



## Perspektywy wykorzystania fitazy w gorzelnictwie

Tomasz Kapela

Zakład Technologii Spirytusu i Drożdży,  
Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii,  
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka, Łódź

### The perspectives for application of phytase in ethanol production

#### Summary

The contemporary process of ethanol production utilizes a group of additional enzymes besides the traditionally used, necessary for production amylases. Among them, one may find such enzymatic activities as proteases, xylanases,  $\beta$ -glucanases or pullulanases. There exist reasonable causes to also include phytases in this group. Phytin is a specific substance of plant origin, built on a scaffold created by phytic acid, which interacts with a number of plant constituents like proteins, starch or ions of chosen metals. Enzymatic degradation of phytin during the initial steps of feedstock processing (mashing) might potentially enhance various features of ethanol production process.

#### Key words:

phytin, phytic acid, phytase application, phytase, ethanol production.

#### Adres do korespondencji

Tomasz Kapela,  
Zakład Technologii  
Spirytusu i Drożdży,  
Instytut Technologii  
Fermentacji  
i Mikrobiologii,  
Wydział Biotechnologii  
i Nauk o Żywności,  
Politechnika Łódzka,  
ul. Wólczańska 171/173,  
90-924 Łódź;  
e-mail:  
toka@enzymes.com.pl

### 1. Wstęp

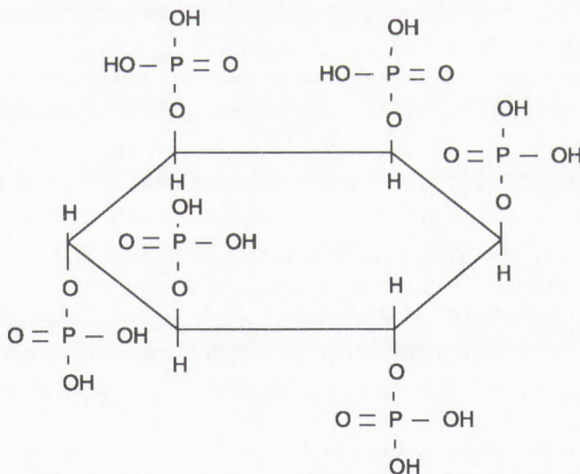
Współczesny proces fermentacyjnej produkcji etanolu wymaga stosowania szerokiej gamy enzymów pochodzenia mikrobiologicznego. Wraz z rozwojem wiedzy i doskonaleniem technologii rośnie liczba wykorzystywanych preparatów enzymatycznych. Ich listę otwierają podstawowe enzymy niezbędne w produkcji, czyli  $\alpha$ -amylazy i glikoamylazy, hydrolizujące skrobię do glukozy i jej oligomerów ulegających fermentacji. W dalszej kolejności należy wymienić preparaty poprawiające przebieg zabiegów mechanicznych: ksylanazy i  $\beta$ -glukanazy, redukujące lepkość

zacierów. Następną grupę stanowią enzymy, których główną rolą jest poprawienie przyswajalności wybranych składników surowca. Są to głównie enzymy proteolityczne, degradujące białka do wolnych aminokwasów i oligopeptydów czego wynikiem jest wyraźny wzrost wolnego azotu aminowego (FAN, ang. *free amino nitrogen*). Do tej samej grupy co proteazy zaliczyć należy fitazy, degradujące fitynę.

## 2. Fityna

Fityna jest nazwą zwyczajową używaną do określenia substancji pochodzenia roślinnego, której zrab strukturalny stanowi kwas fitynowy (heksafosforan inozytolu) (rys. 1). Jest to mieszanina soli kwasu fitynowego, głównie soli magnezowych, wapniowych, sodowych i potasowych (rys. 2). Fityna jest odkładana przez większość roślin w warstwie aleuronowej ziarna. Ulegając hydrolizie enzymatycznej w czasie kiełkowania ziarna służy ona jako źródło fosforu, inozytolu oraz kationów metali. Około 2/3 ogółu fosforu roślinnego (w zależności od rośliny) zmagazynowana jest w postaci kwasu fitynowego (1).

Szczególne cechy tego związku powodują, że znajduje się on w centrum zainteresowania naukowców w laboratoriach badawczych różnych specjalizacji zwłaszcza zajmujących się tematyką żywienia tak zwierząt jak i ludzi. Dzieje się tak, dlatego że fityna jako związek wiążący wcześniej wymienione pierwiastki, jest jednym z ważniejszych składników antyżywnościowych ograniczających ich dostępność, gdy ziarna roślin są wykorzystywane w produkcji żywności oraz do komponowania pasz dla zwierząt (2).



Rys. 1. Kwas fitynowy.



Zawartość fosforu i jego formy fitynowej w ziarnach zbóż (1)

Zboże	Zawartość fosforu [g/kg]	Fosfor fitynowy – % fosforu ogólnego
żyto	2,2-2,5	61-73
kukurydza	1,7-2,2	66-85
pszenica	1,7-2,5	60-77
jęczmień	1,9-2,5	51-66
owies	1,9-2,3	55-63
ryż	2,2-2,5	61-73

Ze względu na budowę chemiczną, kwas fitynowy ma zdolność tworzenia nierozpuszczalnych soli z kationami metali (4). Dzieje się tak na skutek oddziaływania pomiędzy zjonizowanymi resztami fosforowymi fitynianu a kationami. Kwas fitynowy jest kwasem o średniej mocy, którego sześć grup fosforanowych charakteryzuje szeroki zakres  $pK^*$  – od 1,1 do 12. Pięć do sześciu  $[H^+]$  wchodzących w skład tych ugrupowań, oddysocjowuje przy pH około 1,5, dwa do trzech przy pH w zakresie od 4,0 do 6,0. Natomiast cztery do sześciu  $H^+$  jest odszczepianych, jeśli wartość pH wynosi powyżej 8. Po uśrednieniu ładunek wypadkowy cząsteczki kwasu fitynowego wynosi – 3 przy pH 1,5 i maleje do -8 przy pH 7,5.

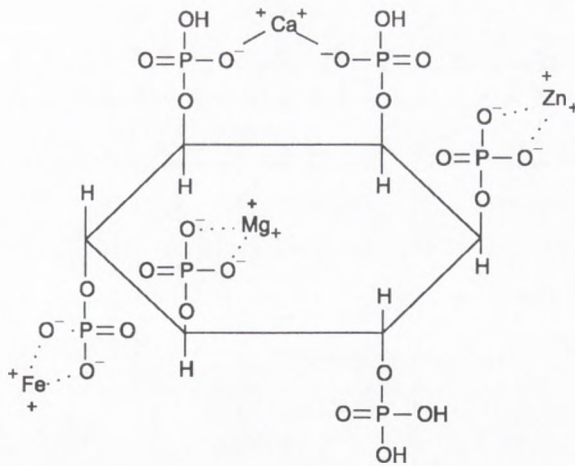
Wysoki ładunek ujemny cząsteczki może być równoważony przez kationy wybranych metali, ale również przez białka, jeśli wartość pH znajduje się poniżej ich punktu izoelektrycznego. Zdolność do tworzenia kompleksów i ich stabilność zależy m.in. od wartości pH (3). Sole z kationami dwuwartościowymi są łatwo rozpuszczalne przy  $pH < 3$ , natomiast najmniejszą rozpuszczalnością charakteryzują się w zakresie pH od 4 do 7. Kompleksy z jednowartościowymi kationami ( $Na^+$ ,  $K^+$ ) rozpuszczają się łatwo w pełnym zakresie pH. Przykład kompleksowania jonów metali przez fitynian przedstawiono na rysunku 2.

Wiązane przez kwas fitynowy metale są niezwykle istotne dla rozwoju wszystkich organizmów żywych, w tym drożdży prowadzących proces fermentacji alkoholowej. Łatwo zatem wysnuć wniosek, że jakiegokolwiek ograniczenia dostępu mikroelementów będą upośledzać te czynności komórki, które wymagają ich obecności. Ponadto niektóre kationy (głównie  $Ca^{2+}$ ) wiązane przez fitynian są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania wybranych enzymów (zwłaszcza  $\alpha$ -amylaz) stosowanych w czasie technologicznej obróbki surowca zbożowego.

Kwas fitynowy zlokalizowany w warstwie aleuronowej ziaren, odznacza się zdolnością tworzenia trwałych kompleksów z białkami w szerokim zakresie pH. Przy niskich wartościach pH kwas fitynowy charakteryzuje duży wypadkowy ładunek ujem-

\* Ujemna wartość logarytmu dziesiętnego ze stałej dysocjacji wybranego protonu. Wygodna definicja  $pK$  określa tę wielkość jako takie pH, przy którym tworzy się stan równego podziału między postaciami zdysocjowaną i protonowaną (50% postaci dysocjowanej i 50% protonowanej).

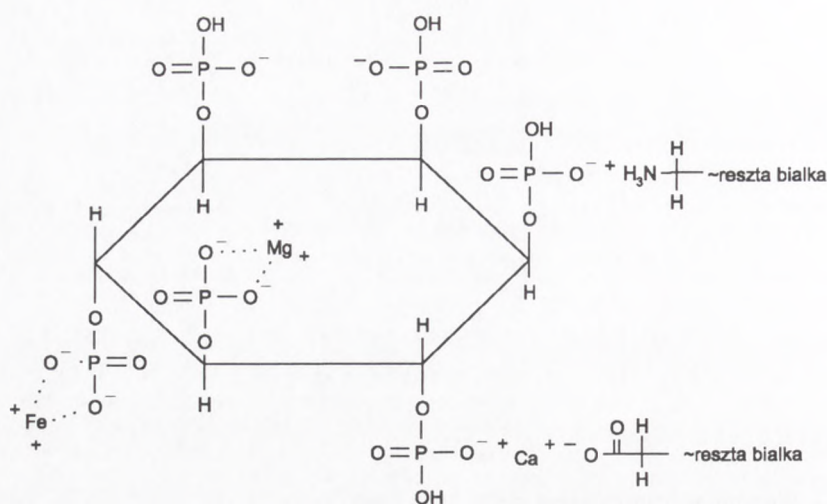




Rys 2. Wiązanie wybranych jonów metali przez kwas fitynowy.

ny, podczas gdy większość białek jest wtedy silnie uprotonowana. W takich warunkach tworzą się kompleksy fitynianowo-białkowe. Bezpośrednie oddziaływanie pomiędzy fitynianem a wybranymi białkami występuje poniżej ich punktu izoelektrycznego (pH poniżej wartości 5-6). W takich warunkach fitynian wchodzi w interakcje z końcowymi grupami  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> białek bądź z aminokwasami zasadowymi: arginina (p<sub>i</sub> = pH 10,8), histydyną (p<sub>i</sub> = pH 7,6) i lizyną (p<sub>i</sub> = pH 9,7) (5). Podobne oddziaływania obserwuje się również pomiędzy fitynianem a wolnymi postaciami wymieniowych aminokwasów. Przy wyższych wartościach pH ten sam efekt jest osiągnięty z wykorzystaniem mostków kationowych – oba składniki kompleksu (fitynian i białko) łączą się ze sobą za pośrednictwem dwuwartościowego kationu wybranego metalu (6). Tego typu kompleksy mogą się tworzyć tylko w obecności kationów dwuwartościowych i ich stężenie decyduje o szybkości przebiegu tego zjawiska (7). Deprotonowane grupy fosforanowe fitynianu za pośrednictwem odpowiednich kationów (najczęściej Ca<sup>2+</sup>) (8) łączą się z deprotonowanym ugrupowaniem imidazolowym histydyny lub też ze zjonizowanymi grupami karboksylowymi aminokwasów o charakterze kwaśnym.

Ostatecznym efektem jest ograniczona podatność białka na hydrolizę enzymatyczną, a w konsekwencji ograniczenie jego przyswajalności czy spadek poziomu wolnego azotu w środowisku. Istnieją doniesienia o negatywnym wpływie kwasu fitynowego na proces hydrolizy białek przez pepsynę. Postulowane oddziaływania pomiędzy fitynianem a białkami zostało potwierdzone eksperymentalnie. Inkubacja rozpuszczalnych białek pochodzenia roślinnego z kwasem fitynowym w roztworze o pH 2 prowadzi do intensywnego strącania się kompleksów fitynianowo-białkowych. Dodatek enzymu o aktywności fitazy, degradującego kwas fitynowy w sposób zdecydowany ogranicza to zjawisko (9). Kompleksy fitynianowo-białkowe najprawdopodobniej wy-



Rys. 3. Budowa kompleksów fitynianowo-białkowych.

stępują w ziarnach zbóż, jednak większość negatywnych efektów związanych jest z tworzeniem się takich połączeń *de novo*, po przetworzeniu surowców (5). Mechanizm tworzenia się kompleksów fitynianowo-białkowych przedstawiono na rysunku 3.

Istnieją również doniesienia sugerujące ograniczanie dostępności i strawności skrobi przez fitynian. Wniosek taki wysnuto na podstawie obserwacji, dowodzących, że kwas fitynowy jest czynnikiem spowalniającym proces przyswajania glukozy u badanych zwierząt eksperymentalnych. Postuluje się istnienie trzech zasadniczych sposobów wyjaśnienia tego zjawiska: 1) bezpośrednie oddziaływanie pomiędzy fitynianem a skrobią; 2) angażowanie skrobi w kompleksy tworzone pomiędzy kwasem fitynowym a białkami ściśle związanymi (strukturalnie bądź funkcjonalnie) ze skrobią; 3) spowalnianie procesu enzymatycznej degradacji skrobi poprzez obniżanie aktywności amylaz (dzięki bezpośredniemu z nimi oddziaływowaniu bądź poprzez ograniczanie dostępności jonów wapnia) (10,11).

### 3. Enzymy o aktywności fitazy

Enzymy o aktywności fitazy to specyficzna grupa fosfatyz zdolna do hydrolizy kwasu fitynowego do mniej ufosforylowanych pochodnych inozytolu i fosforu mineralnego. Termin fitazy zbiorczo określa dość dużą grupę enzymów o podobnej aktywności. Klasyfikacja wewnątrz tej grupy opiera się w całości jedynie na mechanizmie specyficznej degradacji IP6 (sześćfosforanu inozytolu). Enzymy te są szeroko rozpowszechnione i odnajduje się je zarówno u mikroorganizmów, roślin wyższych jak i w wybranych tkankach zwierzęcych.



Fitazy należą do klasy hydrolaz monoestrów fosforanowych (fosfomonoesteryzy). Dzieli się je na dwie podstawowe grupy: 3-fitaza (3-fosforylaza sześćfosforanu mioinozytolu, EC 3.1.3.8,) oraz 6-fitaza (6-fosforylaza sześćfosforanu mioinozytolu, EC 3.1.3.26). Zasadnicza różnica pomiędzy nimi polega na kolejności w jakiej hydrolizują poszczególne grupy fosforanowe w cząsteczce IP6. 3-fitaza na początku atakuje fosforan przy trzecim węglu w pierścieniu inozytolu, podczas gdy 6-fitaza, szósty.

Śród wszystkich poznanych i zbadanych enzymów o aktywności fitazy najszersze zastosowanie biotechnologiczne znalazły fitazy produkowane przez wyselekcjonowane szczepy grzybów z rodzaju *Aspergillus* (3-fitazy) oraz *Peniphora* (6-fitazy). Ze względu jednak na pewne cechy charakterystyczne (wysoka termostabilność, odporność na proteolizę, wysoka aktywność katalityczna) fitazy pochodzenia bakteryjnego, jak się wydaje, są interesującą alternatywą.

Światowy rynek fitazy, niezwykle szybko rozwijająca się gałąź przemysłu enzymatycznego, opiera się na stosowaniu fitazy w przemyśle paszowym. Jest to niezwykle powszechnie stosowany komponent pasz dla trzody chlewnej i kurcząt. Zwierzęta te nie syntetyzują własnej fitazy, przez co pasze bez dodatku tego enzymu charakteryzuje niezwykle niska przyswajalność fosforu i minerałów kompleksowanych przez fitynian. O ile bez większego problemu można stosować dodatki mineralne, które przeciwdziałają temu zjawisku, to niestety trzeba w takim przypadku liczyć się z niezwykle uciążliwym skutkiem ubocznym. Jest to postępująca degradacja środowiska naturalnego spowodowana nadmiernym obciążeniem związkami fosforu, które obecne w kwasie fitynowym przechodzą prawie nietknięte przez układ pokarmowy zwierząt monogastycznych i trafiają do środowiska. Stosowanie fitazy mikrobiologicznej stanowi obiecującą perspektywę rozwiązania tego problemu, dzięki czemu preparaty fitazy sprzedają się znakomicie w krajach, gdzie prowadzi się intensywną hodowlę.

Niezwykle pozytywne rezultaty działania fitazy można wykorzystywać wszędzie tam, gdzie zasadniczym surowcem przemysłowym są ziarna zbóż bądź rośliny strączkowe. Takim przypadkiem jest produkcja spirytusu na drodze fermentacji, gdzie zdecydowaną większość stosowanego surowca stanowią ziarna zbóż (głównie kukurydzy i żyta).

#### 4. Znaczenie fitazy w procesie produkcji spirytusu

Właściwości kwasu fitynowego, jak i specyficznie degradujących go enzymów – fitaz, powodują, że istnieje możliwość stosowania tej aktywności enzymatycznej w procesie gorzelniczym. Zasadniczym surowcem wykorzystywanym na świecie (obok melasy) są ziarna zbóż. Cechy fitazy stają się interesujące z wielu powodów. Po pierwsze, w procesie obróbki surowca zbożowego wykorzystuje się szereg enzymów, których część do właściwego funkcjonowania potrzebuje obecności jonów metali kompleksowanych przez fitynian (są to najistotniejsze w procesie enzymy –



amylazy). Po drugie, fitynian wiąże również skrobię (2), która bezpośrednio stanowi zasadniczy surowiec do produkcji etanolu. Po trzecie działanie fitazy powinno zdecydowanie wzbogacać zacier gorzelniany w elementy poprawiające aktywność fermentacyjną drożdży.

Stosowanie fitazy w przemyśle gorzelnicznym zostało już pod pewnymi względami sprawdzone w skali laboratoryjnej. Stwierdzono, że kilkudziesięciominutowa inkubacja zacieru z dodatkiem fitazy w temperaturze poniżej progu kleikowania dla danego surowca, poprzedzająca upłynnianie zasadnicze (85-90°C) zdecydowanie poprawia pracę enzymu upłynniającego –  $\alpha$ -amylazy. Po pierwsze, zwiększa się dynamika hydrolizy skrobi, a po drugie, wyraźnie poprawia się stabilność enzymu (13).  $\alpha$ -amylazy są enzymami, które w procesie zacierania odpowiadają za wstępną hydrolizę polimeru skrobiowego do dekstryn. Jest to główny etap tak dla dalszych przemian biochemicznych (następującej po nim degradacji powstałych dekstryn do cukrów ulegających fermentacji) jak i dla kształtowania cech reologicznych zacieru. W etapie upłynniania skrobi efektem działania  $\alpha$ -amylaz jest spadek lepkości zacieru. Skrobia w wysokich temperaturach tworzy z wodą żełe o wysokiej lepkości. Stanowi to oczywistą przeszkodę w takich zabiegach jak mieszanie czy wymiana ciepła. Dlatego też, z fizycznego punktu widzenia, zasadniczym celem upłynniania jest jak najszybsze obniżenie lepkości zacieru. Proces ten przebiega w wysokiej temperaturze (85-90°C), przy której  $\alpha$ -amylazy, by zachować stabilność i aktywność potrzebują określonego stężenia jonów wapniowych odpowiadających po części za zachowanie pożądanej konformacji przestrzennej białka enzymatycznego. Obecny w środowisku fitynian tworzy z jonami wapnia nierozpuszczalne sole. Dlatego też jedną z istotnych przyczyn poprawienia jakości pracy  $\alpha$ -amylazy po wprowadzeniu fitazy jest wyraźny wzrost stężenia jonów wapniowych. Ponadto na podstawie analiz prowadzonych po odpowiednio długim procesie upłynniania w temperaturze 85-90°C dowiedziono, że aktywność  $\alpha$ -amylazy utrzymuje się na wysokim poziomie. Jest to najprawdopodobniej również konsekwencja wzrostu stężenia jonów wapnia.

Obecność tych jonów w składzie chemicznym zacieru w odpowiedniej ilości, wpływa również korzystnie na jego fermentację przez drożdże gatunku *Saccharomyces cerevisiae*.

Spośród związków mineralnych, których dostępność jest ograniczana przez fitynian wymienić należy w pierwszej kolejności związki fosforu. Fosfor odgrywa podstawową rolę w metabolicznych przemianach cukrów (niezbędny do tworzenia ufosforylowanych postaci cukrów, będących związkami pośrednimi w szlakach przemian cukrów), w syntezie lipidów budujących błony i ściany komórkowe oraz w syntezie kwasów nukleinowych. Drożdże wykorzystują fosforany również jako materiał zapasowy w postaci polifosforanów. Spośród makroelementów niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania komórek wymienia się również magnez i żelazo tworzące sole z fitynianem.

Niedobory związków mineralnych prowadzą do spowolnienia pączkowania komórek i w konsekwencji ograniczenia pożądanej liczebności drożdży. Te zjawiska



z kolei w sposób bezpośredni przekładają się na upośledzenie procesu fermentacji (wydłużenie czasu jej trwania, niepełne odfermentowanie cukrów, rozwój zakażeń bakteryjnych). Zjawiska te stają się widoczne przy fermentacji zacierów o wysokim ekstrakcie. W takim przypadku drożdże muszą charakteryzować się wysoką odpornością na podwyższone stężenia cukrów (osmotolerancją) i etanolu. Te dwa podstawowe parametry zależą nie tylko od szczepu stosowanych drożdży, ale również od składu chemicznego zacieru. Odpowiedni poziom wszystkich wymaganych związków mineralnych gwarantuje uzyskiwanie zadowalających wyników produkcyjnych (14).

Na podstawie wyników z przeprowadzonych badań dowodzi się, że fitynian odznacza się zdolnością tworzenia trwałych kompleksów z białkami, ograniczając w ten sposób ich przyswajalność. W przypadku produkcji etanolu z zastosowaniem drożdży *Saccharomyces cerevisiae* zagadnienie poziomu przyswajalnego azotu jest sprawą podstawową. Drożdże stosowane w praktyce przemysłowej nie syntetyzują proteinaz zewnątrzkomórkowych. Oznacza to, że aby korzystać ze źródeł azotu w postaci białek roślinnych zawartych w surowcu, muszą one najpierw zostać zdegradowane do postaci aminokwasów lub krótkich peptydów za pomocą proteinaz mikrobiologicznych dodatkowo dodawanych do zacieru (drożdże mogą asymilować peptydy zbudowane z co najwyżej trzech aminokwasów). Poziom wolnego azotu aminowego ma decydujący wpływ na drożdże i jakiegokolwiek niedobory natychmiast przekładają się na spowolnienie lub nawet zatrzymanie fermentacji. Azot jest pierwiastkiem niezbędnym do syntezy białek komórkowych – tak strukturalnych, jak i funkcjonalnych (np. enzymów) czy kwasów nukleinowych. Dlatego też jego niedobór upośledza podstawowe funkcje komórki drożdżowej. Z wielu przeprowadzonych badań wynika, że suplementacja zacierów związkami azotu bądź dodatek enzymu proteolitycznego wpływa w sposób ewidentnie pozytywny na liczebność komórek drożdżowych, prędkość ich namnażania, żywotność, osmotolerancję i odporność na wysokie stężenia etanolu. Ingledew w swoich badaniach pokazał, że czas potrzebny na pełne odfermentowanie zacierów pszennych o wysokim ekstrakcie skrócił się z ponad 100 godzin do niespełna 72 tylko dzięki podniesieniu poziomu FAN w zacierach. Jednocześnie liczebność komórek drożdżowych praktycznie na każdym etapie fermentacji była dwu-, a nawet trzykrotnie wyższa w zacierach o wysokim FAN niż w próbie kontrolnej (15).

## 5. Podsumowanie

Na podstawie wstępnych wyników badań własnych, przeprowadzonych w warunkach polskich gorzelnisk wskazuje się, że dodatek fitazy na odpowiednim etapie procesu może znacznie poprawić jego przebieg. Fitazy wywierają pozytywny wpływ zarówno na zacieranie, gdzie uwolnione jony wapniowe tworzą lepsze środowisko pracy dla  $\alpha$ -amylaz, jak i w czasie fermentacji ulepszając skład chemiczny zacieru.



Pośrednio degradacja kompleksów fitynowych podnosi również przyswajalność azotu przez drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. Obok zasadniczego produktu procesu gorzelniczego, którym jest spirytus, duże znaczenie ma suszony wywar stosowany powszechnie jako składnik pasz dla zwierząt. Stosowanie fitazy poprawia jakość także tego produktu.

## Literatura

1. Podkański A., (2000), *Proceeding of the International Symposium on phytase in animal nutrition*, Wyd. AR, Lublin, 21-27.
2. Heindl U., (2000), *Proceeding of the International Symposium on phytase in animal nutrition*, Wyd. AR, Lublin, 11-20.
3. Cheryan M., (1980), *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 13, 297-335
4. Nolan K. B., Duffin P. A., McWeeny D. J., (1987), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 40, 79-85.
5. Selle P. H., Ravindran V., Caldwell R. A., Bryden W. L., (2000), *Nutritional Research Reviews*, 13, 255-278.
6. Okubo, et al, (1975), *Cereal Chemistry*, 52, 263-271.
7. de Rahm O., Jost T., (1979), *Journal of Food Science*, 44, 596-600.
8. Prattley C. A., et al., (1982), *Journal of Food Biochemistry*, 6, 255-271.
9. Jongbloed A. W., et al., (1997), *Proceedings of the 6<sup>th</sup> forum of animal nutrition*, BASF, 92-106.
10. Thompson L. U., Yoon J. H., (1984), *Journal of Food Science*, 49, 1228-1229.
11. Thopson L. U., (1988), *Food Technology*, 42, 123-131.
12. Szyniarowski P., (2004), *Enzymy fosforolityczne z *Aspergillus niger* i ich potencjalne zastosowanie w przemyśle żywnościowym*.
13. Konieczny-Janda G., (2001), *Genencor International, Proceeding of Starch Convention*.
14. Jacques K., Lyons T. P., Kelsall D. R., (1999), *The Alcohol Textbook*, 3<sup>rd</sup> ed., Nottingham University Press.
15. Kolothumannil C., Thomas, Ingledew W. M., (1990), *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 7, 2046-2050.