



# СВОЙСТВА ФЕРМЕНТНЫХ КОМПЛЕКСОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В КАЧЕСТВЕ КОРМОВЫХ ДОБАВОК



***Проф. Аркадий П. Синицын***

***Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии РАН»,  
Институт биохимии им.А.Н.Баха РАН***

***Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова***

**23-й Научно-практический семинар по оптимизации кормления  
сельскохозяйственных животных.**

**ООО «Агрофермент», 23 октября 2015 г.**

# Негативные (антипитательные) факторы кормов на основе злаков и сои

- Некрахмальные полисахариды злаков и сои (НКП):
  - целлюлоза, ксиланы,  $\beta$ -глюканы, (галакто)маннаны, пектины, рамногалактоуронаны, арабиногалактаны, ксилоглюканы
- Галактоолигосахариды сои
- Фитаты (хелатирование катионов металлов, связанный фосфор)
- Ингибиторы карбогидраз (белковые ингибиторы ржи, пшеницы, др. злаков)
- Ингибиторы протеаз (белковые ингибиторы сериновых протеаз сои)
- Аллергены (глицинин,  $\beta$ -конглицинин)
- Другие факторы

# Проблемы и способы борьбы с антипитательными факторами кормов

## Проблемы, вызванные антипитательными факторами

- Снижение питательной ценности, уменьшение доступности полезных компонентов кормов
- Высокая вязкость содержимого кишечника
- Низкая степень конверсии корма
- Аллергенность
- Метеоризм

## Способы борьбы с антипитательными факторами

- Применение ферментных препаратов
  - ✓ карбогидразы (деструкция НКП, галактоолигосахаридов)
  - ✓ фитазы (гидролиз фитатов)
  - ✓ протеазы (гидролиз белковых компонентов кормов)
- Термообработка
  - ✓ инактивация белковых ингибиторов
  - ✓ разрушение аллергенов

# Результаты применения ферментов в качестве кормовых добавок



- Повышение усвояемости, пищевой, энергетической ценности и степени конверсии кормов
- Улучшение физиологического состояния животных, улучшение реологических свойств кормов (уменьшение вязкости химуса)
- Ускорение роста животных
- Удешевление кормовых рационов

## Необходимость добавок экзогенных ферментов в корма:

Пшеница – **ксиланазы, целлюлазы**

Рожь – **ксиланазы, целлюлазы**

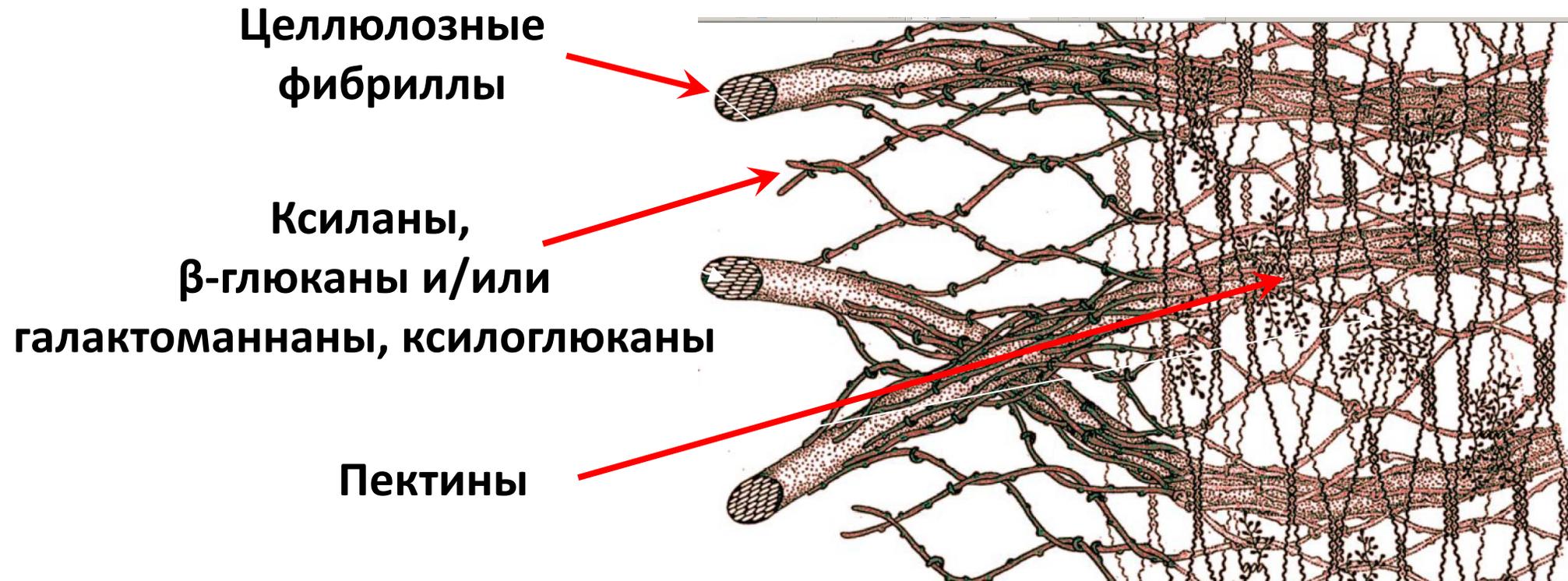
Ячмень –  **$\beta$ -глюканызы, целлюлазы**

Кукуруза – **ксиланаза**

Пшеничные отруби – **ксиланаза, целлюлаза**

Соя – **фитазы, пектиназы,  $\alpha$ -галактозидазы, ксилоглюканазы, протеазы**

# Строение растительной клеточной стенки



- Полисахариды – природные высокомолекулярные вещества, состоящие из остатков простых сахаров (глюкозы, маннозы, ксилозы, арабинозы и других), связанных между собой  $\alpha$ - или  $\beta$ -гликозидными связями.
- К полисахаридам относятся: крахмал (1,4-  $\alpha$ -гликозидная связь между остатками глюкозы), целлюлоза (1,4- $\beta$ -гликозидная связь между остатками глюкозы), ксиланы (1,4- $\beta$ -гликозидная связь между остатками ксилозы),  $\beta$ -глюканы (1,4/1,3- $\beta$ -гликозидная связь между остатками глюкозы), маннаны (1,4- $\beta$ -гликозидная связь между остатками маннозы), ксилоглюканы, галактаны, арабинаны, пектины
- Олигосахариды – более короткие молекулы. К ним относятся раффиноза, стахиоза, фруктоолигосахариды (инулин) и др.

# Содержание НПС в компонентах кормов

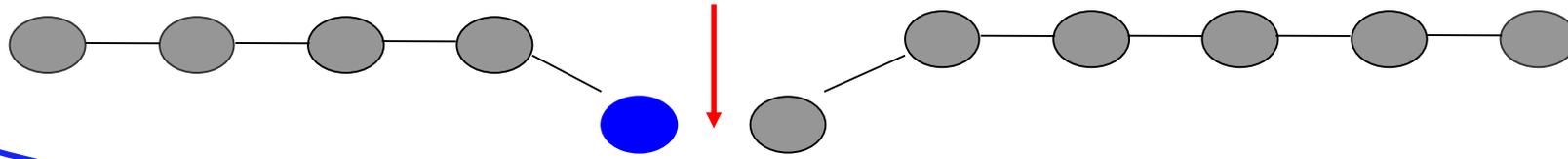
Компоненты кормов	Арабино-ксилан	$\beta$ -Глюкан	Целлюлоза	Пектин
Пшеница	6.0-6.6	0.7-0.8	2.5	-
Рожь	8.7	2.2-2.8	3.0	-
Ячмень	4.4	5.7-7.0	4.3	-
Кукуруза	4.9	-	2.6	-
Пшеничные отруби	21.0-26.0	1.9-2.4	>20	-
Соя	3.6	-	4.6	9.3-14.0

# Способ действия карбогидраз на полисахариды

*Наиболее важны для кормового применения, уменьшают вязкость НПС*

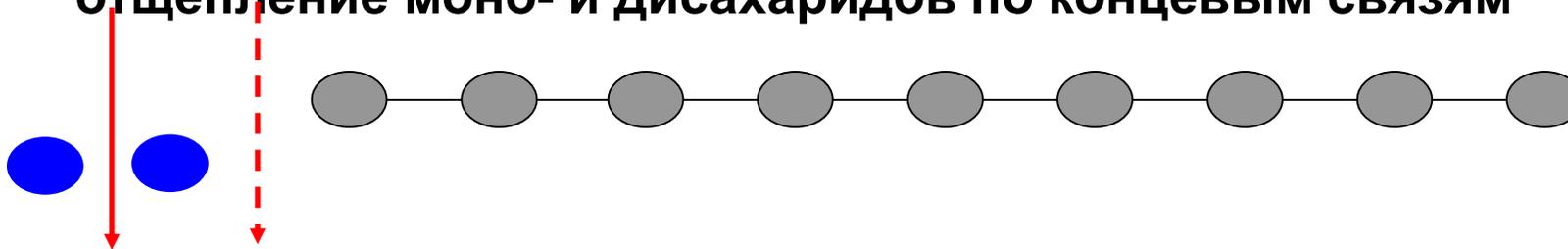
## ЭНДО-ДЕПОЛИМЕРАЗЫ

“статистическая” деструкция по внутренним связям



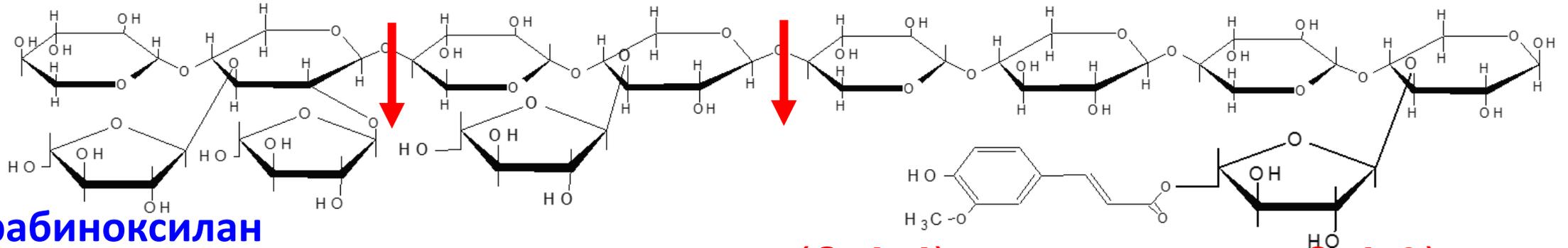
## ЭКЗО-ДЕПОЛИМЕРАЗЫ

отщепление моно- и дисахаридов по концевым связям



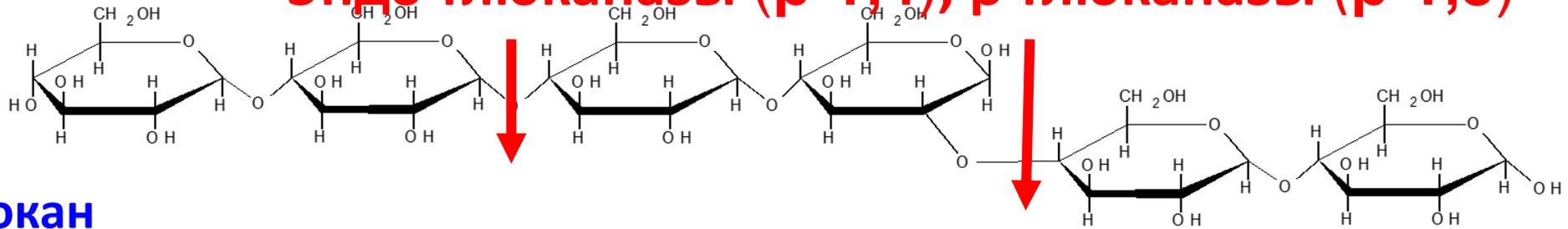
# Механизм действия кормовых карбогидраз на НПС

## Арабиноксилан гидролазы, эндо-ксилазазы



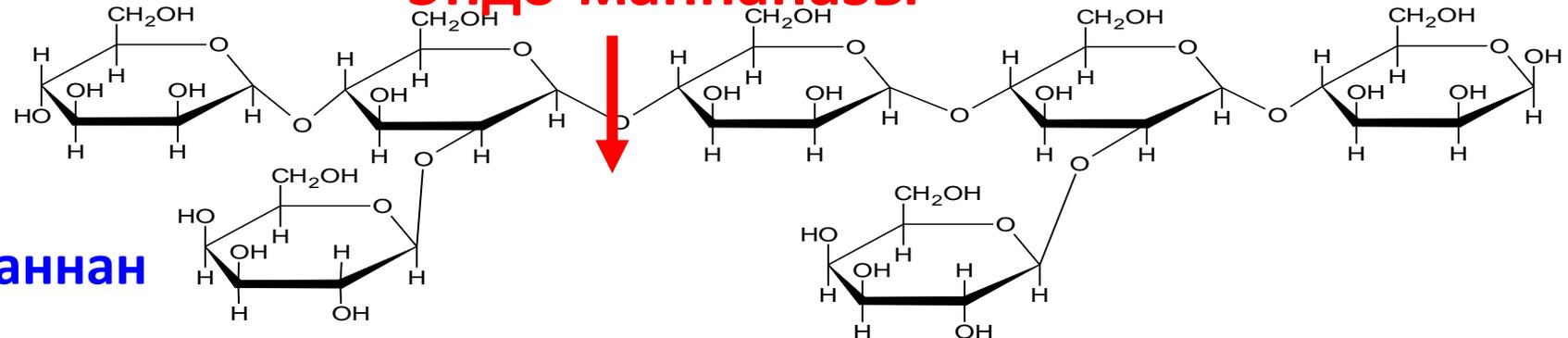
Арабиноксилан

## Эндо-глюканазы ( $\beta$ -1,4), $\beta$ -глюканазы ( $\beta$ -1,3)



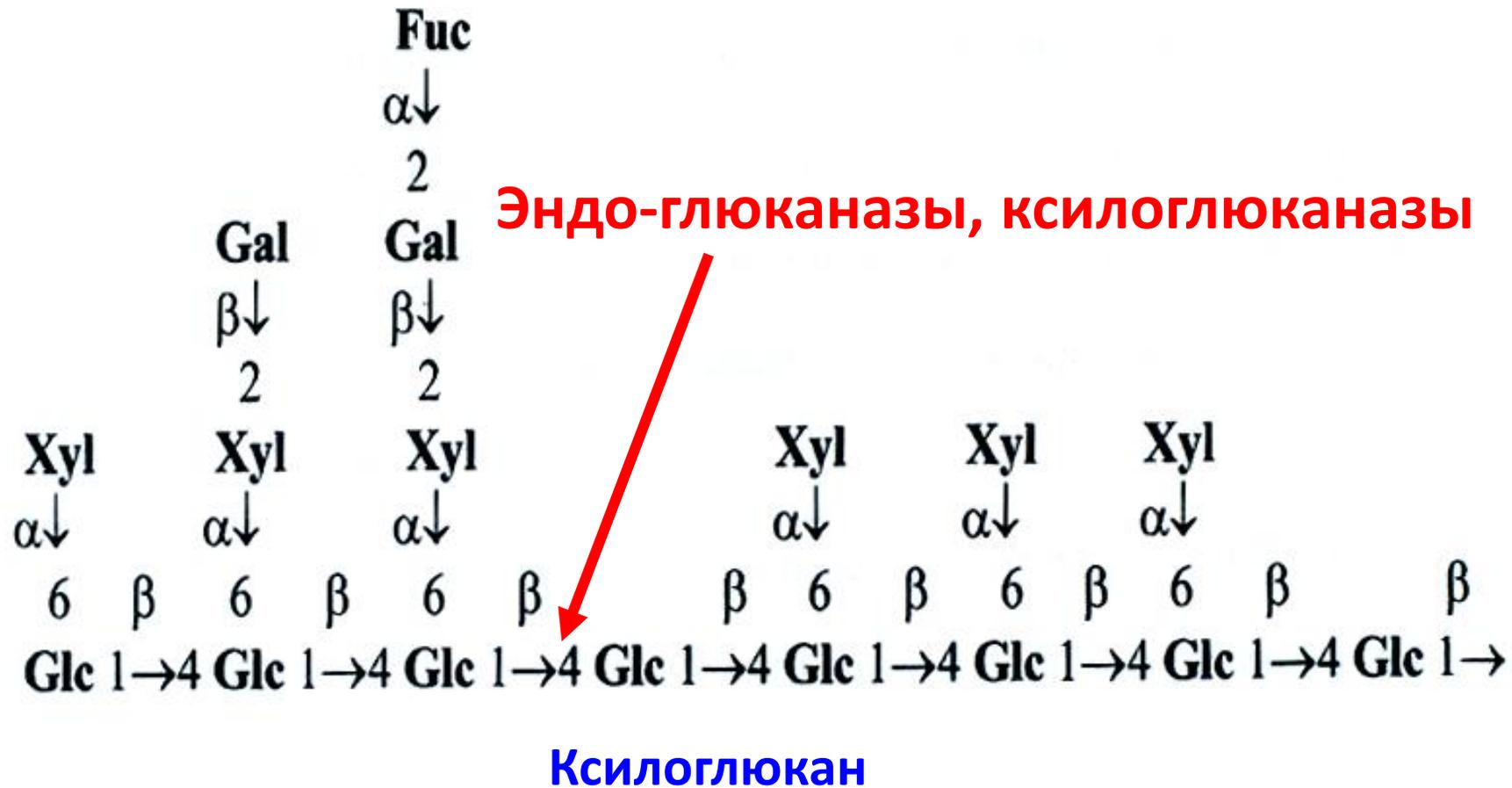
$\beta$ -Глюкан

## Эндо-манназазы



Галактоманнан

# Механизм действия ксилогюканаз



# Механизм действия $\alpha$ -галактозидаз

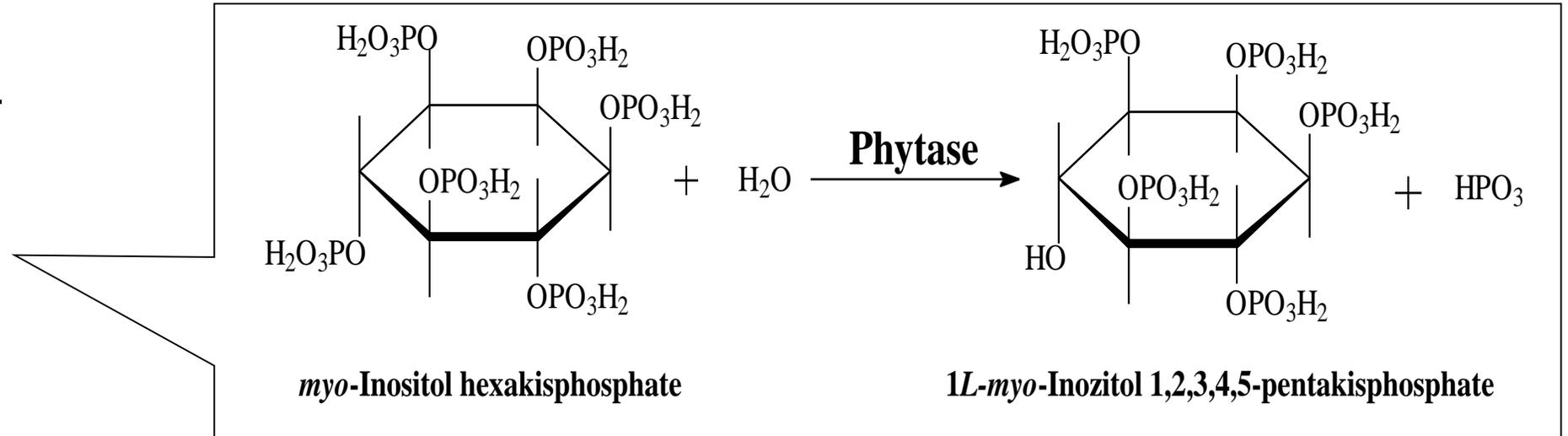
Специфичность:



- Гидролизует галактоолигосахариды, улучшает питательную ценность кормов на основе сои
- Предотвращает метеоризм

# Механизм действия фитаз

## Специфичность:



- Гидролизует фитаты, улучшает обмен фосфора (на 20-50%)
- Улучшает обмен  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$
- Уменьшает нагрузку на очистные сооружения
- Уменьшает стоимость кормов

# Механизм действия протеаз



# Кормовые ферментные препараты

✓ В качестве кормовых добавок применяются гидролазы:

Карбогидразы – целлюлазы,  $\beta$ -глюканазы, ксиланазы (пентозаназы), маннаназы, пектиназы,  $\alpha$ -галактозидазы, амилазы

Протеазы – сериновые, карбоксильные

Фитазы

✓ Штаммы-продуценты кормовых ферментов:

Традиционные – *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Bacillus*, ...

Рекомбинантные – *E.coli*, *Humicola*, *Chrysosporium*, *Saccharomyces*, ...

✓ Состав кормовых ферментных препаратов:

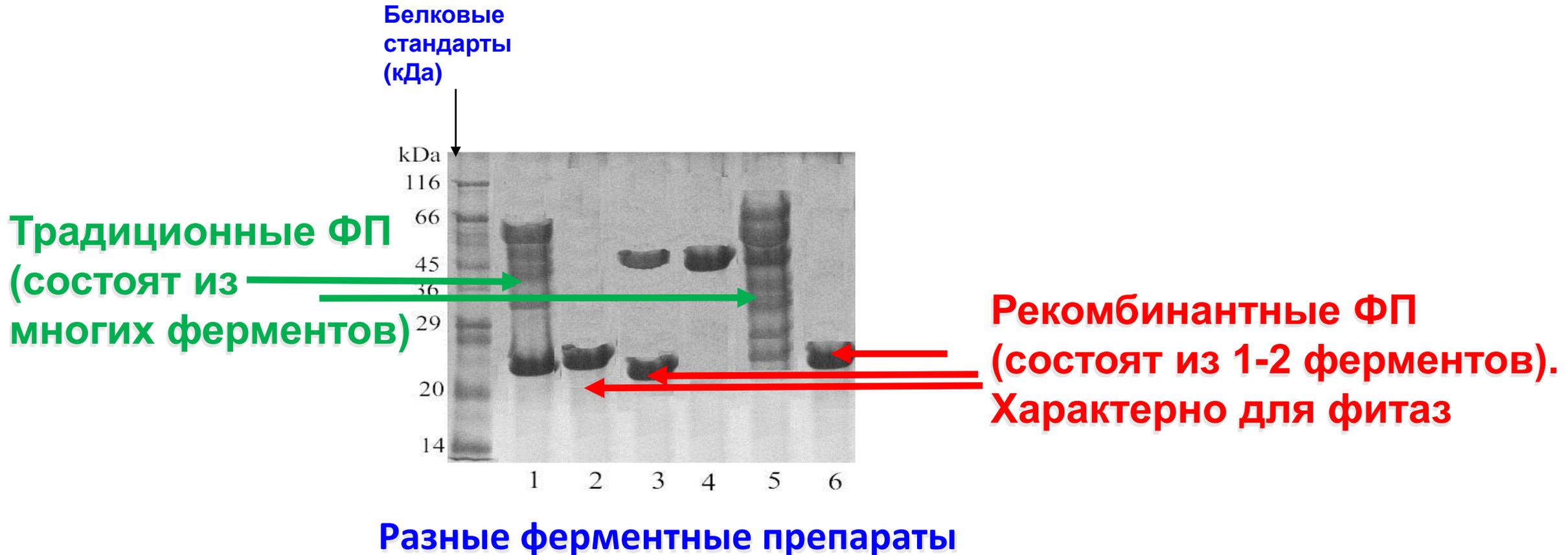
Мультиферментные (на основе традиционных штаммов), содержат несколько ферментов:

– целлюлазы +  $\beta$ -глюканазы + ксиланазы, с преобладанием какой-либо активности

Моноферментные (на основе рекомбинантных штаммов) – все фитазы, ряд ксиланаз

Смесевые, полученные смешиванием разных ферментных препаратов

# Состав ферментных препаратов, полученных с помощью традиционных и рекомбинантных штаммов-продуцентов (по данным ДДС-ПААГ)



# Качественный и количественный состав традиционных мультиферментных кормовых препаратов на основе штамма-продуцента *Trichoderma* (в % от общего содержания белка)

Индивидуальный фермент	Целлюлаза	Ксиланаза
Эндоглюканаза 1 (бета-глюканаза)	10	8
Эндоглюканаза 2 (бета-глюканаза)	7 $\Sigma$ 17,5%	6 $\Sigma$ 16%
Эндоглюканаза 3 (бета-глюканаза)	0,5	2
Целлобиогидролаза 1 (целлюлаза)	40 $\Sigma$ 65%	32 $\Sigma$ 47%
Целлобиогидролаза 2 (целлюлаза)	25	15
Ксиланаза 2	2 $\Sigma$ 4%	18 $\Sigma$ 18%
Ксиланаза 3	2	10
Полигалактуроназа (пектиназа)	0,5	0,5
Бета-маннаназа	1	1
Ксилоглюканаза	5	3
Экзо- $\beta$ -1,4-глюканаза	1	2
A-L-арабинофуранозидаза	1	1
Бета-ксилозидаза	0,5	2

# Комментарии к составу традиционных кормовых мультиферментных препаратов

- Оба ферментных препарата, позиционируемые как «целлюлазы» и «ксиланазы», имеют одинаковый по качественному составу ферментный комплекс; «кормовые» ферменты представлены ТРЕМЯ эндоглюканазами ( $\beta$ -глюканазами) и ДВУМЯ ксиланазами
- Другие ферменты, включая две мажорные целлобиогидролазы (и ряд минорных компонентов) для «кормового» применения не столь важны
- Общее содержание ферментов в двух препаратах варьирует следующим образом:

Индивидуальные ферменты	Целлюлаза	Ксиланаза
Эндоглюканазы (бета-глюканазы)	17,5	16
Целлобиогидролазы	65	47
Ксиланазы	4	18
Другие ферменты	9,5	9

- Основное отличие состоит в содержании ксиланаз

# Требования к кормовым ферментам нового поколения (I)

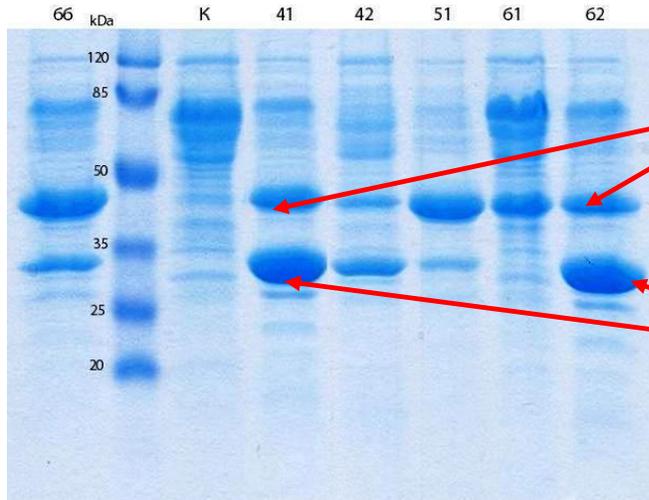
Традиционные мультиферментные препараты (1-го поколения) имеют «произвольный» компонентный состав с т.зрения «кормовых» ферментов (содержание и соотношение эндоглюканаз/ $\beta$ -глюканаз и ксиланаз) и содержат значительное количество балластных с т.зрения кормового применения ферментов (целлобиогидролазы), что уменьшает эффективность их применения

Традиционные моноферментные препараты проявляют один тип активности, что снижает эффективность их применения

## Требования к ферментам 2-го поколения (I):

- Ферментные препараты должны иметь сбалансированный состав и содержание «кормовых» ферментов с минимальным содержанием балластных ферментов; желательно избегать применения моно-ферментных препаратов
- Индивидуальные ферменты, входящие в состав кормовых ферментных препаратов должны иметь максимально высокую молекулярную активность

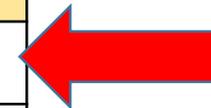
# Получение штаммов-продуцентов высокоактивных эндо- $\beta$ -1,4-глюканаз ( $\beta$ -1,4-глюканаз) и $\beta$ -1,3-глюканаз (ламинариназ) – МГУ, ИНБИ



Эндо-глюканаза II /  $\beta$ -глюканаза ( $\beta$ -1,4-глюканаза)  
*Penicillium verruculosum* с высокой молекулярной активностью и высокой стабильностью

$\beta$ -глюканаза / ламинариназа ( $\beta$ -1,3-глюканаза)  
*Myceliophthora thermophila*

Трансформант	Активность, ед/мг белка		
	по КМЦ	по ламинарину	по $\beta$ -глюкану
<b>В1-537 (контроль)</b>	<b>9,7</b>	<b>2,8</b>	<b>10,0</b>
<b>41</b>	<b>32,7</b>	<b>4,8</b>	<b>44,6</b>
<b>42</b>	<b>16,7</b>	<b>4,5</b>	<b>15,9</b>
<b>51</b>	<b>21,9</b>	<b>2,8</b>	<b>12,3</b>
<b>61</b>	<b>16,3</b>	<b>3,3</b>	<b>8,5</b>
<b>62</b>	<b>14,1</b>	<b>4,8</b>	<b>39,5</b>



# Белковые ингибиторы ксиланаз – важный антипитательный фактор

**TAXI** – *Triticum aestivum* xylanase inhibitor

**XIP** – Xylanase inhibiting protein

**TLXI** – Thaumatin-like xylanase inhibitor

Обнаружены в конце 1990-х в зёрнах злаков (пшенице, ржи, ячмене, рисе, кукурузе и др.)

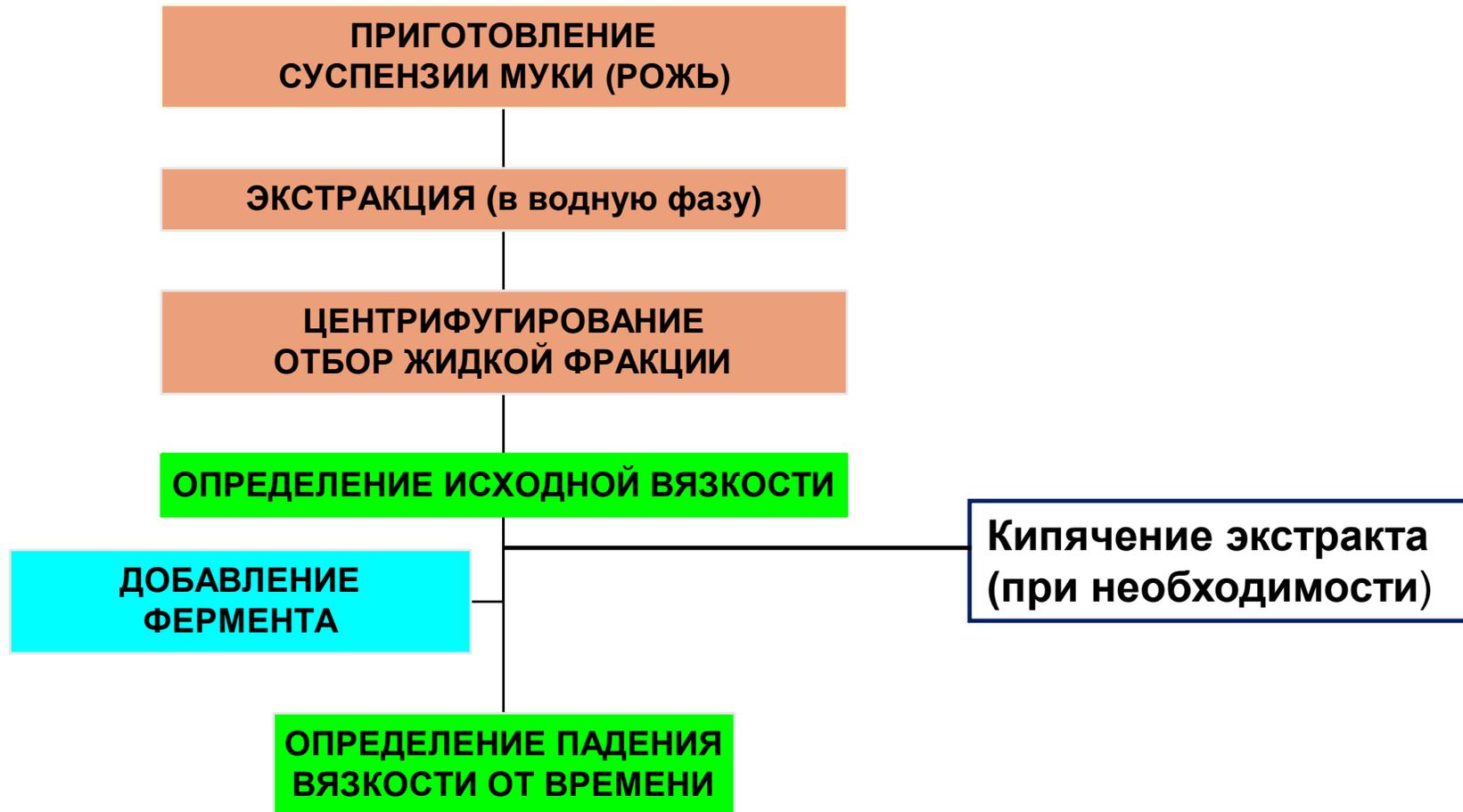
Специфично (через сайты «узнавания») воздействуют на грибные и бактериальные ксиланазы (11 и 12 семейств гликозилгидролаз), но не ингибируют эндогенные ферменты, выполняют защитную функцию при воздействии патогенных микроорганизмов

Не влияет на целлюлазы



**Структура комплекса TAXI с ксиланазой *Aspergillus niger***

# Выявление наличия ингибирования ксиланаз *in vitro*



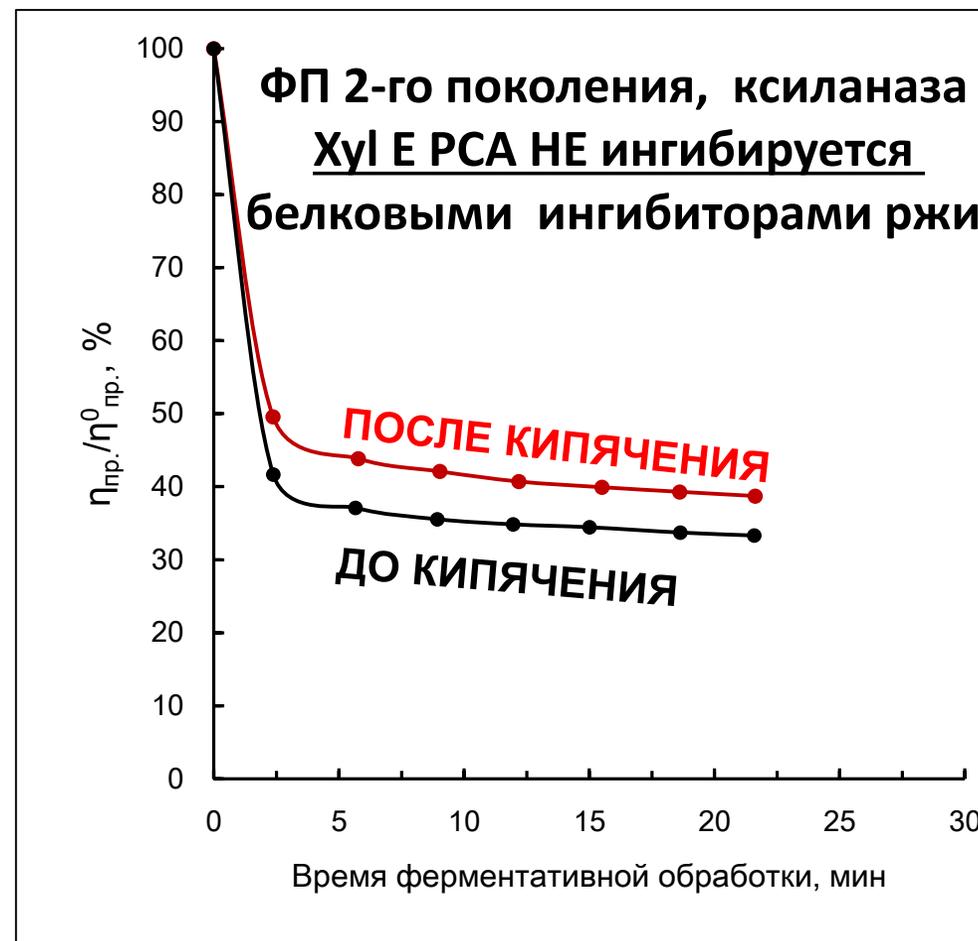
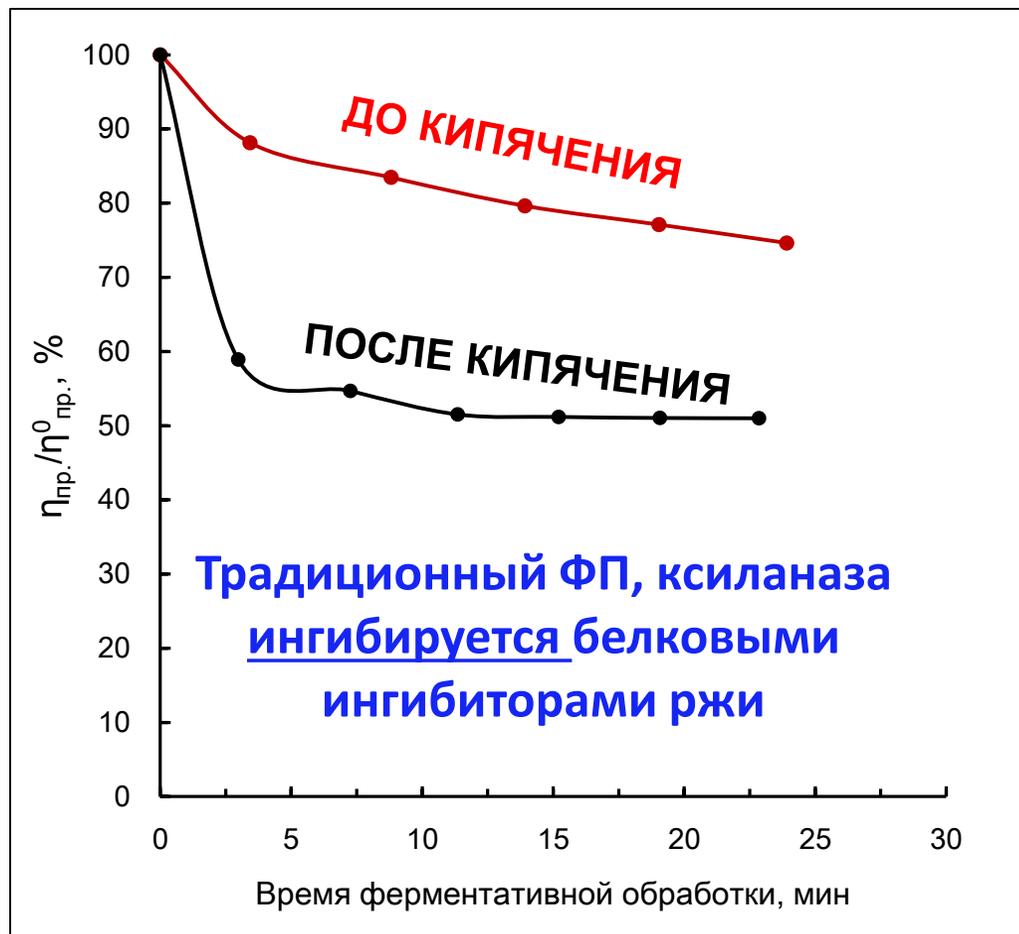
# Вязкость водных экстрактов ржи

(из измельчённых семян ржи, 100 г/л)

	Время истечения, сек	Относительная вязкость
Рожь	155	6,3
Рожь, после кипячения экстракта	152	6,3
Вода	24,5	1,0

$$\text{Относительная вязкость} = \frac{\text{Время истечения экстракта}}{\text{Время истечения воды}}$$

# Результаты сравнительных *in vitro* тестов на ингибирование традиционных и новых кормовых ферментных препаратов



# Требования к кормовым ФП нового поколения (II)

Ксиланазы подавляющего большинства традиционных ФП (1-го поколения) ИНГИБИРУЮТСЯ белковыми ингибиторами злаков, что существенно уменьшает эффективность их кормового применения. Этот фактор как правило НЕ УЧИТЫВАЕТСЯ потребителям при выборе ферментных препаратов.

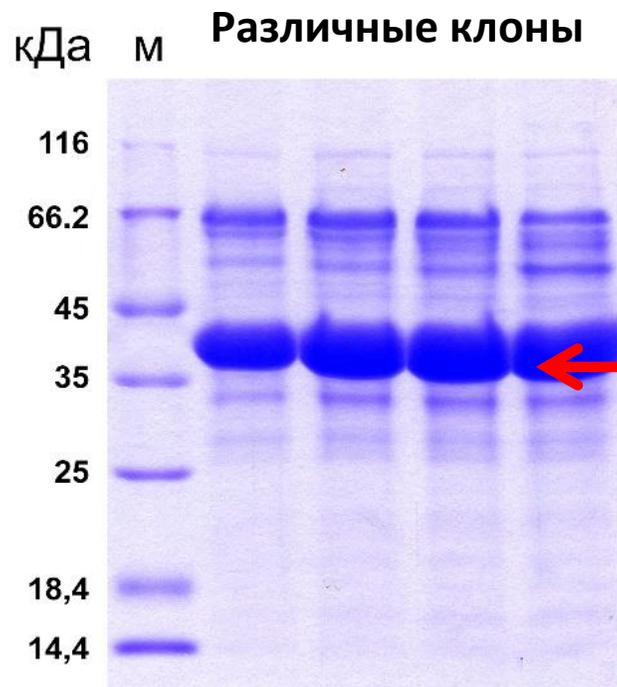
## Требования к ФП 2-го поколения (II):

- Ферменты не должны ингибироваться белковыми ингибиторами злаков

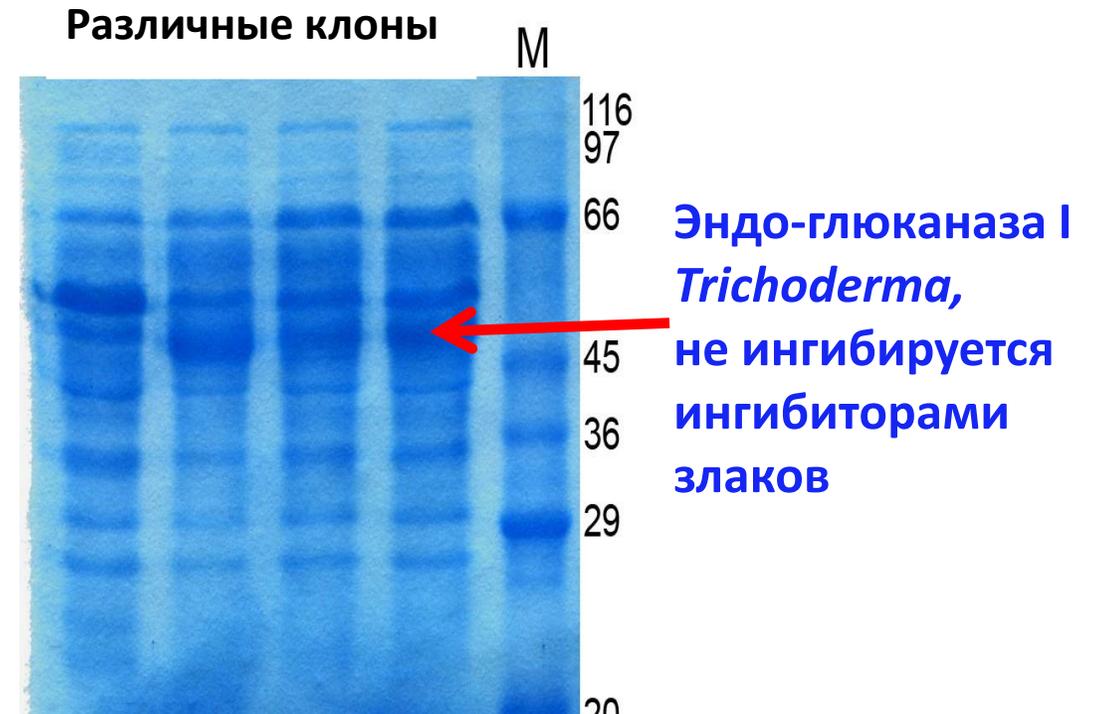
## Пути создания не ингибируемых ФП:

- ✓ Поиск природных ферментов (генов) ксиланаз, не ингибируемых белковыми ингибиторами злаков (ксиланаза XylE PCA)
- ✓ Поиск ферментов (генов) карбогидраз, обладающих широкой специфичностью, не относящихся к 11 и 12 семьям гликозид-гидролаз и не ингибируемых белковыми ингибиторами злаков (эндо-глюканаза I *Trichoderma*, относится к 7 семье гликозид гидролаз, обладает целлюлазной,  $\beta$ -глюканазной, ксилоглюканазной и ксиланазной активностью и не ингибируется белковыми ингибиторами злаков из-за отсутствия специфических сайтов «узнавания»)
- ✓ Молекулярная «инженерия» традиционных ксиланаз для делеции сайтов «узнавания» белковых ингибиторов

# Получение штаммов-продуцентов ксиланаз и других карбогидраз, не ингибируемых белковыми ингибиторами злаков – МГУ, ИНБИ



Ксиланаза Xyl E РСА,  
не ингибируется  
ингибиторами  
злаков



Эндо-глюканаза I  
*Trichoderma*,  
не ингибируется  
ингибиторами  
злаков

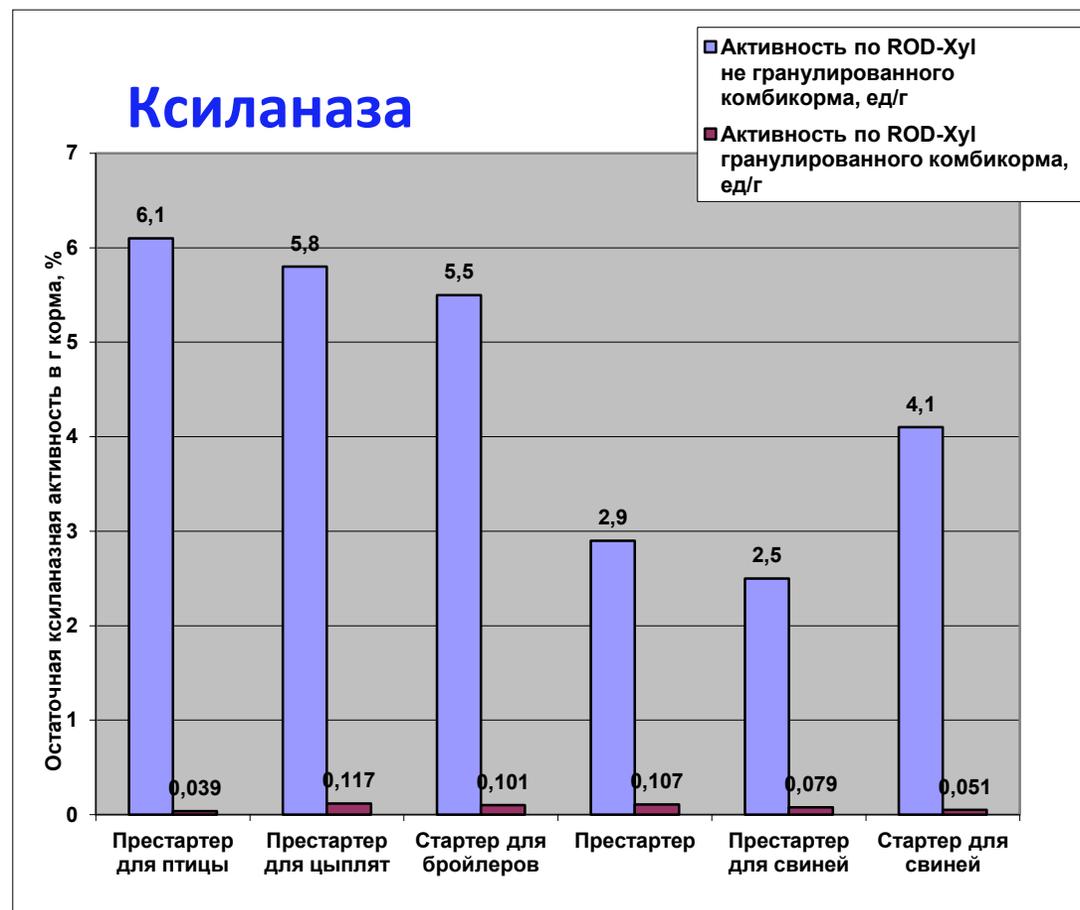
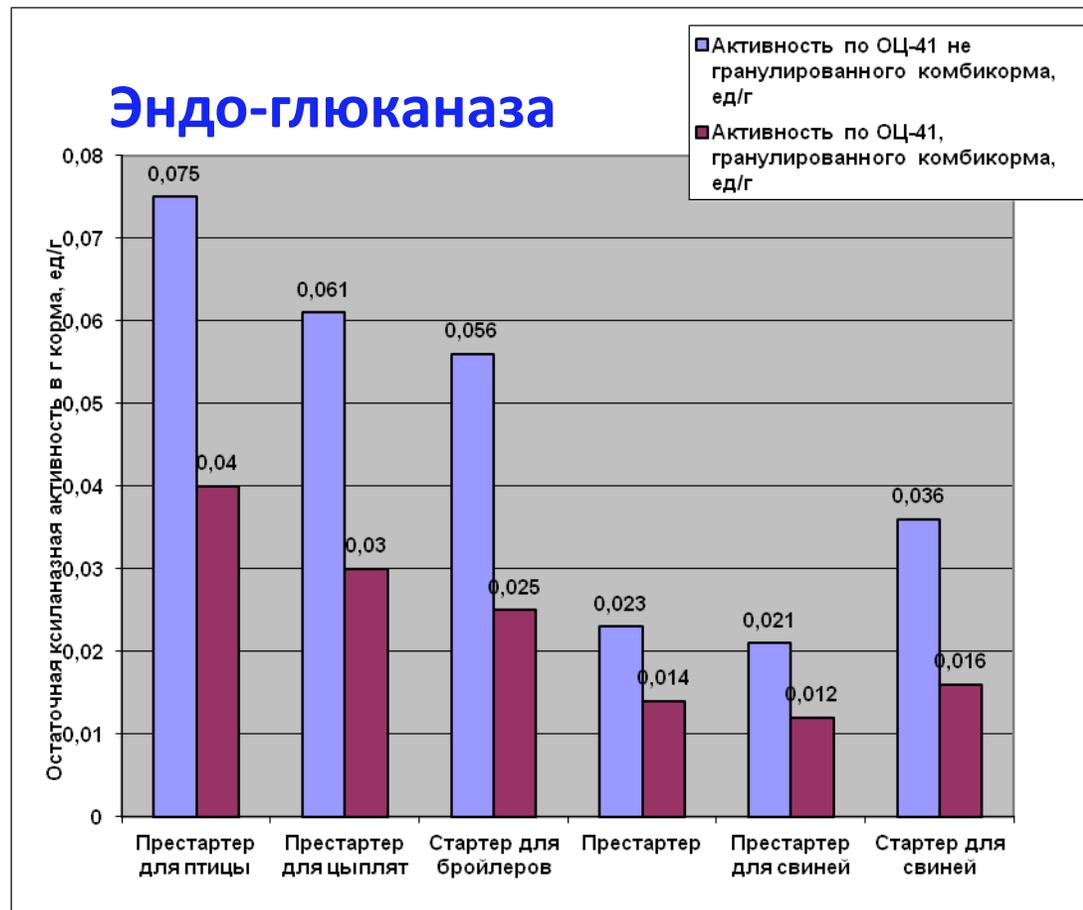
# Технологическая проблема - потеря ферментативной активности на стадии гранулирования кормов

Стадия гранулирования осуществляется при высокой температуре ( $\geq 80^{\circ}\text{C}$ ) в течение короткого времени. Это приводит к потере ферментативной активности (для КСИЛАНАЗ в особенности), но обеспечивает:

1. Улучшенную продуктивности животных
2. Улучшенную объемная плотность, отсутствие пыли
3. Облегчение погрузочно-разгрузочных работ
4. Уничтожение вредных организмов



# Остаточная целлюлазная (эндо-глюканазная) и ксиланазная активность традиционных ФП в комбикормах после гранулирования



# Требования к кормовым ФП нового поколения (III)

Ферменты (особенно ксиланазы) большинства традиционных кормовых ФП (1-го поколения) ИНАКТИВИРУЮТСЯ при осуществлении процесса гранулирования

## Требования к ФП 2-го поколения (III):

- Ферменты должны быть стабильны и не терять активности при 80°C в течение 5-10 мин, активность ФП, в первую очередь ксиланазная, не должна теряться при осуществлении процесса гранулирования

## Пути решения проблемы:

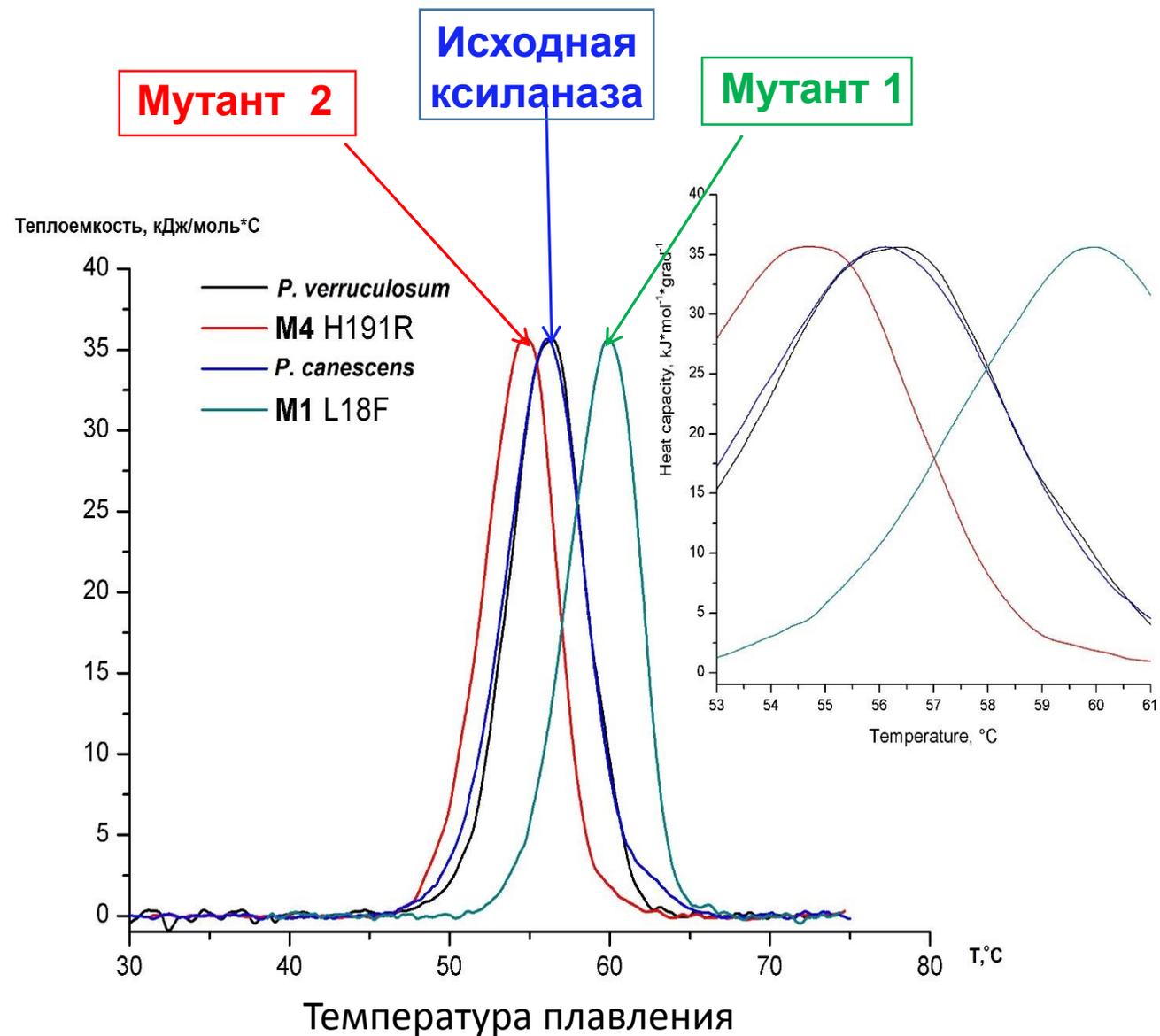
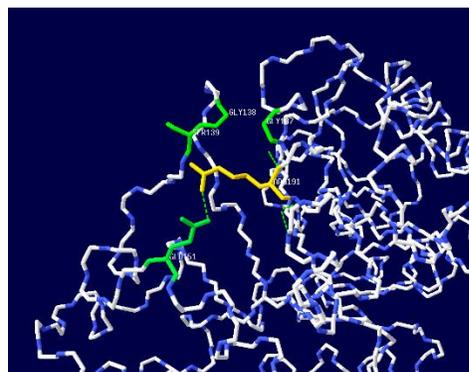
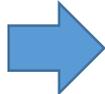
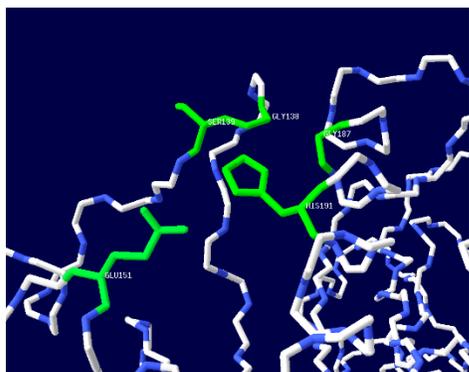
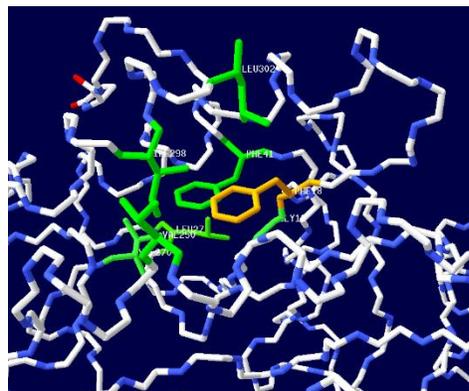
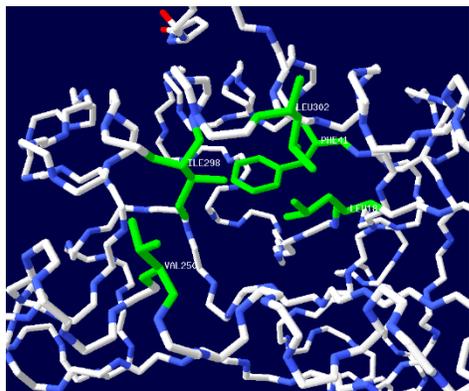
- ✓ Поиск природных ферментов (генов) ксиланаз и других кормовых карбогидраз, обладающих повышенной стабильностью при кратковременном воздействии высокой температуры (ксиланаза XylE PCA)
- ✓ Поиск ферментов (генов) карбогидраз, обладающих широкой специфичностью и высокой стабильностью (эндо-глюканаза I *Trichoderma*, является целлюлазой, имеющей ксиланазную активность и высокую стабильность)
- ✓ Молекулярная «инженерия» традиционных ксиланаз и других карбогидраз для увеличения их стабильности при повышенных температурах

# Увеличение термостабильности эндо-1,4-β-ксиланазы A PCA методом сайт направленного мутагенеза

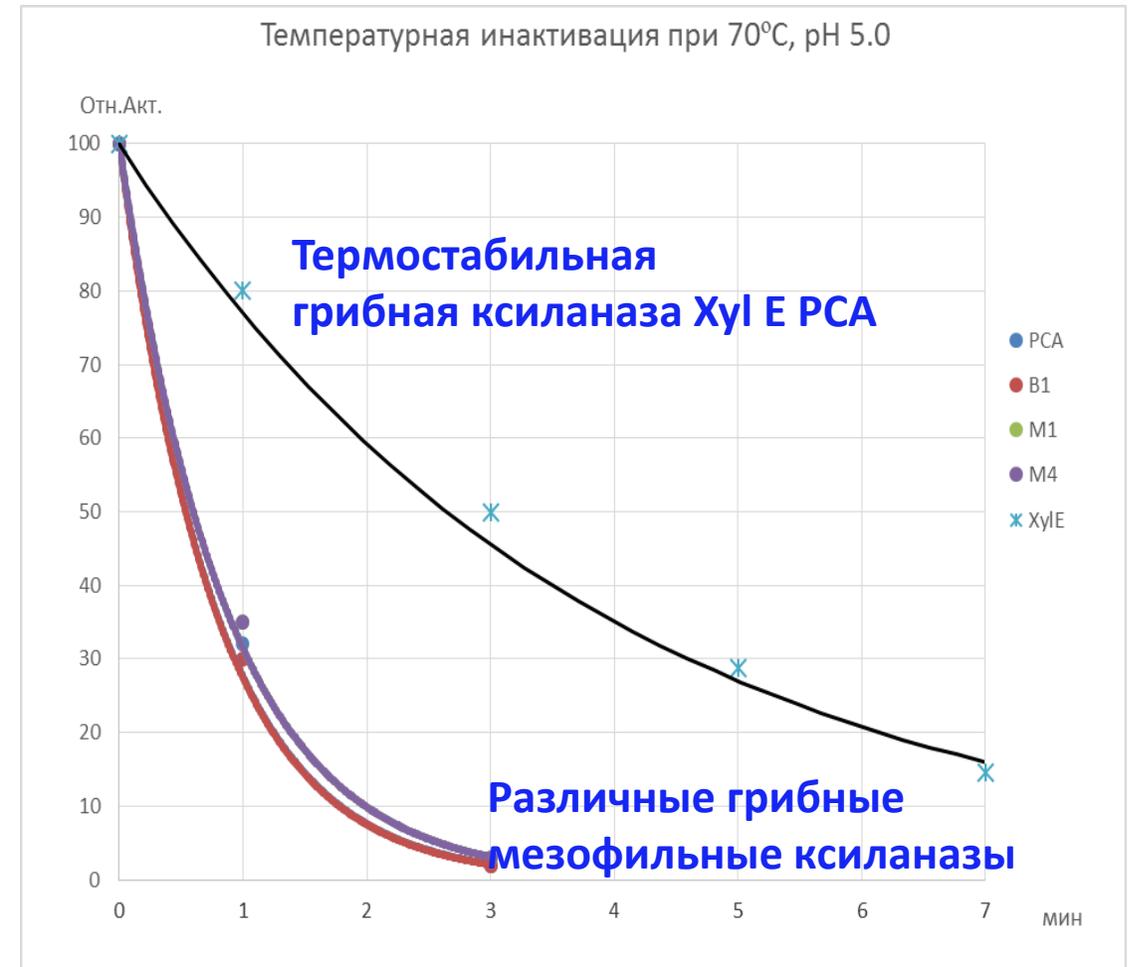
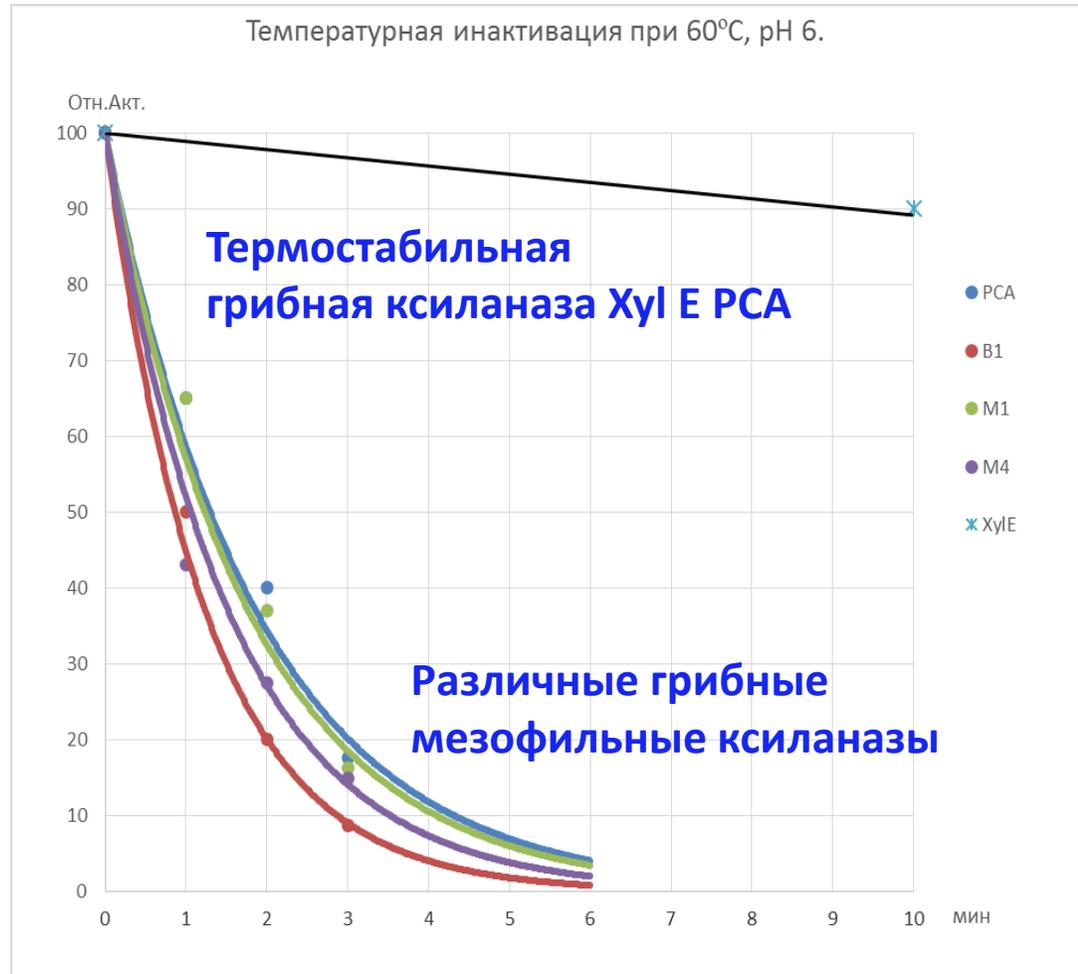
Произведены 2 аминокислотные замены в ксиланазе Xyl A PCA:

**1. L18F Увеличение термостабильности**

**2. H191R Уменьшение термостабильности**



# Скрининг термостабильных ксиланаз

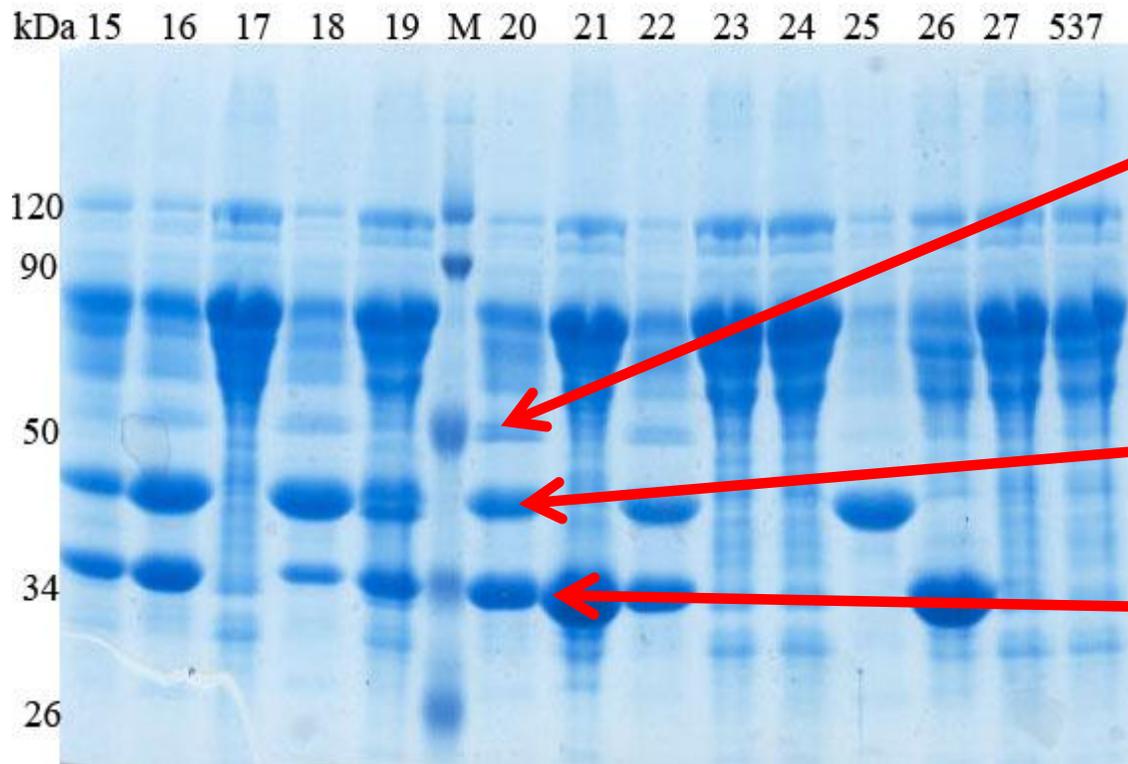


# Требования к кормовым ФП нового поколения (ИТОГ)

- Ферментные препараты должны иметь сбалансированный состав и содержание «кормовых» ферментов с минимальным содержанием балластных ферментов; желательно избегать применения моно-ферментных препаратов
- Индивидуальные ферменты, входящие в состав кормовых ферментных препаратов должны иметь максимально высокую молекулярную активность
- Ферменты не должны ингибироваться белковыми ингибиторами злаков
- Ферменты должны быть стабильны и не терять активности при 80°C в течение 5-10 мин, активность ферментных препаратов, в первую очередь ксиланазная, не должна теряться при осуществлении процесса гранулирования

# Получение штаммов-продуцентов мультиферментных комплексов кормовых ферментов (карбогидраз) нового поколения

Различные клоны (трансформанты)



➤ Эндо-глюканаза I *Trichoderma sp.*, обладает целлюлазной,  $\beta$ -глюканазной, ксилоглюканазной и ксиланазной активностью, высокой стабильностью, не ингибируется ингибиторами злаков

➤ Эндо-глюканаза II *Penicillium verruculosum*, обладает высокой молекулярной целлюлазной и  $\beta$ -глюканазной активностью и высокой стабильностью

➤ Ксиланаза Xyl E PCA, обладает высокой молекулярной активностью, высокой стабильностью, не ингибируется ингибиторами злаков

# Новый продукт ООО Агрофермент – АгроПрот: протеаза и ксиланазы

Кислая грибная протеаза. Ферментный препарат протеолитического спектра действия для повышения переваримости белковой составляющей рационов и лучшего использования кормов:

- Улучшает расщепление и всасывание протеинов корма
- Повышает уровень переваримого протеина
- Увеличивает процент мясности туш
- Повышает продуктивность

Может применяться для рационов различного состава:

- Племенного и промышленного стада птицы
- Поросят и маточного поголовья
- Молодняка и взрослых животных
- Товарной рыбы

# Новый продукт ООО Агрофермент – АгроПрот: протеаза и ксиланазы

Может заменить импортные продукты (в РФ не выпускается):

- Amano: **Amano A, B, M**
- Biocatalysis: **Promod 25, FlavourPro 192P**
- Enzyme Development corporation: **Enzeco Fungal Acid Protease**
- Meiji Seika Kaisha: **Proctase**
- Nagase Biochemiclas: **Denapsin**
- Novozymes: **Flavourzyme**
- Rohm GmbH: **Corolase PN, Vernon PS**
- Shin Nihon Chemical: **Sumizyme AP, Sumizyme LPL**
- Genencor & Danisco: **Acid fungal protease**
- DSM: **BackeZyme**
- Beijing Challenge Bio-technology: **Acid protease**

# Новый продукт ООО Агрофермент – АгроПрот: протеаза и ксиланазы

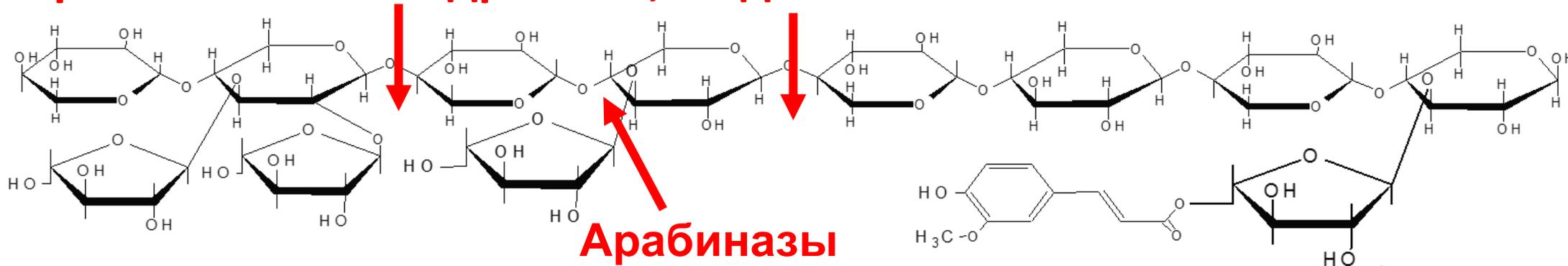
В состав АгроПрота входят следующие ферменты:

- Кислая протеаза (пенициллопепсин) – обеспечивает расщепление протеинов
- Лейцинаминопептидаза (экзо-пептидаза) – обеспечивает отсутствие горечи белковых гидролизатов
- Комплекс ксиланаз и гемицеллюлаз, обеспечивающих гидролиз арабиноксиланов зерна (ржи, пшеницы, тритикале)
  - Арабиноксилан гидролаза
  - Ксиланаза
  - Арабиназа

# Характер действия АгроПрота

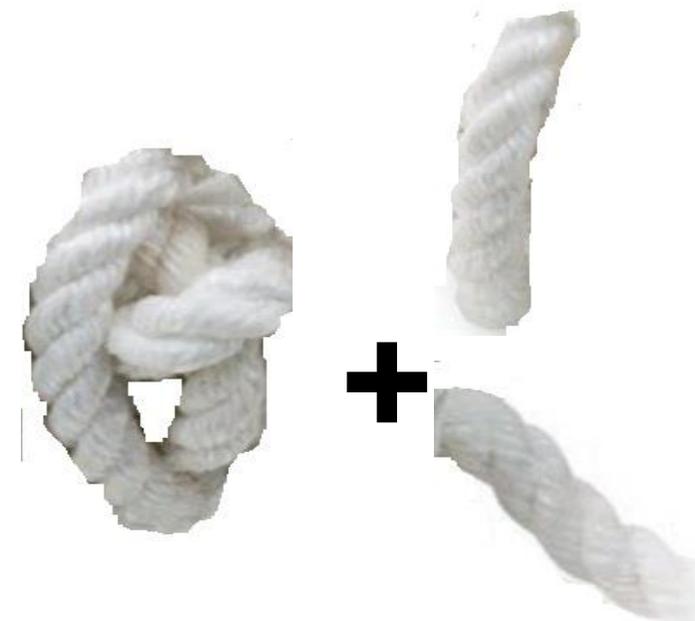
Арабиноксилан

Арабиноксилан гидролазы, эндо-ксилазаы



Исходный белок

Протеаза



Полипептиды с низкой молекулярной массой

# Завод по производству ферментных препаратов ООО «Агрофермент»



Современное опытно-промышленное биотехнологическое предприятие с использованием универсальной технологической схемы, позволяющей производить продукцию биосинтеза различного назначения (Тамбовская область РФ)