

Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos



Estrategias biotecnológicas para reducir el contenido de fitatos en productos fermentados de origen vegetal mediante fitasas de bifidobacterias

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
Izaskun García Mantrana

Dirigida por:
Dra Claudia Mónica Haros
Dr. Vicente Monedero García

Programa de Doctorado en Ciencias de la Alimentación
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la
Alimentación, Toxicología y Medicina Legal
Universidad de Valencia

Valencia, 2015



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA



La Dra. Claudia Mónica Haros y el Dr. Vicente Monedero, ambos Científicos Titulares del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos.

CERTIFICAN QUE:

La Licenciada en Farmacia, Dña. Izaskun García Mantrana ha realizado el trabajo que tiene por título **“Estrategias biotecnológicas para reducir el contenido de fitatos en productos fermentados de origen vegetal mediante fitasas de bifidobacterias”**, que reúne los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Valencia y que ha dado lugar a un compendio de publicaciones que se detallan a continuación:

- *Myo*-inositol hexakisphosphate degradation by *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC 27919 improves mineral availability of high fibre rye-wheat sour bread. *Food Chemistry*, 2015, 178, 267-275. Factor de impacto: 3.259.
- Application of phytases from bifidobacteria in the development of cereal-based products with amaranth. *European Food Research and Technology*, 2014, 238, 853-862. Factor de impacto: 1.387.
- Expression of bifidobacterial phytases in *Lactobacillus casei* and their application in a food model of whole-grain sourdough bread. Enviado a *International Journal of Food Microbiology*, 2015 (2ª revisión). Factor de impacto: 3.155.
- Reduction of phytate in soy drink by fermentation with *Lactobacillus casei* expressing phytases from bifidobacteria. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2015. En prensa. Factor de impacto: 2.416.

Fdo. Dra Claudia Mónica Haros

Fdo. Vicente Monedero García

*A vosotros,
Adriana, Hernán
y
Anselmo*

Agradecimientos

A pesar de tanto contratiempo y tener siempre esa sensación de ir contracorriente en esta etapa de mi vida que decidí emprender hace algunos años, finalmente aquí me encuentro frente a la hoja de los agradecimientos de la Tesis. Ya está! Una vez más, con voluntad, esfuerzo y constancia todo se consigue por muy difícil que parezca desde un principio, incluso en el campo de la ciencia y en estos tiempos que corren para ella.

En primer lugar quería transmitir mi más profundo agradecimiento a mis directores de tesis, la **Dra. Mónica Haros** y el **Dr. Vicente Monedero**. Cada uno a su manera con sus medios, han sabido apoyarme y ofrecerme su tiempo y dedicación en todo momento para realizar este proyecto.

También me gustaría agradecer a **TODOS** los que habéis coincidido conmigo en mi estancia transcurrida en el IATA. No voy a nombrar uno por uno por miedo a olvidarme de alguien. Aunque habéis sido personas muy diferentes, de las que he aprendido mucho tanto en lo personal como en lo profesional, algo teníais en común todos y es el haber estado siempre dispuestos a ofrecer un momento de vuestro tiempo por muy ocupados que estuviéseris para ayudarme cuando lo necesité.

A mis **amigos** por “aguantarme” a mí y a mi tesis, aún sin entender muy bien de que iba exactamente. En especial, me gustaría agradecer a mi amiga **Reme** su apoyo como segunda mami de mis hijos cuando no he podido encargarme de ellos por no acabar a tiempo en el laboratorio.

Y por último, a vosotros chicos. **Hernán, Adriana** y muy en especial a tí **Anselmo**, gracias por permitirme robaros tanto tiempo de atención y por animarme cuando perdía la paciencia. Sois la ilusión necesaria al final del día para continuar con fuerza en la vida.

RESUMEN

Los alimentos integrales de origen vegetal, concretamente, los cereales de grano entero y leguminosas se caracterizan por ser una fuente excelente de fibra dietética y poseer un elevado contenido en compuestos fitoquímicos. Además de proporcionar macronutrientes, como carbohidratos complejos y proteínas, también destacan por su contenido en micronutrientes como son las vitaminas y minerales. Sin embargo, su ingesta conlleva a la vez un aporte en sustancias antinutritivas, como los fitatos, con gran afinidad por minerales, proteínas y elementos traza, que pueden comprometer su absorción por formación de quelatos estables en el tracto digestivo. Una hidrólisis o defosforilación parcial de los fitatos disminuiría su capacidad quelante y en consecuencia el efecto negativo sobre la biodisponibilidad de minerales. La fitasa es la enzima capaz de hidrolizar los fitatos (InsP_6) a ésteres de fosfato de *mio*-inositol de menor grado de fosforilación (InsP_5 - InsP_1). Existen muchas investigaciones que han intentado reducir la cantidad de ácido fítico en alimentos mediante diversas estrategias en las que se incrementa la acción de las fitasas endógenas vegetales o se adiciona una fitasa exógena.

El objetivo principal de este trabajo es desarrollar nuevos productos fermentados de origen vegetal, con elevada calidad nutricional, mediante el uso de alimentos integrales de origen vegetal empleando fitasas provenientes de bifidobacterias (microorganismos GRAS/QPS) para promover la hidrólisis de las sustancias antinutritivas asociadas a estos productos.

Con el propósito de alcanzar este objetivo, se desarrollaron tres diferentes estrategias, siempre mediante el uso de fitasas provenientes de bifidobacterias. En un primer trabajo se utilizaron directamente las bifidobacterias productoras de fitasas. Posteriormente, en un segundo estudio, se aplicaron las fitasas aisladas y purificadas. Por último, en un tercer trabajo las fitasas de bifidobacterias fueron

expresadas en una cepa del género *Lactobacillus* (principal género bacteriano implicado en procesos fermentativos). Tras la aplicación de las tres estrategias en el desarrollo de diversos alimentos fermentados de origen vegetal, se evaluó la calidad tanto tecnológica y nutricional como el contenido final en fitatos y productos de hidrólisis. Finalmente, se estimó la biodisponibilidad mineral resultante en base a las relaciones molares fitato/mineral en los alimentos obtenidos tras los diferentes tratamientos.

Las estrategias utilizadas en este trabajo permitieron el desarrollo de nuevos productos vegetales fermentados con bajo contenido en fitatos y alto valor nutricional y funcional. Además, esta investigación puso de manifiesto la capacidad de modificar una cepa de *L. casei* para producir enzimas con relevancia tecnológica en aplicación de alimentos funcionales.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. GENERALIDADES EN CONSUMO DE ALIMENTOS SALUDABLES.....	3
1.1 Alimentos de origen vegetal.....	3
1.2 Alimentos funcionales.....	10
1.3 La fibra dietética.....	13
1.3.1 Papel.....	13
1.3.2 Recomendaciones de consumo.....	14
1.4 Minerales.....	15
1.4.1 Necesidades nutricionales.....	15
1.4.2 Calcio.....	16
1.4.3 Hierro.....	17
1.4.4 Zinc.....	18
1.4.5 Fortificación con minerales de productos de origen vegetal.....	20
2. COMPONENTES ANTINUTRITIVOS: ÁCIDO FÍTICO Y FITATOS.....	21
2.1 Fuentes y consumo.....	21
2.2 Aspectos negativos.....	24
2.3 Aspectos beneficiosos.....	26
2.4 Degradación de los fitatos.....	28
2.4.1 Estrategias de eliminación en alimentos.....	28
2.4.2 Fermentación: proceso con masas madre.....	29
2.4.3 Fitasas.....	31
2.4.3.1 Tipos de fitasas.....	31
2.4.3.2 Fitasas de bifidobacterias.....	35
3. RELACIONES MOLARES FITATO/MINERAL Y PREDICCIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD DE MINERALES.....	38

4. BIBLIOGRAFÍA.....40

OBJETIVOS.....51

RESULTADOS Y DISCUSIÓN55

CAPÍTULO 1. Myo-inositol hexakisphosphate degradation by Bifidobacterium pseudocatenulatum ATCC 27919 improves mineral availability of high fibre rye-wheat sour bread.....57

CAPÍTULO 2. Application of phytases from bifidobacteria in the development of cereal-based products with amaranth.....87

CAPÍTULO 3. Expression of bifidobacterial phytases in Lactobacillus casei and their application in a food model of whole-grain sourdough bread.....111

CAPÍTULO 4. Reduction of phytate in soy drink by fermentation with Lactobacillus casei expressing phytases from bifidobacteria.....141

DISCUSIÓN GENERAL.....157

CONCLUSIONES.....179

ANEXO.....185

INTRODUCCIÓN

1. GENERALIDADES SOBRE EL CONSUMO DE ALIMENTOS SALUDABLES

Los avances científicos en torno a la repercusión de la dieta sobre la salud han dado origen a una creciente demanda de alimentos funcionales los cuales desempeñan un importante papel fisiológico en el mantenimiento del bienestar general y la salud. Particularmente, el incremento de enfermedades precedidas por el síndrome metabólico ha generado un continuo interés en el consumo de productos elaborados con granos enteros, como son los cereales y pseudocereales, además de otros alimentos dentro del grupo de los alimentos vegetales como son las leguminosas, oleaginosas y frutos secos.

Algunos de estos grupos de alimentos de origen vegetal, donde podemos encontrar una amplia variedad, son altamente apreciados por su posible potencial terapéutico asociado a una extraordinaria fuente de fibra y su elevado contenido en compuestos fitoquímicos. Además de proporcionar macronutrientes, como carbohidratos complejos y proteínas, también se caracterizan por su adecuado aporte de micronutrientes como son las vitaminas y minerales y por su elevada proporción de ácidos grasos de tipo insaturado.

1.1 Alimentos de origen vegetal

El consumo de alimentos de origen vegetal como los cereales de grano entero, leguminosas, frutos secos, verduras y frutas es considerado un factor esencial dentro del seguimiento de una alimentación saludable. La mayoría de estos alimentos están situados en las primeras posiciones de la pirámide nutricional. Los alimentos de origen vegetal son recomendados constantemente en todas las guías alimenticias por expertos en el seguimiento de una dieta equilibrada y saludable y la gran mayoría de ellos son la base de la dieta mediterránea. A los beneficios de su bajo contenido en grasas saturadas hay que añadir su alto contenido en

carbohidratos complejos además de fibra y su riqueza en sustancias antioxidantes. La Organización Mundial para la Salud (OMS) sostiene que un consumo diario y suficiente de este tipo de alimentos podría contribuir a la prevención de patologías importantes como las enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. Además existen otras enfermedades y trastornos como diabetes tipo-2, obesidad y estreñimiento sobre las cuales el consumo de alimentos de origen vegetal ejerce un efecto protector. Los países subdesarrollados tienden a seguir dietas basadas en alimentos vegetales, aunque es importante resaltar que se trata de monodietas, es decir dietas poco variadas que acaban resultando desequilibradas. Sin embargo, conforme aumenta el desarrollo y nivel de vida en un país también lo hace a su vez el consumo de alimentos refinados, procesados y de origen animal. Es por esto que la estrategia mundial que pretende la OMS sobre la alimentación, avalada por expertos nacionales e internacionales junto con estudios científicos actuales, se basa en recomendaciones sobre una ingesta adecuada de nutrientes para la obtención de un estado de salud óptimo. En España, la estrategia NAOS (Estrategia para la Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad), fue creada en 2005 desde la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) con la intención de sensibilizar a la población del problema que representa la obesidad para la salud, y de impulsar todas las iniciativas que contribuyan a lograr que los ciudadanos, y especialmente los niños y los jóvenes, adopten hábitos de vida saludables, principalmente a través de una alimentación saludable y de la práctica regular de actividad física (www.naos.aesan.mssi.gob.es).

Desde la Unión Europea surgió también un proyecto denominado *HEALTHGRAIN* que se comenzó con la idea de reducir el riesgo de padecer enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico (Poutanen y col., 2008). Este programa tiene como objetivo incrementar el consumo de granos enteros y junto con éstos los compuestos bioactivos que contienen. El programa se creó en el

año 2005, y continúa en la actualidad por medio de la asociación *HEALTHGRAIN Forum*, fundada en mayo del 2010 (www.healthgrain.org).

En una dieta equilibrada al menos el 50% de las calorías totales debe provenir de los hidratos de carbono de los alimentos y son necesarios para proporcionar a nuestro organismo la energía que necesita para poder funcionar y desarrollarse correctamente, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Dentro de los hidratos de carbono, los cereales son el grupo más representativo. Los principales cereales cultivados en el mundo son el trigo, el arroz y el maíz con un promedio anual de 686, 685 y 819 millones de toneladas métricas, respectivamente (FAO, 2011). Los minoritarios son la cebada, la avena y el centeno con una producción anual media de 152, 23 y 18 millones de toneladas métricas, respectivamente (FAO, 2011). En cuanto al mijo y sorgo, con una producción anual de 56 y 26 millones de toneladas respectivamente, se destinan principalmente para consumo animal, aunque en algunas regiones son la base de la alimentación humana (USDA, 2007).

En un subgrupo aparte, aunque en muchas ocasiones considerados dentro del grupo de los cereales, encontramos a los pseudocereales. Se trata de plantas no gramíneas que pertenecen principalmente a los géneros *Amaranthus*, *Fagopyrum* y *Chenopodium*, y se engloban dentro de la familia de las dicotiledóneas, a diferencia de los cereales (Buitrago y Torres, 2000). Sin embargo, producen granos y semillas similares a las de las gramíneas, ricos en materia harinosa con un elevado contenido en almidón. Es por eso que desde la antigüedad han sido usados de igual forma que éstos siendo aptos para la fabricación de pan y productos derivados (Schoenlechner, 2008). La producción mundial de pseudocereales es muy inferior a la de los cereales, alrededor de 70 mil toneladas anuales para quínoa y amaranto, y América Latina es la principal fuente de producción. Su producción se destina a dos fines fundamentales, como son el autoconsumo en las regiones donde se cultiva y el mercado de los alimentos funcionales (FAO, 2011). Los pseudocereales

se caracterizan por su elevada calidad nutricional y ausencia de gluten, aunque también destaca su elevado contenido en ácido fólico, siendo éste superior al de la mayoría de los cereales de grano entero (Egli y col., 2002).

El pan ha constituido uno de los principales alimentos del primer grupo básico de la alimentación de todas las civilizaciones debido a sus características nutritivas, manteniéndose hasta nuestros días como un alimento de consumo diario. Concretamente, las recomendaciones de la OMS aconsejan que se consuman alrededor de 250g de pan al día (90 kg al año), lo que equivale a 6-8 rebanadas de pan a diario. La tendencia habitual ha sido la elaboración de pan y demás productos derivados a base de harinas refinadas de trigo, a pesar de su limitado valor nutricional (Isserliyska y col., 2001). Sin embargo, como se ha comentado con anterioridad, el auge que han tenido los alimentos funcionales se ha visto reflejado en un aumento del uso de harinas integrales tanto de otros cereales diferentes del trigo como también de pseudocereales, con mayor contenido en fibra dietética y valor nutricional (Snider y Liebman, 1992). Es por ello que en 1999 el consumo de grano entero y su uso para la elaboración de productos derivados comenzó a tener declaraciones de salud en los Estados Unidos extendiéndose en 2002 a Inglaterra y Suecia (Marquart y col., 2004).

Concretamente, cereales como el trigo y el centeno comparten características botánicas similares, como también se asemeja la estructura de sus granos enteros. Éstos se caracterizan por una equilibrada composición de macro y micronutrientes. Sin embargo, el contenido en proteínas del centeno es inferior al del trigo. Esto es debido a que el centeno tiene un menor contenido en glutelinas, y por lo tanto sus harinas forman gluten en menor proporción que las harinas de trigo. El centeno es mejor fuente de fibra dietética que el trigo. Contiene una notable cantidad de fibra soluble, debido a su alto contenido en arabinosilano soluble y β -glucanos (Lappi y col., 2010). Además, se ha demostrado que el consumo de fibra de centeno es más eficaz que la fibra de trigo en la mejora global de biomarcadores de la salud del

intestino (McIntosh y col., 2003; Gråsten y col., 2007). Los granos de centeno también son buena fuente de lignanos como pinoresinol, lariciresinol y syringaresinol. En el intestino, la microbiota intestinal es capaz de convertirlos en derivados con importantes beneficios para la salud (Heinonen y col., 2001). Además, el centeno es un candidato ideal para procesos panarios que conlleven la inclusión de masa madre, debido principalmente a la mejora en las características organolépticas que ambos en conjunto incluidos en este proceso consiguen aportar al producto final. El consumo de pan de centeno en España va en aumento, siguiendo el camino marcado por los países del centro y norte de Europa, donde su consumo está muy extendido.

Dentro de los pseudocereales, con una mayor calidad nutricional que los cereales debido a su contenido y calidad proteica y por su equilibrada composición en aminoácidos esenciales (Schoenlechner y col., 2008; Giuseppe y col., 2009; Oszvald y col., 2009), destaca el amaranto. Este pseudocereal es particularmente rico en lisina, aminoácido deficitario en cereales. Su contenido lipídico es 2-3 veces superior al de los cereales (7-8%), destacando en su composición la presencia de ácido oleico y ácido linoleico, que suponen alrededor del 75% del total presente en la fracción lipídica del grano (Bodroza-Solarov y col., 2008; Nascimento y col., 2014). El contenido mineral también es superior al de los cereales, especialmente posee elevadas concentraciones de calcio, magnesio, hierro, potasio y zinc (Schoenlechner y col., 2008; Álvarez-Jubete y col., 2010). De las más de 60 especies del género *Amaranthus*, solamente tres de ellas, *A. hypocondriacus*, *A. cruentus* y *A. caudatus*, cultivadas en México, Guatemala y Perú, son destinadas a consumo humano. Hace apenas unas cuantas décadas que se redescubrió su gran valor alimenticio y en los últimos años el amaranto se utiliza como ingrediente funcional, especialmente en procesos de panificación, puesto que puede ser muy versátil para su transformación e industrialización en la producción de alimentos. Sin embargo, cabe recalcar que cuando las harinas integrales de

cereales o pseudocereales son empleadas en la elaboración de productos de panadería es necesario realizar estudios sobre la calidad tecnológica y sensorial de éstos, con la consiguiente modificación del proceso para poder mantener el grado de aceptación global del alimento final por parte del consumidor.

Otros alimentos vegetales importantes a mencionar por su elevada calidad nutricional, aunque fuera de la definición de grano entero, son las leguminosas. Dentro de las leguminosas destaca la soja (*Glycine max*). Se trata de una leguminosa oleaginosa. Juntos, aceite y contenido de proteínas son el 60% aproximadamente del peso seco de la soja: proteína 40% y aceite 20%. De origen asiático, donde es consumida con mucha asiduidad de manera histórica, aunque en la actualidad se comercializa en todo el mundo, debido a sus múltiples usos. La producción mundial de cultivos oleaginosos en 2011/12 se estimó en 472 millones de toneladas, con una producción mundial de soja de alrededor de 260 millones de toneladas. Actualmente, Estados Unidos es el principal productor de soja del mundo con alrededor de 100 millones de toneladas métricas, seguido de Brasil y Argentina (FAO, 2011). Gracias al desarrollo tecnológico y económico que ha experimentado la alimentación de origen no animal, los extractos de grano de soja ocupan actualmente un destacado lugar en el mercado de productos proteicos de origen vegetal. La proteína de soja se emplea tanto como ingrediente tecnofuncional por su poder emulsificante y gelificante y por su capacidad de absorción de agua, como por sus propiedades nutritivas, ya que se trata de una de las proteínas vegetales con mayor valor biológico. Dentro de los alimentos de origen vegetal, las leguminosas destacan por un elevado contenido proteico, entre 17-25%, pero la soja sobresale con un contenido proteico superior de alrededor de un 40% (Mateos-Aparicio y col., 2008). Aunque el contenido en algunos aminoácidos esenciales sulfurados, como metionina y cisteína es limitante, tiene un contenido en lisina superior al de otros muchos alimentos vegetales y deficitario en cereales. Por lo tanto con la asociación de leguminosas y cereales se consigue

complementar entre sí sus déficits y mejorar así la calidad de sus proteínas. El grano de soja también se caracteriza por un elevado contenido lipídico (20%), principalmente de carácter poliinsaturado, siendo fuente de ácido linoleico y alfa-linolénico. Además es importante su contenido en lecitinas, vitaminas, minerales y compuestos fitoquímicos. Los componentes biológicamente activos son conocidos como fitoestrógenos y dentro de este grupo se encuentra un tipo especial de flavonoides denominados isoflavonas con potencial actividad antioxidante y anticarcinógena, pudiendo además interferir en el desarrollo de enfermedades hormono-dependientes como también colaborar en la prevención del avance de enfermedades cardiovasculares gracias a su efecto hipocolesterolemiante. Como se ha comentado con anterioridad, la soja es un alimento polivalente del que se obtienen gran variedad de productos: harina, aceite, lecitina, bebida de soja, tofu, productos fermentados con sal (*tamari*) o sin sal (*tempeh*) y otros como los brotes de soja. Uno de estos productos a base de soja ampliamente consumido es la bebida o *leche* de soja. En cuanto a las ventajas nutricionales de consumir una bebida a base de extractos de granos de soja se encuentran el alto valor biológico de sus proteínas y la alta proporción de minerales y de compuestos bioactivos. En comparación con la leche de vaca, esta bebida no contiene lactosa, caseínas, vitamina B₁₂, grasas saturadas, colesterol y aporta menor cantidad de sodio y calorías.

De todos modos, junto a esta serie de beneficios nutricionales que conlleva el consumo de este tipo de alimentos de origen vegetal que se han descrito a lo largo de este texto, es importante resaltar que todos ellos poseen una característica común y es el elevado contenido en diversas sustancias antinutritivas, entre las que se destacan el ácido fítico o sus sales los fitatos. Tratamientos térmicos adecuados, así como la fermentación o la germinación, permiten que estos alimentos sean más fáciles de digerir y que parte de sus nutrientes, como los minerales, sean más biodisponibles, ya que se reduce el contenido en fitatos.

1.2 Alimentos funcionales

El creciente interés de hoy en día por parte de la población en temas de salud y bienestar y la gran influencia que la alimentación desempeña en nuestro organismo junto con las últimas investigaciones sobre sustancias beneficiosas presentes en los alimentos contribuye al impulso en el desarrollo de estos productos en el mercado. El concepto de alimento funcional surgió en Japón en los años 80. Las autoridades sanitarias niponas conscientes del incremento en el gasto sanitario, generado por la mayor esperanza de vida de la población anciana y a la que había que garantizar también una mejor calidad de vida, iniciaron un sistema de regulación para la aprobación de ciertos alimentos con beneficio para la salud documentado con el fin de mejorar la salud de la población (Arai, 2002). Estos alimentos son ahora reconocidos como “Alimentos para Uso Específico en Salud” y son denominados como *Foods for Specified Health Use* o FOSHU. En el año 2002 cerca de 300 productos obtuvieron el grado FOSHU (Hasler, 2002). Éstos deben ser autorizados por el Ministerio de Sanidad, tras la presentación de diversos documentos que prueben científicamente sus beneficios y siempre y cuando estos productos formen parte de una dieta ordinaria.

En Estados Unidos la legislación de este tipo de alimentos permite alegaciones de salud autorizadas por la Administración para Alimentos y Medicamentos (*Food and Drug Administration*, FDA), siempre que existan evidencias científicas y estén respaldadas por el consenso científico entre los expertos.

En Europa la legislación es aún más restrictiva. La Unión Europea creó una Comisión Europea de Acción Concertada sobre Bromatología Funcional en Europa (*Functional Food Science in Europe*, FUFOSSE) y su objetivo fue desarrollar y establecer un enfoque científico sobre las pruebas que se necesitan para respaldar el desarrollo de productos alimenticios que puedan tener un efecto beneficioso sobre una función fisiológica del cuerpo y mejorar el estado de salud y bienestar de un

individuo y/o reducir el riesgo de que desarrolle enfermedades (Diplock y col., 1999; Verschuren, 2002). En Europa, el primer documento de consenso sobre conceptos científicos en relación con los alimentos funcionales fue elaborado en 1999 por un grupo de expertos coordinados por el ILSI (*International Life Sciences Institute*), según el cual "un alimento funcional es aquel que contiene un componente, nutriente o no nutriente, con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, con un efecto añadido por encima de su valor nutricional y cuyos efectos positivos justifican que pueda reivindicarse su carácter funcional o incluso saludable". Aunque el concepto de alimento funcional aún no ha sido definido más concretamente por la legislación vigente, podríamos decir que son considerados aquellos alimentos que se consumen como parte de una dieta normal, es decir, deben demostrar sus efectos en las cantidades que normalmente se consumiría en la dieta y éstos pueden ser un alimento natural, un alimento al que se le ha añadido un componente, uno al que se le ha retirado o modificado alguno de sus componentes mediante procesos tecnológicos o biológicos, incrementando de este modo la biodisponibilidad de los mismos y que contribuye a mantener o mejorar nuestro estado de salud y bienestar. Todos estos tipos de alimentos funcionales estarían englobados en dos tipos de alegaciones de salud. Las de tipo A, que son las alegaciones de mejora de diversas funciones normales del organismo y las de tipo B que son las alegaciones de reducción de riesgo de enfermedades (*Swedish Nutritional Foundation. Swedish Code*). Para la puesta en práctica del programa FUFUSE, se creó un nuevo programa de Acción Concertada de la Comisión Europea, el Proceso para la Valoración de Soporte Científico de las Alegaciones con Respecto a los Alimentos (*Process for the Assessment of Scientific Support for Claims on Foods, PASSCLAIM*), que tiene como objetivo resolver los temas relativos a la validación y la verificación científica de alegaciones y la información al consumidor como también establecer un criterio más consensuado (*PASSCLAIM – Process for the Assessment of Scientific Support*

for Claims on Foods. European Commission concerted action organized by ILSI Europe; 2002). Estos estudios se basarán en la identificación y caracterización de biomarcadores, que justifiquen el beneficio en la salud debido a la ingesta de estos alimentos funcionales (Roberfroid, 2002; Verschuren, 2002). A mediados del 2003, es presentada por la Comisión una propuesta de Reglamento Comunitario acerca de las declaraciones nutricionales y propiedades saludables de los alimentos, finalmente aprobado en el año 2006. El Reglamento (CE) nº 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, del 20 de diciembre de 2006 (CE, 2006), relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos tiene como finalidad garantizar la protección del consumidor introduciendo la evaluación científica como requisito previo para poder realizar una declaración nutricional o de propiedades saludables. Sólo se permitirán hacer alegaciones de propiedades saludables demostradas científicamente y deberán estar incluidas en la lista comunitaria de alegaciones generalmente admitidas en función de las evidencias científicas sobre esa función biológica. Prohíbe de forma general el uso de información que pueda inducir a error al consumidor. No se permiten alegaciones relativas a la prevención, tratamiento o curación., alentar o promover el consumo excesivo de los mismos. También establece restricciones en las alegaciones que, directa o indirectamente, están destinadas al público infantil. Y con objeto de impedir que se formulen alegaciones en favor de productos que, por otra parte, presentan un perfil no saludable, el Reglamento tiene la intención de establecer perfiles nutricionales. Además, todas estas medidas con respecto a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables serán de aplicación a cualquier tipo de comunicación comercial (etiquetado, presentación y publicidad) en los alimentos que se ofrezcan. En el etiquetado o publicidad debe informarse de la importancia de una dieta equilibrada y un estilo de vida saludable, de la cantidad y patrón de consumo adecuado para obtener el efecto alegado como de los riesgos de un consumo excesivo o posibles interacciones farmacológicas. Cuando sea

necesario también se debe incluir la advertencia de su consumo por determinados sectores de la población (CE, nº 1924/2006) (Agget y col., 2005; Sanz y Dalmau, 2008).

1.3 La fibra dietética

1.3.1 Papel

Entre las varias definiciones encontradas sobre fibra dietética, la más utilizada es la de la *American Association of Cereal Chemists* (2001), la cual la define como la parte comestible de la planta o hidratos de carbono análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado, con fermentación completa o parcial en el intestino grueso. Por lo tanto, no podemos considerar a la fibra dietética un nutriente, aunque si desempeña funciones fisiológicas muy importantes, aportando un gran valor funcional a los alimentos que la contienen.

La fibra dietética en función de su solubilidad se puede distinguir en fibra insoluble y fibra soluble. Dentro de la fibra insoluble destaca: celulosa, algunas hemicelulosas, lignina y almidón resistente. En cuanto a la fibra soluble, está constituida por parte de hemicelulosas, gomas, mucílagos, pectinas y fibra prebiótica como la inulina y los fructooligosacáridos. Es precisamente esta fibra prebiótica la que favorece el crecimiento y desarrollo de una microbiota intestinal adecuada y beneficiosa para el correcto funcionamiento de nuestro organismo (ADA, 2008). Entre otras de las funciones beneficiosas que desempeña la fibra en el organismo se destacan algunas como son: retención de agua y aumento del bolo fecal incrementando así el tránsito intestinal, fijación de ácidos biliares y como consecuencia disminución de la absorción de lípidos y además regulación del metabolismo de la glucosa. Los alimentos que contienen fibra poseen un índice glicémico menor que el de los alimentos equivalentes refinados, manteniendo una mejor regulación de la respuesta glucémica (Jenkins y col., 1988; Nilsson y col., 2008). Todas estas acciones se traducen en efectos positivos y preventivos de

trastornos como estreñimiento, obesidad, arterioesclerosis y patologías como enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo-2, síndrome de colon irritable y algunos tipos de cáncer, sobre todo el cáncer de colon (Gastroenterology, 1997; Escudero-Alvarez y González-Sanchez, 2006; ADA. 2008; Alexandre y Miquel, 2008). La fibra consigue favorecer la eliminación de una serie de sustancias cancerígenas, disminuyendo así su paso al organismo. Además ésta consigue disminuir el tiempo de tránsito intestinal, traduciéndose en un menor contacto de estas sustancias con la pared intestinal. También consigue equilibrar la microbiota intestinal, evitando el crecimiento de cepas bacterianas que degradan los ácidos biliares en componentes cancerígenos y favoreciendo el desarrollo de cepas beneficiosas, que llevan a cabo la fermentación de polisacáridos de la fibra dando lugar a la producción de ácidos grasos de cadena corta como el butírico, que inhibe el desarrollo de tumores en colon y recto (Scheppach y col., 1995). Además el butirato se metaboliza en los colonocitos, constituyendo una fuente de energía para la mucosa colónica. En este sentido, el ácido butírico es un elemento de gran importancia en el mantenimiento de la estructura barrera del intestino. La fibra dietética además influye en los parámetros hormonales, ya que disminuye los niveles plasmáticos de testosterona y estradiol, regulando los niveles circulantes (Howie y Schultz, 1985; Yip y col., 1999).

1.3.2 Recomendaciones de consumo

Se dispone de numerosos estudios epidemiológicos que sugieren que las dietas de países desarrollados e industrializados, caracterizadas por un elevado consumo de carne, grasa animal y harinas refinadas, que aportan muy bajo contenido en fibra, impactan de manera negativa en el bienestar general y la salud.

Actualmente el consumo normal de fibra varía entre 5-18 g/día, es decir, las ingestas promedio en países occidentales están muy por debajo de las ingestas recomendadas. No se han establecido recomendaciones específicas y unificadas

para el consumo adecuado de fibra, existiendo diferencias considerables a nivel mundial. Además éstas difieren en función del sexo y la edad del individuo. Según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria se recomienda 25 g/día (EFSA, 2010). Con respecto a Estados Unidos las recomendaciones varían entre 38 g/día para hombres y 25 g/día para mujeres (IOM, 2005). En países como Reino Unido, Holanda y Estados Unidos se han creado incluso recomendaciones de consumo de fibra dirigidas a los niños y adolescentes. En niños mayores de 2 años y hasta los 18 años se recomienda el consumo de la cantidad que resulte de sumar 5 g/día a la edad (Escudero-Álvarez y González-Sánchez, 2006). Con respecto a los ratios recomendados entre fibra insoluble y soluble, éstos deben tener una proporción de 3/1. Esta proporción recomendada se consigue alcanzar cuando la dieta es variada y contiene cereales integrales, frutos secos, legumbres, frutas y otros vegetales (Salas-Salvadó y col., 2006).

1.4 Minerales

1.4.1 Necesidades nutricionales

Los minerales constituyen el 4% del peso corporal y tienen numerosas funciones en el organismo (Linder, 1988). Esas funciones van desde mantener la presión osmótica como es el caso del sodio, potasio y cloro; otros como el calcio y fósforo forman parte de la estructura de tejidos como el hueso y otros minerales son componentes de moléculas orgánicas complejas como hormonas o actúan en metaloenzimas o como cofactores en reacciones enzimáticas. Los minerales se clasifican principalmente como macro- y microminerales en función de su presencia y/o necesidades por parte del organismo. Entre los macrominerales se encuentran el calcio, fósforo, magnesio, sodio, potasio, cloro y azufre y entre los microminerales el hierro, zinc, cobre, iodo, cromo, selenio, flúor, entre otros (Silverman y Brauer, 2008).

A través de la dieta el organismo puede recibir aportes variados de minerales y adaptarse dentro de cortos períodos de tiempo, aumentando la absorción o la utilización de éstos en función de que tengan lugar aportes deficitarios o por el contrario aportes incrementados en exceso. Es por eso, que para cada nutriente, mineral en este caso, debemos consumir una dosis mínima diaria, denominado cantidad diaria recomendada (CDR) (Tabla 1). Estos requerimientos varían en función del sexo y de la edad, aunque también lo hacen a lo largo de la vida en función del estado en el que se encuentre el organismo o según patologías asociadas. Es decir, los requerimientos más altos corresponderían a períodos de crecimiento, como es el caso de la infancia y adolescencia o durante el embarazo. Los aportes de algunos minerales también varían en las últimas etapas de la vida (NAS, 2004).

1.4.2 Calcio

El calcio es el mineral más abundante del organismo, siendo el 99% parte del esqueleto y de los dientes. Su absorción es muy baja, tan sólo entre el 10 y el 30% del contenido en la dieta se absorbe. Tiene diversas e importantes funciones fisiológicas y actúa como segundo mensajero intracelular además de cofactor en reacciones enzimáticas (Silverman y Brauer, 2008). Existen factores que aumentan su absorción como la vitamina D, el ejercicio físico y dieta alta en proteínas, mientras otros factores como la hipoclorhidria, el exceso de grasa, fosfatos y fitatos en la dieta o un déficit de magnesio la disminuyen. Las principales fuentes son la leche y derivados, aunque también se encuentra en alta proporción en granos enteros de cereales, pseudocereales y leguminosas. Sin embargo, es precisamente en estas fuentes vegetales donde su biodisponibilidad se ve comprometida por la presencia de sustancias antinutritivas como el ácido fítico y sus sales (Dendougui y Schwedt, 2004). Aportes deficitarios o una mala absorción de este mineral

provocan un aumento en la resorción ósea, disminuyendo la masa ósea y favoreciendo la osteoporosis.

1.4.3 Hierro

El contenido en el organismo es de 4 a 6 gramos. Un 70% se encuentra en la hemoglobina, mioglobina muscular y diversos enzimas (Silverman y Brauer, 2008). El hierro en los alimentos se encuentra en dos estados. Uno de ellos es la forma inorgánica también denominado hierro no hemo y la otra es la forma orgánica o hierro hemo. La absorción del hierro en su forma hemo tiene lugar como estructura porfirínica intacta. El hierro hemo se encuentra principalmente en los alimentos de origen animal y es altamente absorbible siendo menos afectado por los demás componentes de la dieta. Sin embargo, todo el hierro no hemo que se encuentra en los productos de origen vegetal se caracteriza por ser menos absorbible, siendo esta absorción de alrededor de un 10% (Zimmermann y Hurrell, 2007). Esta fracción sí se ve afectada por el resto de componentes de la dieta. Su biodisponibilidad se ve incrementada en presencia de ácido ascórbico o cuando es consumido junto con proteína animal, mientras que, por el contrario, los fosfatos, taninos y los fitatos disminuyen su absorción, resultando así la asimilación del hierro no hemo muy variable, oscilando entre un 3% y un 30% (Porres y col., 2001; Heath y col., 2003; Teucher y col., 2004). Aportes deficitarios de hierro y mantenidos en el tiempo propicia la aparición de anemia ferropénica (Brady, 2007). Los grupos de mayor riesgo son los bebés, niños en edad preescolar, adolescentes, mujeres en edad fértil o embarazadas, ancianos y población de países en desarrollo, como también individuos con enfermedades asociadas al tubo digestivo o síndrome de malabsorción. La deficiencia de hierro es una de las deficiencias nutricionales más comunes, afectando a más de 2 millones de personas en el mundo, lo que desencadena anemia ferropénica, la enfermedad carencial clásica por excelencia nivel mundial (Zimmerman y Hurrell, 2007).

1.4.4 Zinc

La cantidad total en el organismo se encuentra entre los 2 y 3 gramos. Tres cuartas partes se localizan en el esqueleto y el resto en diferentes partes de cuerpo. Se absorbe sobre un 20% del contenido de la dieta y desempeña un importante papel en diversas funciones biológicas en el cuerpo. Se conoce que aproximadamente 300 enzimas requieren del zinc para desempeñar su actividad (Ganapathy y Volpe, 1999). Participa especialmente en períodos de crecimiento tanto en el desarrollo físico como sexual, así como en el adecuado mantenimiento del sistema inmune (Salgueiro y col., 2000). Entre los síntomas de carencia se encuentran trastornos en la cicatrización, lesiones cutáneas, hipogeusia e hiposmia. También es importante resaltar los retrasos en el crecimiento y trastornos del sistema inmune aumentando la susceptibilidad a infecciones con su déficit (Brown y col., 2001; Osredkar y Sustar, 2011). Las principales fuentes de zinc de origen animal en los alimentos son la carne, aves, pescado y mariscos, mientras que las de origen vegetal son los granos enteros, legumbres y frutos secos, pero al igual que sucede con otros minerales, su absorción se ve afectada por la presencia de otros compuestos antinutritivos de la dieta, como son los fitatos (Larrison y col., 1996; Brown y col., 2001).

Tabla 1. Cantidades diarias recomendadas (CDR) de algunos minerales

Edad	Na (g/d)	K (g/d)	P (mg/d)	Ca (mg/d)	Zn (mg/d)	Fe (mg/d)
Bebes						
0-6 meses	0,12*	0,4*	100*	210*	2*	0,27*
7-12 meses	0,37*	0,7*	275*	270*	3*	11
Niños						
1-3 años	1,0*	3,0*	460	500	3	7
4-8 años	1,2*	3,8*	500	800	5	10
Hombres						
9-13 años	1,5*	4,5*	1250	1300	8	8
14 -18 años	1,5*	4,7*	1250	1300	11	11
19-30 años	1,5*	4,7*	700	1000	11	8
31-50 años	1,5*	4,7*	700	1000	11	8
51 -70 años	1,3*	4,7*	700	1200	11	8
mayor 70	1,2*	4,7*	700	1200	11	8
Mujeres						
9-13 años	1,5*	4,5*	1250	1300	8	8
14 -18 años	1,5*	4,7*	1250	1300	9	15
19-30 años	1,5*	4,7*	700	1000	8	18
31-50 años	1,5*	4,7*	700	1000	8	18
51 -70 años	1,3*	4,7*	700	1200	8	8
mayor 70	1,2*	4,7*	700	1200	8	8

Fuente: NAS, 2004.

NOTA: esta tabla presenta las cantidades diarias recomendadas (CDR), o en su defecto las ingestas adecuadas (IA*). Una CDR es el promedio de la ingesta alimentaria diaria, suficiente para satisfacer los requerimientos nutricionales de casi la totalidad (97-98%) de los individuos sanos en un grupo. Se calcula a partir de un requerimiento promedio estimado (RPE). Si no existe suficiente evidencia científica para establecer un RPE, y así calcular una CDR, se utiliza una IA. Para los lactantes sanos, una IA es una ingesta media. La IA para otros grupos se estima para cubrir las necesidades de todos los individuos sanos, pero la falta de datos impide que se pueda especificar con seguridad el porcentaje de personas cubiertas por este consumo.

1.4.5 Fortificación con minerales de productos de origen vegetal

Con el mantenimiento de una dieta equilibrada y en personas sanas, los requerimientos de minerales deberían verse satisfechos, aunque esto no siempre es así. Es importante tener en cuenta que durante los procesos de absorción, transporte y metabolismo de los minerales, éstos interactúan con otros componentes de los alimentos de la dieta, pudiendo verse afectada su absorción, resultando en una disminución o incremento de su biodisponibilidad (Hallberg, 1981). Además, el procesamiento de los alimentos tiene cierto impacto en la calidad nutricional de éste. Un claro ejemplo son los granos de los cereales que son sometidos a la molienda convencional obteniendo harinas refinadas. Durante este proceso se elimina el salvado y el germen y junto con ellos una importante cantidad de minerales, proteínas, lípidos y sustancias biológicamente activas, haciéndolos así menos nutritivos a cambio de hacerlos más fácilmente digeribles y menos proclives al deterioro durante su almacenamiento (Miller y col., 2002; Hemery y col., 2011). Esto hace necesario en ocasiones la fortificación de los productos elaborados con estas harinas. La fortificación es una práctica en el procesamiento de alimentos que se puede utilizar como estrategia para el control de la carencia de alguno/s nutriente/s ajustando el contenido en éste/éstos en el producto final procesado, equiparándolo/s a los niveles encontrados antes del proceso. Para definir este tipo de alimentos se utilizan indistintamente los términos enriquecimiento o fortificación y dentro de los alimentos funcionales se encuentran incluidos en el grupo de alimentos modificados. Concretamente, la fortificación se define como la adición de uno o más nutrientes a un alimento con el fin de mejorar su calidad para las personas que lo consumen, con el fin de reducir o controlar una carencia de nutrientes (FAO, 2006). Los alimentos usados como transportador o *carrier* para estos minerales deben reunir ciertos requisitos, siendo el principal el ser ampliamente consumidos por los grupos de riesgo (Boccio y Monteiro, 2004). Los alimentos más utilizados para vehicular minerales como calcio, hierro y zinc son

principalmente cereales y productos lácteos, ya que son de amplio consumo por parte de la población.

La fortificación tiene algunas desventajas, como por ejemplo el crear modificaciones en las características sensoriales no deseables en el alimento fortificado. Otro problema que se presenta en ocasiones es la posibilidad de que tenga lugar la oxidación catalítica de grasas, vitaminas y aminoácidos por la fortificación con hierro (Hurrell y col., 1999; Salgueiro y col., 2000). De ahí la importancia en la selección de los componentes adecuados para fortificar, como también de la matriz alimentaria que se va a fortificar. De todos modos la fortificación es tan sólo un aspecto de una de las posibles estrategias para incrementar el aporte en minerales, siendo necesario barajar otras medidas como sería la inclusión de alimentos más nutritivos en si, como por ejemplo el uso de harinas integrales de cereales o pseudocereales más nutritivas para la elaboración de alimentos, pero con menor contenido en sustancias antinutritivas, como son los fitatos. Esto permitiría hacer más biodisponibles los minerales propios del alimento, aprovechando al máximo su calidad nutricional original.

2. COMPONENTES ANTINUTRITIVOS: ÁCIDO FÍTICO Y FITATOS

2.1 Fuentes y consumo

El ácido fítico es un ácido orgánico ampliamente extendido en sistemas naturales, especialmente en plantas (Reddy y col., 1989). La correcta descripción química según la IUPAC-IUB es ácido 1,2,3,4,5,6 hexakis dihidrógeno fosfato de *mio*-inositol (InsP_6). Está formado por un polialcohol cíclico de seis átomos de carbono, llamado *mio*-inositol, donde cada residuo alcohol está fosforilado (Figura 1). La molécula de ácido fítico posee 12 protones de los cuales 6 de ellos se

encuentran fuertemente disociados (pKs 1.1 a 2.1) y los 6 restantes débilmente disociados (pKs 4.6 a 10.0) (Evans y Pierce, 1982; Nolan y col., 1987). Es precisamente la disociación de estos protones ionizables, la que otorga al fitato la capacidad de formar complejos muy estables y unirse a moléculas cargadas positivamente como cationes o proteínas. La interacción con las proteínas es pH dependiente, mientras que la interacción con minerales es debida exclusivamente a sus numerosos grupos fosfato: éstos pueden unirse bien a un sólo grupo fosfato, a dos grupos fosfato de una misma molécula o a grupos fosfato de distintas moléculas de ácido fítico (Figura 1) (Thompson,1987; Lott y col.,1995). El grado de interacción entre el ácido fítico y las proteínas es dependiente de la carga neta de la proteína, de su conformación y de las interacciones con minerales a un pH determinado (Thompson,1987; 1993; Dua y col., 1996). A bajo pH, por debajo del punto isoeléctrico de las proteínas, éstas se encuentran cargadas positivamente y el ácido fítico negativamente. En estas condiciones, se produce una fuerte interacción electrostática entre grupos amino terminal de las proteínas, y ésteres fosfato aniónicos del fitato, formándose un complejo binario (Cheryan, 1980; Thompson, 1987) (Figura 1). A pH intermedio, por encima del punto isoeléctrico de las proteínas, dado que la carga de las proteínas al igual que la del ácido fítico es negativa, su interacción sería imposible, sin embargo se produce a través de la formación de un complejo ternario con cationes divalentes como el Ca^{2+} o el Mg^{2+} (Figura 1).

El ácido fítico se sintetiza durante el desarrollo de la semilla actuando como reserva de fósforo, cationes y energía en las plantas para su crecimiento y fisiología antes y durante la germinación (Reddy y col., 1989; Torre y col., 1991). Los fitatos se encuentran en concentraciones entre 0.1 y 6% dependiendo de la parte de la planta que se considere. En los granos de cereales, pseudocereales, leguminosas, oleaginosas o frutos secos los niveles son elevados, representando el

60-90% del fósforo total (Loewus, 2001). En tubérculos, raíces y frutas sus niveles son moderados y bajos en verduras (Ravindran y col., 1994).

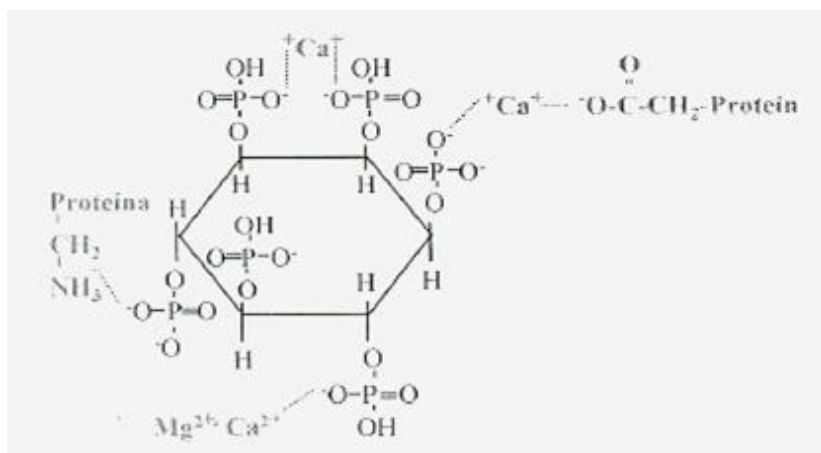


Figura 1. Estructura química de fitatos e interacción con proteínas y minerales (Thompson, 1987)

Los granos de cereales varían en forma y tamaño, pero mantienen una estructura semejante. Éstos presentan tres grandes partes: i. el pericarpio o parte externa y la testa; ii. el embrión o germen, que se encuentra en uno de los extremos de la cara dorsal del grano, rico en lípidos, proteínas y minerales y por último iii. el endospermo o parte más interna compuesto principalmente por almidón y proteínas, donde se incluye la capa de aleurona rica en proteínas de alto valor biológico. Rodeando al germen y endospermo se encuentra el pericarpio formado a su vez por diversas capas desde el interior al exterior. El salvado (pericarpio, testa y aleurona) y el germen son las fracciones eliminadas en el proceso de la molienda convencional de los granos de los cereales y son éstos los que contienen la mayor parte de las sustancias que desempeñan un importante papel tanto nutricional como funcional (Slavin, 2004; Hemery y col., 2011).

La localización del ácido fítico en las semillas varía. En los granos enteros de cereales, el ácido fítico se encuentra principalmente en el germen y el salvado. Más concretamente en las fracciones del salvado correspondientes a la aleurona, testa y también en el pericarpio. Sin embargo, en otros alimentos de origen vegetal como leguminosas, oleaginosas y frutos secos difiere en posición. En las leguminosas y oleaginosas se hallan localizadas en el interior de los corpúsculos de proteínas de las células del cotiledón del germen, mientras que en el caso de algunas semillas, como las de lino lo hace preferentemente en el endospermo (Oberleas y Harland, 1986; Reddy y col., 1989; Pallauf y Rimbach, 1997;). Las leguminosas y los granos de pseudocereales contienen mayor cantidad de fitatos que los cereales de grano entero (Kumar y col., 2010). Es por eso, que en países subdesarrollados, en vías de desarrollo, como también en la población que sigue una dieta vegetariana, donde los cereales y otros alimentos de origen vegetal proporcionan la base de la dieta, la ingesta de fitatos será muy elevada. En estos casos, la ingesta diaria de fitatos podría llegar a triplicarse alcanzando un promedio de 2.000-2.600 mg en el consumo, mientras que en dietas mixtas el consumo medio de fitatos se estima en 150-1.400 mg (Ravindran y col., 1994; Kumar y col., 2010).

2.2 Aspectos negativos

La principal preocupación sobre la presencia de fitatos en la dieta es su efecto negativo sobre la absorción de minerales. En un amplio intervalo de pH tanto a pH neutro como al pH que encuentran los alimentos a su paso por el tubo digestivo, este compuesto se encuentra cargado negativamente, lo que le confiere ese extraordinario poder quelante, con gran afinidad por componentes presentes en alimentos, como minerales, proteínas y elementos traza (Cheryan, 1980; Konietzny y Greiner, 2003). Como se ha mencionado anteriormente, los cationes pueden interaccionar con el ácido fítico uniéndose a un catión dentro de un grupo fosfato sencillo o entre dos grupos fosfatos tanto sobre la misma o diferentes moléculas

(Erdman, 1979). De este modo, el InsP_6 es capaz de disminuir la biodisponibilidad de hierro, zinc, calcio, magnesio, manganeso y cobre (López y col., 2002; Konietzny y Greiner, 2003), formando complejos insolubles a pH fisiológico, impidiendo su absorción (Hallberg y col., 1989; Sandström y Sandberg, 1992; Servi y col., 2008). Muchas investigaciones han demostrado que una dieta rica en fitatos, debido a un excesivo consumo de fibra, causa deficiencia en minerales (Sandström & Sandberg, 1992; Sandberg y col., 1999; Konietzny y col., 2006), particularmente en dietas desequilibradas, en poblaciones de riesgo y poblaciones de países subdesarrollados y también en alimentación animal (Sandberg y col., 1999). En concreto, el ácido fítico tiene un alto efecto en la inhibición de la absorción del hierro en su forma no-hemo, como demuestran estudios en humanos (Sandberg y col., 1999). La absorción del hierro en su forma química hemo no puede inhibirse al no poder ser quelado. El efecto inhibitor en minerales ha sido descrito de mayor a menor en el siguiente orden: cobre>zinc>níquel>cobalto>manganeso>hierro>calcio según algunos estudios (Vohra y col., 1965; Persson y col., 1998), mientras que otras investigaciones difieren y postulan otro orden de preferencia de afinidad en la quelación de minerales: zinc> cobre>cobalto> manganeso > calcio (Maddaiah y col., 1964). Algunos estudios han demostrado que los fitatos también pueden interactuar a la vez, directa y/o indirectamente, con varios minerales de la dieta creando un efecto sinérgico que puede dar lugar a un incremento en la cantidad de fitatos precipitados (Sandberg y col., 1993) y a un cambio en el orden de afinidades (Bohn y col., 2008). En el caso del calcio y el zinc, el efecto inhibitorio de los fitatos sobre el zinc se agrava y queda potenciado en presencia de altas concentraciones de calcio en la dieta. Así, se formaría un complejo calcio-zinc-fitato altamente insoluble, impidiendo su absorción. En el caso del magnesio se ha observado el mismo efecto, potenciando la precipitación del zinc, aunque en menor medida que el calcio (Wise, 1995; Kumar y col., 2010).

En alimentación animal, el fósforo es el segundo macromineral en importancia después del calcio y es, por lo tanto, esencial para el crecimiento y metabolismo de los animales. El fósforo en forma de fitato no se encuentra biodisponible en animales monogástricos, debido a la insuficiente capacidad por parte de éstos de degradar el ácido fítico en el tracto gastrointestinal. Es por esto que los piensos para animales monogástricos, tales como aves de corral y cerdos, deben estar suplementados con fósforo inorgánico para alcanzar los requerimientos necesarios en este mineral para el correcto crecimiento y desarrollo. Este exceso de fósforo será excretado en las heces con el consiguiente efecto negativo para el medio ambiente (Bohn y col., 2008). Además, el poder quelante del ácido fítico presente en los piensos también afecta a la absorción de minerales tales como calcio, teniendo que ser suplementados incrementando así sus costes.

La ingesta de ácido fítico en la dieta además de interactuar con los minerales también afecta la absorción y la digestibilidad de las proteínas, ya que los complejos fitato-proteína formados son menos accesibles al ataque enzimático para su digestión como indican diversos estudios *in vitro* (Ravindran y col., 1995). Otro inconveniente nutricional adicional derivado de la presencia de fitatos se debe a su capacidad de inhibir diversas enzimas digestivas, como la pepsina, tripsina, quimotripsina (Deshpande y Damodaran, 1989), lipasa (Knuckles y Betschart, 1987) y amilasa (Deshpande y Cheryan, 1984; Konietzy y Greiner, 2003).

2.3 Aspectos beneficiosos

El poder quelante del ácido fítico con cationes podría presentar algunos beneficios. El ácido fítico es capaz de unirse a metales pesados tóxicos como el cadmio o el aluminio (Pallauf y Rimbach, 1997). Esto haría que estos metales pesados fuesen secuestrados y eliminados por las heces disminuyendo de este modo su absorción. Algunos autores sugieren que la capacidad del fitato para unirse al hierro podría desplazar el potencial redox de éste y mantenerlo en su

forma férrica, otorgando así una protección contra el daño oxidativo tanto en el alimento que lo contiene como en el consumidor (Graf y Eaton, 1990; Konietzny y col., 2006).

Una desfosforilación parcial del fitato en productos alimenticios no sólo disminuye el efecto negativo en la absorción de minerales, sino que a su vez genera productos de hidrólisis intermedios con actividad biológica específica en el organismo (Larsson y Sandberg, 1991). Algunos de los productos intermedios derivados del ácido fítico poseen efecto anticancerígeno, ya que están implicados en la interrupción de la transducción de la señal celular, la inhibición del ciclo celular, la mejora de la actividad de las células NK, la inhibición de la angiogénesis y la regulación del calcio intracelular (Shamsuddin y col., 1992; Shears, 1998; Maffucci y Falasca, 2001; Kumar y col., 2010).

Los fitatos previenen de complicaciones diabéticas debido a que reducen la respuesta glicémica o por la regulación de la secreción de insulina (Pallauf y Rimbach, 1997; Barker y Berggren, 1999). También afectan la utilización de los hidratos de carbono en humanos porque forma complejos con éstos con la consecuente reducción de la respuesta de glucosa en sangre, lo que resultaría en un índice glicémico menor de los alimentos que contienen fitatos. Por otro lado, se ha postulado que el ácido fítico al quelar el calcio inhibiría a su vez la amilasa pancreática, retrasando así la digestibilidad del almidón (Lee y col., 2006; Kumar y col., 2010). El consumo de cereales de grano entero y legumbres beneficiaría al enfermo diabético ayudando así a controlar los niveles de glucosa en sangre.

Estudios en animales han demostrado el posible papel de los fitatos en la prevención del desarrollo de enfermedades cardiovasculares, ya que al reducir la biodisponibilidad del zinc afecta el cociente zinc/cobre en plasma, disminuyéndolo. La reducción de este cociente podría aportar beneficios en el metabolismo del colesterol y los triglicéridos (Klevay, 1975; Persson y col., 1998). Otro posible mecanismo por el que la presencia de fitatos en la dieta podría resultar beneficioso

sobre el metabolismo del colesterol es por medio de alguno de sus productos de hidrólisis, como es el caso del difosfato de *mio*-inositol (InsP_2), al cual se le atribuye un papel inhibitor sobre la HMG-CoA reductasa, enzima implicada en la síntesis del colesterol (Klevay, 1975; Jariwalla y col., 1990; Pallauf y Rimbach., 1997).

2.4 Degradación del ácido fítico y efectos

El ser humano presenta una limitada capacidad de eliminar el ácido fítico, por lo que para producir una degradación eficaz del mismo, se hace necesario incrementar su hidrólisis en el alimento previo a su ingesta. Este efecto produce el consecuente incremento en la biodisponibilidad de fósforo presente en la molécula y de los minerales de la dieta. Además pueden verse incrementados sus productos de hidrólisis con efectos beneficiosos en la salud.

2.4.1 Estrategias de eliminación del ácido fítico

Hasta el momento se han estudiado diversas estrategias para la reducción del contenido en fitatos. Comenzando desde el cultivo de la planta, se han realizado cambios tanto en las condiciones agronómicas, optimizando el uso de fertilizantes; como mediante ingeniería genética, generando o seleccionando variedades con bajo contenido en fitatos o elevada actividad fitasa endógena (Bohn y col., 2008). Los métodos físicos de procesamiento industrial como la molienda o trituración consiguen disminuir los fitatos, pero estos tratamientos a su vez eliminan la mayor parte de los minerales, vitaminas y fibra del alimento, siendo una estrategia inadecuada desde el punto de vista de la calidad nutricional del producto final. El remojo y la germinación de las semillas o procesos como el malteado y la fermentación resultan más efectivos y los fitatos se hidrolizan por activación de las fitasas endógenas presentes en los vegetales (Türk y col., 1996; Greiner y col., 1998; Haros y col., 2001ab). Sin embargo, este enfoque resulta útil para aplicaciones de

uso doméstico, pero no parece ser un método industrial económico en la elaboración de alimentos a gran escala.

La activación de las fitasas endógenas en productos de origen vegetal durante el procesado de alimentos depende de muchos factores: tiempo, temperatura, pH, contenido en salvado (en el caso de cereales), contenido de agua, concentración de sales minerales, aditivos o tipo de proceso (Türk y Sandberg, 1992). Algunas investigaciones han intentado incrementar la hidrólisis de $InsP_6$ en productos de panadería por medio de diversas estrategias. Por un lado, intentando potenciar la actividad fitasa endógena del cereal mediante la prolongación del tiempo de fermentación en el proceso y la disminución de pH, por otro, aportando actividad fitásica exógena, incrementando la cantidad de levadura productora de fitasa como también la combinación de varios de estos procesos citados. Sin embargo, muchas de estas estrategias repercuten en la calidad del producto final y la hidrólisis de los fitatos sólo sufre un leve incremento.

2.4.2 Fermentación: proceso con masas madre

Los procesos fermentativos de alimentos abarcan una amplia gama de microorganismos, procesos enzimáticos e ingredientes para lograr una serie de características deseables en el producto final obtenido, tales como la prolongación de la vida útil del producto, mejora del sabor y textura, enriquecimiento nutricional, eliminación de anti-nutrientes y producción de sustancias implicadas en la promoción de la salud. Muchos cereales, legumbres y vegetales han sido ampliamente utilizados en la fabricación de gran variedad de productos fermentados. En concreto, el uso de masas madre o masas agrias en panificación ha sido, y sigue siendo, una práctica habitual. La fermentación con masa madre es un proceso tradicional empleado en la elaboración de productos de panadería principalmente a base de harina de trigo y de centeno. Los efectos beneficiosos que conlleva el uso de masas madre sobre la calidad del pan incluyen una mejora en el

sabor y la prolongación de la vida útil al retrasar el envejecimiento del producto final. También mejora la textura y palatabilidad debido al metabolismo de péptidos, lípidos y carbohidratos que conlleva la producción de sustancias como ácidos orgánicos, exopolisacaridos y/o enzimas (Arendt y col., 2007) durante la fermentación (Gänzle y col., 2008). En cuanto a la calidad nutricional y el valor funcional que aporta la utilización de masas madre se encuentran la disminución del índice glicémico de productos de panadería debido a su potencial para modificar la digestibilidad del almidón, al aumentarse los niveles de ácido láctico y acético durante la fermentación (Katina y col., 2005). Además, la masa madre podría mejorar aún más la biodisponibilidad de minerales durante la fermentación y a su vez producir nuevos compuestos funcionales para el organismo. Mediante el uso de las masas madre se consiguen alcanzar valores de pH cercanos al pH óptimo de la fitasa endógena de los cereales. Así se estimula la degradación de los fitatos (Fretzdorff y Brümmner, 1992; Lopez y col., 2001; Reale y col., 2004), consiguiendo disminuir el efecto negativo quelante sobre los minerales y aumentando en ocasiones el contenido de los productos de hidrólisis beneficiosos, como también de ácidos orgánicos de cadena corta propios del proceso fermentativo (López y col., 2000; 2001; Sanz-Penella y col., 2012a). Las bacterias ácido-lácticas representan la mayoría de la microbiota en una masa madre con recuentos que van desde $\sim 10^8$ a $\sim 10^9$ UFC por gramo de masa madre. Las cepas de bacterias ácido-lácticas que se encuentran comúnmente en masas madre pertenecen al género *Lactobacillus* y están representadas principalmente por las especies *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus plantarum* (Jekle y col., 2010). La relación de bacterias ácido-lácticas:levaduras es normalmente de 100 a 1 (De Vuyst y Neysens, 2005). Las levaduras generalmente muestran una baja actividad fitasa propia y además, en el caso de querer elevar la actividad, las condiciones de fermentación deben favorecer la expresión de los genes correspondientes (Andlid y col., 2004). Por otro lado, las cepas de

Lactobacillus que normalmente son responsables de la fermentación de masas madre no expresan actividad fitasa. Aunque existen trabajos que muestran actividad fitasa en diversas cepas de *Lactobacillus*, en realidad se trata de actividades monofosfatasa inespecíficas, que podrían actuar sobre la degradación de fitatos, aunque en muy baja proporción (López y col., 2000; Reale y col., 2007; Haros y col., 2009). En el caso de la fermentación ácido-láctica mediada por cepas del género *Lactobacillus*, si ésta reduce significativamente el contenido en fitatos en alimentos de grano entero y otros de origen vegetal, se debe principalmente a la activación de la fitasa endógena vegetal a consecuencia de la disminución de pH durante la fermentación (Reale y col., 2007). Sin embargo, la desfosforilación del ácido fítico mediante el uso de masas madre incluyendo las cepas hasta el momento descritas, sigue sin ser lo suficientemente efectiva, manteniendo en el alimento un nivel de fitatos que sigue comprometiendo la biodisponibilidad mineral, especialmente para el hierro. Es por esto que el modo más frecuente y efectivo para eliminar los fitatos es la adición de una fitasa exógena.

2.4.3 Fitasas

El término fitasa (*mio*-inositol 1,2,3,4,5,6 hexakisfosfato fosfohidrolasa) se define como una clase de fosfatasa con la capacidad de hidrolizar el ácido fítico (InsP_6) a ésteres de fosfato de *mio*-inositol de menor grado de fosforilación y fosfato inorgánico (Pi) (Bohn y col., 2008; Greiner y col., 2006; Frontela y col., 2008). La actividad fitasa se mide en unidades fitasa (U) y se definió como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μg de fósforo inorgánico por minuto a un pH de 5,5 y una temperatura de 50°C (Sanz-Penella y col., 2012b).

2.4.3.1 Tipos de fitasas

Diversas investigaciones sobre el empleo de fitasas exógenas sobre la hidrólisis de fitatos, tanto en alimentación animal como humana, han demostrado el posible potencial de estos enzimas para mejorar la biodisponibilidad mineral.

Existen diferentes criterios para la clasificación de las fitasas. Si nos basamos en el mecanismo catalítico que éstas posean pueden ser referidas al grupo de las histidín-fosfatasas ácidas, *β-propeller* fosfatasas, cistein-fosfatasas o *purple-acid* fosfatasas. En función de su pH óptimo se pueden dividir en fitasas ácidas o alcalinas. Teniendo en cuenta el carbono del anillo de *mio*-inositol donde se inicia la desfosforilación, se clasifican en 3-fitasas (EC 3.1.3.8), 5-fitasas (EC 3.1.3.72) y 6-fitasas (EC 3.1.3.26). Aunque el más común es por su origen y éstas pueden ser de origen vegetal, animal o microbiano. Dependiendo también de la procedencia de la enzima, la temperatura óptima para la hidrólisis del fitato varía dentro de un rango de 35 a 80°C. Generalmente, las fitasas vegetales muestran actividades óptimas máximas a temperaturas inferiores y también el rango de pH en el que son activas resulta más estrecho si se comparan con las fitasas de origen microbiano. La mayor estabilidad térmica a temperaturas más elevadas junto con el rango de pH de acción mayor hace que las fitasas de origen microbiano sean la opción más favorable y atractiva para ser aplicadas a procesos industriales en la elaboración de alimentos (Bohn y col., 2008; Greiner y Konietzny, 2006).

De las fitasas existentes en el mercado, las procedentes de hongos del género *Aspergillus* son las que más frecuentemente han sido utilizadas debido a que se producen en mayor cantidad (Hurrell y col., 2003), especialmente las de cepas de *Aspergillus niger*. Aunque la mayoría de las fitasas conocidas previamente fueron aisladas de *Aspergillus* existen también en otras especies de la clase ascomicetos, basidiomicetos y de levaduras, lo que sugiere que las fitasas están ampliamente distribuidos en el reino de los hongos (Lassen col., 2001; Quan y col., 2002). Dentro del mercado de enzimas para alimentación animal, las fitasas representan el 60-70%, constituyendo la categoría más importante. La primera fitasa comercial fue una histidín-fosfatasa ácida de *Aspergillus niger* (NaturphosTM, BASF) introducida en 1991 (Bohn y col., 2008). Actualmente el mercado de las fitasas tiene un valor aproximado de 150 millones de euros (Greiner

y Konietzny., 2006). En la Tabla 2 se muestran los principales preparados de fitasas autorizados para su utilización en piensos en la Unión Europea.

Tabla 2. Principales fitasas autorizadas en la UE como aditivos para piensos

Compañía	Nombre Comercial	Origen de la enzima	Cepa productora
BASF	Natuphos	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
AB Enzymes	Finase	<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Trichoderma reesei</i>
Novozymes	Bio-Feed Phytase	<i>Peniophora lycii</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
Danisco Nutrition	Animal Phyzyme	<i>Escherichia coli</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>

El empleo de fitasas de origen microbiano, está actualmente autorizado en alimentación animal en diversos reglamentos de la Comisión Europea. Fitasas procedentes de *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Aspergillus niger* NCIM 563 están aprobadas incluso para su uso en alimentación humana en algunos países, entre los que no se incluye España, además de estar reconocidas por la FDA como seguro para el hombre (Frontela y col., 2008). Aunque muchas fitasas de diversas especies de *Aspergillus*, *Pichia* y *Bacillus* se han expresado mediante la utilización de diferentes plantas transgénicas como tabaco, alfalfa y patata (George y col., 2005; Wang y col., 2007; Bohn y col., 2008), los huéspedes escogidos para su expresión y producción industrial son generalmente otros microorganismos.

Las fitasas comerciales son incluidas prácticamente en la elaboración de todos los piensos para alimentación de animales monogástricos, principalmente

aves y cerdos (Nahm, 2002; Wang y col., 2007; Askelson y col., 2014;), como también en acuicultura (Cao y col., 2007). Su uso ha mostrado una mejora en la biodisponibilidad mineral, de elementos traza y de proteínas, además de la consecuente reducción del deterioro ambiental asociada a la contaminación causada por fosfato.

Como ya hemos comentado con anterioridad, el uso de las fitasas exógenas en alimentación humana no está autorizado en la mayoría de países. Sin embargo, se han realizado numerosos estudios sobre la adición de estas enzimas en alimentos para consumo humano a nivel experimental. La aplicación de fitasas durante el proceso de elaboración de alimentos se ha descrito para panificación, producción de aislados de proteínas vegetales, cereales infantiles, molienda húmeda de maíz y en el fraccionamiento del salvado de cereales (Haros y col., 2001ab; Greiner y Konietzny., 2006; Sanz-Penella y col., 2012b). Otro enfoque diferente para conseguir una mejora en la degradación del ácido fítico en los alimentos es el uso de microorganismos GRAS/QPS (*Generally Regarded as Safe/Qualified Presumption of Safety*), seguros para el consumo humano, como por ejemplo levaduras o lactobacilos, en procesos de fermentación. Sin embargo, tanto la mayoría de las levaduras (Olstorpe y col., 2009) como los lactobacilos poseen baja actividad fitásica o carecen de ella. Por otro lado, se ha descubierto que ciertas especies de bifidobacterias poseen actividad fitasa (Haros y col., 2005; 2007). Sin embargo, esta actividad es aún insuficiente y el efecto en la reducción de fitatos de bifidobacterias incluidas en procesos de fermentación, aunque evidente, es todavía moderado (Sanz-Penella y col., 2009; 2012a). Esto hace que se puedan plantear nuevas estrategias dentro de la ingeniería genética, destinadas a la obtención de nuevas cepas productoras de mayor actividad fitásica para su uso en fermentaciones de alimentos.

2.4.3.2 Fitasas de bifidobacterias

Las bifidobacterias son bacterias Gram-positivas, anaeróbicas estrictas, de metabolismo fermentativo. Se conocen unas 32 especies de bifidobacterias de las cuales las más relevantes son *Bifidobacterium adolescentis*, *B. angulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. breve*, *B. longum* y *B. animalis* (Charteris y col., 1997). Suelen encontrarse como miembros de la microbiota intestinal tanto de los seres humanos como de animales, disminuyendo su cantidad con la edad (Mattö y col., 2004; Kim y col., 2005). Son capaces de fermentar lactosa sin la presencia de oxígeno, obteniendo como resultado ácido acético y láctico. En consecuencia esta capacidad de digerir la lactosa, disminuiría los síntomas asociados a su intolerancia. Entre otros de los efectos que se les atribuyen, están la regulación del tiempo del tránsito intestinal, combatiendo de esta forma el estreñimiento. También mejoran el equilibrio de la microbiota intestinal, previenen de infecciones por bacterias patógenas y en general, aumentan las defensas inmunitarias del organismo. También son productores de diversas vitaminas en concreto del grupo B, como por ejemplo las vitaminas B₁, B₂, B₆, B₁₂ como también la B₃, también conocida por ácido nicotínico y B₉ o ácido fólico (Tamura, 1983; Tomasik y Tomasik, 2003). Por toda esa serie de beneficios algunas cepas de bifidobacterias han sido ampliamente utilizadas como probióticos.

Haros y col. (2005; 2007) encontraron actividad fitasa en cepas específicas del género *Bifidobacterium* y recientemente se han aislado y caracterizado las fitasas de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 y *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC15697 (Tamayo-Ramos y col., 2012). Los genes de las fitasas fueron identificados y las enzimas purificadas. Éstas pertenecen a una nueva subclase dentro de las histidín-fosfatasa ácidas, presentan motivos característicos en su secuencia de aminoácidos y poseen una alta especificidad por el ácido fítico, además de tener la peculiaridad de dar lugar a la acumulación de trifosfato de *myo*-inositol (InsP₃) como el producto final de la hidrólisis. Su termoestabilidad es alta,

presentando ambas una actividad máxima a pH 5.5 y 50 °C (Tamayo-Ramos y col., 2012). Representan a las primeras fitasas caracterizadas de este grupo de microorganismos probióticos, abriendo las posibilidades para su utilización en el procesamiento de alimentos ricos en fitatos, sugiriendo su posible uso en la elaboración de productos fermentados. En concreto la cepa *B. pseudocatenulatum* ATCC 27919 se ha empleado en la elaboración de productos de panadería realizados a base de grano entero. Debido a que estas fitasas son producidas por cepas de bifidobacterias, las cuales son microorganismos GRAS/QPS, no modificados genéticamente, existe la posibilidad de su utilización en alimentación humana.

Las cepa de *B. pseudocatenulatum* productora de fitasa fue estudiada para validar su uso como iniciador panario en la elaboración de pan integral con masa madre (Sanz-Penella y col., 2012a). En este estudio se compararon masas madres de harina integral adicionadas a la formulación de pan integral en diferentes proporciones (5%, 10%, 15% y 20%) y se compararon con muestras control (sin masa madre y/o masa madre acidificada químicamente en presencia de antibióticos como control ácido). En esta investigación se demostró que la masa madre inoculada con bifidobacterias incrementaba significativamente el contenido de ácidos orgánicos, tanto en la masa como en el producto final. La bifidobacteria contribuyó al proceso fermentativo, incrementando la hidrólisis de fitatos por activación de la fitasa endógena de los cereales y además aportando su propia actividad fitasa (Sanz Penella y col., 2012a). El contenido de fitatos descendió significativamente desde un valor de 7,62 a 1,45 $\mu\text{mol/g}$ de pan.

También se utilizaron bifidobacterias productoras de fitasa adicionadas conjuntamente (*B. longum* subsp. *infantis* y *B. pseudocatenulatum*) en la elaboración de pan integral y pan semi-integral por un método directo (Sanz-Penella y col., 2009). En este estudio el recuento de microorganismos viables tras la inoculación de la masa con bifidobacterias durante el amasado se incrementó

desde 10^4 UFC/g (muestra control sin inóculo) hasta 10^7 UFC/g, acidificándola. Se demostró así que las cepas pudieron adaptarse al entorno de la masa y ser metabólicamente activas fermentando las fuentes de hidratos de carbono, como maltosa y maltodextrinas, que se encuentran en la harina, aunque las masas panarias no fueran el hábitat natural de las bifidobacterias. La presencia de las bifidobacterias productoras de fitasa durante el proceso de fermentación provocó una disminución significativa del contenido de fitatos de aproximadamente 44% en el pan integral y de 67% en la muestra elaborada con 50% de harina integral (Sanz-Penella y col., 2009). Previamente y desde un punto de vista tecnológico, Palacios y col. (2006; 2008a; 2008b) validaron el uso de bifidobacterias de distinto origen en procesos panarios. En estas investigaciones se comprobó un proceso adaptativo de las cepas a la masa, reduciendo el contenido en fitatos, aunque fue debido principalmente a la activación de la fitasa endógena del cereal (Palacios y col., 2008b).

En otras investigaciones las fitasas de bifidobacterias purificadas se introdujeron en procesos de elaboración de alimentos a base de cereales. En uno de los estudios las fitasas se utilizaron en la preparación de cereales infantiles para papillas. La solubilidad de los minerales calcio y hierro no se vio afectada, incluso en la muestra control sin adición de la fitasa, debido al proceso de fortificación que usualmente experimentan estas papillas infantiles. Sin embargo, en el caso del zinc, el tratamiento con las fitasas de bifidobacterias consiguió un aumento de hasta un 30% en la solubilidad de este mineral lo que redundará en su biodisponibilidad (Sanz-Penella y col., 2012b). La utilización de fitasas de *B. longum* subsp. *infantis* y *B. pseudocatenulatum* también se investigaron en la elaboración de pan con harina integral de quinoa. El tratamiento enzimático de *B. pseudocatenulatum* fue más efectivo reduciendo drásticamente la concentración de fitatos en las formulaciones estudiadas, hasta alcanzar valores muy por debajo de los valores umbrales de inhibición de la absorción mineral (Iglesias-Puig y col., 2015).

3. RELACIONES MOLARES FITATO/MINERAL Y PREDICCIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD DE MINERALES

Como se ha mencionado a lo largo del documento, la biodisponibilidad de los minerales ingeridos en la dieta se ve influenciada por la presencia de otras sustancias ingeridas conjuntamente en el resto de alimentos. Como se ha descrito, los fitatos actúan como inhibidores de la absorción de minerales y tienen efectos adversos sobre su biodisponibilidad, debido a la formación de complejos insolubles (Sandström y Sandberg, 1992). Los minerales en cereales y legumbres forman complejos insolubles con el ácido fítico en el tracto gastrointestinal y no pueden ser biodisponibles a menos que se hidrolice el ácido fítico a productos de hidrólisis de menor grado de fosforilación. La solubilidad de los nutrientes en el entorno gastrointestinal (o bioaccesibilidad) es un requisito para la absorción por los enterocitos en el intestino. En este sentido, se asume que las ingestas predichas que se derivan de las CDR para los minerales en los alimentos de origen vegetal con elevado contenido en ácido fítico están sobreestimadas debido a la presencia de fitatos (Sanz-Penella y col., 2013). Pequeñas cantidades de fitatos pueden comprometer seriamente la biodisponibilidad de minerales. A modo de ejemplo, un estudio realizado por Sandberg y col. (1996) avala que a partir de valores superiores a 0,135 μmoles de InsP_6/g de pan fortificado (expresado en base seca), comienza la inhibición de la absorción de hierro en los seres humanos (Sandberg y col., 1996).

Existe una metodología descrita en la bibliografía que permite predecir la biodisponibilidad mineral mediante una medición sencilla de la relación molar entre el contenido de fitatos y el contenido del mineral en cuestión en la matriz alimentaria (Morris y Ellis, 1985). Fordyce y col. (1987) propusieron el uso de la proporción molar fitato/mineral como un predictor significativo de la

biodisponibilidad mineral, puesto que es una propiedad dinámica que depende tanto de la cantidad y fuente del mineral incluida en la dieta, como de las interacciones de éstos con otros componentes del alimento. De este modo, los ratios molares $\text{InsP}_6/\text{mineral}$ pueden ser utilizados para predecir y estimar los efectos inhibidores en la absorción de calcio, zinc, o hierro (Hurrell y col., 1992; 2003; Ma y col., 2005), y en este sentido se han establecido una serie de valores que representan los umbrales críticos a partir de los cuales comienza la inhibición. Concretamente, en el caso del calcio sería una relación molar fitato/calcio mayor de 0,24 (Morris y Ellis, 1985), en el caso del hierro mayor de 1,0 (Hallberg y col., 1989), siendo preferibles valores por debajo de 0,4 (Hurrell y col., 2004) y por último en el caso del zinc una relación molar mayor de 15 (Turnlund y col., 1984; Sandberg y col., 1987; Morris y Ellis, 1989) significaría el comienzo en la afectación de la biodisponibilidad. Además, en el caso del zinc, su absorción podría verse aun particularmente reducida y situarse por debajo del 50% cuando el valor de esa relación molar fitato/zinc aún se sitúa por encima de 5,0 (Ma y col., 2005). También resulta interesante resaltar, como se ha comentado con anterioridad, que el fitato también puede interactuar a la vez, directa e indirectamente con varios minerales de la dieta. Debido a un efecto sinérgico existente entre el fitato y los cationes a los que se une, el efecto que provoca el segundo catión ligado puede provocar un incremento en la cantidad de los fitatos precipitados (Sandberg y col., 1993). Este es el caso del calcio y el zinc. El efecto inhibitorio de los fitatos sobre el zinc se enfatiza en presencia de calcio. Se formaría un complejo calcio-zinc-fitato altamente insoluble, impidiendo así su absorción. Es por eso que se recomienda además tener en cuenta relaciones molares para el zinc que contemplen la presencia del calcio en la matriz alimentaria. Relaciones molares de fitato x calcio/zinc mayores de 150-200 comenzarían a afectar la absorción de este mineral (Davies y col., 1985; Bindra y col., 1986).

Bibliografía

- ADA. (2008). Position of the American Dietetic Association: Health Implications of Dietary Fiber. *J Am Diet Assoc*, **108**:1716-1731.
- Aggett, P.J., Antoine, J.M., Asp N.G., Bellisle, F., Contor, L., Cummings, J.H., Howlett, J., Müller, D.J., Persin, C., Pijls, L.T., Rechkemmer, G., Tuijelaars, S., & Verhagen, H. (2005). PASSCLAIM: consensus on criteria. *Eur J Nutr*, **44**:5-30.
- Aleixandre, A., & Miguel, M. (2008). Dietary fiber in the Prevention and Treatment of Metabolic Syndrome: A Review. *Crit Rev Food Sci*, **48**:905-912.
- Andlid, T.A., Veide, J., & Sandberg, A.S. (2004). Metabolism of extracellular inositol hexaphosphate (phytate) by *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol*, **97**:157-169.
- Arai, S. (2002). Global view on functional foods: Asian perspectives. *Br J Nutr*, **88**:139-143.
- Arendt, E.K., Ryan, L.A.M., & Dal Bello, F. (2007). Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiol*, **24**:165-174.
- Askelson, T.E., Campasino, A., Lee, J.T., & Duong, T. (2014). Evaluation of phytate-degrading *Lactobacillus* culture administration to broiler chickens. *Appl Environ Microbiol*, **80**:943-950.
- Barker, C.J., & Berggren, P.O. (1999). Inositol hexakisphosphate and beta-cell stimulus-secretion coupling. *Anticancer Res*, **19**:3737-3741.
- Bindra, G.S., Gibson, R.S., & Thompson, L.U. (1986). [Phytate]/[calcium]/[zinc] ratios in Asian immigrant lacto-ovo vegetarian diets and their relationship to zinc nutriture. *Nutr Res*, **6**:475-483.
- Boccio, J., & Monteiro, J. B. (2004). Fortificación de alimentos con hierro y zinc: pros y contras desde un punto de vista alimenticio y nutricional. *Rev Nutr Campinas*, **17**:71-78.
- Bodroza-Solarov, M., Filiociev, B., Kevresan, Z., Mandic, A., & Simurina, O. (2008). Quality of bread supplemented with popped *Amaranthus cruentus* grain. *J Food Process Eng*, **31**:602-618.
- Bohn, L., Meyer, A.S., & Rasmussen, S.K. (2008). Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *J Zhejiang Univ Sci. B*, **9**:165-191.
- Brady, P.G. (2007). Iron deficiency anemia: a call for aggressive diagnostic evaluation. *South Med J*, **100**:966-967.
- Brown, K.H., Wuehler, S.E., & Peerson, J. M. (2001). The importance of zinc in human nutrition and estimation of the global prevalence of zinc deficiency. *Food Nutr Bull*, **22**:113-125.
- Cao, L., Wang, W., Yang, C., Yang, Y., Diana, J., Yakupitiyage, A., Luo, Z., & Li, D. (2007). Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme Microb Technol*, **40**:497-507.
- CE, 2006. Reglamento (CE) No 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, **404**:9-25.

- Charteris, W.P.; Kelly, P.M.; Morelli, L; Collins, J.K. (1997). Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *Int J Food Microbiol*, **35**:1-27.
- Cheryan, M. (1980). Phytic acid interactions in food systems. *Crit Rev Food Sci*, **13**:297-335.
- Davies, N.T., Carswell, A.J.P., & Mills, C.F. (1985). The effect of variation in dietary calcium intake on the phytate-zinc interaction in rats. In: Mills CF, Bremner I, Chesters JK (eds). *Trace Elements in Man and Animals*. CAB: Wallingford, UK, 456-457.
- De Vuyst, L., & Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci Technol*, **16**:43-56.
- Deen, D., & Hark, L. (2007). *The Complete Guide to Nutrition in Primary Care (249-274)*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Dendougui, F., & Schwedt, G. (2004). In vitro analysis of binding capacities of calcium to phytic acid in different food samples. *Eur Food Res and Technol*, **219**:409-415.
- Deshpande, S., & Cheryan, M. (1984). Effects of Phytic Acid, Divalent Cations, and Their Interactions on α -Amylase Activity. *J Food Sci*, **49**:516-519.
- Deshpande, S.S., & Damodaran, S. (1989). Effect of Phytate on Solubility, Activity and Conformation of Trypsin and Chymotrypsin. *J Food Sci*, **54**:695-699.
- Dipplock, A.; Agget, P.; Ashwell, M.; Borne, F.; Fern, E.; Robertfroid, M. (1999). Scientific Concepts of Functional Foods in Europe - Consensus Document Scientific Concepts of Functional Foods in Europe - Consensus Document. *Br J Nutr*, **81**:1-27.
- Dua S, Mahajan A, Mahajan A. (1996). Improvement of functional properties of rapeseed (*Brassica campestris* var. Toria) preparations by chemical modifications. *J Agr Food Chem*, **44**:706-710.
- Egli, I., Davidsson, L., Juillerat, M. A., Barclay, D., & Hurrell, R. F. (2002). The Influence of Soaking and Germination on the Phytase Activity and Phytic Acid Content of Grains and Seeds Potentially Useful for Complementary Feeding. *J Food Sci*, **67**:3484-3488.
- Erdman, J.W. (1979). Oilseed phytates: Nutritional implications. *J Am Oil Chem Soc*, **56**:736-741.
- Escudero Álvarez, E., & González, P. (2006). La fibra dietética. *Nutr Hosp*, **21**:61-72.
- Evans, W., & Pierce, A.G. (1982). Interaction of phytic acid with the metal ions, Copper (II), Cobalt (II), Iron (III), Magnesium (II), and Manganese (II). *J Food Sci*, **47**:1014-1015.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2011). FAOSTAT. <http://faostat.fao.org/>.
- Fordyce, E.J., Forbes, R.M., Robbins, K.R., & Erdman, J.W. (1987). Phytate Calcium/Zinc Molar Ratios: Are they predictive of zinc bioavailability? *J Food Sci*, **52**:440-444.
- Fretzdorff, B., & Brümmer, J.M. (1992). Reduction of phytic acid during breadmaking

of whole-meal breads. *Cereal Chem*, **69**:266–270.

Frontela, C., Haro, J. F., Ros, G., & Martínez, C. (2008). Effect of dephytinization and follow-on formula addition on in vitro iron, calcium, and zinc availability from infant cereals. *J Agr Food Chem*, **56**:3805–3811.

Ganapathy, S., & Volpe, S.L. (1999). Zinc, exercise, and thyroid hormone function. *Crit Rev Food Sci*, **39**:369–390.

Graf, E., & Eaton, J.W. (1990). Antioxidants functions of phytic acid. *Free Rad Biol Med*, **8**:61–69.

Gänzle, M.G., Loponen, J., & Gobetti, M. (2008). Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends Food Sci Technol*, **19**:513–521.

George, T.S., Simpson, R.J., Hadobas, P.A., & Richardson, A. E. (2005). Expression of a fungal phytase gene in *Nicotiana tabacum* improves phosphorus nutrition of plants grown in amended soils. *Plant Biotechnol. J*, **3**:129–140.

Giuseppe Rizzello, C., Coda, R., De Angelis, M., Di Cagno, R., Carnevali, P., & Gobetti, M. (2009). Long-term fungal inhibitory activity of water-soluble extract from *Amaranthus spp.* seeds during storage of gluten-free and wheat flour breads. *Int J Food Microbiol*, **131**:189–196.

Gråsten, S. M., Juntunen, K. S., Mättö, J., Mykkänen, O. T., El-Nezami, H., Adlercreutz, H., Poutanen, K.S., & Mykkänen, H. M. (2007). High-fiber rye bread improves bowel function in postmenopausal women but does not cause other putatively positive changes in the

metabolic activity of intestinal microbiota. *Nutr Res*, **27**:454–461.

Greiner, R., Konietzny, U., & Jany, K.-D. (1998). Purification and properties of a phytase from rye. *J Food Biochem*, **22**:143–161.

Greiner, R., & Konietzny, U. (1999). Phosphates with inhibitory effects on mineral absorption in black beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Process. Preserv*, **23**:249–261.

Greiner, R., & Konietzny, U. (2006). Phytase for food application: A review. *Food Technol. Biotechnol.* **44**:125-140

Hallberg, L. (1981). Bioavailability of dietary iron in man. *Annu Rev Nutr*, **1**:123–147.

Hallberg, L., Brune, M., & Rossander, L. (1989). Iron absorption in man: ascorbic acid and dose-dependent inhibition by phytate. *Am J Clin Nutr*, **49**:140–144.

Haros, M., Rosell, C. M., & Benedito, C. (2001a). Use of fungal phytase to improve breadmaking performance of whole wheat bread. *J Agr Food Chem*, **49**:5450–5454.

Haros, M., Rosell, C. M., & Benedito, C. (2001b). Fungal phytase as a potential breadmaking additive. *Eur Food Res Technol*, **213**: 317-322.

Haros, M., Bielecka, M., & Sanz, Y. (2005). Phytase activity as a novel metabolic feature in *Bifidobacterium*. *FEMS Microbiol Lett*, **247**:231–239.

Haros, M., Bielecka, M., Honke, J., & Sanz, Y. (2007). *Myo*-inositol hexakisphosphate degradation by *Bifidobacterium infantis*

ATCC 15697. *Int J Food Microbiol*, **117**:76–84.

Haros, M., Carlsson, N., Almgren, A., Larsson-Alminger, M., Sandberg, A.-S., & Andlid, T. (2009). Phytate degradation by human gut isolated *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 and its probiotic potential. *Int J Food Microbiol*, **135**:7–14.

Hasler, C.M. (2002). Issues and Opinions Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges — A Position Paper from the American Council on Science and Health. *J Nutr*, **132**:3772–3781.

Heath, A.L.M., & Fairweather-Tait, S.J. (2003). Health implications of iron overload: the role of diet and genotype. *Nutr Rev*, **61**:45–62.

Hemery, Y., Chaurand, M., Holopainen, U., Lampi, A.-M., Lehtinen, P., Piironen, V., Sadoudi, A., & Rouau, X. (2011). Potential of dry fractionation of wheat bran for the development of food ingredients, part I: Influence of ultra-fine grinding. *J Cereal Sci*, **53**:1–8.

Howie, B.J., & Shultz, T.D. (1985). Dietary and hormonal interrelationships among vegetarian Seventh-Day Adventists and nonvegetarian men. *Am J Clin Nutr*, **42**:127–134.

Hurrell, R.F., Juillerat, M.A., Reddy, M.B., Lynch, S.R., Dassenko, S.A., & Cook J.D (1992). Soy protein, phytate and iron absorption in man. *Am J Clin Nutr* **56**:573-578.

Hurrell, R.F, Reddy M, Cook JD (1999). Inhibition of non-haem iron absorption in

man by polyphenolic-containing beverages. *Br J Nutr*, **81**:289-295.

Hurrell, R. F. Reddy, M.B., Juillerat, M.A., & Cook J.D (2003). Degradation of phytic acid in cereal porridges improves iron absorption by human subjects. *Am J Clin Nutr*, **77**:1213-1219.

Hurrell, R.F. (2004). Phytic acid degradation as a means of improving iron absorption. *Int J Vitam Nutr Res*, **74**:445-452.

Iglesias-Puig, E., Monedero, V., & Haros, M. (2015). Bread with whole quinoa flour and bifidobacterial phytases increases dietary mineral intake and bioavailability. *LWT - Food Sci Technol*, **60**: 71–77.

IOM (Institute of Medicine). Food and Nutrition Board (2005). Dietary references intakes for Energy, Carbohydrates, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids (Macronutrients).

Isserliyska, D., Karadjov, G., & Angelov, A. (2001). Mineral composition of Bulgarian wheat bread. *Eur Food Res Technol*, **213**:244–245.

Jariwalla, R. J., Sabin, R., Lawson, S., & Herman, Z. S. (1990). Lowering of serum cholesterol and triglycerides and modulation of divalent cations by dietary phytate. *J Appl Nutr*, **42**:18–28.

Jekle, M., Houben, A., Mitzscherling, M., & Becker, T. (2010). Effects of selected lactic acid bacteria on the characteristics of amaranth sourdough. *J Sci Food Agr*, **90**:2326–2332.

Jenkins, D. J., Wesson, V., Wolever, T. M., Jenkins, A. L., Kalmusky, J., Guidici, S.,

- Csima, A., Josse, R.G., & Wong, G. S. (1988). Wholemeal versus wholegrain breads: proportion of whole or cracked grain and the glycaemic response. *Brit Med J*, **297**: 958–960.
- Katina, K., Arendt, E., Liukkonen, K.-H., Autio, K., Flander, L., & Poutanen, K. (2005). Potential of sourdough for healthier cereal products. *Trends Food Sci Technol*, **16**:104–112.
- Klevay, L.M. (1975). Coronary heart disease: the zinc/copper hypothesis. *Am J Clin Nutr*, **28**:764–774.
- Knuckles, B.E. (1988). Effect of phytate and other myo-inositol phosphate esters on lipase activity. *J Food Sci*, **53**:250–252.
- Konietzny, U., & Greiner, R. (2003). Phytic acid: Properties and determination. In: *Encyclopaedia of Food Science and Nutrition*. 2nd Edition. Caballero, B., Trugo, L. and Finglas P., Eds., pp. 4555-4563. London, UK: Elsevier. ISBN: 978-0-12-227055-0.
- Konietzny, U., Jany, K.D., & Greiner, R. (2006). Phytate - An undesirable constituent of plant-based foods? *J Ernährungsmedizin*, **8**:18–28.
- Kumar, V., Sinha, A. K., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2010). Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chem*, **120**:945–959.
- Lappi, J., Selinheimo, E., Schwab, U., Katina, K., Lehtinen, P., Mykkänen, H., Kolehmainen, M., & Poutanen, K. (2010). Sourdough fermentation of wholemeal wheat bread increases solubility of arabinoxylan and protein and decreases postprandial glucose and insulin responses. *J Cereal Sci*, **51**:152–158.
- Lassen, S. F., Breinholt, J., Østergaard, P. R., Brugger, R., Bischoff, A., Wyss, M., & Fuglsang, C. C. (2001). Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens*. *Appl Environ Microbiol*, **67**:4701–4707.
- Larsson, M., & Sandberg, A.S. (1991). Phytate reduction in bread containing oat flour, oat bran or rye bran. *J Cereal Sci*, **14**:141–149.
- Lee, S.H., Park, H.J., Chun, H.K., Cho, S.Y., Cho, S.M., & Lillehoj, H.S. (2006). Dietary phytic acid lowers the blood glucose level in diabetic KK mice. *Nutr Res*, **26**:474–479.
- Linder, M. (1988). Nutrición: aspectos bioquímicos, metabólicos y clínicos. Eds. Pamplona: UN Navarra, Eunsa. ISBN: 8431310502.
- Loewus, F.A. (2001). Biosynthesis of Phytate in Food Grains and Seeds. In *Food Phytates* CRC Press. *CRC Press*. p. 56–61
- López, H. W., Ouvry, a, Bervas, E., Guy, C., Messenger, A, Demigne, C., & Remesy, C. (2000). Strains of lactic acid bacteria isolated from sour doughs degrade phytic acid and improve calcium and magnesium solubility from whole wheat flour. *J Agr Food Chem*, **48**:2281–2285.
- López, H. W., Krespine, V., Guy, C., Messenger, a, Demigne, C., & Remesy, C. (2001). Prolonged fermentation of whole wheat sourdough reduces phytate level and increases soluble magnesium. *J Agr Food Chem*, **49**:2657–2662.
- López, H. W., Leenhardt, F., Coudray, C., & Remesy, C. (2002). Minerals and phytic acid

interactions: is it a real problem for human nutrition? *Int J Food Sci Technol*, **37**:727–739.

Lott J.N.A., Greenwood J.S., & Batten, G.D. (1995). Mechanisms and mineral nutrient storage during seed development. En: *Seed Development and Germination*. J. Kigel. G. Galili. Eds. Marcel Dekker. New York; p. 215.

Ma, G., Jin, Y., Piao, J., Kok, F., Guusje, B., & Jacobsen, E. (2005). Phytate, calcium, iron, and zinc contents and their molar ratios in foods commonly consumed in China. *J Agr Food Chem*, **53**:10285–10290.

Maddaiah, V. T., Kurnick, A. A., & Reid, B. L. (1964). Phytic acid studies. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.), **115**:391–393.

Maffucci, T., & Falasca, M. (2001). Specificity in pleckstrin homology (PH) domain membrane targeting: a role for a phosphoinositide-protein co-operative mechanism. *FEBS Lett*, **506**:173–179.

Marlett, J. A., McBurney, M. I., & Slavin, J. L. (2002). Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. *J Am Diet Assoc*, **102**:993–1000.

Marquart, L., Wiemer, K. L., Jones, J. M., & Jacob, B. (2004). Whole grains health claims in the USA and other efforts to increase whole-grain consumption. *Proc Nutr Soc*, **62**:151–160.

Mateos-Aparicio, I.; Redondo Cuenca, A.; Villanueva-Suárez, M.J.; & Zapata-Revilla, M.A. (2008). Soybean, a promising health source. *Nutr Hosp*, **23**:305-312.

Mattö, J., Malinen, E., Suihko, M.L., Alander, M., Palva, A., & Saarela, M. (2004). Genetic heterogeneity and functional properties of intestinal bifidobacteria. *J Appl Microbiol* **97**:459-470.

McIntosh, G. H., Noakes, M., Royle, P. J., & Foster, P. R. (2003). Whole-grain rye and wheat foods and markers of bowel health in overweight middle-aged men. *Am J Clin Nutr*, **77**:967–974.

Miller, G., Prakash, A., Decker, E. (2002). Whole-grain micronutrients. In: *Whole-Grain Foods in Health and Disease*. Marquart, L., Slavin, J.L. and Fulcher, R.G. Eds. St Paul, MN: Eagan Press. p. 243-258

Morris, E.R & Ellis, R. (1985). Bioavailability of dietary calcium-effect of phytate on adult men consuming nonvegetarian diets. In: Kies C. Eds. ACS Symposium Series 275: Nutritional Bioavailability of Calcium. American Chemical Society: Washington DC,USA, p. 36.

Morris, E.R., & Ellis, R. (1989). Usefulness of the dietary phytic acid/zinc molar ratio as an index of zinc bioavailability to rats and humans. *Biol Trace Elem Res* **19**:107-117.

Nahm, KH. (2002). Efficient feed nutrient utilization to reduce pollutants in poultry and swine manure. *Crit Rev Environ Sci Technol* **32**:1-16.

NAS, National Academy of Sciences. Institute of Medicine. (2004). Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes: Recommended Intakes for Individuals, vitamins, minerals and macronutrients.

Nascimento, A. C., Mota, C., Coelho, I., Gueifão, S., Santos, M., Matos, A. S.,

- Giménez, A., Lobo, M., Samman, N., & Castanheira, I. (2014). Characterisation of nutrient profile of quinoa (*Chenopodium quinoa*), amaranth (*Amaranthus caudatus*), and purple corn (*Zea mays L.*) consumed in the North of Argentina: proximates, minerals and trace elements. *Food Chem*, **148**:420–426.
- Nilsson, A. C., Ostman, E. M., Holst, J. J., & Björck, I. M. E. (2008). Including indigestible carbohydrates in the evening meal of healthy subjects improves glucose tolerance, lowers inflammatory markers, and increases satiety after a subsequent standardized breakfast. *J Nutr*, **138**:732–739.
- Nolan, K.B., Duffin, P.A., & McWeeny, D.J. (1987). Effects of phytate on mineral bioavailability. *in vitro* studies on Mg²⁺, Ca²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ (also Cd²⁺) solubilities in the presence of phytate. *J Sci Food Agr*, **40**:79–85.
- Oberleas D., Harland BF. (1986) Analytical methods for phytate. Phytic acid: chemistry and applications. In: Graf E. Eds. Minneapolis: Pilatus Press. p.77-100.
- Olstorpe, M., Schnürer, J., & Passoth, V. (2009). Screening of yeast strains for phytase activity. *FEMS Yeast Res*, **9**:478-488.
- Osredkar J, Sustar N (2011). Copper and Zinc, Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance. *J Clinic Toxicol* **S3**:001
- Oszvald, M., Tamás, C., Rakszegi, M., Tömösközi, S., Békés, F., & Tamás, L. (2009). Effects of incorporated amaranth albumins on the functional properties of wheat dough. *J Sci Food Agr*, **89**:882–889.
- Palacios, M. C., Sanz, Y., Haros, M., & Rosell, C. M. (2006). Application of Bifidobacterium strains to the breadmaking process. *Process Biochem*, **41**:2434–2440.
- Palacios, M. C., Haros, M., Sanz, Y., & Rosell, C. M. (2008a). Phytate degradation by *Bifidobacterium* on whole wheat fermentation. *European Food Res Technol*, **226**: 825–831.
- Palacios, M. C., Haros, M., Rosell, C. M., & Sanz, Y. (2008b). Selection of phytate-degrading human bifidobacteria and application in whole wheat dough fermentation. *Food Microbiol*, **25**:169–176.
- Pallauf, J., & Rimbach, G. (1997). Nutritional significance of phytic acid and phytase. *Arch für Tierernährung*, **50**:301–319.
- Persson, H., Tu, M., & Nyman, M. (1998). Binding of Cu²⁺, Zn²⁺, and Cd²⁺ to Inositol Tri-, Tetra-, Penta-, and Hexaphosphates. *J Agric Food Chem*, **46**:3194–3200.
- Porres, J.M Etcheverry, P., Miller, M., & Lei, X. (2001). Phytase and Citric Acid Supplementation in Whole-Wheat Bread Improves Phytate- phosphorus Release and Iron Dialyzability. *J Food Sci*, **66**:614–619.
- Poutanen, K., Shepherd, R., Shewry, P.R., Delcour, J.A., Björck, I.M., & Kamp, J.W. van der. (2008). Beyond whole grain: the European HEALTHGRAIN project aims at healthier cereal foods. *Cereal Food World*, **53**:32-35.
- Reddy, N.R. (2002). Occurrence, distribution, content, and dietary intake of phytate. In: Food phytates. Reddy, N.R and Sathe, S.K. Eds. Boca Raton, FL: CRC Press LLC. p.25-51. ISBN: 1-56676-867-5.

- Reglamento (CE) No 1924/2006 DEL Parlamento Europeo Y Del Consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. DOUE. 30/12/2006; **404**:9-25.
- Quan, C.S., Fan, S.D., Zhang, L.H., Wang, Y.J., & Ohta, Y. (2002). Purification and properties of a phytase from *Candida krusei* WZ-001. *J Biosci Bioeng*, **94**:419–425.
- Ravindran, V., Bryden, W.L., & Kornegay, E.T. (1995). Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poult. Avian Biol. Rev. (United Kingdom)*, **6**:125–143.
- Ravindran, V., Ravindran, G., & Sivalogan, S. (1994). Total and phytate phosphorus contents of various foods and feedstuffs of plant origin. *Food Chem*, **50**:133–136.
- Reale, A., Mannina, L., Tremonte, P., Sobolev, A. P., Succi, M., Sorrentino, E., & Coppola, R. (2004). Phytate degradation by lactic acid bacteria and yeasts during the wholemeal dough fermentation: a ³¹P NMR study. *J Agr Food Chem*, **52**:6300–6305.
- Reale, A., Konietzny, U., Coppola, R., Sorrentino, E., & Greiner, R. (2007). The importance of lactic acid bacteria for phytate degradation during cereal dough fermentation. *J Agr Food Chem*, **55**:2993–2997.
- Reddy, N.R., Harland, B.F., & P. M. (1989). Accumulation and occurrence of phytate forms in drye beans. forms in dry beans. *Faseb J*, **3**:A759.
- Roberfroid, M.B. (2002). Global view on functional foods: European perspectives. *Br J Nutr*, **88**:133–138.
- Salas-Salvadó, J., Bulló, M., Pérez-Heras, A., & Ros, E. (2006). Dietary fibre, nuts and cardiovascular diseases. *Br J Nutr*, **96**:1077–1080.
- Salgueiro, M.J., Zubillaga, M., Lysionek, A., Cremaschi, G., Goldman, C.G., Caro, R., Paoli, T., Hager, A., Weill, R., & Boccio, J. (2000). Zinc status and immune system relationship: A review. *Biol Trace Elem Res*, **76**:193–205.
- Sandberg, A.S., Andersson, H., Carlsson, N.G., & Sandström, B. (1987). Degradation products of bran phytate formed during digestion in the human small intestine: effect of extrusion cooking on digestibility. *J Nutr*, **117**:2061–2065.
- Sandberg, A. S., Larsen, T., & Sandström, B. (1993). High dietary calcium level decreases colonic phytate degradation in pigs fed a rapeseed diet. *J Nutr*, **123**:559–566.
- Sandberg, A.S., Hulthén, L.R., & Türk, M. (1996). Dietary *Aspergillus niger* phytase increases iron absorption in humans. *J Nutr*, **126**:476–480.
- Sandberg, A.S., Brune, M., Carlsson, N.G., Hallberg, L., Skoglund, E., & Rossander-Hulthén, L. (1999). Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr*, **70**:240–246.
- Sandström, B., & Sandberg, A. S. (1992). Inhibitory effects of isolated inositol phosphates on zinc absorption in humans. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis*, **6**:99–103.
- Sanz, Y & Dalmau, J. (2008). Los probióticos en el marco de la nueva normativa europea

- que regula los alimentos funcionales. *Acta Pediatr Esp*, **66**: 27-31.
- Sanz-Penella, J. M., Tamayo-Ramos, J. A., Sanz, Y., & Haros, M. (2009). Phytate reduction in bran-enriched bread by phytase-producing bifidobacteria. *J Agr Food Chem*, **57**:10239–10244.
- Sanz-Penella, J. M., Tamayo-Ramos, J. A., & Haros, M. (2012a). Application of Bifidobacteria as Starter Culture in Whole Wheat Sourdough Breadmaking. *Food Bioprocess Technol*, **5**:2370–2380.
- Sanz-Penella, J. M., Frontela, C., Ros, G., Martínez, C., Monedero, V., & Haros, M. (2012b). Application of bifidobacterial phytases in infant cereals: effect on phytate contents and mineral dialyzability. *J Agr Food Chem*, **60**:11787–11792.
- Sanz-Penella, J. M., Wronkowska, M., Soral-Smietana, M., & Haros, M. (2013). Effect of whole amaranth flour on bread properties and nutritive value. *LWT - Food Sci Technol*, **50**:679–685.
- Scheppach, W., Bartram, H. P., & Richter, F. (1995). Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. *Eur J Cancer*, **31**:1077–1080.
- Schoenlechner, R., Siebenhandl, S., & Berghofer, E. (2008). Pseudocereals. In: *Gluten-Free Cereal Products and Beverages*. Arendt, E.K and Dal Bello, F. Eds. Oxford, UK: Elsevier. p.149-190. ISBN: 978-0-12-373739-7.
- Schoenlechner, R., Drausinger, J., Ottenschlaeger, V., Jurackova, K., & Berghofer, E. (2010). Functional properties of gluten-free pasta produced from amaranth, quinoa and buckwheat. *Plant Food Hum Nutr*, **65**:339–349.
- Servi, S., Özkaya, H., & Colakoglu, A. S. (2008). Dephytinization of wheat bran by fermentation with baker's yeast, incubation with barley malt flour and autoclaving at different pH levels. *J Cereal Sci*, **48**:471–476.
- Shamsuddin, A. M., Baten, A., & Lalwani, N. D. (1992). Effects of inositol hexaphosphate on growth and differentiation in K-562 erythroleukemia cell line. *Cancer Lett*, **64**:195–202.
- Shears, S. B. (1998). The versatility of inositol phosphates as cellular signals. *BBA-Mol Cell Biol L*, **1436**:49–67.
- Slavin, J. (2004). Whole grains and human health. *Nutr Res Rev*, **17**:99-110.
- Snider, M., & Liebman, M. (1992). Calcium additives and sprouted wheat effects on phytate hydrolysis in whole wheat bread. *J Food Sci*, **57**:118–120.
- Tamayo-Ramos, J. A., Sanz-Penella, J. M., Yebra, M. J., Monedero, V., & Haros, M. (2012). Novel phytases from *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC 27919 and *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697. *Appl Environ Microbiol*, **78**:5013–5015.
- Tamura, Z. (1983). Nutriology of Bifidobacteria. *Bifidobacteria and Microflora* **2**:3-16.
- Teucher, B., Olivares, M., & Cori, H. (2004). Enhancers of iron absorption: ascorbic acid and other organic acids. *Int J Vitam Nutr Res*, **74**:403–419.

- Thompson LV (1987). Reduction of phytic acid concentration in protein isolates by acylation techniques. *J Am Oil Chem Soc*, **64**:1712-1717
- Thompson, LU. (1993). Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. *Food Res Int*, **26**:131-149.
- Tomasik, P.J., & Tomasik, P. (2003). Probiotics and prebiotics. *Cereal Chem*, **80**:113-117.
- Torre, M., Rodriguez, A.R., & Saura-Calixto, F. (1991). Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **30**:1-22.
- Türk, M., & Sandberg, A.-S. (1992). Phytate degradation during breadmaking: Effect of phytase addition. *J Cereal Sci*, **15**:281-294.
- Türk, M., Carlsson, N.G., & Sandberg, A.S. (1996). Reduction in the levels of phytate during wholemeal bread making; effect of yeast and wheat phytases. *J Cereal Sci*, **23**:257-264.
- Turnlund, J. R., King, J. C., Gong, B., Keyes, W. R., & Michel, M. C. (1984). A stable isotope study of zinc absorption in young men: effect of phytate and alpha-cellulose. *Am J Clin Nutr* **40**:1071-1077.
- Uauy, R., Hertrampf, E., & Reddy, M. (2002). Iron fortification of foods: overcoming technical and practical barriers. *J Nutr*, **132**:849-852.
- USDA. (2007). Data Source. U.S. Department of Agriculture, National Agriculture Statistics Service, grain and feed in 2007 Agricultural Statistics.
- Verschuren, P. M. (2002). Functional Foods: Scientific and Global Perspectives. *Br J Nutr*, **88**:2-126.
- Vohra, P., Gray, G. A., & Kratzer, F. H. (1965). Phytic acid-metal complexes. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.), **120**:447-449.
- Wang, Y., Gao, X., Su, Q., Wu, W., & An, L. (2007). Expression of a heat stable phytase from *Aspergillus fumigatus* in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. NC89). *Indian J. Biochem. Biophys*, **44**:26-30.
- WHO/FAO. (2006). Guidelines on food fortification with micronutrients, (ISBN:9241594012), 341.
- Wise, A. (1995). Phytate and zinc bioavailability. *Int J Food Sci Nutr*, **46**:53-63.
- Yip, I., Heber, D., & Aronson, W. (1999). Nutrition and prostate cancer. *Urol Clin North Am*, **26**:403-411.
- Zimmermann, M. B., & Hurrell, R. F. (2007). Nutritional iron deficiency. *Lancet*, **370**:511-520

OBJETIVOS

OBJETIVOS

La actividad fitasa detectada en el género *Bifidobacterium*, microorganismos GRAS/QPS (*Generally Regarded as Safe/Qualified Presumption of Safety*) ampliamente utilizados como probióticos, puede tener una importante repercusión en la mejora de la biodisponibilidad de minerales tanto en productos fermentados a base de alimentos integrales de origen vegetal como a nivel del intestino. Por tanto, el principal objetivo de este trabajo es desarrollar nuevos productos vegetales fermentados, con elevada calidad nutricional, mediante el uso de harinas integrales de cereales/pseudocereales o leguminosas empleando fitasas provenientes de bifidobacterias para promover la hidrólisis de las sustancias anti-nutritivas asociadas a estos productos. Adicionalmente, esto produciría la consiguiente generación de productos intermedios de hidrólisis que pueden presentar actividades biológicas beneficiosas.

Para conseguir este objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollar nuevos panes especiales con harina/harina integral de centeno, incrementando el valor nutricional por adición de bifidobacterias productoras de fitasa, evaluando su posibilidad de uso como iniciador panario en la elaboración de masa madre. Se estudiará su efecto sobre la degradación de fitatos, estimación de la biodisponibilidad mineral, así como el incremento del contenido de ácidos orgánicos implicados en la digestibilidad del almidón. Se evaluará la calidad tecnológica y sensorial del producto final.
2. Estudiar el efecto que produce sobre la calidad de productos de panadería la inclusión de fitasas y harinas integrales alternativas al trigo (amaranto). Los resultados se compararán con aquellos obtenidos empleando dos

controles: 100% harina y 100% harina integral de trigo. Además se evaluará el grado de hidrólisis/degradación de fitatos, incremento del contenido en fosfatos de *mio*-inositol de menor grado de fosforilación y el efecto en la biodisponibilidad mineral por inclusión de fitasas purificadas provenientes de bifidobacterias (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* y *B. pseudocatenulatum*) durante el proceso de panificación. Los resultados se compararán con aquellos obtenidos mediante la adición de una fitasa fúngica comercial. Esta investigación pretende explorar el uso de estas fitasas purificadas de microorganismos GRAS/QPS como un nuevo adyuvante para incrementar la calidad nutricional de alimentos.

3. Validar la utilización de una cepa modificada del género *Lactobacillus* en la elaboración de diversos productos fermentados de origen vegetal con alto contenido en fitatos. Se pretende manipular la cepa mediante técnicas moleculares para que exprese enzimas fitasa provenientes de bifidobacterias. Se evaluará su capacidad para hidrolizar eficientemente los fitatos en este tipo de alimentos. Esta aproximación pretende desarrollar una cepa del género *Lactobacillus* (principal género bacteriano implicado en procesos fermentativos en alimentos) con nuevas cualidades, como es la capacidad de degradar fitato y con relevancia tecnológica en aplicación de alimentos funcionales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPITULO 1

Myo-inositol hexakisphosphate degradation by *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC 27919 improves mineral availability of high fibre rye-wheat sour bread

Izaskun García-Mantrana^{a,b}

Vicente Monedero^b

Monika Haros^{a*}

Food Chemistry 2015, 178, 267-275

^aCereal Group and ^bLactic Acid bacteria and Probiotics Laboratory.

Institute of Agrochemistry and Food Technology (IATA-CSIC)

Valencia, Spain

ABSTRACT

The goal of this investigation was to develop baking products using *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919, a phytase producer, as starter in sourdough included in whole rye-wheat mixed bread. This bifidobacterial strain contributed to *myo*-inositol hexakisphosphate (phytate) hydrolysis, resulting in breads with higher mineral availability as was predicted through phytate/mineral molar ratios, which remained below the inhibitory threshold values for Ca and Zn intestinal absorption. The products with sourdough showed similar technological quality as their homologous without sourdough, being the levels of acetic and D/L lactic acids in dough and bread baking significantly higher with the use of sourdough. Overall acceptability scores showed that breads with 25% of whole rye flour were highly accepted regardless of the inclusion of sourdough. This work emphasizes that the *in situ* production of phytase during fermentation by GRAS/QPS microorganisms constitutes a strategy particularly appropriated to reduce phytate contents in products for human consumption.

KEYWORDS: whole rye flour, sourdough, phytates, phytase, *Bifidobacterium*, dietary fibre, mineral availability, dietary reference intakes.

1. Introduction

Whole grain cereal foods provide significant health benefits. Epidemiological findings indicate a protective role of whole grain foods against several diseases such as diabetes, certain cancers, cardiovascular disease and obesity, including an improved regulation of blood glucose levels (Pereira et al., 2002; McIntosh, Noakes, Royle, & Foster, 2003; Laaksonen et al., 2005). In addition to dietary fibre, whole grains are source of a wide range of vitamins, minerals and bioactive compounds such as lignans, phenolic acids, phytosterols, tocotrienols and phytic acid (Katina et al., 2005). Compared to wheat, rye is a better source of dietary fibre. Rye bran contains a remarkable amount of soluble fibre, due to its high content in soluble arabinoxylan which has prebiotic properties and also fructans which are known to be bifidogenic (Katina et al., 2005; Lappi et al., 2010). It has been shown that rye fibre consumption is more effective than wheat fibre in improvement of certain biomarkers of bowel health in human such as the reduction of faecal β -glucuronidase activity, postprandial plasma insulin and postprandial plasma, as well as increase of plasma enterolactone and faecal butyrate (Gråsten et al., 2000; McIntosh et al., 2003). In addition, whole grain rye is characterized by a well-balanced composition of macro and micronutrients. However, whole grains also contain phytic acid, an antinutrient that impairs mineral absorption (Greiner & Konietzny, 1999; López et al., 2001).

Processing is a prerequisite for consumption of whole grains and it is also important because it may modify the amount and bioavailability of nutrients and antinutrients. Sourdough is a mixture of flour and water that is fermented with lactic acid bacteria, mainly heterofermentative strains, thus producing lactic acid and acetic acid in the mixture, and hence resulting in a sour taste of the end product (Gänzle, 2014). The use of sourdough as the natural starter for bread making is one

of the oldest biotechnology processes in food fermentation. Nowadays, sourdough is largely used for the manufacture of wheat and rye breads, crackers, pizza, various sweet baked goods, and gluten-free products (Ercolini et al., 2013). Beneficial effects of sourdough fermentation on bread quality include an increased bread flavour, prolonged self life and delayed staling (Gänzle, Loponen, & Gobbetti, 2008). A sourdough fermentation process also improves texture and palatability due to peptide, lipid and carbohydrate metabolism (Gänzle et al., 2008). The production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria in sourdough improves bread volume and texture (Gänzle, 2014). Lactobacilli convert peptides (from depolymerisation of proteins/gluten) to amino acids by strain-specific intracellular peptidases, and convert amino acids to specific metabolites with impact on bread flavour (Gänzle, 2014). Their metabolism can also favour lipidoxidation during fermentation, or exert strong antioxidative effects. Chemical degradation of linoleic acid peroxide forms flavour-active aldehydes which are converted to alcohols by alcohol dehydrogenase activity of heterofermentative lactobacilli (Gänzle, 2014). Regarding nutritional quality, the use of sourdough may decrease the glycemic index, because of its potential to modify the digestibility of starch, owing to increased lactic and acetic acid levels (Katina et al., 2005). Furthermore, the sourdough could enhance the bioavailability of minerals. Microbial metabolism during sourdough fermentation may produce active compounds, such as bioactive peptides and amino acid derivatives with various functionalities, and potentially prebiotic exo-polysaccharides (Katina et al., 2005; Gänzle, 2014). As was mentioned above, in addition to many nutritional components, whole grain cereals also contain significant amounts of phytic acid (*myo*-inositol (1,2,3,4,5,6)-hexakisphosphate or $InsP_6$) or its salts (phytates), a well-known inhibitor of mineral, proteins and trace elements bioavailability. Aside from this negative effect, phytic acid is a precursor for the generation of bioactive compounds (Haros et al., 2009). The phytate hydrolysis decreases the negative

effects on mineral absorption and generates lower *myo*-inositol phosphates with potential benefits to human health. Phytases are the enzymes that catalyse this hydrolysis and several strategies exist to increase their activity. Enzymatic phytate degradation during breadmaking process depends on many factors including pH, temperature, water content, bran content, leavening agent, fermentation time, process and exogenous phytase addition (generally from microbial sources). The endogenous phytase from cereal has optimal pHs around 4.5 and therefore the use of sourdough improves the degradation of phytates, due to the decrease of pH (Fretzdorff & Brümmer, 1992; Lopez et al., 2001; Reale et al., 2004). *Lactobacillus* strains typically responsible for sourdough fermentation lack phytase activity and their phytate degrading capacity is limited and based on non-specific acid phosphatases able hydrolyse phytates at a low rate (Haros et al., 2009). However, phytase activity has been described for food-grade strains of the *Bifidobacterium* genus, which are endogenous inhabitants of the gastrointestinal tract, suggesting their utility in producing fermented cereal based products. In fact, phytase-producing bifidobacteria have been applied in both direct and indirect breadmaking processes (Sanz-Penella, Tamayo-Ramos, Sanz, & Haros, 2009; Sanz-Penella, Tamayo-Ramos, & Haros, 2012). Results showed that bifidobacterial strains presented a good adaptation to the dough ecosystem and contributed to acidification resulting in whole wheat breads with significantly lower levels of phytates (Palacios, Haros, Rosell, & Sanz, 2008). The aim in the present study was to develop whole rye-wheat mixed bread, with increased nutritional quality, by using *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 from human origin as a sourdough starter for improving phytate hydrolysis and the production of organic acids.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Commercial flours were purchased from the local market. The characteristics of wheat and whole rye flours were: moisture, $13.79\pm 0.07\%$ and $12.58\pm 0.02\%$; protein, $11.32\pm 0.09\%$ and $10.13\pm 0.02\%$ in dry basis; fat, $1.02\pm 0.06\%$ and $1.17\pm 0.12\%$ in dry basis; ash, $0.63\pm 0.01\%$ and $1.56\pm 0.01\%$ in dry basis; and phytate contents were: 1.02 ± 0.03 and 7.64 ± 0.05 $\mu\text{mol/g}$ in dry basis, respectively. Compressed yeast (*Saccharomyces cerevisiae*, Levamax, Spain) was used as starter for the breadmaking process and *B. pseudocatenulatum* ATCC 27919, originally isolated from infant faeces, was used as starter in sourdough fermentation.

2.2 Microbial growth conditions

Bifidobacteria were grown in Garcke broth in which inorganic phosphate (KH_2PO_4 and NaH_2PO_4) was replaced by 0.74 g/L phytic acid dipotassium salt (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 0.1 M of 3-[N-Morpholino] propanesulphonic acid buffer (MOPS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Haros, Bielecka, Honke, & Sanz, 2007). The medium was inoculated at 5 % (v/v) with 18-hour old cultures, previously propagated under the same conditions (AnaeroGen™, Oxoid, England) until the beginning of the stationary phase of growth (~14-18 hours). Bacterial growth was monitored by measuring optical density at 600 nm.

The inoculum was prepared by harvesting the bacterial cells by centrifugation (21,000xg, 20 min, 4 °C, SLC 1500, Sorvall Evolution), washing the pellets twice and suspending them in 0.085% NaCl solution (Sanz-Penella et al., 2009). The bacterial suspensions were used to inoculate the sourdough. Microbial counts in sourdough and dough samples were determined by plate count on selective media. In the case of bifidobacteria counts, Garcke agar was employed by using the double layer technique and a temperature of incubation of 37 °C for 48 h (Haros et al.,

2007). Yeast counts were determined in Rose Bengal Agar (Scharlau Chemie, Barcelona, Spain) after aerobic incubation at 30 °C for 72 h (Sanz-Penella et al., 2009).

2.3 Breadmaking process

Five formulations were used for making bread dough: 100% refined wheat flour, 25/75 % w/w whole rye-refined wheat flour, 50/50 % w/w whole rye-refined wheat flour, 75/25 % w/w whole rye-refined wheat flour and 100% whole rye flour. The bread dough formula consisted of one of these formulations (750g), compressed yeast (2% flour basis), sodium chloride (1.8% flour basis), tap water (up to optimum absorption). A Farinograph (Brabender, Duisburg, Germany) with a 300 g mixer was used to evaluate the impact of formulation on dough development time (time to reach maximum consistency, in min) and water absorption (water required to yield dough consistency of 500 Brabender Units, in %), following the official standard method (AACC, 2000). The ingredients were mixed for 10 min, rested for 10 min, divided into 100-g pieces, kneaded and rested again for 10 min. Doughs were manually sheeted, rolled and fermented up to the optimum volume increase at 28 °C and 85% of relative humidity. The samples were baked at 160-180 °C/ 20-30 min according to formulation and cooled at room temperature for 2 hours. The formulation samples were done in duplicate. Wheat sourdoughs without yeast inoculated with *B. pseudocatenulatum* were prepared and added in three levels to bread doughs formula for replacement of flour at 0%, 10% and 20%.

2.4 Sourdough preparation

The sourdough formulation consisted in a mixture of refined wheat flour and water (1:2, w/w) with an inoculum of 3.2×10^9 CFU of *B. pseudocatenulatum* per gram of flour. Incubation was carried out at 37 °C for 18 hours under anaerobic conditions. The control acid sourdough consisted in the same formulation and

conditions, but instead of the inclusion of the bifidobacterial strain, a mixture of antibiotics at 1% v/v (Penicillin, 50 U/ml; Streptomycin, 0.05 mg/ml; Neomycin, 0.1 mg/ml and Cycloheximide, 0.5 mg/ml from Sigma-Aldrich Steinheim, Germany) was included. The pH of this control sourdough was adjusted to the pH level reached in sourdoughs acidified with bifidobacteria by using similar proportions of lactic and acetic acid and it was included at 20% for preparation of dough for breadmaking.

2.5 pH, total titratable acidity and D/L-lactic and acetic acids determination

Sourdough, dough and bread pH was determined electrometrically during sampling. Measurements were done in triplicate using a pH meter. For determination of titratable acidity ten grams of sourdough, dough and bread were mixed and blended with 100 ml of acetone:water (5:95, v/v). Later, they were titrated against 0.1 N NaOH up to pH 8.5. The results were expressed as the volume (ml) of NaOH 0.1 N needed for titrating 10 g of sourdough, fermented dough or bread. Concentrations of D-lactic acid, L-lactic acid and acetic acid were analysed using a specific coupled enzymatic reaction (Boehringer Mannheim/R-Biopharm) measured at 340 nm (PolarStar Omega BMG Labtech, Germany). The results were expressed as μmol of D/L lactic or acetic acid per gram of sourdough, fermented dough or bread (Sanz-Penella et al., 2012).

2.6 Bread composition

2.6.1 Determination of dietary fibre

The dietary fibre content was measured by the total dietary fibre standard assay procedure from AACC (2000). One gram dried sample was subjected to sequential enzymatic digestion by heat-stable alpha-amylase, protease and amyloglucosidase. For the determination of insoluble dietary fibre, sample was filtered and the residue

was washed with 95% of ethanol and acetone and dried. Combined solutions of filtrate and water washings were precipitated with four volumes of 95% of ethanol, filtered and dried. Both soluble and insoluble dietary fibre residues were corrected for protein, ash and blank. The total dietary fibre was the weight of the filtered and dried residue minus the weight of protein and ash. The insoluble dietary fibre was the weight of the dried residue minus the weight of the protein and ash. The soluble dietary fibre was the difference of weight between total and insoluble dietary fibre.

2.6.2 Determination of *myo*-inositol phosphates

InsP₆ present in flours and the remaining InsP₆ and lower *myo*-inositol phosphates generated during the breadmaking process (InsP₅, InsP₄ and InsP₃) were purified and measured according the methodology described by Türk and Sandberg (1992), later modified by Sanz-Penella et al. (2008). *Myo*-inositol phosphates of flour and dried bread (1 g) were extracted with 0.5 M HCl (20 ml) for 3 h at 30°C. The extracts were centrifuged at 12,000xg for 10 min, then the supernatant was decanted, frozen overnight, thawed and centrifuged again at 12,000xg for 10 min. Identification of the *myo*-inositol phosphates was achieved by comparison with standards of phytic acid di-potassium salt (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Samples were analyzed in triplicate.

2.6.3 Determination of minerals

The total Fe, Ca and Zn concentrations in bread samples were determined using a flame atomic absorption spectrometer at the *Servei Central de Suport a la Investigació Experimental* from the *Universitat de València*. Previously, samples were placed in a Teflon perfluoroalkoxy (PFA) vessel and treated with 1 ml HNO₃ (14 M, Merck) and 1 ml of H₂O₂ (30 % v/v, Panreac Quimica, Spain). The Teflon PFA vessel was irradiated at 800 W (15 min at 180°C) in a microwave accelerated reaction system (MARS) from CEM (Vertex, Spain). At the end of the digestion

program, the digest was placed in a tube and made up to volume with 0.6 M HCl (Merck). Samples were analyzed in triplicate. In the calculation of dietary reference intake contribution of each mineral (% DRI contribution) was taken in account a daily average intake of 250 g of bread in wet basis following the recommendation of the World Health Organization.

2.7 Bread quality

The technological parameters analyzed were moisture (%), loaf specific volume (ml/g), width/height ratio of the central slice (cm/cm) and the texture profile analysis using the TA.XT Plus Texture Analyser (Stable Micro Systems, Godalming, United Kingdom). Samples were analyzed at least in triplicate. The colour parameters L* (lightness), a* (redness to greenness) and b* (yellowness to blueness) of crumb and crust were determinate using a digital colorimeter (Chromameter CR-400, Konika Minolta Sensing, Japan) (Sanz-Penella et al., 2009). From the colour parameters the total colour difference (ΔE^*) was calculated by the equation: $\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$. Determinations were carried out three times per sample for each baking. Digital image analysis was used to measure bread crumb structure. Images were previously squared at 240 pixels per centimetre with a flatbed scanner (HP ScanJet 4400C, Hewlett Packard, USA) supported by the HP PrecisionScan Pro 3.1 Software. Two 10 mm x 10 mm square fields of view of the central slice (10 mm thick) of each loaf were used, thereby yielding six digital images per each baking. Data was processed using Sigma Scan Pro Image Analysis Software (version 5.0.0, SPSS Inc., USA). The chosen parameters were number of cells per cm^2 and mean cell area (mm^2). Measurements were done nine times per sample per each baking (Sanz-Penella et al., 2009). Sensory analysis was carried out with the participation of 50 tasters and untrained volunteers who are usual consumers of bread. The product overall acceptability

was assessed using a hedonic scale of 9 points (Popper, Rosenstock, Schraidt, & Kroll, 2004).

2.8 Statistical analysis

Multiple sample comparison of the means and Fisher's least significant differences (LSD) were applied to establish significant statistical differences between treatments. All statistical analyses were carried out with the Statgraphics Plus 7.1 Software (Bitstream, Cambridge, MN) and differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1 Characteristics of sourdough

The characteristics of the sourdough prepared with bifidobacteria are shown in Table 1. The sourdough was inoculated with 1.3×10^9 CFU of *B. pseudocatenulatum* ATCC 27919 per gram of flour. This bacterium adapted well to the sourdough medium and bacterial counts after 18 h of incubation at 37 °C in anaerobic conditions reached 10^{11} CFU/g. Microbial examination after Gram-staining confirmed that these bacterial counts were derived from the inoculated bifidobacteria (data not shown). The cell counts (Garche medium) in control sourdoughs without inoculation and supplemented with antibiotics were only 10^4 CFU/g throughout the fermentation, excluding a contribution of microbial metabolism to any analytical parameters observed in these samples. The sourdough inoculated with bifidobacteria showed an acidification from an initial pH of 5.9 to final pH of 4.3. These final pH values reached at the end of the fermentation showed that the bifidobacteria were metabolically active and fermented the carbohydrate sources of the flour producing organic acids and increasing the TTA

from 2.0 to 5.2 ml of NaOH. The L-lactic and D-lactic acids production were 41.0 and 15.7 $\mu\text{mol/g}$, respectively, while the acetic acid production was 76.8 $\mu\text{mol/g}$. The higher values for acetic acid compared to lactic acid (molar ratio lactic/acetic of 0.73) was characteristic for the fermentative metabolism of bifidobacteria on the carbohydrates which are typically present in wheat flour (maltose and maltodextrins) (Van der Meulen, Adriany, Verbrugghe, & De Vuyst, 2006). The control acid sourdough was adjusted at 4.2 and reached a TTA of 5.4 ml of NaOH.

3.2 Characteristics of the dough

The Farinograph can be used to evaluate the flour water absorption required for reaching to defined dough consistency and for getting the dough development time. The inclusion of whole rye flour promoted the highest increase in water absorption from 60.6 % (100% refined wheat flour) to 66.3 % (100% whole rye flour), mainly due to higher amount of bran/fibre in rye flour, whereas the addition of sourdough practically did not change this parameter (data not shown). During the dough development a maximum in dough consistency was reached. The dough development time augmented with the increase in rye flour (from 4.5 to 5.9 minutes, 100 % of wheat and 100 % of rye flour, respectively). This was apparently due to the coarseness of bran, as the time to develop is longer with higher particle size. This result was also attributed to the effect of the interaction between fibres and gluten that prevents the hydration of the proteins, affecting the aggregation and disaggregation of the high molecular weight proteins in dough (Sanz Penella, Collar & Haros, 2008).

The sourdough fermented with bifidobacteria was used for making dough for breadmaking with different rye proportions and sourdough levels (Table 1). The yeast fermentation process did not produce any significant decrease in the dough pH. However, the dough volume increased during the fermentation until the

Table 1. Values of pH, TTA, concentration of organic acids and cell counts of sourdough, dough^{ab}

Formulation		Parameter						
Rye ^c %	Sour- dough ^b %	pH	TTA ^b ml NaOH	Acetic Acid μmol/g	L-lactic Acid μmol/g	D-lactic Acid μmol/g	Bacteria log CFU/g	Yeast log CFU/g
Sourdough								
0	100	4.3±0.2	5.2±0.4	76.8±1.8	41.0±2.1	15.7±0.9	10.2±0.7	4.4±0.1
Dough								
	0	6.1±0.1e	2.5±0.0a	3.2±1.1a	1.8±0.2c	1.4±0.1i	3.2±0.6a	8.2±0.2a
0	10	5.7±0.1cd	3.5±0.1b	8.8±0.5de	3.1±0.1g	1.0±0.2gh	10.4±0.3d	8.9±0.1d
	20	5.7±0.0c	4.8±0.1f	11.7±0.3g	5.2±0.1h	0.8±0.1defg	10.4±0.3d	8.8±0.1bcd
	0	6.1±0.0e	2.5±0.1a	4.3±0.8a	1.5±0.1c	1.2±0.2hi	2.9±0.2a	8.5±0.3abc
25	10	5.8±0.1cd	3.7±0.0c	8.1±0.2cd	3.0±0.2fg	0.9±0.1efg	8.5±0.7bc	9.0±0.1d
	20	5.7±0.1c	4.5±0.1e	10.5±0.3f	5.0±0.2h	0.6±0.1cdef	8.2±0.5bc	8.4±0.1a
	0	6.3±0.1f	2.5±0.1a	3.5±0.1a	1.1±0.1b	0.9±0.1fg	2.9±0.4a	8.2±0.2a
50	10	5.9±0.1d	3.6±0.1bc	7.6±0.1bc	2.6±0.1ef	0.6±0.1cdef	9.6±1.3cd	8.8±0.1bcd
	20	5.5±0.0b	4.5±0.1e	9.6±0.5ef	5.2±0.1h	0.4±0.1abc	7.9±0.1b	8.4±0.1a
	0	6.1±0.0ef	2.6±0.1a	3.8±0.1a	0.7±0.1a	0.6±0.2cde	3.7±0.7a	8.2±0.1a
75	10	5.3±0.1a	4.3±0.1de	7.5±0.1bc	2.4±0.1de	0.5±0.1bcd	8.2±1.0bc	8.5±0.3ab
	20	5.7±0.0c	4.4±0.1de	9.7±0.1ef	5.6±0.1h	0.2±0.1a	7.5±0.8b	8.1±0.1a
	0	5.8±0.0cd	4.2±0.1d	4.0±0.1a	0.5±0.1a	0.8±0.1defg	3.9±0.7a	8.2±0.1a
100	10	5.8±0.1cd	3.4±0.1b	6.7±1.0b	2.2±0.2d	0.8±0.2defg	10.1±0.1d	8.9±0.2cd
	20	5.8±0.0cd	4.2±0.1d	10.2±0.9f	5.8±0.1h	0.2±0.1ab	9.6±0.9cd	8.1±0.1a

^aMean±SD n≥3; values followed by the same letter in the same column are not significantly different at 95% confidence level. ^bTTA: total titratable acidity.

^cBread formulations Rye 0%: 100% refined wheat flour, Rye 25%: 25% whole rye flour/75% refined wheat flour, Rye 50%: 50% whole rye flour/50% refined wheat flour, Rye 75%: 75% whole rye flour/25% refined wheat flour and Rye 100%: 100% whole rye flour, sourdough 0%, 10% and 20%: formulations dough with 0%, 10% and 20% of sourdough inoculated with bifidobacteria, respectively.

optimal volume was reached, being significantly influenced by the addition of whole rye flour and the inclusion of sourdough (data not shown).

The inclusion of sourdough to the formulation significantly increased the bacterial counts, which ranged from 2.9 to 10.4 log CFU/g, while the yeast counts remained constant. As expected, pH values decreased whereas TTA values showed a significant increase with the raise in the proportion of sourdough. However, the inclusion of the whole rye flour did not have a significant effect in any of these parameters. In general, with the increase in flour extraction rate, a TTA increase and greater buffering effect on dough system is found. This results in an initial high pH with only a slight decrease in pH over the fermentation time. The increase of sourdough proportion in the formulations mainly affected the acidic properties of the bread dough due to production of organic acids. Data showed a constant and significant increase of acetic and L-lactic acid with the increase of sourdough proportion, whereas the D-lactic acid content decreased when raising the proportion of sourdough. Sanz-Penella et al. (2012) reported a similar behaviour when the same bifidobacterial strain was inoculated in doughs made with whole wheat flour. The molar ratio between lactic and acetic acids ranged from 0.25 and 0.61 in all the formulations with sourdough inoculated with bifidobacteria. These values were still typical according to sugar catabolism of bifidobacteria, which varies depending on the strain, the type of soluble sugars and the processing conditions (Sanz-Penella et al., 2012).

3.3 Evaluation of bread

pH and TTA evolution followed the same trend in bread and sourdough. The pH value of bread was modified with the addition of sourdough from 5.8-6.2 to 5.5-5.8, whereas the TTA values increased ranging from to 2.0-3.5 to 2.7-4.8 ml of NaOH depending on the whole rye proportion in formulation. These results are comparable with those reported in the literature for breads made with sourdough

inoculated with lactobacilli and can vary over a wide range, depending not only on the strain, but on the variety of cereal used (Katina et al., 2005; Liukkonen et al., 2003).

During the bread baking step there was a weight loss mainly due to water evaporation followed by organic acid loss due to volatilisation. The residual amount of acetic acid after baking was 2.8-3.8 $\mu\text{mol/g}$ of bread for samples without sourdough and 4.9-5.9 $\mu\text{mol/g}$ of bread for samples with 20% of sourdough. On the other hand, D/L lactic acid remained in concentration 1.0-2.4 $\mu\text{mol/g}$ of bread without sourdough and 7.8-8.3 $\mu\text{mol/g}$ of bread with 20% of sourdough. The molar ratio between D/L-lactic and acetic acids registered an increase from 0.27-0.84 in the control samples without sourdough up to 1.40-1.64 with the addition of 20% of sourdough. The inclusion of bifidobacteria in sourdough conferred bread a longer shelf life due to production of organic acids which caused bread acidification (lower pH and higher TTA). The samples were packed in polyethylene bags, stored in a controlled chamber at 25°C temperature and the visual appearance of mould colonies on crust/crumb surface was registered daily. The sourdough inclusion delayed the onset of mould after storage of the loaves at 25°C from 5-6 days in control samples to 9-11 days in samples with 10% of sourdough, and even 12 to 14 days in samples with 20% of sourdough. The inclusion of whole rye flour had no significant effect on the microbiological stability of bread, despite being whole flour.

A decrease in the bread quality was observed by the raise of whole rye flour proportion in the bread formula. The inclusion of whole rye flour produced significant changes in specific volume. In general, whole rye flour inclusion had a higher impact in crumb texture than sourdough inclusion. This effect could be explained by the lower gluten content and higher bran in whole rye flour in comparison to refined wheat flour which affected the functionality of gluten network. Samples with more than 50 % of whole rye flour content were the most

affected with a 2.4- to 2.6-fold decrease in specific volume and a 3.5- to 8.5-fold increase in crumb firmness (Table 2). These changes are mainly due to the lower proportion of gluten in whole rye flour in comparison to wheat flour (Bodroža-Solarov, Filipčev, Kevrešan, Mandić, & Šimurina, 2008).

The effect of sourdough resulted in a decrease in the specific volume, whereas samples with 20 % sourdough content showed significantly higher crumb firmness than control sample. The application of sourdough has been reported to either increase (Corsetti et al., 2000; Crowley, Schober, Clarke, & Arendt, 2002) or decrease (Barber, Bfiguena, Barber, & Martinez-anaya, 1991; Salovaara & Valjakka, 2007) bread volume, and the type of effect depends on the acidification level obtained and the microbial strain employed (Katina et al., 2005). Furthermore, during sourdough fermentation, pH drop may favour amyolytic or proteolytic reactions, leading to an impact on structure-forming components like gluten and starch. Thiele et al. (2004) demonstrated that gluten macropolymers are solubilised and degraded during sourdough fermentation, which resulted in a less elastic texture of bread dough containing sourdough (Clarke, Schober, Dockery, Sullivan, & Arendt, 2004; Thiele, Grassl, & Gänzle, 2004).

Crumb springiness (related to the strength of the crumb cell wall) decreased slightly, but significantly, in breads with highest rye content. This parameter was also slightly affected by the inclusion of sourdough in comparison with control samples, with values remaining lower but close to 1 (data not shown). Resilience (related to the instantaneous ability of crumb for recovering the original geometry) in loaves with rye also showed significant differences with regard to control ones (from 0.52-0.43 to 0.27-0.28). This seems to be due to the higher water absorption of bran from whole rye flour, whereas sourdough inclusion did not affect this parameter. Chewiness represents the energy required to masticate a solid food product to a state ready for swallowing, and it is related to the primary parameters of firmness, cohesiveness, and springiness. In this investigation an increased trend

Table 2. Technological parameters and acceptability of bread with different proportions of whole rye flour and sourdough^{ab}

Formulation		Parameter		
Rye ^b %	Sourdough ^b %	Specific Volume ml/g	Firmness N	Acceptability
0	0	5.06±0.37j	0.57±0.05a	7.89±0.03d
	10	3.86±0.15g	0.80±0.02a	7.91±0.05d
	20	4.85±0.05i	0.75±0.01a	7.87±0.06d
25	0	4.11±0.09h	0.95±0.03ab	8.89±0.02e
	10	3.51±0.01f	0.96±0.03ab	8.94±0.03e
	20	3.37±0.05f	1.46±0.14b	8.95±0.01e
50	0	2.59±0.09e	2.10±0.05c	6.69±0.06c
	10	2.46±0.08e	2.61±0.01c	6.77±0.05c
	20	2.02±0.10d	4.30±0.01de	6.79±0.02c
75	0	1.89±0.04cd	3.85±0.50d	2.24±0.01b
	10	1.55±0.03a	4.51±0.01e	2.23±0.05b
	20	1.79±0.10bc	6.34±0.14f	2.21±0.03b
100	0	1.83±0.01bcd	4.55±0.44e	1.36±0.01a
	10	1.66±0.03ab	7.36±0.21g	1.36±0.02a
	20	1.83±0.01bcd	6.40±0.04f	1.35±0.01a

^aMean±SD n≥3; values followed by the same letter in the same column are not significantly different at 95% confidence level.

^bBread formulations Rye 0%: 100% refined wheat flour, Rye 25%: 25% whole rye flour/75% refined wheat flour, Rye 50%: 50% whole rye flour/50% refined wheat flour, Rye 75%: 75% whole rye flour/25% refined wheat flour and Rye 100%: 100% whole rye flour, sourdough 0%, 10% and 20%: formulations dough with 0%, 10% and 20% of sourdough inoculated with bifidobacteria, respectively.

in chewiness was observed with the inclusion of rye (data not shown), as was also observed in crumb firmness. On the other hand, cohesiveness did not show significant differences by inclusion of rye up to 50% level or by the inclusion of sourdough (data not shown). This means that formulations did not affect the strength of the internal bonds making up the crumb, measured as the ratio of the peak area of the second compression divided by the peak area of the first compression. A weaker gluten network might result in breads with a worse technological quality. The mean cell area and number of cells per cm^2 presented a significant decrease with the increase of the proportion of whole rye flour in bread formula (from 1.6 ± 0.2 to 0.58 ± 0.09 mm^2 and from 121 ± 17 to 96 ± 13 cells/ cm^2 , respectively). Nevertheless, all these parameters in samples added with sourdough did not show significant differences compared to the control without sourdough (data not shown). The effect of the percentage of rye flour used in the formulations on crust and crumb colour was also analysed. The CIEL*a*b* parameters were significantly affected by the increase of whole rye flour. As was expected, samples with higher rye flour amount showed an enhance in the darkness (lower L*), values ranged from 59 ± 7 to 47 ± 3 , a higher redness (a*), values ranged from 11 ± 1 to 12 ± 1 and a lower yellowness (b*), values ranged from 37.1 ± 0.8 to 28.2 ± 0.8 . The total colour difference between control sample and bread with rye and sourdough, ΔE , were higher than five units, indicating that significant differences are perceptible to consumers by visual observation (Sanz-Penella et al., 2012).

3.4 Effect of formulation on nutritional value of bread

3.4.1 Dietary Fibre and contribution to adequate dietary intake

As was expected, the incorporation of whole rye flour in the formulation, gradually and significantly increased the total dietary fibre (Table 3). The *Bifidobacterium* strains possess a remarkable capacity to use oligosaccharides as a carbon source,

for which partial degradation of fibre components during dough fermentation may take place (Table 3).

Dietary fibre consumption must be provided by the diet itself more than by means of specific supplements. Consumption should ideally provide an insoluble fibre-to-soluble fibre ratio of 3:1 (Park, 2001, chap V), which is achieved when the diet is varied and contains wholegrain cereals, nuts, legumes, fruit and other vegetables (Salas-Salvadó, Bulló, Pérez-Heras, & Ros, 2007). An increase in whole rye flour content resulted in breads with soluble/insoluble fibre ratios closer to the recommended ratio value. Table 3 also shows the adequate intakes (AIs) for dietary fibre given by the Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine, National Academy of Science (NAS, 2005), taking into account the World Health Organization's recommendation of a consumption of 250 g of bread per day. For example, the substitution of 50% of refined wheat flour by whole rye flour contributed to an increase in the intakes of total dietary fibre, reaching values of 52% to 56% for men and 79% to 85% for women of AIs. Furthermore, soluble arabinoxylans are the main dietary fibre polysaccharides in rye -around 55% of the total polysaccharides- which could provide a positive influence on the post-prandial glycaemic response (Knudsen & Lærke, 2010). This fact, together with the organic acids derived from the sourdough process could contribute to lower the glycaemic index in these bread formulations.

Table 3. Effect of bread formulation on dietary fibre content and contribution to adequate dietary intake

Parameter ^a	Units ^b	Sour dough ^c %	Rye ^c %				
			0	25	50	75	100
Total Dietary Fibre	g/100g d.m.	0	4.68±0.17b	8.10±0.08c	10.89±0.13e	13.69±0.25f	16.46±0.21j
		10	4.43±0.11ab	8.29±0.20c	10.42±0.13d	14.24±0.21g	15.88±0.08i
		20	4.25±0.02a	8.31±0.06c	10.40±0.11d	14.56±0.07h	14.63±0.16h
Soluble Fibre	g/100g d.m.	0	2.51±0.03b	3.67±0.07c	3.89±0.05d	4.03±0.07d	4.70±0.08gh
		10	2.56±0.06b	3.60±0.12c	3.93±0.05d	4.44±0.08f	4.82±0.05i
		20	2.37±0.01a	3.60±0.01c	4.19±0.06e	4.68±0.04g	4.92±0.08hi
Insoluble Fibre	g/100g d.m.	0	2.17±0.14b	4.43±0.01c	6.96±0.08g	9.66±0.18h	11.77±0.13k
		10	1.87±0.16a	4.70±0.08d	6.49±0.10f	9.80±0.13hi	10.97±0.04j
		20	1.88±0.04a	4.71±0.06d	6.22±0.05e	9.89±0.04hi	9.81±0.08i
Soluble/Insoluble Fibre Ratio 1:3 ^d	g/g	0	1:0.9	1:1.2	1:1.8	1:2.4	1:2.5
		10	1:0.7	1:1.3	1:1.7	1:2.2	1:2.2
		20	1:0.8	1:1.3	1:1.5	1:2.1	1:2.0
AI ^e Contribution	%	0	23/35	39/60	56/85	69/104	75/115
		10	24/37	43/65	54/82	71/108	71/109
		20	22/34	43/65	52/79	74/113	72/109

^aMean±SD n=3; values followed by the same letter in lines and columns from the same parameter are not significantly different at 95% confidence level.

^bDry matter, d.m.

^cBread formulations sourdough 0%, 10% and 20%: formulations dough with 0%, 10% and 20% of sourdough inoculated with bifidobacteria, respectively; Rye 0%: 100% refined wheat flour, Rye 25%: 25% whole rye flour/75% refined wheat flour, Rye 50%: 50% whole rye flour/50% refined wheat flour, Rye 75%: 75% whole rye flour/25% refined wheat flour and Rye 100%: 100% whole rye flour.

^d1:3 ratio of soluble/insoluble fibre (Salas-Salvadó, Bulló, Pérez-Heras, & Ros, 2007)

^eAI (adequate intake) contribution (%) for a daily average intake of 250 g of bread. AI in g per day for dietary fibre in man/woman is 38/25 (these values are AI for adults between 19 and 50 years; Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2005)

3.4.2. Minerals and contribution to dairy dietary reference intake

Table 4 shows the contribution to mineral intake of the five formulations used in this study based on the dietary reference intakes (DRIs) given by the Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine, National Academy of Science (NAS, 2004) and assuming a consumption of 250 g of bread per day.

Table 4. Effect of bread formulation on residual amount of lower *myo*-inositolphosphates, minerals, mineral dietary reference intake contribution and mineral availability prediction

Para- meter ^{ab}	Units ^c	Sour- dough ^d %	Rye ^d %				
			0	25	50	75	100
InsP ₅	μmol/g	0	0.01±0.01a	0.28±0.01cd	0.53±0.01f	0.78±0.07hi	1.19±0.08j
		10	0.01±0.01a	0.20±0.01bc	0.45±0.02e	0.70±0.05g	0.86±0.08i
		d.m. 20	0.03±0.01a	0.20±0.01b	0.35±0.03d	0.59±0.06f	0.74±0.01e
		CA20	0.01±0.01a	0.18±0.01b	0.33±0.01d	0.44±0.02gh	0.77±0.04gh
InsP ₄	μmol/g	0	0.01±0.01a	0.12±0.01cde	0.20±0.02efg	0.25±0.06gh	0.41±0.05ij
		10	0.05±0.01abc	0.14±0.01def	0.22±0.03fg	0.41±0.13j	0.33±0.08hi
		d.m. 20	0.03±0.01ab	0.14±0.02de	0.20±0.01efg	0.26±0.01gh	0.32±0.01h
		CA20	0.03±0.01ab	0.10±0.01bcd	0.20±0.03efg	0.18±0.01efg	0.32±0.03h
InsP ₃	μmol/g	0	0.07±0.01a	0.16±0.02b	0.16±0.01b	0.17±0.02b	0.18±0.01bc
		10	0.19±0.01bcdef	0.22±0.02cdefg	0.25±0.01gh	0.29±0.04h	0.23±0.02efg
		d.m. 20	0.18±0.01bcd	0.22±0.02cdefg	0.30±0.01h	0.23±0.03fg	0.23±0.01efg
		CA20	0.18±0.01bcde	0.17±0.02b	0.23±0.01fg	0.20±0.01bcdef	0.22±0.03defg

Table 4. (cont.)

Parameter ^{ab}	Units ^c	Sour- dough ^d %	Rye ^d , %				
			0	25	50	75	100
Ca	mg/100g d.m.	0/10/20	27.7±0.1a	45.1±0.8b	62.5±1.8c	80.90±1.4d	97.32±3.7e
Ca-DRI Contribution ^e %		0/10/20	5.5	8.8	12.4	15.4	16.5
InsP ₆ /Ca ^f >0.24		0	0.01	0.11	0.16	0.16	0.17
		10	0.00	0.07	0.12	0.14	0.15
		20	0.00	0.06	0.10	0.11	0.12
Fe	mg/100g d.m.	0/10/20	1.5±0.1a	2.3±0.2ab	3.0±0.2bc	3.7±0.3cd	4.1±0.4d
Fe-DRI Contribution ^e %		0/10/20	38/17	55/24	73/32	88/39	94/42
InsP ₆ /Fe ^f >1.0		0	0.15	3.13	4.60	4.95	5.25
		10	0.04	1.84	3.54	4.14	4.48
		20	0.07	1.69	2.94	3.40	3.54
Zn	mg/100g d.m.	0/10/20	1.9±0.2a	2.9±0.5b	3.6±0.3bc	4.1±0.1cd	4.9±0.1d
Zn DRI Contribution ^e %		0/10/20	34/47	51/70	63/87	72/99	76/104
InsP ₆ /Zn ^f >5.0		0	0.14	2.85	4.51	5.17	5.58
		10	0.03	1.67	3.48	4.33	4.72
		20	0.07	1.54	2.89	3.55	3.73

^aMean±SD n=3; values followed by the same letter lines and columns from the same parameter are not significantly different at 95% confidence level. ^bInsP₃ to InsP₅; *myo*-inositol phosphate containing 3-5 phosphates per inositol residue. ^cd.m.: in dry matter ^dBread formulations: sourdough 0%, 10% and 20% formulations dough with 0%, 10% and 20% of sourdough inoculated with bifidobacteria, respectively; CA-20: dough with 20% acid control sourdough with antibiotics; Rye 0%: 100% refined wheat flour, Rye 25%: 25% whole rye flour/75% refined wheat flour, Rye 50%: 50% whole rye flour/50% refined wheat flour, Rye 75%: 75% whole rye flour/25% refined wheat flour and Rye 100%: 100% whole rye flour. ^eDRI (dietary reference intakes) contribution (%) for a daily average intake of 250 g of bread in wet basis if the mineral absorption inhibitors are absent. DRI in mg per day for Ca in adults is (1,000)**; for Fe in man/woman is (8/18*) and for Zn in man/woman is (11/8), respectively. The values in parenthesis are recommended dietary allowances for individuals between 19 and >70 years, except for: *(between 31 and >70 years), and **(men between 31 and 70 years, women between 19 and 50 years); NAS (2014)

^fThreshold ratios (InsP₆/mineral) for mineral availability inhibition; mineral: Ca, Fe or Zn (Morris & Ellis, 1985; Hallberg et al., 1989; King, 2000).

The substitution of refined wheat flour by whole rye flour contributed to higher intakes of Ca, which is increased from 5.5% up to 16.5 % of DRIs. The contribution to DRIs for Fe and Zn was also significantly increased. Regarding Fe, the inclusion of whole rye flour resulted in an increase in the percentages of the DRI from 38 % to 94 % for men and 17 % to 42 % for women. For Zn the percentages of the DRI increased from 34 % to 76 % for men and 47 % to 104% for women. Despite, the mineral bioavailability depends on the presence of phytates, which affects their absorption due to its chelating effect, which gives raise to insoluble complexes (Sandström & Sandberg, 1992; Sanz-Penella et al., 2012). In this context, the predicted intakes are obviously overestimated due to the presence of phytates (Sanz-Penella, Wronkowska, Soral-Smietana, & Haros, 2013).

3.4.3 Effect of sourdough on the *myo*-inositol phosphates levels

In order to determine the content of the anti-nutritional *myo*-inositol phosphates in breads made with phytase-producing bifidobacteria, phytate and lower *myo*-inositol phosphates were measured (Table 4, Fig. 1). As expected, the phytate content in the final product was increased by the addition of whole rye flour. However, the inclusion of sourdough inoculated with bifidobacteria caused a significant decrease in the phytate content in breads at the two different proportions investigated (10% and 20%). The contents of $InsP_5$, which also has a strong chelating potential on minerals, were also significantly reduced. In addition, lower *myo*-inositol phosphates, like $InsP_3$, showed accumulation. Nevertheless, the lower *myo*-inositol phosphate levels did not present significant differences between the control made with a chemically acidified sourdough and samples with fermented sourdoughs. Therefore, $InsP_6$ reduction and generation of lower *myo*-inositol phosphates can be primarily correlated to the activation of the cereal endogenous phytase by the acidic pH, as seen in previous works (Sanz-Penella et al., 2012).

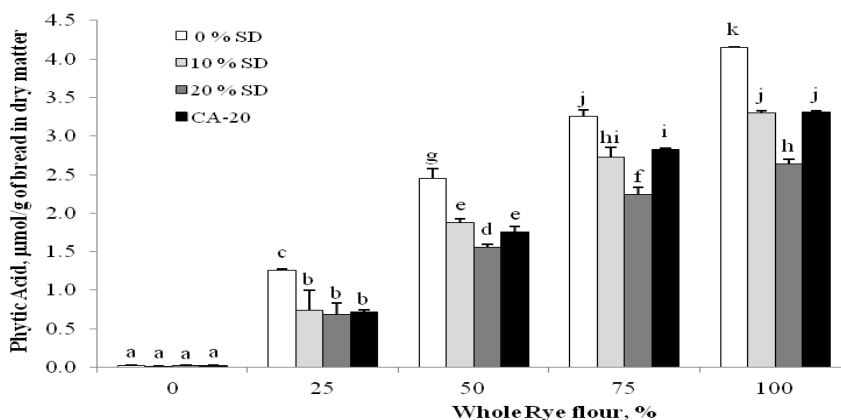


Fig 1. Effect of bread formulation on residual amount of phytic acid. Mean \pm standar deviation, $n=3$. Values in bar followed by the same letter are not significantly different at 95% confidence level. Codes: 0% SD, 10% SD and 20% SD correspond to formulations dough with 0%, 10% and 20% of sourdough inoculated with bifidobacteria, respectively. CA-20: dough with 20% acid control sourdough with antibiotics.

However, hydrolysis of InsP_6 in samples containing 20% bifidobacterial sourdough and 50%, 75% or 100% whole rye flour was significantly higher (between 5% and 11% higher), than values obtained using a chemically acidified sourdough in the same proportion, indicating that the additional hydrolysis is due to the phytase activity of *B. pseudocatenuatum*. These results were in the line to those obtained when bifidobacteria treatment was applied to whole wheat breads (Sanz-Penella et al., 2012), showing the versatility of these microorganisms in the fermentation and phytate reduction in different types of whole grain flours.

3.4.4 Human mineral availability estimation

The phytate/mineral molar ratios are used to predict the inhibitory effect of InsP_6 on the bioavailability of minerals (Morris & Ellis, 1985; Hallberg, Brune, & Rossander, 1989; King, 2000). Mineral bioavailability was predicted for calcium,

iron and zinc in the bread samples. In the case of Ca, a phytate/mineral molar ratios value higher than 0.24 starts compromising this mineral bioavailability. For Fe the phytate/Fe molar ratio could impair Fe bioavailability in humans at values higher than 1, whereas for Zn, if the phytate/Zn molar ratio is higher than 5 the bioavailability of Zn could be less than 50%. These ratios were decreased by the raise in sourdough proportion, which resulted in higher InsP_6 degradation. Due to the Ca content and the hydrolysis effect of sourdough on phytates, the InsP_6/Ca ratios were below the critical value for all the samples. For Zn, inhibitory effects (more than 50% of the mineral) were predicted in samples with 75% and 100% rye and this effect was efficiently avoided by the inclusion of sourdough at both 10% and 20%. Although the inclusion of sourdough reduced the InsP_6/Fe ratios close to the threshold in samples with 25% rye, the high phytate content of rye resulted in ratios still above the critical threshold in all samples.

3.5 Sensory analysis

Sensory evaluation study using a hedonic scale showed that the main factor for the approval by consumers was the proportion of whole rye flour added to the formulation (data no shown). As the percentage of whole rye flour increased, the product acceptability decreased, while the proportion of sourdough did not influence significantly. Thus, breads made with 25% rye flour were the most accepted. However, it is important to underline that samples with up to 50% rye reached about 85% acceptance, regardless of the use of sourdough.

4. Conclusions

Whole rye flour contributes to an increase in the nutritional value of bread products. Whole rye flour used until 50% of wheat substitution only resulted in a slight depreciation in bread performance and contributed to an increase in the

intakes of total dietary fibre, reaching values close to 50% and 80% of AIs for men and women, respectively, with high consumer acceptance. Sourdough inoculated with bifidobacteria was able to increase the phytate hydrolysis and raised organic acid levels that modify the starch digestibility, which could contribute to lowering the glycaemic index. The reduction of phytates in all the formulations with rye and sourdough up to 10% led to InsP_6 levels below the threshold of inhibition for Ca and Zn availability. Previous research has demonstrated that recombinant purified phytases from bifidobacteria are very effective, and superior than a commercial fungal phytase, in reducing InsP_6 contents to non-inhibitory levels in breads made with whole amaranth flour or in infant cereals (Sanz-Penella et al., 2012; García-Mantrana, Monedero, & Haros, 2014). Although direct inoculation of bifidobacteria may not be as effective as the use of their purified phytases, the benefits obtained in the sourdough fermentation with these phytase-producing microorganisms reinforce the idea that they could be used as starters in sourdough formulations. Their inclusion does not affect the bread quality and results in an increased nutritional value.

Acknowledgments

This work was financially supported by grants Consolider Fun-C-Food CSD2007-00063 and AGL2011-22669 from the Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) and PROMETEO/2012/064 from the Generalitat Valenciana, Spain. The contract of I. García-Mantrana from the Consolider Fun-C-Food Project is gratefully acknowledged. The authors would like to thank Bsc Carlos Bernabé Marqués and Bsc M^a Luisa Llin Albiñana from INDESPAN Company for their help in the optimization of bread formulations. We would like to thank Dr. Dinoraz Velez and Dr. Vicenta Devesa from the Trace Elements Group (IATA-CSIC) for their help with the samples digestion for mineral determination and the Msc Marta Sancho-Robles for her excellent support and assistance with this investigation.

References

- AACC, (2000). *Approved Methods of AACC* (10th ed.) Methods 32-21, 54-21. *The American Association of Cereal Chemists*, Saint Paul, Minnesota.
- Barber, S., Baguena, R., Benedito de Barber, C., & Martínez-Anaya, M. A. (1991). Evolution of biochemical and rheological characteristics and breadmaking quality during a multistage wheat sour dough process. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 192, 46–52.
- Bodroža-Solarov, M., Filipčev, B., Kevrešan, Ž., Mandić, A., & Šimurina, O. (2008). Quality of bread supplemented with popped *Amaranthus cruentus* grain. *Journal of Food Process Engineering*, 31(5), 602–618.
- Clarke, C. I., Schober, T. J., Dockery, P., Sullivan, K. O., & Arendt, E. K. (2004). Wheat Sourdough Fermentation: Effects of Time and Acidification on Fundamental Rheological Properties. *Cereal Chemistry* 81(3), 409–417.
- Corsetti, A., Gobbetti, M., De Marco, B., Balestrieri, F., Paoletti, F., Russi, L., et al. (2000). Combined effect of sourdough lactic acid bacteria and additives on bread firmness and staling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 3044–3051.
- Crowley, P., Schober, T., Clarke, C., & Arendt, E. (2002). The effect of storage time on textural and crumb grain characteristics of sourdough wheat bread. *European Food Research and Technology*, 214(6), 489–496.
- Ercolini, D., Pontonio, E., De Filippis, F., Minervini, F., La Stora, A., Gobbetti, M., & Di Cagno, R. (2013). Microbial ecology dynamics during rye and wheat sourdough preparation. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24), 7827–7836.
- Fretzdorff, B., & Brümmer, J.-M. (1992). Reduction of Phytic Acid During Breadmaking of Whole-Meal Breads. *Cereal Chemistry*, 69(3), 266–270.
- Gänzle, M.G. (2014). Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food Microbiology*, 37, 2-10.
- Gänzle, M. G., Loponen, J., & Gobbetti, M. (2008). Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends in Food Science & Technology*, 19(10), 513–521.
- García-Mantrana, I., Monedero, V., & Haros, M. (2014). Application of phytases from bifidobacteria in the development of cereal-based products with amaranth. *European Food Research and Technology*, 238(5), 853–862.
- Gråsten, S. M., Juntunen, K. S., Poutanen, K. S., Gylling, H. K., Miettinen, T. A., & Mykkänen, H. M. (2000). Human Nutrition and Metabolism Rye Bread Improves Bowel Function and Decreases the Concentrations of in Middle-Aged Women and Men1,2 . *The Journal of Nutrition*, 130(9), 2215–2221.
- Greiner, R., & Konietzny, U. (1999). Improving enzymatic reduction of myo-inositol phosphates with inhibitory effects on mineral absorption in black beans (*Phaseolus vulgaris* var. Preto) *Journal of Food Processing and Preservation*, 23(3), 249–261.
- Hallberg, L., Brune, M., & Rossander, L. (1989). Iron absorption in man: inhibition by phytate acid and dose-dependent. *American Journal of Clinical Nutrition*, 49, 140–144.
- Haros, M., Bielecka, M., Honke, J., & Sanz, Y. (2007). Myo-inositol hexakisphosphate degradation by *Bifidobacterium infantis*

ATCC 15697. *International Journal of Food Microbiology*, 117(1), 76–84.

Haros, M., Carlsson, N.-G., Almgren, A., Larsson-Alminger, M., Sandberg, A.-S., & Andlid, T. (2009). Phytate degradation by human gut isolated *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 and its probiotic potential. *International Journal of Food Microbiology*, 135(1), 7–14.

Katina, K., Arendt, E., Liukkonen, K.-H., Autio, K., Flander, L., & Poutanen, K. (2005). Potential of sourdough for healthier cereal products. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1-3), 104–112.

King, J.C. (2000). Determinants of maternal zinc status during pregnancy. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(suppl), 1334S – 1343S.

Knudsen, K. E. B., & Lærke, H. N. (2010). Review: Rye Arabinoxylans: Molecular Structure, Physicochemical properties and physiological effects in the gastrointestinal tract. *Cereal Chemistry*, 87(4), 353–362.

Laaksonen, D. E., Toppinen, L. K., Juntunen, K. S., Autio, K., Liukkonen, K., Poutanen, K. S., et al. (2005). Dietary carbohydrate modification enhances insulin secretion in persons with the metabolic syndrome. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82(6), 1218–1227.

Lappi, J., Selinheimo, E., Schwab, U., Katina, K., Lehtinen, P., Mykkänen, H., et al. (2010). Sourdough fermentation of wholemeal wheat bread increases solubility of arabinoxylan and protein and decreases postprandial glucose and insulin responses. *Journal of Cereal Science*, 51(1), 152–158.

Liukkonen, K.-H., Katina, K., Wilhelmsson, A., Myllymäki, O., Lampi, A.-M., Kariluoto, S., et al. (2003). Process-induced changes on bioactive compounds in whole grain rye. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 62(1), 117–122.

Lopez, H. W., Krespine, V., Guy, C., Messenger, a, Demigne, C., & Remesy, C. (2001). Prolonged fermentation of whole wheat sourdough reduces phytate level and increases soluble magnesium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2657–2662.

McIntosh, G. H., Noakes, M., Royle, P. J., & Foster, P. R. (2003). Whole-grain rye and wheat foods and markers of bowel health in overweight middle-aged men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(4), 967–974.

Morris, E.R., & Ellis, R. (1985). Bioavailability of dietary calcium - effect of phytate on adult men consuming nonvegetarian diets. *ACS Symposium Series*, 275, 63–72.

NAS (2005). National Academy of Sciences. Dietary, Functional, and Total Fiber. In Institute of Medicine Food and Nutrition Board, *Dietary References Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids* (pp 339-421). Washington D.C.: The National Academies Press.

NAS (National Academy of Sciences, Institute of Medicine Food and Nutrition Board). Dietary Reference Intakes: Recommended Intakes for Individuals, vitamins, minerals and macronutrients, 2014. URL <http://iom.edu/Activities/Nutrition/SummaryDRIs/~media/Files/Activity%20Files/Nutrition/DRIs/New%20Material/5DRI%20Values%20SummaryTables%2014.pdf>. Accessed 22.07.14

- Palacios, M. C., Haros, M., Rosell, C. M., & Sanz, Y. (2008). Selection of phytate-degrading human bifidobacteria and application in whole wheat dough fermentation. *Food Microbiology*, 25(1), 169–176.
- Park, N. (2001). V. Worldwide Dietary Fiber Intake and Regulations of Dietary Fiber Food, Chapter 43: Dietary Fiber Intake in Chile: Recommendations and Actual Consumption Patterns. In: S. Sungsoo Cho & M.L. Dreher (Eds.), *Handbook in Dietary Fiber* (pp. 824–834). New York: Taylor & Francis.
- Pereira, M. A., Jacobs, D. R., Pins, J. J., Raatz, S. K., Gross, M. D., Slavin, J. L., et al. (2002). Effect of whole grains on insulin sensitivity in overweight hyperinsulinemic adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 75(5), 848–855.
- Popper, R., Rosenstock, W., Schraidt, M., Kroll, B.J. (2004). The effect of attribute questions on overall liking ratings. *Food Quality and Preference*, 15(7-8), 853–858.
- Reale, A., Mannina, L., Tremonte, P., Sobolev, A. P., Succì, M., Sorrentino, E., et al (2004). Phytate degradation by lactic acid bacteria and yeasts during the wholemeal dough fermentation: a 31P NMR study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6300–6305.
- Salas-Salvadó, J., Bulló, M., Pérez-Heras, A., & Ros, E. (2007). Dietary fibre, nuts and cardiovascular diseases. *British Journal of Nutrition*, 96(2), 46-51.
- Salovaara, H., & Valjakka, T. (2007). The effect of fermentation temperature, flour type, and starter on the properties of sour wheat bread. *International Journal of Food Science & Technology*, 22(6), 591–597.
- Sandström, B., & Sandberg, A. S. (1992). Inhibitory effects of isolated inositol phosphates on zinc absorption in humans. *Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease*, 6(2), 99–103.
- Sanz-Penella, J. M., Collar, C., & Haros, M. (2008). Effect of wheat bran and enzyme addition on dough rheological performance and phytic acid levels in bread. *Journal of Cereal Science*, 48, 715-721.
- Sanz-Penella, J. M., Tamayo-Ramos, J. A., Sanz, Y., & Haros, M. (2009). Phytate reduction in bran-enriched bread by phytase-producing bifidobacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 10239–10244.
- Sanz-Penella, J. M., Frontela, C., Ros, G., Martínez, C., Monedero, V., & Haros, M. (2012). Application of bifidobacterial phytases in infant cereals: effect on phytate contents and mineral dialyzability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(47), 11787–11792.
- Sanz-Penella, J. M., Tamayo-Ramos, J. A., & Haros, M. (2012). Application of Bifidobacteria as Starter Culture in Whole Wheat Sourdough Breadmaking. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2370–2380.
- Sanz-Penella, J. M., Wronkowska, M., Soral-Smietana, M., & Haros, M. (2013). Effect of whole amaranth flour on bread properties and nutritive value. *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 679–685.
- Thiele, C., Grassl, S., & Gänzle, M. (2004). Gluten hydrolysis and depolymerization during sourdough fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1307–13014.

Türk, M., & Sandberg, A.-S. (1992). Phytate degradation during breadmaking: Effect of phytase addition. *Journal of Cereal Science*, 15(3), 281–294.

Van der Meulen, R., Adriany, T., Verbrugghe, K., & De Vuyst, L. (2006). Kinetic analysis of bifidobacterial metabolism reveals a minor role for succinic acid in the regeneration of NAD⁺ through its growth-associated production. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5204–5210.

CAPITULO 2

Application of phytases from bifidobacteria in the development of cereal-based products with amaranth

Izaskun García-Mantrana^{1,2}

*Vicente Monedero*²

Monika Haros^{1*}

European Food Research and Technology 2014, 238, 853-862

¹Cereal Group and ²Lactic Acid Bacteria and Probiotics Laboratory
Institute of Agrochemistry and Food Technology (IATA-CSIC)
Valencia, Spain

ABSTRACT

The effects of the inclusion of purified phytases from *Bifidobacterium longum* spp. *infantis* ATCC15697 and *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 on phytate (InsP_6) levels were analyzed during breadmaking process. Two different levels of whole amaranth (*Amaranthus cruentus*) flour (25 and 50%) were used in bread dough preparation and they were compared to control doughs made with 100% wheat flour and 100% whole wheat flour. Bread samples made with 50% of amaranth flour showed a significant decrease in technological quality parameters in comparison to control white breads. However, a 25% of amaranth flour improved the nutritional value of the bread, with only a slight depreciation in the quality. Addition of bifidobacterial phytases resulted in higher InsP_6 degradation compared to a commercial fungal phytase, without affecting the bread quality. InsP_6 reduction was especially efficient in breads with 25% amaranth, leading to InsP_6 levels below the threshold of mineral bioavailability inhibition for Fe and Zn in human nutrition.

KEYWORDS: whole amaranth flour, bread, phytates, bifidobacterial phytase, mineral availability

1. Introduction

Cereals and their derivatives constitute a considerable part of a balanced diet and are at the first level in the food pyramid, according to the international dietary guidelines. Cereal grain products are divided into two categories: refined and whole grain products. Refined grains possess a limited nutritional value, whereas whole grains are a better source of fibre, vitamins, minerals, and contain also a variety of other phytochemicals and antioxidants [1-3]. Due to this fact, an increasing interest exists in the development of dietary fibre-rich cereal products with this nutritional added value. In addition, epidemiological studies confirmed that consumption of whole grain cereals and pseudocereals is associated with reduced risk of type-2 diabetes, constipation, obesity, cardiovascular diseases and some types of cancer [4].

One possibility for increasing the nutritional value of bakery products could be the inclusion of whole amaranth grain in their formulations. *Amaranthus* is a common flowering plant genus that yields the nutritious staple amaranth grain, a pseudocereal [5]. This genus comprises more than 60 species, but only three of them are usually used for human consumption: *Amaranthus caudatus*, *A. cruentus* and *A. hypocondriacus* [5]. The nutritional quality of amaranth grain is significantly higher when compared with most cereal seeds such as wheat, barley or rice. Compared to wheat flour, *A. cruentus* flour possesses a significantly higher protein (14-18%), lipid (6-8%) and dietary fibre (11-23%) contents and it also contains vitamins, minerals and other biologically active compounds [6,7]. The balanced essential amino acid composition is also a characteristic of amaranth seeds [8]. Furthermore, amaranth grain protein is rich in lysine content, a deficient amino acid in cereals. The lipid content (6-8%) is also higher than that of most cereal grains, with an enhanced presence of unsaturated oil (45% linoleic acid) which plays an important role in cardiovascular health [9]. In addition to these

nutritional components, amaranth seed also contains other organic compounds such as tocotrienols, squalene and phytosterols, involved in the metabolism of cholesterol, and able to lower LDL-cholesterol levels and plasma triglycerides concentration [10]. Aside from these substances amaranth seeds count with bioactive peptides with antihypertensive effect and with the anticarcinogenic properties of the peptide lunasin [11] and their lack of gluten make them ideal for the manufacture of products for celiacs. However, whole grains contain significant amounts of phytic acid [*myo*-inositol (1,2,3,4,5,6)-hexakisphosphate or $InsP_6$] or its salts (phytates), a well-known inhibitor of mineral, proteins and trace elements bioavailability [12]. The negative effects of phytates in human nutrition are more relevant in developing countries, in risk populations such as pregnant women or those who follow an unbalanced diet and also in animal feed [13,14]. The phytic acid is an organic acid common in plants in which it functions in the storage of phosphorus and cations for growth [15]. Phytic acid has a strong ability to form complexes with bi/multivalent metal ions, especially iron, calcium and zinc [16,17]. A partial dephosphorylation of phytates not only decreases this negative effect, but also generates lower *myo*-inositol phosphates with potential benefits to human health [18,19]. Phytases are a class of phosphatases that catalyze the sequential hydrolysis of $InsP_6$ to lower *myo*-inositol phosphates and inorganic phosphate [19]. There are several strategies to increase the phytase activity present in raw materials. Thus, cereals have their own endogenous phytase and the addition of sourdough into breadmaking process improves the degradation of phytates, due to the decrease of pH [20]. Aside from the own cereal phytase, the addition of an exogenous phytase (generally from microbial sources) is other alternative. This strategy is broadly used in feed production for monogastric animals and it has also been explored in the production of cereal and legume foods for human consumption [21]. Phytase activity has been described for food-grade strains of the genus *Bifidobacterium*, and these bacteria have been applied in both direct and

indirect breadmaking processes [20,22]. *Bifidobacterium longum* spp. *infantis* ATCC15697 and *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 bacterial cells demonstrated their efficacy in the reduction of phytates in breads and increased iron availability in both processes [20,22]. The genes encoding these phytases have been recently cloned and the enzymes purified and characterized, showing that they belong to the histidine-acid phosphatase family and possess distinctive biochemical characteristics, such as a remarkable thermal stability and the ability to degrade InsP_6 to InsP_3 [23]. The inclusion of these purified phytases in the process of production of infant cereals resulted in a significant decrease in InsP_6 contents and an enhanced solubility of zinc [22].

The objective of the present investigation was to develop new bakery cereal-based products with improved nutritional quality. To this end, breads were made with addition of whole amaranth flour. In these breads the undesirable effects of the high level of phytates found in amaranth seeds were avoided by including purified phytases from intestinal bifidobacteria during the process. The likely contribution of the product to mineral intake, according to the daily reference intake (DRI) and its possible overestimation by the presence of phytates, was also evaluated.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Commercial flours were purchased from the local market. The characteristics of wheat, whole wheat and whole amaranth flours (*Amaranthus cruentus*) were: moisture, 14.53 ± 0.03 , 14.04 ± 0.08 and 11.89 ± 0.04 %; protein, 13.6 ± 0.1 , 11.6 ± 0.1 and 14.9 ± 0.1 % in dry basis; fat, 1.30 ± 0.09 , 1.67 ± 0.03 and 5.60 ± 0.04 % in dry basis; ash, 0.62 ± 0.03 , 1.36 ± 0.01 and 2.94 ± 0.08 % in dry basis; and phytate contents were: not detected, 7.5 ± 0.1 and 13.3 ± 0.3 $\mu\text{mol g}^{-1}$ in dry basis,

respectively. The flour alveograph parameters were: tenacity, P: 81 mm; extensibility, L: 110 mm; P/L ratio, 0.74; and deformation work, W: 308×10^{-4} J. Compressed yeast (*Saccharomyces cerevisiae*, Levamax, Spain) was used as starter. Commercial fungal phytase (E.C 3.1.3.8) from *Aspergillus niger* produced by submerged fermentation of a genetically modified *Aspergillus oryzae* (73 U ml^{-1} , Ronozyme Phytase from Novozymes, Bioindustrial, Madrid, Spain) was used as a positive control in dough formulations. Recombinant phytases enzymes expressed in *Escherichia coli* clones carrying the phytase genes from *Bifidobacterium longum* spp. *infantis* ATCC 15697 and *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC 27919, originally isolated from infant faeces, were also used (see below).

2.2 Expression of bifidobacterial phytases

The phytases from bifidobacteria were overexpressed in *E. coli* as 6xHis-tagged proteins lacking their N-terminal signal peptides and C-terminal cell-wall anchor endogenous sequences [23]. *E. coli* M15 clones carrying the recombinant plasmids (pQE80 derivatives) were grown in 500 ml of LB medium with ampicillin at $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ at 37°C under shaking, until an optical density of 0.6 at 600 nm was reached. The expression of the phytases was induced by adding isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) to 0.1 mM and incubating at 30°C for 4 hours. After centrifugation, the obtained bacterial cell pellets were washed with 0.9% NaCl, resuspended in 100 mM Tris-HCl pH 7.4 buffer containing 1 mg ml^{-1} lysozyme and incubated at 37°C for 30 min. Bacterial cells in this suspension were broken by sonication and after removing the cellular debris by centrifugation at $15000 \times g$ 15 min at 4°C , the supernatants were filtered through $0.45 \mu\text{m}$ -pore-size nitrocellulose filters. Filtered supernatants were applied to Ni-NTA agarose chromatography columns (1 ml bed volume), and recombinant proteins were purified according to the supplier instructions (Qiagen). After several washes, proteins were eluted from

the columns in 1 ml fractions that were analyzed by SDS-PAGE. The fractions containing the expressed proteins were dialyzed against 100 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 10% glycerol and 50 mM NaCl at 4°C for 24h and stored at -80°C until use.

2.3 Determination of phytase activity

The enzymatic flour extracts were prepared following the method reported by Haros et al. [24]. The phytase activity was determined using 500 µl of 0.1 M sodium acetate pH 5.5, containing 1.2 mM potassium phytate and 100 µl fractions of each purified enzyme or flour extracts [24,25]. After 15 minutes of incubation at 50°C, the reaction was stopped by adding 100 µl of 20% trichloroacetic acid, allowed to stand for 10 min at 0°C and centrifuged at 14000xg, 5 min and 4°C (Centrifuge 5415R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany). The determination of the enzyme activity was based in a colorimetric quantification at 400 nm of free phosphorus released by the hydrolysis of phytate using ammonium molybdovanadate reagent (Fluka Chemika) according to Tanner et al. [26]. One unit of phytase activity (U) was defined as the amount of enzyme releasing 1 mg of phosphorous from phytate per minute at pH 5.5 and 50°C. Determinations were carried out in duplicate.

2.4 Determination of *myo*-inositol phosphates

InsP₆ present in flours and the remaining InsP₆ and lower *myo*-inositol phosphates generated during the breadmaking process were extracted by ion-exchange chromatography and measured by high pressure liquid chromatographic methods described by Türk and Sandberg [27], later modified by Sanz-Penella et al. [28]. Identification of the *myo*-inositol phosphates was achieved by comparison with standards of phytic acid di-potassium salt (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Samples were analyzed in triplicate.

2.5 Determination of minerals in bread samples

The total Fe, Ca and Zn concentrations in bread samples were determined using a flame atomic absorption spectrometer at the *Servei Central de Suport a la Investigació Experimental* from the University of Valencia. Previously, samples were placed in a Teflon perfluoroalkoxy (PFA) vessel and treated with 1 mL HNO₃ (14M, Merck) and 1 mL of H₂O₂ (30% v/v, Panreac Química, Spain). The Teflon PFA vessel was irradiated at 800 W (15 min at 180°C) in a microwave accelerated reaction system (MARS) from CEM (Vertex, Spain). At the end of the digestion program, the digest was placed in a tube and made up to volume with 0.6 M HCl (Merck). Samples were analyzed in triplicate.

2.6 Breadmaking process

Four flour formulations were used for bread doughs: 100% wheat flour (WF), 100% whole wheat flour (WWF), 25% whole amaranth flour and 75% wheat flour (WAF25), and 50% whole amaranth flour and 50% wheat flour (WAF50). The bread dough formula expressed in flour basis consisted of different flour formulations (300g), compressed yeast (5%), sodium chloride (1.6%) and water up to optimum absorption corresponding to 500 BU (Brabender Units) (between 60% and 66.8% depending on bread dough formulation). A sponge method mixing dough in a two stage was used (Figure 1). The first stage involved mixing half water and flour amount together with the total yeast amount and fermenting for 24h at 4°C. The sponge is then mixed in with the rest of ingredients in a second stage. The ingredients were mixed for 5.5-6.0 min, rested for 10 min, divided into 100 g pieces, kneaded and then rested again for 15 min. Doughs were manually sheeted, rolled and fermented up to the optimum volume increase at 28°C and 80% of relative humidity. Finally, the samples were baked at 180°C/20min, 165°C/30min, 160°C/35min, and 160°C/30min for WF, WWF, WAF25 and WAF50, respectively, and cooled at room temperature for 75 min. The formulation samples were done in

duplicate. The different phytases were added during mixing at a concentration equivalent to the phytase endogenous activity in the flours (Figure 1).

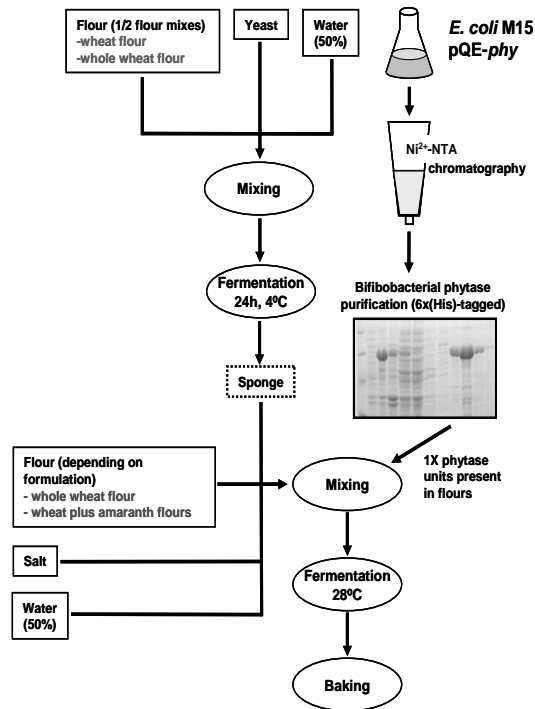


Figure 1. Flow diagram of the breadmaking process with different whole grain flours (wheat or amaranth) and bifidobacterial phytases

2.7 Bread quality

The technological parameters analyzed were moisture (%), loaf specific volume (ml/g), width/height ratio of the central slice (cm/cm) and crumb firmness (N) using texture analyzer TA-XT plus. The colour parameters L* (lightness), a* (redness to greenness) and b* (yellowness to blueness) of crumb and crust were

determinate using a digital colorimeter (Chromameter CR-400, Konika Minolta Sensing, Japan) [22]. From the colour parameters the total colour difference (ΔE^*) was calculated with the formula: $\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$. Samples were analysed at least in triplicate.

2.8 Statistical analysis

Multiple sample comparison of the means and Fisher's least significant differences (LSD) were applied to establish significant statistical differences between treatments. All statistical analyses were carried out with the Statgraphics Plus 7.1 software (Bitstream, Cambridge, MN) and differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1 Technological quality of breads containing amaranth flours and microbial phytases

The characteristics of whole amaranth-wheat mixed bread and the effect of the inclusion of bifidobacterial phytases on bread quality was investigated. The quality of the final products was analyzed by measuring technological parameters such as moisture, loaf specific volume, width/height ratio of the central slice, crust and crumb colour and crumb firmness and compared to control breads made with wheat or whole wheat flours.

The moisture parameters for whole wheat breads (WWF samples) were between 30.8 and 33.8%. Moisture of wheat flour breads (WF samples) was 33.1%, whereas in breads containing 25% and 50% of whole amaranth flour (WAF25 and WAF50 samples) moisture ranged between 30.4 to 33.6 % and 32.5 to 34.3%, respectively (Table 1). In general, when the levels of whole grain flours or bran are increased,

the water retention capacity of doughs is higher compared to refined flours [28]. However, in the current investigation a strong flour with high protein content (13.6%) was used, which accounts for a higher water absorption in the wheat flour breads.

A decrease in the bread quality was observed by the use of whole wheat flour and whole amaranth flour (Table 1). The presence of these whole grain flours produced significant changes in specific volume and in crumb firmness, especially in WWF and WAF50 samples (Table 1). These changes were related to the gluten content decrease in these formulations. Crumb firmness is a quality parameter in bakery products that is closely related to the tenderness perception by the consumer [29]. Samples with 50% of amaranth (WAF50) were the most affected, with a 2.8- to 3.8-fold increase in firmness and 1.3- to 1.6-fold decrease in specific volume compared to bread made with wheat flour (WF, Table 1). However, the inclusion of 25% of amaranth flour (WAF25) resulted in technological parameters closer to the control white bread. Thus, WAF25 samples displayed significantly lower firmness and higher specific volume compared to WWF samples (Table 1).

Table 1. Effect of treatment and formulation on the technological parameters of breads.

Sample	Treatment	Moisture %	Specific volume ml g ⁻¹	Width/Height cm cm ⁻¹	Firmness N
WF		33.1 ± 0.1 e	4.1 ± 0.0 g	1.6 ± 0.0 abc	0.5 ± 0.1 a
WWF	C	33.8 ± 0.2 fgh	3.7 ± 0.1 d	1.5 ± 0.0 a	1.0 ± 0.1 cd
WAF25		31.5 ± 0.1 c	3.9 ± 0.1 fg	1.9 ± 0.0 f	0.7 ± 0.1 b
WAF50		34.3 ± 0.5 i	2.6 ± 0.2 a	2.0 ± 0.0 g	2.0 ± 0.3 g
WWF		33.4 ± 0.5 ef	3.8 ± 0.1 def	1.7 ± 0.0 bcd	2.5 ± 0.1 h
WAF25	FP	33.6 ± 0.1 efg	3.9 ± 0.1 efg	1.7 ± 0.0 bcd	1.1 ± 0.2 cd
WAF50		32.5 ± 0.1 d	3.1 ± 0.1 c	1.8 ± 0.1 ef	1.9 ± 0.2 fg
WWF		30.8 ± 0.1 ab	3.8 ± 0.1 de	1.8 ± 0.0 ef	2.5 ± 0.3 h
WAF25	PS	30.4 ± 0.1 a	3.8 ± 0.1 def	1.7 ± 0.0 cde	0.8 ± 0.1 bc
WAF50		34.2 ± 0.3 hi	2.8 ± 0.1 b	1.7 ± 0.0 cdef	1.5 ± 0.1 e
WWF		31.0 ± 0.1 bc	3.8 ± 0.1 de	1.7 ± 0.0 abcd	1.8 ± 0.2 f
WAF25	IN	33.5 ± 0.1 ef	4.0 ± 0.1 g	1.6 ± 0.0 ab	0.9 ± 0.1 cd
WAF50		34.1 ± 0.2 ghi	2.8 ± 0.1 b	1.8 ± 0.0 def	1.4 ± 0.1 e

WF: 100% wheat flour, WWF: 100% whole wheat flour, WAF25: 25% whole amaranth flour/75% wheat flour, WAF50: 50% whole amaranth flour/50% wheat flour; C: control without phytase, FP: fungal phytase, PS: *B. pseudocatenulatum* phytase, IN: *B. longum* spp. *infantis* phytase;

^{a-i}Mean ± SD. Values followed by the same letter in the same column are not significantly different at 95% confidence level.

The colour of both whole grain flours showed a lower lightness than the wheat flour without significant differences between them. The values were 84±2; 78±4 and 79±3 for wheat, whole wheat and whole amaranth flour, respectively. The amaranth flour colour parameters showed a slight increase in the yellowness (data

not shown). This was related to the presence of natural pigments such as flavonoids and other polyphenols, especially present in the whole amaranth flour, which were responsible for the changes in the crust and crumb colour observed in breads [30]. In general, the tristimulus colour values in crust and crumb were affected by the inclusion of amaranth. The crust redness was significantly higher when the whole grain flour concentration was increased, especially with the increase in amaranth content (values of a^* ranging from 4.9 ± 0.2 to 14.1 ± 0.7 for WF and WAF50 breads, respectively). On the other hand, the crust lightness decreased significantly with the inclusion of whole amaranth (from 65 ± 2 to 51 ± 1), whereas the yellowness remained around 32.

The crumb tristimulus colour parameters were more affected than the crust parameters by the inclusion of amaranth flour. The values of a^* varied from -1.5 ± 0.3 to 1.8 ± 0.3 for WF and WAF50 breads, respectively, while the breads made with 100% whole wheat flour (WWF) had the higher values of redness (3.6 ± 0.5). The inclusion of 25% or 50% of whole amaranth flour in bread formulations did not affect significantly the crumb lightness. However, crumb lightness in whole wheat bread (55 ± 2) was significantly lower than in control sample (63 ± 3). The crumb yellowness was also correlated to a high concentration of amaranth flour, probably due to a higher content of flavonoids (b^* value was 24.7 ± 0.7 for WAF50 breads, whereas they were 12.9 ± 0.6 and 17.7 ± 0.8 for WF and WWF breads, respectively). The total colour difference between samples (crust and crumb colour), ΔE , were higher than 5 units, indicating that significant differences are perceptible to consumers by visual observation [20]. The phytase treatment did not show significant differences in colour parameters compared to control (results not shown).

With the exception of some specific conditions, the technological parameters did not change with the addition of the different microbial phytases (control fungal phytase and bifidobacterial phytases). The differences comprised an increased

firmness in WWF breads treated with both types of phytases, compared to the same untreated samples (Table 1). This behaviour was not observed in breads with amaranth flour, although no clear explanation for this could be hypothesized. Another change was represented by a slight increment in loaf volume in formulations with amaranth and treated with phytases compared to untreated samples (Table 1). This effect was significantly higher in the WAF50 formulation. Haros et al. [31] hypothesized that an advanced hydrolysis of phytate could activate the wheat endogenous alpha-amylase through calcium liberation, which acts as cofactor of this enzyme. This leads to an increase in the volume of the bakery pieces during the fermentation process. Finally, the width/height ratio of the central slice remained constant in all the formulations, except in the WAF50 breads, where higher values were obtained in samples not treated with phytases (Table 1).

3.2 Effect of bifidobacterial phytases on the *myo*-inositol phosphates levels in bread

The whole grain flours used in this study contained high levels of phytate (whole wheat, $7.5 \pm 0.2 \mu\text{mol g}^{-1}$; whole amaranth, $13.3 \pm 0.4 \mu\text{mol g}^{-1}$ of InsP_6). However they also showed a high endogenous phytase activity (whole wheat, $18.8 \pm 0.5 \text{ U g}^{-1}$; whole amaranth, $22.0 \pm 0.8 \text{ U g}^{-1}$). Usually the phytate degradation during cereal dough fermentation is positively correlated with the endogenous phytase activity [32]. This fact was observed in the control formulations without added phytase, which displayed a 70% of phytate hydrolysis for whole wheat bread (WWF) and 46% for the 25% whole amaranth bread (WAF25) compared to raw materials (Table 2). However, endogenous InsP_6 hydrolysis in samples with the highest concentration of amaranth flour (WAF50) was not observed. The addition of exogenous phytases resulted in a further decrease in InsP_6 contents which reached up to an 89% reduction relative to control samples. InsP_3 contents, which also have

a strong chelating potential on minerals [33] were also reduced to similar levels. Here, a better performance was found for bifidobacterial phytases compared to the control fungal phytase, especially in WWF and WAF25 breads: hydrolysis of 87-89% of InsP_6 for bifidobacterial phytases compared to control breads, whereas hydrolysis was only between 28 and 74% for fungal phytase. A better InsP_6 hydrolysis by bifidobacterial phytases compared to a commercial fungal phytase has been previously reported in the treatment of cereals for infants [34]. In these studies more than 90% InsP_6 hydrolysis was reported for the *B. pseudocatenulatum* enzyme, whereas hydrolysis of 68% were obtained with a *Aspergillus niger* phytase. Factors like pH and temperature drastically affect phytase activity [23] and may account for these differences. In this regard it is worth mentioning that the bifidobacterial enzymes showed a high thermal stability [23] that allows their activity during the first stage of baking. Also, it cannot be excluded that inhibitory substances present in the flours were differentially affecting the activity of fungal and bifidobacterial phytases. In WAF50 breads phytate hydrolysis by the added phytases reached values from 47 to 70%, although these products still contained a substantial amount of phytate (up to $3.5 \mu\text{mol g}^{-1}$, Table 2). This can be attributed to the elevated InsP_6 concentration present in this formulation, to the presence of likely phytase inhibitory substances in the amaranth flour or to a feedback inhibition on phytase activity by phosphate released to the medium [24].

Table 2. Effect of formulation on the *myo*-inositol phosphates levels in bread

Samples	$\mu\text{moles g}^{-1}$ of bread (dry base)					
	Phytase	InsP ₆	InsP ₅	InsP ₄	InsP ₃	InsP ₆ +InsP ₅
WF	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
WWF	C	2.3±0.5 e	0.6±0.1 e	0.3±0.1d	0.5±0.1f	2.9±0.7c
	FP	0.6±0.4ab	0.1±0.1ab	0.1±0.1a	0.1±0.1a	0.7±0.7a
	PS	0.3±0.1 a	0.1±0.1ab	0.1±0.1b	0.3±0.1e	0.5±0.1a
	IN	0.3±0.2 a	0.1±0.1a	0.1±0.1ab	0.1±0.1a	0.4±0.3a
WAF25	C	1.8±0.3cd	0.3±0.1bcd	0.1±0.1b	0.2±0.1de	2.1±0.4b
	FP	1.3±0.1bc	0.2±0.1abc	0.1±0.1ab	0.1±0.1abc	1.5±0.2b
	PS	0.2±0.1a	0.1±0.1a	0.1±0.0a	0.1±0.0ab	0.2±0.1a
	IN	0.2±0.1a	0.1±0.0a	0.1±0.0a	0.1±0.1abc	0.3±0.1a
WAF50	C	6.8±0.2g	1.0±0.2f	0.2±0.1c	0.2±0.1bcde	7.8±0.5e
	FP	3.4±0.6f	0.4±0.1cde	0.1±0.0ab	0.1±0.1abc	3.7±0.6d
	PS	2.0±0.1de	0.3±0.1bcd	0.1±0.1ab	0.2±0.1abcd	2.4±0.0bc
	IN	3.5±0.3f	0.5±0.1de	0.1±0.0ab	0.2±0.1cde	3.9±0.4d

^{a-g}Mean ± SD, n=3. Values followed by the same letter in the same column are not significantly different at 95% confidence level; WF: 100% wheat flour, WWF: 100% whole wheat flour, WAF25: 25% whole amaranth flour/75% wheat flour, WAF50: 50% whole amaranth flour/50% wheat flour; C: control without phytase FP: fungal phytase, PS: *B. pseudocatenulatum* phytase, IN: *B. longum* spp. *infantis* phytase; ^dn.d.: not detected; InsP_{6:3}: hexakis, pentakis, tetrakis and tri phosphate of *myo*-inositol, respectively.

In these samples, a better InsP₆ degrading activity for the *B. pseudocatenulatum* enzyme, compared to *B. longum* spp. *infantis*, was determined. This was also observed during the phytase treatment of infant cereals, which contained more than 2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ of InsP₆ [34].

The biochemical characterization of *B. longum* spp. *infantis* and *B. pseudocatenulatum* phytases showed that these enzymes, although displaying a high specificity for phytate, are not able to degrade InsP₃. Therefore this *myo*-inositol phosphate is accumulated during the reaction [23]. InsP₃ accumulation was

also observed when InsP_6 hydrolysis products were analyzed in bacterial cultures of these bifidobacteria [19,35] or when the purified enzymes were employed during the dextrinization step of infant cereals [34]. In addition, other whole grain breads made with doughs fermented by bifidobacteria also showed accumulation of InsP_3 [22]. In contrast to this, InsP_3 accumulation was not observed in the present study. This suggests that the high activity of the cereal/pseudocereal endogenous phytases and/or unspecific phosphatases present in our flours are responsible for a further degradation of InsP_3 to lower *myo*-inositol phosphates (InsP_2 and InsP_1) or *myo*-inositol. This indicates that the hydrolysis profile depends not only on the utilized phytases but also on the flour (raw material).

3.3 Phytase treatments and phytate/mineral ratios

The substitution of 50% of wheat flour by whole amaranth flour (WAF50) increased the amount of Ca from 43 ± 3 to 125 ± 13 mg/100g. The amount of Fe and Zn was also increased from 1.1 ± 0.1 to 3.2 ± 0.6 mg/100g and from 2.3 ± 0.2 to 3.3 ± 0.7 mg/g, respectively (Table 3). In general, white bread has a low mineral content and should be supplemented to meet the daily requirements for different elements. In this context, whole grain breads are known to be richer sources of macro- and microelements than breads made of refined flours. The amount of Fe in whole wheat bread (WWF) was close to the amount in breads with 25% of whole amaranth flour (WAF25), while the amount of Zn was similar to the content in bread with 50% of amaranth (WAF50). Table 3 shows the contributions of mineral intake from bread to the dietary reference intakes (DRIs) given by the Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine, National Academy of Science [36], taking into account the World Health Organization's recommendation of a daily intake of 250 g of bread [7]. When expressed in terms of DRIs, the control breads (WF and WWF) contribute between 8.2 and 9.0% of the Ca recommended for adults, whereas the breads incorporating amaranth contribute to increased intakes

of this mineral, ranging from 17.6 to 23.8% of DRIs (WAF25 and WAF50, respectively). Regarding Zn, consumption of the WF bread would provide 38.8% for men and 53.4% for women of the daily requirement in adults; while WAF50 breads could provide 57% and 78% of the daily requirements in men and women, respectively. The same trend was observed with Fe, where 25% amaranth flour substitution could supply near 50% of the daily requirement of this mineral in men and 22% in women. Notwithstanding, it is known that the bioavailability of minerals depends on the presence of phytates, which act as inhibitors of mineral uptake and have adverse effects on their bioavailability, owing to the formation of insoluble complexes [37,38]. Solubility of nutrients in the gastrointestinal environment (or bioaccessibility) is a pre-requisite for absorption by enterocytes in the intestine. In this sense, the predicted intakes that are derived from DRIs for the minerals analyzed in this study are certainly overestimated due to the presence of phytate [7]. Small amounts of phytate can seriously compromise minerals bioavailability. As an example, more than $0.135 \mu\text{mol g}^{-1}$ of InsP_6 in fortified bread (dry basis), can affect iron absorption in humans [39]. The phytate/minerals molar ratios are used to predict this inhibitory effect [12,40] and in this regard a series of values have been established representing critical thresholds (Table 3). Mineral bioavailability was predicted for calcium, iron and zinc in our samples based on these ratios. Due to the high calcium content, their InsP_6 /mineral ratios were below the critical threshold in all samples. These ratios were further decreased by the use phytases. For iron and zinc, bifidobacterial phytases generally proved to be more effective than the control fungal phytase in reducing the ratios below the critical values (<1 and <5 , respectively). Thus, molar ratios for iron were still above the critical value in WAF25 samples treated with the fungal phytase, whereas these ratios were below this value in samples with bifidobacterial phytases. Owing to the high phytate contents, breads with 50% amaranth flour still displayed values indicative of an inhibition in Fe and Zn availability. In these samples inhibition was

only relieved for zinc by treatment with the *B. pseudocatenulatum* phytase, further confirming the better performance of this enzyme in cereal mixes [34].

Table 3. Effect of bread formulation on mineral dietary reference intake contribution and mineral availability prediction

Parameter	Units	DRI (mg/day) or InsP ₆ /Mineral (mol mol ⁻¹)	Bread Formulation															
			WF				WWF				WAF25				WAF50			
			C	FP	PS	IN	C	FP	PS	IN	C	FP	PS	IN				
InsP ₆	μmol g dm ⁻¹		n.d.	2.3	0.6	0.3	0.3	1.8	1.3	0.2	0.2	6.8	3.4	2.0	3.5			
Ca ^a	mg 100g dm ⁻¹		48±8 a		43±3 a				92±15 b			125±13 c						
DRI contribution ^b	%	Adults(1000)**	9.01		8.16				17.6			23.8						
InsP ₆ /Ca ^c	mol mol ⁻¹	> 0.24	0.00	0.22	0.06	0.03	0.03	0.08	0.06	0.01	0.01	0.22	0.11	0.06	0.11			
Fe ^a	mg 100g dm ⁻¹		1.1±0.1a		2.1±0.1 b				2.0±0.1 b			3.2±0.6 c						
DRI contribution ^b	%	Man (8)	25.6		51.1				49.0			76.3						
		Woman (18)*	11.6		22.7				21.8			33.9						
InsP ₆ /Fe ^c	mol mol ⁻¹	> 1	0.0	6.0	1.6	0.8	0.8	4.9	3.5	0.5	0.5	11.7	5.9	3.4	6.0			
Zn ^a	mg 100g dm ⁻¹		2.3±0.2a		3.6±0.2 b				2.3±0.2 a			3.3±0.7 b						
DRI contribution ^b	%	Man (11)	38.8		62.3				40.1			57.0						
		Woman (8)	53.4		85.7				55.2			78.4						
InsP ₆ /Zn ^c	mol mol ⁻¹	> 5	0.0	4.7	1.1	0.6	0.6	9.1	3.7	0.6	0.6	16.2	6.8	4.0	7.0			

WF: 100% wheat flour, WWF: 100% whole wheat flour, WAF25: 25% whole amaranth flour/75% wheat flour, WAF50: 50% whole amaranth flour/50% wheat flour; C: control without phytase, FP: treatment with fungal phytase, PS: treatment with *B. pseudocatenulatum* phytase, IN: treatment with *B. longum* spp. *infantis* phytase.

^aValues followed by the same letter in the same row are not significantly different at 95% confidence level; dm, dry matter; n.d., not detected.

^bDRI (Dietary Reference Intakes) contribution (%) for a daily average intake of 250 g of bread if the mineral absorption inhibitors are absent. The values in parenthesis are recommended dietary allowances and adequate intakes for individuals between 19 and >70 years, except for: *(between 31 and >70 years), and **(men between 19 and 70 years, women between 19 and 50 years); Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academy of Science, 2004.

^cThreshold ratios (InsP₆/mineral) for mineral availability inhibition; InsP₆: myo-inositol hexakisphosphate; minerals: Ca, Fe or Zn.

4. Conclusions

We showed that a 25% of amaranth flour can be used as a replacement for wheat flour in bread formulations. This produces an improvement in the nutritional value of bread with only a slight depreciation in quality. Bifidobacterial phytases are able to lower InsP_6 levels during the breadmaking process. The reduction in breads with 25% amaranth leads to InsP_6 levels that are below the threshold of inhibition of mineral availability. Furthermore, due to the food-grade nature of bifidobacteria, the use of their phytases during food manufacture represents an attractive strategy to produce whole grain products (from cereals and pseudocereals) with enhanced nutritional quality.

Acknowledgments

This work was financially supported by grants AGL2011-22669 and Consolider Fun-C-Food CSD2007-00063 from the Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) and PROMETEO/2012/064 from the Generalitat Valenciana, Spain. The contract of I. García-Mantrana from the Consolider Fun-C-Food Project is gratefully acknowledged. We thank Dr. Dinoranz Vélez and Dr. Vicenta Devesa from the Trace Elements Group (IATA-CSIC) for their help with the MARS method for samples digestion.

References

1. Snider M, Liebman M (1992) Calcium additives and sprouted wheat effects on phytate hydrolysis in whole wheat bread. *J Food Sci* 57:118-120
2. Isserlyska D, Karadjov G, Angelov A (2001) Mineral compositions of Bulgarian wheat bread. *Eur Food Res Technol* 213:244-245
3. Katina K, Arendt E, Liukkonen KH, Autio K, Flander L, Poutanen K (2005) Potencial of sourdough for healthier cereal products. *Trends Food Sci Tech* 16:104-112
4. Aleixandre A, Miguel M (2008) Dietary fiber in prevention and treatment of metabolic syndrome. *Crit Rev Food Sci* 48:905-912
5. Gamel TH, Linssen JP, Mesallam AS, Damir AA, Shekib LA (2006) Seed treatments affect functional and antinutritional properties of amaranth flours. *J Sci Food Agric* 86:1095-1102
6. Bodroza-Solarov M, Filiociev B, Kevresan Z, Mandic A, Simurina O (2008) Quality of bread supplemented with popped *Amaranthus cruentus* grain. *J Food Process Eng* 31:602-618
7. Sanz-Penella JM, Wronkowska M, Soral-Smietana M, Haros M (2013) Effect of whole amaranth flour on bread properties and nutritive value. *LWT-Food Sci Technol* 50:679-685
8. Giuseppe C, Coda R, De Angelis M, Di Cagno R, Carnevali P, Gobbetti M (2009) Long-term fungal inhibitory activity of water-soluble extract from *Amaranthus* spp. Seeds during storage of gluten-free and wheat flour breads. *Int J Food Microbiol* 131:189-196
9. Oszvald M, Tamás C, Rakszegi M, Tömösközi S, Békés F, Tamás L (2009) Effects of incorporated amaranth albumins on the functional properties of wheat dough. *J Sci Food Agr* 89:882-889
10. Zapotoczny P, Markowski M, Majewska K, Ratajski A, Henryk K (2006) Effect of temperature on the physical, functional and mechanical characteristics of hot-air-puffed amaranth seeds. *J Food Eng* 76:469-476
11. Silva-Sánchez C, Barba de la Rosa AP, León-Galván MF, De Lumen BO, De León-Rodríguez A, González de Mejía E (2008) Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *J Agric Food Chem* 56:1233-1240
12. Hurrell RF (2003) Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability. *J Nutr* 133:2973S-2977S
13. Fretzdorff B, Brümmer JM (1992) Reduction of phytic acid during breadmaking of whole-meal breads. *Cereal Chem* 69:266-270
14. Nielsen MM, Damstrup ML, Dal Thomsen A, Rasmussen SK, Hansen A (2007) Phytase activity and degradation of phytic acid during rye bread making. *Eur Food Res Technol* 225:173-181
15. Reddy NR, Harland BF, Pierson MD (1989) Accumulation and occurrence of phytate forms in dry beans. *Faseb J* 3:A759
16. Cheryan M (1980) Phytic acid interactions in food systems. *CRC Cr Rev Food Sci* 13:297-335
17. Konietzny U, Greiner R (2003) Phytic acid: Properties and Determination. In: Caballero B, Trugo L, Finglas P (eds) *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, 2nd edn. Elsevier, London

18. Shi Y, Azab AN, Thompson MN, Greenberg ML (2006) Inositol phosphates and phosphoinositides in health and disease. *Sub-Cell Biochem* 39:265-292
19. Haros M, Carlsson NG, Almgren A, Larsson-Alminger M, Sandberg AS, Andlid T (2009) Phytate degradation by human gut isolated *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 and its probiotic potential. *Int J Food Microbiol* 135:7-14
20. Sanz-Penella JM, Tamayo-Ramos JA, Haros M (2012) Application of Bifidobacteria as starter culture in whole wheat sourdough breadmaking. *Food Bioprocess Technol* 5:2370-2380
21. Maenz DD. (2001) Enzymatic characteristics of phytases as they relate to their use in animal feeds. In: Bedford MR, Partridge GG (eds) *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. CABI Publishing, New York
22. Sanz-Penella JM, Tamayo-Ramos JA, Sanz Y, Haros M (2009) Phytate reduction in bran-enriched bread by phytase-producing Bifidobacteria. *J Agric Food Chem* 57:10239-10244
23. Tamayo-Ramos JA, Sanz-Penella JM, Yebra MJ, Monedero V, Haros M (2012) Novel phytases from *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC 27919 and *Bifidobacterium longum* spp *infantis* ATCC 15697. *Appl Environ Microbiol* 78:5013-5015
24. Haros M, Rosell CM, Benedito C (2001) Use of fungal phytase to improve breadmaking performance of whole wheat bread. *J Agr Food Chem* 49:5450-5454
25. Haros M, Bielecka M, Sanz Y (2005) Phytase activity as a novel metabolic feature in *Bifidobacterium*. *FEMS Microbiol Lett* 247:231-239
26. Tanner JT, Barnett SA (1986) Methods of analysis for infant formula: Food and drug administration and infant formula Council Collaborative study, Phase III. *J Assoc Off Anal Chem* 69:777-785
27. Türk M, Sandberg AS (1992) Phytate degradation during breadmaking: effect of phytase addition. *J Cereal Sci* 15:281-294
28. Sanz-Penella JM, Collar C, Haros M (2008) Effect of wheat bran and enzyme addition on dough functional performance and phytic acid levels in bread. *J Cereal Sci* 48:715-721
29. Giannou V, Tzia G (2007) Frozen dough bread: Quality and textural behaviour during prolonged storage-Prediction of final product characteristics. *J Food Process Eng* 79:929-934
30. Martínez-Valverde I, Periago MJ, Ros G (2000) Nutritional meaning of the phenolic compounds from the diet. *Arch Latinoam* 50:5-18
31. Haros M, Rosell CM, Benedito C (2001) Fungal phytase as a potential breadmaking additive. *Eur Food Res Technol* 213:317-322
32. Reale A, Konietzny U, Coppola R, Sorrentino E, Greiner R (2007) The importance of lactic acid bacteria for phytate degradation during cereal dough fermentation. *J Agri Food Chem* 55:2993-2997
33. Sandberg AS, Brune M, Carlsson NG, Hallberg L, Skoglund E, Rossander-Hulthén L (1999) Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 70:240-246
34. Sanz-Penella JM, Frontela C, Ros G, Martinez C, Monedero V, Haros M (2012)

Application of bifidobacterial phytases in infant cereals: Effect on phytate contents and mineral dialyzability. *J Agric Food Chem* 60:11787-11792

35. Haros M, Bielecka M, Sanz Y (2007) *Myo*-inositol hexakisphosphate degradation by *Bifidobacterium infantis*. *Int J Food Microbiol* 117:76-84

36. NAS (2004) National Academy of Sciences. Institute of Medicine Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes: Recommended Intakes for Individuals, vitamins, minerals and macronutrients

37. Sandström B, Sandberg AS (1992) Inhibitory effects of isolated inositol

phosphates on zinc absorption in humans. *J Trace Elem Elect H* 6:99-103

38. Sanz-Penella JM, Laparra JM, Sanz Y, Haros M (2012) Bread supplemented with amaranth: Effect of phytates on *in vitro* iron absorption. *Plant Food Hum Nutr* 67:50-56

39. Sandberg AS, Hulthen LR, Turk M (1996) Dietary *Aspergillus niger* phytase increases iron absorption in humans. *J Nutr* 126:476-480

40. Ma G, Jin Y, Plao J, Kok F, Giusi B, Jacobsen E (2005) Phytate, Calcium, Iron and zinc contents and their molar ratios in foods commonly consumed in China. *J Agric Food Chem* 53:10285-10290.

CAPITULO 3

Expression of bifidobacterial phytases in *Lactobacillus casei* and their application in a food model of whole-grain sourdough bread

Izaskun García-Mantrana^{a,b}

María J. Yebra^a

Monika Haros^b

Vicente Monedero^{a}*

Enviado a International Journal of Food Microbiology 2015

^aLactic Acid Bacteria and Probiotics Laboratory and ^bCereal Group
Institute of Agrochemistry and Food Technology (IATA-CSIC)
Valencia, Spain

ABSTRACT

Phytases are enzymes capable of sequentially dephosphorylating phytic acid to products of lower chelating capacity and higher solubility, abolishing its inhibitory effect on intestinal mineral absorption. Genetic constructions were made for expressing two phytases from bifidobacteria in *Lactobacillus casei* under the control of a nisin-inducible promoter. *L. casei* was able of producing, exporting and anchoring to the cell wall the phytase of *Bifidobacterium pseudocatenulatum*. The phytase from *Bifidobacterium longum* spp. *infantis* was also produced, although at low levels. *L. casei* expressing any of these phytases completely degraded phytic acid (2 mM) to lower *myo*-inositol phosphates when grown in MRS medium. Owing to the general absence of phytase activity in lactobacilli and to the high phytate content of whole grains, the constructed *L. casei* strains were applied as starter in a bread making process using whole-grain flour. *L. casei* developed in sourdoughs by fermenting the existing carbohydrates giving place to an acidification. We determined that in this food model system the contribution of *L. casei* strains expressing phytases to phytate hydrolysis was low, and the phytate degradation was mainly produced by activation of the cereal endogenous phytase as a consequence of the drop in pH. This work constitutes the first use of lactobacilli engineered to express phytases in food fermentation and it shows their capacity to be modified in order to produce enzymes with relevance in food technology processes. The ability of these strains in reducing the phytate content in fermented food products must be evaluated in further models.

KEYWORDS: *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium*, phytase, phytate, sourdough, whole wheat

1. Introduction

The impact of diet on health has led to an increasing demand for functional foods, where high fibre products, as whole grain meal, play an important physiological role in the maintenance of general well-being and health. Epidemiological findings indicate a protective role of whole grain foods against several diseases such as diabetes, certain cancers, cardiovascular disease and obesity, including an improved regulation of blood glucose levels (McIntosh et al., 2003). Refined grains are characterized by a limited nutritional value, whereas whole grains are a better source of fibre, vitamins, minerals and other biologically active compounds as phenolic compounds, lignans, phytosterols and phytic acid. Processing may modify the amount and bioavailability of some of them (Isserliyska et al., 2001; Slavin, 2004). Sourdough fermentation is a traditional process employed since ancient times in baking (Katina et al., 2005). Generally, the microbiota involved in sourdough fermentation is composed of yeasts and lactic acid bacteria (LAB), which represent the majority of the sourdough's microbiota, with counts ranging from 10^8 to 10^9 CFU per g of sourdough. The strains of LAB most frequently found in sourdough belong to the species *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum* (Jekle, et al., 2010). During sourdough fermentation LAB produce a number of metabolites which have been shown to have a positive effect on the texture and staling of bread, e.g. organic acids, exopolysaccharides (EPS) and/or enzymes (Arendt et al., 2007). This results in an enhancement of the nutritional and sensory quality of bread (Katina et al., 2005). The sourdough could also increase the bioavailability of minerals. As was mentioned above, whole grain cereals contain significant amounts of phytic acid (*myo*-inositol (1,2,3,4,5,6)-hexakisphosphate, $InsP_6$) or its salts (phytates). The phytic acid is an organic acid common in plants in which it functions in the storage of phosphorus and cations for growth and it is a well-known inhibitor of mineral,

proteins and trace element bioavailability (Sandberg et al., 1999). However, the phytate hydrolysis decreases the negative effects on mineral absorption and generates lower *myo*-inositol phosphates with potential specific biological activity that may positively affect human health (Shi et al., 2006). Phytases are the enzymes capable of sequentially dephosphorylating phytic acid to products of lower chelating capacity and higher solubility, unlocking the inhibitory effect on mineral absorption (Haros et al., 2009). Cereals have their own endogenous phytase activity that could be enhanced by the low pH resulting from the use of sourdough in the breadmaking process, but this activity is not sufficient to efficiently degrade phytate (Greiner and Konietzny, 2006; Sanz-Penella et al., 2012a). Bacteria of the genus *Lactobacillus* are the main players in sourdough fermentation and LAB:yeast ratio is generally 100:1 (De Vuyst and Neysens, 2005). Yeasts usually show low phytase activity and for high yeast phytase activity to take place, conditions must favour the expression of the phytase genes (Andlid et al., 2004). As far as we know, no real phytases from lactobacilli have been described in the literature. Some reports exist describing the partial degradation of phytate by particular *Lactobacillus* strains (Anastasio et al., 2010; De Angelis et al., 2003; Lopez et al., 2000; Zamudio et al., 2001), but this activity is due to the expression of unspecific phosphatases that act on phytate, although with very low efficiency (Haros et al., 2009a; Sandberg and Andlid, 2002; Zamudio et al., 2001). By the contrary, phytase activity has been described for strains of the genus *Bifidobacterium* and the corresponding genes and enzymes have been characterized, showing that they belong to the Histidine-Acid Phosphatase family (Tamayo-Ramos et al., 2012). The purified bifidobacterial phytases have been applied in several food processes (García-Mantrana et al., 2014; Iglesias-Puig et al., 2014; Sanz-Penella et al., 2012b) and the strain *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 has been used in both direct and indirect breadmaking processes (Sanz-Penella et al., 2009, 2012a), showing its potential in the reduction of phytates in breads and in the

increase of mineral bioavailability. However, the condition of strict anaerobic and fastidious microorganisms of bifidobacteria limits their use in food fermentations. The purpose of this work was to construct *Lactobacillus casei* strains expressing the phytases from *B. pseudocatenulatum* and *Bifidobacterium longum* spp. *infantis* and their application as starters in the breadmaking process of whole-grain bread.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Commercial Spanish whole wheat flour was purchased from the local market. The characteristics of the flour in dry basis were: moisture $14.04 \pm 0.08\%$, protein (N x 5.7) $11.64 \pm 0.08\%$, lipid content $1.67 \pm 0.03\%$ and ash 1.36 ± 0.01 . Compressed yeast (*Saccharomyces cerevisiae*, Levamax, Spain) was used as starter for the breadmaking process and *Lactobacillus casei* strains genetically modified to produce phytases from bifidobacteria were used as starter in sourdough fermentation. In order to construct these strains we used *L. casei* BL23 (wild type) and *L. casei* BL23[*nisKR*] (Hazebrouck et al., 2007), a BL23 derivative in which the *nisKR* two-component system from *Lactococcus lactis* has been integrated in its genome. *L. lactis* MG1363 was used as a host for cloning.

2.2. Methods

2.2.1. Culture media and growth conditions

L. casei strains were grown in MRS medium (Oxoid) at 37°C under static conditions and *L. lactis* was grown in M17 medium (Oxoid) supplemented with 0.5% glucose at 30°C. Antibiotics for plasmid selection (erythromycin and

chloramphenicol) were used at 5 µg/ml when added individually and at 2.5 µg/ml when they were used together.

2.2.2. Construction of genetically modified *Lactobacillus casei* expressing phytase genes from bifidobacteria

The phytase genes from *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 (BIFPSEUDO_03792) and *Bifidobacterium longum* spp. *infantis* ATCC15697 (BLON_0263) were amplified by PCR with the following primer pairs: (5'-GAACCATGGGGATAATGGCGAAAAAC/5'-CACAAAGCTTTCACGTCACGTTTGAACCGGTTTTG) and (5'AATCCATGGCAACACGAGTGATG/5'GACAAGCTTTCAGACCGAACTTCCGGTACGTGCC), respectively (underlined sequences correspond to the NcoI and HindIII sites introduced for cloning). The PCR reaction was carried out in a mixture containing Expand High Fidelity 1X buffer, 100 ng of genomic DNA of each strain, 200 µM of dNTPs, 10 pmol of each primer, 1 µl of Expand High Fidelity Polymerase (Roche), in a volume of 50 µl. The PCR thermal conditions were as follows: 1 cycle at 94°C for 3 min, 30 cycles of 94 °C for 30 seconds, 50 °C for 30 seconds and 72 °C for 2.5 min and a last cycle of 72 °C for 7 min. The amplified genes were examined by agarose gel electrophoresis, purified with the Illustra GFX PCR and gel band DNA purification kit (GE Healthcare) and digested with NcoI y HindIII for cloning into the pNG8048e vector (Steen et al., 2007) digested with the same endonucleases. Vector and phytase genes were ligated with T4 ligase (Invitrogene) and the ligation mixtures were used to transform *L. lactis* MG1363 electrocompetent cells (Holo and Nes, 1995) using a GenePulser apparatus (Biorad) and 0.2 cm electroporation cuvettes. After electroporation, cells were resuspended in 5 ml of M17 medium containing 0.5 M saccharose, 0.5% glucose, 2 mM CaCl₂ and 10 mM MgCl₂ and incubated for 1 h at 30°C. After this period transformants were plated on M17 plates containing 0.5 M saccharose, 0.5%

glucose and 5 µg/ml chloramphenicol and incubated overnight at 30°C. The recombinant plasmids were purified from the lactococcal transformants with the Illustra Plasmid Isolation Kit (GE Healthcare) and examined by sequencing analysis. The obtained plasmids were electrotransformed to competent cells of *L. casei* BL23 [*nisKR*] as previously described (Posno et al., 1991). Transformants were recovered on MRS plates containing erythromycin and chloramphenicol after incubation at 37°C.

2.2.3. Phytase induction experiments

L. casei BL23 [*nisKR* pNG80548e], *L. casei* BL23 [*nisKR* pNGPHY*pseudo*] and *L. casei* BL23 [*nisKR* pNGPHY*longum*] were grown in 20 ml of MRS medium overnight. These cultures were diluted into 50 ml of fresh MRS medium with antibiotics to an OD₅₅₀ of 0.4, and incubated at 37 °C for 1.5 h. At the end of the incubation each culture was divided in two parts and nisin (Sigma-Aldrich) was added at a concentration of 20 ng/ml to one of them. Then, cultures were further incubated for 3 h at 37 °C. The cells were centrifuged at 9,000xg for 15 min (Hermle Z383K centrifuge), the pellet was washed twice with PBS and frozen at -20°C until use. Phytase expression was analyzed by SDS-PAGE. To this end, to 10 µl of bacterial cells resuspended in PBS, 10 µl of 2X Laemmli buffer were added. After boiling for 5 min, samples were centrifuged at 12,000xg for 5 min and loaded onto 10% SDS-PAGE gels that were stained with Coomassie blue.

2.2.4. Preparation of crude extracts for phytase determination

L. casei strains harbouring different plasmids were induced for phytase production and the phytase activity was determined in different cellular fractions. Induced cells were washed twice with Tris-HCl 50 mM pH 7.5 and resuspended in the same buffer. Eight hundred µl of this suspension were mixed with 1 gram of glass beads (0.1 mm diameter) and broken in a BeadBeater apparatus (Biospec Products) for 4

cycles of 40 seconds at maximal speed with 1 min intervals in which the tubes were kept on ice. Unbroken cells were removed after centrifugation for 5 min at 14,000xg at 4 °C. Protein concentration in the crude extracts was determined with the BioRad Dye-binding Protein Assay Kit using BSA as a standard. Cell wall proteins were obtained by enzymatic digestion. The reaction was carried out in 100 µl of Tris-HCl 50 mM pH 7.5 containing bacterial cells to an OD₅₅₀ of 1 and 0.5 M saccharose, 5 mg/ml lysozyme and 5 U/ml mutanolysin. The suspension was incubated at 37 °C for 30 min and bacteria were removed by centrifugation 5 min at 14,000xg and 4 °C. The supernatant was collected and used as crude cell wall extract. The enzymatic extract of sourdoughs were prepared following the method reported by Haros et al. (2001).

2.2.5. Determination of phytase activity

The phytase activity was determined using 500 µl of 0.1 M sodium acetate pH 5.5, containing 1.2 mM phytic acid dipotassium salt (Sigma-Aldrich) and 100 µl of each fraction (whole cells, crude extracts, cell wall extracts or sourdough extracts) (Haros et al., 2001, 2005). After 15 minutes of incubation at 50 °C, the reaction was stopped with 100 µl of trichloroacetic acid at 20%, allowed to stand for 10 min at 0 °C and centrifuged at 14,000xg, 5 min and 4°C (Centrifuge 5415R, Eppendorf). The determination of the enzyme activity was based in a colorimetric quantification at 400nm of free phosphorus released by the hydrolysis of phytate using ammonium molybdovanadate reagent (Fluka Chemika) according to Tanner et al. (Tanner & Barnett, 1986).

2.2.6. Phytate hydrolysis by *L. casei* grown in MRS medium.

In order to estimate the *in vivo* phytate degradation capacity of *L. casei* strains expressing bifidobacterial phytases, bacterial cells were inoculated in MRS broth containing 2 mM phytic acid dipotassium salt, 20 ng/ml of nisin, 2.5 µg/ml of

chloramphenicol and 2.5 µg/ml of erythromycin and incubated for 24 hours at 37 °C. Five ml samples were periodically taken for OD, pH and phytate content determination.

2.2.7. Inoculum and sourdoughs preparation

L. casei strains were grown in 50 ml of MRS medium with appropriated antibiotics at 37 °C for 24 hours. Bacterial cells were centrifuged (9000xg, 10 min, 4 °C, Hermle Z383K centrifuge), washed twice in 0.9% NaCl solution, resuspended in 1 ml of 0.9% NaCl and the OD₅₅₀ was determined. The sourdough formulation consisted in a mixture of whole flour and water (1:2, v/v) with an inoculum of 5 x 10⁸ CFU per gram of flour of *L. casei* BL23 (wild type strain) or the recombinant strains *L. casei* BL23 [*nisKR* pNG8048e], *L. casei* BL23 [*nisKR* pNGPHY*pseudo*] and *L. casei* BL23 [*nisKR* pNGPHY*longum*]. Twenty ng/ml of nisin were added to the sourdough, which included 2.5 µg/ml of chloramphenicol and 2.5 µg/ml of erythromycin when recombinant strains were used. Incubation was carried out at 37 °C for 18 hours. Two control acid sourdoughs were also prepared consisting in the same formulation and conditions, without inoculated lactobacilli and containing a mixture of antibiotics (penicillin, 50 U/ml; streptomycin, 0.05 mg/ml; neomycin, 0.1 mg/ml and cycloheximide, 0.5 mg/ml from Sigma-Aldrich) at 1% v/v. The pH of these controls was adjusted to 4 and 5, respectively, by using lactic acid.

2.2.8. Breadmaking procedure

The formula used for making bread dough consisted of (500g): whole wheat flour 100%; tap water 61% (up to optimum absorption corresponding to 500 BU, Brabender Units); compressed yeast 5% and sodium chloride 1.6%. Wheat sourdoughs without yeast and inoculated with the *L. casei* strains were added in a 10% level in flour basis to bread doughs formula for replacement of flour. The ingredients were mixed for 5.5 min, rested for 10 min, divided into 100 gr pieces,

kneaded and then rested again for 15 min. Doughs were manually sheeted, rolled and fermented up to the optimum volume increase at 28 °C and 80% of relative humidity. Finally, the samples were baked at 165 °C/30min, and then cooled at room temperature for one hour. The formulation samples were done in duplicate.

2.2.9. pH, total titratable acidity

Sourdough, dough and bread pH was determined electrometrically during sampling. Measurements were done in triplicate using a pH meter. For determination of titratable acidity ten grams of sourdough, dough or bread was mixed and blended with 100 ml of acetone:water (5:95, v/v). Later, they were titrated against 0.1 N NaOH up to pH 8.5. The results were expressed as the volume (ml) of NaOH 0.1 N needed for titrating 10 g of sourdough, fermented dough or bread.

2.2.10. Determination of *myo*-inositol phosphates

Phytate (*myo*-inositol hexakisphosphate or $InsP_6$) present in the supernatant of culture media and in breads and lower *myo*-inositol phosphates generated by phytase action (pentakis-, tetrakis- and triphosphate of *myo*-inositol: $InsP_5$, $InsP_4$ and $InsP_3$, respectively) were extracted by ion-exchange chromatography and measured by the HPLC method described by Türk and Sandberg (1992), later modified by Sanz-Penella et al. (Sanz Penella et al., 2008). Identification of the *myo*-inositol phosphates was achieved by comparison with standards of phytic acid di-potassium salt (Sigma-Aldrich). Samples were analyzed in quadruplicate.

2.2.11. Statistical analysis

Multiple sample comparison of the means and Fisher's least significant differences (LSD) were applied to establish significant statistical differences between

treatments. All statistical analyses were carried out with the Statgraphics Plus 7.1 Software (Statistical Graphics Corporation) and differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Construction of *L. casei* strains expressing bifidobacterial phytases

The phytase genes from *B. pseudocatenulatum* and *B. longum* subsp. *infantis* were cloned in *L. casei* BL23 under the control of a nisin-inducible promoter (plasmids pNGPHY*pseudo* and pNGPHY*longum*, respectively). The genes were cloned preserving their coding regions for the signal peptides and C-terminal motifs of the LPXTG class that promote the secretion and covalent anchoring to the cell-wall peptidoglycan via a sortase-catalized reaction (Tamayo-Ramos, et al., 2012). Therefore *L. casei* transformants were expected to express, secrete and display at their surface the bifidobacterial enzymes. The analysis by SDS-PAGE of crude cell extracts from *L. casei* transformed with pNGPHY*pseudo* and induced with 20 ng nisin per ml of culture showed the appearance of an extra protein band of 68 kDa which was not present in extracts of non-induced cells or in cells transformed with the empty vector (pNG8048e) (Fig. 1). This protein size was in agreement with the molecular weight of *B. pseudocatenulatum* phytase. By the contrary no extra bands could be identified in a strain carrying the *B. longum* phytase gene (pNGPHY*longum* plasmid). These results suggested that the *B. pseudocatenulatum* phytase was efficiently expressed in *L. casei*, whereas the *B. longum* enzyme was not expressed or it was expressed at a low level.

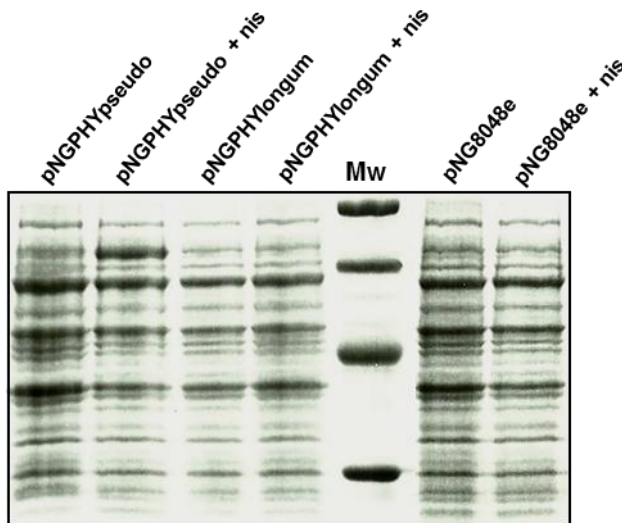


Figure 1. SDS-PAGE analysis of crude extracts from *L. casei* strains carrying different phytase expression plasmids. The clones were uninduced or induced by the addition of 20 ng/ml of nisin (nis). The black arrowhead points to the position of the phytase enzyme from *B. pseudocatenulatum* (pNGPHY*pseudo* plasmid). Mw is a protein molecular weight standard (97, 66, 45 and 30 kDa, respectively).

3.2. The bifidobacterial phytases expressed in *L. casei* are functional

We determined the phytase activity in several fractions of *L. casei* strains (Table 1). Activity in crude extracts of induced *L. casei* transformed with pNGPHY*pseudo* was 4.5-fold higher compared to non-induced cells. These cells exhibited the highest phytase activity, while the capacity of releasing phosphate from phytate in cells carrying pNGPHY*longum* was comparable to that of a strain carrying the control plasmid. Phytase activity was also detected in whole cells and in proteins extracted from the cell walls of *L. casei* transformed with pNGPHY*pseudo* (Table 1), indicating that part of the enzyme was secreted and displayed at the cell surface.

Table 1. Phytase activity in whole cells, cell wall extracts and crude extracts fractions of *L. casei* strains

Plasmid ^a	Phytase Activity ^b	
	Non induced	Induced
whole cells (µgP/min OD)^c		
pNG8048e	0.23±0.07a	0.21±0.05a
pNGPHYlongum	0.16±0.07a	0.21±0.10a
pNGPHYpseudo	0.95±0.20b	1.69±0.84b
cell wall extracts (µgP/min ml)^c		
pNG8048e	0.24±0.04a	0.25±0.09a
pNGPHYlongum	0.28±0.07a	0.33±0.12a
pNGphypseudo	0.91±0.31b	1.49±0.82b
crude extracts (µgP/min mg prot)^c		
pNG8048e	0.97±0.21a	0.96±0.21a
pNGPHYlongum	0.71± 0.12a	1.52±0.85a
pNGPHYpseudo	2.67±0.37b	12.06±0.01b

^apNG8048e: *L. casei* with control plasmid without phytase; pNGPHYlongum: *L. casei* expressing *B. longum* phytase; pNGPHYpseudo: *L. casei* expressing *B. pseudocatenulatum* phytase. ^bMean± SD, n=3. Values followed by the same letter in the same column are not significantly different at 95% confidence level. ^cPhytase activity was quantified as the amount of phosphorous released from phytate per minute and OD units, ml of extract and mg of protein for whole cells, cell wall extracts and crude extracts, respectively. Bacterial cells were non-induced or induced with nisin at 20 ng/ml

3.3. Degradation of phytate by recombinant *L. casei* growing cells

We next tested whether the *L. casei* strains with phytase plasmids could degrade phytic acid when grown in MRS medium. Figure 2 shows the growth curves and

the medium pH of the recombinant strains *L. casei* BL23 [*nisKR* pNG8048e], *L. casei* BL23 [*nisKR* pNGPHYpseudo] and *L. casei* BL23 [*nisKR* pNGPHYlongum].

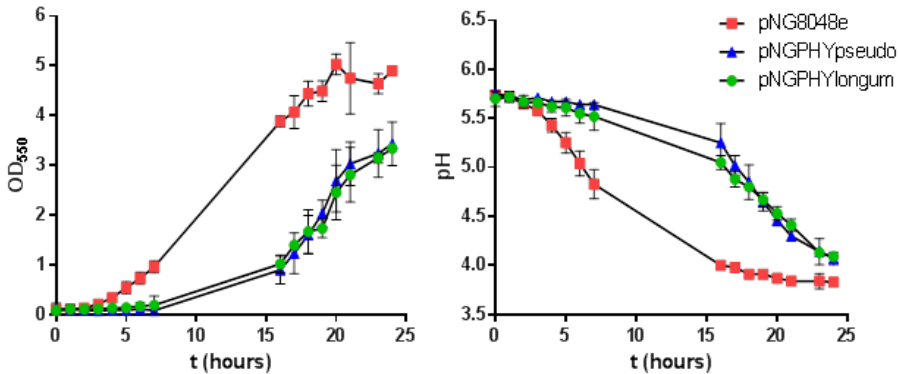


Figure 2. Growth and pH evolution of *L. casei* strains in MRS medium under inducing conditions. The inoculated medium contained 2 mM phytate and 20 ng/ml nisin. The different plasmids carried by *L. casei* BL23 [*nisKR*] are indicated.

Compared to the control, the strains carrying phytase genes grew slower and reached lower final optical densities (4.90 ± 0.08 for *L. casei* BL23 [*nisKR* pNG8048e]; 3.43 ± 0.44 for *L. casei* BL23 [*nisKR* pNGPHYpseudo] and 3.34 ± 0.01 for BL23 [*nisKR* pNGPHYlongum]). Also, differences in the final medium pH were observed (3.83 ± 0.04 for *L. casei* BL23 [*nisKR* pNG8048e] 4.07 ± 0.09 for *L. casei* BL23 [*nisKR* pNGPHYpseudo]; and 4.09 ± 0.01 for BL23 [*nisKR* pNGPHYlongum]). The results clearly showed that the strains harboring the phytase expression plasmids had a drawback in growth. However, phytase-expressing bacteria efficiently degraded the phytic acid (InsP_6), giving rise to different lower *myo*-inositol phosphates (Fig. 3). The degradation rate of InsP_6 was higher for the strain expressing the *B. pseudocatenuatum* phytase and it was completed in around seven hours of growth; whereas transformants expressing the *B. longum* enzyme needed 24 h to almost completely eliminate InsP_6 . The lower *myo*-inositol phosphates InsP_5 and InsP_4 showed a transient accumulation and they

were finally degraded with accumulation of InsP_3 . In the strain carrying pNGPHYlongum accumulation of InsP_4 was also observed at 24 h. No InsP_6 degradation and generation of lower *myo*-inositol phosphates was seen in the control strain (Fig. 3).

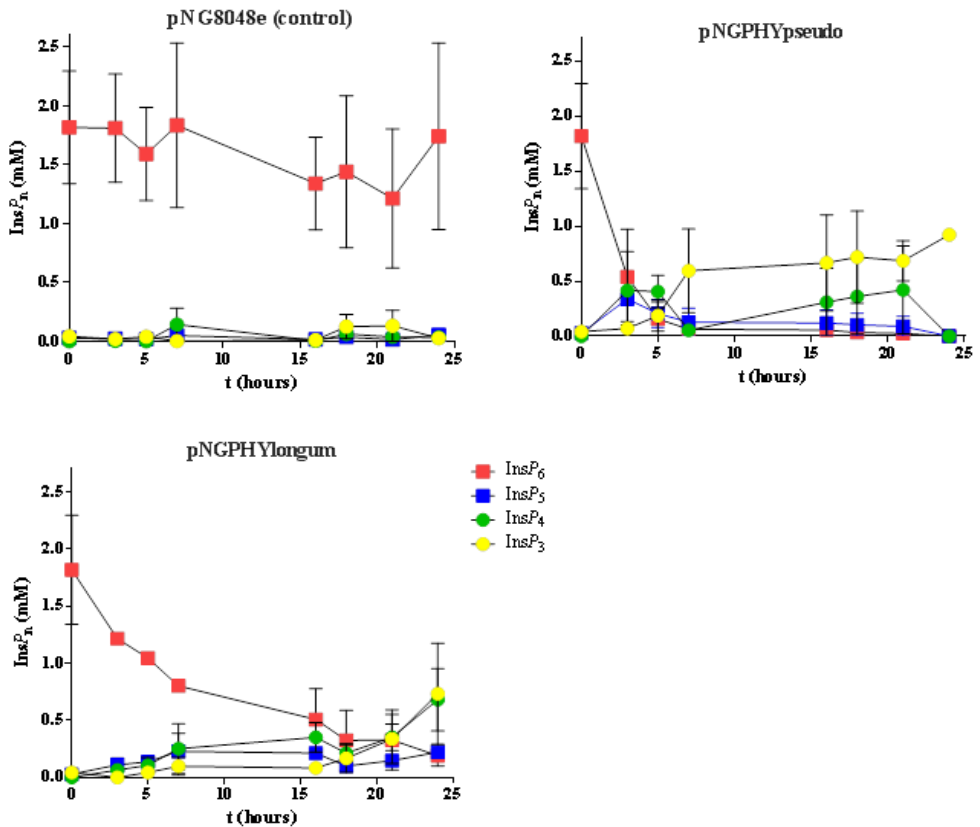


Figure 3. Evolution of *myo*-inositol phosphates in *L. casei* strains grown in MRS medium containing 2 mM phytate. InsP_6 , InsP_5 , InsP_4 and InsP_3 are *myo*-inositol hexakis-, pentakis-, tetrakis- and triphosphate, respectively. The inoculated medium contained 20 ng/ml nisin as inducer of phytase expression. The different plasmids carried by *L. casei* BL23 [*nisKR*] are indicated.

3.4. Characteristics of sourdough prepared with *L. casei* strains

In order to determine the efficacy of the constructed *L. casei* strains in removing InsP_6 in a complex food model, fermentations of sourdough made with whole-wheat flour and the modified lactobacilli were performed. The resulting sourdoughs were afterwards introduced in a whole-wheat breadmaking process. Table 2 shows pH, total titratable acidity (TTA) and LAB counts of sourdoughs. The samples inoculated with wild type *L. casei* BL23 strain showed an acidification from an initial pH of 5.85 to final pH of 3.68, reaching a TTA value of 13.71 ml. This was attributed to lactic acid production showing that the strain adapted to the dough environment and was metabolically active possibly by fermenting the carbohydrate sources from the flour (mainly maltose and maltodextrins), although BL23 strain is not from a sourdough origin. The cell counts increased one order of magnitude, from 5.4×10^8 CFU/g to 6.7×10^9 CFU/g per gram of flour after the incubation period. The sourdough prepared with *L. casei* strain BL23 [pNG8048e] showed similar pH as the sourdough inoculated with the wild type (unmodified) strain, but with a total titratable acidity significantly lower (Table 2). The lower acidification could be explained by lower cell counts. In fact this trend was more pronounced in sourdoughs inoculated with *L. casei* BL23 [pNGPHY*pseudo*] and *L. casei* BL23 [pNGPHY*longum*], with significantly lower cell counts, which resulted in significantly lower TTA values and higher pH values (Table 2). Differences in bacterial cell counts were even observed during the first sampling, although all sourdoughs were initially inoculated with the same bacterial numbers per g.

3.5. Characteristics of the dough and bread

During the fermentation period pH, TTA and volume were determined. The control dough without added sourdough showed the highest pH value, 5.76 and the lowest

TTA value of 3.51, as was expected (Table 2). However, samples made with sourdough inoculated with wild-type *L. casei* BL23 obtained the highest decrease in pH from 5.76 (control dough) to 5.09. In addition, these values were significantly lower than samples inoculated with lactobacilli strains carrying phytase genes. The inclusion of sourdough in the bread formulation did not cause any significant change in the dough pH evolution, which lasted unchanged during the whole yeast fermentation process for all the formulations. Dough volume of bread showed a progressive increase during the fermentation period, reaching optimum dough volume values of 105-107 ml after 1 hour at 28° C, which did not change by the sourdough inclusion. TTA values in fermented dough ranged from 3.51 to 5.69, showing a significant increase in samples inoculated with lactobacilli, due to the lactic acid production, compared to the values recorded in the control without sourdough. As was mentioned above for the pH, TTA values for lactobacilli strains carrying phytase genes were significantly lower compared to samples containing the wild type strain. As a general trend, the inclusion of sourdough to the bread formulation decreased the pH of bread compared to the control sample, whereas TTA values did not show significant differences between samples (Table 2). Nevertheless, TTA values in bread were lower than those obtained in fermented dough. The effect could be explained by weight loss during the breadmaking process. 95% of this loss is due to water evaporation, whereas 5% is due to losses in organic acids content, mainly in crust and outside crumb of the bread during baking (Sanz-Penella et al., 2012a). The observed lower TTA values in bread compared to dough could be attributed to the drop in acetic acid content during baking, due to its volatility compared to lactic acid (Barber et al., 1991). The pH in bread was close to the optimal pH for endogenous phytase and remained constant during mixing and fermentation allowing thus this activity.

Table 2. Values of pH, total titratable acidity (TTA) and CFU in sourdough, dough and whole wheat bread made with *L. casei*.

Sample ^{ab}	pH			TTA ml ^c			Log CFU/g sourdough	
	Sourdough	Dough	Bread	Sourdough	Dough	Bread	Initial	Final
Control	---	5.76±0.13b	5.57±0.07c	---	3.51±0.03a	3.66±0.05a	---	---
BL23 WT	3.68±0.04a	5.09±0.05a	5.03±0.03a	13.71±0.31d	5.69±0.03c	5.23±0.03c	8.73±0.01d	9.83±0.01d
pNG8048e	3.96±0.06ab	5.58±0.24b	5.31±0.00b	9.41±0.81c	4.86±0.35b	5.26±0.36c	8.17±0.04c	8.96±0.05c
pNGPHYlongum	4.41±0.25b	5.55±0.08b	5.66±0.06c	6.02±0.61b	4.55±0.61b	4.71±0.86ab	7.00±0.06a	8.59±0.20b
pNGPHYpseudo	5.49±0.49c	5.71±0.05b	5.60±0.18c	3.32±0.12a	4.39±0.15ab	5.18±0.40c	7.30±0.08b	8.21±0.17a
CA-pH 4	4.20±0.01ab	5.54±0.01b	5.49±0.03c	7.61±1.34b	5.09±0.71bc	4.76±0.93ab	---	---
CA-pH 5	5.44±0.32c	5.71±0.02b	5.60±0.07c	4.12±0.11a	5.05±0.59bc	4.14±0.11ab	---	---

^aMean± SD, n=3. Values followed by the same letter in the same column are not significantly different at 95% confidence level.

^bBread formulations; Control: bread without sourdough; CA: chemically acidified sourdough control; BL23 WT: *L. casei* BL23 (wild type strain); pNG8048e: *L. casei* with control plasmid without phytase; pNGPHYlongum: *L. casei* expressing *B. longum* phytase; pNGPHYpseudo: *L. casei* expressing *B. pseudocatenulatum* phytase.

^cTTA: Total titratable acidity.

3.6. Effect of sourdough on the *myo*-inositol phosphates levels

In order to determine the impact of sourdough inoculated with phytase-expressing lactobacilli in whole-grain breads, phytate and lower *myo*-inositol phosphates were measured (Table 3). As was mentioned above, the endogenous cereal phytase works during mixing, fermentation and first stage of baking as a consequence of a drop in pH. Thus, phytate degradation during cereal dough fermentation has been reported, which was correlated with the endogenous phytase activity (Reale et al., 2007). In our samples this effect was even observed in the control formulation without sourdough when we compared its phytate (InsP_6) contents to those present in flour ($1.38 \pm 0.04 \mu\text{moles/g}$ (dry basis) and $1.53 \pm 0.01 \mu\text{moles/g}$ (dry basis), respectively). The addition of sourdough to the bread formula produced a greater and significant decrease in the amount of InsP_6 compared to the control sample (up to 38% InsP_6 degradation). Samples containing sourdough inoculated with the recombinant strains *L. casei* BL23 [*nisKR pNGPHYpseudo*] and *L. casei* BL23 [*nisKR pNGPHYlongum*] showed the lowest InsP_6 contents. Nevertheless, the *myo*-inositol phosphates levels did not present significant differences between samples with *L. casei* BL23 [*nisKR pNG8048e*] and samples with *L. casei* BL23 [*nisKR pNGPHYpseudo*] or *L. casei* BL23 [*nisKR pNGPHYlongum*]. No differences were also observed in the rest of lower *myo*-inositol phosphates (InsP_5 to InsP_3). The acidified control breads, supplemented with lactic acid to reach the pH found in sourdoughs, displayed a lower degree of hydrolysis but, again, at pH 4 there were no statistically significant differences compared with the samples fermented with lactobacilli. The results indicated that bifidobacterial phytases were not being expressed or that they had a minor contribution to InsP_6 degradation in the dough matrix added with sourdough. The phytase activity in extracts prepared from sourdoughs fermented with strains *L. casei* BL23 [*nisKR pNG8048e*], *L. casei* BL23 [*nisKR pNGPHYpseudo*] and *L. casei* BL23 [*nisKR pNGPHYlongum*] did not show significant differences (activities of 0,69; 0,44 and 0,56 $\mu\text{g P}$ released

Table 3. *Myo*-inositol phosphates concentration in final product.

Sample ^{ab}	<i>myo</i> -inositol phosphates ($\mu\text{mol/g d.m.}$) ^c			
	InsP ₆	InsP ₅	InsP ₄	InsP ₃
Control	1.38±0.04c	0.52±0.14a	0.46±0.07a	0.50±0.13a
BL23 WT	0.97±0.04a	0.56±0.19a	1.02±0.25d	0.84±0.15b
pNG8048e	0.92±0.11a	0.49±0.02a	0.77±0.10cd	0.72±0.12ab
pNGPHYlongum	0.87±0.15a	0.48±0.10a	0.52±0.10ab	0.58±0.15ab
pNGPHYpseudo	0.85±0.10a	0.50±0.07a	0.56±0.06ab	0.59±0.01ab
CA-pH 4	0.98±0.04ab	0.59±0.11a	0.55±0.14ab	0.54±0.14a
CA-pH 5	1.18±0.10b	0.58±0.02a	0.61±0.14ab	0.60±0.07ab

^aMean± SD, n=4. Values followed by the same letter in the same column are not significantly different at 95% confidence level

^bBread formulations; Control: bread without sourdough; CA: chemically acidified control sourdough; BL23 WT: *L. casei* BL23 (wild type strain); pNG8048e: *L. casei* with control plasmid without phytase; pNGPHYlongum: *L. casei* expressing *B. longum* phytase; pNGPHYpseudo: *L. casei* expressing *B. pseudocatenulatum* phytase;

^cInsP₆₋₃: *myo*-inositol containing 6 to 3 phosphates per *myo*-inositol molecule on dry matter basis.

min⁻¹ml⁻¹, respectively). In the sourdough samples degradation of InsP₆ was completed for all the strains after 18 hours of fermentation at 37 °C.

4. Discussion

Lactobacillus is a bacterial genus implicated in numerous food fermentation processes. Owing to its relevant role in sourdough fermentation and the need of a

greater phytase activity for phytate degradation in breadmaking processes, phytase producing lactobacilli have been isolated and characterized for their use in these processes (Anastasio et al., 2010; Chaoui et al., 2003; De Angelis et al., 2003). However, most *Lactobacillus* strains typically responsible for sourdoughs fermentation lack phytase activity. Their phytase degrading capacity is limited and based on non-specific acid phosphatases that are able to hydrolyse phytates at a low rate (Haros et al., 2009; Palacios et al., 2005; Zamudio et al., 2001). The general lack of phytase in lactobacilli is also supported by the lack of phytase encoding genes in the currently available genomes. This correlated with the fact that lactobacilli displaying phytase-like activity were in some cases not able to degrade phytate when used in fermentation processes (Songré-Ouattara et al., 2010; Tang et al., 2010). Notwithstanding, some reports described that specific strains lowered phytate levels in phytate-containing foods (Anastasio et al., 2010; Fischer et al., 2014; Lopez et al., 2000).

Efforts have been made to construct phytase expressing lactobacilli, but the resulting strains have never been used in food applications. The phytase gene of *Aspergillus ficuum* was expressed in *L. casei* (Zuo et al., 2010) but the capacity of the originated strain to degrade phytate was not evaluated. Also, *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus reuteri* strains have been engineered to express phytase genes from *Bacillus subtilis* (*phyA*) (Askelson et al., 2014) and *Aspergillus fumigatus* (*phyW*) (Wang et al., 2014), respectively. In these examples the strains were administered to broiler chickens to study their effects in growth performance.

L. casei is not a typical species reported in sourdough fermentation. However, in some cases it has been isolated from sourdough samples (Gaggiano et al., 2007; Kitahara et al., 2005). This, together with the genetic amenability of strain BL23 and the fact that no lactobacilli with real phytase activity have been employed in a food process, prompted us to engineer this species in order to explore its capacity for phytate reduction by using a breadmaking model with sourdough. This model

was particularly suited for the biotechnological application of phytases, as phytate concentration in whole-grain products is very high and the endogenous phytase activity of cereals is clearly not sufficient to reduce phytate to levels which are non-inhibitory for mineral bioavailability (Greiner and Konietzny, 2006; Sanz-Penella et al., 2012a). Here we showed that *L. casei* BL23 was able to express the phytase enzymes from *B. pseudocatenulatum* and *B. longum* spp. *infantis* by using the nisin-inducible system (NICE) for LAB (Mierau and Kleerebezem, 2005). These two bifidobacterial enzymes possess interesting qualities to be used in food products for human consumption (García-Mantrana et al., 2014; Sanz-Penella et al., 2012b). The *B. pseudocatenulatum* enzyme was efficiently expressed and the activity assays confirmed that part of the enzyme was present at the bacterial surface, showing that the *L. casei* cell-wall anchoring machinery was able to recognize its LPXTG signal (Muñoz-Provencio et al., 2012). This fact is crucial, as InsP_6 degradation has to take place extracellularly. We showed that *L. casei* expressing the *B. pseudocatenulatum* phytase efficiently degraded InsP_6 and accumulated InsP_3 in the growth medium. Therefore, the enzymes expressed in lactobacilli showed the same InsP_6 degrading characteristics already reported for the whole cells of bifidobacteria and for the purified enzymes (Sanz-Penella et al., 2009, 2012b; Tamayo-Ramos et al., 2012). Despite of the fact that no clear phytase activity could be measured in *L. casei* extracts carrying the *B. longum* spp. *infantis* phytase gene, this strain was able to slowly degrade InsP_6 in MRS medium, indicating that the phytase gene was being expressed at low level or that this phytase presented lower activity. These results were also in agreement with the fact that the purified enzyme from *B. pseudocatenulatum* has been proved to be superior to the *B. longum* spp. *infantis* phytase in degrading InsP_6 in several food matrices (García-Mantrana et al., 2014; Sanz-Penella et al., 2012b). The presence of plasmids expressing phytase resulted in detrimental effects on *L. casei* growth in

laboratory medium (MRS) and this effect was more patent for the strain harboring pNGPHY*pseudo* plasmid, which gave the higher expression level of phytase.

The *L. casei* strains were used in sourdough fermentations for breadmaking. *L. casei* BL23 was able to develop in the sourdough to levels that were in the range of LAB counts found in other works (Hammes et al., 2005; Sanz-Penella et al., 2012a). The efficient acidification of *L. casei* BL23 was in agreement with the presence of genes for the uptake and metabolism of maltose and maltotriose in its genome (Monedero et al., 2008). However, as also observed for growth in laboratory medium, phytase expression had an adverse effect on *L. casei* growth during sourdough development, resulting in lowered bacterial counts that were evident even at the beginning of the fermentation, indicating a toxic effect that probably reduced the *L. casei* viability.

Despite of the high capacity of the strains to degrade phytate in liquid medium, phytate removal in the final bread products was not enhanced by the recombinant strains and it was mainly related to acidification. Lactic acid production does not only participate in flavor, storability and nutritional and functional value of sourdough breads (Jekle et al., 2010; Liljeberg et al., 1995) but it also contributes to activate the endogenous phytase in cereals (Leenhardt et al., 2005; Reale et al., 2004, 2007). Thus, it has been reported that an acidification of the sourdough is sufficient to explain the partial phytate degradation (Leenhardt et al., 2005). This degradation is independent of the LAB employed in the sourdough fermentation and only relates to the endogenous phytase activity of each flour (Reale et al., 2007) which, again, questions the presence of phytase in wild lactobacilli.

The inability of *L. casei* strain harboring phytase genes to further reduce phytate levels in dough may respond to a deficient induction capacity of nisin in this kind of food matrix, as the measured phytate activity in sourdoughs did not differ between samples. Although many proteins and enzymes have been expressed in LAB by means of the NICE system (Mierau and Kleerebezem, 2005), induction

was usually carried out in liquid laboratory medium and very few reports on the induction in complex food matrices (de Ruyter et al., 1997), as sourdough, are reported. In addition, to be effective phytases must have access to the phytate in the dough. The flour used in this study was a whole-wheat flour. Therefore, the sourdough mixture (flour plus water) was a suspension containing a high amount of bran particles. The enzymatic accessibility of phytates could be limited by these particles in the flour. Laurikainen et al. (1998) reported that part of the substrate may be inaccessible to the enzymes by steric hindrance. Other researchers have explored the ability of baker yeast with high phytase activity to reduce phytate levels during simulated digestion of wheat gruel with similar negative results (Haraldsson et al., 2005). Therefore, this matrix seems especially refractory to this kind of approach and additional factors such as InsP_6 solubility and cell structure of the meal have to be considered. However, the purified bifidobacterial phytases have been employed in other whole-grain products with excellent results (García-Mantrana et al., 2014; Sanz-Penella et al., 2012b). This also points to low diffusion of the microbial produced enzyme in the whole-flour matrix as one likely cause of the poor efficacy. Finally, although the pH reached in doughs was optimal for the bifidobacterial phytases (Tamayo-Ramos et al., 2012), the presence of inhibitors of the activity of these enzymes cannot be excluded.

This investigation showed the ability of modified *L. casei* to produce enzymes with technological relevance in functional foods application. Nevertheless, the contribution of phytases from modified *L. casei* to phytate hydrolysis in bread was not satisfactory, resulting in products with a substantial amount of residual InsP_6 . This was due to low expression/activity of the bifidobacterial phytases in the sourdough model or a lack of accessibility of the phytate present in the whole grain by the enzymes. Consequently, the phytate hydrolysis was mainly produced by activation of the cereal endogenous phytase as a consequence of the drop in pH.

Current research is under way to test the efficacy of the constructed strains in reducing InsP_6 levels during the fermentation of alternative food matrices.

Acknowledgements

This work was financed by projects Consolider Fun-C-Food CSD2007-00063 from the Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) and PROMETEO/2012/064 from the Generalitat Valenciana, Spain. The contract of I. García-Mantrana from the Consolider Fun-C-Food Project is gratefully acknowledged. We are grateful to Ludovica Iodice for technical assistance.

References

- Anastasio, M., Pepe, O., Cirillo, T., Palomba, S., Blaiotta, G., Villani, F., 2010. Selection and use of phytate-degrading LAB to improve cereal-based products by mineral solubilization during dough fermentation. *Journal of Food Science* 75, 28–35.
- Andlid, T. A., Veide, J., Sandberg, A.S., 2004. Metabolism of extracellular inositol hexaphosphate (phytate) by *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* 97, 157–169.
- Arendt, E. K., Ryan, L. A., Dal Bello, F., 2007. Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology* 24, 165–174.
- Askelson, T. E., Campasino, A., Lee, J. T., Duong, T., 2014. Evaluation of phytate-degrading *Lactobacillus* culture administration to broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 943–950.
- Barber, S., Báguena, R., Benedito de Barber, C., Martínez-Anaya, M. A., 1991. Evolution of biochemical and rheological characteristics and breadmaking quality during a multistage wheat sour dough process. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 192, 46–52.
- Chaoui, A., Faid, M., Belhacen, R., 2003. Effect of natural starters used for sourdough bread in Morocco on phytate biodegradation. *Eastern Mediterranean Health Journal* 9, 141–147.
- De Angelis, M., Gallo, G., Corbo, M.R., McSweeney, P.L. H., Faccia, M., Giovine, M., Gobbetti, M., 2003.
- Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *International Journal of Food Microbiology* 87, 259–270.
- De Ruyter, P. G., Kuipers, O. P., Meijer, W. C., de Vos, W. M., 1997. Food-grade controlled lysis of *Lactococcus lactis* for accelerated cheese ripening. *Nature Biotechnology* 15, 976–979.
- De Vuyst, L., Neysens, P., 2005. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology* 16, 43–56.
- Fischer, M. M., Egli, I. M., Aeberli, I., Hurrell, R. F., Meile, L., 2014. Phytic acid degrading lactic acid bacteria in tef-injera fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 190, 54–60.
- Gaggiano, M., Di Cagno, R., De Angelis, M., Arnault, P., Tossut, P., Fox, P.F., Gobbetti, M., 2007. Defined multi-species semi-liquid ready-to-use sourdough starter. *Food Microbiology* 24, 15–24.
- García-Mantrana, I., Monedero, V., Haros, M., 2014. Application of phytases from bifidobacteria in the development of cereal-based products with amaranth. *European Food Research and Technology* 238, 853–862.

- Greiner, R. and Konietzny, U., 2006. Phytase for food application. *Food Technology and Biotechnology* 44(2), 125-140.
- Hammes, W. P., Brandt, M. J., Francis, K. L., Rosenheim, J., Seitter, M. F. H., Vogelmann, S. A., 2005. Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends in Food Science & Technology* 16, 4–11.
- Haraldsson, A. K., Veide, J., Andlid, T., Alminger M. L., Sandberg, A. S., 2005. Degradation of phytate by high-phytase *Saccharomyces cerevisiae* strains during simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 5438-5444.
- Haros, M., Rosell, C. M., Benedito, C., 2001. Use of Fungal Phytase to Improve Breadmaking Performance of Whole Wheat Bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 5450–5454.
- Haros, M., Bielecka, M., Sanz, Y., 2005. Phytase activity as a novel metabolic feature in *Bifidobacterium*. *FEMS Microbiology Letters* 247, 231–239.
- Haros, M., Carlsson, N., Almgren, A., Larsson-Alminger, M., Sandberg, A.S., Andlid, T., 2009. Phytate degradation by human gut isolated *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 and its probiotic potential. *International Journal of Food Microbiology* 135, 7–14.
- Hazebrouck, S., Pothelune, L., Azevedo, V., Corthier, G., Wal, J.-M., Langella, P., 2007. Efficient production and secretion of bovine beta-lactoglobulin by *Lactobacillus casei*. *Microbial Cell Factories* 6, 12.
- Holo, H., Nes, I. F., 1995. Transformation of *Lactococcus* by electroporation. *Methods in Molecular Biology* 47, 195–199.
- Iglesias-Puig, E., Monedero, V., Haros, M., 2014. Bread with whole quinoa flour and bifidobacterial phytases increases dietary mineral intake and bioavailability. *LWT - Food Science and Technology*, 1–7.
- Isserliyska, D., Karadjov, G., Angelov, A., 2001. Mineral composition of Bulgarian wheat bread. *European Food Research and Technology* 213, 244–245.
- Jekle, M., Houben, A., Mitzscherling, M., Becker, T., 2010. Effects of selected lactic acid bacteria on the characteristics of amaranth sourdough. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 2326–2332.
- Katina, K., Arendt, E., Liukkonen, K.-H., Autio, K., Flander, L., Poutanen, K., 2005. Potential of sourdough for healthier cereal products. *Trends in Food Science & Technology* 16, 104–112.
- Kitahara, M., Sakata, S., Benno, Y., 2005. Biodiversity of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from five sourdoughs. *Letters in Applied Microbiology* 40, 353–357.
- Laurikainen, T., Härkönen, H., Autio, K., Poutanen, K., 1998. Effects of Enzymes in Fibre-Enriched Baking.

- Journal of the Science of Food and Agriculture 76, 239-249.
- Leenhardt, F., Levrat-Verny, M.-A., Chanliaud, E., Rémésy, C., 2005. Moderate decrease of pH by sourdough fermentation is sufficient to reduce phytate content of whole wheat flour through endogenous phytase activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 98–102.
- Liljeberg, H. G. M., Lönner, C. H., Björck, I. M. E., 1995. Sourdough fermentation or addition of organic acids or corresponding salts to bread improves nutritional properties of starch in healthy humans. The Journal of Nutrition 125, 1503–1511.
- López, H. W., Ouvry, A, Bervas, E., Guy, C., Messenger, A, Demigne, C., Remesy, C., 2000. Strains of lactic acid bacteria isolated from sour doughs degrade phytic acid and improve calcium and magnesium solubility from whole wheat flour. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48, 2281–2285.
- McIntosh, G. H., Noakes, M., Royle, P. J., Foster, P. R., 2003. Whole-grain rye and wheat foods and markers of bowel health in overweight middle-aged men. The American Journal of Clinical Nutrition 77, 967–974.
- Mierau, I., Kleerebezem, M., 2005. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. Applied Microbiology and Biotechnology 68, 705–717.
- Monedero, V., Yebra, M. J., Poncet, S., Deutscher, J., 2008. Maltose transport in *Lactobacillus casei* and its regulation by inducer exclusion. Research in Microbiology 159, 94–102.
- Muñoz-Provencio, D., Rodríguez-Díaz, J., Collado, M. C., Langella, P., Bermúdez-Humarán, L. G., Monedero, V., 2012. Functional analysis of the *Lactobacillus casei* BL23 sortases. Applied and Environmental Microbiology 78, 8684–8693.
- Palacios, M. C., Haros, M., Rosell, C. M., Sanz, Y., 2005. Characterization of an acid phosphatase from *Lactobacillus pentosus*: regulation and biochemical properties. Journal of Applied Microbiology 98, 229–237.
- Posno, M., Leer, R. J., Lokman, B. C., Pouwels, P. H., Hoch, J. A., 1991. Incompatibility of *Lactobacillus* vectors with replicons derived from small cryptic *Lactobacillus* plasmids and segregational instability of the introduced vectors. Applied and Environmental Microbiology 57, 1822–1828.
- Reale, A., Mannina, L., Tremonte, P., Sobolev, A. P., Succi, M., Sorrentino, E., Coppola, R., 2004. Phytate degradation by lactic acid bacteria and yeasts during the wholemeal dough fermentation: a 31P NMR study. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 6300–6305.
- Reale, A., Konietzny, U., Coppola, R., Sorrentino, E., Greiner, R., 2007. The importance of lactic acid bacteria for phytate degradation during cereal dough fermentation. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55, 2993–2997.

- Sandberg, A. S., Brune, M., Carlsson, N. G., Hallberg, L., Skoglund, E., Rossander-Hulthén, L., 1999. Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 70, 240–246.
- Sandberg, A.S., Anlid, T., 2002. Phytogetic and microbial phytases in human nutrition. *International Journal of Food Science and Technology* 37, 823–833.
- Sanz Penella, J. M., Collar, C., Haros, M., 2008. Effect of wheat bran and enzyme addition on dough functional performance and phytic acid levels in bread. *Journal of Cereal Science* 48, 715–721.
- Sanz-Penella, J. M., Tamayo-Ramos, J. A., Sanz, Y., Haros, M., 2009. Phytate reduction in bran-enriched bread by phytase-producing bifidobacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 10239–10244.
- Sanz-Penella, J. M., Tamayo-Ramos, J. A., Haros, M., 2012a. Application of bifidobacteria as starter culture in whole wheat sourdough breadmaking. *Food and Bioprocess Technology* 5, 2370–2380.
- Sanz-Penella, J. M., Frontela, C., Ros, G., Martínez, C., Monedero, V., Haros, M., 2012b. Application of bifidobacterial phytases in infant cereals: effect on phytate contents and mineral dialyzability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 11787–11792.
- Shi, Y., Azab, A. N., Thompson, M. N., Greenberg, M. L., 2006. Inositol phosphates and phosphoinositides in health and disease. *Sub-Cellular Biochemistry* 39, 265–292.
- Slavin, J., 2004. Whole grains and human health. *Nutrition Research Reviews* 17, 99–110.
- Songré-Ouattara, L. T., Mouquet-Rivier, C., Humblot, C., Rochette, I., Diawara, B., Guyot, J.-P., 2010. Ability of selected lactic acid bacteria to ferment a pearl millet-soybean slurry to produce gruels for complementary foods for young children. *Journal of Food Science* 75, 261–269.
- Steen, A., Van Schalkwijk, S., Buist, G., Twigt, M., Szeliga, M., Meijer, W., Kuipers, O.P., Kok, J., Hugenholtz, J. 2007. Lytr, a phage-derived amidase is most effective in induced lysis of *Lactococcus lactis* compared with other lactococcal amidases and glucosaminidases. *International Dairy Journal* 17, 926–936.
- Tamayo-Ramos, J. A., Sanz-Penella, J. M., Yebra, M. J., Monedero, V., Haros, M., 2012. Novel phytases from *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC 27919 and *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 5013–5015.
- Tang, A. L., Wilcox, G., Walker, K. Z., Shah, N. P., Ashton, J. F., Stojanovska, L., 2010. Phytase activity from *Lactobacillus* spp. in calcium-fortified soymilk. *Journal of Food Science* 75, 373–376.
- Tanner, J. T., Barnett, S. A., 1986. Methods of analysis for infant formula: Food

- and Drug Administration and Infant Formula Council Collaborative Study, Phase III. Journal - Association of Official Analytical Chemists 69, 777–785.
- Türk, M., Sandberg, A.S., 1992. Phytate degradation during breadmaking: Effect of phytase addition. Journal of Cereal Science 15, 281–294.
- Wang, L., Yang, Y., Cai, B., Cao, P., Yang, M., Chen, Y., 2014. Coexpression and secretion of endoglucanase and phytase genes in *Lactobacillus reuteri*. International Journal of Molecular Sciences 15, 12842–12860.
- Zamudio, M., González, A., Medina, J.A., 2001. *Lactobacillus plantarum* phytase activity is due to non-specific acid phosphatase. Letters in Applied Microbiology 32, 181–184.
- Zuo, R., Chang, J., Yin, Q., Chen, L., Chen, Q., Yang, X., Zheng, Q., Ren, G., Feng, H., 2010. Phytase gene expression in *Lactobacillus* and analysis of its biochemical characteristics. Microbiological Research 165, 329–235.

CAPITULO 4

Reduction of phytate in soy drink by fermentation with *Lactobacillus casei* expressing phytases from bifidobacteria

Izaskun García-Mantrana^{1,2}

Vicente Monedero^{2*}

Monika Haros^{1*}

Plant Foods for Human Nutrition 2015, en prensa

¹Cereal Group and ²Lactic Acid Bacteria and Probiotics Laboratory
Institute of Agrochemistry and Food Technology (IATA-CSIC)
Valencia, Spain.

ABSTRACT

Plant-based food products can be modified by fermentation to improve flavour and the concentration of some biologically active compounds, but also to increase the mineral availability by eliminating anti-nutrient substances such as phytates. The objective of this study was to develop a fermented soybean drink with improved nutritional quality and source of probiotic bacteria by including as starter for fermentation *Lactobacillus casei* strains modified to produce phytase enzymes from bifidobacteria. The *L. casei* strains showed a good adaptation to develop in the soy drink but they needed the addition of external carbohydrates to give rise to an efficient acidification. These strains were able to effectively degrade phytates during the product fermentation, leading to the accumulation of *myo*-inositol triphosphates. In addition, the hydrolysis of phytate in soy drink fermented with the *L. casei* strain expressing the *Bifidobacterium pseudocatenulatum* phytase resulted in phytate/mineral ratios for Fe and Zn, which were below the critical value for reduced mineral bioavailability in humans. This investigation showed the ability of modified *L. casei* to produce enzymes with technological relevance in the design of new functional foods.

KEYWORDS: *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium*, phytase, phytate, soybeans, soy drink, mineral availability

1. Introduction

Legumes provide a range of essential benefits and nutrients such as proteins, lipids, carbohydrates with low glycemic index, minerals, vitamins, dietary fibre. They are also a source of high quality and low-cost protein with higher content than other plants foods (17-25%). Specially, the nutritional quality and content of soybean protein is the highest of those available from plant sources [1]. The lipid content of soybeans is also higher than that of most legumes, with an enhanced presence of polyunsaturated oil as linoleic and α -linolenic acid, but cholesterol free [2]. In addition to these nutritional components, soybeans also contain other compounds such as lecithins, B-group vitamins, minerals as calcium, iron and zinc and phytochemicals. Soy beans are particularly high in phytoestrogens isoflavones which are linked to a reduced risk of hormone-based health due to its antiestrogenic effects [3,4].

Soy drink or soy milk is the aqueous extract of soybeans and can be an ideal substitute for cow's milk for lactose-intolerant population and also can serve as a delivery medium for probiotic organisms to the consumer. Aside of the several health benefits and advantages, its consumption may lead to digestive problems associated with raffinose and stachyose contents [5] and it also contains antinutritional factors, such as proteinase inhibitors, polyphenols and phytates [6,7]. Soybeans contain significant amounts of phytic acid (*myo*-inositol (1,2,3,4,5,6)-hexakisphosphate or InsP_6 or its salts, phytates), a well-known inhibitor of mineral, proteins and trace elements bioavailability [8]. The phytate hydrolysis decreases the negative effect on mineral absorption and generates lower *myo*-inositol phosphates with potential specific biological activity that may positively affect human health [9]. The degree and position of phosphorylation of the *myo*-inositol ring is a determinant factor of both mineral absorption and a specific biological function. Phytases are the enzymes that catalyze this hydrolysis

and several strategies exist to increase their activity, being the most common the addition of exogenous enzyme. Some works describe the partial degradation of phytate by *Lactobacillus* strains, which are main players in food fermentations, but this bacterial genus lacks phytase activity and their low phytate degrading capacity is due to non-specific acid phosphatases able to hydrolyse phytates [10]. In accordance, the reduction in phytate content during lactic acid fermentation is mainly due to an activation of the endogenous plant phytases as a consequence of a drop in pH [11]. By the contrary, phytase activity has been described for strains of the genus *Bifidobacterium* and the corresponding genes and enzymes have been characterized [12]. The strains *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 and *Bifidobacterium longum* spp. *infantis* ATCC15697 and also their corresponding purified phytases have been applied in several food processes [13-16], showing their potential in the reduction of phytates in whole grain foods and the subsequent increase of mineral bioavailability. In a previous work, we constructed *Lactobacillus casei* strains expressing these two phytases and they were used as starters in a breadmaking process of whole-grain sourdough bread [17]. We determined that in this food model system the capacity of these strains to hydrolyse phytate was low. Therefore, the purpose of the current work was to test the performance of the designed *L. casei* strains in a different food matrix where phytate levels are high (soy drink), in order to develop a fermented food with improved nutritional quality and as a probiotic source.

2. Materials and Methods

2.1 Bacterial strains

Lactobacillus casei strains genetically modified to produce phytases from bifidobacteria, *L. casei* BL23 [pNG8048e], *L. casei* BL23 [pNGPHYpseudo] and

L. casei BL23 [pNGPHY*longum*] were obtained in a previous work [17] and used as starter in soy drink fermentation. In these strains bifidobacterial phytase genes from *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 and *Bifidobacterium longum* spp. *infantis* ATCC15697, respectively, are expressed under the control of a nisin-inducible promoter.

2.2 Culture media and growth conditions

L. casei strains were grown in MRS medium (Oxoid) at 37 °C under static conditions. Antibiotics erythromycin and chloramphenicol were used at 5 µg/ml and 10µg/ml, respectively. Bacterial growth was monitored by measuring optical density at 550nm.

2.3 Soy drink preparation

Hundred grams of commercial spanish white soybeans purchased from the local market (Legumbres Biográ, Polinyà, Spain) were placed in boiling water for 30 min. The soybeans were drained, rinsed with cold water and drained again. Six hundred ml of distilled water at 90°C were added to the soybeans. They were then blended with a commercial blender at high speed for 3 min and the resulting slurry was strained through a fine mesh sieve to remove the coarse material (Chufamix system, Chufamix S.L., Valencia, Spain). The soy drink was collected and autoclaved at 121 °C for 20 min and then cooled to room temperature before inoculation. The characteristics of the obtained drink were: protein, 2.36±0.06 g/100 ml; fat, 1.19±0.01 g/100 ml; ash, 0.50±0.01 g/100 ml and dry extract 8.0±0.2 g/100ml.

2.4 Inoculum preparation and fermentation of soy drink with lactobacilli

L. casei strains were grown in 50 ml of MRS medium with appropriated antibiotics at 37 °C for 24 hours. Bacterial cells were centrifuged (9000xg, 10 min, 4 °C, Hermle Z383K centrifuge), washed twice in 0.9% NaCl solution, resuspended in 1 ml of 0.9% NaCl and the OD₅₅₀ was determined. The soy drink (50 ml) was inoculated with 6x10⁷ CFU per ml of *L. casei* BL23 [pNG8048e], *L. casei* BL23 [pNGPHY*pseudo*] or *L. casei* BL23 [pNGPHY*longum*]. Twenty ng/ml of nisin were added to the soy drink, which included 10 µg/ml of chloramphenicol, 5 µg/ml of erythromycin and 0.5% glucose. Incubations were carried out at 37 °C and aliquots of 5 ml were taken at 0, 3, 5, 7, 16, 20, 24 hours of incubation in order to determine pH and cell counts. After this, the samples were immediately stored at -80°C and later freeze-dried using a Genesis 35EL freeze dryer (Virtis) for the determination of phytate content.

2.5 Determination of minerals

The total Fe, Ca and Zn concentrations in soy drink samples were determined using a flame atomic absorption spectrometer at the *Servei Central de Suport a la Investigació Experimental* from the University of Valencia. Previously, samples were placed in a Teflon perfluoroalkoxy (PFA) vessel and treated with 1 mL HNO₃ (14M, Merck) and 1mL of H₂O₂ (30% v/v, Panreac Química, Spain). The Teflon PFA vessels were irradiated at 800 W (15 min at 180°C) in a microwave accelerated reaction system (MARS) from CEM (Vertex, Spain). At the end of the digestion program, the digest was placed in a tube and made up to volume with 0.6 M HCl (Merck). Samples were analysed in triplicate.

2.6 Extraction and determination of *myo*-inositol phosphates

Phytate (*myo*-inositol hexakisphosphate or InsP_6) present in the previously lyophilised soy drink and lower *myo*-inositol phosphates generated by phytase action (pentakis-, tetrakis- and triphosphate of *myo*-inositol: InsP_5 , InsP_4 and InsP_3 , respectively) were extracted by ion-exchange chromatography and measured by the HPLC method described by Türk & Sandberg [18] later modified by Sanz-Penella et al. [19]. Identification of the *myo*-inositol phosphates was achieved by comparison with standards of phytic acid di-potassium salt (Sigma-Aldrich). Samples were analysed in quadruplicate.

3. Results and Discussion

3.1 Growth of the modified strains in soy drink

Preliminary experiments showed that glucose addition (0.5%) was necessary to promote growth and acidification by *L. casei* BL23 strains in soy drink (not shown). *L. casei* BL23 does not ferment sucrose, which is a main sugar in soy drink [20], and has probably a limited capacity to degrade α -galactosides such as raffinose, stachyose or verbascose which are dominating in soy, which explains its poor growth without added extra sugars. Soy drink have been shown to support growth of other probiotic microorganisms such as different species of bifidobacteria, because they possess many glycosidase activities, including α -galactosidases, that allow them to utilize such oligosaccharides from soy [21]. However, strict anaerobic conditions are needed for these bacteria, which may limit their application in food fermentations.

Our results showed that cell growth and acidification profiles in soy drink were different for the three *L. casei* strains employed. *L. casei* BL23 [pNG8048e] (control strain carrying the empty vector) displayed the highest growth and

acidification rate. Specifically, the cell counts increased one order of magnitude, from 6.0×10^7 to 5.2×10^8 CFU/ml, and the strain produced a rapid acidification from an initial pH of 6.50 ± 0.03 to a pH of 4.19 ± 0.09 in 16h. However its population level did not remain stable and the viability decreased to 2.4×10^8 CFU/ml at the end of the fermentation (24h). The loss of viability in the control strain was not seen in the strains expressing phytases. This could be attributed to the stress produced by the fast drop in pH during fermentation by the control strain. In soy drink inoculated with *L. casei* BL23 [pNGPHY*pseudo*] and *L. casei* BL23 [pNGPHY*longum*], expressing two bifidobacterial phytases, both strains showed a prolonged lag phase and slower growth, but at the end of the fermentation higher cell counts (3.4×10^8 and 3.7×10^8 CFU/ml for *L. casei* BL23 [pNGPHY*pseudo*] and *L. casei* BL23 [pNGPHY*longum*], respectively) were obtained compared to the control. Slower growth was paralleled with significantly slower acidification rate and higher final pH values after 24h (4.33 ± 0.05 and 4.41 ± 0.06 for the strains expressing phytases, while it was 3.99 ± 0.04 in the control strain). The same behavior was also observed in these strains during growth in MRS laboratory medium and in sourdough [17], showing that phytase expression had an adverse effect on *L. casei* growth.

3.2 Effect of fermentation on *myo*-inositol phosphates levels

In order to determine the efficacy of the modified *L. casei* strains in removing InsP_6 in soy drink, the evolution of the different *myo*-inositol phosphates during fermentation was determined (Fig. 1). The growth of *L. casei* BL23 [pNGPHY*pseudo*] and *L. casei* BL23 [pNGPHY*longum*] in soy drink resulted in a significant reduction of phytate (InsP_6) content in comparison with the control strain *L. casei* BL23 [pNG8048e], in which *myo*-inositol phosphates level remained constant throughout fermentation. *L. casei* BL23 [pNGPHY*pseudo*] showed the highest breakdown of initial InsP_6 content, with around 85% degradation after 7h

of growth and more than 90% InsP_6 hydrolysis at the end of the fermentation. The contents of InsP_5 , which also has a strong chelating potential on minerals, were also significantly reduced. In contrast, a slower and lower InsP_6 and InsP_5 degrading activity was observed for *L. casei* BL23 [pNGPHYlongum], with a final InsP_6 breakdown around 65%.

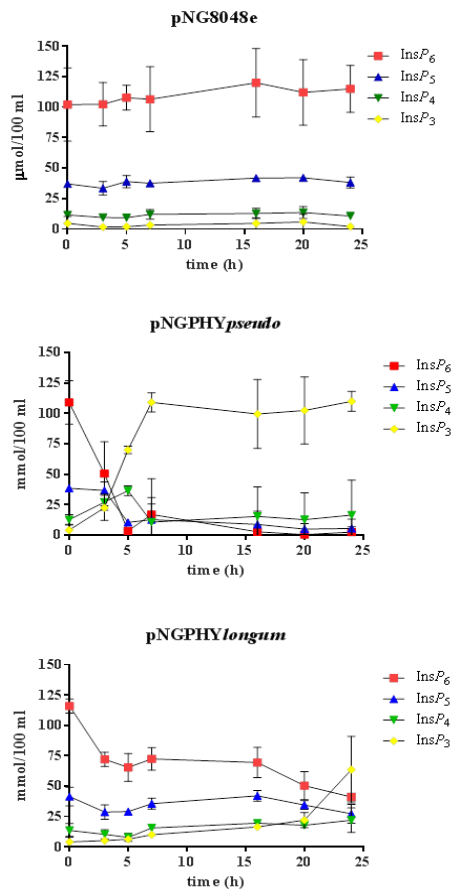


Figure 1. Evolution of *myo*-inositol phosphates in soy drink fermented by different *L. casei* strains. InsP_6 , InsP_5 , InsP_4 and InsP_3 are hexakis-, pentakis-, tetrakis- and tri-phosphate of *myo*-inositol, respectively. pNG8048e corresponds to the *L. casei* strain carrying the control plasmid, whereas pNGPHYpseudo and pNGPHYlongum are *L. casei* strains expressing the phytases from *B. pseudocatenulatum* and *B. longum* spp. *infantis*, respectively.

Fermentation by the *L. casei* strains carrying the phytase genes also led to accumulation of *myo*-inositol triphosphates (InsP_3), particularly in the strain expressing the *B. pseudocatenulatum* phytase. The intake of a soy drink with a higher amount of *myo*-inositol triphosphates could have positive effect on human health not only by increasing the bioavailability of minerals, but also as a result of their bioactive functions in the body [9]. The enzymes expressed in lactobacilli showed the same InsP_6 degrading characteristics already reported for the whole cells of bifidobacteria, for the purified enzymes and when the same strains were tested in MRS broth [22,17,16,13]. Similar to the results obtained in soy, a better degrading activity for the *B. pseudocatenulatum* enzyme or strains which express it, compared with *B. longum* spp. *infantis*, was determined in these previous works. Lactic acid fermentation by lactobacilli was known to reduce the phytate content in plant-based foods and it has been mainly studied in whole-grain cereal products. However, as lactobacilli do not express phytase activity, phytate degradation is essentially related to acidification, that contributes to activate the endogenous phytase from cereals [11]. This is not applicable to soy drink, as this product must be thermically treated prior fermentation, which destroys endogenous enzymes. In a previous work we showed that *L. casei* BL23 expressing the phytase enzymes from *B. pseudocatenulatum* or *B. longum* spp. *infantis* was effective in degrading InsP_6 and accumulating InsP_3 in MRS medium. However, phytate degradation during fermentation of whole-wheat sourdough bread was not enhanced by the recombinant strains [17]. We postulate that phytate degradation in this last food matrix was impaired due to lack of induction of the phytase genes or to a lack of accessibility of the enzymes to phytate in the particulate whole-flour. Contrarily to this, the same *L. casei* strains proved to be very effective in degrading phytate in soy drink, where this compound is abundant. This indicated that induction and phytate accessibility was optimal in this food matrix. Published works on soy drink fermented with probiotic lactic acid bacteria have been focused on bacterial growth

[21,23], on the improvement of the functionality by increasing the isoflavone aglycones content or antioxidant capability [2,24] and in eliminating the undesirable beany flavor and the high content of indigestible and flatulence factors [5]. However, only few works explored the capacity of lactic acid bacteria to degrade phytate in soy [25-27,7]. It is worth noting that fermentation with different strains of lactobacilli resulted in no phytate degradation [7], while partial degradations of 12% and 50% were only obtained with *Pediococcus pentosaceus* [27] and *Leuconostoc mesenteroides* [26] strains, respectively. Therefore, the results presented here are the only example where almost complete removal of InsP_6 in a soy drink was achieved by means of fermentation.

3.3 Mineral availability estimation in fermented soy drink

The bioavailability of minerals depends on the presence of phytates, which act as inhibitors of mineral uptake, due to its chelating potential [28]. The predicted intakes derived from dietary reference intakes (DRI) for minerals analyzed in this study (Table 1) are certainly overestimated due to the presence of phytates [28]. The phytate/mineral molar ratios are used to predict the inhibitory effect of InsP_6 on the bioavailability of minerals [29,30]. In the case of Ca, a phytate/mineral molar ratios value higher than 0.24 starts compromising this mineral bioavailability. For Fe the phytate/Fe molar ratio could impair Fe bioavailability in humans at values higher than 1, whereas for Zn, if the phytate/Zn molar ratio is higher than 5 the bioavailability of Zn could be less than 50% [30]. Mineral bioavailability was predicted for Ca, Fe and Zn in our soy drink samples based on these ratios. The ratios were decreased by the fermentation with *L. casei* strains harbouring the phytase genes in comparison to the control strain, due to the InsP_6 degradation (Table 1).

Table 1. Effect of soy drink fermentation on mineral dietary reference intake contribution and mineral availability prediction

Parameter ^a	Units	DRI ^b (mg/day) or InsP ₆ /Mineral ^c (mol/mol)	Soy drink fermented with ^d		
			pNG8048e	pNGPHYlongum	pNGPHYpseudo
Ca	mg/100ml		6.3 ± 1.9		
DRI contribution	%	Adults (1000)**	1.6		
InsP ₆ /Ca	mol/mol	> 0.24	0.73	0.26	0.02
Fe	mg/100ml		0.40 ± 0.01		
DRI contribution	%	Man (8)	13.3		
		Woman (18)*	5.9		
InsP ₆ /Fe	mol/mol	> 1.0	16	5.7	0.35
Zn	mg/100ml		0.068 ± 0.001		
DRI contribution	%	Man (11)	1.6		
		Woman (8)	2.1		
InsP ₆ /Zn	mol/mol	> 5.0	110	39.5	2.4

^aMean ± SD, n=3

^bDRI (dietary reference intakes) contribution (%) for a daily average intake of 250 ml of soy drink if the mineral absorption inhibitors are absent. DRI in mg per day for Ca in adults is (1000)**, for Fe in man/woman is (8/18*) and for Zn in man/woman is (11/8), respectively. The values in parenthesis are recommended dietary allowances and adequate intakes for individuals between 19 and >70 years, except for: *(between 31 and >70 years), and **(men between 31 and 70 years, women between 19 and 50 years); Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academy of Science, 2004

^cThreshold ratios (InsP₆/mineral) for mineral availability inhibition; InsP₆, myo-inositol hexakisphosphate; minerals, Ca, Fe and Zn

^dSoy drink formulations: soy drink fermented with pNG8048e (*L. casei* with control plasmid without phytase); pNGPHYlongum (*L. casei* expressing *B. longum* phytase); pNGPHYpseudo (*L. casei* expressing *B. pseudocatenulatum* phytase).

The hydrolytic effect of soy drink fermentation on phytates resulted in $\text{Ins}P_6/\text{Ca}$, $\text{Ins}P_6/\text{Fe}$ and $\text{Ins}P_6/\text{Zn}$ ratios, which were below the critical value for the soy drink fermented with the strain expressing the *B. pseudocatenulatum* phytase. In summary, it was concluded that soy can be used as substrate for the growth of modified *L. casei*, although carbohydrate supplementation, a common practice in soy drink manufacture, is needed. We also demonstrated the ability of modified *L. casei* expressing phytases to degrade phytate, leading to the accumulation of myo-inositol triphosphates ($\text{Ins}P_3$). The fermentation of a soy drink by the *L. casei* strain expressing the *B. pseudocatenulatum* phytase leads to enhanced predicted bioavailability for Ca, Fe and Zn. This opens the door to the development of new probiotic fermented vegetable products with low phytate content and higher nutritional and functional value. Efforts are underway to construct food-grade strains expressing the bifidobacterial phytases in *L. casei* and other lactobacilli better suited for growth in soy substrates.

Acknowledgements

This work was financed by projects Consolider Fun-C-Food CSD2007-00063 from the Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) and PROMETEO/2012/064 from the Generalitat Valenciana, Spain. The contract of I. García-Mantrana from the Consolider Fun-C-Food Project is gratefully acknowledged. The authors would like to thank Dr. Dinoraz Vélez and Dr. Vicenta Devesa from the Trace Elements Group (IATA-CSIC) for their help with the samples digestion for mineral determination and Dr. María J. Yebra for critical discussions.

References

1. Messina MJ (1999) Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am J Clin Nutr* 70 (3 Suppl):439S-450S.
2. Donkor ON, Shah NP (2008) Production of beta-glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in soymilk. *J Food Sci* 73 (1):M15-20.
3. Gil-Izquierdo A, Penalvo JL, Gil JJ, Medina S, Horcajada MN, Lafay S, Silberberg M, Llorach R, Zafrilla P, Garcia-Mora P, Ferreres F (2012) Soy isoflavones and cardiovascular disease epidemiological, clinical and -omics perspectives. *Curr Pharm Biotechnol* 13 (5):624-631.
4. Lagari VS, Levis S (2014) Phytoestrogens for menopausal bone loss and climacteric symptoms. *J Steroid Biochem Mol Biol* 139:294-301.
5. Rekha CR, Vijayalakshmi G (2008) Biomolecules and nutritional quality of soymilk fermented with probiotic yeast and bacteria. *Appl Biochem Biotechnol* 151 (2-3):452-463.
6. Sandberg AS (2002) Bioavailability of minerals in legumes. *Br J Nutr* 88 Suppl 3:S281-285.
7. Tang AL, Wilcox G, Walker KZ, Shah NP, Ashton JF, Stojanovska L (2010) Phytase activity from *Lactobacillus* spp. in calcium-fortified soymilk. *J Food Sci* 75 (6):M373-376.
8. Sandberg AS, Brune M, Carlsson NG, Hallberg L, Skoglund E, Rossander-Hulthen L (1999) Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 70 (2):240-246.
9. Shi Y, Azab AN, Thompson MN, Greenberg ML (2006) Inositol phosphates and phosphoinositides in health and disease. *Subcell Biochem* 39:265-292.
10. Zamudio M, Gonzalez A, Medina JA (2001) *Lactobacillus plantarum* phytase activity is due to non-specific acid phosphatase. *Lett Appl Microbiol* 32 (3):181-184.
11. Reale A, Konietzny U, Coppola R, Sorrentino E, Greiner R (2007) The importance of lactic acid bacteria for phytate degradation during cereal dough fermentation. *J Agric Food Chem* 55 (8):2993-2997.
12. Tamayo-Ramos JA, Sanz-Penella JM, Yebra MJ, Monedero V, Haros M (2012) Novel phytases from *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC 27919 and *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697. *Appl Environ Microbiol* 78 (14):5013-5015.
13. Sanz-Penella JM, Frontela C, Ros G, Martinez C, Monedero V, Haros M (2012) Application of bifidobacterial phytases in infant cereals: effect on phytate contents and mineral dialyzability. *J Agric Food Chem* 60 (47):11787-11792.
14. Sanz-Penella JM, Laparra JM, Sanz Y, Haros M (2012) Bread supplemented with amaranth (*Amaranthus cruentus*): effect of phytates on *in vitro* iron absorption. *Plant Food Hum Nutr* 67 (1):50-56.

15. Sanz-Penella JM, Tamayo-Ramos JA, Sanz Y, Haros M (2009) Phytate reduction in bran-enriched bread by phytase-producing bifidobacteria. *J Agric Food Chem* 57 (21):10239-10244.
16. Iglesias-Puig E, Monedero V, Haros M (2015) Bread with whole quinoa flour and bifidobacterial phytases increases dietary mineral intake and bioavailability. *LWT-Food Sci Technol* 60 (1):71-77.
17. García-Mantrana I, Yebra MJ, Haros M, Monedero V (2015) Expression of bifidobacterial phytases in *Lactobacillus casei* and their application in a food model of whole-grain sourdough bread. Submitted.
18. Turk M, Sandberg AS (1992) Phytate degradation during breadmaking-effect of phytase addition. *J Cereal Sci* 15 (3):281-294.
19. Sanz-Penella JM, Collar C, Haros M (2008) Effect of wheat bran and enzyme addition on dough functional performance and phytic acid levels in bread. *J Cereal Sci* 48 (3):715-721.
20. Kumar V, Rani A, Goyal L, Dixit AK, Manjaya JG, Dev J, Swamy M (2010) Sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) in soybean seeds as influenced by genotype and growing location. *J Agric Food Chem* 58 (8):5081-5085.
21. Bozanic R, Lovkovic S, Jelicic I (2011) Optimising fermentation of soymilk with probiotic bacteria. *Czech J Food Sci* 29 (1):51-56.
22. Garcia-Mantrana I, Monedero V, Haros M (2014) Application of phytases from bifidobacteria in the development of cereal-based products with amaranth. *Eur Food Res Technol* 238 (5):853-862.
23. Farnworth ER, Mainville I, Desjardins MP, Gardner N, Fliss I, Champagne C (2007) Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. *Int J Food Microbiol* 116 (1):174-181.
24. Wei Q-K, Chen T-R, Chen J-T (2007) Using of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* to product the isoflavone aglycones in fermented soymilk. *Int J Food Microbiol* 117 (1):120-124.
25. Lai L-R, Hsieh S-C, Huang H-Y, Chou C-C (2013) Effect of lactic fermentation on the total phenolic, saponin and phytic acid contents as well as anti-colon cancer cell proliferation activity of soymilk. *J Biosci Bioeng* 115 (5):552-556.
26. Oh N-S, In M-J (2009) Phytate degradation by *Leuconostoc mesenteroides* KC51 cultivation in soymilk. *Afr J Biotechnol* 8 (13):3023-3026.
27. Raghavendra P, Ushakumari SR, Halami PM (2011) Phytate-degrading *Pediococcus pentosaceus* CFR R123 for application in functional foods. *Benef Microbes* 2 (1):57-61.
28. Sandstrom B, Sandberg AS (1992) Inhibitory effects of isolated inositol phosphates on zinc-absorption in humans. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 6 (2):99-103.
29. Hurrell RF, Reddy MB, Juillerat MA, Cook JD (2003) Degradation of phytic acid in cereal porridges improves iron absorption by human subjects. *Am J Clin Nutr* 77 (5):1213-1219.
30. Ma GS, Jin Y, Piao J, Kok F, Guusje B, Jacobsen E (2005) Phytate, calcium, iron, and zinc contents and their molar ratios in foods commonly consumed in China. *J Agric Food Chem* 53 (26):10285-10290.

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

La presencia de alimentos de origen vegetal como cereales y pseudocereales de grano entero, leguminosas y oleaginosas se ha visto incrementada en la dieta no sólo por su alto poder nutritivo, sino también por su alto valor funcional debido al contenido en sustancias fitoquímicas y fibra dietética que poseen. Sus beneficios para la salud son de sobra reconocidos y el incremento de enfermedades precedidas por el síndrome metabólico ha generado un continuo interés en el consumo de estos alimentos o de productos derivados elaborados. Sin embargo, por otro lado, estos productos derivados suelen poseer una calidad tecnológica y sensorial inferior, además de poseer un elevado contenido en sustancias antinutritivas, como son los fitatos.

Esta investigación ha perseguido una inclusión moderada y gradual de productos integrales de origen vegetal en la formulación de alimentos. La elaboración de productos formulados con un incremento paulatino de granos enteros podría ser una manera adecuada de adaptar al consumidor al cambio sensorial que aporta este tipo de productos (Miller Jones, 2009). A su vez se intentó incrementar al máximo tanto el valor nutritivo como funcional de éstos, mediante la hidrólisis de los fitatos. De esta manera no sólo disminuye el efecto negativo de estas sustancias antinutritivas sobre la biodisponibilidad mineral sino que además se intenta obtener productos de hidrólisis de menor grado de fosforilación con importantes beneficios en la salud. Las estrategias empleadas en esta tesis para conseguir la reducción de fitatos en alimentos han sido principalmente de carácter biotecnológico. La primera estrategia consistió en desarrollar productos de panadería con mezclas de harina de trigo y harina integral de centeno. Para ello, se utilizó la cepa *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 de origen humano como *starter* o iniciador de una masa madre para mejorar tanto la hidrólisis de los fitatos como la producción de

ácidos orgánicos. La masa madre inoculada con bifidobacterias mostró una acidificación desde un pH inicial de 5.9 a un pH final de 4.3. Esto evidenció que las bifidobacterias eran metabólicamente activas, siendo capaces de fermentar la fuente de carbohidratos presentes en la harina, produciendo ácidos orgánicos. La relación molar de ácido láctico/ácido acético fue de 0.73, siendo característico para el metabolismo fermentativo de bifidobacterias sobre hidratos de carbono como maltosa y maltodextrinas presentes en la harina (Van der Meulen y col., 2006). Los resultados mostraron un aumento constante y significativo de ácido acético y ácido L-láctico, mientras que el contenido de ácido D-láctico disminuyó, con el aumento de la proporción de masa madre. El ácido D-láctico es el denominado no fisiológico, ya que no puede ser asimilado por los mamíferos y se le atribuye cierta toxicidad (Rodríguez-Gómez, 2006). Sanz-Penella y col. (2012a) informaron un comportamiento similar cuando esta misma cepa se utilizó en masas preparadas con harina de trigo integral. Estos ácidos orgánicos permanecieron parcialmente en el producto final tras la cocción, lo cual podría contribuir a reducir la respuesta glucémica en estas formulaciones de pan (Liljeberg y col., 1995; Katina y col., 2005; De Angelis y col., 2009). Liljeberg y Björck. (1998) comprobaron que el ácido acético actuaría retrasando el vaciado gástrico, mientras que el ácido láctico lo haría retardando la amilólisis. Este mecanismo fue confirmado posteriormente por Östman y col. (2002a), que sugieren además que el ácido láctico debe estar presente durante el horneado de pan, promoviendo conjuntamente las interacciones entre el almidón y gluten y dificultando así el acceso de las enzimas amilolíticas sobre el almidón (Östman y col., 2002ab; 2005; Katina y col., 2005).

Con el aumento en la proporción de harina integral de centeno en la formulación se observó una disminución en la calidad del pan. Se produjeron cambios significativos en el volumen específico de la pieza panaria y en la dureza de la miga, siendo las muestras con más de 50% de harina integral de centeno las más afectadas. Estos cambios se deben principalmente a la menor proporción de gluten

que contiene la harina de centeno integral en comparación con la harina de trigo (Bodroža-Solarov y col., 2008). Además, la presencia de partículas de salvado pueden dificultar la formación de la red gluten, repercutiendo fundamentalmente en el volumen de la pieza y la suavidad de la miga (Wang y col., 2002). El efecto de la inclusión de masa madre también resultó en una disminución del volumen específico. Las muestras con 20% de masa madre mostraron significativamente mayor dureza de la miga que la muestra control. Contrariamente a esto, por lo general existe la idea sobre un efecto positivo de la adición de masa madre en el tamaño de la pieza panaria y la estructura de la miga (Arendt y col., 2007). Sin embargo, Collar y col. (1994) también obtuvieron panes de menor volumen cuando emplearon un alto porcentaje de masa madre inoculada con cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis* como *starters*. Esto puede ser debido a que durante la fermentación de la masa, donde se produce la caída de pH, podrían favorecerse reacciones amilolíticas o proteolíticas, lo que llevaría a un impacto sobre los componentes que forman la estructura del gluten y el almidón (Rollán y col., 2005). Thiele y col. (2004) demostraron que los macropolímeros de gluten se solubilizan y degradan durante la fermentación con masa madre, dando como resultado una textura de la masa menos elástica en los panes que no la contienen (Clarke y col., 2004; Thiele y col., 2004). Sin embargo, todos los demás parámetros analizados del perfil de textura de la miga en las muestras adicionadas con masa madre no mostraron diferencias significativas en comparación con la muestra control. A medida que el porcentaje de harina integral de centeno aumentó, la aceptabilidad del producto disminuyó, mientras que la proporción de masa madre no influyó de manera significativa. Sin embargo, de las formulaciones implicadas en este estudio, los panes elaborados con 25% de harina integral de centeno fueron los más aceptados, aunque es importante resaltar que las muestras con hasta un 50% de centeno y que contenían masa madre inoculada con bifidobacterias fueron aceptadas por aproximadamente el 85% de los catadores.

Conforme se incrementaba el porcentaje de harina integral de centeno en la formulación, aumentaba gradualmente y significativamente el contenido en fibra dietética total. Teniendo en cuenta la recomendación de la OMS de un consumo de 250 g de pan al día, la sustitución de 50% de harina por harina integral de centeno contribuiría a un aumento en la ingesta de fibra dietética total, alcanzando valores de 52-56% para los hombres y de 79-85% para las mujeres de la ingesta adecuada recomendada. Con respecto a la ingesta diaria recomendada de minerales, la sustitución de la harina por harina integral de centeno contribuyó a una mayor presencia de calcio, lo que llevaría a un incremento desde el 5,5 hasta un 16,5% de la cantidad diaria recomendada (CDR). La contribución a la CDR de hierro también se incrementó significativamente, resultando en un aumento de 38% a 94% para los hombres y de 17% a 42% para las mujeres. Con respecto al zinc los porcentajes de las CDR aumentaron de 34% al 76% para los hombres y de 47% a 104% para las mujeres. Sin embargo, estas ingestas están con total seguridad sobreestimadas debido a la presencia de fitatos (Sanz-Penella y col., 2013). No obstante, la inclusión de masa madre inoculada con bifidobacterias causó una disminución significativa en el contenido de fitatos en los productos desarrollados. El contenido de $InsP_5$, que también tiene un fuerte potencial quelante de minerales, también se vio reducido significativamente. La hidrólisis de $InsP_6$ en las muestras que contienen un 20% de masa madre y 50, 75 o 100% de harina integral de centeno fue significativamente mayor (entre 5 y 11% superior), que la obtenida utilizando masa madre acidificada químicamente en la misma proporción. Este resultado indica que la hidrólisis adicional de fitatos es debida a la actividad de la fitasa de *B. pseudocatenulatum*. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en formulaciones de panes con harina de trigo integral inoculados con bifidobacterias empleando tanto un proceso directo como indirecto (Sanz-Penella y col., 2009; 2012a), mostrando la versatilidad de estos microorganismos en procesos fermentativos diferentes y reduciendo el contenido en fitatos en dos tipos de

harinas de grano entero. Como se ha comentado en el apartado de introducción, las relaciones molares de fitato/mineral se utilizan para predecir el efecto inhibitor de $InsP_6$ sobre la biodisponibilidad de minerales (Ma y col., 2005, Morris y Ellis, 1985). Por lo tanto, como consecuencia de la reducción de $InsP_6$, debido a la inclusión de masa madre, las relaciones molares fitato/mineral del calcio y zinc se mostraron por debajo del valor umbral crítico, por lo que no se predice efecto inhibitor en la absorción de estos dos minerales. Sin embargo, a pesar de la reducción significativa del contenido de fitatos en el producto final, la relación molar $InsP_6/Fe$ se mostró por encima del valor crítico de inhibición, indicando que la biodisponibilidad del hierro sí podría verse afectada. Por otro lado, los panes elaborados con masa madre adicionada con bifidobacterias mostraron una acumulación de trifosfato de *mio*-inositol ($InsP_3$) respecto a las muestras sin masa madre. Sin embargo, éstos no se mantuvieron en concentraciones tan elevadas como las observadas en trabajos anteriores en los que se utilizó esta cepa con diferente tipo de harina (Sanz-Penella y col., 2012a). Esto sugiere que la alta actividad de la fitasa endógena y/o fosfatasa no específicas presentes en nuestras harinas causó una hidrólisis adicional de $InsP_3$ para degradarlo a fosfatos de *mio*-inositol de menor grado de fosforilación ($InsP_2$ y $InsP_1$) o hasta *mio*-inositol. La actividad fitásica endógena de la harina de centeno es muy elevada en comparación con otros cereales, pudiendo llegar a duplicar la del trigo (Greiner y Konietzny, 2006).

Aunque en esta primera estrategia se consiguió una reducción significativa de los fitatos con independencia de la acción de la fitasa vegetal endógena, la eficiencia alcanzada en el proceso no fue la deseada, ya que existía una cantidad de fitato residual considerable en el producto final que aún podía afectar a la biodisponibilidad del hierro.

Existen varias estrategias para aumentar la actividad de la fitasa presente en las materias primas. Además del incremento de la propia fitasa de cereales, o el

empleo de microorganismos con actividad fitásica durante la fermentación panaria, la adición de una enzima aislada y degradadora de fitatos (generalmente a partir de fuentes microbianas) es otra alternativa. Así, en la realización de este trabajo se planteó una segunda estrategia en la que se evaluó el efecto en la hidrólisis de fitatos e incremento del contenido en fosfatos de *mio*-inositol de menor grado de fosforilación por inclusión de las enzimas fitasa purificadas provenientes de dos cepas de bifidobacterias productoras (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* y *B. pseudocatenulatum*). Los resultados se compararon con los obtenidos mediante la adición de una fitasa fúngica comercial durante un proceso de panificación. La estrategia de incluir una fitasa exógena en productos de cereales se utiliza ampliamente en la producción de piensos para animales monogástricos y también se ha explorado en la producción de alimentos a base de cereales y de leguminosas para consumo humano (Haros y col., 2001a; Maenz y col., 2001; Sanz-Penella y col., 2012b; Iglesias-Puig y col., 2015). A diferencia del proceso llevado a cabo en la primera de nuestras estrategias, en esta ocasión se utilizó otro tipo de proceso de panificación que incluyó un método esponja. La harina utilizada en este estudio fue una harina integral de amaranto, elegida por sus cualidades nutricionales especialmente relevantes en comparación con harinas de cereales convencionales como el trigo y por su relativa novedad en Europa, lo que la convierte en un ingrediente atractivo para desarrollar nuevas formulaciones. Además de su gran aporte en minerales, el amaranto también destaca por su elevado contenido en fitatos. Las fitasas provenientes de bifidobacterias utilizadas fueron producidas de manera recombinante en *E. coli* a partir de los genes correspondientes. Debido al modo en que se han obtenido estas enzimas, no pueden ser considerados aditivos de grado alimentario. Sin embargo, su obtención por métodos recombinantes nos permitió estudiarlas en procesos fermentativos a escala de laboratorio con el fin de validar su eficiencia y uso como aditivo, con el objeto de evaluar su aplicabilidad y la conveniencia de obtenerlas a posteriori por metodologías de grado alimentario.

Los resultados de esta investigación mostraron una disminución en la calidad de los productos de panadería desarrollados que contenían tanto harina integral y harina integral de amaranto en términos de dureza de la miga, volumen específico de la pieza panaria, relación de aspecto de la rebanada central y color de la corteza y miga. Sin embargo, la inclusión de 25% de harina integral de amaranto resultó en parámetros tecnológicos similares al pan blanco control. Por otro lado, se observó un ligero incremento en el volumen específico de la pieza panaria en las formulaciones con amaranto tratadas con fitasas en comparación con las muestras no tratadas. Esto podría deberse a que la hidrólisis avanzada de los fitatos provocaría una liberación del calcio que se encontraba quelado. Este calcio libre podría actuar como cofactor de la alfa-amilasa, aumentando así su actividad, lo que repercute en un aumento del volumen de la pieza panaria durante el proceso de fermentación (Haros y col, 2001a). Enzimas como la alfa-amilasa se adicionan frecuentemente en las panificaciones para mejorar la calidad de los productos. De este modo, la adición de fitasas reforzaría este efecto positivo sobre la amilasa endógena de la harina mejorando el volumen de la pieza panaria y la suavidad de la miga. Investigaciones previas mostraron que la inclusión de fitasa fúngica en procesos de fermentación panario reduce significativamente el contenido de fitatos entre 50 y 60% (Türk y col., 1996; Haros y col., 2001ab). La adición de fitasas exógenas de bifidobacterias en este trabajo, mostró una mayor disminución en el contenido de $InsP_6$, alcanzando valores de hasta un 88% con respecto a las muestras sin fitasa y mayor efectividad (hasta 15%) en comparación con las formulaciones con fitasa fúngica. Resultados similares fueron encontrados en la producción de cereales infantiles (Sanz-Penella y col, 2012b). En este estudio, se obtuvo más del 90% de hidrólisis de $InsP_6$ con la fitasa de *B. pseudocatenulatum*, en comparación con una hidrólisis de tan sólo el 68% alcanzada por una fitasa comercial de *Aspergillus niger* utilizada como control positivo. Sin embargo, cabe resaltar que en el caso anterior se trata de otro proceso de elaboración de alimentos,

que difiere en gran medida con el aplicado en el presente trabajo, en el que factores como pH y temperatura varían pudiendo afectar la actividad enzimática, explicando así estas diferencias. Además, en los procesos de elaboración de alimentos es importante también la termoestabilidad de las enzimas. Si éstas son termoestables les permite actuar por un período más prolongado durante el proceso, incluso hasta alcanzadas temperaturas elevadas como ocurre durante la etapa de horneado. La actividad de la enzima de la cepa de *B. pseudocatenulatum* fue superior en comparación a la obtenida con la de *B. longum* subsp. *infantis*. Este mismo comportamiento también se observó en procesos anteriores en los que se han utilizado estas enzimas provenientes de las mismas cepas (Sanz-Penella y col., 2012b; Iglesias-Puig y col., 2015). En contraste con trabajos anteriores, en las panificaciones realizadas con harina de amaranto no se observó la acumulación de trifosfato de *mio*-inositol. Esto sugiere una mayor actividad fitásica presente en estas harinas que podría causar una hidrólisis más avanzada del InsP_6 . La mayor eficiencia de hidrólisis sobre los fitatos por parte de las fitasas de bifidobacterias con respecto a la fitasa fúngica, se vio reflejada en una mayor reducción de las relaciones molares para calcio, hierro y zinc, donde se obtuvieron valores por debajo de los umbrales críticos de inhibición para estos minerales. Considerando la recomendación de la OMS, la ingesta del producto con un 25% de amaranto contribuiría con un 18% a la CDR de calcio para adultos, con un 50% para hombres y un 22% para mujeres con respecto al hierro, mientras que en el caso del zinc sería de un 40% para hombres y un 55% para mujeres, respectivamente. De este modo, con tan sólo una proporción de harina integral de amaranto del 25% en la formulación se consigue preservar la calidad del producto, mientras que la adición de fitasas de bifidobacterias permitió incrementar el valor nutricional superando a su vez el valor nutricional del pan integral.

Como pudimos observar en la primera de las estrategias las bifidobacterias deben desarrollarse en condiciones de estricta anaerobiosis y son microorganismos con

requerimientos nutricionales complejos, lo que dificulta su cultivo. Esto es algo que merma su versatilidad a la hora de ser aplicadas en la producción de alimentos. Por tanto, desarrollar cepas bacterianas más adaptables a un ecosistema de fermentación de alimentos y con actividad fitásica, sería deseable y se presenta como una tercera estrategia biotecnológica para disminuir el contenido de fitatos en alimentos fermentados. El género *Lactobacillus* es uno de los principales géneros dentro de las bacterias lácticas que participan en la elaboración de alimentos, aunque como hemos comentado con anterioridad, las especies de este género no poseen actividad fitasa (Zamudio y col., 2001; Sandberg y Andlid., 2002; De Vuyst y Neysens, 2005; Haros y col., 2009). En esta tercera estrategia se expresó la actividad fitasa de las bifidobacterias en una cepa de *Lactobacillus*. En concreto, la cepa seleccionada fue *Lactobacillus casei* BL23, que ha sido ampliamente utilizada como modelo en el estudio de la fisiología y genética de las bacterias lácticas y para la cual existen ya herramientas genéticas conocidas para su modificación. Hasta el momento se han expresado varias fitasas fúngicas y bacterianas en *Lactobacillus*. Concretamente, fitasas de *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus fumigatus* y *Bacillus subtilis* en algunas cepas de *Lactobacillus*, pero ninguna de ellas se ha aplicado en procesos de fermentación de alimentos (Zuo y col., 2010; Askelson y col., 2014; Wang y col., 2014). Los resultados mostraron que *L. casei* BL23 fue capaz de expresar la fitasa de *B. pseudocatenulatum* utilizando el sistema inducible por nisina (NICE) para bacterias lácticas (Mierau y Kleerebezem, 2005). La fitasa de *B. pseudocatenulatum* se expresó en *L. casei* y además la cepa resultante consiguió degradar eficientemente el InsP_6 , dando lugar a los productos de hidrólisis, en un medio de cultivo de laboratorio utilizado como un primer modelo de estudio. A pesar del hecho de que ninguna actividad fitasa clara podía medirse en los extractos de *L. casei* que portaba el gen de la fitasa de *B. longum* spp. *infantis*, esta cepa también fue capaz de degradar InsP_6 en el medio de laboratorio, aunque más lentamente. Esto indicaba que el gen de la fitasa se expresaba a un

nivel más bajo o que la actividad de este enzima era menor. Este efecto también lo pudimos ver en la anterior estrategia utilizada y resultados similares fueron obtenidos cuando la enzima purificada a partir de *B. pseudocatenulatum* demostró ser superior a la fitasa de *B. longum* subsp. *infantis* en la degradación de InsP_6 en varias matrices alimentarias (Sanz-Penella et al, 2012b; Iglesias-Puig y col., 2015). Posteriormente, decidimos utilizar un segundo modelo de un proceso fermentativo de alimentos con un alto contenido en fitatos. Las cepas de *L. casei* productoras de fitasas de bifidobacterias se utilizaron como *starters* en la elaboración de masa madre de harina integral. La cepa silvestre de *L. casei* BL23 fue capaz de desarrollarse en este medio alcanzando recuentos acordes a los observados habitualmente para bacterias lácticas en otras investigaciones con masa madre (Hammes y col., 2005; Sanz-Penella y col., 2012a). La acidificación eficiente por parte de la cepa silvestre de *L. casei* BL23 concuerda con la presencia de genes en su genoma para la captación y el metabolismo de la maltosa y la maltotriosa (Monedero y col., 2008). Sin embargo, como también se observó en el crecimiento en el medio de laboratorio, la expresión de las fitasas de bifidobacterias provocó un efecto adverso sobre el crecimiento de *L. casei* durante el desarrollo de la masa madre, resultando en menores recuentos bacterianos, evidentes incluso desde el principio de la fermentación. Este comportamiento indicaría un posible efecto tóxico en las cepas debido a la expresión de las fitasas, que se tradujo en una menor viabilidad de la cepa inoculada. La inclusión de masa madre en formulaciones de pan integral produjo un descenso significativo de los niveles de fitatos en comparación a la muestra control. Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre las muestras adicionadas con masa madre inoculadas con las cepas recombinantes, y la muestra control adicionada con masa madre acidificada químicamente a pH 4. Por lo tanto, la degradación de los fitatos se produjo principalmente por la activación de la fitasa endógena del cereal a consecuencia del descenso del pH, debido a la producción de ácido orgánicos (Leenhardt y col.,

2005). La incapacidad de las cepas *L. casei* que albergaban los genes de las fitasas para reducir aún más los niveles de fitatos en el pan puede responder a una deficiente capacidad de inducción de la expresión génica por parte de la nisina en este tipo de matriz alimentaria, ya que la actividad fitásica medida en las masas madre no difirió entre muestras. Este hecho pone en evidencia que posiblemente la acidificación y la consiguiente activación de la fitasa endógena del cereal es el factor más relevante para la hidrólisis de los fitatos en el sistema modelo en estudio. Muchas proteínas y enzimas se han expresado en bacterias lácticas por medio del sistema NICE (Mierau y Kleerebezem, 2005). Sin embargo, la inducción normalmente se suele llevar a cabo en un medio líquido de laboratorio y apenas existen trabajos sobre la inducción en matrices alimentarias complejas (de Ruyter y col., 1997), como es una masa madre. Además, para que las fitasas actúen y sean eficaces, éstas deben de tener acceso a su sustrato contenido en la matriz alimentaria. La harina utilizada en este estudio fue una harina integral, que al mezclarse con el agua para formar la masa madre y más tarde la masa, se convierte en una suspensión grosera con un alto contenido de partículas de salvado en su interior. De este modo, la accesibilidad enzimática a los fitatos podría verse limitada debido a que se encuentran fundamentalmente en el interior de la fracción de salvado. Laurikainen y col. (1998) reportaron que parte del sustrato puede quedar así inaccesible a las enzimas por impedimento estérico. Además, existe la posibilidad de la presencia de inhibidores de la enzima, como puede ser la propia liberación del fosfato al medio tras la hidrólisis (Haros y col., 2001a).

Los resultados ponen de manifiesto la capacidad de modificar una cepa de *L. casei* para producir enzimas con relevancia tecnológica en el diseño de alimentos con cualidades nutricionales mejoradas. Sin embargo, la contribución de las fitasas de las cepas de *L. casei* modificadas para alcanzar una hidrólisis óptima y adicional de los fitatos en productos de panadería no fue satisfactoria, dando como resultado un producto con una cantidad residual elevada de InsP_6 . Es por esta razón que se

decidió estudiar la eficacia de las cepas de *L. casei* recombinantes en la reducción de los niveles de InsP_6 durante la fermentación de matrices alimentarias alternativas. Como tercer modelo se eligió una bebida o *leche* de soja como sustrato para la fermentación. En este caso se trataba de una matriz líquida, que aunque también posee un alto contenido en fitatos, reflejaba mejor las condiciones de cultivo del primer modelo, en los que se habían obtenido resultados satisfactorios. Hasta el momento, los trabajos publicados sobre bebida de soja fermentada con bacterias lácticas se han centrado en el crecimiento y la viabilidad de las cepas empleadas (Beasley y col., 2003; Farnworth y col., 2007; Bozanic y col., 2011; Bao y col., 2012), así como en la mejora de la funcionalidad de este alimento incrementando el contenido de isoflavonas biodisponibles o la capacidad antioxidante (Wei y col., 2007; Donkor y Shah, 2008; Hubert et al., 2008; Rekha y Vijayalakshmi, 2008). También existen investigaciones encaminadas a solventar la eliminación de sabores indeseables que otorgan las habas de las leguminosas, como también a reducir el alto contenido de sustancias indigeribles que provocan flatulencias (Bao y col., 2012). Sin embargo, existen pocos trabajos que hayan estudiado la capacidad de degradar los fitatos de la soja por parte de bacterias lácticas. Algunas fermentaciones llevadas a cabo con diferentes cepas de lactobacilos no resultaron eficaces a la hora de degradar el fitato (Tang y col., 2010; Lai y col., 2013), mientras que utilizando cepas de *Pediococcus pentosaceus* (Raghavendra y col., 2011) y *Leuconostoc mesenteroides* (Oh y In, 2009), tan sólo se alcanzaron hidrólisis de fitatos del orden de un 12% y 50%, respectivamente. Los resultados en este tercer modelo mostraron que las cepas de lactobacilos productores de fitasas se desarrollaron deficientemente en la bebida de soja elaborada en el laboratorio y que ésta debía ser adicionada con glucosa como azúcar fermentable para sustentar el crecimiento. Esto es debido a que *L. casei* BL23 tiene una capacidad muy limitada de utilizar los principales carbohidratos presentes en la soja (sacarosa y alfa-galactósidos como la rafinosa y la estaquiosa)

(Bozanic y col., 2011), lo que explica su pobre crecimiento en la bebida de soja sin la adición extra de azúcares. Una bebida de soja resulta ser un medio más favorable para el crecimiento de otros microorganismos probióticos tales como diferentes especies de bifidobacterias. Éstas poseen enzimas glicosidásicas, con actividad α -galactosidasa, que les permiten utilizar los oligosacáridos presentes en la soja y favorecer así su desarrollo (Kumar y col., 2010). Sin embargo, y como ya hemos mencionado con anterioridad, la necesidad de mantener condiciones anaerobias estrictas para su crecimiento, puede limitar su aplicación en la fermentación de alimentos. Además, otro gran inconveniente que presentan estos microorganismos es que, con la fermentación de los azúcares, producen grandes cantidades de ácido acético, que confiere un sabor y aroma al producto final que generalmente no es aceptado por el consumidor. Esta es la razón por la cual sólo algunas cepas específicas de bifidobacterias son empleadas en fermentaciones o suelen añadirse al alimento como un cultivo adjunto, al final del proceso, de forma que no participan en la fermentación del mismo. Sin embargo, recientemente, investigadores han trabajado para conseguir bifidobacterias con mayor aplicabilidad mediante su modificación para que produzcan bajos niveles de ácido acético (Margollos y Sánchez, 2012), por lo que su impacto organoléptico sería menor.

Aplicando las cepas de *L. casei* modificadas para expresar fitasas se obtuvieron perfiles de crecimiento bacteriano y de acidificación diferentes para las tres cepas ensayadas (control y cepas expresando las dos fitasas de bifidobacterias). Las diferencias en los recuentos de células bacterianas se observaron incluso durante la primera toma de muestras, aunque todas las bebidas de soja se inocularon inicialmente con los mismos números de bacterias por unidad de volumen. En las bebidas de soja inoculadas con las cepas *L. casei* que portaban los genes de las fitasas, se observaron recuentos de células significativamente más bajos, lo que resultó en una acidificación más lenta además de valores finales de pH más

elevados. Ambas cepas crecieron más lentamente mostrando una fase de latencia con respecto a la cepa control, siendo este efecto más pronunciado para la cepa que contenía la fitasa de *B. pseudocatenulatum*. Este perfil de crecimiento y comportamiento está en consonancia a lo acontecido en los otros dos modelos utilizados con anterioridad (medio de cultivo y masa madre). La expresión de la fitasa tuvo de nuevo un efecto adverso sobre el crecimiento de *L. casei* durante la fermentación, resultando en bajos recuentos bacterianos incluso al principio de la fermentación, lo que podría ser un inconveniente para el cultivo. La adición de las cepas de *L. casei* que expresaban fitasas a la bebida de soja resultó en una reducción significativa del contenido de InsP_6 en comparación con la cepa control. La cepa productora de la fitasa de *B. pseudocatenulatum* mostró una mayor eficiencia de degradación. El porcentaje de hidrólisis de InsP_6 fue de alrededor de 85% transcurridas tan sólo 7 horas de fermentación, obteniéndose más de un 90% al final del proceso. El contenido de InsP_5 , también se vio reducido significativamente. Por el contrario, se observó una actividad de degradación más lenta y menor tanto para InsP_6 como para InsP_5 en el caso de la cepa *L. casei* productora de la fitasa de *B. longum* subsp. *infantis*, con un porcentaje de hidrólisis de InsP_6 en torno al 65%. Por otro lado, a diferencia de estrategias anteriores donde utilizamos las bacterias directamente y el enzima fitasa aislado y al igual que en el medio de laboratorio, los productos de hidrólisis permanecieron en concentraciones elevadas en las bebidas de soja elaboradas con las cepas de *L. casei* que portan los genes de las fitasas respecto a la muestra control. Particularmente, este hecho fue además más pronunciado en la cepa que expresa la fitasa de *B. pseudocatenulatum*. Es importante recalcar que en la soja no encontramos actividad fitasa endógena tras el proceso de elaboración de la bebida debido al drástico tratamiento térmico durante la elaboración y ésta solo actúa en las primeras etapas del proceso, por lo que tanto la capacidad como el perfil hidrolítico de fitatos se puede atribuir básicamente a las cepas construidas. Por lo tanto, los resultados que aquí se

presentan son el único ejemplo en el que la eliminación casi completa de InsP_6 en una bebida de soja se consigue por medio de la fermentación. La biodisponibilidad mineral en el caso de la bebida de soja se predijo también para el calcio, hierro y zinc en base a las relaciones molares fitato/minerales anteriormente descritas. Las relaciones molares de la bebida elaborada con la cepa control mantuvieron valores superiores a los límites indicados, por lo que la absorción de minerales tras la ingesta de esta bebida se vería comprometida. La fermentación con las cepas de *L. casei* portadoras de los genes de las fitasas consiguió disminuir estas proporciones. Aunque en el caso de la cepa con la fitasa de *B. longum* subsp. *infantis* los valores se encontraron aún por encima del umbral de inhibición, el efecto de la degradación de los fitatos debido a la fermentación por parte de la cepa que expresa la fitasa de *B. pseudocatenulatum* logró reducir las relaciones molares fitato/mineral a valores que se encuentran por debajo de los umbrales descritos para la inhibición de la absorción de calcio, hierro y zinc. De este modo, una bebida de soja fermentada por esta cepa podría ver aumentada la biodisponibilidad de los minerales presentes. Además, el hecho de que los lactobacilos permanezcan vivos en este tipo de producto y si la construcción de las cepas se realiza mediante técnicas de grado alimentario, podría dar lugar al desarrollo de productos probióticos a base de soja con cualidades nutricionales mejoradas, debido a un incremento en la biodisponibilidad de proteína de alto valor biológico y minerales.

Bibliografía

- Arendt, E.K., Ryan, L.A.M., & Dal Bello, F. (2007). Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiol*, **24**:165–174.
- Askelson, T.E., Campasino, A., Lee, J.T., & Duong, T. (2014). Evaluation of phytate-degrading *Lactobacillus* culture administration to broiler chickens. *Appl Environ Microbiol*, **80**:943–950.
- Bao, Y., Zhang, Y., Li, H.L.F., Wang, S., Dong, X.S.F., Yao, G., & Sun, T.Z.H. (2012). In vitro screen of *Lactobacillus plantarum* as probiotic bacteria and their fermented characteristics in soy drink. *Ann Microbiol*, **62**:1311–1320.
- Beasley, S., Tuorila, H., & Saris, P.E.J. (2003). Fermented soy drink with a monoculture of *Lactococcus lactis*. *Int J Food Microbiol*, **81**:159–162.
- Božanić, R., Lovković, S., & Jeličić, I. (2011). Optimising Fermentation of Soy drink with Probiotic Bacteria. *J Food Sci*, **29**:51–56.
- Bodroza-Solarov, M., Filičev, B., Kevresan, Z., Mandić, A., & Simurina, O. (2008). Quality of bread supplemented with popped *Amaranthus cruentus* grain. *J Food Process Eng*, **31**:602–618.
- Collar, C., Benedito de Barber, C., & Martínez-Anaya, M.A. (1994). Microbial sourdoughs influence acidification properties and breadmaking potential of wheat dough. *J Food Sci*, **59**:629–633.
- De Angelis, M., Gallo, G., Corbo, M.R., McSweeney, P.L.H., Faccia, M., Giovine, M., & Gobetti, M. (2003). Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Int J Food Microbiol*, **87**:259–270.
- De Ruyter, P. G., Kuipers, O. P., Meijer, W. C., & de Vos, W. M. (1997). Food-grade controlled lysis of *Lactococcus lactis* for accelerated cheese ripening. *Nat Biotechnol* **15**:976–979.
- De Vuyst, L., & Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci. Technol*, **16**:43–56.
- Donkor, O.N., & Shah, N.P. (2008). Production of beta-glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in soy drink. *J Food Sci*, **73**:15–20.
- Farnworth, E.R., Mainville, I., Desjardins, M.P., Gardner, N., Fliss, I., & Champagne, C. (2007). Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. *Int J Food Microbiol*, **116**:174–181.
- Greiner, R., & Konietzny, U. (2006). Phytase for food application: A review. *Food Technol. Biotechnol*, **44**:125–140.
- Hammes, W. P., Brandt, M. J., Francis, K. L., Rosenheim, J., Seitter, M. F. H., & Vogelmann, S. A. (2005). Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends Food Sci Technol*, **16**:4–11.
- Haros, M., Rosell, C. M., & Benedito, C. (2001a). Use of fungal phytase to improve breadmaking performance of whole wheat bread. *J Agr Food Chem*, **49**:5450–5454.
- Haros, M., Rosell, C. M., & Benedito, C. (2001b). Fungal phytase as a potential breadmaking additive. *Eur Food Res Technol*, **213**:317–322.
- Haros, M., Carlsson, N., Almgren, A., Larsson-Alminger, M., Sandberg, A.-S., & Andlid, T. (2009). Phytate degradation by

human gut isolated *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 and its probiotic potential. *Int J Food Microbiol*, **135**:7–14.

Hubert, J., Berger, M., Nepveu, F., Paul, F., & Daydé, J. (2008) Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soy germ. *Food Chem*, **109**:709–721.

Iglesias-Puig, E., Monedero, V., & Haros, M. (2015). Bread with whole quinoa flour and bifidobacterial phytases increases dietary mineral intake and bioavailability. *LWT - Food Sci Technol*, **60**:71–77.

Katina, K., Arendt, E., Liukkonen, K.-H., Autio, K., Flander, L., & Poutanen, K. (2005). Potential of sourdough for healthier cereal products. *Trends Food Sci Technol*, **16**:104–112.

Kumar, V., Rani, A., Goyal, L., Dixit, A.K., Manjaya, J.G., Dev, J., & Swamy, M. (2010) Sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) in soybean seeds as influenced by genotype and growing location. *J Agric Food Chem*, **58**:5081–5085.

Lai, L.R., Hsieh, S.C., Huang, H.Y., & Chou, C.C. (2013) Effect of lactic fermentation on the total phenolic, saponin and phytic acid contents as well as anti-colon cancer cell proliferation activity of soymilk. *J Biosci Bioeng* **115**:552–556.

Laurikainen, T., Härkönen, H., Autio, K., & Poutanen, K. (1998). Effects of Enzymes in Fibre-Enriched Baking. *J Sci Food Agric*, **76**:239–249.

Leenhardt, F., Levrat-Verny, M.A., Chanliaud, E., & Rémésy, C. (2005). Moderate decrease of pH by sourdough fermentation is sufficient to reduce phytate content of whole wheat flour through

endogenous phytase activity. *J Agric Food Chem*, **53**:98–102.

Liljeberg, H., Lönner, C., & Björck, I. (1995). Sourdough fermentation or addition of organic acids or corresponding salts to bread improves nutritional properties of starch in healthy humans. *J Nutr*, **125**:1503–1511.

Liljeberg, H., & Björck, I. (1998). Delayed gastric emptying rate may explain improved glycaemia in healthy subjects to a starchy meal with added vinegar. *Eur J Clin Nutr*, **52**:368–371.

Ma, G., Jin, Y., Piao, J., Kok, F., Guusje, B., & Jacobsen, E. (2005). Phytate, calcium, iron, and zinc contents and their molar ratios in foods commonly consumed in China. *J Agr Food Chem*, **53**:10285–10290.

Maenz, D. D. (2001). Enzymatic characteristics of phytases as they relate to their use in animal feeds. In *Enzymes in Farm Animal Nutrition*; Bedford, M.R., Partridge, G.G., Eds.; CABI Publishing: New York, NY, pp 61–84.

Margollos, A., & Sánchez, B. (2012). Selection of a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain with a decreased ability to produce acetic acid. *Appl. Environ. Microbiol*, **78**:3338–3342.

Mierau, I., Olieman, K., Mond, J., Smid, E.J. (2005). Optimization of the *Lactococcus lactis* nisin-controlled gene expression system NICE for industrial applications. *Microb Cell Fact*, **4**:16.

Miller Jones, J. (2009). The second C&E Spring Meeting and Third International Whole Grain Global Summit. *Cereal Food World*, **54**:132–135.

Monedero, V., Yebra, M. J., Poncet, S., & Deutscher, J. (2008). Maltose transport in *Lactobacillus casei* and its regulation by

inducer exclusion. *Res Microbiol*, **159**:94–102

Morris, E.R. & Ellis, R. (1985). Bioavailability of dietary calcium-effect of phytate on adult men consuming nonvegetarian diets. In: Kies C Eds. ACS Symposium Series 275: Nutritional Bioavailability of Calcium. American Chemical Society: Washington DC, USA, pp 36.

Oh, N.S., & In, M.J. (2009). Phytate degradation by *Leuconostoc mesenteroides* KC51 cultivation in soy drink. *African J Biotechnol*, **8**:3023–3026.

Östman, E.M., Nilsson, M., Liljeberg Elmstahl, H.G.M., Molin, G., & Björck, I.M.E. (2002a). On the effect of lactic acid on blood glucose and insulin responses to cereal products: Mechanistic studies in healthy subjects and in vitro. *J Cereal Sci*, **36**:339–346.

Östman, E.M., Liljeberg Elmstahl, H.G.M., & Björck, I.M.E. (2002b). Barley bread containing lactic acid improves glucose tolerance at a subsequent meal in healthy men and women. *J Nutr*, **132**:1173–1175.

Östman, E.M., Elmstahl, H.G.M., Molin, G., Lundquist, I., & Björck, I.M.E. (2005). A diet based on wheat bread baked with lactic acid improves glucose tolerance in hyperinsulinaemic Zucker (fa/fa) rats. *J Cereal Sci*, **42**:300–308.

Raghavendra, P., Ushakumari, S.R., & Halami, P.M. (2011) Phytate-degrading *Pediococcus pentosaceus* CFR R123 for application in functional foods. *Benef Microbes*, **2**:57–61.

Rekha, C.R., & Vijayalakshmi, G. (2008) Biomolecules and nutritional quality of soy drink fermented with probiotic yeast and

bacteria. *Appl Biochem Biotechnol*, **151**:452–463.

Rodríguez Gómez, J.M. (2006). Microorganismos y salud: bacterias lácticas y bifidobacterias probióticas. Editorial Complutense. ISBN: 978-84-7491-823-6.

Rollan, G., De Angelis, M., Gobbetti, M. & De Valdez, G.F. (2005). Proteolytic activity and reduction of gliadin-like fractions by sourdough lactobacilli. *J Appl. Microbiol*, **99**:1495–1502.

Sandberg, A.S., & Andlid, T. (2002). Phytogenic and microbial phytases in human nutrition. *Int J Food Sci Technol* **37**:823–833.

Sanz-Penella, J. M., Tamayo-Ramos, J. A., Sanz, Y., & Haros, M. (2009). Phytate reduction in bran-enriched bread by phytase-producing bifidobacteria. *J Agr Food Chem*, **57**:10239–10244.

Sanz-Penella, J. M., Tamayo-Ramos, J. A., & Haros, M. (2012a). Application of Bifidobacteria as Starter Culture in Whole Wheat Sourdough Breadmaking. *Food Bioprocess Technol*, **5**:2370–2380.

Sanz-Penella, J. M., Frontela, C., Ros, G., Martínez, C., Monedero, V., & Haros, M. (2012b). Application of bifidobacterial phytases in infant cereals: effect on phytate contents and mineral dialyzability. *J Agr Food Chem*, **60**:11787–11792.

Sanz-Penella, J. M., Wronkowska, M., Soral-Smietana, M., & Haros, M. (2013). Effect of whole amaranth flour on bread properties and nutritive value. *LWT - Food Sci Technol*, **50**:679–685.

Tang, A.L., Wilcox, G., Walker, K.Z., Shah, N.P., Ashton, J.F., & Stojanovska, L. (2010) Phytase activity from *Lactobacillus* spp. in calcium-fortified soy drink. *J Food Sci*, **75**:373–376.

Thiele, C., Grassl, S., & Gänzle, M. (2004). Gluten hydrolysis and depolymerization during sourdough fermentation. *J Agric Food Chem*, **52**:1307–13014.

Türk, M., Carlsson, N.G., & Sandberg, A.S. (1996). Reduction in the levels of phytate during wholemeal bread making; effect of yeast and wheat phytases. *J Cereal Sci*, **23**:257–264.

Van der Meulen, R., Adriany, T., Verbrugge, K., & De Vuyst, L. (2006). Kinetic analysis of bifidobacterial metabolism reveals a minor role for succinic acid in the regeneration of NAD⁺ through its growth-associated production. *Appl Environ Microbiol*, **72**:5204–5210.

Wang, J., Rosell, C.M., & Benedito de Barber, C. (2002). Effect of the addition of different fibres on wheat dough performance and bread quality. *Food Chem*. **79**:221-226.

Wang, L., Yang, Y., Cai, B., Cao, P., Yang, M., & Chen, Y. (2014). Coexpression and secretion of endoglucanase and phytase genes in *Lactobacillus reuteri*. *Int J Mol Sci*, **15**:12842–12860.

Wei, Q.K., Chen, T.R., Chen, J.T. (2007). Using of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* to product the isoflavone aglycones in fermented soy drink. *Int J Food Microbiol*, **117**:120–124.

Zamudio, M., & Gonza, A. (2001). *Lactobacillus plantarum* phytase activity is due to non-specific acid phosphatase. *Lett. Appl. Microbiol*, **32**:181–184.

Zuo, R., Chang, J., Yin, Q., Chen, L., Chen, Q., Yang, X., Zheng, Q., Ren, G., & Feng, H. (2010). Phytase gene expression in *Lactobacillus* and analysis of its biochemical characteristics. *Microbiol Res*, **165**:329-335.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Debido al alto contenido de fibra dietética en la harina integral de centeno, una inclusión parcial de ésta en la formulación, aumenta el valor funcional del producto final, cubriendo al menos la mitad de la ingesta adecuada recomendada para fibra dietética con una ligera depreciación de la calidad y una alta aceptabilidad por parte de los consumidores.

Las bifidobacterias fueron metabólicamente activas en harina integral, siendo capaces de fermentar las fuentes de carbohidratos presentes, aumentando significativamente el contenido de ácidos orgánicos en la masa fermentada, los cuales están involucrados en la reducción del índice glicémico.

La cepa empleada de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* contribuyó al proceso de fermentación, activando las fitasas endógenas de los cereales por el descenso del pH, además de aportar su propia actividad fitásica. Esto provocó una hidrólisis adicional de fitatos, dando lugar a relaciones molares fitato/mineral para Ca y Zn situadas por debajo del valor umbral crítico de inhibición de su absorción.

El estatus GRAS/QPS de las bifidobacterias hace que su uso en fermentaciones sea una estrategia idónea para reducir el contenido en fitatos en alimentos. Sin embargo, las bifidobacterias deben desarrollarse en condiciones de estricta anaerobiosis, dificultando su cultivo. Aunque la hidrólisis de fitatos fue avanzada, los niveles residuales en los productos con harina integral de centeno aún podrían tener efecto negativo en la absorción del Fe.

La aplicación de las fitasas de bifidobacterias purificadas en un proceso de elaboración de pan con alto contenido en fitatos, resultó significativamente más

eficiente que la utilización de una fitasa fúngica comercial, produciendo una disminución en los niveles de $InsP_6$ por debajo del umbral de inhibición para la disponibilidad de Ca, Fe y Zn.

La adición de fitasas de bifidobacterias derivó en un incremento significativo del volumen específico de la pieza panaria, en una mejora del aspecto de la rebanada central, como también en la disminución de la dureza de la miga, probablemente debido al incremento indirecto de la actividad amilásica endógena.

Con tan sólo un 25% de sustitución de harina por harina integral de amaranto junto con la adición de fitasas provenientes de bifidobacterias se consigue superar el valor nutritivo que ofrece un producto integral de trigo, con únicamente una ligera depreciación de la calidad.

La modificación genética de una cepa del género *Lactobacillus* para expresar actividad fitasa de bifidobacterias fue posible, dando lugar a una eficiente degradación de fitatos tras el crecimiento en un medio de cultivo de laboratorio.

La cepa recombinante de *Lactobacillus casei* BL23 modificada es capaz de crecer en masas madre de harinas integrales, adaptándose al medio. Sin embargo, su contribución a la hidrólisis de fitatos en masa panaria no resultó suficiente, dando lugar a productos con un remanente sustancial de $InsP_6$. Esto podría ser debido a la baja expresión de las fitasas de bifidobacterias en el modelo de masa fermentada o a la falta de accesibilidad al sustrato presente en el salvado por parte de las enzimas. En consecuencia, la hidrólisis de fitatos se produjo principalmente por la activación de las fitasas endógenas del cereal como consecuencia de la caída del pH en el proceso.

Aunque la cepa de *L. casei* BL23 modificada requiere de la adición de azúcares para fermentar una bebida de soja, fue capaz de degradar eficazmente los fitatos presentes en este alimento, además de provocar acumulación de fosfatos de *mio-*

inositol de menor grado de fosforilación. La fitasa de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* expresada en *L. casei* es la más eficaz en la degradación de fitatos, dando lugar a la reducción de los cocientes $\text{InsP}_6/\text{mineral}$ a valores que se encuentran por debajo de los umbrales descritos para la inhibición de la absorción de Ca, Fe y Zn.

La fermentación por cepas de lactobacilos productores de fitasa en este proceso aporta el beneficio de la presencia de lactobacilos vivos, algo que abre la puerta al desarrollo de nuevos productos vegetales fermentados probióticos con bajo contenido en fitatos y alto valor nutricional y funcional.

Las fitasas comerciales disponibles sólo son aceptadas para su empleo en la elaboración de piensos para animales monogástricos, y provienen por lo general de hongos filamentosos. No existe ninguna fitasa autorizada para uso en alimentos para consumo humano en España. El empleo de fitasas de otros orígenes, como bifidobacterias (que poseen la calificación GRAS/QPS y son considerados microorganismos probióticos), si éstas son producidas y purificadas mediante técnicas de grado alimentario, se convertiría en una posible estrategia para reducir el contenido de fitatos en productos vegetales para alimentación humana, pudiendo así obtener productos con un mayor valor nutricional y beneficio para la salud.

ANEXO

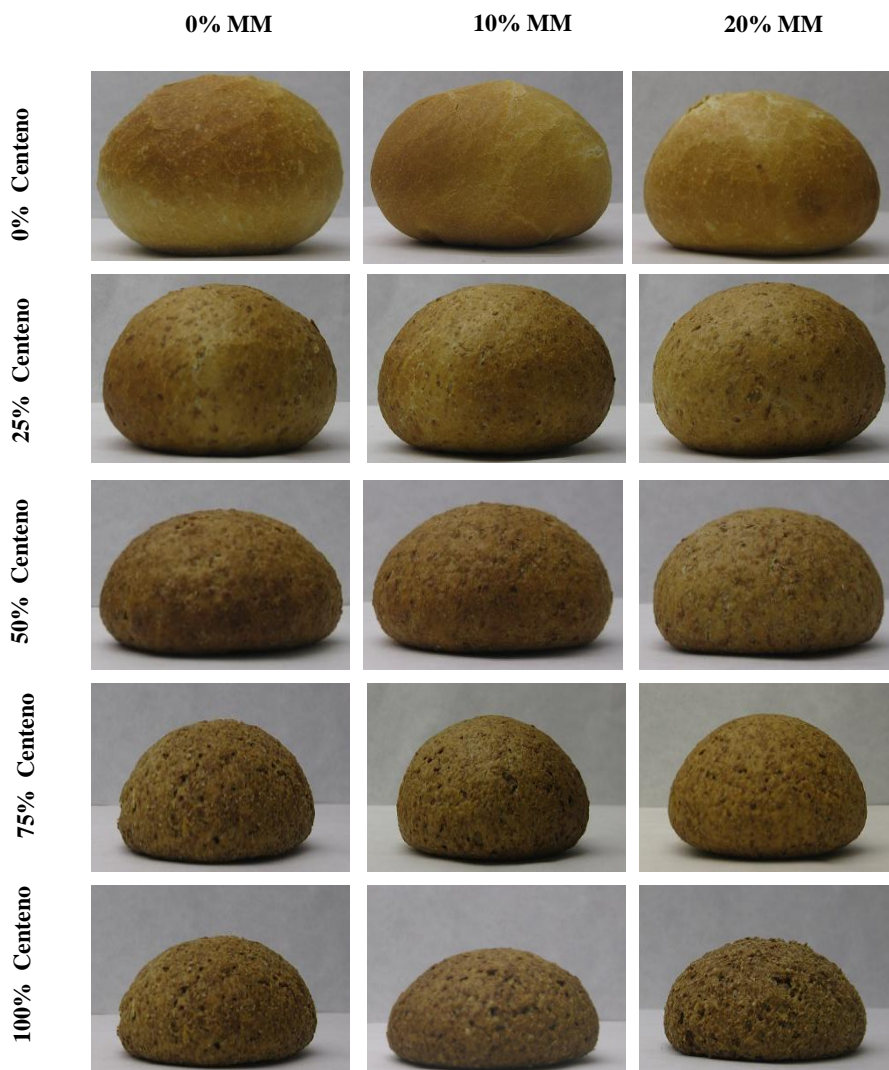


Figura 1. Efecto de la proporción de harina integral de centeno y de masa madre en la morfología de las piezas panarias.



Figura 2. Efecto de la proporción de harina integral de centeno y de masa madre en la relación de aspecto de la rebanada central.

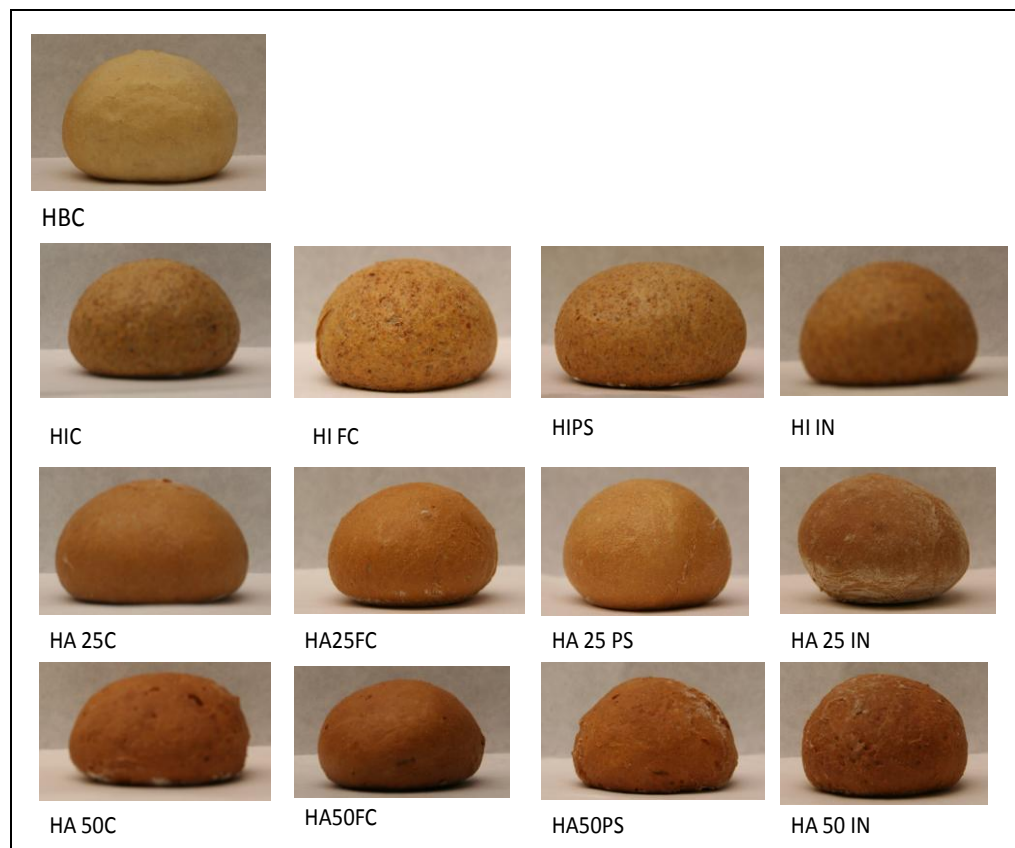


Figura 3. Efecto de la formulación en la morfología de las piezas panarias.

HB: 100% harina; HI: 100% harina integral; HA25: 25% harina integral amaranto y 75% harina; HA50: 50% harina integral amaranto y 50%harina.

C: control sin adición de fitasa; FC: con la adición de fitasa fúngica comercial; PS: con la adición de fitasa de *B. pseudocatenulatum*; IN: con la adición de fitasa de *B. infantis*.

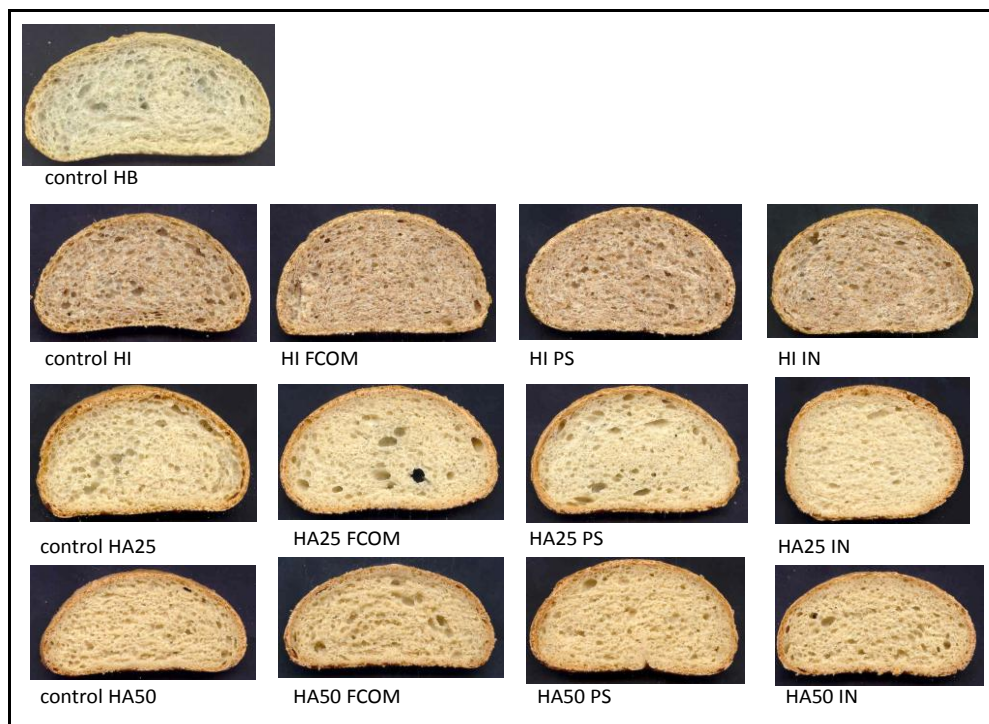


Figura 4. Efecto de la formulación en el aspecto de la rebanada central y estructura de la miga.

HB: 100% harina; HI: 100% harina integral; HA25: 25% harina integral amaranto y 75% harina; HA50: 50% harina integral amaranto y 50%harina.

C: control sin adición de fitasa; FC: con la adición de fitasa fúngica comercial; PS: con la adición de fitasa de *B. pseudocatenuatum*; IN: con la adición de fitasa de *B. infantis*.

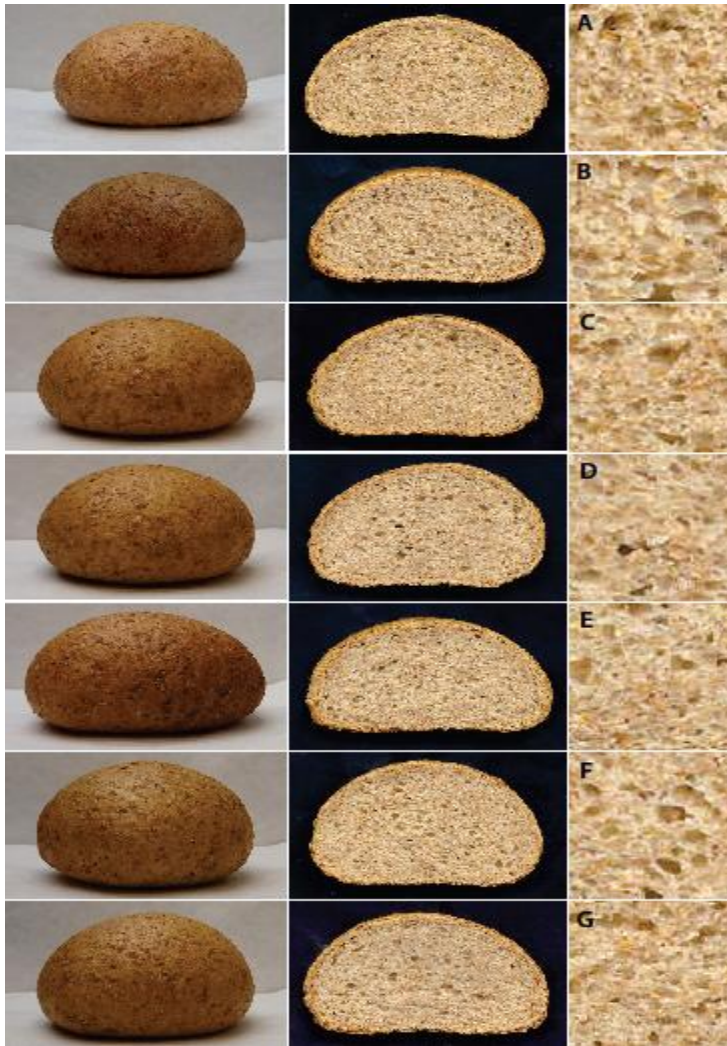


Figura 5. Efecto de la inclusión de masa madre con *L. casei* en la morfología de la pieza panaria, aspecto de la rebanada central y estructura de la miga.

A. Control sin masa madre; B. Masa madre con cepa salvaje *L. casei* BL23; C. Masa madre con *L. casei* BL23 con el plásmido control vacío; D. Masa madre con *L. casei* BL23 expresando fitasa de *B. longum*; E. Masa madre con *L. casei* BL23 expresando fitasa de *B. pseudocatenulatum*; F. MM-CA-pH 4: masa madre control acidificada químicamente con ácido láctico; G. MM-CA-pH 5: masa madre control acidificada químicamente con ácido láctico.

