

Diversidad de levaduras marinas productoras de fitasas

Diversity of phytase-producing marine yeasts

NY Hirimuthugoda^{1,2}, Z Chi^{1*}, X Li¹, L Wang¹, L Wu¹

¹ UNESCO Chinese Center of Marine Biotechnology, Ocean University of China, Yushan Road No. 5, Qingdao, China.

* E-mail: zhenming@sdu.edu.cn

² Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Ruhuna, Mapalana, Kamburupitiya, Sri Lanka.

Resumen

Se aislaron cepas de levaduras marinas de diferentes hábitats y se monitorearon las que mostraron ser productoras de fitasa. De las 327 cepas aisladas, 10 mostraron comparativamente mayor actividad fitasa. Se examinaron las características fisiológicas y bioquímicas de las levaduras productoras de fitasas, así como el pH y temperatura óptimos para su producción. También se analizaron secuencias parciales del gen 18S rARN. Con base en las características bioquímicas y fisiológicas y análisis filogenéticos, se encontró que las 10 cepas están estrechamente relacionadas con *Hanseniaspora uvarum* (cepa WZ1), *Yarrowia lipolytica* (cepa W2B), *Kodamaea ohmeri* (cepa BG3), *Candida carpophila* (cepa N12C), *Issatchenkia orientalis* (cepa YF04C), *Candida tropicalis* (cepa MA6), *Yarrowia lipolytica* (cepa YF08), *Candida carpophila* (cepa NY4E), *Candida tropicalis* (cepa YF12C), y *Candida tropicalis* (cepa MB2). Estas cepas se obtuvieron de estómagos de peces no identificados, de vísceras de *Holothuria scabra*, de *Hexagrammos otakii*, de *Hexagrammos otakii*, de *Synechogobius hasta*, así como directamente de agua de mar. Es interesante resaltar que algunas levaduras marinas pueden producir fitasa alcalina. Ésta es la primera vez que se reportan cepas de levaduras marinas capaces de producir fitasa extracelular o unida a las células. Los resultados también indican que las levaduras marinas productoras de fitasa fueron lo suficientemente diversas como para ser utilizadas en la bioremediación de contaminación marina por fósforo.

Palabras clave: levaduras marinas, fitasa, diversidad genética, árbol filogenético.

Abstract

Marine yeast strains from different habitats were isolated and phytase-producing marine yeasts were screened. Of the 327 yeast strains isolated, 10 showed comparatively higher phytase activity. Physiological and biochemical characters of these 10 strains, and optimum pH and temperature of the crude phytases produced by them were examined. Partial sequences of the 18S rDNA were also analyzed. Based on the physiological and biochemical characters and phylogenetic analyses, the 10 strains were found to be closely related to *Hanseniaspora uvarum* (strain WZ1), *Yarrowia lipolytica* (strain W2B), *Kodamaea ohmeri* (strain BG3), *Candida carpophila* (strain N12C), *Issatchenkia orientalis* (strain YF04C), *Candida tropicalis* (strain MA6), *Yarrowia lipolytica* (strain YF08), *Candida carpophila* (strain NY4E), *Candida tropicalis* (strain YF12C), and *Candida tropicalis* (strain MB2). They were obtained from gut of unknown fish, gut of *Holothuria scabra*, gut of *Hexagrammos otakii*, gut of *Hexagrammos otakii*, gut of *Synechogobius hasta*, and seawater. It is interesting to note that some marine yeast strains could produce alkaline phytase. This is the first report of marine yeast strains capable of producing extracellular phytase or cell-bound phytase. The results also indicated that phytase-producing marine yeasts were diverse enough to be used in bioremediation of marine phosphorous pollution.

Key words: marine yeasts, phytase, genetic diversity, phylogenetic tree.

Introducción

La fitasa (mioinositol hexakisfosfato fosfohidrolasa, EC 3.1.3.8) cataliza la liberación de fosfato a partir del fitato (hexakisfosfato de inositol), que es el principal tipo de fosfato presente en los granos de cereal, legumbres y semillas oleaginosas, por lo que suele incorporarse en el pienso de aves de corral, cerdo y pescado. Además, la fitasa tiene un amplio rango de aplicaciones en nutrición animal y humana debido a que puede reducir la excreción de fósforo en animales monogástricos si se utiliza como sustituto del fosfato inorgánico en

Introduction

Phytase (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase, EC 3.1.3.8) catalyses the release of phosphate from phytate (myo-inositol hexakisphosphate), which is the principal type of phosphorus present in cereal grains, legumes and oilseeds. Therefore, phytase can be incorporated into commercial poultry, swine, and fish diets. It has a wide range of applications in animal and human nutrition since it can reduce phosphorus excretion of monogastric animals by replacing inorganic phosphates in the animal diet, thus contributing

la dieta animal, contribuyendo significativamente a la protección del medio ambiente. La fitasa también permite mejorar la disponibilidad de minerales, elementos traza, aminoácidos y energía en la dieta (Vats y Barnerjee 2004).

En las últimas décadas la industria de la maricultura en general, incluyendo cultivos de gambas, bivalvos, algas y pepinos de mar, se ha desarrollado rápidamente gracias a la gran demanda de alimentos marinos. Prácticas de gestión no orientadas a la protección ambiental, muy comunes en los sistemas de cultivo intensivo, tales como descargas de restos y aguas residuales de las plantas de tratamiento, parecen estar relacionadas con la contaminación por fósforo en el medio marino. Dada la falta de fitasa en los estómagos de animales marinos cultivados, ésta se ha venido incorporando en su alimentación para reducir este tipo de contaminación.

Debido a la facilidad de su cultivo y a su gran productividad enzimática, los microorganismos son las mejores fuentes para la producción comercial de fitasas. Actualmente todas las preparaciones de fitasa autorizadas en la UE como aditivos alimenticios se producen mediante recombinaciones de cepas de hongos filamentosos, y los genes que expresan la fitasa provienen de hongos de dos casos del género *Aspergillus* (Haefner *et al.* 2005). En la última década, las encimas que pueden degradar fitasas provenientes de levaduras terrestres como *Schwanniomyces occidentalis* (Nakamura *et al.* 1999), *Pichia anomala* (Vohara y Satyanarayana 2004), *Arxula adenivorans* (Sano *et al.* 1999), *Hansenula polymorph* (Mayer *et al.* 1999) y *Rhodotorula gracilis* (Bindu *et al.* 1998) también han sido objeto de creciente atención, ya que pueden ser fácilmente incorporadas en dietas balanceadas y son ricas en nutrientes. Sin embargo, se conoce muy poco sobre levaduras marinas productoras de fitasa.

Recientemente se ha encontrado que el océano cuenta con un potencial enorme de fuentes biológicas, incluyendo levaduras marinas y sus genes. Se cree que las levaduras marinas productoras de fitasas pueden ser más adecuadas como aditivo para los piensos marinos que las fitasas de microorganismos de origen terrestre, considerando además que en el medio marino las levaduras son más eficientes que los microorganismos terrestres. Por tanto, en este estudio se examinó la diversidad fisiológica y genética de las levaduras marinas productoras de fitasa provenientes de diferentes medios, con el objetivo de encontrar levaduras marinas que puedan producir grandes cantidades de fitasa extracelular de potencial aplicación en la industria de cultivos marinos.

Material y métodos

Muestreo

Durante la campaña Antártica de 2004 se recolectaron distintas muestras de agua y sedimentos en la parte sur del Mar de China y del Océano Pacífico. También se recolectaron muestras de agua hipersalina, sedimentos provenientes de salinas y

significantly toward environmental protection. Moreover, it helps to improve the availability of minerals, trace elements, amino acids and energy (Vats and Barnerjee 2004).

In recent decades, the global maricultural industry, including shrimp, bivalve, seaweed, and sea cucumber farming, has undergone rapid development owing to the high demand for sea food. Non eco-friendly management practices that are very common in intensive modern farming systems, such as discharges of waste manures and wastewater from treatment plants, appear to be associated with phosphorous pollution in the marine environment. Therefore, phytase is also incorporated into the maricultural feed since it is lacking in the guts of farmed marine animals.

Microorganisms are the best sources for the commercial production of phytases because of their easy cultivation and high yields of the enzyme. At present, all phytase preparations authorized in the European Union as feed additives are produced by recombinant strains of filamentous fungi, and the expressed phytase genes are of fungal origin and originate in two cases from the genus *Aspergillus* (Haefner *et al.* 2005). In the last decade, phytate-degrading enzymes of terrestrial yeasts such as *Schwanniomyces occidentalis* (Nakamura *et al.* 1999), *Pichia anomala* (Vohara and Satyanarayana 2004), *Arxula adenivorans* (Sano *et al.* 1999), *Hansenula polymorph* (Mayer *et al.* 1999), and *Rhodotorula gracilis* (Bindu *et al.* 1998), have also received attention since they can be easily incorporated into feed diets and are rich in nutrients. However, little is known about phytase-producing marine yeasts.

In recent years, it has been found that the ocean constitutes a huge potential of bio-resources, including marine yeasts and their genes. We think that phytase-producing marine yeasts are more suitable as maricultural feed additives than the phytase from terrestrial microorganisms, because in the sea environment, marine yeasts are more efficient than terrestrial microorganisms. Therefore, in the present study, the physiological and genetic diversity of phytase-producing marine yeasts from different marine environments was examined, aiming at searching for marine yeasts that can produce a large amount of extracellular phytase and exploring their potential applications in the maricultural industry.

Material and methods

Sampling

Seawater and sediment samples were collected from the South China Sea and Pacific Ocean during the Antarctic exploration in 2004. Hypersaline seawater, sediment from salt pans, and different species of marine animals and algae were also collected from the coast of Qingdao (China) and the Indian Ocean.

Isolation of marine yeasts

Two milliliters of seawater or 2 g of sediments or 2 mL of homogenized guts of marine animals or homogenized marine

diferentes especies de animales marinos y algas a lo largo de la costa de Qingdao, China y en el Océano Índico.

Aislamiento de levaduras marinas

De las diferentes muestras se obtuvieron 2 mL de agua de mar, 2 g de sedimento o bien 2 mL de intestino de animales marinos u homogeneizado de algas, que inmediatamente después del muestreo se mezclaron en una suspensión de 20 mL de medio YPD (2% glucosa, 2% polipeptona y 1% de extracto de levadura), preparado con agua de mar con un suplemento de 0.05% de cloranfenicol, dejando dicha suspensión a temperatura ambiente durante cinco días. Después de la dilución necesaria de los distintos cultivos, la mezcla resultante se introdujo en placas de medio YPD con 0.05% de cloranfenicol, que fueron incubadas a 20–25°C durante cinco días. De estas placas se extrajeron diferentes colonias que fueron transferidas a nuevas placas YPD.

Búsqueda de levaduras marinas productoras de fitasa

Cada cepa de levadura obtenida de las placas se cultivó en medio YPD líquido durante 24 h a 28°C. Se recolectaron 2 mL de los cultivos y las células obtenidas fueron limpiadas tres veces con agua destilada esterilizada por centrifugación. Las células limpias fueron inyectadas en placas con vitaminas, sales minerales, 1% de sulfato amónico, 0.5% de fitato sódico como única fuente de carbono y fósforo, y 2% de agar, todo ello tamponado a pH 5. Después de 24 h de incubación, cada colonia fue transferida a una segunda placa con el mismo medio. Todas las cepas que crecieron vigorosamente en la segunda placa fueron usadas para la estimación de fitasa.

Estimación de fitasa

Las cepas de levadura seleccionadas de la segunda placa fueron inoculadas en viales de 250 mL con 50 mL de medio sintético mínimo con vitaminas, sales minerales, 1% de sulfato de amonio, 0.5% de fitato sódico, y posteriormente fueron incubadas aeróbicamente durante cinco días a 28°C. Se centrifugó 1 mL del medio de cultivo a 5000 rpm durante 10 min. El sobrenadante obtenido fue usado como preparación cruda de fitasa extracelular. Las pelletillas fueron lavadas tres veces con agua esterilizada y destilada doblemente, y posteriormente resuspendidos en 1 mL de medio sintético. Esta suspensión se usó como preparación para la fitasa unida a la célula. La actividad fitasa fue estimada de la siguiente manera: se preincubó 0.8 mL de solución de fitato de sodio (5 mM fitato de sodio en 0.2 M acetato de sodio, pH 5) a 60°C durante 5 min, añadiendo o bien 0.2 mL de la solución cruda de fitasa extracelular o de la preparación de fitasa unida a la célula, mezclando bien la solución en ambos casos con la ayuda de una punta de pipeta. La mezcla fue incubada a 60°C durante 30 min. La reacción fue posteriormente detenida mediante la adición de 1 mL de TCA (ácido tricloroacético) al 5%. El fósforo inorgánico liberado fue

algas were suspended in 20 mL of YPD (2% glucose, 2% polypeptone and 1% yeast extract) medium prepared with seawater and supplemented with 0.05% chloramphenicol immediately after sampling and cultivated at room temperature for five days. After suitable dilution of the cell cultures, the dilute was plated on YPD plates with 0.05% chloramphenicol and the plates were incubated at 20–25°C for five days. Different colonies from the plates were transferred to the YPD slants.

Screening of phytase-producing marine yeasts

Each yeast strain from the slants was grown in YPD liquid medium for 24 h at 28°C. Two milliliters of the culture were collected and cells were washed three times with sterilized distilled water by centrifugation. The washed cells were inoculated onto plates that contained vitamins, minerals salts, 1% ammonium sulfate, 0.5% sodium phytate as the sole source of carbon and phosphate, and 2% agar (pH 5). After 24 h of incubation, each colony was transferred to the second plate with the same medium. All the strains that grew vigorously on the second plate were used for the phytase measurement.

Phytase assay

The selected yeast strains from the second plate were inoculated into a 250-mL flask with 50 mL of the minimal synthetic medium containing vitamins, mineral salts, 1.0% ammonium sulfate, and 0.5% sodium phytate, and then grown aerobically for five days at 28°C. One milliliter of the culture medium was centrifuged at 5000 rpm for 10 min. The supernatant obtained was used as the crude extracellular phytase preparation. The pellets were washed three times with sterilized double distilled water and then resuspended in 1.0 mL of the synthetic medium, and the cell suspension was used as the cell-bound phytase preparation. The phytase activity was assayed as follows: 0.8 mL of sodium phytate solution (5.0 mM sodium phytate in 0.2 M sodium acetate, pH 5.0) were pre-incubated at 60°C for 5 min, and 0.2 mL of the crude extracellular phytase preparation or the cell-bound phytase preparation were added and mixed well with the aid of a pipette tip. The mixture was incubated at 60°C for 30 min. The reaction was stopped by addition of 1 mL of 5.0% TCA (trichloroacetic acid). The inorganic phosphate liberated was quantitatively determined by the ammonium molybdate method (Chi *et al.* 1999) in a spectrophotometer at 700 nm. One unit of phytase activity was defined as the amount of enzyme causing the release of 1.0 μ M of inorganic phosphate per minute under the assayed conditions. In order to examine the effects of temperature on phytase activity, the phytase activity was determined at 37°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, and 70°C. The effect of pH on the enzyme activity was determined by incubating the mixture between pH 4.0 and 9.0 using the standard assay condition. The buffers used were 0.2M acetate (pH 4.0–6.0) and 0.2 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ – H_3Br_3 (pH 7.0–9.0).

determinado cuantitativamente mediante el método del molibdato de amonio (Chi *et al.* 1999) en un espectrofotómetro a 700 nm. La unidad de actividad fitasa se definió como la cantidad de encima que provoca la liberación de 1 μM de fosfato inorgánico por minuto bajo las condiciones del experimento. Para poder examinar los efectos de la temperatura en la actividad fitasa, ésta última se midió a 37°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C y 70°C. El efecto del pH en la actividad enzimática se determinó incubando la mezcla entre pH 4 y 9, usando las condiciones de experimentación estándar. Los tampones usados fueron acetato 0.2 M (pH 4.0–6.0) y $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O} \cdot \text{H}_3\text{Br}_3$ 0.2 M (pH 7.0–9.0).

Extracción total del ADN genómico y PCR

Todo el ADN genómico de las cepas de levaduras se aisló y purificó utilizando los métodos descritos por Sambrook *et al.* (1989). Se utilizaron precursores universales para la amplificación del gen 18S ARNr de las levaduras. El precursor *forward* fue P1 (5'-ATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') y el *reverse* fue P2 (5'-GATCCTTCCGCAGGTTTACC-3') (Thanh *et al.* 2002). Veinticinco microlitros de la mezcla reactiva contenían 12.5 μL de 10 $\times$ tampón, 2 μL de dNTP 10 mM, 1.5 μL de MgCl_2 25 mM, 1 μL de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de P1, 1 μL de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de P2, 0.5 μL de 5 $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$ Taq ADN polimerasa, 0.5 μL de ADN templado y 17.75 μL de H_2O . La amplificación por PCR se llevó a cabo mediante la desnaturalización a 94°C durante 5 min seguida por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, templado a 55°C durante 1 min, extensión a 72°C por 2 min, y una extensión final a 72°C por 10 min. El producto del PCR se separó por electroforesis en agarosa, y se recuperó usando una columna en gel UNIQ para ADN (BIOASIA, Shanghai). El producto PCR recuperado fue incluido en un vector pGEM-T e introducido en células competentes de *Escherichia coli* JM109. Los transformadores fueron seleccionados en placas con ampicilina. Los plásmidos en las células transformadas se extrajeron usando el método descrito en Sambrook *et al.* (1989). Para poder confirmar que los productos del PCR fueron incluidos en el vector, los plásmidos purificados se utilizaron como plantilla para la amplificación del gen 18S rARN de las cepas de levadura. El sistema de reactivos y las condiciones para la amplificación del PCR fueron las mismas descritas anteriormente. El fragmento del gen 18S rARN insertado en el vector fue secuenciado por la Compañía Shanghai Sangon.

Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas fueron analizadas para detectar similitudes utilizando BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). El árbol filogenético se construyó usando el paquete de software PHYLIP, versión 3.75c (Felsenstein, 1995). Las matrices de distancia se generaron usando el programa DNADIST, basado en el modelo de dos parámetros de Kimura (Kimura 1980). Se realizaron análisis tipo Neighbor-joining de los datos mediante el programa Neighbor del paquete PHYLIP.

Total genomic DNA extraction and PCR

The total genomic DNA of the yeast strains was isolated and purified following the methods described by Sambrook *et al.* (1989). The universal primers for amplification of the 18S rRNA gene of the yeasts were used. The forward primer was P1 (5'-ATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') and the reverse primer was P2 (5'-GATCCTTCCGCAGGTTTACC-3') (Thanh *et al.* 2002). Twenty-five microliters of the reaction mixture contained 12.5 μL of 10 $\times$ buffer, 2 μL of 10 mM dNTP, 1.5 μL of 25 mM MgCl_2 , 1 μL of 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ P1, 1 μL of 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ P2, 0.5 μL of 5 $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$ Taq DNA polymerase, 0.5 μL of template DNA and 17.75 μL of H_2O . The PCR amplification was carried out by denaturing at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles of denaturing at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min, extension at 72°C for 2 min, and a final extension at 72°C for 10 min. The PCR product was separated by agarose electrophoresis and recovered using the UNIQ column DNA gel recovery kit (BIOASIA, Shanghai). The recovered PCR products were ligated into pGEM-T easy vector and transformed into competent cells of *Escherichia coli* JM109. The transformers were selected on plates with ampicillin. The plasmids in the transformed cells were extracted according to the methods described by Sambrook *et al.* (1989). In order to confirm that the PCR products had been ligated into the vector, the purified plasmids were used as templates for amplification of the 18S rRNA gene of the yeast strains. The reaction system and the conditions for PCR amplification were the same as described above. The 18S rRNA gene fragment inserted on the vector was sequenced by the Shanghai Sangon Company.

Phylogenetic analyses

The sequences obtained above were analyzed for similarity by using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). The phylogenetic tree was constructed using PHYLIP software, package version 3.75c (Felsenstein 1995). Distance matrices were generated by the DNADIST program, based on Kimura's two-parameter model (Kimura 1980). Neighbor-joining analysis of the data sets was carried out with the Neighbor program of the PHYLIP package.

Routine identification of the yeasts

The routine identification of the yeasts was performed following the methods described by Kurtzman and Fell (2000).

Results

Marine yeast strains with phytase activity

A total 327 yeast strains were obtained from seawater, sediments, marine fish guts and marine algae, but only 10 of these strains secreted a large amount of phytase into the medium or had cell-bound phytase activity (table 1).

Identificación rutinaria de las levaduras

La identificación rutinaria de las levaduras se realizó usando los métodos descritos por Kurtzman y Fell (2000).

Resultados

Levaduras marinas con actividad fitasa

Se obtuvo un total de 327 cepas de levadura a partir de agua de mar, intestinos de peces marinos y algas marinas, pero sólo 10 de estas cepas segregaron cantidades elevadas de fitasa en el medio o tuvieron actividad fitasa ligada a la célula (tabla1).

Las cepas WZ1, W2B, BG3, N12C, YF04C, MA6, YF08, NY4E, YF12C y MB2 fueron aisladas a partir del intestino de peces marinos no identificados a lo largo de la línea de costa de Qingdao, intestino de *Holothuria scabra* en China, intestino de *Hexagrammes otakii*, agua de mar del Océano Pacífico, intestino de *Hexagrammes otakii*, agua de mar del Océano Índico, intestino de *Synecogobius hasts*, agua proveniente de salinas, intestino de *Holothuria scabra* de Sri Lanka y agua de mar del sur del Mar de China, respectivamente.

Caracterización fisiológica y bioquímica

La tabla 2 muestra los espectros de fermentación y asimilación de fuentes de carbono, y otras características fisiológicas y bioquímicas de las distintas levaduras marinas productoras de fitasa obtenidas en este estudio.

Strains WZ1, W2B, BG3, N12C, YF04C, MA6, YF08, NY4E, YF12C, and MB2 were isolated from gut of unknown marine fish from the Qingdao coast, gut of *Holothuria scabra* from China, gut of *Hexagrammes otakii*, Pacific Ocean seawater, gut of *Hexagrammes otakii*, Indian Ocean seawater, gut of *Synecogobius hasts*, saltpan seawater, gut of *Holothuria scabra* from Sri Lanka, and South China Sea seawater, respectively.

Physiological and biochemical characterization

Table 2 shows fermentation spectra and carbon source assimilation spectra, as well as other physiological and biochemical characteristics of the different phytase-producing marine yeasts obtained in this study. Based on this information and on similar information for the type strains listed by Kurtzman and Fell (2000), we found that strains WZ1, W2B, BG3, YF04C and YF08 were similar to *Hanseniaspora uvarum*, *Yarrowia lipolytica*, *Kodamaea ohmeri*, *Issatchenkia orientalis* and *Yarrowia lipolytica*, respectively, while N12C and NY4E were similar to *Candida carpophila*, and MA6, YF12C and MB2 to *Candida tropicalis*.

Phylogenetic analysis of partial sequences of the 18S rRNA genes

According to Kurtzman and Fell (2006), traditional and routine identification methods that depend on phenotype usually lead to uncertain and inaccurate interpretations of

Tabla 1. Cepas productoras de fitasa y su actividad.

Table. 1. Phytase-producing strains and their activity.

Strains	Phytase activity (mU mL ⁻¹)	Optimum temperature (°C)	Optimum pH	Habitats
WZ1	19 + 0.01 ¹	65	7	Gut of unknown fish
	14 + 0.004 ²	60	8	
W2B	61 + 0.011 ¹	60	8	Gut of sea cucumber, <i>Holothuria scabra</i> (China)
BG3	62 + 0.006 ¹	65	5	Gut of fish, <i>Hexagrammes otakii</i>
N12C	47 + 0.026 ¹	55	6	Seawater (Pacific Ocean)
	14 + 0.012 ²	60	5	
YF04C	30 + 0.004 ¹	50	9	Gut of fish, <i>Hexagrammes otakii</i>
MA6	35 + 0.006 ¹	65	7	Seawater (Indian Ocean)
YF08	31 + 0.034 ¹	60	7	Gut of fish, <i>Synecogobius hasts</i>
NY4E	44 + 0.006 ¹	55	8	Seawater (salt pans)
	16 + 0.001 ²	65	6	
YF12C	49 + 0.008 ¹	55	8	Sea cucumber, <i>Holothuria scabra</i> (Sri Lanka)
	28 + 0.045 ²	65	6	
MB2	34 + 0.023 ¹	60	6	Seawater (South China Sea)

¹ Extracellular enzyme activity. ² Cell-bound enzyme activity.

Tabla 2. Características fisiológicas y bioquímicas de las cepas aisladas.
Table 2. Physiological and biochemical characteristics of the isolates.

Isolate	Fgl	Fgl	Ga	Ar	Cb	La	Su	Ma	Ra	Ss	Xy	Tr	Sa	Ge	Uh	10%	16%	50%	60%	37	40	As	Ni
YF12C	+	+	+	-	w	-	+	+	-	-	+	+	w	-	-	W	-	w	-	+	+	-	-
W2B	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	+	-	+	-	w	-	w	-	-	-
W21	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	w	-	-	-	-	-
BG3	+	-	+	-	+	-	w	+	w	-	-	+	w	-	-	+	+	+	w	+	-	-	-
YF08	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	+	-	+	-	w	-	w	-	-	-
YF04C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	w	-	+	-	+	+	-	+
MB2	+	+	+	-	w	-	+	+	-	-	+	+	w	-	-	w	-	w	-	+	+	-	-
MA6	+	+	+	-	w	-	+	+	-	-	+	+	w	-	-	w	-	w	-	+	+	-	-
NY4E	+	-	+	-	w	-	+	+	w	-	+	w	w	-	-	w/-	-	w	-	-	-	-	-
N12C	+	-	+	-	w	-	+	+	w	-	+	w	w	-	-	w/-	-	w	-	-	-	-	-

Fgl = glucose fermentation and Fgal = galactose fermentation. Other assimilation tests: Gl = glucose, Ga = galactose, Ar = D-arabinose, Cb = cellobiose, La = lactose, Su = sucrose, Ma = maltose, Ra = raffinose, Ss = soluble starch, Xy = xylose, Tr = trehalose, Sa = salicin, Ge = gelatin liquefaction, Uh = urea hydrolysis, 10% = 10% NaCl, 16% = 16% NaCl, 50% = 50% glucose, 60% = 60% glucose, 37 = growth at 37°C, 40 = growth at 40°C, As = observations of ascospores, Ni = growth in nitrite. w = weak growth.

Con base en los espectros de fermentación y de asimilación de fuentes de carbono y otras características fisiológicas y bioquímicas de las distintas levaduras marinas productoras de fitasa y las cepas tipo listadas por Kurtzman y Fell (2000), encontramos que las cepas WZ1, W2B, BG3, YF04C y YF08 fueron similares a *Hanseniaspora uvarum*, *Yarrowia lipolytica*, *Kodamaea ohmeri*, *Issatchenkia orientalis* y *Yarrowia lipolytica*, respectivamente, mientras que N12C y NY4E fueron similares a *Candida carpophila*, y MA6, YF12C y MB2 lo fueron a *Candida tropicalis*.

Análisis filogenético de las secuencias parciales de los genes 18S rARN

De acuerdo con Kurtzman y Fell (2006), los métodos tradicionales y la identificación rutinaria que dependen del fenotipo generalmente tienden a interpretaciones poco precisas de las interacciones entre especies. El análisis secuencial de la filogenia para realizar taxonomía microbiana es un método más preciso para determinar relaciones intra e interespecíficas. Por tanto, se analizaron secuencias parciales del ITS de 18S rARN de las cepas de levadura para los análisis comparativos usando un análisis BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) y se depositaron en el National Center for Biotechnological Information (NCBI), EUA, bajo los números de acceso que aparecen en la tabla 3. *Cafetena roenbergensis* (un flagelado heterótrofo) se usó como elemento fuera del grupo para construir el árbol filogenético. La búsqueda de similitudes entre las secuencias de 18S rARN aisladas y las que se encuentran en la base de datos del NCBI indica que las cepas de levadura encontradas en este análisis son similares a varias especies filogenéticamente relacionadas. En la figura 1 se muestran las relaciones filogenéticas de las secuencias de 18S rARN de las cepas identificadas de levaduras marinas, y sus números de acceso en Genbank se muestran en la tabla 3.

Discusión

Hasta donde sabemos, éste es el primer trabajo de investigación completo sobre un rango considerablemente diverso de levaduras marinas productoras de fitasa. Es importante destacar que ninguno de los animales marinos utilizados era de cultivo, sino que provenían de medios marinos naturales. Estos resultados muestran que muchas de las levaduras marinas productoras de fitasa fueron obtenidas de intestinos de animales marinos, sugiriendo que pueden existir en dichos ambientes. En la tabla 1 se puede observar que algunas de las fitasas de levaduras marinas pueden actuar de forma óptima en medios alcalinos. Por ejemplo, la fitasa extracelular en crudo producida por las cepas W2B, NY4E y YF12C, y la fitasa unida a células en WZ1 tuvieron un pH óptimo de 8, mientras la fitasa extracelular producida por la cepa YF04C tuvo un pH óptimo de 9. Sin embargo, el pH óptimo de las fitasas de levaduras y mohos terrestres es de 2.5 a 5.5. Se ha descrito que las fitasas alcalinas de microorganismos pueden tener aplicaciones

species interaction. Sequence analysis of phylogeny for microbial taxonomy is a more accurate method for determining inter- and intra-specific relationships. Therefore, 18S rRNA partial ITS sequences of the yeast strains were compared by BLAST analysis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), and deposited at the National Center for Biotechnological Information (NCBI, USA) under the accession numbers that are given in table 3. *Cafetena roenbergensis* (heterotrophic flagellate) was used as out-group for constructing the phylogenetic tree. The search for the similarity between the 18S rRNA sequences of the isolates and those in the NCBI database showed that the yeast strains obtained in this study are similar to several phylogenetically-related yeast species. Phylogenetic relationships of the 18S rRNA sequences of the marine yeast strains identified are shown in figure 1 and their GenBank accession numbers are shown in table 3.

Discussion

To our knowledge, this is the first research work on phytase-producing marine yeasts that had a considerable high diversity. It should be stressed that all the marine animals were not farmed, but came from natural marine environments. The results showed that most of the phytase-producing marine yeasts were obtained from the guts of natural marine animals, suggesting that they can exist in such environments. It can be observed from table 1 that some phytases from marine yeasts can act optimally in alkaline environments. For example, the crude extracellular phytases produced by strains W2B, NY4E, and YF12C, and the cell-bound phytase from WZ1 had optimum pH 8, while the extracellular phytase produced by strain YF04C had optimum pH 9; however, the optimum pH of phytases from terrestrial yeasts and molds was 2.5 to 5.5. It has been reported that alkaline phytase from microorganisms has promising applications in industry (Haefner *et al.* 2005). Therefore, further studies on alkaline phytase from strain

Tabla 3. Cepas marinas identificadas y su código de acceso.

Table 3. Marine yeast strains identified and their accession numbers.

Strain	18s rRNA	ITS
<i>Hanseniaspora uvarum</i> strain WZ1	DQ 438176	DQ 666349
<i>Yarrowia lipolytica</i> strain W2B	DQ 438177	DQ 666189
<i>Kodamaea</i> sp. strain BG3	DQ 438178	DQ 666194
<i>Candida</i> sp. strain N12C	DQ 438179	DQ 666191
<i>Issatchenkia orientalis</i> strain YF04C	DQ 438180	DQ 666350
<i>Candida</i> sp. strain MA6	DQ 438181	DQ 666188
<i>Yarrowia lipolytica</i> strain YF08	DQ 438182	DQ 666187
<i>Candida</i> sp. strain NY4E	DQ 499512	DQ 666192
<i>Candida</i> sp. strain YF12C	DQ 515959	DQ 666193
<i>Candida</i> sp. strain MB2	DQ 471323	DQ 666190

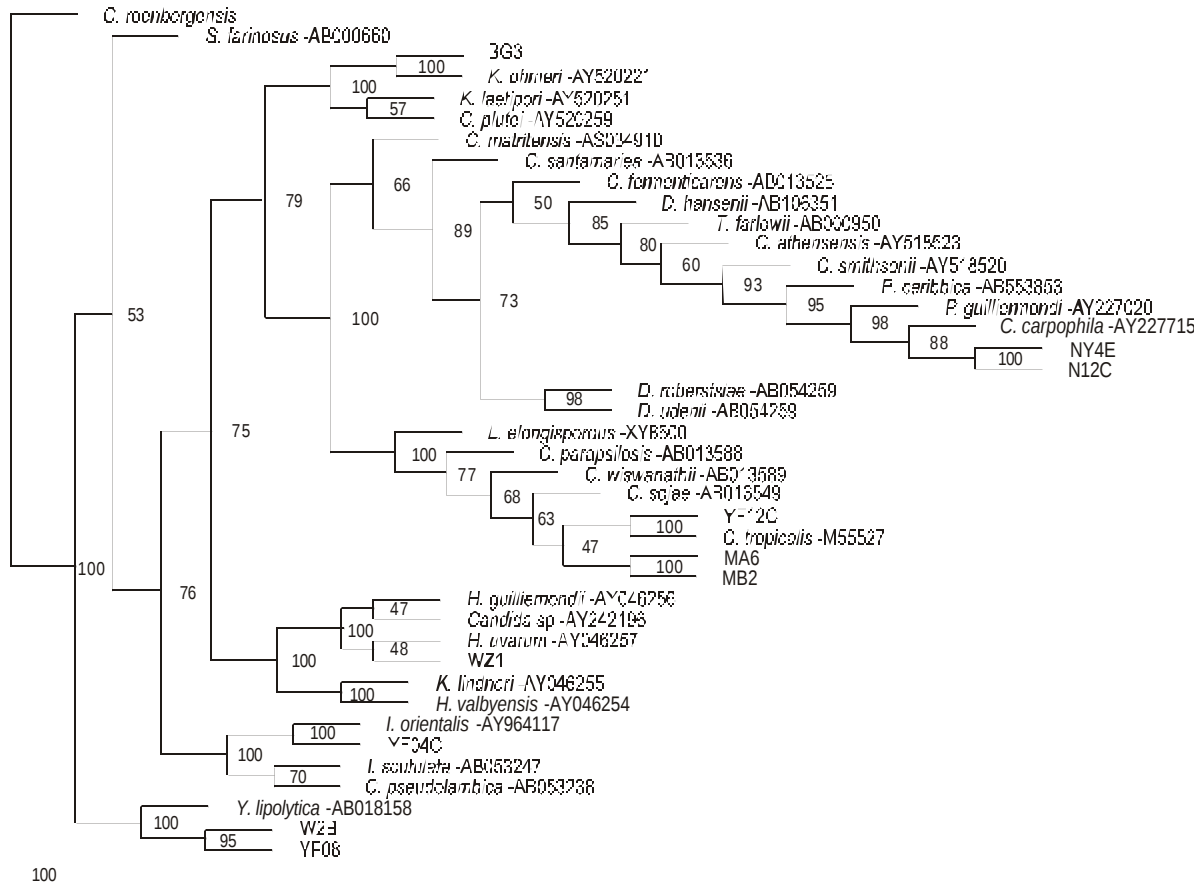


Figura 1. Árbol de consenso de las cepas aisladas basado en las secuencias de 18S rARN obtenidas en este estudio y 35 secuencias previamente publicadas obtenidas de GenBank. Los números encima de las ramas son el número de bootstrap realizados.

Figure 1. Consensus tree of the isolates based on the 18S rRNA sequences obtained in this study and on 35 previously published sequences obtained from GenBank. The numbers above the branches are bootstrap values.

prometedoras para la industria (Haefner *et al.* 2005). Por lo tanto, es necesario realizar más trabajos sobre la fitasa alcalina proveniente de la cepa YF04C. En la tabla 1 se puede observar que *Yarrowia lipolytica* W2B y *Kodamea ohmeri* BG3 tuvieron la mayor actividad fitasa extracelular, y ambas fueron aisladas a partir de intestinos de animales marinos. Varios trabajos han mostrado que estas dos especies de levadura son comunes en ambientes marinos o de alta salinidad (Barnett *et al.* 2000, Jain *et al.* 2004).

La temperatura óptima de las fitasas de levaduras marinas estuvo en un rango entre 55°C y 65°C. Este resultado es idéntico que para las levaduras terrestres. En general, la fitasa de levaduras terrestres muestra una gran actividad en el rango de temperaturas entre 50°C y 70°C, mientras que la temperatura óptima se encuentra principalmente entre 45°C y 60°C (Haefner *et al.* 2005). También se puede observar en la tabla 1 que las cepas WZ1, N12C, NY4E y YF12C pueden producir tanto fitasa extracelular como fitasa ligada a la célula, pero ambas fitasas mostraron diferentes temperaturas y pH óptimos. Vohara y Satyanarayana (2004) informaron de ligadura de fitasa a la célula en cepas de levaduras terrestres. De acuerdo

YF04C are necessary. Table 1 shows that *Yarrowia lipolytica* W2B and *Kodamea ohmeri* BG3 had the highest extracellular phytase activity and both of them were isolated from the guts of marine animals. Several studies have shown that these two yeast species are common in marine and saline environments (Barnett *et al.* 2000, Jain *et al.* 2004).

The optimum temperature of phytases from the marine yeast strains ranged from 55°C to 65°C. This result was identical for the terrestrial yeasts. In general, terrestrial yeast phytase shows high activity in the 50–70°C temperature range, while optimum temperature is mostly between 45°C and 60°C (Haefner *et al.* 2005). It can also be seen from table 1 that strains WZ1, N12C, NY4E, and YF12C can produce both extracellular phytase and cell-bound phytase, which showed different optimal pH and temperature. Vohara and Satyanarayana (2004) reported the cell-bound character of phytases in terrestrial yeast strains. According to those authors, it has been proven that a considerable percentage of some phytases binds to the cell wall and is thus unavailable for phytate digestion as expected in feeding livestock. It can also be inferred from table 1 that the marine yeast strains isolated

con estos autores está probado que un considerable porcentaje de la fitasa está ligado a la pared celular y, por tanto, no está disponible para la digestión por fitasa esperada en la alimentación de seres vivos. También se puede inferir de la tabla 1 que las cepas de levaduras marinas aisladas de la superficie de algas no produjeron ni fitasa extracelular ni ligada a la pared celular.

Con base en la topología del árbol filogenético parece que las 10 cepas aisladas pertenecen a seis especies genéticas. La topología del filograma en la figura 1 confirma que la cepa WZ1 está muy relacionada con *Hanseniaspora uvarum*, mientras que las cepas W2B y YF08 están muy relacionadas con *Yarrowia lipolytica*. La cepa BG3 fue asignada a *Kodamaea ohmeri*. Las cepas N12C y NY4E pueden estar estrechamente relacionadas con *Candida carpophila* mientras que la cepa YF04C pertenece a los miembros de *Issatchenkia orientalis*. Las secuencias de 18S rARN de las cepas MA6, YF12C y MB2 fueron idénticas que las de *Candida tropicalis*. A pesar de que los resultados de asimilación de carbono y fermentación de las cepas YF12C, MA6 y MB2 fueron similares a *Candida tropicalis* (tabla 2), el árbol filogenético indica que las cepas MA6, YF12C y MB2 pertenecen a dos genotipos (fig. 1).

A pesar de que muchas especies de levaduras terrestres han sido identificadas como productoras de fitasa (Segueilha *et al.* 1992, Lambrechts *et al.* 1993, Bindu *et al.* 1998, Mayer *et al.* 1999, Nakamura *et al.* 1999), los resultados obtenidos en este estudio indican que todas las cepas encontradas fueron especies nuevas de levaduras marinas con actividad fitasa. Aunque el ambiente intestinal de los animales marinos es ácido, también pueden encontrarse cepas de levaduras productoras de fitasa alcalina en el intestino de animales marinos (tabla 1). Con base en los resultados obtenidos puede concluirse que cada una de las cepas puede ser objeto de análisis futuros tales como análisis de las propiedades de la enzima purificada, clonación de genes, etc. Por lo tanto, la purificación y caracterización de fitasas alcalinas a partir de levaduras marinas está siendo objeto de estudio en este laboratorio. La purificación y las propiedades de las enzimas purificadas de estas cepas serán discutidas en trabajos futuros.

Agradecimientos

Esta investigación ha sido financiada mediante el consejo de becas de China y las becas 3032802 de la Fundación Nacional de Ciencias Naturales de China.

Referencias

- Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. 2000. Yeasts: Characteristics and Identification. 3rd ed. Cambridge Univ. Press.
- Bindu S, Somashekar D, Joseph R. 1998. A comparative study on permeabilization treatments for *in situ* determination of phytase of *Rhodotorula gracilis*. Lett. Appl. Microbiol. 27: 336–340.
- Chi Z, Kohlwein SD, Paltauf F. 1999. Role of phosphatidylinositol (PI) in ethanol production and ethanol tolerance by highly ethanol producing yeasts. J. Indus. Microbiol. Biotechnol. 22: 58–63.

from the surface of algae did not produce both extracellular phytase and cell-bound phytase.

On the basis of tree topology, it appears that the 10 isolates belonged to six genospecies. The topology of the phylogram in figure 1 confirms that strain WZ1 was closely related to *H. uvarum*, while strains W2B and YF08 were closely related to *Y. lipolytica*. Strain BG3 was assigned to *K. ohmeri*. Strains N12C and NY4E could be closely related to *C. carpophila*, whereas strain YF04C belonged to members of *I. orientalis*. The 18S rDNA sequences of strains MA6, YF12C and MB2 were identical to those of *C. tropicalis*. Although the carbon assimilation and fermentation results of YF12C, MA6 and MB2 were similar to *C. tropicalis* (table 2), the phylogenetic tree indicates that these three strains belonged to two genospecies (fig. 1).

Though many terrestrial yeast species have been identified as producing phytase (Segueilha *et al.* 1992, Lambrechts *et al.* 1993, Bindu *et al.* 1998, Mayer *et al.* 1999, Nakamura *et al.* 1999), the results obtained in this study indicate that all strains were new marine yeast species with phytase activity. Although the intestinal environment of marine animals is acidic, alkaline phytase-producing marine yeasts could be present in the intestines of marine animals (table 1). Based on the results obtained, we conclude that every single strain can be subjected to further analysis (e.g., analyzing properties of purified enzymes, gene cloning, etc.). The purification and characterization of alkaline phytase from marine yeasts are being undertaken in this laboratory, and the properties of purified enzymes of these strains will be discussed in future works.

Acknowledgements

This research was supported by the Chinese Scholarship Council and grant 3032802 from the National Natural Science Foundation of China.

-
- Felsenstein J. 1995. PHYLIP (Phylogenetic Inference Package), Version 3.75. Distributed by author, Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
 - 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.
 - Jain MR, Zinjarde SS, Deobagkar DD, Deobagkar DN. 2004. 2,4,6-Trinitrotoluene transformation by a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. Mar. Pollut. Bull. 49: 783–788.
 - Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies on nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 2: 87–90.
 - Kurtzman CP, Fell J. 2000. The yeasts. A taxonomic Study. 4th revised and enlarged ed. Elsevier, Amsterdam. Pp. 5–174.
 - Kurtzman CP, Fell JW. 2006. Yeast systematics and phylogeny: Implications of molecular identification methods for studies in Ecology. In: Rosa CA, Peter G (eds.), The Yeast Handbook. Springer-Verlag, Berlin, pp.11–30.
 - Lambrechts C, Boza H, Segueilha L, Moulin G, Galzy P. 1993. Influence of culture conditions on the biosynthesis of *Schwanniomyces castellii* phytase. Biotechnol. Lett. 15: 399–404.

- Mayer AF, Hellmuth K, Schlieker H, Lopez-Ulibarri R, Oertel, S, Dahlems U, Strasser AWM, Van-Loon APM. 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.
- Nakamura T, Suzuki T, Tokuda J, Kato N, Sakai Y, Mochizuki D, Takhashi H. 1999. Secretory manufacture of *Schwanniomyces occidentalis* phytase using a *Candida boidinii* host. Eur. Patent Appl. Ep. 931, 837 July 28.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Beijing (Chinese translating ed.).
- Sano K, Fukuhara H, Nakamura Y. 1999. Phytase of the yeast *Arxula adeninivorans*. Biotechnol. Lett. 21: 33–38.
- Segueilha L, Lambrechts C, Boze H, Moulin G, Galzy P. 1992. Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castellii*. J. Ferment. Bioeng. 74: 7–11.
- Thanh VN, Van DMS, Wingfield MJ. 2002. *Debaryomyces mycophilus* sp. nov., a siderophore-dependent yeast isolated from woodlice. FEMS Yeast Res. 2: 415–427.
- Vats P, Banerjee CU. 2004. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate Pposphohydrolases): An overview. Enzyme Microb. Technol. 35: 3–14.
- Vohara A, Satyanarayana T. 2004. A cost effective molasses medium for enhanced cell bound phytase production by *Pichia anomala*. J. Appl. Microbiol. 97: 471–476.

Recibido en febrero de 2006;

aceptado en octubre de 2006.