



Различные методы определения ферментативных активностей кормовых добавок

Проф. Аркадий П. Сеницын

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

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова

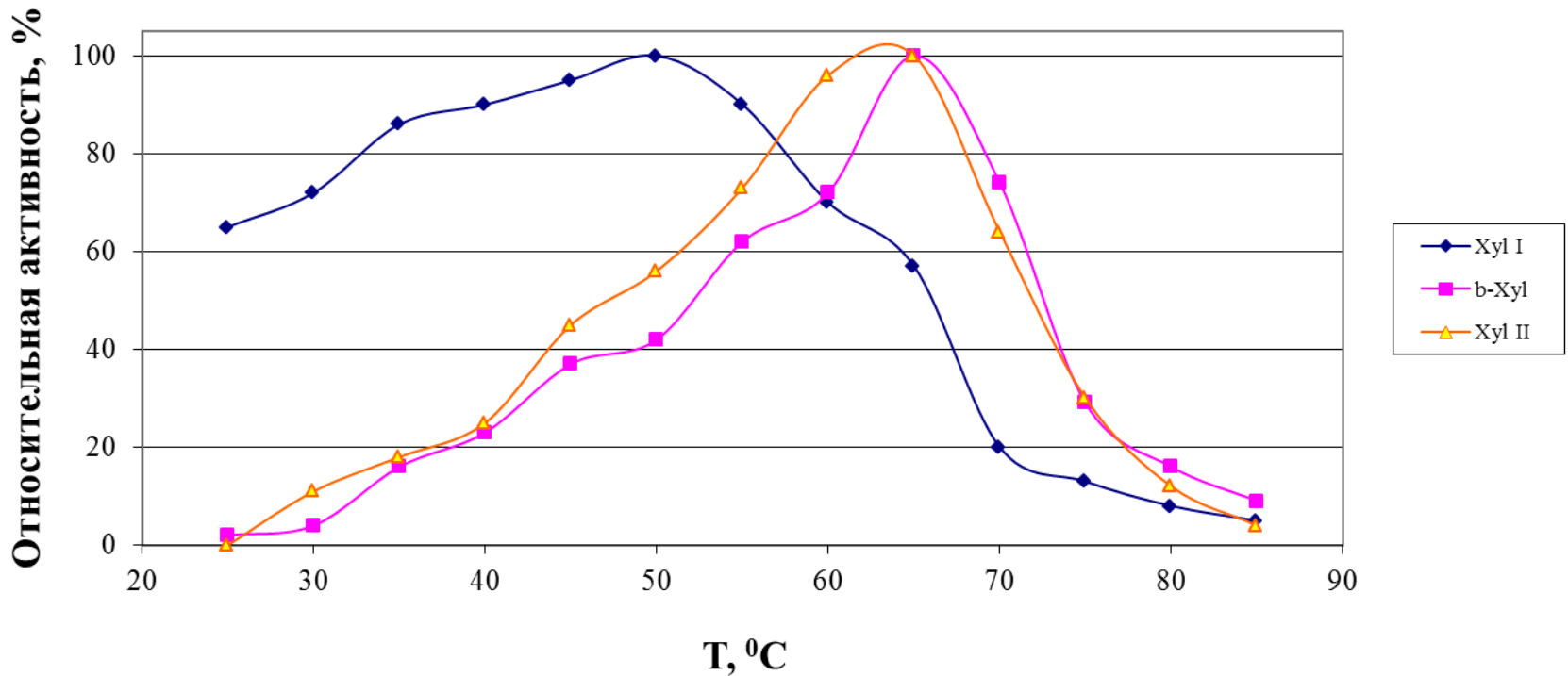
**23-й Научно-практически семинар по оптимизации кормления
сельскохозяйственных животных.
ООО «Агрофермент», 23 октября 2015 г.**

- Активность ферментов (ферментных препаратов) характеризует скорость осуществляемой ими биохимической (биокаталитической) реакции
- Знание активности ферментов (ферментных препаратов) позволяет выбрать правильную дозировку при их применении, а также контролировать ход процесса получения ферментов и их хранения

- Активность определяют по скорости с которой фермент осуществляет (катализирует) ту или иную реакцию.
- Скорость ферментативной реакции определяют по накоплению конечных продуктов или по убыли субстрата
- Скорость ферментативной реакции зависит от концентрации, удельной каталитической активности фермента, концентрации субстрата, а также от условий реакции – pH и температуры реакционной среды
- На скорость может оказывать влияние наличие и концентрации в реакционной среде ингибиторов (активаторов), ПАВ, хелатирующих агентов, анионов и катионов ...
- Активность определяют в строго определенных (стандартных) условиях (вид субстрата, [E], [S], T, pH, τ ,), оптимальных для конкретного фермента

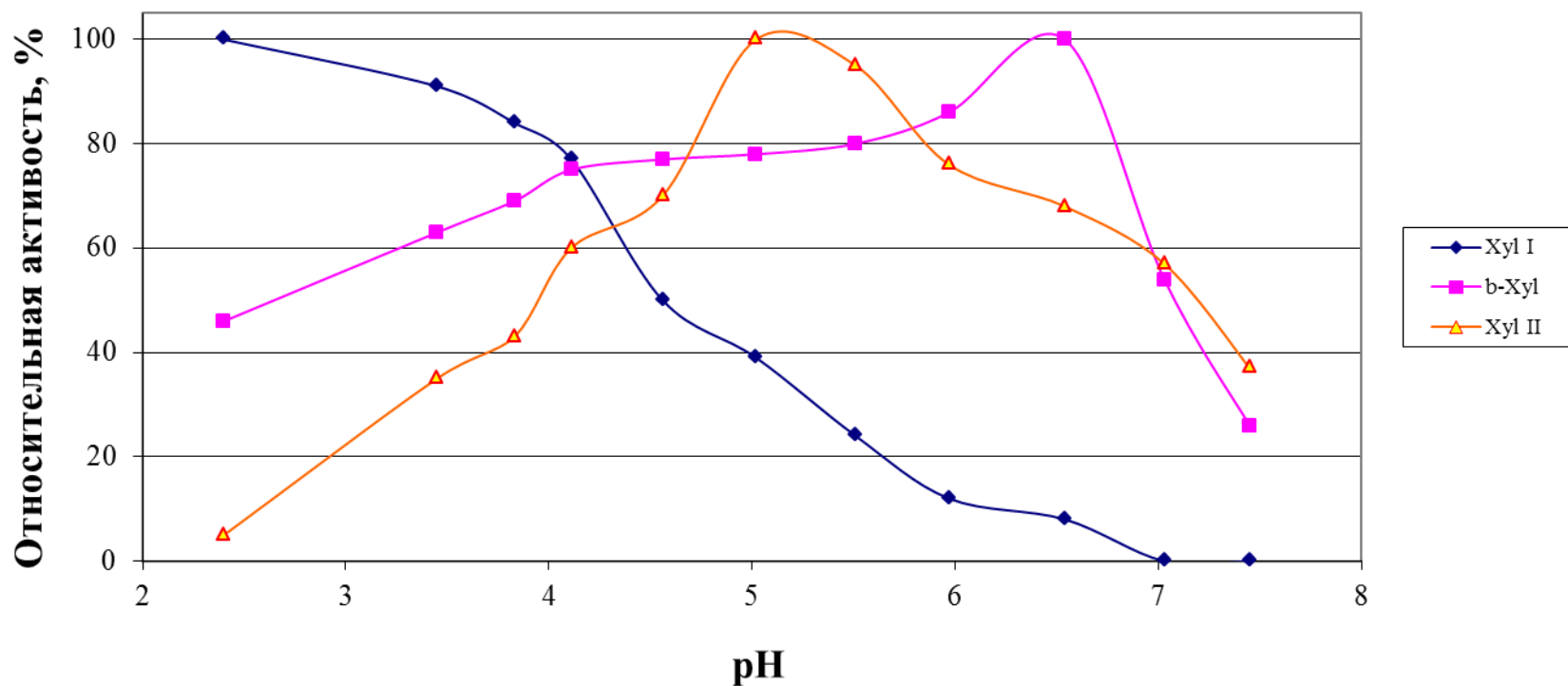
Влияние температуры на активность ферментов

Температурные профили активности ксиланазы I, ксиланазы II и β -ксилозидазы *Trichoderma* (pH 5.0)



Влияние pH на активность ферментов

рН-профили активности ксиланазы I, ксиланазы II и β -ксилозидазы *Trichoderma* (50°C)



Уравнение Михаэлиса-Ментен, значения параметров

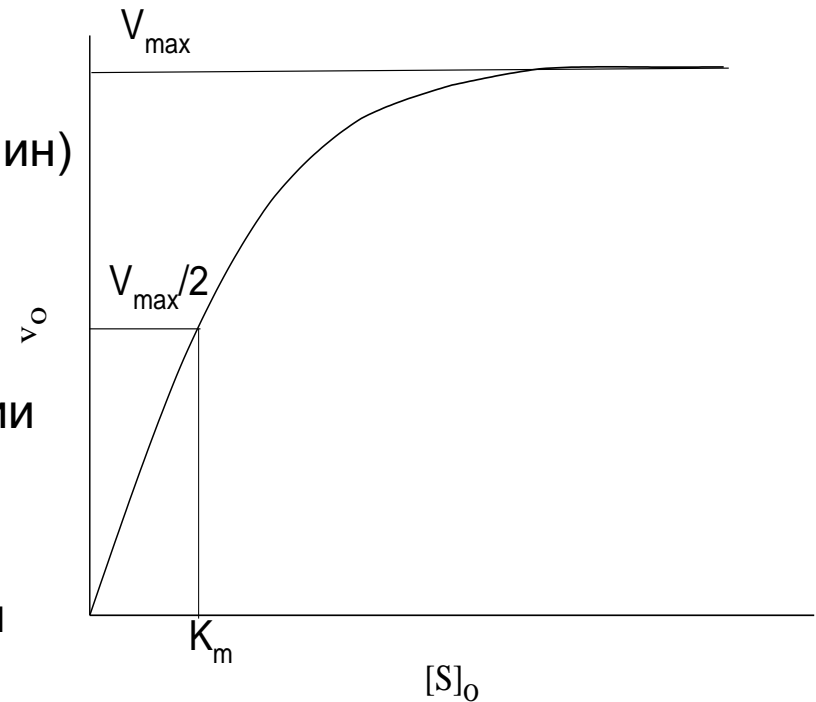
$$v = \frac{k_{\text{кат}} [E]_0 [S]_0}{K_m + [S]_0}$$

$k_{\text{кат}}$ — каталитическая константа
(число актов трансформации субстрата, совершаемое одной молекулой фермента в единицу времени), размерность – 1/с (1/мин)

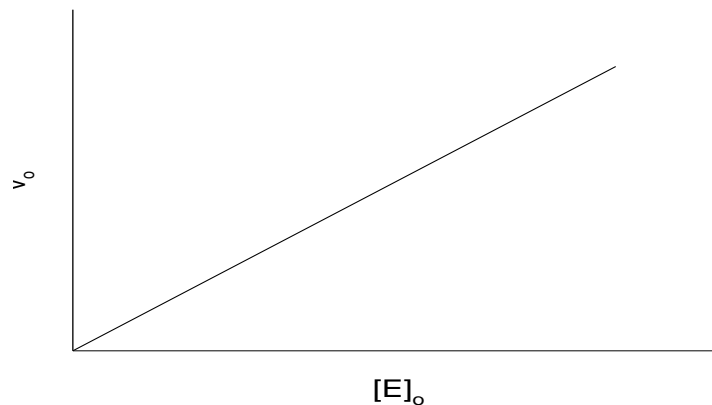
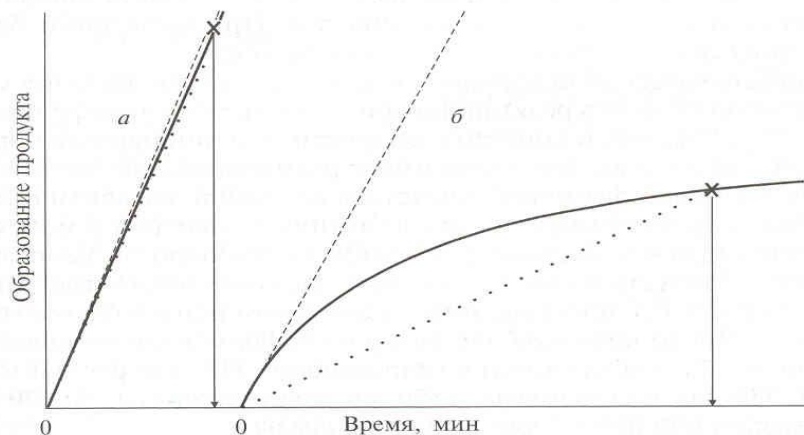
$$V_{\text{max}} = k_{\text{кат}} [E]_0$$

Максимальная скорость реакции, зависит от каталитической константы и концентрации фермента (М/с, мМ/мин, мкМ/мин)

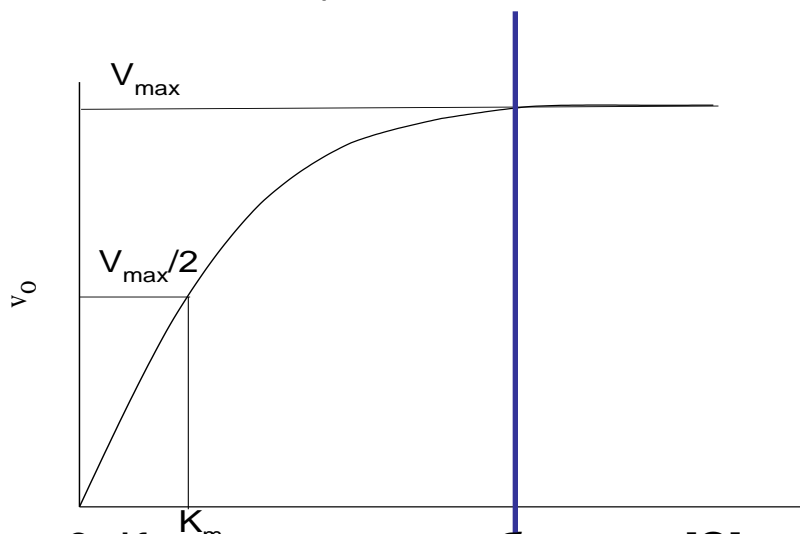
Константа Михаэлиса имеет размерность концентрации (М, мМ, мкМ). Ее физический смысл – концентрация субстрата, при которой достигается половина максимальной скорости реакции.



Стандартные условия определения активности ферментов



1. Метод касательных, определение активности по начальным скоростям (v_0)



3. Концентрация субстрата $[S] > K_m$ ($[S] = 2-3 \times K_m$)

2. Выбор разведения ферментного препарата для обеспечения линейной зависимости начальной скорости от концентрации фермента
4. Проведение ферментативной при оптимальных значениях pH и T (или при стандартных (строго определенных значениях pH и T)
5. Выбор строго определенной по составу и молярности буферной системы для поддержания pH

Единицы активности

- Международные единицы (ME, IU) – количество фермента, обеспечивающего скорость конверсии 1 мкмоля субстрата в 1 мин при стандартных (оптимальных) условиях (используются в РФ)
- Единицы IUPAC (в системе SI), «каталь» (кат) - количество фермента, обеспечивающего скорость конверсии 1 моля субстрата в секунду при выбранных условиях реакции,
 - 1 кат = 60 000 000 ME, 1 нкат = 0,060 ME
- Единицы ГОСТ
- Единицы производящих ферменты компаний
- Единицы исследовательских лабораторий

Характеристики ферментных препаратов

- Содержание белка (метод Лоури и др.)
- **Целевая активность (активности) – целлюлазная + β -глюканазная + ксиланазная; фитазная; протеазная; амилазная**
- рН и температурные оптимумы (зависимости) целевой активности, операционная стабильность, стабильность при хранении
- Форма, формулирование, стандартизация – сухая, гранулированная (наполнители, стабилизаторы), жидкая концентрированная (стабилизаторы)
- Наличие / отсутствие контаминации (следов распада белков, протеолиза, автолиза, запахов, помутнений, осадков и т.д.)
- Состав и степень очистки – определение целевых ферментов мультиферментного комплекса, определение наличия посторонних (балластных) белков
- Тест на целевую активность (применение в кормлении)
- Упаковка (форма, объем, для сухих и жидких ферментных препаратов), маркировка (название, партия, активность и т.д.), цвет, плотность, насыпной вес

Методы анализа активности и свойств ферментов

- Спектральные методы

- Фотометрия в УФ и видимом диапазоне (наиболее распространённый метод, основан на измерении поглощения света), связана с применением химических методов для осуществления «цветных реакций», а также с применением окрашенных субстратов – определение белка, нуклеиновых кислот, фосфатов, липидов, сахаров
- Флуориметрия (более чувствительный, менее универсальный, основан на поглощении и испускании света)
- Люминометрия (очень чувствительный, основан на собственном свечении)
- Турбидиметрия (рассеяние света) при образовании суспензии субстратов или клеток

- Электрохимические методы

- Титриметрический метод (рН-статирование, измерение изменения рН)

- Вискозиметрические методы – основаны на уменьшении вязкости полимерных субстратов, в первую очередь полисахридов (карбогидразы), определение вязкости ферментационных сред

- Хроматографические методы (ТСХ, ЖХ, ВЭЖХ, белковая хроматография)

- Электротранспортные методы

- Электрофорез (в денатурирующих и неденатурирующих условиях) – определение молекулярной (Мм) массы белков и пептидов
- Электрофокусирование – определение изоэлектрической точки белков (pI)

- Масс-спектрометрические методы

Проведение анализа активности ферментов-1

- Правильный выбор субстрата
 - целлюлазы – КМЦ (раств.), КМЦ-азур (окраш.), МКЦ, ФБ (нераств.)
 - бета-глюканазы – β -глюкан ячменный
 - ксиланазы – ксилан берёзовый
 - амилазы – крахмал картофельный
 - пектиназы – пектин цитрусовый (яблочный, свекловичный)
 - фитаза (фитат Na рисовый)
 - протеазы (казеин, гемоглобин)
- Правильный выбор колориметрирования (спектрофотометрирования)
 - собственное поглощение вещества (продукта) – азур (КМЦ-азур)
 - через использование хромофоров (цветные реакции) – ФБ, КМЦ, β -глюкан, ксилан, крахмал, пектин (ВС через ДНС или по Нельсону-Шомоди)
- Выбор рН и температуры реакции
 - Выбор буфера с нужным значением рН и молярности
 - Термостатирование (включая предварительное)
- Выбор времени ферментативной реакции (обычно 1-5-10 мин)
- Выбор способа остановки реакции (увеличение температуры, изменение рН, разбавление)

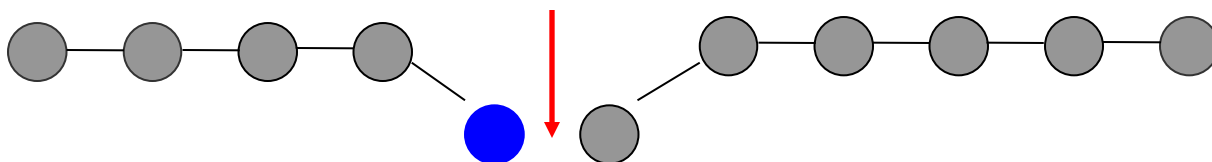
Проведение анализа активности ферментов-2

- Раздельное хранение ферментных препаратов и субстратов (в холодильнике)
- Приготовление запасных растворов ферментов и субстратов (в буфере)
- Предварительный выбор рабочей концентрации фермента (субстрата) в реакционной смеси: [E] должна позволить определить активность в течение 1-5-10-60 мин, чтобы оптическая плотность была в диапазоне $A=0,3-1,0$ ед
- Ферментативная реакция начинается путем внесения раствора фермента в раствор субстрата (с определенными рН и температурой)
- Как правило, активность сухих ферментных препаратов варьирует в пределах 500-20000 ед/г, жидких – 100-5000 ед/мл

Активность целлюлаз, бета-глюканаз, ксиланаз

*Наиболее важны для кормового применения,
уменьшают вязкость НПС*

Целлюлазы, β -глюканазы, ксиланазы

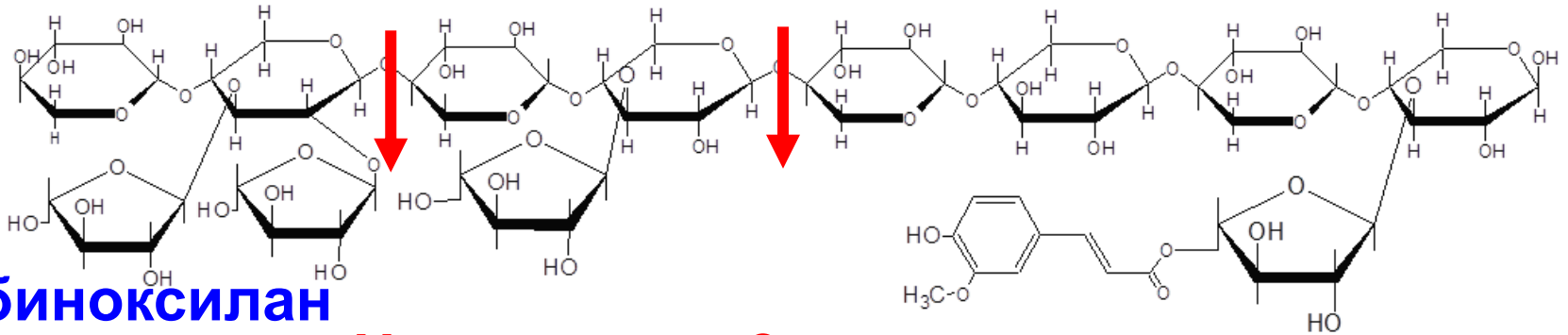


Образование восстанавливающих сахаров (ВС)

В основу метода определения целлюлазной, β -глюканазной и ксиланазной активности положено определение начальной скорости образования ВС с помощью метода Нельсона-Шомоди (или ДНС) из КМЦ, β -глюкана и ксилана

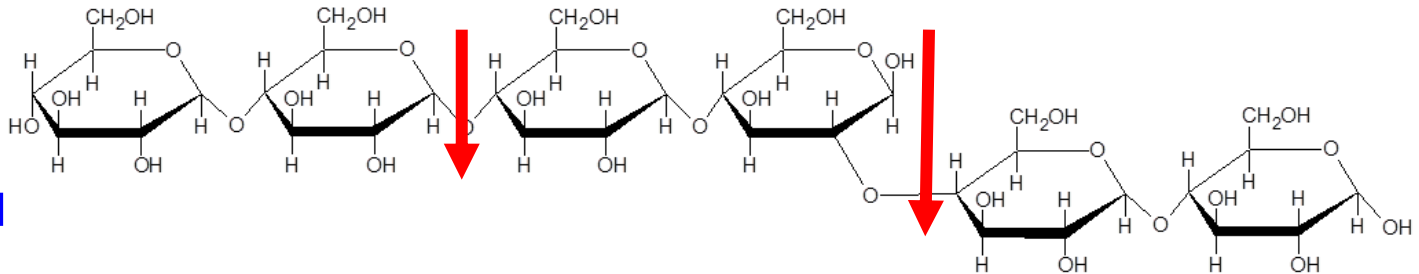
Время гидролиза – 5-10 мин, [S] = 5 г/л, pH = 5, 50°C

Ксиланазы



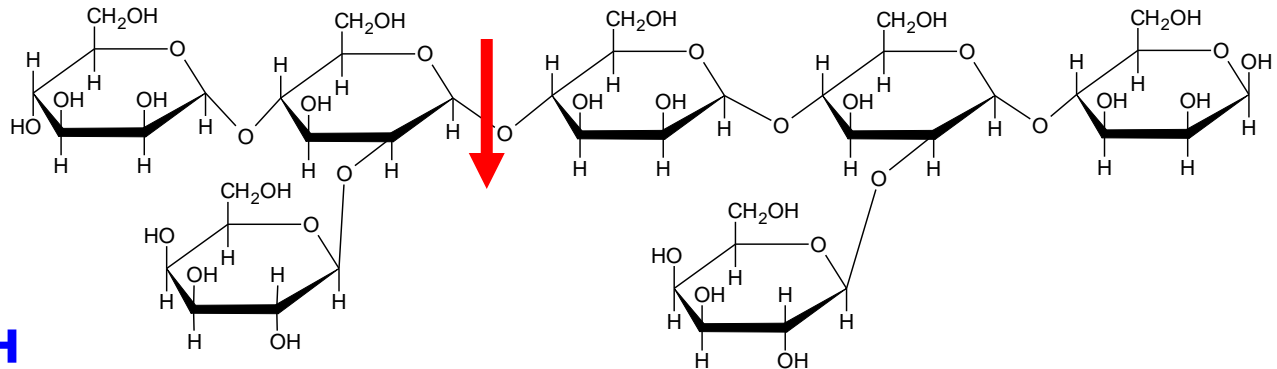
Арабиноксилан

Целлюлазы, β -глюканазы



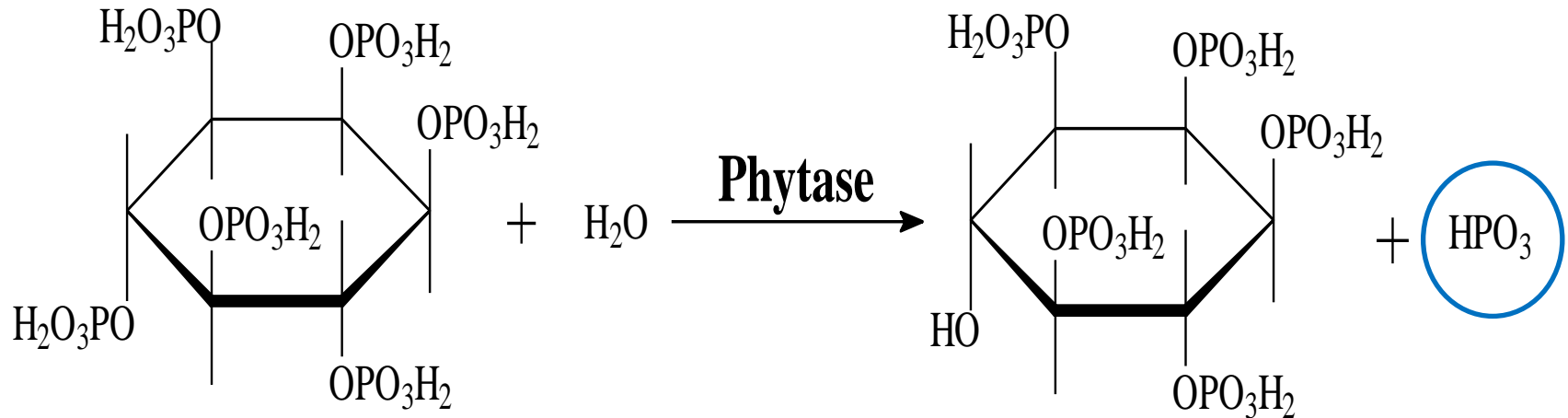
β -Глюкан

Манназаы



Галактоманнан

Активность фитазы



myo-Inositol hexakisphosphate

1*L*-*myo*-Inozitol 1,2,3,4,5-pentakisphosphate

В основу метода определения фитазной активности положено определение начальной скорости образования фосфатных групп из фитата Na с помощью аммоний-молибденового реагента

Время гидролиза – 30 мин, [S] = 1,4 мМ, рН = 5, 50°С

Расчет ферментативной активности

$$\text{Ак-ть} = \frac{\Delta A \times \text{объем реакционной смеси} \times \text{ФР}}{\varepsilon \text{ (л/моль} \times \text{см}^{-1}) \times \text{объем фермента в реакц. смеси} \times \text{время}}$$

$$\text{Ак-ть} \frac{\text{МЕ}}{\text{мл}} = \frac{\Delta A \times \text{объем реакционной смеси (мл)} \times \text{ФР} \times 100000}{\varepsilon \text{ (л/моль} \times \text{см}^{-1}) \times \text{объем фермента в реакц. смеси} \times \text{время (мин)}} = \frac{\text{мкМ/мин}}{\text{мл}}$$

100000 - фактор пересчета моль/л в мкмоль/л в коэффициенте экстинкции
ФР – фактор разведения фермента

Удельная активность = Активность / содержание белка в препарате (МЕ/мг белка)

Определение активности по полисахаридным субстратам

Активности ФП по отношению к полисахаридным субстратам (КМЦ, бета-глюкан ячменя, ксилан березы «Sigma») рассчитывали по начальным скоростям образования восстанавливающих сахаров (ВС), определяемых методом Шомоди-Нельсона в глюкозном (КМЦ-аза, бета-глюканаза) и ксилозном (ксиланаза) эквиваленте].

Для определения активности отношению к полисахаридным субстратам использовали 10 г/л раствор КМЦ, бета-глюкана или ксилана в 0.1 М Na-ацетатном буфере, pH 5.0.

Раствор субстрата (100 мкл) смешивали со 60 мкл 0.1 М Na-ацетатного буфера, pH 5.0 и 40 мкл раствора фермента и инкубировали 5 мин (КМЦ) или 10 мин (бета-глюкан и ксилан) при 50°C.

Далее вносили 200 мкл реагента Шомоди и кипятили 45 мин на водяной бане. После охлаждения до комнатной температуры добавляли 200 мкл реагента Нельсона, 1400 мкл воды и регистрировали интенсивность окраски полученного раствора при 610 нм.

Рассчитывали активность ФП (ед/мл) по формуле:

$$A = (C_i \cdot 10^6 \cdot 5 \cdot R_E) / (M_r \cdot 10^3 \cdot t_p),$$

где C_i – концентрация ВС в глюкозных или ксилозных эквивалентах (г/л), определённая исходя из калибровочного графика, полученного с помощью глюкоза или ксилозы (0-0.2 г/л),

5 – разбавление ферментного препарата в реакционной смеси,

R_E – предварительное разбавление ферментного препарата,

M_r – молекулярная масса глюкозы или ксилозы (180 или 150 г/моль),

t_p – время реакции (5 или 10 мин),

10^6 – коэффициент, учитывающий переход единиц измерения (от моль/л к мкмоль/л),

10^3 – коэффициент пересчёта на 1 мл фермента.

Единица КМЦ-азной, бета-глюканазной и ксиланазной активности соответствует такому количеству ФП, которое приводило к образованию одного микромоля ВС за 1 мин при использовании в качестве субстратов КМЦ, бета-глюкана и ксилана, соответственно, при концентрации субстрата 5 г/л, 50°C и pH 5.0.

Определение фитазной активности

Активность ФП по отношению к фитату Na (производства фирмы «Sigma») рассчитывали по начальным скоростям образования свободных фосфатных групп, определяемых с помощью аммоний-молибденового реагента [Engelen A.J., van der Heeft F., Randsdorp P.H., Smit E.L., J. AOAC Int., 77, 1994, 760-764].

Для определения фитазной активности использовали 1.4 мМ раствор фитата Na из риса в 0.1 М Na-ацетатном буфере, pH 5.0, 40°C.

Раствор субстрата (300 мкл) смешивали с 33 мкл раствора фермента и инкубировали 30 мин при 40°C.

Реакцию останавливали добавлением 335 мкл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

Концентрацию свободного фосфата (P_i) определяли с помощью аммоний-молибденового реагента (13 мМ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ / 8.1 мМ $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_2\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ / 0.533 М H_2SO_4). Реакционную смесь инкубировали с 665 мкл свежеприготовленного реагента в течение 30 мин при комнатной температуре.

Интенсивность окраски полученного раствора регистрировали при 750 нм.

Рассчитывали активность ФП (ед/мл) по формуле:

$$A = P_i \cdot 10^6 \cdot R_{pc} \cdot R_E / (M_r \cdot 10^3 \cdot t_p),$$

где P_i – концентрация фосфата (г/л), определённая исходя из калибровочного графика, полученного с помощью KH_2PO_4 (0-0.21 г/л),

R_{pc} – разбавление ферментного препарата в реакционной смеси (10 в условиях метода),

R_E – предварительное разбавление ферментного препарата,

M_r – молекулярная масса фосфата (136 г/моль),

t_p – время реакции (30 мин),

10^6 – коэффициент, учитывающий переход единиц измерения (от моль/л к мкмоль/л),

10^3 – коэффициент пересчёта на 1 мл фермента.

Единица фитазной активности соответствует такому количеству ФП, которое приводит к образованию из фитата Na одного микромоля фосфатных групп за 1 мин при концентрации субстрата 1.4 мМ, 40°C и pH 5.

Примеры анализа активности ферментных препаратов

Препарат	Белок, мг/г	КМЦ -аза	Бета- глю- каназа	Ксила- наза	Фитаза	Протеаза (ПЕ, по Ансону)
		50°C, pH5.0	50°C, pH5.0	50°C, pH5.0	40°C, pH5.0	50°C, pH7.2
<u>Препарат 1</u> Ксиланаза - 600 ед/г, Протеаза - 8000 ед/г	56	30	20	170	-	40
<u>Препарат 2</u> Фитаза min 300 ед/г	50	-	-	-	300	-
<u>Препарат 3</u> Протеаза - мин. 7500 ед/г, Целлюлаза - мин. 45 ед/г	8	30	30	40	-	0
<u>Препарат 4</u> Целлюлаза - не менее 5000 ед/г	131	500	856	1370	-	-
<u>Препарат 5</u> Фитаза - мин 16000 ед/г	25	-	-	-	7800	-
<u>Препарат 6</u> Протеаза > 75000 ед/г	59	-	-	-	-	340
<u>Препарат 7</u> Фитаза > 10 000 ед/г	22	-	-	-	6800	-
<u>Препарат 8</u> Фитаза > 5000 ед/г	44	-	-	-	6200	-
<u>Препарат 9</u> Ксиланаза > 90 000 ед/г, Целлюлаза > 12 500 ед/г, Бета-глюканаза > 12 500 ед/г	360	3600	3800	12100	-	-

Литература

- Биссвангер Х. Практическая энзимология, М., ЮИНОМ. Лаборатория знаний. 2010
- Польшалина Г.В., Чередниченко В.С., Римарева Л.В. Определение активности ферментов. Справочник. М., ДеЛи принт, 2003
- Синицын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. Методы изучения и свойства целлюлолитических ферментов. Итоги науки и техники, сер. Биотехнология. ВИНТИ, т.25, 1993