

AGNIESZKA WIKIERA

**WPLYW WYBRANYCH PREPARATÓW PEKTYNAZ I FOSFATAZ NA
DEGRADACJĘ FITYNIANÓW PASZY TRAWIONEJ METODĄ *IN VITRO***

Streszczenie

Badano wpływ siedmiu handlowych preparatów pektynolitycznych na proces uwalniania endogennego fosforu z mieszanki pszenno-sojowej dla kurcząt brojlerów. Analizy prowadzono z wykorzystaniem metody *in vitro*, symulującej warunki panujące w poszczególnych odcinkach przewodu pokarmowego ptaków. W obecności pektynaz stwierdzono istotny statystycznie wzrost ilości fosforu uwalnianego z paszy, korelujący z ogólną aktywnością pektynolityczną badanych preparatów, oznaczaną wiskozymetrycznie. Współczynnik determinacji, modelu liniowego, opisującego tę zależność, wynosił 58,62%. Analiza efektów współdziałania preparatów pektynolitycznych z wprowadzanym jednocześnie do paszy preparatem fitazy A ujawniła dodatni wpływ pektynaz na efektywność akcji katalitycznej wysycającej dawki fitazy. Zdolność pektynaz do intensyfikacji procesu defosforylacji fitynianów, wywołanego obecnością egzogennej fitazy, korelowała z towarzyszącą pektynazom aktywnością fosfatazy kwaśnej ($R^2 = 93\%$). Intensyfikujący wpływ preparatów pektynolitycznych na proces defosforylacji fitynianów utrzymywał się nawet wtedy, gdy do paszy wraz z fitazą dodano wysycającą dawkę fosfatazy kwaśnej, ale wówczas był on skorelowany ujemnie ($R = - 0,949$) z aktywnością pektynoesterazową badanych preparatów. Ujemną zależność pomiędzy aktywnością pektynoesterazy i ilością fosforu uwalnianego z paszy przy wysycających dawkach fitazy i fosfatazy kwaśnej najlepiej opisywał model funkcji $y = 3,831 + 0,059x^{-1}$. Prawdopodobnie wysoka aktywność pektynoesterazy w preparatach pektynolitycznych była przyczyną eliminacji jonów Ca^{2+} ze środowiska reakcji i tworzenia pektynianów selektywnie obniżających efektywność działania enzymów fosfolitycznych.

Słowa kluczowe: pektynazy, fosfatazy, defosforylacja paszy.

Wstęp

Fityniany to związki o charakterze antyodżywczym, występujące licznie w podstawowych składnikach pasz. Tworząc złożone kompleksy, fityniany obniżają strawność białka, skrobi i tłuszczu [17, 18] oraz ograniczają wykorzystanie Ca, Mg, Zn i Fe z przewodu pokarmowego [13]. Zawarty w nich fosfor stanowi około 70% fosforu całkowitego mieszanek paszowych i jest trudno dostępny dla zwierząt

monogastrycznych. Antyodżywcze działanie fitynianów paszowych próbuje się znosić wprowadzając do diet fitazę i fosfatazę kwaśną, wykazujące egzogenne aktywności defosforylujące [12]. Ciągłe jednak nie udaje się osiągnąć pełnej defosforylacji mieszanek pszenno-sojowych. Badania nad optymalizacją tego procesu wskazują na możliwość jego intensyfikacji poprzez wprowadzanie do pasz oprócz fitazy i fosfatazy kwaśnej także preparatów pektynolitycznych [26]. W ostatnim dziesięcioleciu pojawiło się kilka prac opisujących zarówno wielokierunkowość działania katalitycznego handlowych pektynaz [3], jak i zasadność ich użycia w żywieniu zwierząt monogastrycznych [1, 4, 5]. Żyła [28] podaje, że eksperymentalny preparat pektynazy dodany do mieszanki kukurydziano-sojowej w badaniach *in vitro* wykazuje właściwości zbliżone do fosfatazy kwaśnej, tzn. powoduje wzrost stężenia fosforu i cukrów redukujących uwalnianych z paszy do dializatu. Intensyfikuje też defosforylację fitynianów przez fitazę. Zastosowanie w paszach dla rosnących brojlerów zestawu enzymatycznego, w skład którego oprócz wysycających dawek fitazy i fosfatazy kwaśnej wchodzi pektynaza, pozwala osiągnąć większe, niż w grupach karmionych paszą z dodatkiem fitazy i fosfatazy kwaśnej, przyrosty masy ciała, lepsze wykorzystanie karmy i poprawę mineralizacji kośćca [27]. Kuchta i wsp. [15] zaobserwowali, że dodatek pektynazy do mieszanki o wysokim udziale żyta poprawia nieśność kur oraz zwiększa retencję azotu i strawność białka.

Celem przedstawionych badań była analiza udziału preparatów pektynolitycznych w znoszeniu antyżywniowego charakteru fitynianów paszowych oraz poznanie ewentualnych mechanizmów kooperacji aktywności fosfolitycznych i pektynolitycznych w procesie defosforylacji.

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiła mieszanka pszenno-sojowa dla drobiu. Jeden kilogram paszy zawierał 0,6% wapnia i 0,45% fosforu, w tym 0,17% fosforu przyswajalnego. W doświadczeniach wykorzystano 7 handlowych preparatów pektynolitycznych pochodzenia mikrobiologicznego oraz dwa preparaty fosforolityczne: fitazę – Finase P i fosfatazę kwaśną – Finase AP firmy AB Enzymes OY (Finlandia).

W każdym z preparatów pektynolitycznych oznaczano następujące aktywności enzymatyczne: aktywność poligalakturonazy (EC 3.2.1.15) wyrażoną w jednostkach PGU [16], aktywność pektynoesterazy (EC 3.1.1.11) – PEU [9], ogólną aktywność pektynolityczną w °PM [22], aktywność fitazy (EC 3.1.3.8) – FTU [8], aktywność fosfatazy kwaśnej (EC 3.1.3.2) – AcPU [26], aktywność proteazy kwaśnej (EC 3.4.23.6) – AcPRU [22], aktywność ksylanazy (EC 3.2.1.8) – XU [16], aktywność celulazy (EC 3.2.1.4) – CU [23], oraz aktywność β -glukanazy (EC 3.2.1.6) wyrażoną w jednostkach GIU [22].

Proces defosforylacji paszy badano stosując metodę *in vitro*, symulującą układ pokarmowy ptaków, opisaną przez Żyłę i wsp. [25]. Preparaty pektynolityczne stosowano w dawce optymalnej, wynoszącej 95 PGU na 1 g paszy [28]. Fitazę i fosfatazę kwaśną stosowano w dawkach wysycających proces defosforylacji mieszanki pszenno-sojowej, równych 0,750 FTU i 3,156 AcPU na 1 g paszy [27]. Ilość fosforu uwalnianego z paszy oznaczano metodą Fiske i Subbarowa [6]. Analizy wykonano w 24 powtórzeniach. Wyniki opracowano stosując analizę regresji i wieloczynnikową analizę wariancji.

Wyniki i dyskusja

Wielkości głównych i ubocznych aktywności enzymatycznych oznaczone w 7 badanych preparatach pektynolitycznych przedstawiono w tab. 1.

Tabela 1

Profil aktywności enzymatycznych w badanych preparatach pektynolitycznych.
The enzymatic activity profile of the pectinase preparations under investigation.

Nazwa preparatu i miejsce produkcji Trade name of the Pectinase and country of its manufacturing	Aktywności główne Main activities			Aktywności towarzyszące pektynazom Activities accompanying Pectinases					
	PGU/mg	PEU/mg	°PM/mg	FTU/g	AcPU/g	AcPRU/mg	XU/mg	GIU/mg	CU/mg
Energex L Denmark	24,28	0,48	2399,14	6,78	1388,77	3,10	0,41	2,76	0,35
Pectinex Ultra SPL Denmark	16,02	0,37	1492,56	2,95	20,43	1,20	0,23	2,17	0,15
Pektopol PT 400 Poland	15,43	0,04	2052,21	55,71	103,86	1,34	1,75	4,49	0,35
Rapidase Liq + The Netherlands	6,63	0,52	653,91	10,71	13,91	0,14	1,14	5,31	0,44
Rapidase Pomaliq 2F The Netherlands	5,86	0,48	545,60	0,69	1,71	0,10	1,76	3,64	0,39
Rohapect D5S Germany	82,24	4,95	1241,61	0,00	6,35	0,25	0,93	0,02	0,03
Ultrazym AFP-L Denmark	14,23	0,44	724,21	2,41	8,13	0,45	0,42	2,19	0,13

Podano wartości średnie z 12 powtórzeń / The given data represent mean values of twelve determinations.

Stwierdzono, że każda z handlowych pektynaz, obok deklarowanych przez producenta wysokich aktywności enzymów rozkładających substancje pektynowe, wykazywała zróżnicowany poziom aktywności ubocznych, istotnych w zastosowaniach paszowych. W związku z wieloaktywnościowym charakterem preparatów pektynolitycznych ich dawkę do badań nad procesami defosforylacji paszy standaryzowano według aktywności poligalakturonazy, stosując 95 PGU/g paszy. Aktywności enzymatyczne towarzyszące tej dawce poligalakturonazy w każdej z pektynaz przedstawiono w tab. 2.

Tabela 2

Aktywności enzymatyczne towarzyszące 95 PGU w badanych pektynazach.
Enzymatic activities accompanying a standardized level of 95 PGU in pectinase preparations

Nazwa preparatu Trade name of the preparation	Rzeczywista dawka [μl/g paszy] Actual dosage	Aktywności wprowadzane na 1 g paszy z dawką 95 PGU Enzymatic activities in the standardized dosage of 95 PGU applied for 1 g of feeds							
		PEU	°PM	FTU	AcPU	AcPRU	XU	GIU	CU
Energex L	3,38	1,89	9387,8	0,026	5,434	12,14	1,61	10,79	1,39
Pectinex Ultra SPL	5,08	2,21	8852,4	0,017	0,121	7,12	1,34	12,84	0,89
Pektopol PT 400	5,07	0,27	12635,5	0,343	0,639	8,24	10,79	27,67	2,13
Rapidase Liq +	13,14	7,74	9368,6	0,153	0,199	2,03	16,30	76,11	6,36
Rapidase Pomaliq 2F	15,25	7,85	8837,7	0,011	0,027	1,68	28,49	58,94	6,43
Rohapect D5S	1,16	5,72	1434,1	0,000	0,007	0,29	1,08	0,03	0,04
Ultrazym AFP-L	5,85	2,91	4834,1	0,014	0,054	3,04	2,82	14,62	0,88

Ilości fosforu uwalniane z paszy trawionej metodą *in vitro* z dodatkiem preparatów pektynolitycznych (seria I), preparatów pektynolitycznych i fitazy (seria II) oraz preparatów pektynolitycznych, fitazy i fosfatasy kwaśnej (seria III) przedstawiono w tab. 3.

Zaobserwowano, że po wprowadzeniu do paszy każda z pektynaz powodowała statystycznie istotny wzrost ilości fosforu w dializacie (seria I). Stopień defosforylacji mieszanki paszowej wzrastał względem próby kontrolnej od 4,2% do 9,3%. Zgodnie z oczekiwaniami efektywność preparatów pektynolitycznych w procesie uwalniania fosforu zawartego w paszy zależała od aktywności fitazy i fosfatasy kwaśnej w stosowanej dawce pektynaz. Siłę interakcji tych zmiennych wyrażał współczynnik wielorakiej korelacji liniowej Pearsona $R_p = + 0,952$ ($p = 0,001$; test F). Różna

aktywność fosfataz we wprowadzanych do paszy preparatach pektynolitycznych tłumaczyła ponad 90% obserwowanej zmienności stopnia defosforylacji mieszanki paszowej. Istniała także rosnąca liniowa współzależność pomiędzy stopniem defosforylacji mieszanki pszenno-sojowej a ogólną aktywnością pektynolityczną badanych preparatów oznaczaną wiskozymetrycznie. Zależność tę przedstawiono na rys. 1.

Tabela 3

Ilości P uwalniane z paszy pszenno-sojowej po wprowadzeniu pektynaz (seria I), pektynaz i fitazy (seria II) oraz pektynaz, fitazy i fosfatazy kwaśnej (seria III).

The phosphorus amounts released from a wheat-based feed by pectinases (run I), pectinases and phytase (run II), pectinases, phytase and acid phosphatase (run III).

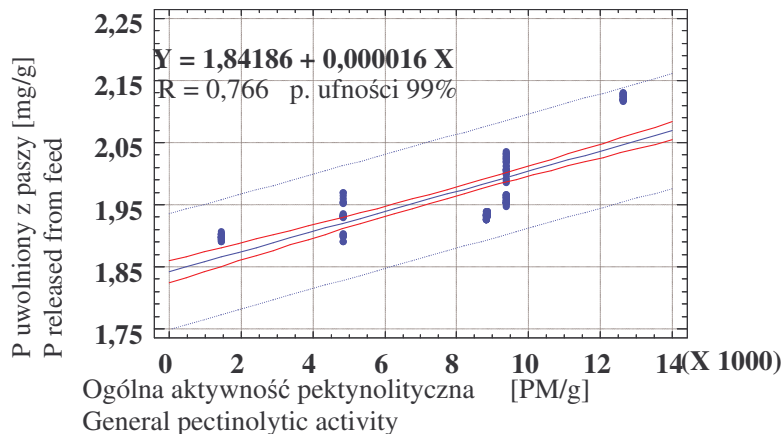
Nazwa preparatu Name of the preparation	Ilości fosforu uwalniane z paszy [mg/g] P amounts released from the feed [mg/g]		
	Seria I (run I)	Seria II (run II)	Seria III (run III)
Kontrola (control preparations – no name)	1,70 ^a	3,16 ^a	3,71 ^a
Energex L	2,01 ^e	3,69 ^h	3,88 ^e
Pectinex Ultra SPL	1,94 ^c	3,27 ^d	3,87 ^e
Pektopol PT 400	2,12 ^f	3,34 ^g	4,05 ^f
Rapidase Liq +	1,96 ^d	3,32 ^f	3,83 ^c
Rapidase Pomaliq 2F	1,93 ^c	3,31 ^e	3,81 ^b
Rohapect D5S	1,89 ^b	3,18 ^b	3,83 ^c
Ultrazym AFP-L	1,93 ^c	3,19 ^c	3,86 ^d
SEM*	0,0064	0,0059	0,1020
p	0,0000	0,0000	0,0000

Podano wartości średnie z 24 powtórzeń. / The given data represent mean values of twenty four determinations.

Różne litery superskryptu oznaczają różnice statystycznie istotne w obrębie serii (test LSD). / Different superscript letters express mean values that differ statistically significant within one run ('LSD' test).

Korelacja ogólnej aktywności pektynolitycznej badanych preparatów z ilością fosforu uwalnianego z paszy ($R_p = +0,766$) była istotna na poziomie $p = 0,001$ w teście F. Współczynnik determinacji R^2 modelu liniowego, opisującego tę zależność, wynosił 58,62%. Z literatury wiadomo, że obecność pektyny w środowisku reakcji może ograniczać aktywność katalityczną wielu enzymów. Według Ikeda i Kuzano [10], chymotrypsyna traci w tych warunkach 27,2% swojej aktywności, trypsyna i α -amylaza prawie po 50%, a pepsyna nawet 57,4%. Najprawdopodobniej więc zaobserwowana dodatnia korelacja pomiędzy ogólną aktywnością pektynolityczną preparatów i ich efektywnością defosforylującą była skutkiem intensywnej degradacji substancji pektynowych. Eliminacja pektyny ze środowiska reakcji enzymatycznej

mogła bezpośrednio lub pośrednio, przez zwiększenie aktywności katalitycznej enzymów trawiennych, ułatwiać dostęp do magazynujących fosfor fitynianów endogennym i egzogennym enzymom fosfolitycznym.



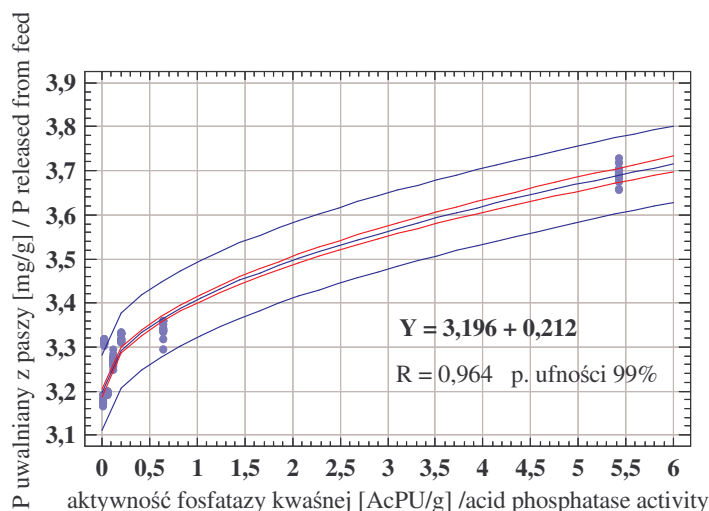
Rys. 1. Zależność pomiędzy ogólną aktywnością pektynolityczną ($^{\circ}$ PM) preparatów i ich zdolnością do uwalniania fosforu z paszy. Współczynnik korelacji liniowej zmiennych ($R_p = +0,766$) był istotny na poziomie $p = 0,001$ w teście F.

Fig. 1. The relationship between general pectinolytic activity ($^{\circ}$ PM) of the preparations and their ability to release phosphorus from a feed. The linear correlation coefficient of variables ($R_p = +0,766$) was significant at a level of $p = 0,001$ in the 'F' test.

Analiza efektów współdziałania preparatów pektynolitycznych z wprowadzanym równocześnie do paszy handlowym preparatem fitazy A (seria II) potwierdziła opisywany wcześniej przez zespół Żyły [26, 28] intensyfikujący wpływ pektynaz na efektywność akcji katalitycznej wysycającej dawki fitazy. Ilości fosforu uwalnianego z paszy przez fitazę działającą w kooperacji z preparatami pektynolitycznymi były nawet o 16,77% wyższe od tych, jakie obserwowano podczas indywidualnej akcji katalitycznej fitazy. Jednocześnie stwierdzono, że w obecności wysycającej dawki fitazy A przestała być istotna, występująca w pierwszej serii doświadczeń, dodatnia korelacja pomiędzy ogólną aktywnością pektynolityczną preparatów i ich zdolnością do defosforylacji paszy. Zaobserwowano natomiast, że zdolność pektynaz do intensyfikacji procesu defosforylacji fitynianów, wywołanego obecnością egzogennej fitazy, korelowała z towarzyszącą pektynazom aktywnością fosfatazy kwaśnej. Zależność tę najlepiej ($R^2 = 93\%$, $p = 0,001$) opisywał przedstawiony na rys. 2 model pierwiastkowy $y = 3,196 + 0,212 \sqrt{x}$.

Wprowadzając do mieszanki pszenno-sojowej wraz z pektynazami i fitazą A wysycającą dawkę fosfatazy kwaśnej (seria III) obserwowano dalszy wzrost ilości fosforu w dializacie, a stopień defosforylacji paszy był ujemnie zależny ($R = -0,949$)

od obciążenia dawki pektynaz pektynoesterazą. Zależność tę najlepiej opisywał model funkcji $y = 3,831 + 0,05 \cdot x^{-1}$, którego współczynnik determinacji R^2 wynosił 90,23% (rys. 3).

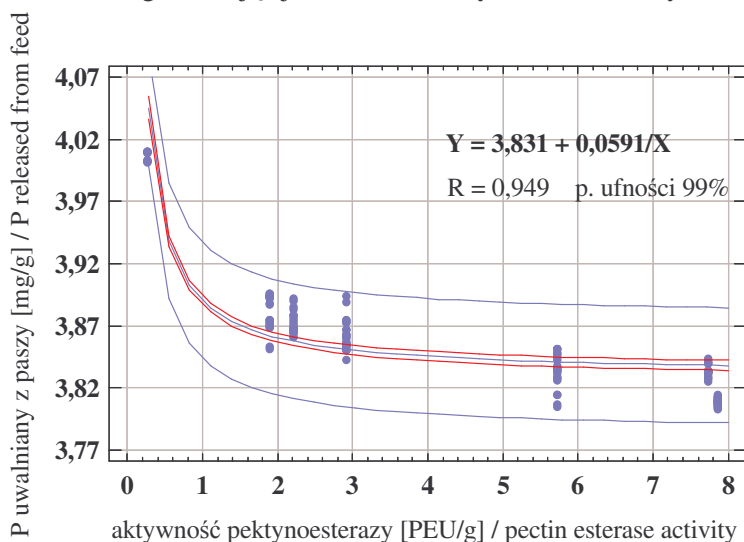


Rys. 2. Zależność ilości fosforu uwalnianego z paszy w obecności preparatów pektynolitycznych i fitazy od obciążenia stosowanej dawki pektynaz aktywnością fosfatazy kwaśnej. Korelacja zmiennych ($R_p = +0,964$) była istotna na poziomie $p = 0,001$ (test F).

Fig. 2. The relationship between the phosphorus amount released from a feed in the presence of pectinolytic preparations and phytase, and the acid phosphatase activity load of the pectinase dosage applied. The correlation of variables ($R_p = +0,964$) was significant at a level of $p = 0,001$ (F test).

Pektynazy mające w dawce 95 PGU największą aktywność pektynoesterazy w kooperacji z wprowadzanymi do paszy jednocześnie fosfatazami wykazywały najniższą zdolność intensyfikacji procesu uwalniania fosforu. W ich obecności stopień defosforylacji paszy wzrastał jedynie o 2,69%, podczas gdy w obecności pektynaz o niskiej aktywności pektynoesterazy wzrost ilości fosforu w dializacie osiągał wartość 7,44%. Wiadomo, że pektynoesteraza, poprzez odszczepianie reszt metylowych od łańcucha kwasu α -poligalakturonowego, umożliwia łączenie się reszt karboksylowych z jonami niektórych pierwiastków, w tym wapnia, magnezu cynku i fosforu. Powstają wówczas trwałe pektyniany, które obniżają przyswajalność tych pierwiastków [2, 7]. Wiadomo także, że jony Ca^{2+} są ważnymi aktywatorami wielu fosfomonoesteraz [14, 20]. Prawdopodobnie obserwowana dopiero podczas wspólnej akcji katalitycznej fitazy, fosfatazy kwaśnej i pektynaz ujemna zależność pomiędzy ilością fosforu uwalnianego z paszy i aktywnością pektynoesterazy była konsekwencją nie tyle kompleksowania jonów fosforu uwolnionego wcześniej z połączeń fitynowych co

ograniczonej dostępności jonów wapnia selektywnie działających na fosfatazy. Wydaje się, że wywołana dużą aktywnością pektynoesterazy eliminacja Ca^{2+} ze środowiska reakcji mogła zmniejszać aktywność wprowadzanej do paszy fosfatazy kwaśnej, nie wpływając jednocześnie w sposób istotny na aktywność fitazy A. W literaturze znajdują się przykłady opisujące zróżnicowany wpływ jonów Ca^{2+} na aktywność fitazy. Scott i Loewus [19] dowodzili aktywującego działania Ca^{2+} na fitazę. Ullah [21] natomiast opisał brak wrażliwości fitazy z *Aspergillus ficuum* na obecność tego pierwiastka w środowisku reakcji. Fakt, że obecność czynników kompleksujących, takich jak EDTA, może stymulować aktywność fitaz pochodzenia grzybowego [24], wydaje się dodatkowo potwierdzać nieistotną rolę metalu w efektywnej akcji katalitycznej stosowanego preparatu fitazy. Co więcej, obecna w paszy pektyna, ulegając pod wpływem wprowadzanych preparatów pektynolitycznych stopniowej depolimeryzacji i demetylacji, zyskiwała w ten sposób coraz większe właściwości kompleksujące [11], które mogłyby wpływać na aktywność fitazy A w sposób podobny jak EDTA, ograniczając jednocześnie aktywność fosfatazy kwaśnej.



Rys. 3. Zależność między aktywnością pektynoesterazy a ilością fosforu uwalnianego z paszy przy wysycającej dawce fitazy i fosfatazy kwaśnej. Wartość współczynnika korelacji nieliniowej zmiennych $R_{Ss} = +0,949$ była istotna na poziomie $p = 0,001$ (test F).

Fig. 3. The relationship between pectin esterase activity of pectinases and the phosphorus amounts released from a feed containing phytase and acid phosphatase preparations. A value of the non-linear correlation coefficient of variables ($R_{Ss} = +0,949$) was significant at a level of $p = 0,001$ (F test).

Wnioski

1. Preparaty pektynolityczne są czynnikiem synergistycznym w procesie defosforylacji fitynianów paszy nawet przy wysycających dawkach enzymów fosfolitycznych.
2. Ogólna aktywność pektynolityczna, pojmowana jako zdolność preparatu do obniżania lepkości roztworu pektyny, może być wykorzystana jako czynnik intensyfikujący defosforylację fitynianów paszowych.
3. Wysoka aktywność pektynoesterazy w preparatach enzymatycznych jest czynnikiem ograniczającym wykorzystanie fosforu z paszy.
4. Pomiędzy aktywnością pektynoesterazy i ilością fosforu uwalnianego z paszy w obecności wysycających dawek fitazy i fosfatazy kwaśnej istnieje zależność którą najlepiej opisuje równanie:

$$\text{Ilość dostępnego P} = 3,831 + \frac{0,059}{\text{aktywność pektynoesterazy [PEU]}} \quad (R^2 = 90\%, p = 0,001)$$

Literatura

- [1] Annison G., Hughes R.J.: Choct M. Effects of enzyme supplementation on the nutritive value of dehulled lupins. Br. Poultr. Sci., 1996, **37**, 157.
- [2] Bagheri, S. i Gueguen, L.: Effect of wheat bran and pectin on the absorption and retention of phosphorus, calcium, magnesium and zinc by the growing pig. Reprod. Nutr. Dev., 1985, **25 (4A)**, 705-716.
- [3] Barbe Ch., Dubourdiou D.: Characterisation and purification of cinnamate esterase from *Aspergillus niger* industrial pectinase preparation. J. Sci. Food Agric., 1998, **78**, 471-478.
- [4] Cowan D.W., Korsbak A., Hastrup T., Rasmussen P.B.: Influence of added microbial enzymes on energy and protein availability of selected feed ingredients. Animal Feed Sci. Technol., 1996, **60**, 311-319.
- [5] Cowan D.W., Pettersson D.R., Rasmussen P.B.: The influence of lipase, α -galactosidase or multi-component pectinase enzymes on energy and amino acid availability in feedstuffs. Poultry Feedstuffs: supply, composition and nutritive value. (eds) McNab J.M. and Boorman K.N., CAB International, 2002, pp. 337-344.
- [6] Fiske C., Subbarow Y.: The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem., 1925, **66**, 375.
- [7] Galas E., Kubik C., Turkiewicz M., Sikora B., Zielińska M.: Preparaty pektynolityczne z brzezki i grzybni po fermentacji cytrynowej w depektynizacji soków jabłkowych. Przem. Ferm. Owoc. Warz., 1997, **9**, 30-33.
- [8] Hajnal K.A., Polaczek-Racz M.: Determination of pectin methyl esterase, polygalacturonase and pectin substances in some fruit and vegetables. Acta Alim., 1975, **4 (3)**, 271-289.
- [9] Heinonen J.K., Lahti R.J.: A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. Anal. Biochem., 1981, **113**, 313-317.
- [10] Ikeda K., Kusano K.: In vitro inhibition of digestive enzymes by indigestible polysaccharides. Cereal Chem. 1983, **60**, 260-263.

- [11] Kim M., Atallah M.T.: Intestinal solubility and absorption of ferrous iron in growing rats are affected by different dietary pectins. *J. Nutr.*, 1993, **123**, 117-124.
- [12] Kornegay E.T., Yi Z., Mc Guirk A.: Replacement values of inorganic phosphorus by microbial phytase for pigs and poultry. *J. Animal Sci.*, 1994, **72**, 30-335.
- [13] Kornegay E.T.: Digestion of phosphorus and other nutrients: the role of phytases and factors influencing their activity. In: *Enzymes in farm animal nutrition*, 2001, pp. 237-271.
- [14] Kružel M., Morawiecka B.: Acid phosphatase of potato tubers (*Solanum tuberosum* L). Purification, properties, sugar and amino acid composition. *Acta Bioch. Polon.*, 1982, **29** (3-4), 321-329.
- [15] Kuchta M., Koreleski J., Zegarek Z.: Paszowe enzymy pektynolityczne w żywieniu kur nieśnych. *Rocz. Naukowe Zootech.*, 1991, **18** (1-2), 195-206.
- [16] Miller G.L.: Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, 1959, **31**, 426-428.
- [17] Ravindran V.: Protein and energy effects of microbial phytase in poultry diets. Paper presented at the BASF Technical Symposium following the southern Poultry Science meetings, Atlanta, Georgia, 19 January 1999, s. 271-272.
- [18] Ravindran V., Cabahug S., Ravindran G., Bryden W.L.: Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broilers. *Poultry Sci.*, 1999, **78**, 699-706.
- [19] Scott J.J., Loewus F.A.: A calcium-activated phytase from pollen of *Lilium longiflorum*. *Plant Phys.*, 1986, **82**, 333-335.
- [20] Shimizu M.: Purification and characterization of phytase and acid phosphatase produced by *Aspergillus oryzae* K1. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1993, **57** (8), 1364-1365.
- [21] Ullach A.H.: *Aspergillus ficuum* phytase: partial primary structure, substrate selectivity, and kinetic characterization. *Preparative Biochem.*, 1988, **18**, 459-471.
- [22] Wikiera A.: Dostosowanie preparatu pektynolitycznego do Pektopol PT 400 do potrzeb przemysłu paszowego. Praca doktorska, 2003, Kraków.
- [23] Wood T., Bhat K.M.: Methods for measuring cellulase activities. *Methods Enzym.*, 1988, **160**, 87-112.
- [24] Wyss M., Pasamontes L., Friedlein A., Remy R., Tessier M., Kronenberger A., Middendorf A., Lehmann M., Schnoebelen L., Röthlisberger U., Kuszniir E.: Biophysical characterization of fungal phytases (myoinositol hexakisphosphate phosphohydrolases): molecular size, glycosylation pattern and engineering of proteolytic resistance. *Appl. Environmental Microbiol.*, 1999, **65** (2), 359-366.
- [25] Żyła K., Ledoux D.R., Garcia A., Veum T.L.: An *in vitro* procedure for studying enzymatic dephosphorylation of phytate in maize-soybean feeds for turkey poults. *Br. J. Nutr.*, 1995, **74**, 3-17.
- [26] Żyła K., Koreleski J., Świątkiewicz S., Wikiera A., Kujawski M., Piironen J., Ledoux D.R.: Effects of phosphorolytic and cell wall-degrading enzymes on the performance of growing broilers fed wheat-based diets containing different calcium levels. *Poultry Sci.*, 2000, **79**, 66-76.
- [27] Żyła K.: Phytase applications in poultry feeding: Selected issues. *J. Anim. Feed Sci.*, 2001, **10**, 247-258.
- [28] Żyła K., Wikiera A.: *In vitro* evaluation of commercial pectinases for possible enhancement of feed dephosphorylation by phytate - degrading enzymes. 13th European Symposium Poultry Nutrition, Oct. 2001, Blankenberge, Belgium.

THE EFFECT OF SELECTED PECTINASE AND PHOSPHATASE PREPARATIONS ON THE PHYTATE DEGRADATION IN FEEDS DIGESTED USING AN *IN VITRO* PROCEDURE

S u m m a r y

There were studied effects of seven commercial pectinase preparations on the phosphorus release from a wheat-soybean mix feed for broilers. The analyses were carried out using an *in vitro* method that simulated the digestion process and conditions in individual parts of the bird's gastrointestinal tract. In the presence of pectinases, there was a statistically significant increase in the amounts of phosphorus released from the feed that correlated well with the viscosimetrically determined overall pectinolytic activity. The determination coefficient of a linear model describing that relationship was 58.62%. The effect analysis of cooperation between the pectinolytic preparations and an 'A' phytase, which was simultaneously added to the feed, stated a favourable impact of pectinases on the efficiency of catalytic action of saturating dosages of phytase added. The ability of pectinases to enhance phytate dephosphorylation by exogenous phytase was correlated with the acid phosphatase activity ($R^2 = 93\%$) accompanying the pectinases. The enhancing effect of pectinolytic preparations on the phytate dephosphorylation was stated even in the presence of a saturating level of phytase and acid phosphatase, however, under such conditions, this effect was negatively correlated ($R = -0,949$) with the pectin esterase activity of the preparations investigated. A model of the function $y = 3,831 + 0,059/x$ was the best to describe such a negative relationship between the pectin esterase activity and the amount of phosphorus being released from a feed with the phytase and acid phosphatase dosages at a saturating level. It was quite probable that the high pectin esterase activity in pectinase preparations caused the elimination of Ca^{2+} ions from the reaction environment and stimulated the formation of pectates. The latter ones selectively decreased the efficiency of the phosphorolytic enzymes.

Key words: pectinase, phytate degrading enzymes, and feed dephosphorylation. ☒