

MAGDALENA MIKA, AGNIESZKA WIKIERA, KRZYSZTOF ŻYŁA,
PRZEMYSŁAW PEREK

INTERAKCJE PEKTYNAZ I FOSFATAZ W PROCESIE ZMIAN BIODOSTĘPNOŚCI BIAŁKA Z PASZY DLA DROBIU

Streszczenie

Badano wpływ enzymów fosforolitycznych i pektynolitycznych na biodostępność białka oraz określono interakcje zachodzące pomiędzy działaniem tych enzymów. Analizy prowadzono z wykorzystaniem metody *in vitro*, symulującej warunki trawienia w przewodzie pokarmowym ptaków. Wyniki analizowano stosując dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA (dwuelementowe kombinacje aktywności enzymatycznych – preparaty: Finase P, Finase AP, Rapidase pomaliq 2F, Energex L). Wykazano, że zarówno dodatek pektynaz, jak i fosfataz do paszy ma istotny wpływ na stężenie białka oznaczanego w dializacie. Ponadto wykazano, że kooperacja z preparatami pektynolitycznymi jest efektywniejsza w przypadku fosfatazy kwaśnej niż fitazy. Stwierdzono także, że wysoka aktywność pektynoesterazy w preparatach pektynolitycznych jest czynnikiem ograniczającym biodostępność białka.

Słowa kluczowe: pektynazy, fosfatazy, biodostępność białka.

Wstęp

Preparaty enzymatyczne mają szerokie zastosowanie w przemyśle paszowym. Ich wykorzystanie zwiększa dostępność składników odżywczych z paszy pochodzenia roślinnego, zwłaszcza dla zwierząt monogastrycznych. Obecność składników antyżywniowych, takich jak fityniany czy niestrawne polisacharydy nieskrobiowe (NSP) może być niwelowana przez wzbogacanie diet dla drobiu w preparaty enzymatyczne. Zastosowanie preparatów fosforolitycznych, powodujących rozkład fitynianów, zwiększa nie tylko przyswajalność fosforu, ale poprawia także biodostępność metali (Ca, Mg, Zn, Fe) [8], białka [2, 17] i cukrowców [12] tworzących kompleksy z kwasem fitynowym. W ostatnich latach pojawiły się w literaturze doniesienia na temat zastosowania preparatów pektynolitycznych w żywieniu zwierząt monogastrycznych [14, 16]. Preparaty te, oprócz aktywności głównych enzymów rozkładających pektyny, wykazują istotne aktywności enzymów rozkładających inne

polisacharydy nieskrobiowe (β -glukany, hemicelulozy, ksylany). Wysoki stopień polimeryzacji NSP, często silnie rozgałęziona struktura oraz obecność grup zdysocjowanych sprawia, że związki te łatwo wiążą różne substancje, tworząc duże konglomeraty [1]. W środowisku przewodu pokarmowego w skład tych konglomeratów najczęściej wchodzi cząsteczki białka, skrobi, lipidów, wolne aminokwasy, witaminy i różne mikroelementy, a nawet enzymy trawienne. Już w roku 1983 Ikeda i Kuzano [6] donieśli o inhibitującym wpływie pektyny, celulozy i ksylanu na aktywność enzymów katalizujących hydrolizę wiązań peptydowych, głównie pepsyny i trypsyny. Innym czynnikiem decydującym o antyżywnościowym działaniu NSP jest ich hydrofilowy charakter, co wpływa na wzrost lepkości treści jelitowej [3] i spowolnienie jej przepływu szczególnie u młodych zwierząt [7].

Celem badań było określenie wpływu preparatów pektynolitycznych i fosforolitycznych na biodostępność białka oraz określenie możliwych interakcji zachodzących pomiędzy działaniem tych preparatów.

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiła mieszanka kukurydziano-sojowa dla drobiu. Jeden kilogram paszy charakteryzował się energią metaboliczną 12,47 MJ (2980 kcal) i zawierał składniki odżywcze w następujących ilościach: białko ogółem – 21,60%, wapń – 0,6%, fosfor całkowity – 0,40%, fosfor przyswajalny – 0,11%. Do głównych składników paszy należały: śruta kukurydziana (56,3%), poekstrakcyjna śruta sojowa (38,0%) i olej rzepakowy (3,6%).

Do badań zastosowano dwa handlowe preparaty pektynolityczne pochodzenia mikrobiologicznego: Energex L firmy Novo Nordisk i Rapidase pomaliq 2F firmy Gist-Brocades oraz dwa preparaty fosforolityczne pochodzenia mikrobiologicznego fitazę – Finase P i fosfatazę kwaśną – Finase AP firmy AB Enzymes OY. W każdym z preparatów oznaczano aktywności główne i towarzyszące.

Aktywność poligalakturonazy (EC 3.2.1.15) oznaczano w obecności 0,678% roztworu pektyny o pH 4,5, w temp 40°C, w ciągu 10 min. Za jednostkę aktywności poligalakturonazy (PGU) przyjęto ilość enzymu, która w warunkach oznaczenia uwalnia 1 μ mol kwasu D-galakturonowego w ciągu 1 min [11].

Aktywność pektynoesterazy (EC 3.1.1.11) oznaczano metodą miareczkowania potencjometrycznego uwalnianych w czasie reakcji grup karboksylowych. Jako substrat stosowano 0,5% roztwór pektyny o pH 4,5. Reakcja zachodziła w temp 40°C w ciągu 10 min. Jednostkę aktywności pektynoesterazy (PEU) zdefiniowano jako ilość enzymu równoważną 1 ml 1 M NaOH potrzebnego do utrzymania stałego pH mieszaniny reakcyjnej przez 1 min w warunkach reakcji [4].

Ogólną aktywność pektynolityczną oznaczano w temp. 20°C po uprzedniej hydrolizie 0,5% roztworu pektyny w temp. 40°C, przy pH równym 3,2. Jako jednostkę aktywności pektynolitycznej przyjęto stopnie PM (°PM) określające w ilu litrach 0,5% roztworu pektyny można osiągnąć spadek lepkości o 85%, w ciągu 5 godz, w temp. 20°C pod wpływem działania 1 kg preparatu pektynolitycznego [13].

Aktywność fitazy (EC 3.1.3.8) oznaczano w temp. 40°C, w ciągu 30 min, stosując jako substrat 5 mM roztwór fitynianu sodu o pH 5,0. Jednostkę aktywności fitazy (FTU) określano jako ilość enzymu uwalniającą 1 μmol fosforu w ciągu 1 min w warunkach reakcji [5].

Aktywność fosfatazy kwaśnej (EC 3.1.3.2) oznaczano w temp. 40°C, inkubując enzym z 5,5 mM roztworem soli sodowej p-nitrofenylofosforanu o pH 4,5 przez 15 min. Jednostkę aktywności fosfatazy kwaśnej (AcPU) definiowano jako ilość enzymu, która w warunkach reakcji uwalnia 1 μmol p-nitrofenolu w ciągu 1 min [18].

Aktywność proteazy kwaśnej (EC 3.4.23.6) oznaczano metodą Ansona wobec 2,5% roztworu hemoglobiny. Inkubację prowadzono przez 10 min, w temp. 40°C przy pH 2,8. Uwolnione aminokwasy i krótkołańcuchowe peptydy oznaczano z odczynnikiem Folina-Ciocalteu'a. Jako jednostkę aktywności proteazy kwaśnej (AcPRU) przyjęto ilość enzymu, która hydrolizuje hemoglobinę w takim stopniu, że barwa z odczynnikiem Folina-Ciocalteu'a odpowiada tej, jaką powoduje 1 μmol tyrozyny w warunkach oznaczenia [13].

Aktywność ksylanazy (EC 3.2.1.8) oznaczano w temp 40°C, w ciągu 10 min, stosując w charakterze substratu 3,33% roztwór ksylanu o pH 5,0. Jednostkę aktywności ksylanazy (XU) zdefiniowano jako ilość enzymu uwalniającą w warunkach reakcji 1 μmol ksylozy w ciągu 1 min [11].

Aktywność celulazy (EC 3.2.1.4) oznaczano wobec 0,833% roztworu CM-celulozy w temp. 40°C, przy pH równym 5,0 w ciągu 10 min. Jako jednostkę aktywności celulazy (CU) przyjęto ilość enzymu potrzebną do uwolnienia 1 μmola glukozy w ciągu 1 min w warunkach analizy [14].

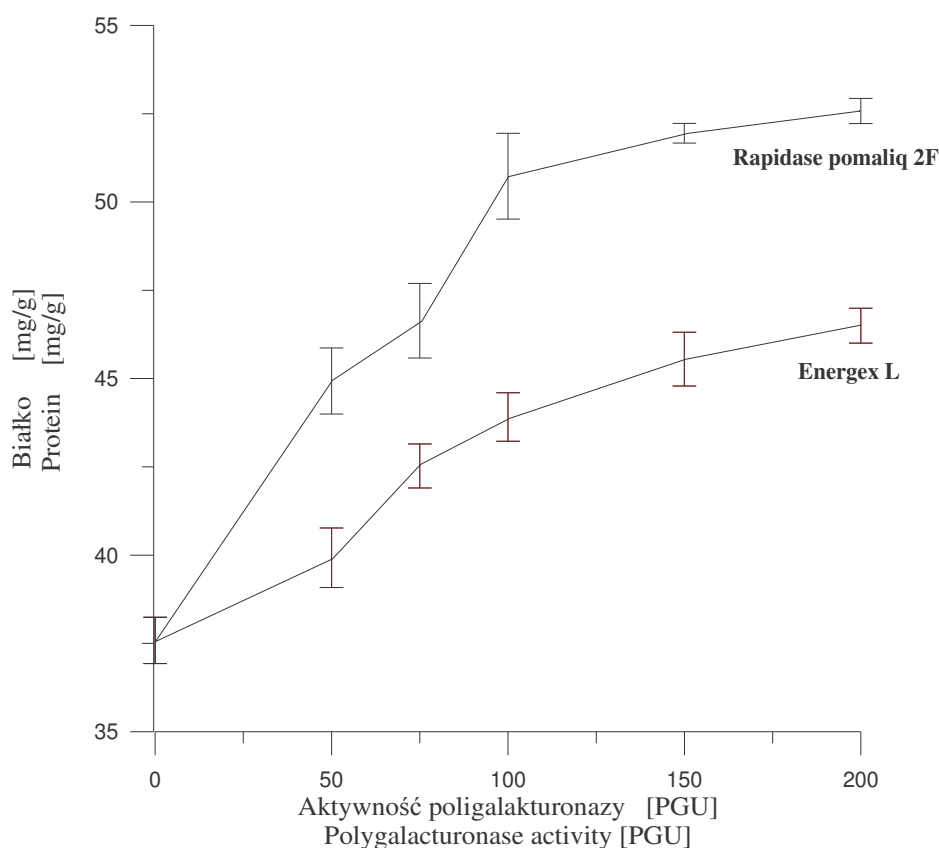
Aktywność β-glukanazy (EC 3.2.1.6) oznaczano w temp. 40°C przy pH 5,0, prowadząc dwudziestominutową inkubację enzymu z 1,66% roztworem lichenanu. Jednostkę aktywności β-glukanazy (GIU) zdefiniowano jako ilość enzymu konieczną do uwalniania 1 μmola glukozy w ciągu 1 min [11].

Biodostępność białka badano, stosując metodę *in vitro* symulującą układ trawienny ptaka opracowaną przez Żyłę i wsp. [17]. Preparaty fitazy i fosfatazy kwaśnej stosowano w dawkach wysycających w procesie defosforylacji paszy pszenno-sojowej, równych 750 FTU i 3156 AcPU na 1 kg paszy [16]. Preparaty pektynolityczne stosowano w dawce optymalnej 100 PGU na 1 kg paszy, którą wyznaczano w pierwszym etapie badań. Wszystkie analizy prowadzono w 6 powtórzeniach. Białko (produkty hydrolizy białka) w dializacie oznaczano metodą Lowry'ego [10].

Wyniki opracowano statystycznie, stosując dwuczynnikową analizę wariancji.

Wyniki i dyskusja

Optymalną dawkę wieloaktywnościowych preparatów pektynolitycznych standaryzowano w badaniach *in vitro* według aktywności poligalakturonazy. Uzyskane wyniki przedstawiono na rys. 1. Jako optymalną dawkę uznano ilość preparatu wprowadzającą aktywność poligalakturonazy równą 100 PGU do 1 kg paszy. W tab. 1. przedstawiono poziomy aktywności głównych i aktywności towarzyszących, które były wprowadzane z preparatami pektynolitycznymi do 1 kilograma mieszanki paszowej.



Rys. 1. Zależność między aktywnością poligalakturonazy (PGU) w preparatach pektynolitycznych a ilością białka uwalnianego z paszy kukurydziano-sojowej.

Fig. 1. The relation between a polygalacturonase activity (PGU) in pectolytic preparations and amounts of protein released from a maize-soyabean-feed.

Tabela 1

Aktywności enzymatyczne towarzyszące 100 PGU w badanych preparatach pektynaz w przeliczeniu na 1 kg paszy kukurydziano-sojowej.

Enzymatic activities accompanying the standardized level of 100 PGU as found in the pectinase preparations per one kg of feed.

Nazwa preparatu Name of preparation	Dawka μl/kg paszy Dosage μl/kg of feed	Aktywności enzymatyczne Enzymatic activities								
		PGU	PEU	°PM	FTU	AcPU	AcPRU	XU	GIU	CU
<i>Energex L</i>	4,3	100	2,4	11943,0	0,033	6,91	15,5	2	13,7	1,8
<i>Rapidase pomaliq 2F</i>	40	100	20,6	23180,8	0,029	0,07	4,4	75	154,6	16,9

W stosowanych dawkach preparat *Energex L* zawierał znaczący poziom jedynie ogólnej aktywności pektynolitycznej (11943 °PM), pozostałe aktywności były śladowe. Pektynaza *Rapidase pomaliq 2F* charakteryzowała się relatywnie wysoką aktywnością enzymów rozkładających nieskrobiowe polisacharydy, a ogólna aktywność pektynolityczna tego preparatu była dwukrotnie wyższa niż w preparacie *Energex L*. Preparat *Rapidase pomaliq 2F* wykazywał także znaczący poziom pektynoesterazy, wynoszący 20,6 PEU na 1 kg paszy. Oba preparaty charakteryzowały śladowe aktywności: fitazy, fosfatazy kwaśnej i proteazy kwaśnej.

W tab. 2. przedstawiono aktywności enzymatyczne towarzyszące wysycającym dawkom handlowych preparatów fitazy (*Finase P*) i fosfatazy kwaśnej (*Finase AP*) wprowadzanym do 1 kg paszy. Stosowane preparaty fitazy i fosfatazy kwaśnej nie wykazały ogólnej aktywności pektynolitycznej ani pektynoesterazowej.

Tabela 2

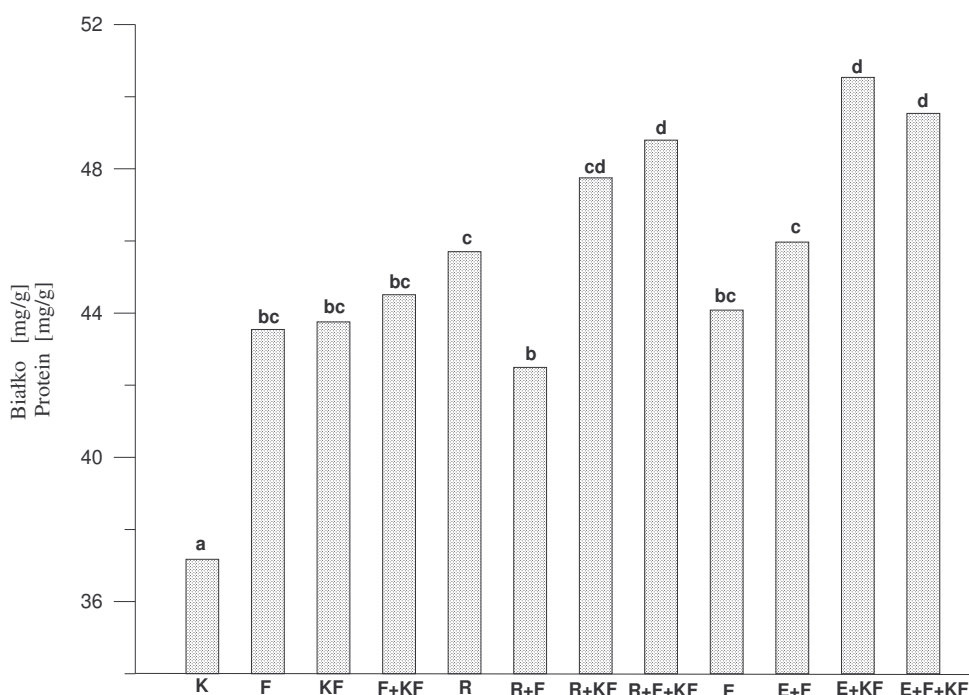
Aktywności enzymatyczne towarzyszące wysycającym dawkom fitazy i fosfatazy kwaśnej w przeliczeniu na 1 kg paszy kukurydziano-sojowej.

Enzymatic activities accompanying the saturated levels of phytase and acid phosphatase per kg of feed.

Nazwa preparatu Name of preparation	Dawka [μl/kg paszy] Dosage [μl/kg of feed]	Aktywności enzymatyczne Enzymatic activities								
		PGU	PEU	°PM	FTU	AcPU	AcPRU	XU	GIU	CU
<i>Finase P</i>	0,3	80	0	0	750	305	24	53	32	54
<i>Finase AP</i>	0,48	106	0	0	178	3156	97	82	22	32

Wszystkie preparaty stosowane w doświadczeniach *in vitro* wpływały istotnie na poziom uwalnianego białka (rys. 2). Z preparatów pektynolitycznych nieznacznie lepsze rezultaty uzyskano w przypadku preparatu *Rapidase pomaliq 2F*, który spowodował wyższy o 23% przyrost ilości białka w dializacie niż preparat *Energex L*. Fakt ten można

wytłumaczyć wykazanymi uprzednio w preparacie Rapidase pomaliq 2F wyższymi, niż w preparacie Energex L, poziomami wszystkich aktywności enzymów rozkładających NSP. Wywołana przez glikozydazy depolimeryzacja paszowych pektyn, ksylanów i β -glukanów obniżała lepkość paszy trawionej metodą *in vitro*, ponadto podwyższała dostępność substratu (białka), uwalniając go z wielkich polisacharydowych konglomeratów, jak również eliminowała inhibujący wpływ nieskrobiowych polisacharydów, zwiększając tym samym ilość aktywnych cząsteczek enzymów trawiennych.



Rys. 2. Wpływ dodatku preparatów enzymatycznych na poziom białka uwalnianego z paszy do dializatu. [K – próba kontrolna, F – fitaza (Finase P), KF – fosfataza kwaśna (Finase AP), E – preparat Energex L, R – preparat Rapidase pomaliq 2F]. Różne litery superskryptu oznaczają różnice statystycznie istotne (test LSD).

Fig. 2. The influence of different enzyme preparations added to feed on the concentration of protein being released from feed to a dialysate. [K – control, F – phytase (Finase P), KF – acid phosphatase (Finase AP), E – Energex L pectinase preparation, R – Rapidase pomaliq 2F pectinase preparation]. Different letters in superscripts denote statistically essential difference (LSD test).

Zarówno fitaza, jak i fosfataza kwaśna, wpłynęły istotnie na przyrost ilości białka w dializacie (rys. 2), ale pomiędzy efektywnością działania tych preparatów nie obserwowano istotnych statystycznie różnic. Zastosowanie równocześnie

wysycających dawek obu fosfataz nie zwiększało w sposób istotny ilości białka uwalnianego z paszy. Pomiedzy działaniem preparatów fosforolitycznych zachodziła interakcja (tab. 3). Interesujący wydaje się fakt, że preparat Finase AP działający bez dodatku preparatu Finase P wpływał istotnie na wzrost poziomu białka uwalnianego do dializatu, mimo iż fosfataza kwasna samodzielnie nie jest w stanie hydrolizować kwasu fitynowego. Substratem do jej działania może być dopiero produkt powstały w reakcji (odszczerpienia pierwszej reszty fosforanowej od kwasu fitynowego) katalizowanej przez fitazę [15]. Wskazuje to, że poziom aktywności endogennej fitazy składników paszy i poziom aktywności fitazowej wprowadzanej z wysycającą dawką preparatu Finase AP były wystarczające do uwolnienia odpowiedniej ilości substratu.

Tabela 3

Wyniki dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA.
Results of the two way ANOVA variance analysis.

Interakcje Interactions	F – wartość testu F – test value	P – prawdopodobieństwo P – probability
Finase P x Finase AP	10,65	0,003
Finase P x Energex L	12,06	0,002
Finase P x Rapidase pomaliq 2F	53,29	0,000
Finase AP x Energex L	0,01	0,924
Finase AP x Rapidase pomaliq 2F	8,46	0,007

W tab. 3. przedstawiono wyniki dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA (dwuelementowe kombinacje aktywności enzymatycznych – preparaty: Finase P, Finase AP, Rapidase pomaliq 2F, Energex L). Zbadano interakcje układów: Finase P x Energex L, Finase P x Rapidase pomaliq 2F, Finase AP x Energex L, Finase AP x Rapidase pomaliq 2F. Stwierdzono brak interakcji i zarazem istotny wzrost stężenia białka tylko przy kooperacji preparatów Finase AP i Energex L (rys. 2). W przypadku tych preparatów prawdopodobieństwo, że przyrosty ilości uwalnianego białka pochodzące od każdego z preparatów oddzielnie są addytywne wyniosło 92,4%. Dowodzi to, że substratem tych enzymów są różne kompleksy wiążące białka i żaden z produktów powstałych w reakcjach przez nie katalizowanych nie wpłynął inhibująco na aktywność drugiego preparatu, jak również nie spowodował dodatkowego kompleksowania białka. W przypadku preparatów Rapidase pomaliq 2F i Finase AP zaobserwowano istotną interakcję (tab. 3) i niewielki wzrost ilości uwalnianego białka (rys. 2). Spowodowane to było wysoką aktywnością pektynoesteryzy, obecnej w preparacie Rapidase pomaliq 2F. Powstałe w wyniku akcji pektynoesteryzy wolne grupy karboksylowe prawdopodobnie chelatowały białko uwalniane przez fosfatazę z kompleksów fitynowych, co ograniczyło dostęp peptydaz do substratu. Ponadto

negatywny wpływ mógł wynikać z wiązania przez wolne grupy karboksylowe jonów wapnia, które są aktywatorami wielu fosfomonoesteraz [9, 14].

Stwierdzono, że fitaza współdziałająca z preparatami pektynolitycznymi uwolniła do dializatu znacznie mniejsze ilości białka niż fosfataza kwaśna w połączeniu z tymi preparatami. Pomiedzy fitazą i preparatami pektynaz wystąpiły istotne interakcje (tab. 3). Współdziałanie preparatów Finase P i Energex L spowodowało 3,6 razy mniejszy przyrost (w stosunku do akcji samego preparatu Energex L) ilości białka w dializacie niż współdziałanie preparatów Finase AP i Energex L. Zastosowanie fitazy i preparatu Rapidase pomalij 2F spowodowało spadek uwalnianego białka o 7% względem wyników otrzymanych przy zastosowaniu tylko pektynazy. Analiza statystyczna wykazała istotną interakcję tych preparatów (tab. 3). Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy ilością białka uwalnianego do dializatu przy wprowadzeniu do paszy pełnego zestawu preparatów (Finase P + Finase AP + preparat pektynolityczny) i zestawem Finase AP + preparat pektynolityczny, co potwierdza małą efektywność działania fitazy w procesie uwalniania białka.

Wnioski

1. Zastosowanie preparatów fosforolitycznych, jak i pektynolitycznych, ma istotny wpływ na ilość białka uwalnianego z paszy poddanej trawieniu *in vitro*.
2. Preparat fosfatazy kwaśnej (Finase AP) we współdziałaniu z preparatami pektynolitycznymi powoduje uwalnianie istotnie większych ilości białka niż preparat fitazy (Finase P) w połączeniu z tymi preparatami.
3. Wysoka aktywność pektynoesterazy w preparatach pektynolitycznych ogranicza uwalnianie białka do dializatu.
4. Działanie preparatu fosfatazy kwaśnej i preparatu pektynolitycznego o bardzo niskim poziomie pektynoesterazy (Energex L) nie wykazało interakcji (Finase P x Energex L $p = 0,924$), a przyrosty uwalnianego białka pod wpływem działania tych preparatów były addytywne.

Literatura

- [1] Bedford M.R., Morgan A.J.: The use of enzymes in poultry diets. *World Poultry Sci. J.*, 1996, **52**, 61-68.
- [2] Camovale E., Lugaro E., Lombardi-Boccia G.: Phytic acid in faba bean and pea. Effect on protein availability. *Cereal Chem.*, 1988, **65**, 114-117.
- [3] Choct M., Annison G.: Anti-nutritive effect of chitin pentosans in broiler chickens: roles of viscosity and gut microflora. *B. Poultry Sci.*, 1992, **33**, 821-834.
- [4] Hajnal H.A., Polaczek-Racz M.: Determination of pectin methyl esterases, polygalacturonase and pectic substances in some fruit and vegetables. *Acta Aliment.*, 1975, **4** (3), 271-289.
- [5] Heinonen J.K., Lahti R.J.: A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal. Biochem.*, 1981, **113**, 313-317.

- [6] Ikeda K., Kusano K.: In vitro inhibition of digestive enzymes by indigestible polysaccharides. *Cereal Chem.*, 1983, **60**, 260-263.
- [7] Jamroz D.: Antyżywniowe i toksyczne składniki pasz. W: *Żywnienie zwierząt i paszoznawstwo*, t. I, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2001, s. 122-134.
- [8] Kornegay E.T.: Digestion of phosphorus and other nutrients: the role of phytases and factors influencing their activity. *Enzymes Farm Animal Nutr.*, 2001, 237-271.
- [9] Krużel M., Morawiecka B.: Acid phosphatase of potato tubers. Purification, properties, sugar and amino acid composition. *Acta Biochim. Pol.*, 1982, **29 (3-4)**, 321-329.
- [10] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.J.: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 256-275.
- [11] Miller G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, 1959, **31**, 426-428.
- [12] Thompson L.U., Serraino M., Effect of phytic acid reduction on rapeseed protein digestibility and amino acid absorption. *J. Agr. Food Chem.*, 1986, **34**, 468-469.
- [13] Wikiera A.: Dostosowanie preparatu pektynolitycznego Pektopol PT 400 do potrzeb przemysłu paszowego. AR, praca doktorska. Kraków 2003.
- [14] Wood T.: Bhat K.M.: Methods for measuring cellulase activities. *Met. Enzym.*, 1988, **160**, 87-112.
- [15] Wyss M.: Biophysical characterization of fungal phytases (myoinositol heksakisphosphate phosphohydrolases): molecular size, glycosylation pattern and engineering of proteolytic resistance. *Appl. Environ. Microb.*, 1999, **65(2)**.
- [16] Żyła K., Koreleski J., Świątkiewicz S., Ledoux D.R., Piironen J.: Influence of supplemental enzymes on the performance and phosphorus excretion of broilers fed wheat-based diets to 6 weeks of age. *Animal Feed Sci. Technol.*, 2001, **89**, 113-118.
- [17] Żyła K., Ledoux D.R., Garcia A., Veum T.L.: An *in vitro* procedure for studying enzymic dephosphorylation of phytate in maize-soybean feeds for turkey poult. *Br. J. Nutr.*, 1995, **74**, 3-17.
- [18] Żyła K., Wikiera A., Koreleski J., Świątkiewicz S., Piironen J., Ledoux D.R.: Comparison of the efficacies of a novel *Aspergillus niger* mycelium with separate and combined effectiveness of phytase, acid phosphatase, and pectinase in dephosphorylation of wheat-based feeds fed to growing broilers. *Poultry Sci.*, 2000, **79**, 1434-1443.

INTERACTIONS BETWEEN PECTINASES AND PHOSPHATASES DURING A PROCESS OF ALTERING THE PROTEIN BIOAVAILABILITY IN FEED STUFF FOR POULTRY

S u m m a r y

The effects of pectinases and phosphatases on the bioavailability of protein and interactions between these enzymes were studied. Analysis were performed using an *in vitro* method simulating conditions of the bird's intestinal digestion tract. The results obtained were analysed using a two way ANOVA variance analysis (two factor combinations of enzymatic activities – the preparations: Finase P, Finase AP, Rapidase pomaliq 2F, and Energex L). The investigations evidenced that the addition of pectinases and phosphatases significantly influenced protein levels being determined in the dializate. Moreover, it was proved that the cooperation with the pectinase preparations was more effective for the acid phosphatase than for the phytase. It was also confirmed that the high pectin esterase activity in pectinase preparations was a factor limiting the protein bioavailability.

Key words: pectinases, phosphatases, protein bioavailability 