

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá, D.C.,

Abogado
EMILIO FERRERO

ASUNTO Radicación 08 012 265
 Trámite 011
 Evento 378
 Actuación 519
 Oficio
 Folios 5 0 9 9 8 8

Patente de Invención	☒	Patente de Modelo de Utilidad	☐
Vía Nacional	☐		
Vía PCT (Fase Nacional)	☒	Capítulo I	☒
		Capítulo II	☐
No. Solicitud Internacional	PCT/FR2006/001653		
Fecha de Presentación Internacional	07/Julio/2006		

Como resultado del Examen de Fondo realizado, con fundamento en el Artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se comunica:

1. Documentos estudiados

Descripción:	Folios 106 a 190	07/Febrero/2008
Reivindicaciones:	Folios 191 a 193	07/Febrero/2008
Dibujos:	Folios 195 a 205	07/Febrero/2008
Secuencias:	Folios 206 a 215	07/Febrero/2008
Prioridad:	FR 05/07336	08/Julio/2005

2. Análisis de la Prioridad

Se acepta la reivindicación de prioridad porque esta solicitud fue presentada dentro del plazo establecido (Art. 9 D 486) y su contenido técnico corresponde con el de la prioridad reivindicada.

3. Objeto de la invención

Título de la solicitud: "Fitasa de *Debaryomyces Castellii*".

El problema que se propone resolver la solicitud consiste en proponer una fitasa que hidroliza todos los grupos fosfato del fitato y donde la actividad depende poco de las condiciones de puesta en obra de la enzima.

Para resolver este problema técnico la solicitud en estudio proporciona la fitasa de la secuencia SEQ ID No. 2, polinucleótido que codifica para una actividad fitasa de

secuencia SEQ ID No 1, casetes de expresión, vectores, organismos anfitriones transformados con el polinucleótido de la invención, aditivos nutricionales, aditivos nutricionales y alimentos.

El objeto de la presente Solicitud se relaciona con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP): C12N 9/16, C12N 1/15, C12P 3/00 y A23K 1/165.

4. No es una invención (Art 15 D 486 literal (b))

El objeto de las reivindicaciones 1 – 3 no se considera una invención, de acuerdo con el Art citado.

5. Reivindicaciones relativas a un uso o a un segundo uso (Art 14 y 21 D 486)

El uso de las reivindicaciones 14 y 15 no es patentable, de acuerdo con el Art 14.

6. De la Solicitud de Patente

Reivindicaciones (Art 30 D 486, Art 22 PCT)

Las reivindicaciones 4 y 5 no son concisas porque se refieren a un promotor funcional de un organismo anfitrión, una secuencia terminal dentro del mismo organismo anfitrión y un vector que comprende un polinucleótido sin definirlos inequívocamente, y por lo tanto no es posible distinguirlos del estado de la técnica. Se sugiere restringir la solicitud a una razonable generalización de lo que se encuentra debidamente soportado.

Las reivindicaciones 4 y 6 - 8 se refieren a un organismo anfitrión sin definir a cual organismo se refiere o definiéndolo por el grupo de microorganismos al cual pertenece, se sugiere al solicitante indicar los microorganismos anfitriones exactos según lo que se encuentra debidamente soportado en el capítulo descriptivo. Además, se sugiere al solicitante reemplazar la palabra organismo por microorganismo puesto que no existe soporte para otros organismos, y adicionalmente organismos como plantas o animales no serían patentables.

Solo se encuentra soporte como microorganismo modificado para el *Pichia pastoris*. Se sugiere restringir la solicitud a una razonable generalización de lo que se encuentra debidamente soportado en el capítulo descriptivo indicando además los números de depósito biológico.

Las reivindicaciones 10 y 13 se refieren a grados de fermentación de un organismo anfitrión. Se recuerda al solicitante que la fermentación es un proceso esencialmente biológico que además de ser no patentable no caracteriza al aditivo nutricional ni al alimento. Se sugiere eliminar la referencia a la fermentación de estas reivindicaciones.

Las reivindicaciones 9 y 13 se refieren a un aditivo nutricional y a un alimento que tiene un polipéptido, debido a que estas secuencias de aminoácidos solo pueden encontrarse en el aditivo alimentario o en el alimento cuando se encuentran en un microorganismo al cual fueron introducidas por un vector y que no se encuentra soporte de estas composiciones en las que el polipéptido se encuentre de forma aislada. Se sugiere realizar las aclaraciones necesarias.

Las reivindicaciones 9 -12 se refieren a un aditivo nutricional y a un alimento que se encuentran definidos porque contienen el polipéptido o el organismo anfitrión de la solicitud. Se recuerda al solicitante que tanto el aditivo nutricional como el alimento se deben definir por sus ingredientes y sus proporciones. Adicionalmente, si bien se nombran en el capítulo descriptivo, no se encuentra soporte de su obtención o prueba, se sugiere restringir la solicitud a una razonable generalización de lo que encuentra soporte en la descripción.

Descripción (Art 28 D 486)

Dado que esta solicitud se refiere a secuencias de nucleótidos o aminoácidos, estas además de ser presentadas en el listado de secuencias deben anexarse en formato digital.

Debido a que la solicitud se refiere a material biológico, es necesario presentar el Certificado de Depósito para el *Pichia pastoris* hiper productor de fitasa recombinante.

Se requiere al Solicitante hacer las aclaraciones necesarias.

7. Determinación del Estado de la Técnica

El estado de la técnica se determinó con base en la fecha de presentación de la solicitud de prioridad: 08/Julio/2005 y se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud:

Ítem	Documento	Título	Fecha de Publicación
D1	LAMBRECHTS, C. ET AL. Biotechnology Letters, Vol. 14, No 1, Pag. 61 - 66	"Utilization of Phytase by Some Yeast"	1992
D2	US2004/0091968	"Recombinant Phytases and Methods of Using Them"	13/Mayo/2004

D1 divulga (Pág. 61, resumen, FI 237) cepas de levadura con la capacidad de hidrolizar sales de ácido fítico, la *Schwanniomyces castelli* CBS 2863 tiene la mayor actividad fitasa.

D2<http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=US&NR=2004091968A1&KC=A1&FT=D&ND=3&date=20040513&DB=EPODOC&locale=en> EP divulga (Pág. 3, párrafo 35 – Pág. 4, párrafo 36; Pág. 4, párrafos 44 y 47) un método de producción recombinante para fitasa en levaduras como *Pichia pastoris* y *Schizosaccharomyces pombe*, suplementos dietarios y alimentos que contienen la fitasa.

8. Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

Nivel Inventivo (Art18 D486)

La reivindicación 4 consiste en un casete de expresión caracterizado en que comprende en el sentido de la transcripción:

- Un promotor funcional dentro de un organismo anfitrión;
- Un polinucleótido según la reivindicación 2; y
- Una secuencia terminal dentro del mismo organismo anfitrión

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1	D2
Un casete de expresión caracterizado en que comprende en el sentido de la transcripción:	Levaduras con actividad fitasa	Casete de expresión
Un promotor funcional dentro de un organismo anfitrión	No se menciona	Promotor
Un polinucleótido según la reivindicación 2	Fitasa de <i>Debaryomyces castelli</i>	Polinucleótido que codifica para un péptido con actividad fitasa
Una secuencia terminal dentro del mismo organismo anfitrión	No se menciona	Secuencia terminal

Los documentos D1 y D2 se consideran el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 4. El documento D1 divulga la actividad fitasa de la *Debaryomyces Castelli* (Pág. 64, líneas 31 – 34, Fl. 240). El documento D2 enseña un casete de expresión para un polinucleótido que codifica un polipéptido con actividad fitasa (Pág. 20, párrafo 241; Pág. 21, párrafos 244, 247 – 254)

El documento D2 también da a conocer suplementos dietarios y alimentos que contienen la fitasa (Pág. 31, párrafos 332 – 334; Pág. 40, tabla 1), composiciones líquidas y sólidas (Pág. 43, párrafos 413 – 415) y levaduras de expresión como la *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* (Pág. 4, párrafo 39; Pág. 47, párrafo 519 – Pág. 48, párrafo 520)

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 4 y el documento D1 es que no se divulga el casete de expresión que comprende un promotor, un polinucleótido que codifica para un péptido con actividad fitasa y la secuencia terminal.

El efecto que logra el casete de expresión que contiene un promotor, un polinucleótido que codifica para un péptido con actividad fitasa y una secuencia terminal es la obtención de una proteína recombinante con actividad fitasa.

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: “cómo obtener una proteína recombinante de la fitasa de *Debaryomyces castelli* conocida en el documento D1”.

Sin embargo, la obtención de fitasa recombinante con un casete de expresión que comprende un promotor, un polinucleótido que codifica con actividad fitasa y la secuencia terminal, ya está divulgada en el documento D2 (Pág. 21, párrafos 244, 247 – 254; Pág. 47, párrafo 520 – Pág. 48, párrafo 521).

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, obtendría la fitasa divulgada en el documento D1 de manera recombinante con un casete de expresión como el divulgado en el documento D2 para llegar así al objeto de la reivindicación 4 de la solicitud. Por lo cual se considera obvia.

Puesto que las reivindicaciones dependientes 5 – 13 no mencionan características inventivas adicionales tampoco se pueden considerar inventivas.

Conclusión:
La reivindicación 4 cumple el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumple con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

9. Conclusión

Los requisitos de Patentabilidad de la presente Solicitud están afectados así:

Ítem	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	LAMBRECHTS, C. ET AL. Biotechnology Letters, Vol. 14, No 1, Pag. 61 - 66	4 - 13	Nivel Inventivo
D2	US2004/0091968	4 - 13	Nivel Inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (60) días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

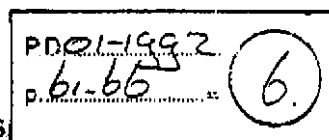
Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.


JOSÉ LUIS SALAZAR LÓPEZ
Director de Nuevas Creaciones (C)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 08 JUN. 2012

Elaborado por: Jeny Paola Villate Becerra *P. Villate*
Revisado por: Consuelo Leguizamón *C. Leguizamón*

XP-002053185



UTILIZATION OF PHYTATE BY SOME YEASTS

CHRISTEL LAMBRECHTS, HELENE BOZE, G. MOULIN AND P. GALZY.

Chaire de Microbiologie Industrielle et de Génétique des Micro-organismes, ENSA-INRA,
34060 Montpellier cedex, France.

SUMMARY

Of 21 yeast strains screened for ability to hydrolyse phytic acid salts, nine strains grew on sodium phytate as sole source of inorganic phosphate. Of the five most interesting strains for their growth parameters tested and for their phytase activity in batch-culture, *Schwanniomyces castellii* CBS 2863 had the highest phytase activity in presence of 5 g phytate l⁻¹.

INTRODUCTION

Phytic acid salts or phytate (myo-inositol hexakisphosphate) are abundant plant constituents, comprising 1-3% of all nuts, cereals, legumes, oil seeds, spores and pollen (Graf, 1983; Maga, 1982). They typically account for 60-90% of total seed phosphorous (Lolas *et al.*, 1976). The organically-bound phosphate of phytic acid is not metabolized by monogastric animals because they lack phytase (myo-inositol hexakisphosphohydrolase). Because phytate may bind certain minerals, making them unavailable for body utilization, this may be of nutritional concern (Morris, 1986).

Phytase hydrolyses phytic acid to inorganic phosphate (Pi) and inositol mono to pentaphosphates. Phytases are present in plants, microorganisms and certain animal tissues (Gibson and Ullah, 1988; Han *et al.*, 1987; Bitar and Reinhold, 1972). While phytase of wheat and other plants or fungi has been studied extensively, little is known about the phytase of yeast (Greenwood and Lewis, 1977; Harland and Frolich, 1989). This paper reports a survey of yeasts for the ability to hydrolyse phytate.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

The strains used come all from the Centraal Bureau voor Schimmelcultuur, Delft, NL.

Growth media and culture conditions

-YEG medium: 10 g glucose l^{-1} , 5 g yeast extract (Difco) l^{-1} .

-G medium (Galzy, 1964), rich in Pi ($2 g.l^{-1}$), containing 10 g galactose l^{-1} .

-MSA medium (low Pi content): vitamins and trace elements of G medium; $(NH_4)_2SO_4$, 3 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g; KCl, 0.5 g; $CaCl_2$, 0.1 g; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 7.9 mg; galactose 10 $g.l^{-1}$; sodium phytate (Sigma) as Pi source.

-solid MSA medium used for screening: 15 $g.l^{-1}$ galactose, 5 $g.l^{-1}$ of calcium phytate (Sigma) and 25 $g.l^{-1}$ of agar. The pH was adjusted to 5.4 by NaOH.

Media and phytate were autoclaved separately at $120^\circ C$ for 30 min. Vitamins and trace elements were sterilized by filtration through a $0.45 \mu m$ membrane.

The cultures grown on these media in Erlenmeyer flasks were buffered to pH 5.4 using a phthalate-NaOH buffer (0.2 M). Aerobic cultures were grown using a shaker (80 oscillations per min, amplitude 7 cm) at $28^\circ C$ in Erlenmeyer flasks filled to 1/10 of their capacity. Batch fermenter cultures were grown in a Braun fermenter. The tank contained 3 l medium, the pH was adjusted to 5.4 by NaOH (2M), the temperature was kept at $30^\circ C$, aeration was 2 vvm and the agitation rate was $1000 rev min^{-1}$.

Enzyme preparations

A culture sample was centrifuged at $30\,000 \times g$ for 8 min to determine phytase activity. The supernatant was ultrafiltered and washed with twice-deionized water to remove all traces of the substrate, salts and inorganic phosphate. The pellet was washed twice and resuspended. 12 ml of a cell suspension of 1 g dry weight were homogenized in the presence of glass beads (8 g) in an MSK Braun cell for 2 min. The mixture was then centrifuged at $35\,000 \times g$ for 15 min. The supernatant was centrifuged again at $35\,000 \times g$ for 30 min. The final supernatant was recovered and ultrafiltered to remove all traces of Pi.

Enzyme assays

Phytase activity was assayed in ultrafiltered culture supernatant and in ultrafiltered crushing supernatant using Ullah and Gibson's method (1987). The sum of these two activities represent the total phytase activity. Phytase activity measurements were carried out at $37^\circ C$. Liberated inorganic orthophosphate was measured by a modification of the ammonium molybdate method (Heinonen and Lahti, 1981). One phytase activity unit was defined as the amount of enzyme that liberates 1 μmol of Pi per minute.

Analytical methods

Free inorganic phosphate was assayed in the culture supernatant using a modification of the ammonium molybdate based method. Pi concentrations of 0.10 to 5 $mmol.l^{-1}$ were measured.

The culture supernatant phytate content was assayed by determination of the phosphate concentration released after hydrolysis of phytates by the phytase of *Aspergillus ficuum* (Sigma). Each assay tube contained 37.5 μmol of sodium acetate, pH 4.8, 100 nmol of $MnCl_2$, 0.116 U phytase activity with phytate added to a final volume of 1 ml, and incubated at $37^\circ C$ for 30

min. A calibration curve was plotted for sodium phytate (Sigma) concentrations of 0.01 to 0.5 mmol.l⁻¹.

Dry weight

Dry weight (DW) was determined after dessication at 108°C.

RESULTS AND DISCUSSION

1 - Screening yeast strains which hydrolyse phytates in solid media

Twenty-one yeast strains belonging to ten different species were tested on solid MSA medium. The presence of calcium phytate makes this medium opaque. When calcium phytate is hydrolysed by a strain, a translucent zone appears around the colonies (Howson and Davies, 1983). After 5 days of incubation at 28°C, 9 strains [*Candida brumptii* CBS 6145, *C. tropicalis* CBS 5696, *Debaryomyces castellii* CBS 2923, *Kluyveromyces fragilis* n°111, *K. fragilis* CBS 1555, *K. fragilis* CBS 5795, *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1253, *Schwanniomyces castellii* CBS 2863, *Torulopsis candida* CBS 940 (*C. famata*)] displayed a translucent zone whose diameter was at least twice that of the diameter of the colonies. Four strains [*C. melibiosica* CBS 5814, *K. lactis* CBS 2359, *T. bovina* CBS 2760 (*C. pintolopesii*), *Zygosaccharomyces fermentati* CBS 6772] showed a weak translucent zone around the colonies, and 8 strains [*C. zeylanoides* I.F.C.C, *C. macedoniensis* CBS 2079, *C. wickerhamii* CBS 2928, *Endomyces fibuliger* CBS 6310, *Hansenula anomala*, *H. salianii* CBS 5640, *H. holstii* CBS 4140, *Lipomyces starkeyi* CBS 1807] displayed both very small growth and the absence of translucent zones around the colonies.

2 - Screening on liquid medium

The 9 strains displaying the largest translucent zones were tested in Erlenmeyer flasks on MSA medium containing sodium phytate at 0.6 or 3.6 g.l⁻¹. This medium has a very low free Pi content (of the order of 0.1 mmol.l⁻¹). Phytates were thus the only source of Pi necessary for the growth of the yeast strains. The evolution of dry weight and the disappearance of phytates from the culture medium were monitored against time. No hydrolysis of phytates was found in *K. fragilis* CBS 1555 and *K. fragilis* CBS 5795. *C. brumptii* CBS 6145 had a low specific rate of hydrolysis of phytate and *S. cerevisiae* CBS 1253 had a bad ability to develop on MSA medium. These results led to select *C. tropicalis* CBS 5696, *T. candida* CBS 940, *D. castellii* CBS 2923, *K. fragilis* 111 and *S. castellii* CBS 2863.

3 - Determination of phytase activity of 5 yeast strains in batch culture

Batch cultures were performed on MSA medium with a sodium phytate content of 5 g.l⁻¹ (Figure 1).

-Comparison of growth parameters in the presence of high phytate concentrations:

S. castellii CBS 2863 and *T. candida* CBS 940 had generation times of 1.8 and 2.5 h. The final dry weights were about 6 g.l⁻¹. This figure is comparable to values obtained on

G medium (rich in Pi). No medium factor therefore appears to limit the development of the two strains.

Generation times of 4 and 5.6 h were observed for the strains *C. tropicalis* CBS 5696 and *D. castellii* CBS 2923. The final dry weights were 5 and 4.4 g.l⁻¹. The generation times on the medium containing 0.6 g.l⁻¹ of sodium phytate were 3.5 and 2.4 h respectively. The slow growth of these strains observed on the medium containing 5 g.l⁻¹ of sodium phytate may be the result of enzyme inactivation or inhibition of the synthesis of phytases by the high phytate content of the medium, which leads to low Pi availability. The comparison of the final biomass obtained on G medium (6.1 and 5.5 g.l⁻¹) with those obtained on a medium with a low phytate content (6 and 4.96 g.l⁻¹) confirm this hypothesis.

K. fragilis n°111 had a 3 h generation time and a final biomass of 3.3 g.l⁻¹. Its growth rate led to considering that synthesis of the enzyme was not inhibited in the presence of large phytate concentrations. However, the final biomass was lower than that on G medium (4 g.l⁻¹); the quantity of Pi appeared to be the limiting factor. The dephosphorylation of phytate may be not complete.

-Study of phytase activity

Phytase activity was assayed for each strain in the culture supernatant and in the crushing supernatant after ultrafiltration. Since phytase activity corresponds to the Pi (μmol) released per minute by the enzyme, the determination of phytase activity in cell debris was found to be impossible because of the high Pi content.

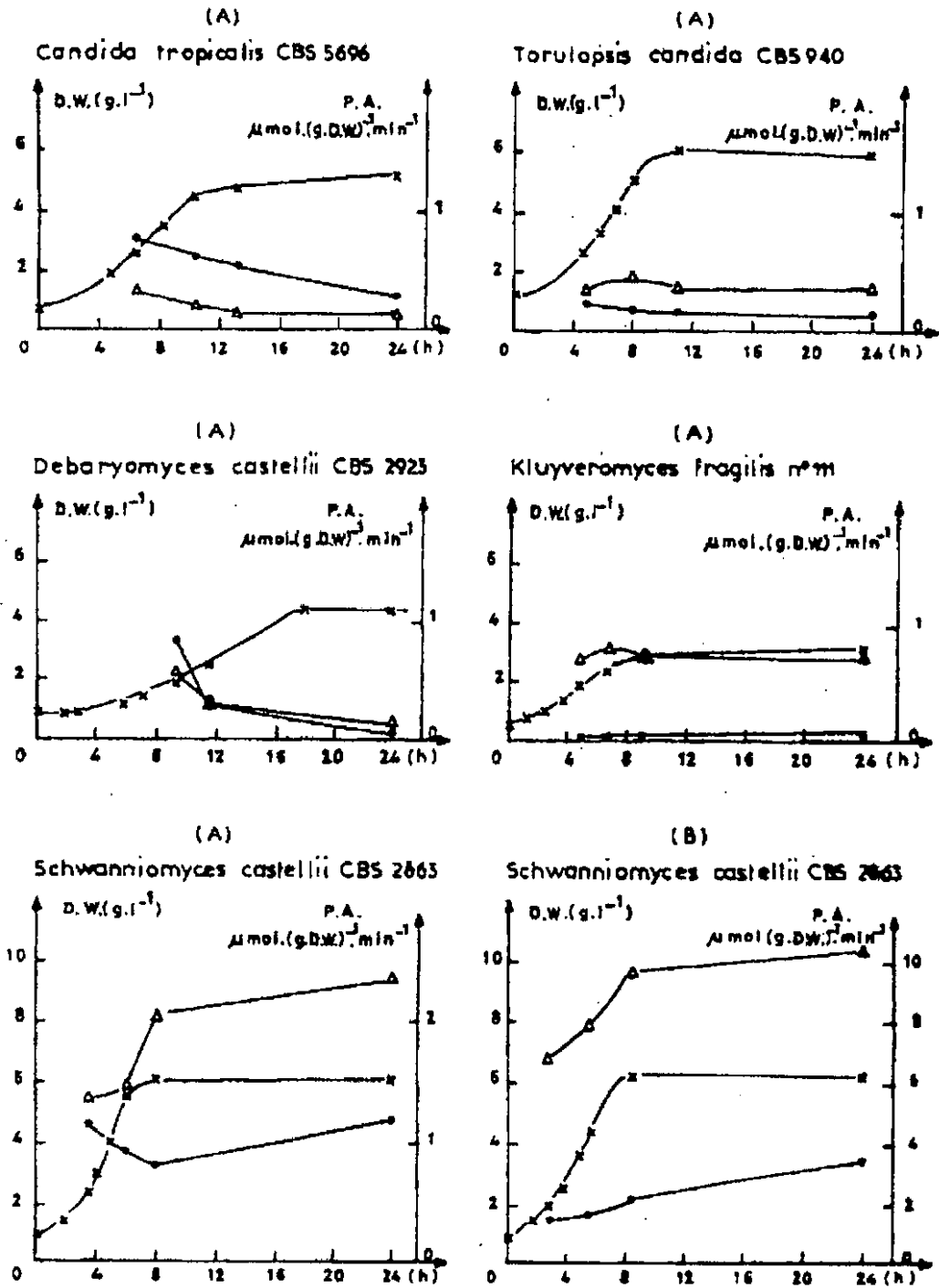
The total specific activity (2,37 μmol (g DW)⁻¹.min⁻¹) of *S. castellii* CBS 2863 was at least 2.5 times higher than total specific activities measured for all the other strains at the end of the exponential growth phase, and increased during growth (Figure 1). The total specific activity of *T. candida* CBS 940 and *K. fragilis* N° 111 remained fairly constant in time. In contrast, the total specific activity of *C. tropicalis* CBS 5696 and *D. castellii* CBS 2923 fell in time. This confirms the previously expressed hypothesis concerning the low biomass obtained for the two strains; the amount of Pi released is insufficient to meet the requirements of these strains and phytase synthesis is inhibited in the presence of strong phytate concentrations.

C. tropicalis CBS 5696 and *D. castellii* CBS 2923 displayed respectively 75 and 50% of enzymatic activity in the culture supernatant. *S. castellii* CBS 2863 and *T. candida* CBS 940 had weaker enzymatic activity in the supernatant than in the crushed material with 38.8 and 28.5% respectively.

K. fragilis N° 111 was the only strain to have displayed practically no enzymatic activity (4.2%) in the supernatant. This may account for the weak development of the strain although the phytase activity determined was sufficient to release the Pi required for growth.

In batch culture, it appeared that the strain *S. castellii* CBS 2863 had the shortest generation time in the presence of 5 g.l⁻¹ of phytate, a final dry matter content of 6 g.l⁻¹ and distinctly higher phytase activity than the other strains.

Figure 1: Time course of dry weight (x, D.W.), phytase activity (P.A.) in the culture supernatant (•) and in the crushing supernatant (Δ) of different yeast strains in Batch-culture on MSA medium containing sodium phytate at: 5 g.l⁻¹ (A) or 0.6 g.l⁻¹ (B).



4 - Influence of the phytate concentration on phytase production by *S. castellii* CBS 2863 in batch culture

The cultures were performed on MSA medium containing 0.6 or 5 g.l⁻¹ of sodium phytate. The decrease in the growth rate (28%) in the presence of phytate at 0.6 g.l⁻¹ or less may be the results of a slowing of Pi release. However, the final dry weights obtained on the two media were comparable (6.4 g.l⁻¹). The growth of the strain did not appear to be affected unfavourably by a high initial phytate content.

The evolution of phytase activity in time was identical in the two cases in which it increased. In contrast, the total phytase activity of *S. castellii* CBS 2863 was 4 times higher when the initial phytate content was low. The synthesis of phytase by *S. castellii* CBS 2863 was partially inhibited in the presence of high phytate concentrations. However, the rate of hydrolysis of phytates was sufficient to obtain a maximum growth rate (1.8 h), comparable to that on G medium.

CONCLUSION

The different stages (solid medium, cultures in Erlenmeyer flasks, batch culture) of our screening led to the selection of the strain *S. castellii* CBS 2863. Its growth parameters on G medium (rich in Pi) were comparable to those obtained on a medium in which phytates were the only Pi source. In addition, the total phytase activity of this strain was 2.8 times as high as those of the four other strains tested in batch culture. *S. castellii* CBS 2863 also has the advantage of using carbon substrates such as starch, sucrose, raffinose and melibiose. These glucosides are among the most common sugars in plants.

REFERENCES

- Blitar K. and Reinhold J. G. (1972). *Biochim. Biophys. Acta* 268: 442-452.
 Galzy P. (1964). *Ann. technol. Agri.* 13: 109-259.
 Gibson D. M. and Ullah A. H. (1988). *Arch. Biochem. and Biophys.* 260: 503-513.
 Graf E (1983). *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60: 1861-1867.
 Greenwood A. J. and Lewis D. H. (1977). *Soil Biol. Biochem.* 9: 161-166.
 Han Y. W., Gallagher D. J. and Wilfred A. G. (1987). *J. Ind. Microbiol.* 2: 195-200.
 Harland B. F. and Frolich W. (1989). *Cereal Chem.* 66, 357-358.
 Heinonen J. K. and Lahti R. J. (1981). *Anal. Biochem.*, 113: 313-317.
 Howson S. J. and Davis R. P. (1983). *Enzyme Microb. Technol.* 5: 377-388.
 Lolas G. M., Palamidis N. and Markakis P. (1976). *Cereal Chem.* 53: 867-887.
 Maga J. A. (1982). *J. Agric. Food Chem.* 30: 1-9.
 Morris E. R. (1986). In: Graf E. (Eds) *Phytic Acid, Chemistry and Applications*. Pilatus Press, Minneapolis, 57-76.
 Ullah A. H. J. and Gibson D. M. (1987). *Biochem.*, 17, 63-91.