



УДК 636.087.8

Активность ферментных препаратов — важнейший критерий их свойств

Синицын А.П., доктор химических наук, профессор, химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

Синицына О.А., кандидат химических наук, химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

Кондратьева Е.Г., кандидат физико-математических наук, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Плохов А.Ю., кандидат технических наук, ООО «Агрофермент»

Аннотация: *В статье обсуждаются методические особенности определения ферментативных активностей коммерческих ферментных препаратов.*

Ключевые слова: *ферменты, pH, субстраты, ферментативные активности.*

The Activity of Enzymatic Preparations as a Main Criterion of Their Properties

Sinitsyn A.P., Dr. of Chem. Sci., Prof., Chem. Faculty

Sinitsyna O.A., Cand. of Chem. Sci., Chem. Faculty, Moscow State Univ. of M.V. Lomonosov

Kondratyeva E.G., Cand. of Phys.-Math. Sci., Institute of Biochemistry of A.N. Bach

Plokhov A.Yu., Cand. of Tech. Sci., «Agroferment» Co.

Summary: *The methodical approaches to the estimation of enzymatic activities in commercial enzyme preparations are discussed.*

Key words: *enzymes, pH, substrates, enzymatic activities.*

Коммерческие ферментные препараты (ФП, биокатализаторы, ферменты, энзимы) находят широкое применение в качестве кормовых добавок при кормлении сельскохозяйственных животных. Их действие направлено преимущественно на разрушение некрахмальных полисахаридов, а также фитатов зерна и сои. Для гидролиза полисахаридов используют ферменты-карбогидразы — целлюлазы, бета-глюканазы, ксиланазы, маннаназы, пектиназы, амилазы и другие, обладающие иной специфичностью действия. Для гидролиза фитина используют фитазу. Карбогидраз-

ные ФП в большинстве случаев являются комплексными, то есть имеют в составе несколько ферментов (например, целлюлазы и бета-глюканазы, целлюлазы и ксиланазы, и т.д.), хотя можно встретить и моноферментные препараты (например, имеющие только ксиланазу). Фитаза на рынке представлена, как правило, моноферментными препаратами.

ФП бывают жидкие, порошкообразные, гранулированные, капсулированные, в их составе кроме собственно ферментов (белковых биокатализаторов) есть различные вещества небелковой природы (соли, полисахариды,

полимерные материалы и т.д.), которые добавляются для увеличения стабильности ферментов при хранении и/или применении, а также для эффективности их действия, или стандартизации.

Для описания свойств коммерческих ФП используют данные об их специфичности, оптимальных значениях pH и температуре, стабильности, наличии (отсутствии) катионов тяжёлых металлов, микробной обсеменённости и т.д. Наиболее важной (ключевой) характеристикой ФП являются данные об их ферментативной активности, выраженной в единицах активности на 1 г (или 1 мл). В их

описании можно встретить данные о целлюлазной, бета-глюканазной, ксиланазной, маннаназной, пектиназной, амилазной, фитазной и других видах активности. Именно эта характеристика и определяет в итоге выбор нужного ФП, его дозировку, эффективность применения и в конечном счёте затраты на применение. Очевидно, что прямым способом определения активности («активности по применению») является испытание «in vivo», то есть непосредственно при кормлении животных, однако это далеко не всегда возможно, особенно на стадии разработки и изготовления препарата. Поэтому в практике промышленной энзимологии при производстве и коммерциализации ферментов в качестве характеристики принято использовать значение активности, определённой «in vitro» — в условиях биохимической лаборатории без использования живых организмов.

Принципы определения активности препаратов заключаются в следующем. Прежде всего подбирают определённый, специфический для того или иного фермента и коммерчески доступный субстрат. Например, для оценки активности целлюлаз в качестве субстратов используют карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ), микрокристаллическую целлюлозу, фильтровальную бумагу; для определения бета-глюканазной активности — бета-глюкан ячменя или овса; ксиланазной — ксилан пшеницы, берёзы; маннаназной — галактоманнан акации; пектиназной — свекловичный,

цитрусовый, яблочный и другие пектины; амилазной — картофельный и другие виды крахмала; фитазы — фитаты натрия, кальция, выделенные из кукурузы, риса или других источников. Процесс изучения активности заключается в том, что в реакционной ячейке смешивают раствор субстрата определённой концентрации с раствором ФП определённой концентрации, при этом в реакционной смеси инициируется ферментативная реакция превращения субстрата. Реакционную смесь инкубируют строго заданное время при фиксированных значениях pH и температуры, далее из реакционной смеси отбирают пробу (пробы), в которой(ых) какими-либо химическими/инструментальными методами определяют концентрацию образовавшихся продуктов реакции. Продуктами действия карбогидраз являются моно- и олигосахариды, а продуктами ферментативной деструкции полисахаридов являются так называемые «восстанавливающие сахара» (ВС), поскольку разрыв гликозидных связей между моносахаридными звеньями полисахаридных субстратов сопровождается образованием восстанавливающей концевой гликозидной группы. Концентрацию ВС оценивают с помощью специфических колориметрических реакций с динитросалициловой кислотой (ДНС), а также медно-арсено-молибдатным методом (Нельсона-Шомоди, НШ), бицинкониатным или другим. В случае фитазы продуктом деструкции фитина яв-

ляются свободные фосфатные группы, концентрация которых изучается, как правило, с помощью колориметрической реакции с молибдатом аммония и образованием фосфомолибдата.

Активность ферментов определяют, зная концентрацию образовавшихся продуктов реакции, время реакции, за которое она достигнута, а также концентрацию ФП. Для выражения активности используют наиболее предпочтительные «международные единицы» (МЕ), когда за единицу активности считают такое количество фермента, которое катализирует образование 1 микромоля продуктов из соответствующего субстрата за 1 мин при оптимальных для данного препарата температуре и pH. Активность выражают также в «каталях» (КАТ) — количество ФП, которое катализирует образование 1 моля продуктов из соответствующего субстрата за 1 с (легко подсчитать, что 1 КАТ = 6×10^7 МЕ). Однако в промышленной энзимологии выражать активность в КАТ обычно не принято.

По существу, за активность ФП принимают скорость образования продуктов реакции, отнесённую к единице концентрации препаратов. Это в самом простом виде можно выразить формулой: $A \text{ (МЕ/г, мл)} = [P] / \tau \times [E]$, где [P] — концентрация продуктов ферментативной реакции, образовавшихся за время реакции τ под действием ФП с концентрацией [E]. Активность выражают в МЕ, которую имеет 1 г (1 мл) ФП. Отметим, что в ряде случаев используют понятие «удель-





ная активность», отнесённая к содержанию белка в ФП (как отмечалось выше, ФП помимо белка содержит другие вещества небелковой природы). Удельная активность выражается в МЕ/мг белка.

При кажущейся относительной простоте понятий и подходов, используемых для определения активности ФП, существует ряд особенностей, заметно усложняющих картину. Важно уточнить, что активность препаратов оценивают по начальной скорости образования продуктов реакции, поскольку только на начальном участке процесса ферментативного превращения субстрата концентрация продуктов линейно зависит от времени процесса. Кроме того, на начальном участке не проявляется действие таких факторов, как ингибирование ферментов продуктами реакции, а также их инактивация. Иными словами, интервал времени τ , в течение которого проводят ферментативную реакцию, должен быть как можно меньше (для карбогидраз оно обычно составляет 5–10 мин, для фитазы — 15–30 мин). На практике временной интервал, в течение которого определяют начальную скорость реакции ферментативного превращения субстрата в компании-изготовителе ФП, сертификационных, испытательных, производственных, исследовательских или иных лабораториях, варьируется в заметных пределах, что может приводить к вариациям измеряемой активности. Важным является также выбор концентрации (разбавления) ферментов в реак-

ционной смеси. Она должна определяться в той области, где наблюдается линейная зависимость между измеряемой активностью и концентрацией ФП. Эта область линейности, как правило, характерна для весьма низких концентраций, выше их зависимость скорости от концентрации ФП приобретает характер кривой. Выбор концентрации субстрата не столь сильно влияет на активность ферментов, поскольку наиболее важным критерием в данном случае является обеспечение в реакционной смеси концентрации самого субстрата, превышающей значения константы Михаэлиса в 2–3 раза. В этом случае начальная скорость ферментативной реакции практически не зависит от концентрации субстрата (обычно для карбогидраз наиболее подходящая концентрация полисахаридных субстратов в реакционной смеси 5–10 г/л, для фитазы — концентрация фитата 1–2 мМ).

Наконец отметим, что для карбогидраз имеет значение метод определения концентрации ВС, поскольку различные перечисленные выше методы обладают разной чувствительностью, что сказывается на результатах оценки активности.

Безусловно, важным является выбор рН и температуры для определения активности ФП. Выше было отмечено, что активность следует определять при оптимальных значениях этих параметров (для карбогидраз и фитазы рН составляет обычно 4,5–6,0, температура — 45–55° С). Понятно, что они несколько отличаются

от «физиологических» (характерных для разных участков желудочно-кишечного тракта животных). Отметим, что зависимость активности от рН и температуры имеет колоколообразный характер, причём активность при изменении рН на одну единицу может варьироваться на десятки процентов, а температуры на 10° С — в 2 и более раз. Очевидно, что для выражения активности ФП должен достигаться компромисс между изготовителями (разработчиками) и его клиентами, поскольку в первом случае необходимо руководствоваться стандартными требованиями, во втором — информацией об активности препарата при физиологических значениях рН и температуры. Обычно этот компромисс достигается тем, что для ФП приводится активность, определённая как в стандартных, так и в физиологических условиях.

В целом с учётом сказанного выше можно заключить, что активность ФП, определённая в разных лабораториях или разными производителями, может заметно варьироваться, поскольку могут быть использованы разные временные интервалы проведения реакции ферментативной деструкции субстрата, разбавления, а также рН и температура. В ряде случаев применяют разные формулы расчёта активности (традиционно принятые в практике той или иной лаборатории или компании), вводятся пересчётные коэффициенты, приводящие к заметному отличию активности от значений, полученных в МЕ или в КАТ.

Активность, ед/г							
Ферментный препарат	КМЦ (НШ), МГУ	КМЦ / КМЦЛА (ДНС), ГОСТ	β -глюканаза (НШ), МГУ	β -глюканаза (ДНС), ГОСТ	Ксиланаза (НШ), МГУ	Ксиланаза / КсА (ДНС), ГОСТ	Фитаза, МГУ
Условия определения активности	50°C, pH 5.0	50°C, pH 4.7	50°C, pH 5.0	50°C, pH 4.7	50°C, pH 5.0	50°C, pH 4.7	40°C, pH 5.0
Карбогидразы различных производителей, представленные на российском рынке							
Агроцелл, «Агрофермент»	4100	6590	3500	15360	1180	4490	–
Агроксил, «Агрофермент»	1010	1610	990	4350	5200	19860	–
Карбогидраза 1	130	210	130	560	150	580	–
Карбогидраза 2	15	25	30	140	970	3700	–
Карбогидраза 3	225	370	280	1230	1980	7560	–
Карбогидраза 4	350	570	320	1400	720	2750	–
Карбогидраза 5	1200	1930	3100	13610	2360	9010	–
Карбогидраза 6	4000	5000	3100	9100	610	2500	–
Карбогидраза 7	1600	2000	1300	3700	4000	16400	–
Фитазы различных производителей на российском рынке							
Агрофит, «Агрофермент»	–	–	–	–	–	–	5570
Фитаза 1	–	–	–	–	–	–	5430
Фитаза 2	–	–	–	–	–	–	8850
Фитаза 3	–	–	–	–	–	–	1350
Фитаза 4	–	–	–	–	–	–	1450
Фитаза 5	–	–	–	–	–	–	850

В таблице показаны данные, полученные на кафедре химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, характеризующие активность ряда импортных ФП карбогидраз и фитаз, а также препаратов, любезно предоставленных биотехнологическим заводом «Агрофермент» (Тамбовская обл.): Агроцелл, Агроксил и Агрофит. Они представляли собой сухой микрогранулят.

В качестве субстратов для определения активности карбогидраз были использованы Na-соль КМЦ (целлюлазная активность), бета-глюкан ячменя (бета-глюканазная активность), ксилан берёзы (ксилазная активность).

Для оценки целлюлазной, бета-глюканазной и ксиланазной активностей использовали методики МГУ, когда для определения ВС в качестве продуктов гидролиза полисахаридов использовали метод НШ в пересчёте на глюкозу (целлюлазная и бета-глюканазная активности) или на ксилозу (ксилазная активность); фермента-

тивный гидролиз полисахаридных субстратов проводили в течение 5 мин при 50° С и pH 5,0, концентрация полисахаридных субстратов в реакционной смеси составляла 5 г/л. Кроме того, целлюлазную (КМЦЛА) и ксиланазную (КсА) активности определяли по ГОСТ, что подразумевало определение ВС в качестве продуктов методом ДНС в пересчёте на глюкозу (КМЦЛА) или на ксилозу (ксилазная активность), проведение гидролиза Na-КМЦ и ксилана берёзы в течение 10 мин при 50° С и pH 4,7; концентрация Na-КМЦ и ксилана в реакционной смеси составляла 5 г/л.

Разница в методах МГУ и ГОСТ заключалась в разном времени ферментативной реакции (5 и 10 мин соответственно), в значении pH (5,0 и 4,7) и в методах определения концентрации ВС (НШ и ДНС).

Отметим, что бета-глюканазную активность оценивали также по методу, аналогичному ГОСТ для КМЦ-азной активности. За 1 единицу активности карбогидраз

принимали количество фермента, катализирующего гидролиз Na-КМЦ (целлюлазы), бета-глюкана ячменя (бета-глюканаза) или ксилана берёзы (ксилаза) до образования 1 мкмольа ВС за 1 мин при 50° С и pH 5,0 (по методу МГУ) или 50° С и pH 4,7 (по ГОСТ).

Для определения фитазной активности применяли метод МГУ, который соответствует широко распространённому международному методу.

В качестве субстрата использовали фитат Na из риса. Фосфат-анионы в гидролизе фитата определяли с помощью аммоний-молибдатного реагента, применяя в качестве восстановителя хлорид железа. Ферментативный гидролиз фитата проводили в течение 30 мин при 40° С и pH 5,0, концентрация фитата в реакционной смеси составляла 1,3 мМ. За 1 единицу фитазной активности принимали количество фермента, катализирующего гидролиз фитата с образованием 1 мкмольа неорганического фосфата при 40° С и pH 5,0.





Анализ полученных данных, приведённых в таблице, позволяет заключить следующее. Карбогидразные ФП различных производителей заметно отличаются по уровню общей активности. Большинство из них являются комплексными препаратами и обладают в различном соотношении разными видами активности — целлюлазной (КМЦ-азной), бета-глюканазной и ксиланазной. Исключением является ФП под номером 2, имеющий в своём составе преимущественно ксиланазу.

Соответственно эти данные необходимо учитывать при выборе ФП для использования в кормах, составленных на основе конкретного рациона. За счёт их совокупной комплексной активности достигается более глубокий гидролиз некрахмальных полисахаридов и, как следствие, существенно повышается степень конверсии кормов по сравнению с моноферментными препаратами, увеличивается прирост и снижаются отходы птицефабрик и животноводческих хозяйств.

Например, препарат Агроцелл преимущественно применяется

при использовании кормов на основе зерновых, содержащих в основном бета-глюканы (ячмень, подсолнечник и т.д.), которые под воздействием данного ФП переходят в легкодоступные вещества для организма животного.

При потреблении кормов на основе пшеницы или ржи для расщепления содержащихся в зерне ксиланов применяют Агроксил, обладающий большей ксиланазной активностью.

Фитазные ФП имеют только фитазную активность и используются в кормах совместно с карбогидразами. Так, препарат Агрофит делает легкодоступным для организма животных фосфор зерновых, что обеспечивает улучшение его усвоения, а также кальция, магния, микроэлементов, сырого протеина и аминокислот, увеличивая энергетическую ценность корма.

Для потребителей кормовых ферментных препаратов очень важно знать, что значения активности, измеренные с помощью разных методов, существенно отличаются между собой. Так, КМЦ-азная активность, определённая по ГОСТ, примерно в

1,3–1,4 раза превышает, измеренную по методу МГУ; бета-глюканазная — в 3,0–4,4, ксиланазная — в 3,8–4,4 раза.

Это также необходимо учитывать для корректного выбора кормовых ферментных препаратов.

Литература:

1. Сеницын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. М.: Изд-во МГУ. 1995. 224 с.
2. Сеницына О.А., Фёдорова Е.А., Гусаков А.В., Упоров И.В., Соколова Л.М., Бубнова Т.М., Окунев О.Н., Чулкин А.М., Винецкий Ю.П., Сеницын А.П. Выделение и свойства внеклеточной фитазы *Penicillium canescens*. Биохимия, 2006. Т. 71. Вып. 9. С. 1260-1268.
3. ГОСТ Р 53046-2008. Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности целлюлазы.
4. ГОСТ Р 53047-2008. Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности ксиланазы.

Для контакта с авторами:

Сеницын Аркадий Пантелеймонович
Сеницына Ольга Аркадьевна
Кондратьева Елена Геннадиевна
тел.: 8 (495) 939-59-66
Плохов Алексей Юрьевич