

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ — ВАЖНЫЙ КРИТЕРИЙ ИХ СВОЙСТВ

А. СИНИЦЫН, д-р хим. наук, МГУ им. М.В. Ломоносова

Е. КОНДРАТЬЕВА, канд. физ.-мат. наук, Институт биохимии им. А.Н. Баха, РАН

А. ПЛОХОВ, канд. тех. наук, ООО «Агрофермент»

Коммерческие ферментные препараты широко применяются в кормлении сельскохозяйственных животных и птицы как кормовые добавки. Их действие направлено преимущественно на разрушение некрахмалистых полисахаридов (НПС), а также фитатов зерна и сои. Для гидролиза НПС используют ферменты-карбогидразы: целлюлазы, бета-глюканазы, ксиланазы, маннаназы, пектиназы, амилазы и другие, обладающие иной специфичностью действия; для гидролиза фитина — фитазу. Карбогидразные ферментные препараты в большинстве случаев комплексные (целлюлазы и бета-глюканазы, целлюлазы и ксиланазы, т.д.), хотя на рынке представлены и моноферментные добавки (например, фитаза, ксиланаза и др.).

Ферментные препараты выпускаются в жидком, порошкообразном, гранулированном, капсулированном виде и имеют в своем составе, кроме собственно ферментов (белковых биокатализаторов), различные вещества небелковой природы (соли, полисахариды, полимерные материалы и др.), которые добавляются для увеличения стабильности ферментов при хранении и/или применении, для повышения эффективности их действия, а также для стандартизации.

Для описания свойств коммерческих ферментных препаратов используют данные об их специфичности, оптимальных значениях pH и температуре их действия, стабильности, наличии (отсутствии) катионов тяжелых металлов, микробной обсемененности и т.д. Наиболее важная характеристика — их ферментативная активность, выраженная в единицах активности на 1 г (или 1 мл) ферментного препарата. В описании его свойств можно встретить данные о целлюлазной, бета-глюканазной, ксиланазной, маннаназной, пектиназной, амилазной, фитазной и других видах активности. Именно эта характеристика ферментного препарата и определяет в итоге его выбор, дозировку, эффективность применения и, в конечном счете, затраты на применение. Очевидно, что

прямым способом определения активности ферментного препарата («активности по применению») является его испытание *in*

in vivo, то есть непосредственно при кормлении животных или птицы, однако это не всегда возможно, особенно на стадии разработки и изготовления. Поэтому в практике промышленной энзимологии при производстве и коммерциализации ферментных препаратов в качестве их характеристики принято использовать значение активности, определенное *in vitro*, то есть в условиях биохимической лаборатории, без применения живых организмов.

На кафедре химической энзимологии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова были получены данные, характеризующие активность ряда импортных ферментных препаратов — карбогидраз и фитаз, а также препаратов, производимых биотехнологическим заводом «Агрофермент»: **Агроцелл**, **Агроксил** и **Агрофит** (таблицы 1 и 2). Все препараты представляли собой сухой микрогранулят.

В качестве субстратов для определения активности карбогидраз использовались: Na-соль КМЦ (целлюлазная активность), бета-глюкан ячменя (бета-глюканазная активность), ксилан березы (ксиланазная активность). Для определения целлюлазной, бета-глюканазной и ксиланазной активности применяли методики МГУ и ГОСТ. В первом случае (МГУ) восстанавливающие сахара в качестве продуктов гидролиза полисахаридов определяли методом Нельсона-Шомоди (НШ) в пересчете на глюкозу (целлюлазная и бета-глюканазная активности) или на ксилозу (ксиланазная активность). Ферментативный гидролиз полисахаридных субстратов проводили в течение 5 мин, их концентрация в реакционной смеси составляла 5 г/л. Во втором случае (ГОСТ) целлюлазную (КМЦЛА) и ксиланазную (КсА) активности определяли по ГОСТ Р 53046-2008 «Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности целлюлазы» и ГОСТ Р 53047-2008 «Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности ксиланазы». Концентрацию восстанавливающих сахаров в качестве продуктов гидролиза определяли с помощью специфических колориметрических реакций с динтиросалициловой кислотой (ДНС) в пересчете на глюкозу (КМЦЛА) или на ксилозу (ксиланазная активность). Гидролиз Na-КМЦ и ксилана березы проводили в течение 10 мин, их концентрация в реакционной смеси составляла 5 г/л. Разница в методах

Таблица 1. Активность карбогидраз разных производителей, ед./г

Ферментный препарат	КМЦ-аза (НШ), МГУ	КМЦ-аза/КМЦЛА (ДНС), ГОСТ	Бета-глюканаза (НШ), МГУ	Бета-глюканаза (ДНС), ГОСТ	Ксиланаза (НШ), МГУ	Ксиланаза/КсА (ДНС), ГОСТ
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
Агроцелл	4100	6590	3500	15 360	1180	4490
Агроксил	1010	1610	990	4350	5200	19 860
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	13 610	2360	9010
Карбогидраза 6	4000	5000	3100	9100	610	2500
Карбогидраза 7	1600	2000	1300	3700	4000	16 400

МГУ и ГОСТ заключалась во времени ферментативной реакции (5 и 10 мин), в значении pH (5,0 и 4,7) и методах определения (НШ и ДНС) концентрации восстанавливающих сахаров.

Отметим, что бета-глюканазную активность определяли по методу, аналогичному ГОСТ для КМЦ-азной активности. За 1 ед. активности карбогидраз принимали количество фермента, катализирующего гидролиз Na-КМЦ (целлюлазы), бета-глюкана ячменя (бета-глюканаза) или ксилана березы (ксиланаза) до образования 1 мкмольа восстанавливающих сахаров за 1 мин при 50°C и pH 5,0 (по методу МГУ) или 50°C и pH 4,7 (по методу ГОСТ). Для определения фитазной активности применяли метод МГУ (Синицына О.А., Федорова Е.А., Гусаков А.В., Упоров И.В., Соколова Л.М., Бубнова Т.М., Окунев О.Н., Чулкин А.М., Винецкий Ю.П., Синицын А.П.: «Выделение и свойства внеклеточной фитазы *Penicillium canescens*», Биохимия, 2006), который соответствует широко распространенному международному методу. В качестве субстрата использовали фитат натрия из риса. Фосфат-анионы как продукт гидролиза фитата определяли с помощью аммоний-молибдатного реагента, применяя в качестве восстановителя хлорид железа. Ферментативный гидролиз фитата проводили в течение 30 мин, его концентрация 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 температуре 40°C и pH 5,0.

Как показывают данные обеих таблиц, карбогидразные ферментные препараты разных производителей заметно отличаются по уровню общей активности. Большинство из них комплексные препараты, обладающие в разном соотношении различными видами активностей: целлюлазной (КМЦ-азной), бета-глюканазной и ксиланазной. Исключение — ферментный препарат под номером 2,

Таблица 2. Активность (ед./г) некоторых фитазных препаратов, представленных на российском рынке

Ферментный препарат	Агрофит	Фитаза 1	Фитаза 2	Фитаза 3	Фитаза 4	Фитаза 5
Активность*	5570	5430	8850	1350	1450	850

* Условия определения активности фитаз: температура — 40°C, pH 5,0 (МГУ).

имеющий в своем составе преимущественно ксиланазу.

Эти данные необходимо учитывать при выборе ферментных препаратов для использования в комбикормах. Благодаря их комплексной активности достигается более глубокий гидролиз НПС и, как следствие, существенно повышается степень конверсии кормов по сравнению с моноферментными препаратами, увеличивается привес и снижаются отходы на птицефабриках и в животноводческих хозяйствах. Например, Агроцелл вводится преимущественно в комбикорма на основе зерновых культур, содержащих в основном бета-глюканы (ячмень, подсолнечник и др.), которые под воздействием данного ферментного препарата переходят в легкодоступные для организма животного вещества. В комбикормах на основе пшеницы или ржи для расщепления содержащихся в них ксиланов применяют Агроксил, обладающий наибольшей ксиланазной активностью.

Фитазные препараты имеют только фитазную активность и вводятся в комбикорма совместно с карбогидразами. Использование препарата Агрофит делает легкодоступным для организма животных фосфор зерновых, улучшает его усвоение, как и кальция, магния, микроэлементов, сырого протеина, аминокислот, что способствует повышению энергетической ценности корма.

Для потребителей кормовых ферментных препаратов важно знать, что значения активности, измеренные с помощью разных методов, существенно различаются между собой. Так, КМЦ-азная активность, измеренная по ГОСТ, примерно в 1,3–1,4 раза превышает таковую, измеренную по методу МГУ; бета-глюканазная — в 3–4,4 раза, ксиланазная — в 3,8–4,4 раза. Это также необходимо учитывать при корректном выборе кормовых ферментных препаратов. ■