

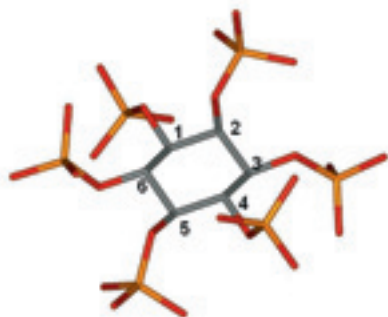
Fytinsyrenedbrydning ved fytase

– studeret med ^{31}P NMR og multivariat kurveopløsning

Antallet af komplekst bundne fosfatgrupper til fytinsyre i korn til foder og brødfremstilling er afgørende for biotilgængeligheden af mineraler. ^{31}P NMR kombineret med multivariat dataanalyse er en unik metode til at undersøge fytinsyrenedbrydning

Af Merete Møller Nielsen, Nanna Viereck & Søren Balling Engelsen, Kvalitet & Teknologi, Institut for Fødevarevidenskab, KVL

Fytinsyre (*myo*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis dihydrogen fosfat, IP6), som er vist i figur 1, danner stærke komplekser med forskellige divalente og trivalente kationer, men også til proteiner og stivelse. Opløseligheden af disse komplekser er meget pH-afhængig, og de fleste fytinsyre-mineral-komplekser, kaldet fytat, er opløselige ved pH under 3,5. Mellem pH 4 og 7, hvilket er samme pH som i tarmene, hvor absorptionen af mineralerne forekommer, er kompleksdannelsen nær uopløselig.



Figur 1. Atomstruktur af fytinsyre. Kun fosfatgruppen på C-atom 2 er aksial.

Kompleksdannelsen er afhængig af antallet af fosfatgrupper på inositol-ringen; jo færre fosfatgrupper, des svagere komplekser. Fosfat i form af fytat er generelt ikke biotilgængelig for ikke-drøvtyggende dyr, fordi de mangler fordøjelsesenzymerne fytase, som er nødvendigt for at nedbryde molekylet.

Fytase er et enzym, der katalyserer den trinvis nedbrydning af fytinsyre til lavere inositol-fosfater (*myo*-inositol pentaosfat, IP5 til *myo*-inositol og uorganisk fosfat, figur 2).



Figur 2. Trinvis nedbrydning af fytinsyre (IP6) til lavere inositol-fosfater (IP5, IP4, IP3, IP2, IP1) og *myo*-inositol samt uorganisk fosfat.

Der er to internationalt klassificerede fytaser: 3-fytase (EC 3.1.3.8) og 6-fytase (EC 3.1.3.26). Enzymerne er navngivet efter, hvilket C-atom første fosfatgruppe fraspalttes. 3-fytase synes at være af mikrobiel oprindelse, hvorimod 6-fytase syntetiseres af planter [1]. En 4-fytase menes at stamme fra korn [2]. Enzymatisk aktivitet af fytase medvirker til frigivelse af fosfat og er en vigtig parameter for at gøre fytatrige fødevarer og foderstoffer ernæringsmæssigt gode. I et moderne landbrug med ikke-drøvtyggende dyrehold såsom svine- og kyllingefarme er foderet hovedsagelig soyabønner og majs. Fordi fytat i disse korn er biotilgængelig, passerer fytatmolekylerne uabsorberet gennem tarmsystemet og direkte ud i miljøet og kan dermed medvirke til fosfatforurening. Ifølge litteraturen bør fytat være nedbrudt til mindst IP3, før de kompleksbundne mineraler

frigives og dermed bliver biotilgængelige [3]. Kombinationen af fosfor-NMR og kemometri giver nogle unikke muligheder for at studere denne omdannelse.

Hvorfor ^{31}P NMR?

Fytatnedbrydning i fødevarer studeres oftest ved HPLC, hvor det er muligt ved brug af et fytathydrolysat at identificere de forekommende nedbrydningsprodukter. HPLC er en destruktiv analyse, hvor det er nødvendigt at lave en syrehydrolyse på prøven for at få et ekstrakt, der kan anvendes i HPLC'en.

På Institut for Fødevarevidenskab er vi i gang med at opbygge en NMR-facilitet specifikt beregnet til at studere en række udvalgte problemstillinger inden for fødevareforskningen vha. NMR-spektroskopi og samtidig udvikle dataanalyseprogrammer specifikt til kvantitativ NMR-signalbehandling.

Med direkte inspiration fra metabonomics har vi introduceret begrebet *bromatonomics*, der dækker over »kvantitative målinger af levnedsmidlers funktionelle kvalitetsparametre, studeret ved NMR på intakte fødevarer evalueret med multivariat dataanalyse«. Pga. den høje følsomhed har vi hovedsageligt interesseret os for proton NMR, men fosforkernen er faktisk den næstmest NMR-aktive kerne. Da ^{31}P NMR samtidig er en yderst direkte måde at studere detaljeret fytatnedbrydning på, var det naturligt at undersøge det kvantitative potentiale for teknikken.

Hvorfor multivariat dataanalyse?

For at forstærke fortolkningen af den kvantitative information, der fremkommer ved måling på komplekse fødevarer, er det ofte nødvendigt at kombinere de spektroskopiske målemetoder med avancerede multivariate (kemometriske) metoder. Dette åbner for et hidtil uudnyttet potentiale for intern kvalitetskontrol af fødevarer, da disse teknologier tilsammen kan benyttes til fingerprinting af processer og produkter. Kemometri, kaldet vi »matematik uden tårer«, fordi teknologien muliggør effektiv håndtering af store datasæt, hvor man udnytter den af statistikkerne frygtede ko-linearitet, og hvor man projicerer sine data ind i et lavdimensionalt rum, der intuitivt kan visualiseres i et grafisk interface. Multivariat datavisualisering af komplekse multivariate datasæt fra den virkelige verden er måske den mest betydende feature ved kemometri. Sat lidt på spidsen findes der ingen univariate problemer i den verden, der omgiver os – dette er mest definitivt blevet understreget af den konservative amerikanske Food and Drug Administration i deres Process Analytical Technology (PAT) guidance to the Pharmaceutical Industry: »Traditional one-factor-at-a-time experiments do not effectively address interactions between products and process variables«.

En af fordelene ved at anvende kemometri på kollinære spek-

trale data er muligheden for at foretage en induktiv og eksplorativ undersøgelse [4]. Vi vil her demonstrere en sammenlignende applikation af to forskellige multivariate teknikker: den universelle kemometriske algoritme *principal component analyse* (PCA) [5] og multivariat kurveopløsning (MCR) [6]. Fælles for de to algoritmer er, at de begge kræver en todimensional datastrategi, altså at der måles en serie af prøver, og at der som resultat findes fælles (latente) datastrukturer med tilhørende individuelle scorer (koncentrationer). Der kræves altså en matrix X , hvor hver række repræsenterer måling (NMR-spektre) af en prøve (fyttatprøve).

Ved PCA er modellen, der ønskes løst, $X = T \cdot P^t + E$, hvor datamatrixen X (prøver $\times$ spektrale variable) opløses i en lavdimensional scorematrix (T) (prøver $\times$ antal latente komponenter), der repræsenterer prøvekoncentrationer og en lavdimensional loading matrice (P) (spektrale variable $\times$ antal latente komponenter), som repræsenterer fælles latente spektra. E -matricen indeholder de usystematiske residualer. For robust opløsning af latente strukturer benytter PCA, at loadings (og scores) er ortogonale. PCA kan betragtes som det første bud ved eksplorativ dataanalyse pga. dens ekstraordinært robuste datareduktion, dens lave niveau af *a priori* forudsætninger og pga. dens datapræsentations-kapacitet.

Multivariat kurveopløsning (MCR) [6] eller alternerende regression løser den samme model som PCA, men kræver ikke ortogonalitet ved løsningen. Analogt med PCA er modellen, der ønskes løst $X = C \cdot S^t + E$, hvor datamatrixen X (prøver $\times$ spektrale variable) ønskes kurveopløst i to matricer: C (prøver $\times$ antal rene komponenter) der indeholder de estimerede koncentrationer af de individuelle blandingskomponenter og S (spektrale variable $\times$ antal rene komponenter), der indeholder

de rene spektra af blandingskomponenterne. MCR bygger på alternerende regression og er normalt ikke, som PCA, en robust datateknologi. I dette modellforsøg har vi implementeret MCR med *non-negativity constraints* [7] for både koncentrationer og spektra.

Kemometriske beregninger og visualisering af spektre er foretaget med version 1.05beta af LatentiX (www.latentix.com, København, DK). MCR-beregninger er foretaget med CARS (www.kvl.models.dk) implementeret under MatLab (Math-Works Inc., Natic, USA).

Nedbrydningsmønsteret af fytinsyre målt med ^{31}P NMR

Nedbrydningen af fytinsyre med fytase blev studeret i realtid med ^{31}P NMR-spektre. Figur 3 viser NMR-spektrene som funktion af tiden. Til at begynde med, inden fytase er aktivt, fremkommer der fire ^{31}P -toppe i spektret (0.14, 0.47, 1.06 og 1.76 ppm) med et intensitets-forhold på 1:2:2:1. Dette forhold skyldes de seks fosfor-atomer i fytinsyremolekylet (IP6), hvoraf 2 par er degenereret pga. symmetri [8]. Efter aktivering af fytase ændres det spektrale mønster og intensitet som en konsekvens af nedbrydningen af IP6 til lavere inositoler. Først dannes fem nye toppe, som skyldes dannelsen af en specifik IP5, fordi der kun dannes fem lige stærke bånd. Dette skyldes dannelsen af et asymmetrisk molekyle, hvor kulstof 2 og 5 stadig er fosforyleret, i god overensstemmelse med, at det er en hvede-fytase, der anvendes, som er specifik for hydrolyse på kulstof 6. Den enzymatiske proces bliver mere og mere kompleks, men der dannes en dominerende isomer for penta-, tetra-, tri-, di- og monofosfater, hvilket tydeligt fremgår af figur 5, side 28. Nedbrydningen med fytase fortsatte i 14 timer og endepunktet var et spektrum med fire toppe (0.38, 0.42,



Kunstner Bjørn Bjørnholt

Plougmann & Vingtoft

intellectual property consulting

Beskyt din investering i forskning og udvikling

Kan du tjene penge på patenter?
Patenterer dine internationale konkurrenter i dit marked?
Kan du sælge et produkt uden at skulle bekymre dig om konkurrence?

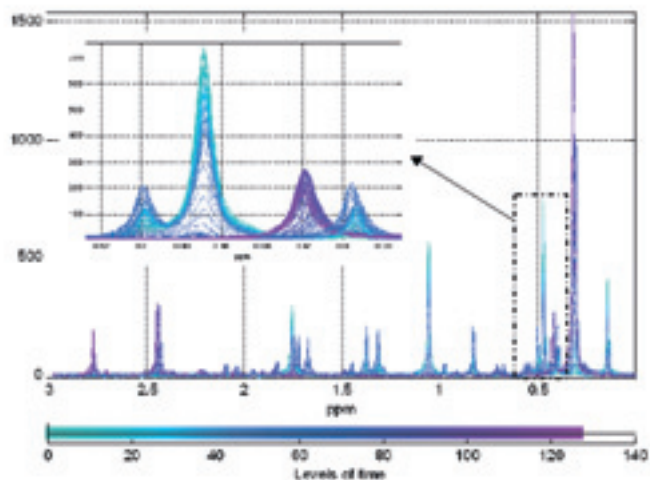
Ring til os for et uforpligtende møde.
Vi synes det er sjovt at gøre vores kunder rige.

Kontakt

Peter Horn Møller, tlf. 3363 9328, e-mail phm@pv.eu
Patentkonsulent og leder af Life Science & Chemistry

Plougmann & Vingtoft er blandt Europas førende rådgivningsvirksomheder inden for patenter, designs og andre intellectual property rights. Vores 40 konsulenter har spidskompetencer inden for områderne Life Science & Chemistry samt Technology & Software.
Læs mere på www.pv.eu

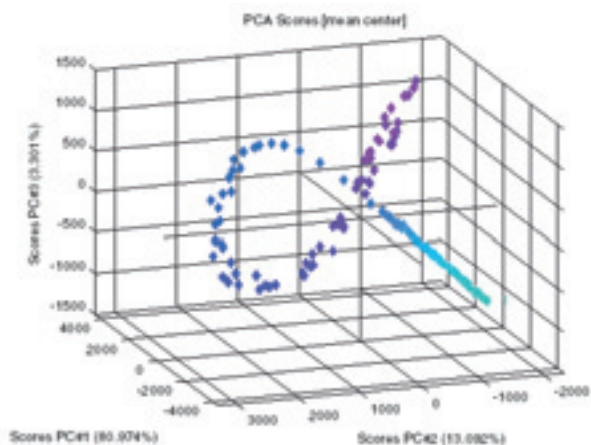
2.45 og 2.77 ppm). De fire tilbageværende toppe korresponderer til de tre isomerer af IP1, der dannes ved hydrolysen, samt uorganisk fosfat (0.38 ppm).



Figur 3. ^{31}P NMR-spektre, der viser hydrolyse af ren Na-fytate med fytase i 19 timer.

For at illustrere ændringerne i ^{31}P -spektrene over tid er området fra 0.37 til 0.53 ppm fremhævet. På figuren ses, at tre toppe falder i intensitet (inkl. IP6 ved 0.47 ppm), mens en top stiger i intensitet. Dette mønster fortsætter, da IP5 nedbrydes til IP4 og IP4 til IP3 og så videre, indtil der kun er IP1 og uorganisk fosfat tilbage.

En PCA over tidsserien fra ^{31}P -spektrene afslører, at de to første principalkomponenter inkluderer i alt 94% af den totale variation i de spektrale data. Scoreplottet, som ikke er vist, har en for mean-centrerede data typisk hesteskoform og forekommer relativt simpelt. Denne simpelhed kunne ikke forudsiges ud fra den relativt komplekse reaktionsmekanisme fra IP6 til IP1. Men allerede hvis man inkluderer en tredje PC til et 3D scoreplot (se figur 4) observeres et langt mere komplekst reaktionsmønster. Den ekstra 3% variation beskrevet ved PC3 resulterer i et loop-mønster af scoreværdierne, hvilket indikerer et meget kompleks scoremønster.



Figur 4. 3D PCA scoreplot af de mean-centrerede ^{31}P spektre. PC1, PC2 og PC3 forklarer tilsammen 98% af variationen i NMR-spektrene.

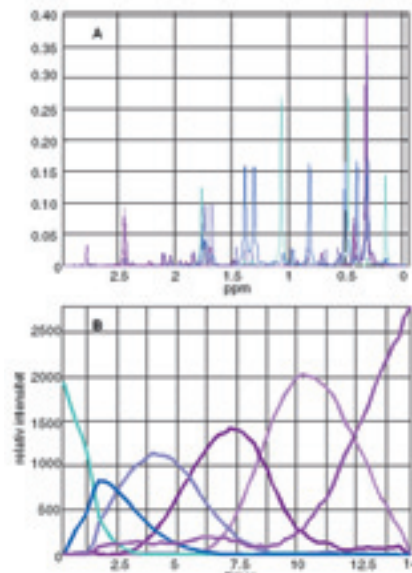
I stedet for at modellere fytionsyrenedbrydningen i ^{31}P NMR-spektrene med PCA opnås måske en mere realistisk model ved brug af multivariat kurveopløsning (MCR), der ikke kræver

ortogonalitet af de rene spektre. Figur 5 viser resultatet af en seks-komponent MCR-analyse af ^{31}P NMR-tidsserien af fytionsyrenedbrydningen.

Med denne tidsserie af velopløste NMR-data viste MCR-metoden sig overordentlig reproducerbar, bl.a. uafhængigt af begyndelsesgæt af S. Modellen med seks rene komponenter resulterede i den bedste beskrivelse af variansen i NMR-spektrene. En fem-komponent model beskrev betydeligt mindre varians og en syv-komponent model begyndte at dele tydelige enkeltkomponenter. Figur 5B viser den resulterende seks-komponent MCR-model for fytatserien.

De seks rene spektre af enkeltkomponenter bestemt ud fra tidsserien af fytasereaktionerne ved brug af MCR er vist i figur 5A. Den lyseblå linje viser de fire toppe ved ppm 0.14, 0.47, 1.06 og 1.76 og repræsenterer IP6. IP5 er repræsenteret af fem toppe ved 0.30, 0.38, 0.48, 0.83, 1.32 og 1.37 ppm (blå linje). Fra da af bliver reaktionerne mere komplekse pga. de mange mulige konfigurationer af fytat. For IP4 dominerer tre toppe lokaliseret ved 1.68, 1.73 og 1.75 ppm, men mange små toppe eksisterer også i områderne omkring 1.4, 2.1 og 2.4 ppm. Disse mønstre er i god overensstemmelse med den meget sparsomme litteratur, der er omkring ^{31}P NMR på rene fytat-modelsystemer [8,9]. Mht. IP3 og de andre lavere inositol-fosfater bliver det meget vanskeligt at separere toppene uden brug af kemometri. Ikke desto mindre gør MCR, som implementeret i programmet CARS, det muligt at separere alle rene komponenter i fytionsyreserien.

Det måske vigtigste resultat er vist i figur 5B, som viser det komplette nedbrydningsmønster fra fytase ved brug af reeltids multivariate eksperimentelle data. Ud fra figuren fremgår det tydeligt, at allerede efter 2,5 timer er næsten al IP6 nedbrudt. Efter ca. 1,5 time når dannelse af IP5 sit maksimum og gennemgår i løbet af de næste 6 timer en nedbrydning til IP4, som når et maksimum efter 4 timer og er fuldstændigt nedbrudt efter 10 timer. Dette resultat viser, at det tager ca. 10 timer (ved den givne koncentration og pH) at nedbryde fytat til en form, hvor mineralkomplekserne ikke længere er så stærke, og derfor bør mineralerne være biotilgængelige for mennesker og dyr. IP3 har en levetid på omkring 10 timer, og for IP2 er den ca. 8 timer. IP1 dannes under hele hydrolysen, men stiger mest efter 10 timer. Ses dette resultatet i forhold til rugbrødsfremstilling, så bør al IP6 således være nedbrudt til mindst IP4, da selve bageprocessen tager omkring 4 timer. Tilsættes der tilmed surdej, som har en procestid på ca. 12 timer, så bør IP6 ifølge disse resultater være nedbrudt. Undersøgelse af rugbrød bagt med surdej har da også vist, at mørkt rugbrød uden kerner ikke har IP6 og derfor tilgængelige mineraler til stede [10].



Figur 5. (A) MCR-model af ^{31}P NMR-spektre. Lyseblå=IP6, Blå=IP5, Lys lilla=IP4, Purple=IP3, Lyserød=IP2 og Pink=IP1. (B) Plot af den relative intensitet som en funktion af tiden. De samme farver er benyttet til identifikationen af de forskellige inositol-fosfater som i (A).

Konklusion

^{31}P NMR er en meget direkte og yderst informativ metode til at beskrive nedbrydelsen af fytinsyre til lavere inositol-fosfater ved brug af enzymet fytase. Brugen af kemometri og MCR gør det muligt at visualisere og forstærke fortolkningen af resultaterne. Ved brug af LatentiX har det været muligt at visualisere den tidsafhængige hydrolyse af fytinsyre, mens modellering af spektrene med MCR (CARS) gjorde det muligt at identificere og kvantificere de forskellige stadier af fytat nedbrydningen til inositol og uorganisk fosfat.

E-mail-adresse

Søren Balling Engelsen: se@kv1.dk

Referencer

1. Centeno, C., Viveros, A., Brenes, A., Canales, R., Lozano, A., and de la Cuadra, C. Effect of Several Germination Conditions on Total P, Phytate P, Phytase, and Acid Phosphatase Activities and Inositol Phosphate Esters in Rye and Barley. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 3208-3215
2. Greiner, R., Alming, M. L., and Carlsson, N.-G. Stereospecificity of myo-Inositol Hexakisphosphate Dephosphorylation by a Phytate-Degrading Enzyme of Baker's Yeast. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 2228-2233
3. Brune, M., Rossander-Hultén, L., Hallberg, L., Gleerup, A., and Sandberg, A.-S. Iron Absorption from Bread in Humans: Inhibiting Effects of Cereal Fiber, Phytate and Inositol Phosphates with Different Numbers of Phosphate Groups. *J. Nutr.* 1992, 122, 442-449
4. Munck, L., Norgaard, L., Engelsen, S. B., Bro, R., and Andersson, C. A. Chemometrics in food science - a demonstration of the feasibility of a highly exploratory, inductive evaluation strategy of fundamental scientific significance. *Chemo. Intell. Lab. Syst.* 1998, 44(1-2), 31-60
5. Hotelling, H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of Educational Psychology* 1933, 24, 417-441
6. Tauler, R. Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chemo. Intell. Lab. Syst.* 1995, 30(1), 133-146
7. Bro, R., and de Jong, S. A fast non-negativity-constrained least squares algorithm. *Journal of Chemometrics* 1997, 11, 393-401
8. Frølich, W., Drakenberg, T., and Asp, N. G. Enzymatic degradation of phytate (myo-inositol hexaphosphate) in whole grain, flour suspension and dough - a comparison between P-31 NMR spectroscopy and a ferric ion method. *Journal of Cereal Science* 1986, 4(4), 325-334
9. Kemme, P. A., Lommen, A., De Jonge, L. H., Van der Klis, J. D., Jongbloed, A. W., Mroz, Z., and Beynen, A. C. Quantification of inositol phosphates using P-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy in animal nutrition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999, 47(12), 5116-5121
10. Nielsen, M. M., Damstrup, M. L., Thomsen, A. D., Rasmussen, S. K., and Hansen, Å. Phytase activity and degradation of phytic acid during rye bread making. *Eur. Food. Res. Technol.* 2006, in press.

Nyt om...

...titaniumhvidt

Titanium er et relativt hyppigt forekommende grundstof: 0,6% af den os tilgængelige del af jorden er titanium. Titanium forekommer især som mineralerne ilmenit (jern(II)titanium(IV)trioxid) og rutil (titanium(IV)dioxid). Af disse mineraler udvindes rent titanium(IV)dioxid som et hvidt pulver, der er velegnet som farvestof.

DuPont har nu indgået en aftale med kinesiske myndigheder om at investere en milliard \$ i en titaniumdioxidfabrik i Kina. DuPont er Verdens største producent af TiO_2 .

Bos

Litteratur: 28. november 2005 *Chemical & Engineering News*: 9

Nyt om...

...zink

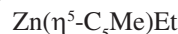
Ernesto Carmona der er professor i kemi ved universitetet i Sevilla, har fremstillet den første molekylforbindelse, der indeholder en zink-zink-binding.

Carmona har sammen med kemistuderende Irena Resa fremstillet:

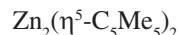


hvor Me er en methylgruppe.

Dette stof blev blandet med diethylzink, idet forskerne ønskede at fremstille:



De fik fremstillet noget af dette stof. Men ved en uventet sidereaktion blev der dannet et helt andet stof, der viste sig at være:



Altså med to zinkatomer:



klempt sammen som i en sandwich. Stoffet kan beskrives ved navnet decamethyldizincocen.

Bos

Litteratur: RON DAGANI 2004: *Organo Metallic Chemistry. Chemical & Engineering News*. 23. august 2004: 5

Vi sprænger rammerne

Højtrykshomogenisering – op til 1.500 bar

Niro Soavi leverer et af markedets mest fleksible produktprogrammer af højtrykshomogenisatorer til den farmaceutiske, bioteknologiske og kosmetiske industri til:

- Cellesprængning
- Stabile emulsioner og suspensioner
- Injektionsvæsker
- Højtrykspumper
- Højtrykshomogenisatorer/Microsizer
- Højtryksteknologi (VHP) op til 1.500 bar
- Laboratorie- og industrimaskiner
- CIP- og SIP-design
- Aseptisk design
- ISO 9001 - 2000 certificeret
- cGMP valideringsmanual

GEA

Niro Soavi Nordic
Salg og servicecenter

Nørskovvej 1b
DK-8660 Skanderborg
Tlf. 70 15 22 00
Fax 70 15 22 44
Email hb@niro-soavi.dk
www.niro-soavi.it



Niro Soavi Lab. Homogenisator
NS1001L 2K
10l/h - 1.500 Bar