

ROBERT DULIŃSKI, KRZYSZTOF ŻYŁA

WPLYW EGZOGENNYCH PREPARATÓW FITAZ NA ZAWARTOŚĆ FOSFORANÓW INOZYTOŁU W CIEŚCIE I PIECZYWIE ŻYTNIM

Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu dodatku enzymów fosforolitycznych na zawartość antyodżywczego składnika – kwasu fitynowego – i spektrum produktów jego hydrolizy tj. izomerów niższych fosforanów *mio*-inozytolu w cieście i pieczywie żytnim. Produkt wzbogacano wprowadzając komercyjne preparaty mikrobiologicznych 3- i 6-fitazy A oraz fitazy B na etapie wytwarzania ciasta. Technikę wysokosprawnej chromatografii jonowej zastosowano w celu obserwacji zmian profili fosforanów *mio*-inozytolu w trakcie fermentacji ciasta. Analizę zawartości fitynianu przeprowadzono metodą kolorymetryczną z odczynnikiem Wade. Największą redukcję kwasu fitynowego stwierdzono w przypadku 3-fitazy A w kombinacji z fitazą B. Stwierdzono, że współdziałanie 3-fitazy i 6-fitazy A z fitazą B nie wpływa na szlak defosforylacji fitynianu, a jedynie przyspiesza proces hydrolizy zgodnie ze zidentyfikowanymi ścieżkami biokonwersji fitaz A. Obserwacja ta została potwierdzona zarówno w eksperymentach modelowych enzym-substrat, jak i w przypadku enzymatycznie modyfikowanego pieczywa. W wyniku enzymatycznej konwersji powstają fizjologicznie aktywne produkty pośrednie m.in. Ins(1,2,6)P₃ oraz Ins(1,4,5)P₃, tak więc fitazy A w kooperacji z fitazą B mogą potencjalnie służyć jako biokatalizatory do produkcji żywności funkcjonalnej.

Słowa kluczowe: fitazy, kwas fitynowy, fosforany *mio*-inozytolu

Wprowadzenie

Kwas fitynowy (1,2,3,4,5,6-heksafosforan *mio*-inozytolu, IP₆) stanowi główną formę magazynowania fosforu w roślinach. W znaczących ilościach (0,5 - 10 mg/g) występuje w mąkach żytnich, pszennych oraz innych przetworzonych produktach zbożowych [8]. Związek ten nie podlega trawieniu w przewodzie pokarmowym zwierząt monogastrycznych oraz człowieka. Kwas fitynowy uważany jest za czynnik antyodżywczy z uwagi na zmniejszanie biodostępności związków mineralnych, białek i skrobi [4, 13]. Przypisywana mu rola związana jest z właściwościami chelatowania wielowartościowych pierwiastków, wynikającymi z obecności sześciu reaktywnych grup

Dr R. Duliński, prof. dr hab. inż. K. Żyła, Katedra Biotechnologii Żywności, Wydz. Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków

kwasu fosforowego w cząsteczce [9]. W celu zredukowania niekorzystnego działania kwasu fitynowego związek należy poddać hydrolizie do niższych fosforanów *mio*-inozytolu. Defosforylacja kwasu fitynowego na drodze nieenzymatycznej zachodzi poprzez hydrolizę termiczną, następującą częściowo również podczas gotowania roślinnych produktów spożywczych, a także w trakcie fermentacji z udziałem bakterii kwasu mlekowego oraz kiełkowania czy namoczenia ziaren [7, 10, 22].

Oprócz fizycznych i chemicznych metod obniżenia poziomu tego składnika w pożywieniu coraz szerszą akceptację zyskują metody enzymatyczne, polegające na wzbogacaniu żywności i pasz w selektywne biokatalizatory, mające zdolność hydrolizy tego związku. Fitazy, czyli fosfohydrolazy heksafosforanu *mio*-inozytolu są odpowiedzialne za katalizę reakcji hydrolizy kwasu fitynowego do niższych fosforanów *mio*-inozytolu [20]. Zgodnie z przyjętą klasyfikacją [15, 28], 3-fitazy (E.C. 3.1.3.8) uwalniają na początkowym etapie hydrolizy resztę fosforanową przy 6. węglu pierścienia inozytolu (typowe dla mikroorganizmów), natomiast pierwszym produktem działania 6-fitaz jest 1,2,3,4,5-pięcioletfosforan *mio*-inozytolu (enzymy roślin) [14, 24, 29, 31]. O ile w przypadku pasz wykorzystanie fitaz datowane jest od wczesnych lat 90. XX w., to w przypadku żywności proces ma jeszcze charakter rozwojowy [23, 30, 34]. Duże nadzieje wiąże się m.in. z wprowadzaniem enzymów fosforolitycznych na etapie wypieku pieczywa. Pierwsze próby [32, 33] wskazują na obiecujące perspektywy tej technologii, jakkolwiek dużym problemem pozostaje aspekt ekonomiczny. Udokumentowane efekty stosowania tego typu preparatów polegają głównie na wzroście biodostępności wybranych składników odżywczych i związków mineralnych oraz z technologicznego punktu widzenia – poprawie tekstury finalnego produktu [3, 4, 25, 32, 33]. Drugą kwestią jest wpływ zmian wywołanych przez te enzymy na spektrum produktów degradacji kwasu fitynowego. W gronie niższych fosforanów *mio*-inozytolu jest kilka związków o funkcjach fizjologicznych [18, 21]. Jednym z ważniejszych produktów są 1,4,5-trójfosforan *mio*-inozytolu oraz 1,3,4,5-tetrafosforan *mio*-inozytolu, które odpowiadają za metabolizm komórkowy, podziały mitotyczne i wydzielanie zewnątrzkomórkowe, poprzez regulację wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia. 1,2,6-trójfosforan *mio*-inozytolu prawdopodobnie zapobiega powikłaniom u osób chorych na cukrzycę, a także przewlekłym zapaleniom oraz chorobom układu naczyniowego [15]. W związku z powyższym zastosowanie fitaz w produkcji żywności może przyczynić się do zwiększenia puli fosforanów *mio*-inozytolu w produktach i umożliwić kontrolowany sposób sterowania ścieżką hydrolizy poprzez wprowadzenie pojedynczych lub kombinacji enzymów, stymulując potencjalne korzyści prozdrowotne.

Niniejsza praca stanowi próbę częściowej odpowiedzi na nurtujące problemy, zastosowano kombinacje handlowych preparatów fitaz A oraz fitazy B próbując wyjaśnić czy wzbogacenie pieczywa zmieni spektrum produktów tzn. przyczyni się do powstawania dodatkowych izomerów fosforanów *mio*-inozytolu.

W badaniach skoncentrowano się na analizach zmian profili fosforanów *mio*-inozytolu w trakcie procesu fermentacji ciasta, bowiem etap wypieku wiąże się z zastosowaniem wysokiej temperatury i inaktywacją enzymów, a różnica pomiędzy finalnym etapem fermentacji a kompozycja izomerów w pieczywie świeżym jest nieznaczna.

Material i metody badań

Material badawczy

Handlowe preparaty enzymatyczne: preparat o aktywności 3-fitazy A (Finase[®]P), aktywność deklarowana przez producenta 4123 FTU/g, oraz 6-fitaza A (Biofed[®]Phytase), aktywność deklarowana 8184 FTU/ml; Fitaza B (Finase[®]AP), aktywność deklarowana 5000 PPU/g producent AB Enzymes, Finlandia.

Eksperymenty modelowe w układzie enzym – substrat

Substrat w postaci 5 cm³ 5 mM roztworu fitynianu sodu inkubowano z 0,5 cm³ roztworu enzymu (aktywności 3- oraz 6-fitazy A: 25 FTU/ml; fitazy B: 2 AcPU/ml) w temp. 40 °C. W punktach czasowych 0, 30, 60, 90, 150 min pobierano 0,5 cm³ mieszaniny inkubacyjnej i wprowadzano do 2 cm³ lodowatego etanolu. Zawartość próbki intensywnie wstrząsano i umieszczano we wrzącej łaźni wodnej na 2 min w celu inaktywacji enzymu. 2,5 cm³ pobranej próbki rozcieńczano do 10 cm³ wodą redestylowaną, chłodzono i wirowano przy 12000 obr./min przez 6 min. Pobraną próbkę supernatantu filtrowano i poddawano analizie HPLC [5].

Przygotowanie ciasta

Surowce wyjściowe do fermentacji ciasta były następujące: 900 g mąki żytniej 2000 (ZPZ, Kraków), 100 g mąki pszennej typu 750 (ZPZ, Kraków), 50 g drożdży (Lesaffre P.S., Łódź), 30 g soli (NaCl, POCH, Gliwice), 80 g preparatu zakwaszającego (Bionat), 750 cm³ wody wodociągowej, 5 cm³ odpowiednio rozcieńczonego enzymu (dawki 3-fitaza A: 1500 FTU/kg mąki; 6-fitaza A: 1500 FTU/kg mąki; fitaza B: 30 AcPU/g mąki) w buforze octanowym o pH 4,5. Z wymieszanego ciasta formowano bochenki o masie 250 g, pozostawiano je w komorze fermentacyjnej w stałej wilgotności oraz w temp. 35,5 °C. Próbkę ciasta o masie 100 g przeznaczano do pomiaru pH oraz do badania profili fosforanów *mio*-inozytolu w ciągu 0, 15, 30, 60, 90, 150 min po wymieszaniu ciasta. Pomiar pH ciasta wykonywano pobierając w odpowiednich odstępach czasowych próbki o masie 5 g, które rozdrabniano i rozpuszczano w 50 ml wody dejonizowanej. Do przygotowanych w ten sposób roztworów wprowadzano elektrodę pomiarową (pehametr typu CP-315m, firmy ELMETRON; elektroda typ ERH-11).

Ekstrakcja próbek ciasta

Ekstrakcję próbek do analizy HPLC prowadzono w roztworze 0,5 M roztworem kwasu solnego. Próbki rozdrobnionego ciasta o masie $2 \pm 0,01$ g ekstrahowano (wyrząsarka ramieniowa) 20 cm^3 0,5 M roztworu kwasu solnego przez 3 h w temp. pokojowej. Otrzymany ekstrakt odwirowywano (4500 obr./min przez 30 min), przesącz przeznaczano do dalszego oczyszczania. W celu oddzielenia fosforanów *mio*-inozytolu od pozostałych składników ekstraktu przeprowadzano chromatografię jonowymienną. Do polipropylenowych kolumn o poj. 20 cm^3 wypełnionych 2 g złoża typu AG 1x8 Cl, (Bio-Rad) nanoszono porcjami 15 cm^3 ekstraktu. Elucję fosforanów *mio*-inozytolu zaabsorbowanych na matrycy przeprowadzano 10 cm^3 2 M roztworu HCl. Otrzymany eluat odparowywano do objętości $1,5 \text{ cm}^3$ przy użyciu rotacyjnej wyparki próżniowej. Przed iniekcją na szczyt kolumny chromatograficznej próbkę filtrowano przez sączki strzykawkowe o średnicy porów $0,44 \mu\text{m}$. Ilościową analizę kwasu fitynowego w badanych próbkach ciasta poddanego fermentacji przez 0, 60, 105, 150 min przeprowadzano metodą kolorymetryczną z odczynnikiem Wade [16], zaadaptowaną do pomiaru na czytniku mikroplótek firmy Biorad, model 680. Uzyskane wyniki stanowią średnią arytmetyczną z czterech powtórzeń.

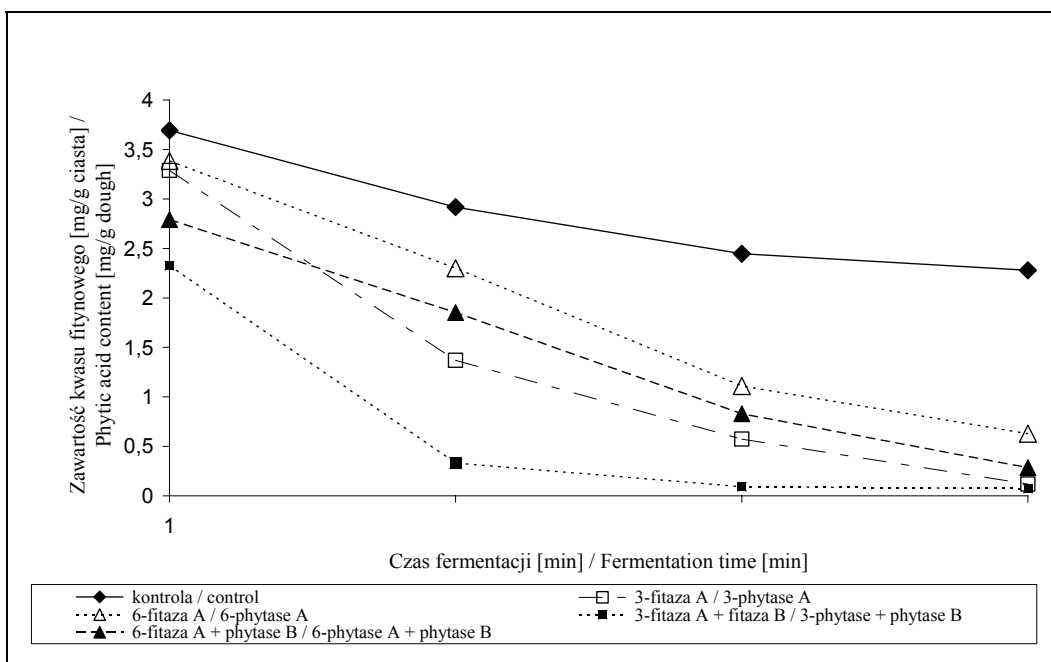
Analizy HPLC

Do analizy jakościowej fosforanów *mio*-inozytolu zastosowano anionowymienną wysokosprawną chromatografię cieczową z postkolumnową derywatyzacją i detekcją UV [5].

Rozdziały chromatograficzne wykonywano przy zastosowaniu liniowego gradientu w kolumnie analitycznej CarboPac PA-100 (250 mm x 4 mm, $10 \mu\text{m}$, mechanizm retencji: wymiana anionów) wyposażonej w kolumnę ochronną (50 mm x 4 mm) (Dionex) i detekcji spektrofotometrycznej przy 280 nm, która zachodziła po pozakolumnowej reakcji z roztworem 0,1 % $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ w 0,33 M HClO_4 . W tej reakcji fosforany inozytolu tworzą kompleks z jonami żelaza umożliwiając detekcje UV. Realizacja gradientu następowała poprzez zmieszanie odpowiednich proporcji eluentów (A) 500 mM HCl oraz (B) wody dejonizowanej przy zastosowaniu poniższego programu: 0 - 16 min, 8 - 20 % A, 92 - 80 % B; 16 - 33 min, 20 - 37 % A, 80 - 69 % B; 33 - 49 min, 37 - 100 % A, 63 - 0 % B; 49 - 50 min, 100 % A, 0 % B; 50 - 50,1 min, 100 - 8 % A, 0 - 92 % B. Prędkość przepływu eluentu oraz reagenta w reakcji postkolumnowej wynosiła odpowiednio 1,0 oraz 0,4 ml/min. W układzie pozakolumnowej derywatyzacji zastosowano pompę perystaltyczną Pharmacia LKB P-1 oraz pętlę opóźniającą z teflonu o pojemności $750 \mu\text{l}$ i wymiarach $1/16'' \times 0,50 \text{ mm}$ połączoną z trójnikiem do chromatografii niskociśnieniowej. Rozdziały przeprowadzano w temp. $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Objętość iniekcji standardów oraz roztworów próbek wynosiła $100 \mu\text{l}$. Analizy chromatograficzne wykonano w trzech powtórzeniach.

Wyniki i dyskusja

W przeprowadzonych badaniach, z uwagi na ścisłą zależność aktywności fitaz od pH [16], monitorowano odczyn badanych ciast. Zaobserwowano minimalne zmiany, na poziomie 0,02 jednostek pH w stosunku do wyjściowej wartości 4,74. W trakcie 150-minutowej fermentacji ciasta przeprowadzono analizy zawartości kwasu fitynowego metodą kolorymetryczną po 0, 60, 105 i 150 min od zakończenia mieszenia ciasta.

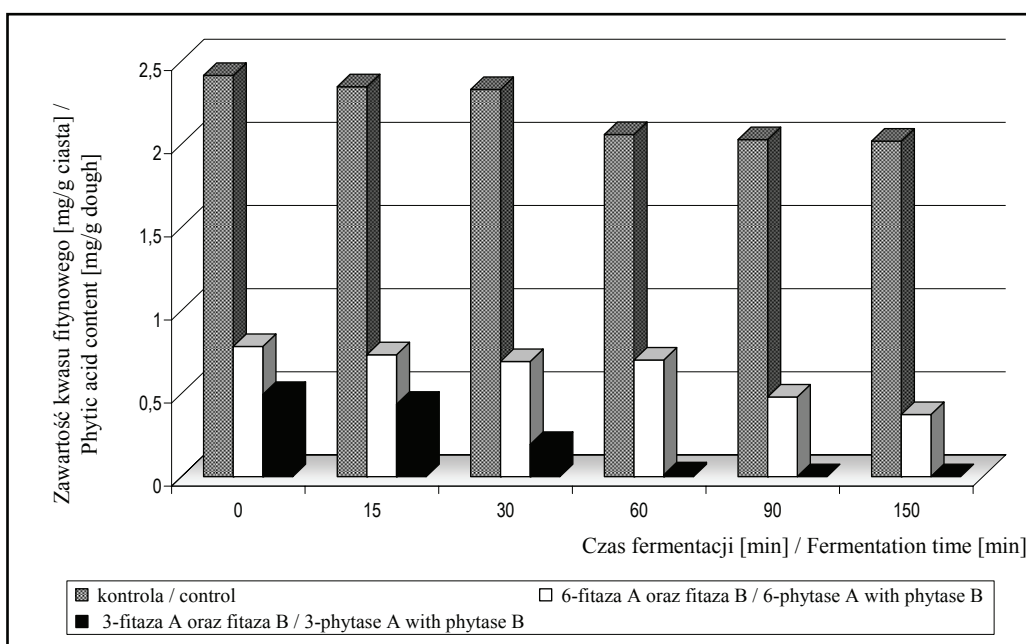


Rys. 1. Zawartość kwasu fitynowego w cieście kontrolnym oraz ciastach z dodatkiem enzymów fosforolitycznych oznaczona metodą kolorymetryczną (z odczynnikiem Wade); 3-fitaza A (1500 FTU/kg mąki), 6-fitaza A (1500 FTU/kg mąki), fitaza B (30 AcPU/g mąki).

Fig. 1. Phytic acid content in control dough and in doughs supplemented with phosphorolytic enzymes as determined using a colorimetric method with Wade reagent; 3-phytase A (1500FTU/kg flour), 6-phytase A (1500FTU/kg flour), phytase B (30 AcPU/gr flour).

W badaniach zastosowano identyczne dawki fitaz A, efektywność tych preparatów testowano również w kooperacji z fitazą B. W przypadku ciasta kontrolnego, bez dodatku enzymów fosforolitycznych, proces degradacji fitynianu następował systematycznie w ciągu 150 min fermentacji i prowadził do redukcji IP6 o 38 % w stosunku do wyjściowego poziomu 3,692 mg/g ciasta (rys. 1). Wprowadzenie na etapie mieszenia ciasta enzymów 3-fitazy A z fitazą B prowadziło do niemal całkowitej konwersji (97 %) kwasu fitynowego do niższych fosforanów inozytolu (0,073 mg fitynianu/g

ciasta w ciągu 150 min fermentacji). Podobną tendencję obserwowano w przypadku współdziałania 6-fitazy A oraz fitazy B, w rezultacie odnotowano ubytek zawartości tego składnika do poziomu 0,285 mg/g ciasta (rys. 1.) Zastosowanie pojedynczych fitaz A charakteryzowała mniejsza efektywność w środkowej fazie fermentacji (60 min), ale w końcowym punkcie (150 min) degradacja fitynianu nastąpiła do bardzo niskiego poziomu tj. 0,119 mg IP6/g ciasta (3-fitaza A) oraz 0,628 mg/g (6-fitaza A).



Rys. 2. Zawartość kwasu fitynowego w cieście kontrolnym oraz ciastach z dodatkiem enzymów fosforolitycznych oznaczona metodą HPLC; 3-fitaza A (1500FTU/kg maki), 6-fitaza A (1500 FTU/kg maki), fitaza B (30 AcPU/g maki).

Fig. 2. Phytic acid content in control dough and in doughs supplemented with phosphorolytic enzymes as determined by HPLC method; 3-phytase A (1500 FTU/kg flour), 6-phytase A (1500 FTU/kg flour), phytase B (30 AcPU/g flour).

Do oszacowania zawartości kwasu fitynowego w cieście zastosowano również metodę HPLC [5, 11], której zasadniczym celem była analiza jakościowa składu izomerów fosforanów inozytolu w produkcie. Porównując uzyskane wyniki w przypadku kombinacji fitaz A z fitazą B stwierdzono większy stopień redukcji fitynianu już na początkowych etapach fermentacji w stosunku do metody kolorymetrycznej. Przypuszczalnie jest to efekt mniejszej selektywności reakcji z odczynnikami Wade, w której biorą udział zarówno IP6, jak i IP5, natomiast metoda HPLC pozwala na jednoznaczną identyfikację sześcioposforanu *mio*-inozytolu i rozdzielenie tej substancji od niższych

izomerów (rys. 2). Z analiz HPLC wynika, że poziom fitynianu był już na początku etapu fermentacji (0 min) znacznie niższy niż w przypadku próby kontrolnej, odpowiednio 0,495 mg/g w przypadku 3-fitazy A i fitazy B oraz 0,783 mg/g ciasta dla 6-fitazy A, współdziałającej z fitazą B w stosunku do 2,413 mg/g dla ciasta kontrolnego. W końcowym punkcie fermentacji (po 150 min) nie stwierdzono już zawartości IP6 w cieście traktowanym preparatem 3-fitazy A oraz fitazy B, natomiast w produkcie z dodatkiem 6-fitazy A i fitazy B zanotowano poziom 0,374 mg fitynianu na gram próbki.

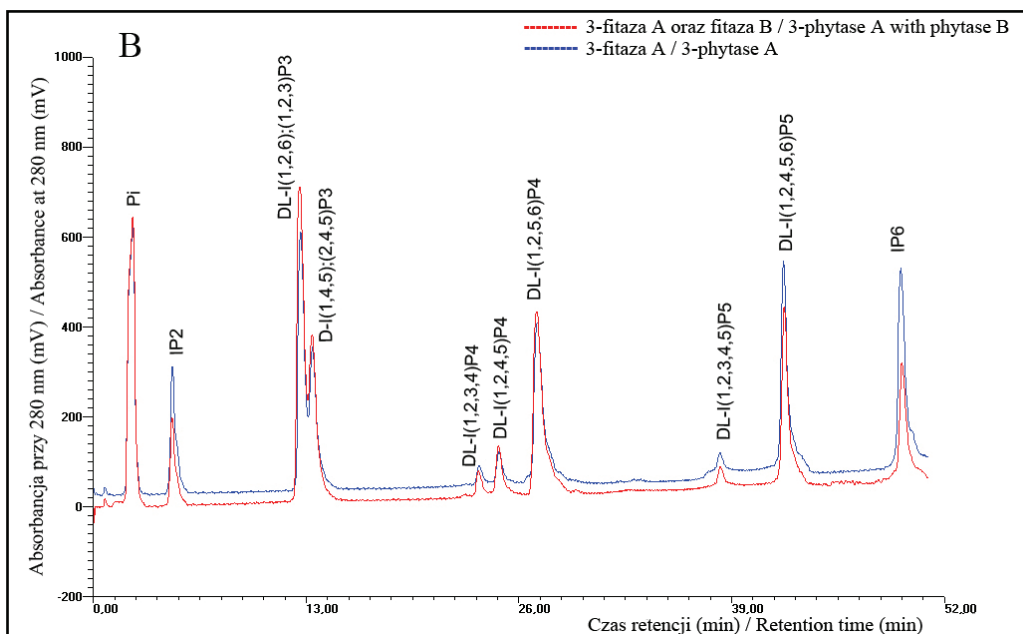
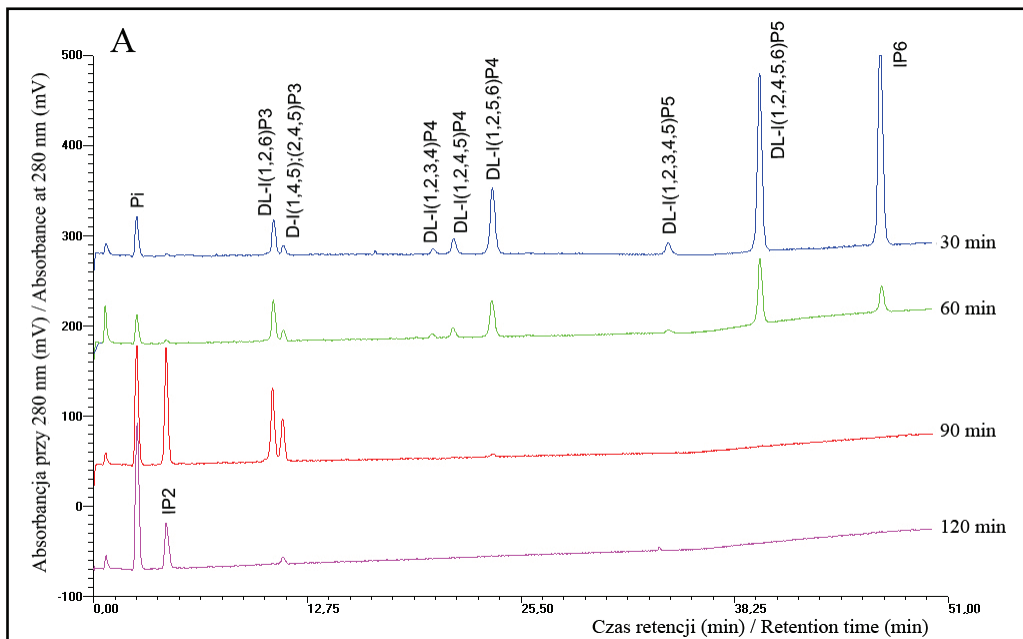
Analiza profili fosforanów inozytolu w modelowym układzie i w cieście z dodatkiem enzymów

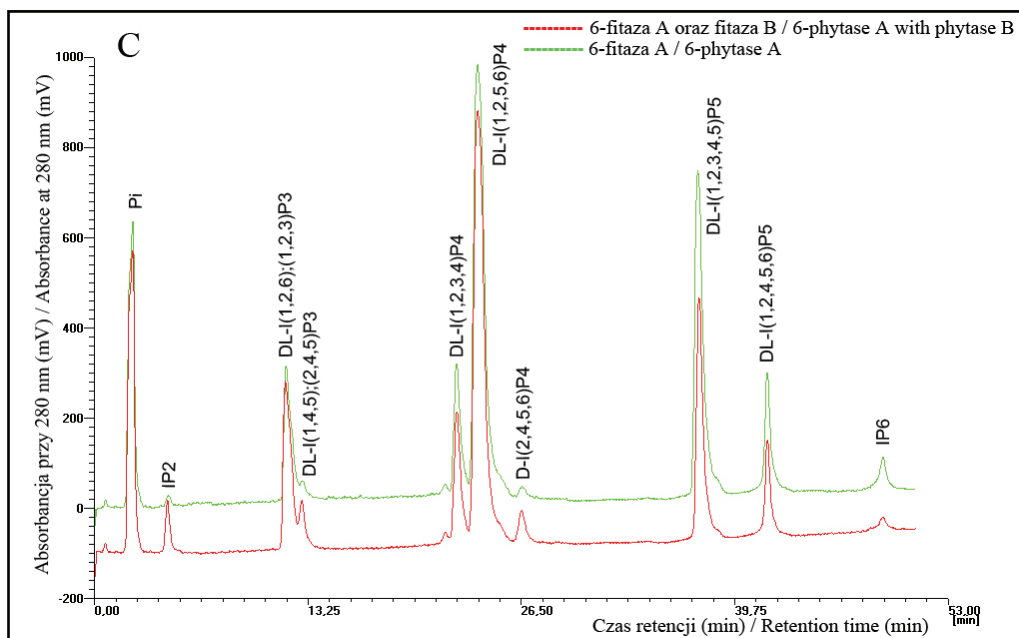
Druga faza badań miała na celu monitorowanie zmian profili fosforanów *mio*-inozytolu w eksperymentach modelowych z udziałem czystych preparatów enzymów oraz substratu i skonfrontowanie tych danych z analizami enzymatycznie modyfikowanego ciasta.

W przypadku akcji katalitycznej 3-fitazy A jako początkowe produkty zidentyfikowano DL-Ins(1,2,4,5,6)P5 oraz w mniejszej ilości DL-Ins(1,2,3,4,5)P5 (rys. 3A, czas inkubacji 30 i 60 min), co potwierdza specyficzność preparatu Finase P, jako 3-fitazy. W dalszej kolejności uwalniane są DL-Ins(1,2,5,6)P4; Ins(1,2,6)P3; IP2 (rys. 3A, czas inkubacji 90, 120 min). Taka sekwencja hydrolizy koresponduje z mechanizmem działania 3-fitazy w kooperacji z fitazą B (rys. 3B). Nie stwierdzono nowych produktów pośrednich, a zaobserwowano przyspieszony proces degradacji kwasu fitynowego, na co wskazuje m.in. znacznie mniejszy pik reprezentujący IP6 na chromatogramie z analizy współdziałania fitazy A oraz B (rys. 3B, linia czerwona), przy identycznych pozostałych parametrach (czas inkubacji, dawka enzymu) w stosunku do samej 3-fitazy A (rys. 3B, linia niebieska). Analiza produktów działania 6-fitazy A wskazuje na początkowe uwolnienie DL-Ins(1,2,3,4,5)P5, ale również w mniejszej ilości DL-Ins(1,2,4,5,6)P5, charakterystycznego przede wszystkim dla 3-fitazy A. Sekwencja hydrolizy prowadziła następnie przez DL-Ins(1,2,5,6)P4; DL-Ins(1,2,3,4)P4 oraz DL-Ins(1,2,6)P3 i DL-(1,2,3)P3 które mają identyczny czas retencji, podobnie jak para D-Ins(1,4,5)P3 i D-Ins(2,4,5)P3 (rys. 3C). Porównanie mechanizmu działania 6-fitazy A w kooperacji z fitazą B prowadzi do analogicznych obserwacji, jak w przypadku 3-fitazy A. Współdziałanie enzymów przyspiesza jedynie proces konwersji, nie wpływając w zasadniczy sposób na ścieżkę defosforylacji.

Monitorowanie produktów obecnych w enzymatycznie modyfikowanym cieście, uwolnionych pod wpływem 3-fitazy A oraz fitazy B potwierdza obecność izomerów zidentyfikowanych w badaniach modelowych. Na rys. 4A zaprezentowano chromatogram z analizy ciasta z dodatkiem 3-fitazy A w środkowej fazie fermentacji (60 min), bowiem dawka aplikowana w niniejszych eksperymentach, identyczna dla 6- oraz 3-fitazy, powodowała w przypadku tego ostatniego enzymu niemal całkowitą konwer-

się sześćcjofosforanu inozytoli w końcowej fazie fermentacji ciasta (150 min). Na chromatogramach obserwowano już tylko fosfor oraz niewielkie ilości dwufosforanu mio-inozytoli.





Rys. 3. Profile chromatograficzne fosforanów *myo*-inozytolu uzyskane w wyniku hydrolizy fitynianu sodu (5 mM) pod wpływem: A. 3-fitazy A (25 FTU/mL) w podanym czasie inkubacji. B. 3-fitazy A (25 FTU/mL) oraz fitazy B (2 AcPU/mL) w ciągu 30 min inkubacji z substratem. C. 3-fitazy A (25 FTU/mL) oraz fitazy B (2AcPU/mL) w ciągu 60 min inkubacji z substratem.

Fig. 3. Chromatographic profiles of *myo*-inositol phosphates obtained during enzymatic hydrolysis of sodium phytate (5 mM) under the impact of A. 3-phytase (25 FTU/mL) at a given time of incubation. B. 3-phytase A (25 FTU/mL) and phytase B during 30 minutes of incubation with substrate. C. 6-phytase A (25 FTU/mL) and phytase B (2 AcPU/mL) during 60 minutes of incubation with substrate.

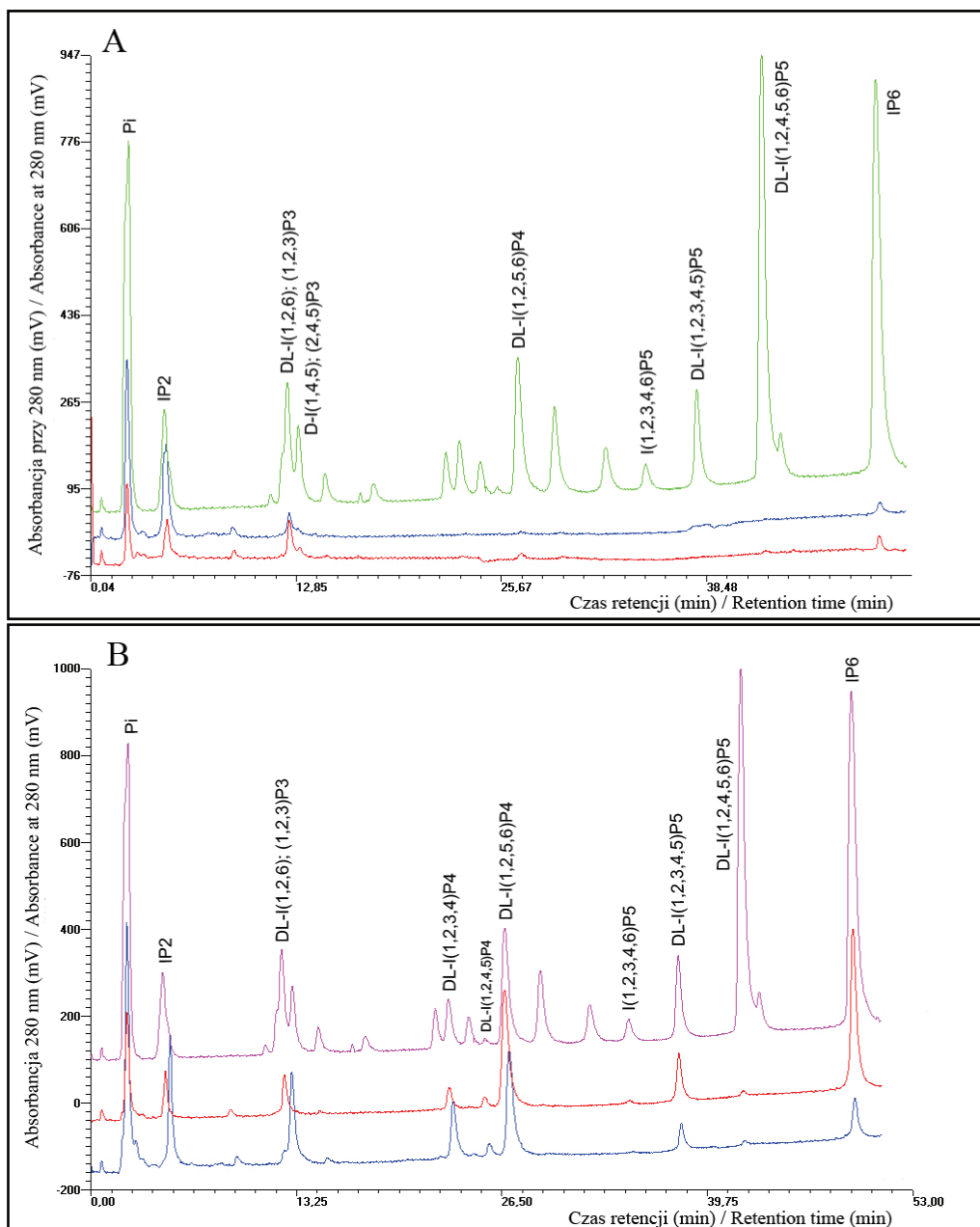
Analiza procesu hydrolizy fitynianu w cieście suplementowanym 6-fitazą A wskazuje na występowanie na końcowym etapie fermentacji zarówno kwasu fitynowego, jak i pośrednich izomerów procesu hydrolizy. Obecność głównego produktu z grona pięciofosforanów – Ins(1,2,3,4,5)P5 wskazuje na początkową aktywność 6-fitazy, ale dalsza identyfikacja niższych izomerów pozwala stwierdzić obecność Ins(1,2,3,4)P4; Ins(1,2,5,6)P4 oraz Ins(1,2,6)P3; Ins(1,2,3)P3 (rys 4B). Istotną obserwacją jest fakt, że dodatek preparatu fitazy B (rys. 4B, linia niebieska) nie zmienia ścieżki hydrolizy kwasu fitynowego, a jedynie przyspiesza degradację wyjściowego oraz produktów pośrednich w ramach istniejących szlaków konwersji zidentyfikowanych w przypadku fitaz A (rys. 4, linia czerwona). Obserwacje te zgodne są z profilem izomerów zanotowanym w eksperymentach modelowych z udziałem czystych preparatów enzymów i substratu (rys. 3B i 3C).

Przeprowadzone analizy jakościowe profili fosforanów *mio*-inozytolu trudno bezpośrednio odnieść do wyników prac Türka i wsp. [25], bowiem zastosowany przez autorów system nie pozwalał na identyfikację izomerów, zanotowali oni 67 % spadek poziomu fitynianu pod wpływem zastosowania fitazy z *A. niger* w procesie fermentacji ciasta pszennego.

Żyła i wsp. [33], stosując dawkę 5000 FTU/kg mąki fitazy A oraz fitazy B (30 AcPU/g mąki), oznaczali zawartość IP6 w świeżym pieczywie żytnim, stwierdzając niewielkie ilości (0,030 mg/g, przy 70% redukcji w stosunku do próby kontrolnej) kwasu fitynowego w produkcie. W przedstawionych w niniejszej pracy analizach, dane z metody kolorymetrycznej wskazują na poziom 0,073 mg/g, ale w cieście, a nie pieczywie oraz przy obniżonej dawce 3-fitazy A do 1500 FTU/kg mąki w stosunku do doświadczenia Żyły i wsp. [33]. W obu przytoczonych powyżej pracach zastosowano jednak mniej selektywny system detekcji (RP-HPLC z detekcją refraktometryczną) nieróżnicujący poszczególne izomery w przeciwieństwie do chromatografii jonowej z derywatyzacją pozakolumnową zaadaptowaną do niniejszych badań.

Haros i wsp. [12] zauważyli, że końcowa faza fermentacji nie różni się znacząco poziomem IP6 w stosunku do finalnego produktu, czyli świeżego chleba pszennego, tak więc decydujące znaczenie ma obraz chromatograficzny uzyskany w końcowym punkcie fermentacji tuż przed potencjalną inaktywacją termiczną fitaz. Autorzy wprowadzając preparat grzybowej fitazy w jednym stężeniu zaobserwowali zmniejszenie zawartości fitynianu z 74 % (mąka żytnia) do 89 % (mąka pszenna) w stosunku do wartości początkowej. Türk i wsp. [26] przeanalizowali potencjalny mechanizm działania fitazy z drożdży oraz pszenicy, prezentując spektrum izomerów obecnych w hydrolizacie fitynianu sodu poddanym enzymatycznej obróbce. Autorzy potwierdzili specyficzność drożdżowego enzymu jako 3-fitazy, identyfikując główny produkt hydrolizy Ins(1,2,4,5,6)P5, a enzym z pszenicy, zgodnie z oczekiwaniami, uwalniał w pierwszej kolejności Ins(1,2,3,4,5)P5, wykazując aktywność 6-fitazy. Odnosząc te dane do wyników niniejszej pracy można sądzić, że w procesie hydrolizy, oprócz wprowadzonych fitaz A i fitazy B niewielką rolę mogą odgrywać endogenne fitazy mikrobiologiczne obecne w surowcach. Jakkolwiek analiza pieczywa niewzbogaconego enzymami, w którym dominującym produktem jest kwas fitynowy [6, 25], nie pozostawia wątpliwości, że te wewnętrzne biokatalizatory nie mogą w znaczący sposób zmieniać spektrum izomerów i przede wszystkim nie stanowią skutecznego narzędzia w procesie kontrolowanej biokonwersji fitynianu.

Analiza spektrum izomerów fosforanów inozytolu w enzymatycznie modyfikowanym cieście zarówno w przypadku aktywności 3-, jak i 6-fitazy A wskazuje na obecność w finalnym produkcie 1,2,6-trójfosforanu *mio*-inozytolu, który prawdopodobnie zapobiega powikłaniom u osób chorych na cukrzycę, a także przewlekłym



Rys. 4. Profile chromatograficzne fosforanów *mio*-inozytoli w enzymatycznie modyfikowanym cieście A. 60. minuta fermentacji: chromatogram referencyjny: termiczny hydrolizat kwasu fitynowego (—); pieczywo z dodatkiem 3-fitazy A [1500 FTU/kg mąki] (—); pieczywo z dodatkiem 3-fitazy A [1500 FTU/kg mąki] oraz kwaśnej fosfatazy [30 AcPU/ g mąki] (—). Analiza metodą HPLC B. 150 min fermentacji: chromatogram referencyjny: termiczny hydrolizat kwasu fityno-

wego (—); pieczywo z dodatkiem 6-fitazy A [1500 FTU/kg mąki] (—); pieczywo z dodatkiem 6-fitazy A [1500FTU/kg mąki] oraz kwaśnej fosfatazy [30 AcPU/ g mąki] (—).

Fig. 4. Chromatographic profiles of *myo*-inositol phosphates in enzymatically modified dough **A**. 60 minutes of fermentation: reference chromatogram: thermal hydrolysate of phytic acid (—); bread supplemented with 3-phytase A [1500 FTU/kg flour] (—); bread supplemented with 3-phytase A [1500 FTU/kg flour] and phytase B [30 AcPU/ g flour] (—). **B**. Analysis using HPLC B method: 150 min of fermentation: reference chromatogram: thermal hydrolysate of phytic acid (—); bread supplemented with 6-phytase A [1500 FTU/kg flour] (—); bread supplemented with 6-phytase A [1500 FTU/kg flour] and phytase B [30 AcPU/ g flour] (—).

zapaleniom oraz chorobom układu sercowo-naczyniowego [15]. Izomer ten ma identyczny czas retencji jak Ins(1,4,5)P3 i nie można wykluczyć, że również ta substancja, pełniąca funkcje przekaźnika międzykomórkowego, jest obecna w produkcie finalnym.

Reasumując, można stwierdzić, że fitazy A w kooperacji z fitazą B mogą służyć jako skuteczne narzędzie konwersji fitynanu w pieczywie i w zależności od zastosowanych dawek i proporcji obu enzymów w kontrolowany sposób pozwalają na uzyskanie produktu o walorach żywności funkcjonalnej.

Wnioski

1. Zastosowanie preparatu 3-fitazy A (Finase P, 1500 FTU/kg mąki) w kombinacji z fitazą B (Finase AP, 30AcPU/g mąki) jako dodatku do ciasta żytniego powoduje 97 % redukcję poziomu kwasu fitynowego. Jest to najbardziej efektywna kombinacja enzymów fosforolitycznych zastosowana w niniejszej pracy.
2. W przypadku zastosowania preparatu 6-fitazy A stwierdzono sekwencje hydrolizy kwasu fitynowego poprzez Ins(1,2,3,4,5)P5; Ins(1,2,3,4)P4; Ins(1,2,3)P3 oraz IP2.
3. Zastosowanie w procesie hydrolizy 3-fitazy A prowadzi do powstania pierwszego głównego produktu Ins(1,2,4,5,6)P5, a następnie szlak prowadzi przez Ins(1,2,5,6)P4; Ins(1,2,6)P3 i IP2.
4. Współdziałanie 3-fitazy A i 6-fitazy A odpowiednio z fitazą B nie wpływa na szlak defosforylacji fitynianu, a jedynie przyspiesza proces hydrolizy w ramach istniejących ścieżek konwersji zidentyfikowanych dla fitaz A. Obserwacja ta została potwierdzona zarówno w eksperymentach modelowych w układzie enzym-substrat, jak i w przypadku enzymatycznie modyfikowanego ciasta żytniego.

Literatura

- [1] Andlid T.A., Veide J., Sandberg A.S.: Metabolism of extracellular inositol hexaphosphate (phytate) by *Saccharomyces cerevisiae*. Int. J. Food Microbiol., 2004, **97**, 157-169.
- [2] Ashima V., Satyanarayana T.: Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. Crit. Rev. Biotechnol., 2003, **23**, 29-60.

- [3] Augspurger N.R., Backer D.H.: High dietary phytase levels maximize phytate-phosphorus utilization but do not affect protein utilization in chicks fed phosphorus- or amino acid-deficient diets. *J. Anim. Sci.*, 2004, **82**, 1100-1107.
- [4] Bohn T., Davidson L., Walczyk T., Hurrell R. F.: Phytic acid added to white-bread inhibits fractional apparent magnesium absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, **79**, 418-423.
- [5] Chen Q.C., Li B.W.: Separation of phytic acid and other related inositol phosphates by high-performance ion chromatography and its applications. *J. Chromatogr. A*, 2003, **1018**, 41-52.
- [6] Duliński R., Ciombor J., Żyła K.: Profile fosforanów *myo*-inozytolu w enzymatycznie modyfikowanym pieczywie żytnim analizowane metodą wysokosprawnej chromatografii jonowej. *Mat. I Konf. „Analityczne zastosowania chromatografii cieczowej”*, PZH oraz Polygen Gliwice, Warszawa 2006, ss. 21-22.
- [7] Fredlund K., Asp N.G., Larsson M., Marklinder I., Sandberg A.-S.: Phytate reduction in whole grains of wheat, rye, barley and oats after hydrothermal treatment. *J. Cereal Sci.*, 1997, **25**, 83-91
- [8] Garcia-Esteva R.M., Guerra-Hernandez E., Garcia-Villanova B.: Phytic acid content in milled cereal products and breads. *Food Res. Int.*, 1999, **32**, 217-221.
- [9] Harland B.F., Morris E. R.: Phytate: A Good or A Bad Food Component? *Nutr. Res.*, 1995, **15**, 733-754.
- [10] Harland B.F., Narula G.: Food phytate and its hydrolysis products. *Nutr. Res.*, 1999, **19**, 947-961.
- [11] Harland B.F., Smikle-Williams S., Oberlas D.: High performance liquid chromatography analysis of phytate (IP6) in selected foods. *J. Food Compos. Anal.*, 2004, **17**, 227-233.
- [12] Haros M., Rosell C. M., Benedito C.: Use of fungal phytase to improve breadmaking performance of whole wheat bread. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 5450-5454.
- [13] Hidvegi M., Laszity R.: Phytic acid content of cereal and legumes and interaction with proteins. *Periodica Polytechnica Ser. Chem. Eng.*, 2003, **46**, 59-64.
- [14] Kerovuo J., Rouvinen J., Hatzack F.: Analysis of *myo*-inositol hexakisphosphate hydrolysis by *Bacillus* phytase: indication of a novel reaction mechanism. *Biochem. J.*, 2000, **352**, 623-628.
- [15] Konietzny U., Greiner R.: Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2002, **37**, 791-812.
- [16] Latta M., Eskin M.: A Simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *J. Agric. Food Chem.*, 1980, **28**, 1313-1315.
- [17] Leenhardt, F., Levrat-Verny M. A., Chanliaud E., Rémésy C.: Moderate decrease of pH by sour-dough fermentation is sufficient to reduce phytate content of whole wheat flour through endogenous phytase activity. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 98-102.
- [18] Loewus F. A., Murthy P. P. N.: *Myo*-inositol metabolism in plants. *Science*, 1999, **150**, 1-19.
- [19] Lopez H. W., Leenhardt F., Coudray Ch., Rémésy Ch.: Minerals and phytic acid interactions: is it a real problem for human nutrition? *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2002, **37**, 727-739.
- [20] Pandey A., Szakacs G., Soccol C.R., Rodriguez-Leon J.A., Soccol V.T.: Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresour. Technol.*, 2001, **77**, 203-214.
- [21] Plaami S.: *Myo*-inositol phosphates: analysis, content in foods and effects in nutrition. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 1997, **30**, 633-647.
- [22] Reale A., Mannina L., Tremonte P., Sobolev A.P., Succi M., Sorrentino E., Coppola R.: Phytate degradation by lactic acid bacteria and yeasts during the wholemeal dough fermentation: a 31P NMR study. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 6300-6305.
- [23] Sandberg A. S., Andlid T.: Phytogetic and microbial phytases in human nutrition. *Int. J. Food Technol.*, 2002, **37**, 823-833.
- [24] Simon O., Igbasan F.: *In vitro* properties of phytases from various microbial origins. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2002, **37**, 813-822.
- [25] Türk M., Carlsson N.-G., Sandberg A.-S.: Reduction in the levels of phytate during wholemeal bread making: Effect of yeast and wheat phytases, *J. Cereal Sci.*, 1995, **23**, 257-264.

- [26] Türk M., Sandberg A.S.: Phytate degradation during breadmaking: effect of phytase addition. *J. Cereal Sci.*, 1992, **15**, 281-294.
- [27] Türk M., Sandberg A.S., Carlsson N.G., Andlid T.: Inositol hexaphosphate hydrolysis by baker's yeast. Capacity, kinetics, and degradation products. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 100-104.
- [28] Vats P., Banerjee U. C.: Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. *Enzyme Microb. Technol.*, 2004, **35**, 3-14.
- [29] Vats, P., Banerjee. U. C.: Biochemical characterisation of extracellular phytase (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase) from a hyper-producing strain of *Aspergillus niger* van Teighem. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, **32**, 141-147.
- [30] Vohra A., Satyanarayana T.: Phytases: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2003, **23**, 29-60.
- [31] Wyss M., Pasamontes L., Friedlein A., Rémy R., Tessier M., Kronenberger A., Middendorf A., Lehmann M., Schnoebelen L., Röthlisberger U., Kuszniir E., Wahl G., Müller F., Lahm H.W., Vogel K., van Loon A.P.: Biophysical characterization of fungal phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. *Appl. Envir. Microbiol.*, 1999, **65**, 359-366.
- [32] Żyła K., Mika M., Gambuś H., Nowotny A., Szymczyk B.: Fungal phytases in wholemeal breadmaking. I: 3-Phytase A improves storage stability and in vitro nutrients digestibility of wheat breads, *EJPAU, Biotechnology*, 2005, **8** (4).
- [33] Żyła K., Mika M., Gambuś H., Nowotny A., Szymczyk B.: Fungal phytases in wholemeal breadmaking III: Nutritional effects of different phytases in rye breads, *EJPAU, Biotechnology*, 2005, **8** (4).
- [34] Żyła K., Mika M., Wikiera A., Perek P.: Interakcje pektynaz i fosfatyz w procesie zmian biodostępności białka z paszy dla drobiu. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, **4** (41), 107-116.

EFFECT OF EXOGENIC PREPARATIONS ON CONTENT OF INOSITOL PHOSPHATES IN RYE DOUGH AND RYE BREAD

S u m m a r y

The objective of this study was to determine the effect of supplementing dough with phosphorolytic enzymes on the content of anti-nutritional factor, phytic acid, and on the spectrum of products of its hydrolysis, i.e. lower isomers of myo-inositol phosphates, in rye dough and rye bread. The product tested was supplemented with commercial, microbiological preparations of 3- and 6-phytase A and of phytase B during the proofing of dough. A high-pressure ion chromatography was applied to monitor changes in the profiles of myo-inositol phosphates during the fermentation of dough. The analysis of the content of phytate was performed using a colorimetric method with a Wade reagent. The highest reduction in the content of phytic acid was found in the case of 3-phytase A combined with phytase B. It was found that the cooperation between the 3-phytase and 6-phytase A with phytase B did not impact the dephosphorylation pathway of phytate, it only accelerated the hydrolysis process according to the bioconversion routes of phytase A. This fact was confirmed both by 'enzyme – substrate' model experiments and by the enzymatically modified breads. The enzymatic conversion results in forming physiologically active intermediates, among other things: Ins(1,2,6)P₃ and Ins(1,4,5)P₃, thus, the phytases A in cooperation with the phytase B could be, potentially, applied as bio-catalysts in the production of functional foods.

Key words: phytases, phytic acid, myo-inositol phosphates ☒