

ФИТАЗА. АНАЛИЗ ТЕРМОСТОЙКОСТИ

ЧЖ. ГУАНМИН, главный специалист,

В. ХАЙЯНЬ, руководитель Научно-исследовательского технологического института Challenge

В. ХУАЧЕНЬ, директор по продажам в России Корпорации Challenge

О КОМПАНИИ BEIJING CHALLENGE

ООО Beijing Challenge «Биотехнологии» является дочерней компанией Корпорации Challenge («Челендж»). В сферу деятельности компании входят научные исследования и разработки, производственная деятельность, техническое обслуживание, внутренняя и международная торговля. Компания получила 40 национальных патентов, разработала и внедрила более 10 серий продукции, которая обладает высокой научно-технической добавленной стоимостью и широкой рыночной применимостью. Термостабильная фитаза, комплексные ферменты, ксиланаза, бетаин и другие продукты получили положительные оценки потребителей по всей стране, а также в Европе, Америке и регионах Юго-Восточной Азии.

Центр исследований и разработок Challenge имеет один макет бионической пищеварительной системы второго поколения моногастричных животных и два — третьего поколения. В настоящее время это организация с наибольшим количеством и с самыми полными сериями бионических пищеварительных систем моногастричных животных среди предприятий ферментных препаратов. В области применения технологии бионического пищеварения компания имеет передовую команду НИОКР и высокий технический уровень в Китае. Предоставляет высококачественные услуги по проверке бионического пищеварения моногастричных животных и услуги по практическому обучению экспериментального персонала.

Компания Challenge разработала метод оценки усвояемости фосфора, содержащегося в кормовых компонентах, на основе модуля вертикального пищеварения бионической системы пищеварения третьего поколения моногастричных животных. Это позволяет достичь результата определения усвояемости фосфора, приближенного к усвояемости фосфора в организме ($R^2 = 0,90$). На основе этой технологии отбирается высокоэффективная фитаза. Благодаря данному методу проверки не требуется анализ соответствующих энзимологических свойств фитазы. Кроме того, становится возможным непосредственное определение эффективного содержания фосфора в суточном рационе с добавлением фитазы и на основе результата точно вычислить количество фитазы, способной заменить в рационе гидрофосфат кальция.

ТЕРМОСТОЙКАЯ ФИТАЗА

Фитаза — это фермент, который катализирует гидролиз фитиновой кислоты (инозитгекса-фосфорной кислоты) на инозит и свободный ортофосфат. В результате гидролиза каталитической фитиновой кислоты образуются низшие производные инозита фосфорной кислоты и неорганические фосфаты, что способствует увеличению коэффициента использования фосфора в растительных кормах и уровень доступных питательных веществ. Это делает возможным замещение компонентов, содержащих неорганический фосфор. Благодаря высокой каталитической эффективности фитазы небольшое количество добавки позволяет заменить гидроортофосфат кальция или костную муку, существенно экономя ценные ресурсы при разработке рецептов комбикормов, снижая их себестоимость и повышая усвояемость. При этом улучшается продуктивность животных и птицы, сокращается загрязнение окружающей среды от выбросов фосфора.

При гранулировании в условиях высоких температур возможна достаточно большая потеря активности фермента. Фитаза добавляется в корма до их термической обработки (перед гранулированием) в основном в виде сухого порошка для лучшей сохранности активности фермента.

В настоящее время основными методами получения термостойкой фитазы являются: отбор микробных генов —

природных или модифицированных, способных вырабатывать термоустойчивую фитазу и соответствующие им производственные штаммы; применение оболочек, микроинкапсулирование и другие технологии. При первом методе молекулы апоферментов сами по себе обладают сравнительно высокой термостабильностью, поэтому эффект является оптимальным. Второй метод имеет некоторые недостатки в практическом применении из-за более высокой себестоимости за счет использования защитного материала. Тем не менее оба вида термостойкой фитазы доступны на рынке, так как не существует единого, общепринятого стандарта оценки термоустойчивости фермента, а оценка термоустойчивости продукта также различается в зависимости от производителя. В данной статье обобщаются современные методы оценки термостабильности фитазы и дается описание фактических условий проверки в целях предоставления ссылки для оценки термостабильности фитазы.

Фитаза компании «Челендж» — «сокровище обнаженного фермента» — это натуральная термостойкая фитаза нового типа, совместно разработанная и произведенная Государственным центром инженерных исследований и разработок биокормов, Исследовательским институтом кормов Китайской академии сельскохозяйственных наук и Центром НИОКР в области ферментной инженерии Корпорации. Данный фермент характеризуется термостойкостью природного «голого» фермента, устойчив к таким неблагоприятным условиям, как температура, удовлет-

воряет строгим технологическим требованиям к условиям производства гранул. В желудочно-кишечном тракте животных он может быстро высвободиться и раскрывать свой эффект, имеет высокую эффективность ферментативного расщепления фосфора в фитиновой кислоте. Для продукта применяется низкотемпературное экструзионное формование, он не слипается, обладает хорошей текучестью и соответствующим удельным весом, не подвержен расслоению.

Лабораторная оценка термостабильности фитазы. Метод «водяной бани»

Первичная подготовка заключается в растворении и выделении твердой фитазы в буферном растворе, после чего отбирается определенный объем разбавленного раствора в стеклянную пробирку, которая помещается на водяную баню с достигнутым значением целевой температуры для теплоизоляции в течение определенного периода времени. Активность фермента тестируют в соответствии с государственным стандартом Китайской Народной Республики GB/T 18634-2009 «Определение ферментативной активности фитазы для кормов. Спектрофотометрия». Метод отражает влияние температуры на ферментную активность фитазы за счет регулирования температуры воды в водяной бане и времени выдержки в ней. Данный метод прост и удобен в действии. Во время обработки на водяной бане молекулы апофермента полностью подвергаются воздействию высокотемпературной водной среды, которая сильно отличается от реальных усло-

вий грануляции корма. Когда в системе содержится большое количество избыточной влаги, разрушаются водородные связи внутри молекулы фермента, и фермент легко дегенерирует и дезактивируется.

При оценке термостабильности фитазы методом «водяной бани» следует обратить внимание на два вопроса. Во-первых, метод «водяной бани» подходит для оценки у фитазного продукта термостойкости самих молекул апофермента, но не подходит для оценки термостойкости покрытого оболочкой фермента. Растворение и высвобождение фитазы методом «водяной бани» фактически устраняет защитный эффект материала оболочки и не отражает влияния процесса последующей обработки на термостабильность. Во-вторых, во время термообработки концентрация раствора фермента влияет на коэффициент сохранения ферментной активности. Во время процесса растворения твердого фермента высвобождаются не только молекулы апофермента, но и другие ионы с различной степенью разбавления, их концентрация тоже различна, и, следовательно, ионная сила разная. Ионная сила в среде нахождения белка может влиять на его пространственную структуру. В целях доказательства данной точки зрения были проведены следующие экспериментальные обоснования с использованием термостойкой фитазы компании Challenge с активностью 5000 ед./г. Пробу фитазы в количестве 0,2086 г растворяли в 80 мл буферного раствора при температуре 25°C; раствор встряхивали в течение 30 мин со скоростью вращения 250 об/мин;

Таблица 1. Влияние различной концентрации раствора и термообработки на коэффициент сохранения ферментной активности

Проба	Ферментная активность, ед./г	Коэффициент сохранения*, %
Раствор исходного фермента	4981	100,00
Раствор исходного фермента, температура 80°C поддерживалась в течение 3 мин	4820	96,77
Раствор исходного фермента, разбавленного до 1/50, температура 80°C поддерживалась в течение 3 мин	4144	83,20

*Коэффициент сохранения (%) = Ферментная активность после термообработки / исходная ферментная активность • 100%.

Таблица 2. Влияние различных условий на коэффициент сохранения ферментной активности термостойкой фитазы компании Challenge с активностью 10 000 ед/г

Показатель	Условие	Ферментная активность, ед/г	Коэффициент сохранения, %
Ферментная активность термостойкой фитазы	Измерение в соответствии с методом, указанным в государственном стандарте	10 863	100,0
Оценка термостойкости	Водяная баня при температуре 85°C в течение 1 мин*	9809	90,3
Оценка кислотостойкости	pH 3,0; водяная баня при температуре 37°C в течение 30 мин*	7821	72,0

*Измерение в соответствии с методом, указанным в государственном стандарте.

постоянный объем доводили до 100 мл и из него отбирали пробу, которая помещалась в центрифугу (400 об/мин в течение 10 мин). Затем была измерена ферментная активность трех проб растворов очищенного исходного фермента: при обычной температуре; при температуре 80°C, которая поддерживалась в течение 3 мин; разбавленного до 1/50 и при температуре 80°C, которая поддерживалась в течение 3 мин. Из приведенных в таблице 1 результатов испытаний видно, что различные концентрации раствора фермента во время термической обработки могут приводить к разным коэффициентам сохранения для одной и той же пробы. Учитывая также данные из других источников необходимо соблюдать осторожность при сравнении показателей коэффициента сохранения ферментной активности для различных продуктов.

В процессе измерения активности фитазы в соответствии со стандартом GB/T 18634-2009 мы обычно полагаем, что фактически измеренные значения светопоглощения A-A0 в диапазоне от 0,2 до 0,5 являются доступными данными. В случае превышения этого диапазона кратность разбавления должна быть скорректирована соответствующим образом, и измерение повторяется, то есть концентрация раствора пробы должна быть откорректирована на уровне около 0,4 ед/мл. Следовательно, в процессе термической оценки концентрация должна превышать измеренную концентрацию в 10 раз, то есть концентрация раствора пробы должна быть около 4 ед/мл. Что касается

большинства фитазных продуктов, то при коэффициенте сохранения не ниже 10%, активность фермента можно определить путем соответствующего разбавления. Результаты оценки термостойкости для фитазы компании Challenge с активностью 10 000 ед/г являются аналогичными (табл. 2).

Для лабораторной оценки термостабильности фитазы мы рекомендуем метод «водяной бани», при котором концентрация раствора фермента регулируется примерно до 4 ед/мл. Используя данный метод, мы сравнили одинаковые виды термостойкой фитазы, подвергшейся тепловой обработке при температуре 80°C в течение 3 мин. Результаты представлены в таблице 3.

Оценка термостабильности фитазы

в условиях гранулирования

Может ли фитаза противостоять жестким условиям гранулирования и каков может быть достигнут коэффициент сохранения ферментной активности? Наиболее убедительным является результат измерения активности после гранулирования корма. При этом существуют две проблемы оценки тер-

мостабильности фитазы. Во-первых, содержание фитазы в корме слишком низкое, а погрешность измерения оказывает большое влияние на результат. Во-вторых, трудно решить проблему однородности смешивания фитазы из-за небольшого количества ввода содержащей ее добавки.

Теоретическое содержание фитазы обычно составляет 400–500 ед/кг комбикорма, а нижний предел проверки фитазы в соответствии с методом, указанным в государственном стандарте, составляет 130 ед/кг. Если активность фермента слишком низкая, то и значение светопоглощения во время измерения тоже очень низкое и будет находиться за пределами диапазона, в котором концентрация в стандартной кривой образует линейную зависимость со значением светопоглощения. Таким образом, измеренное значение не может точно отразить фактическое. Для решения этой проблемы мы разбавили раствор до концентрации в 10 раз меньшей (метод государственного стандарта), чтобы получить кривую, применимую для комбикорма, и увеличили объем пробы до 5 г, а постоянный объем буферного раствора до 100 мл.

Таблица 3. Сравнение коэффициентов сохранения ферментной активности термостойких фитаз разных производителей

Продукт	Challenge	A	B	C	D
Исходная ферментная активность, ед/г	11 780	10 468	11 361	12 623	10 756
Ферментная активность, ед/г	10 236	7728	8375	10 367	6759
Коэффициент сохранения, %	86,9	73,8	73,7	82,1	62,8

Таблица 4. Исходные данные для тестирования пробы кормов

Проба	Количество пробы, г	Значение светопоглощения для холостой пробы	Значение светопоглощения*	Ферментная активность, ед/кг	Дата тестирования
АЗТ	5,0017	0,203	0,216	377	18.01.2013
	5,0021	0,215	0,263	1058	18.01.2013
	5,0018	0,268	0,296	669	19.01.2013
	5,0021	0,231	0,224	Не выявлено	19.01.2013

*Значение светопоглощения — среднее значение трех параллельных реакций.

Несмотря на это, результаты все еще не являются идеальными, и доля погрешности эксперимента, влияющей на результаты теста, большая. Распространенная форма термостойкой фитазы, представленная на рынке, — гранулированная. Вследствие этого даже при ступенчатом разбавлении трудно избежать проблемы неравномерного ее смешивания. Если все-таки удается обеспечить однородное смешивание, то измеренные значения ферментной активности будут превышать нормативные отклонения из-за использования небольшого количества пробы. Для пояснения этой проблемы в таблице 4 приведены основные данные из группы проб, протестированных в нашей лаборатории.

Как видим, полученные четыре значения ферментной активности протестированной четыре раза пробы АЗТ сильно различаются. Подобная ситуация многократно встречается в пробах комбикорма с добавлением фермента. Согласно изложенному в государственном стандарте методу относительное отклонение двух измеренных значений (параллельных) для одной и той же пробы кормов с добавлением фитазы должно составлять не более 15% (см. уравнение ниже).

Два параллельных измерения в течение двух дней подряд, приведенные в таблице 4, показали относительное отклонение 47,46% и 100% соответственно. Использование таких данных для оценки результатов гранулирования не заслуживает доверия.

Для решения проблемы значительного влияния погрешности измерения ферментной активности корма и неравномерного смешивания мы разработали решение для проведения эксперимента по гранулированию, увеличив количество фитазы в 10–20 раз по сравнению с обычной нормой. Необходимо взять одну пробу рассыпного и пять параллельных проб гранулированного комбикорма и проверить их фитазную активность в соответствии с методом по государственному стандарту. Если относительное отклонение не превышает 15%, данные измерений могут быть приняты, а результаты усредняются. При относительном отклонении более 15% данные отбрасываются и берется среднее значение. Это экспериментальное решение может в определенной степени повысить достоверность результатов испытаний, однако часто бывают случаи, когда данные сильно различаются. Например, ферментная активность при тестировании фитазы составляет 9015 ед/г, добавленное ее количество в корме — 1,2 кг на 500 кг, тогда теоретическое значение активности фермента в корме до гранулирования будет составлять 21,636 ед/г. Результаты испытаний до и после гранулирования приведены в таблице 5. Относительные отклонения пяти измеренных значений ферментной активности до гранулирования корма менее 15%; среднее значение 18,112 ед/г; теоретическое значение, вычисленное из ферментной активности пробы фита-

зы и добавленного количества, составляет 21,636 ед/г, это свидетельствует о том, что некоторые компоненты корма влияют на результаты измерений. Среднее из пяти измеренных значений после гранулирования 13,08 ед/г; коэффициент сохранения при гранулировании 72,22%; ферментная активность пробы 1 после гранулирования 10,46 ед/г, пробы 5 — 15,09 ед/г; относительное отклонение соответственно 20% и 15,4%; среднее значение после отбрасывания этих двух значений 13,28 ед/г; степень сохранения при гранулировании 73,33%. Относительное отклонение пробы 5 после гранулирования 15,4%, что превышает норму государственного стандарта. Если использовать эти данные, то среднее значение ферментной активности после гранулирования составит 13,74 ед/г, а коэффициент сохранения — 75,86%. Поскольку условия использования данных различаются, коэффициент сохранения ферментной активности после гранулирования может составлять 72,22%, 73,33% или 75,86%, но в целом различия между коэффициентами сохранения не очень большие. Таким образом, данный эксперимент достаточно отражает сохранение ферментной активности после гранулирования.

В приведенном выше эксперименте с гранулированием есть еще одно явление, на которое стоит обратить внимание. Относительное отклонение результатов тестирования рассыпного комбикорма до гранулирования менее

$$\text{Относительное отклонение} = \frac{\text{Индивидуальное измеренное значение} - \text{среднее арифметическое значение}}{\text{среднее арифметическое значение}} \cdot 100\%$$

Таблица 5. Результат тестирования гранулированного экспериментального корма с добавлением фермента

№	Ферментная активность до гранулирования, ед/г	Относительное отклонение, %	Ферментная активность после гранулирования, ед/г	Относительное отклонение, %
1	17,76	1,9	10,46	20,0
2	17,74	2,1	13,61	4,1
3	18,34	1,3	12,69	3,0
4	16,50	8,9	13,55	3,6
5	20,22	11,6	15,09	15,4

15%, что указывает на то, что однородность смешивания фитазы лучше, однако отклонение двух результатов тестирования после гранулирования превышает 15%. Предполагается, что это изменение может быть связано не только с однородностью смешивания, но и с неравномерностью распределения температуры, влажности и давления внутри модулятора в процессе гранулирования.

В настоящее время наиболее острым вопросом для потребителей термостойкой фитазы является следующий: сколько ферментной активности можно сохранить после гранулирования фитазы и может ли она удовлетворить потребности животноводства. Из-за различий у производителей корма в оборудовании, рецептах комбикормов, технологий обработки и других факторов существенно различаются температура, время выдержки, давле-

ние пара, диаметр отверстий матрицы в процессе гранулирования.

Исследования показывают, что фитаза может повышать коэффициент использования белка, аминокислот, энергии и минеральных веществ. В повышенных дозах она значительно улучшает показатели роста бройлеров и усвояемость видимой метаболической энергии (АМЕ), белка, аминокислот, кальция, фосфора. При этом повышенные дозы (8000 FTU/кг) не оказывают неблагоприятного действия на животных. Учитывая, что ввод фитазной добавки в соответствии с принятой нормой слишком сильно влияет на погрешность тестирования ферментной активности, клиенту рекомендуется увеличить дозу фитазы при оценке ее термостабильности при гранулировании. С одной стороны, научность и степень надежности самого эксперимента по оценке может быть

улучшена. С другой стороны, корм, используемый для оценки, может затем скармливаться как обычно, не создавая напрасных расходов или неблагоприятных последствий.

Для оценки термостабильности фитазы при гранулировании мы рекомендуем увеличивать ее количество в 10–20 раз по сравнению с нормой. Для испытаний необходимо использовать рассыпной комбикорм и пять параллельных проб корма после гранулирования. Концентрация раствора разбавляется в 10 раз для получения кривой; фитазная активность определяется в соответствии с методом, принятом в государственном стандарте. Коэффициент сохранения вычисляется как отношение ферментной активности фитазы в гранулированном комбикорме к таковой в рассыпном комбикорме и выражается в процентах. ■