

Diss. ETH No. 13980

Traditional Food Processing Methods to Increase Mineral Bioavailability from Cereal and Legume Based Weaning Foods

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

Ines Monika Egli
Dipl. Lm.-Ing. ETH
born June 30, 1966
citizen of Alt St. Johann SG, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. R.F. Hurrell, examiner
Dr. L. Davidsson, co-examiner
Dr. M.-A. Juillerat, co-examiner

Summary

Background: Cereal grains and legume seeds usually contain high amounts of phytic acid. Phytic acid binds strongly to minerals and trace elements, such as iron, zinc, copper, calcium and can thereby reduce their bioavailability. Minerals and trace elements are of special importance in infant nutrition for the rapidly growing child. Therefore weaning foods based on cereals and legumes should preferably be low in phytic acid. Phytic acid can be degraded by the enzyme phytase, which naturally occurs in grains and seeds.

Objectives: The aim of this study was to develop a food processing method to produce cereal and legume based weaning foods with low phytic acid content using phytase naturally occurring in cereals and legumes. In order to identify potential sources of phytase, cereal grains and legume seeds were screened for phytase activity. The influence of traditional food processing methods, such as soaking and germination of grains and seeds on phytase activity and phytic acid content was investigated. The impact of phytic acid degradation on zinc and copper absorption from a weaning food was evaluated in adults.

Design: Grains and seeds of cereals, pseudocereals, legumes and oilseeds were screened for phytase activity under standardized conditions. The conditions for phytic acid degradation were optimized for the grains with the highest phytase activity. The influence of traditional food processing methods, such as soaking and germination of grains and seeds on phytase activity and phytic acid content was investigated. Weaning food mixtures based on cereals and legumes were combined with a phytase source selected from the screening study, and incubated as a slurry for phytic acid degradation. Conditions were optimized in laboratory experiments. The application of the method to commercial weaning food production was evaluated in a pilot plant (Nestlé Product Technology Centre, Orbe, Switzerland). For comparison, a weaning food was produced without the phytic acid degradation step and the composition of the weaning foods was evaluated. The influence of phytic acid on zinc and copper absorption from the weaning

foods was investigated in adults. Zinc and copper in the weaning foods were labeled extrinsically with stable isotopes (^{70}Zn and ^{65}Cu). Apparent zinc and copper absorption was measured, based on the quantification of non-absorbed isotopes excreted in feces during a period equivalent to six days dietary intake. The isotopic analysis of copper and zinc was performed by thermal ionization mass spectrometry.

Results: The phytase activity of grains and seeds varied over a wide range (0.1 to 7.0 phytase units per gram dry matter) and the most potent sources of phytase were rye, wheat and buckwheat. The optimal conditions for the phytase activity of rye, wheat and buckwheat were between 50 and 60°C and at pH values between 5.0 and 5.5. Soaking and germination showed a negative influence on phytase activity in most cereals and pseudocereals. Soaking and germination of legumes and oilseeds increased the relatively low initial phytase activity 2 to 3 fold. The phytic acid content of all grains and seeds tested (mean 1.1 g/100 g dry matter) was reduced after soaking and germination to an average of circa 80% of the initial content. Weaning food mixtures based on cereals and legumes were combined with 10% rye, wheat or buckwheat as the phytase source and incubated for complete phytic acid degradation. Time required for complete degradation was in the range of 80 to 280 minutes depending on ingredients and conditions. The results from the laboratory experiments were confirmed in the pilot plant and production of a phytic acid free weaning food based on wheat and soybeans was successfully completed. A patent for the developed processing method has been submitted. For comparison, a weaning food with the same composition was produced without phytic acid degradation. The overall composition of the two weaning foods was comparable, except for the phytic acid content; the dephytinized weaning food contained no phytic acid (< 3 mg/100 g) while the other product contained about 0.4 g/100 g. The mean apparent fractional zinc absorption was significantly higher ($p = 0.005$) from the weaning food containing no phytic acid ($34.6 \pm 8.0\%$), than from the weaning food with the native phytic acid content ($22.8 \pm 8.8\%$). No significant difference ($p = 0.167$) was found for the mean apparent fractional copper absorption between the weaning food with no phytic acid ($19.7 \pm 5.1\%$) and the weaning food with the native phytic acid content ($23.7 \pm 8.1\%$).

Conclusions: Results from this systematic study on phytase activity of cereals, pseudocereals, legumes and oilseeds under standardized conditions provides new data enabling comparisons of absolute values. The results showed that rye, wheat and buckwheat have highest values whereas legumes generally have low phytase activity (circa 10 fold lower). Soaking and germination of grains and seeds did not lead to high phytase activity, nor did these food processing techniques degrade phytic acid substantially under the experimental conditions. Cereals with high phytase activity can be used as a phytase source to degrade phytic acid in weaning foods based on cereals and legumes. Results from small scale laboratory experiments of phytic acid degradation can be used to predict phytic acid degradation during commercial weaning food production. Phytic acid can be degraded completely during commercial production by including a relatively short incubation step (80 to 140 minutes for wheat/soybean mixture) to the usual production steps. The beneficial effect of dephytinization of a weaning food on the absorption of zinc was demonstrated in an absorption study with adults while no effect was observed for copper absorption in the same study. Further studies would be desirable to adapt the new processing method to the household preparation of phytic acid free weaning foods, especially in developing countries.

Kurzfassung

Hintergrund: Zerealien und Leguminosen enthalten Phytinsäure, welche Mineralstoffe wie zum Beispiel Eisen, Zink, Kupfer oder Kalzium bindet und dabei deren Bioverfügbarkeit vermindern kann. Mineralstoffe sind besonders wichtig in der Ernährung von Kleinkindern und deshalb sollten die Mineralstoffe der Beikost eine hohe Bioverfügbarkeit aufweisen. Beikost auf der Basis von Zerealien und Leguminosen sollte daher möglichst wenig Phytinsäure enthalten. Phytinsäure kann durch das Enzym Phytase, welches natürlicherweise in Zerealien und Leguminosen vorhanden ist abgebaut werden und verliert dabei seine Fähigkeit Mineralstoffe zu binden.

Zielsetzungen: Das Ziel dieser Studie war die Entwicklung einer Methode zur Herstellung von phytinsäurearmer Beikost auf der Basis von Zerealien und Leguminosen, unter Verwendung der in den Zutaten natürlicherweise vorkommenden Phytase. Zur Ermittlung potentieller Phytasequellen wurde die Phytaseaktivität einer Vielzahl von Zerealien und Leguminosen gemessen. Die Auswirkungen traditioneller Lebensmittelzubereitungsmethoden, wie das Einweichen und Keimen von Zerealien- und Leguminosensamen auf die Phytaseaktivität und den Phytinsäuregehalt wurden untersucht. Der Einfluss der Phytinsäure in Beikost auf die Absorption von Zink und Kupfer wurde in einer Absorptionsstudie mit Erwachsenen bestimmt.

Studienaufbau: Die Phytaseaktivitäten verschiedener Zerealien, Pseudozerealien, Leguminosen und Ölsamen wurden unter standardisierten Bedingungen gemessen. Für die Proben mit den höchsten Phytaseaktivitäten wurden die Bedingungen für den Phytinsäureabbau optimiert. Der Einfluss traditioneller Lebensmittelzubereitungsmethoden, wie das Einweichen und Keimen von Zerealien- und Leguminosensamen auf die Phytaseaktivität und den Phytinsäuregehalt wurde ermittelt. Mischungen aus Zerealien und Leguminosen wurden mit einer geeigneten Phytasequelle kombiniert und in Form eines Breis inkubiert um die Phytinsäure abzubauen. Die Inkubationsbedingungen wurden in Laborexperimenten optimiert und die Übertragbarkeit der

entwickelten Methode auf die industrielle Beikosterstellung wurde in einer Pilotanlage (Nestlé Product Technology Centre in Orbe) getestet. Als Vergleich wurde ein zweites Produkt hergestellt; basierend auf denselben Zutaten, jedoch ohne den Inkubationsschritt für den Phytinsäureabbau. Die Zusammensetzung beider Produkte wurde evaluiert. Der Einfluss der Phytinsäure auf die Absorption von Zink und Kupfer aus den Beikostprodukten wurde an Erwachsenen untersucht. Das in den Produkten natürlicherweise vorhandene Zink und Kupfer wurde extrinsisch mit stabilen Isotopen markiert (^{70}Zn and ^{65}Cu). Die Zink- und Kupferabsorption wurde über die Quantifizierung der nichtabsorbierten Isotope im Stuhl bestimmt, entsprechend einer quantitativen Stuhlsammlung während sechs Tagen. Die Analyse der Isotopen-verhältnisse von Zink und Kupfer erfolgte mittels Thermionen-Massenspektrometrie.

Resultate: Die Phytaseaktivitäten variierten über einen weiten Bereich (0.1 to 7.0 Phytaseeinheiten pro Gramm Trockenmasse), wobei die höchsten Werte für Roggen, Weizen und Buchweizen gemessen wurden. Die optimalen Bedingungen für die Phytaseaktivitäten von Roggen, Weizen und Buchweizen lagen zwischen 50 and 60°C und pH Werten von 5.0 bis 5.5. Das Einweichen und Keimen der Samen beeinflusste die Phytaseaktivität der meisten Zerealien und Pseudozerealien negativ, während die relativ tiefen Phytaseaktivitäten der Leguminosen und Ölsamen durch das Einweichen und Keimen um das 2- bis 3-fache anstiegen. Die Phytinsäuregehalte aller untersuchten Proben (Mittelwert 1.1 g/100 g Trockenmasse) wurden durch das Einweichen und Keimen auf durchschnittlich circa 80% der Ausgangswerte gesenkt. Als Beikost geeignete Mischungen aus Zerealien und Leguminosen wurden mit 10% Roggen, Weizen oder Buchweizen als Phytasequelle kombiniert. Die Phytinsäure der Mischungen konnte durch Inkubation, je nach Bedingungen und Zusammensetzung, in 80 bis 280 Minuten vollständig abgebaut werden. Die Resultate der Laborversuche konnten in der Pilotanlage bestätigt werden und phytinsäurefreie Beikost basierend auf Weizen und Sojabohnen wurde hergestellt. Ein Patent für die neuentwickelte Herstellungsmethode wurde angemeldet. Zum Vergleich wurde ein zweites Beikostprodukt hergestellt, basierend auf denselben Zutaten, jedoch ohne den Inkubationsschritt zum Phytinsäureabbau. Beide Produkte wiesen eine vergleichbare Zusammensetzung auf, mit Ausnahme des Phytinsäuregehaltes. Während im einen Produkt keine

Phytinsäure nachweisbar war ($< 3 \text{ mg}/100 \text{ g}$), enthielt das andere den ursprünglichen Gehalt von circa $0.4 \text{ g}/100 \text{ g}$. Die durchschnittliche Zinkabsorption vom Produkt ohne Phytinsäure ($34.6 \pm 8.0\%$) war signifikant höher ($p = 0.005$) als vom Produkt mit Phytinsäure ($22.8 \pm 8.8\%$). Für die Kupferabsorption wurde kein signifikanter Unterschied ($p = 0.167$) zwischen dem Produkt ohne Phytinsäure ($19.7 \pm 5.1\%$) und demjenigen mit Phytinsäure ($23.7 \pm 8.1\%$) gefunden.

Schlussfolgerungen: Die systematische Bestimmung der Phytaseaktivitäten verschiedener Zerealien, Pseudozerealien, Leguminosen und Ölsamen unter standardisierten Bedingungen erlaubte den Vergleich der absoluten Werte. Die Messungen zeigten, dass Roggen, Weizen und Buchweizen circa 10 mal höhere Phytaseaktivitäten aufweisen als Leguminosen und sie führten zur Kenntnis der Phytaseaktivitäten von bis dahin nicht untersuchten Lebensmitteln. Das Einweichen und Keimen der Samen erzielte keine hohen Phytaseaktivitäten und die Phytinsäure wurde nicht erheblich reduziert. Zerealien mit hohen Phytaseaktivitäten können als Phytasequelle zu Beikostmischungen zugesetzt werden um die Phytinsäure abzubauen. Die Resultate des Phytinsäureabbaus in Laborversuchen können auf die industrielle Beikostherstellung übertragen werden. Durch die Einführung eines relativ kurzen Inkubationsschrittes (80 bis 140 Minuten für Weizen/Sojabohnen-Mischung) in den herkömmlichen Prozess der Beikostherstellung kann die Phytinsäure vollständig abgebaut werden. Der positive Effekt des Phytinsäureabbaus auf die Zinkabsorption konnte an Erwachsenen gezeigt werden, während in derselben Studie kein Einfluss der Phytinsäure auf die Kupferabsorption beobachtet werden konnte. Weiterführende Studien wären wünschenswert, um die neu entwickelte Methode auf die Herstellung phytinsäurefreier Beikost im Haushalt, speziell in Entwicklungsländern, zu übertragen.