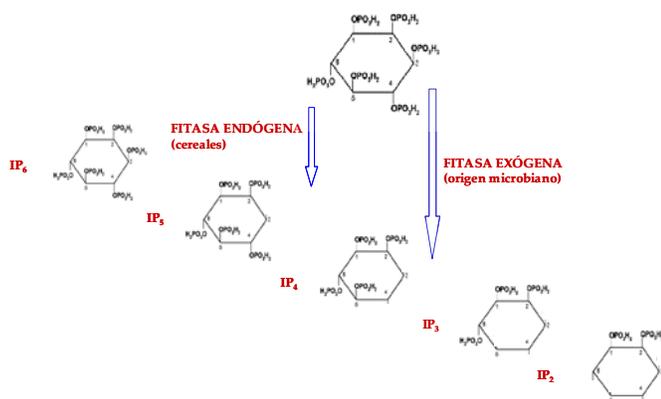
Keywords: Phytic acid, phytase, mineral bioavailability, functional food.

genéticamente (5). Las fitasas (myo-inositol hexafosfatohidrolasas), son enzimas con actividad fosfomonoesterasa capaces de hidrolizar ácido fítico (myo-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6 hexakisfosfato) para producir ortofosfato inorgánico y una serie de ésteres fosfóricos menores (desde inositol penta- a monofosfato como productos intermediarios) liberando finalmente el myo-inositol. Dos fitasas están reconocidas por la IUPAC-IUB (International Union of Pure and Applied Chemistry-International Union of Biochemistry) (1976): 3-fitasa (EC 3.1.3.8) y 6-fitasa (EC 3.1.3.26), estas enzimas comienzan la defosforilación del myo-inositol en las posiciones 3 y 6 respectivamente. La 3-fitasa se encuentra en animales y microorganismos mientras la 6-fitasa está presente en vegetales. Existen evidencias de que las fitasas pueden incrementar significativamente, la utilización de fósforo fítico (6-10), hecho que ha sido descrito como de un gran interés en nutrición humana y animal así como para el medio ambiente ya que supone una reducción en la excreción de fósforo (11). La ingesta de ácido fítico parece sin embargo no tener sólo implicaciones negativas como antinutriente en la salud del ser humano. Numerosos estudios han demostrado sus propiedades antiinflamatoria y antitumoral debido a su capacidad para

inhibir la proliferación celular y la angiogénesis, inducir la apoptosis o muerte celular programada, así como de regular la expresión de determinados oncogenes (12,13). El ácido fítico ha sido también reconocido por su capacidad para estimular el sistema inmune, prevenir la formación de cálculos renales y reducir el riesgo de aparición de enfermedades cardiovasculares (11,13).

El propósito del presente artículo es realizar una revisión de los trabajos publicados en los últimos años que estudian las implicaciones del ácido fítico en la salud humana, así como la posibilidad del empleo de determinadas fitasas en nutrición humana.

FIGURA 1
Productos generados a partir de la hidrólisis del ácido fítico (IP₆)



Tipos de fitasas

Existen diferentes criterios para la clasificación de las fitasas. Basándonos en su pH óptimo, las fitasas se pueden clasificar en fitasas ácidas y alcalinas. Además, si se tiene en cuenta la posición del carbono del anillo de *myo*-inositol en la molécula de fitato por el que la fitasa comienza el proceso de desfosforilación, se clasifican en 3-fitasa (E.C. 3.1.3.8), 6-fitasa (E.C. 3.1.3.26) y 5-fitasa (E.C. 3.1.3.72) (14). No obstante el criterio más importante para clasificar las fitasas es por su origen (vegetal, animal o microbiano) (15). La actividad fitasa se mide en unidades fitasa, que se definen como la cantidad de fitasa que libera 1 μmol de fosfato inorgánico a partir de una disolución 1 mM de fitato de sodio por minuto a un pH de 5.5 y T^a de 37°C. Así, la actividad fitásica de diferentes cereales es, alta para el trigo (2078 U/kg), centeno (5453 U/kg) y triticale (1100 U/kg), mediana para la cebada (925 U/kg) y más baja para el arroz (120 U/kg), maíz (12 U/kg), sorgo (24 U/kg), soja (31 U/kg) y avena (42 U/kg) (16). Entre las fitasas procedentes de microorganismos se encuentran aquellas procedentes de hongos (especies de *Aspergillus*), levaduras (*Saccharomyces* y *Peniophora*), y algunas bacterias (*Bacillus*,

Enterobacter, *Pseudomonas*). Estas fitasas siguen un cierto orden para la hidrólisis de la molécula de fitato, es decir, después de ser liberado el grupo fosfato de la posición 3 de la molécula, continúa en el siguiente orden, 4, 5, 6 y 2 (17). La temperatura óptima de estas enzimas se encuentra entre 60°C a 70°C, y presentan una actividad en general elevada siendo de un mínimo de 5000 FTU/g presentan un pH óptimo de actividad a los valores 2 y 5.5 (18), aunque existen variaciones según el microorganismo del cuál procedan. La mayor estabilidad físico-química de las fitasas de origen microbiano en relación a aquellas procedentes de vegetales ha hecho que las primeras reciban una mayor atención debido a sus mayores posibilidades para ser empleadas en la industria alimentaria (11). La actividad fitásica en animales fue demostrada por primera vez en ratas a nivel intestinal (19), mientras que otros estudios han demostrado igualmente su presencia en humanos (20,21). No obstante, se ha demostrado que la presencia de fitasa endógena de los cereales y/o leguminosas es esencial para producir la hidrólisis del ácido fítico a nivel intestinal, ya que la actividad de la fitasa propia del intestino parece ser insignificante (22).

Estrategias de eliminación del ácido fítico. Empleo de fitasas

Los métodos físicos de procesamiento industrial utilizados habitualmente tales como la molienda o triturado del cereal, consiguen reducir los niveles de ácido fítico, aunque el remojo y la germinación de las semillas, así como los procesos de fermentación han demostrado ser más eficaces en la eliminación de los fitatos presentes. El fundamento de estos últimos es la activación de las fitasas endógenas de las semillas, que producen una degradación del contenido en ácido fítico. Sin embargo, el modo más frecuente de eliminar el IP₆ es la adición de fitasa exógena, producida principalmente por bacterias o levaduras (23). La mayoría de las investigaciones desarrolladas recientemente en el campo de las fitasas, están fundamentalmente encaminadas a la identificación de fitasas nuevas, incrementando la producción de las mismas con una reducción en sus costes, y mejorando las características del enzima para su aplicación en un alimento determinado. Una de las características fundamentales a tener en cuenta es la termotolerancia que presentan las fitasas. Aunque algunas fitasas han sido aisladas, clonadas y caracterizadas, recientes investigaciones han mostrado que las fitasas de origen microbiano presentan prometedoras aplicaciones tecnológicas, existiendo un gran número de microorganismos potencialmente capaces de producir fitasas. El empleo de fitasas procedentes de determinados microorganismos (*Bacillus subtilis*, *Saccharomyces* o *Aspergillus*), ha sido aprobado en un gran número de países, y está reconocido por la FDA (U.S. Food and Drug Administration) como seguro para el hombre permitiendo su uso como ingrediente en alimentos (24-26).

Además, el conocimiento de las propiedades físico-químicas de cada una de las fitasas empleadas permitiría la degradación controlada del ácido fítico presente en el alimento.

En nutrición humana, las fitasas de origen microbiano han sido empleadas en el estudio de la absorción mineral pero pueden existir objeciones a su aplicación especialmente en alimentos destinados a los niños, no obstante la industria alimentaria está mostrando un creciente interés en el empleo de estas fitasas para mejorar la calidad nutricional de los alimentos, produciendo así alimentos funcionales. Por lo tanto, un estudio preliminar de las fitasas microbianas que presenten las propiedades más adecuadas para su aplicación en los alimentos, así como la optimización de las propiedades catalíticas y de estabilidad de las mismas supondría un acercamiento para conseguir fitasas adecuadas para su aplicación específica en el procesado de cereales y leguminosas.

A fin de conseguir una completa degradación del contenido en ácido fítico durante el procesado de los alimentos, y de este modo incrementar la disponibilidad mineral, son numerosas las investigaciones que apuntan al empleo de fitasas de origen exógeno como estrategia (27,28,4,29). Es por lo tanto de una gran importancia conocer las condiciones óptimas de actividad de la fitasa empleada, teniendo en cuenta que estas condiciones dependen del tipo de cereal con el que se está trabajando. La mayoría de las fitasas procedentes de cereales presentan un pH óptimo de actividad entre 4.5-5.6, mientras que las procedentes de leguminosas, presentan un pH óptimo en valores de 7 o superiores (30). Se ha comprobado que en el salvado de trigo la aplicación de las condiciones óptimas de actividad produce la degradación completa del ácido fítico, reduciendo casi totalmente el elevado efecto inhibitorio que presenta este cereal sobre la absorción del hierro (31). No obstante, existen evidencias que ponen de manifiesto que el empleo de fitasas procedentes de microorganismos como es el caso de hongos del género *Aspergillus spp.* son el método más sencillo y eficaz de conseguir la completa eliminación del ácido fítico produciendo un importante incremento en la absorción de hierro (32), lo cual podría suponer que el empleo de estas enzimas de origen microbiano durante el procesado de los alimentos, podría ser en un futuro cercano factible de ser empleado en la industria alimentaria a fin de incrementar la disponibilidad mineral de los alimentos producidos (30). El uso de fitasa de origen microbiano está actualmente autorizado para su empleo en alimentación animal, y está encaminado a incrementar la disponibilidad del fósforo del ácido fítico reduciendo la excreción fecal del mismo al ambiente (33). En el caso del preparado enzimático de 6-fitasa producido por *Aspergillus oryzae* (DSM 14223), éste fue autorizado para los pollos de engorde, las gallinas ponedoras, los pavos de engorde, los lechones, los cerdos de engorde y las cerdas por el Reglamento (CE) n° 255/2005 de la Comisión Europea (34), y actualmente se han presentado nuevos datos en apoyo a una

solicitud para ampliar la autorización del uso de este preparado enzimático a los salmónidos. Aunque actualmente no está autorizado el uso de fitasas exógenas en nutrición humana, se han realizado numerosos estudios sobre la adición de estas enzimas procedentes de diferentes orígenes en alimentos empleados en nutrición humana. En este sentido, Anno *et al.*, (35) consiguieron eliminar los fitatos presentes en leche de soja mediante la adición de fitasa procedente del trigo. Simell *et al.*, (36) obtuvieron un preparado de proteína de soja libre de fitatos tras la aplicación de la 3-fitasa A (EC 3.1.3.8) produciéndose un incremento en la solubilidad a bajo valor de pH (pH 3) comparado con el mismo preparado con presencia de fitatos. Otros estudios (32) han comprobado el efecto de la adición de fitasa procedente de *Aspergillus niger* (3-fitasa) en harina de trigo, observando que incrementa la absorción de hierro en humanos. La misma fitasa, fue empleada por Hurrell *et al.*, (37) para desfitinizar alimentos complementarios a base de cereales realizando para ello estudios en humanos, y por Davidsson *et al.*, (38) estudiando su aplicación sobre fórmulas infantiles elaboradas con soja. El empleo de esta misma enzima, fue investigada igualmente por Urbano *et al.*, (39) sobre harina de guisantes, mientras que Zyla *et al.*, (40) realizaron estudios de adición de 3-fitasa durante la elaboración del pan a partir de harina de trigo. Estudios más recientes (41) apuntan igualmente a los posibles beneficios de la aplicación de una fitasa exógena sobre alimentos destinados a consumo humano a fin de incrementar su disponibilidad mineral, por ejemplo la adición de fitasa microbiana en una fórmula líquida a base de soja, incrementó la absorción del hierro en adultos (42).

En base a los datos aportados, y tal y como han confirmado algunos estudios (43,14,11), que el procesado industrial de alimentos destinados a alimentación humana podría ser un posible campo de aplicación de las fitasas exógenas. Ya que aunque algunos métodos de procesado industrial de alimentos empleados actualmente consiguen reducir de un modo considerable el contenido en ácido fítico (44), el empleo de una fitasa exógena durante el procesado de alimentos ricos en ácido fítico podría resultar más efectivo desde el punto de vista de conseguir una mejora en la biodisponibilidad mineral al degradar completamente el ácido fítico presente.

Fitasa como ingrediente para obtener alimentos funcionales

Existen numerosas definiciones que responden al concepto de alimento funcional. La definición dada por el International Life Science Institute (ILSI) en el documento de consenso Functional Food Science in Europe (FUFOSE) en 1999, establece que un alimento funcional es aquel que ha demostrado de manera satisfactoria que posee un efecto beneficioso sobre una o varias funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, siendo este hecho

relevante para la mejoría de la salud y el bienestar y/o la reducción del riesgo de enfermedad. En este sentido, es importante destacar que la biotecnología aplicada a la obtención de fitasas que se emplea actualmente en alimentación animal podría ser utilizada el día de mañana en el procesado de alimentos de consumo humano. Se obtendrían, de este modo, alimentos con una mayor biodisponibilidad mineral y que al mismo tiempo presenten un mayor contenido en inositoles de bajo número de fosfatos resultantes de la hidrólisis del ácido fítico, y que han demostrado ejercer un importante papel en determinados procesos fisiológicos como segundos mensajeros en la respuesta celular o presentando cierto carácter antiinflamatorio (30,45,46).

La obtención de alimentos con una adecuada disponibilidad mineral mediante la eliminación de parte de su contenido en ácido fítico ha sido estudiada previamente. Se sabe que la relación molar ácido fítico/mineral, es decir número de moles de ácido fítico frente al número de moles de mineral presentes, es indicadora de la disponibilidad mineral de ese alimento (47). De este modo, en el caso del Fe, se sabe que una relación molar inferior o igual a 0.4 en el alimento, no compromete la disponibilidad del mineral (28); para el caso del calcio, la relación molar existente debe ser inferior a 0.17 (48); mientras que para el cinc, se ha establecido que una relación molar inferior a 18, no compromete la disponibilidad del mineral (49).

Las tendencias principales en la alimentación funcional, hoy día, están referidas a nutrientes específicos que actúen sobre una función fisiológica diana que se traduzca en un efecto beneficioso para la salud. Se hace por lo tanto necesario desarrollar nuevas estrategias que incrementen la ingesta diaria de minerales biodisponibles. Actualmente, las estrategias más frecuentemente empleadas para reducir la incidencia de malnutrición por déficit mineral son el empleo de suplementos farmacéuticos, el enriquecimiento de los alimentos, una dieta más variada, y el tratamiento de enfermedades concomitantes (50). Aunque durante el procesado de los alimentos en la industria, la separación física de las partes de la semilla más ricas en fitato, consigue un importante descenso en el contenido del mismo. Es interesante destacar que el procesado que incluye tratamiento físico de las semillas como la molienda o el triturado, va en general acompañado de un descenso en los niveles de otros nutrientes que son eliminados al mismo tiempo que se eliminan partes de la semilla ricas en fitatos, o bien son destruidos al aplicar elevadas temperaturas necesarias para eliminar el ácido fítico mediante métodos no enzimáticos. Mientras que la degradación del ácido fítico mediante métodos enzimáticos, sucede en general bajo condiciones suaves y por tanto no afecta a otros componentes del alimento (14).

Estudios más recientes (14) afirman que incrementar el nivel total de micronutrientes en las partes comestibles del alimento, al tiempo que se incrementa la concentración de componentes que favorezcan su captación y/o disminuyendo

el contenido en componentes que inhiben su absorción mediante el empleo de variedades de la planta o mediante el empleo de la ingeniería genética son importantes estrategias encaminadas a reducir de un modo eficaz la incidencia de enfermedades relacionadas con un déficit de micronutrientes. En base a la información aportada podemos afirmar que se hace necesario el desarrollo de estudios encaminados a determinar la total inocuidad de la fitasa para su empleo como aditivo en alimentos destinados a nutrición humana. Podemos concluir que la aplicación de fitasa podría encontrar una interesante aplicación durante el procesado de los alimentos para obtener productos con un mayor valor nutricional, beneficiosos para la salud y que mantengan intactas sus propiedades organolépticas.

REFERENCIAS

1. Raboy V. Myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochemistry*, 2003; 64:1033-43.
2. Hurrell RF, Juillerat MA, Reddy MB, Lynch SR, Dassenko SA, Cook JD. Soy protein, phytate, and iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr*. 1992; 56:573-578.
3. Erdman JW. Oilseed phytates: nutritional implications. *J A.O.C.S.* 1979; 56, 736-741.
4. Konietzny U, Greiner R. Bacterial phytase: potential application, *in vivo* function and regulation of its synthesis. *Braz J Microbiol*, 2004; 35:11-18.
5. Tijssens LMM, Greiner R, Biekman ES, Konietzny U. Modeling the effect of temperature and pH on activity of enzymes: the case of phytases. *Biotechnology and Bioengineering* 2001; 72: 3.
6. Denbow D, Grabau E, Lacy G, Kornegay E, Russell D y Umbeck P. Soybeans transformed with a fungal phytase gene improve phosphorus availability for broilers. *Poult Sci*. 1998; 77: 878-881.
7. Pan C, Igbasan F, Guenter W y Marquardt R. Effects of enzyme and inorganic phosphorus supplements in wheat and rye-based diets on laying hen performance, energy, and phosphorus availability. *Poult Sci*. 1998; 77: 83-89.
8. Maenz DD, Engele-Schaan CM, Newkirk RW, Classen HL. The effect of minerals and mineral quelators on the formation of phytase-resistant and phytase susceptible forms of phytic acid in solution and in solution and in a slurry of canola meal. *Anim. Feed Sci. Technol.* 1999; 81:171-192.
9. Dao TH, Hoang KQ, Dephosphorylation and quantification of organic phosphorus in poultry litter by purified phytic acid affinity *Aspergillus* phosphohydrolases. *Chemosphere*, 2008; 72:1782-7.
10. Manangi MK, Coon CN. Phytate phosphorus hydrolysis in broilers in response to dietary phytase, calcium and phosphorus concentrations. *Poult Sci*. 2008; 87:1577-86.
11. Bohn L, Meyer AS, Rasmussen SK. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *J Zhejiang Univ Sci. B*. 2008; 9:165-191.
12. Cholewa K, Parfiniewicz B, Bednarek I, Swiatkowska L, Jezienicka E, Kierot J, Weglarz L. The influence of phytic acid

- on TNF-alpha and its receptors genes expression in colon cancer Caco-2 cells. *Acta Pol Pharm*, 2008; 65:75-9.
13. Vucenic I, Shamsuddin AM. Protection against cancer by dietary IP₆ and inositol. *Nutr Cancer*, 2006; 55:109-125.
 14. Greiner R, Konietzny U. Phytase for food application. *Food Technol Biotechnol*. 2006; 44 (2): 125-140.
 15. Kerovuo J. A novel phytase from *Bacillus*. Characterization and production of the enzyme. Academic Dissertation 2000; Faculty of Science of the University of Helsinki.
 16. Zimmermann B, Lantzsch HJ, Langbein U, Drochner W. Determination of phytase activity in cereals grains by direct incubation. *J Anim Physiol. A Anim Nutr*. 2002; 86:347-352.
 17. Venekamp J, Tas A y Somers W. Developments in phytase activity determination: NMR-approach. In: Proceedings of the 2nd European symposium on feed Enzymes, Noordwijkerhout (W.Van Hartingsveldt, M. Hessing, J.P. Van der Lugt and W. Somers, eds). TNO, Zeist, The Netherlands, 1995; 151-156.
 18. Greiner R, Farouk AE. Purification and characterization of a bacterial phytase whose properties make it exceptionally useful as a feed supplement. *Protein J*, 2007;26:467-74.
 19. Bitar K, Reinhold H. Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosa of rat, chicken, calf and man. *Biochim. Biophys Acta* 1972; 268: 442-452.
 20. Iqbal TH, Lewis KO, Cooper BT. Phytase activity in the human and rat small intestine. *Gut* 1994; 35(9): 1233-1236.
 21. Schlemmer U, Jany KD, Berk A, Schulz E, Rechkemmer G. Degradation of phytate in the gut of pigs-pathway of gastrointestinal inositol phosphate hydrolysis and enzymes involved. *Arch Tierernahr*, 2001; 55:255-80.
 22. Agte V, Jahagirdar M, Chiplonkar.S. Apparent absorption of eight micronutrients and phytic acid from vegetarian meals in ileostomized human volunteers. *Nutrition* 2005; 21:678-685.
 23. Denstadli V, Vestre R, Svihus B, Skrede A, Storebakken T. Phytate degradation in a mixture of ground wheat and ground defatted soybeans during feed processing: Effects of temperature, moisture level, and retention time in small- and medium-scale incubation systems. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 5887-5893.
 24. Vuolanto A, von Weymarn N, Kerovuo J, Ojamo H, Leisola M. Phytase production by high cell density culture of recombinant *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters*, 2001; 23:761-766.
 25. Anlid TA, Veide J, Sandberg AS. Metabolism of extracellular inositol hexaphosphate (phytate) by *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol*. 2004; 97:157-169.
 26. Kumar Soni S, Malhar Khire J. Production and partial characterization of two types of phytase from *Aspergillus niger* NCIM 563 under submerged fermentation conditions. *World J Microbiol Biotechnol*, 2007; 23:1585-1593.
 27. Hurrell RF. Phytic acid degradation as a means of improving iron absorption. *Int J Vit Nutr Res*, 2004; 74:445-452.
 28. Lei XG, Porres JM. Phytases. In: W.G. Pond and A.W. Bell, Editors, *Encyclopedic of Animal Sciences*, Marcel Dekker, New York (2005): 704-07.
 29. Ravindran V, Cowieson AJ, Selle PH. Influence of dietary electrolyte balance and microbial phytase on growth performance, nutrient utilization, and excreta quality of broiler chickens. *Poult Sci*, 2008; 87:677-88.
 30. Sandberg AS, Andlid T. Phytogetic and microbial phytases in human nutrition. *Intl J Food Sci Tech*2002; 37: 823-833.
 31. Bohn L, Josefsen L, Meyer AS, Rasmussen SK. Quantitative analysis of phytate globoids isolated from wheat bran and characterization of their sequential dephosphorylation by wheat phytase. *J Agric Food Chem* 2007; 55:7547-52.
 32. Sandberg AS, Hulthen LR and Türk M. Dietary *Aspergillus niger* phytase increases iron absorption in humans. *J Nutr*. 1996; 126: 476-480
 33. Tomschy A, Tessier M, Wyss M, Brugger R, Broger C, Schnoebelen L, Van Loon A, Pasamontes L. Optimization of the catalytic properties of *Aspergillus fumigatus* phytase based on the three-dimensional structure. *Protein Science* 2000; 9:1304-1311.
 34. Reglamento (CE) n° 255/2005 de la Comisión. Diario Oficial de la Unión Europea, L 45/3, 16.2.2005.
 35. Anno T, Nakamishi K, Matsuno R, Kamikubo T. Enzymatic elimination of phytate in soybean milk. *J Japan Soc Food Sci Technol*. 1985; 32:174-180.
 36. Simell M, Turunen M, Piironen J, Vaara T. Feed and food applications of phytase. Lecture at 3rd Meet. Industrial Applications of Enzymes, 1989. Barcelona (España).
 37. Hurrell RF, Reddy MB, Juillerat MA, Cook JD. Degradation of phytic acid in cereal porridges improves iron absorption by human subjects. *Am J Clin Nutr*. 2003; 77: 1213-9.
 38. Davidsson L, Ziegler EE, Kastenmayer P, van Dael P, Barclay D. Dephytinisation of soyabean protein isolate with low native phytic acid content has limited impact on mineral and trace element absorption in healthy infants. *Br J Nutr*. 2004; 91:287-293.
 39. Urbano G, Aranda P, Gómez-Villalva E, Frejnagel S, Porres JM, Frias J, Vidal-Valverde C, López-Jurado M. Nutritional evaluation of pea (*Pisum sativum* L.) protein diets after mild hydrothermal treatment and with and without added phytase. *J Agric Food Chem*. 2003; 51:2415-2420.
 40. Zyla K, Mika M, Gambus H, Nowotuy A, Szymczyk B. Fungal phytases in wholemeal breadmaking I: 3-phytase improves storage stability and in vitro digestibility of nutrients in wheat breads. *Electronic J Polish Agricultural Universities* 2005; 8:4.
 41. Brinch-Pedersen H, Hatzack F, Stöger E, Arcalis E, Pontopidan K, Holm PB. Heat-stable phytases in transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.): Deposition pattern, Thermostability and phytate hydrolysis. *J Agric Food Chem*.2006; 54:4624-32.
 42. Hurrell RF, Juillerat MA, Reddy MB, Lynch SR, Dassenko SA, Cook JD. Soy protein, phytate, and iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr*. 1992; 56:573-578.
 43. Haefner S, Knietsch A, Scholten E, Braun J, Lohscheidt M, Zelder O. Biotechnological production and applications of phytases. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005; 68:588-597.
 44. Rehms H, Barz W. Degradation of stachyose, raffinose, melibiose and sucrose by different tempe-producing *Rhizopus* fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1995; 44(1-2):47-52.
 45. Miyamoto S, Kuwata G, Imai M, Nagao A, Terao J. Protective effect of phytic acid hydrolysis products on iron-induced lipid peroxidation of liposomal membranes. *Lipids*, 2000; 35:1411-13.

46. Sirén M, Linne L, Persson L. Pharmacological effects of D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate. In: *Inositol phosphate and Derivatives Synthesis. Biochemistry and Therapeutic Potential* (edited by AB Reitz): 1991;103-110. Washington DC: American Chemical Society.
47. Ma G, Jin Y, Piao J, Kok F, Gusje B, Jacobsen E. Phytate, calcium, iron and zinc contents and their molar ratios in foods commonly consumed in China. *J Agric Food Chem*, 2005; 53:10285-90.
48. Umeta M, West CE, Fufa H. Content of zinc, iron, calcium and their absorption inhibitors in food commonly consumed in Ethiopia. *J Food Comp Anal*. 2005; 18:803-817.
49. Hotz C, Brown K. International zinc nutrition consultative group (IZiNCG) technical document #1-assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Food Nutr Bull*. 2004; 25:S116-S117.
50. Maberly GF, Trowbridge FL, Yip R, Sullivan KM, West CE. Programs against micronutrient malnutrition: Ending hidden hunger, *Ann Rev Public Health* 1994;15: 277-301.

Recibido: 10-06-2008

Aceptado: 03-09-2008