

# РАЗРАБОТКА КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭНДОГЛЮКАНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

**Л. ТЕЛИШЕВСКАЯ**, д-р биол. наук, **А. САРХАНОВА**, канд. биол. наук,  
**Л. ВАСИЛЬЕВА**, **Д. ХВАТОВА**, **Е. ТИТОВА**, канд. биол. наук, ФГБУ «ВГНКИ»

В последние годы большое внимание уделяется исследованию активности ферментных препаратов, используемых в качестве кормовых добавок для рационов животных. Ранее были разработаны и стандартизованы методы определения ксиланазы, целлюлазы и экзоглюканазы — ферментов, имеющих механизм экзодействия, заключающегося в отщеплении конечных остатков углеводов (ксилозы, глюкозы) от полимерных молекул. Однако наибольший интерес представляют ферменты эндодействия, расщепляющие внутренние связи молекулы с уменьшением ее размеров и молекулярной массы. Стандартизованных методик для определения эндоглюканазы нет. Каждая фирма использует свои методы, единицы, субстраты и стандарты. Прямым методом определения эндоглюканазной активности следует признать метод, связанный с уменьшением вязкости субстрата глюкана. Однако фирмы-производители зачастую применяют альтернативные колориметрические методы по расщеплению окрашенного субстрата глюкана с привязанным радикалом хромофора, например азурин-структурированный ячменный бета-глюкан — Бета-глюказим или Азо-глюкан. С той же целью предлагаются методы по расщеплению окрашенной КМ-целлюлозы. Отметим, что колориметрические методы более простые, менее трудоемкие и не требуют проведения дополнительных химических реакций. При этом показана пропорциональность колориметрических и вискозиметрических методов.

**Таблица 1. Схема экспериментов**

Номер эксперимента	Изменяемые факторы		
	Матрица	Набор реактивов	Оператор
1	Карбонат кальция	1	1
2	Карбонат кальция	2	2
3	Цеолит	2	2
4	Карбонат кальция	2	1
5	Цеолит	1	2
6	Карбонат кальция	1	2
7	Цеолит	1	1
8	Цеолит	2	1

Колориметрические методы основаны на количественном определении степени деградации субстрата под влиянием фермента, в результате чего высвобождаются молекулы красителя. В качестве субстрата применяют в основном препараты производства компании «Мегазайм», как и предлагаемый ею метод.

При определении активности фермента измеряют интенсивность окраски, образованной в результате высвобождения красителя из субстрата, которую оценивают в собственных единицах — оптической плотности или пересчитывают в единицы, принятые для определения экзоглюканазной активности (ГЛА) с эквивалентом по глюкозе и ферментом-стандартом. В последнем случае определение проводится в сравнении со стандартным образцом эндо-β-глюканазы с известной активностью, для чего строят калибровочную кривую с использованием фермента-стандарта, активность которого, как правило, приводится в единицах ГЛА по эквиваленту высвободившихся остатков глюкозы.

В наших исследованиях использовался образец β-глюканазы фирмы Sigma (производитель *Trichoderma longibrachiatum*) с активностью 3100 ед./г, на основании которого готовили стандартные образцы препаратов с применением двух минеральных матриц — карбоната кальция и цеолита. В качестве субстрата использовали таблетки Глюказайма (фирма «Мегазайм»), представляющего собой комплекс глюкана с привязанным к его молекуле хромофором азурином.

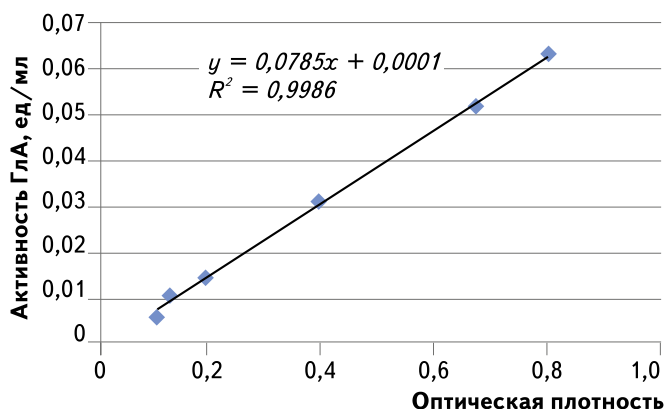


Оценку показателей точности методики проводили в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений» и РМГ 61-2010 «Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки». Для этого приготовили пять аттестованных образцов с различной активностью  $\beta$ -глюканазы: 93; 310; 620; 930 и 1550 ед./г. В условиях внутрилабораторной прецизионности определяли эндоглюканазную активность в аттестованных образцах с вариацией трех факторов: оператора, матрицы и набора реактивов (табл. 1).

Для получения стандартного образца сначала готовили основной раствор (1 г фермента в 100 мл дистиллированной воды) и рабочие растворы (4–6 разведений основного раствора в буферном растворе pH 4,7) с активностями от 0 до 0,4 ед. ГлА в 1 мл. Гидролиз проходил в течение 20 мин при pH 4,7 и температуре 50°C.

В процессе исследований была разработана модификация методики определения эндоглюканазной активности. Согласно ей в пробирки вносили по 1 мл разведений стандарта или контрольного раствора (буфера). В пробирку с контрольной пробой добавляли 10 мл стоп-реагента (раствор  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , pH 12) и перемешивали. Все пробирки помещали в водяную баню при температуре 50°C и выдерживали в течение 5 мин. В опытные пробирки вносили по одной бета-глюказим-таблетке и, не перемешивая, выдерживали в водяной бане 20 мин. Реакцию в пробах стандарта останавливали, добавляя по 10 мл стоп-реагента.

Пробирки встряхивали с помощью вортекса, оставляя при комнатной температуре на 5–10 мин и снова встряхивали. Смеси осветляли центрифугированием или фильтрованием через фильтры Whatman. Оптическую плотность центрифугатов или фильтратов измеряли при длине волны 620 нм против контрольных проб в качестве оптического контроля. Строили градуировочный график соответствия окраски супернатантов после гидролиза



Пример соответствия окраски супернатантов эндоглюканазной активности фермента

Таблица 2. Результаты измерений эндоглюканазной активности в аттестованных образцах фермента, ед. ГлА/г

Экспериментально полученные данные по активности эндоглюканазы 5 аттестованных образцов		Активность эндоглюканазы в аттестованных образцах
$\bar{X}_1$	$\bar{X}_2$	
89,5	89,9	93
301,6	300,1	310
604,2	608,5	620
923,2	923,8	930
1506,5	1515,8	1550

Таблица 3. Показатели точности методики измерений активности эндо- $\beta$ -глюканазы колориметрическим методом

Параметр	Активность стандартных образцов, ед. ГлА/г				
	93	310	620	930	1550
Относительная расширенная неопределенность при коэффициенте охвата $k = 2$	24,5	14,7	13,5	7,3	10,6
Предел повторяемости, %	10,2	6,8	3,5	2,0	3,1

субстрата с разными разведениями стандарта величинам их активности. Пример градуировочной кривой приведен на рисунке.

Анализ испытуемого образца проводили аналогично построению градуировочной кривой, но вместо стандарта в пробирки вносили по 1 мл раствора испытуемого фермента или контрольного раствора (буфера).

В ходе 40 экспериментов по испытанию эндоглюканазной активности пяти аттестованных образцов (с вариацией трех факторов: оператор, матрица и набор реактивов) получены результаты, суммированные в таблице 2 как средние арифметические ( $\bar{X}_1$  и  $\bar{X}_2$ ).

На основании этих данных проведена оценка показателей точности методики. Ее метрологические характеристики представлены в таблице 3.

В результате выполненной работы установлены условия определения эндоглюканазной активности кормовых добавок колориметрическим методом с помощью окрашенных субстратов производства «Мегазайм». Показана возможность пересчета получаемых данных в единицы ГлА с использованием стандарта фермента с известной активностью. Оценены показатели точности методики. Расширенная неопределенность результатов измерений находится в пределах 10–24,5% при коэффициенте охвата  $k = 2$ .

Данный метод предполагается включить в ГОСТ по определению эндоглюканазной активности, разработка которого запланирована на 2016 г. ■

**Мировой рынок** кормовых добавок прибавит более 20% объема и составит 19,54 млрд долл. США в денежном выражении к 2020 г., отмечается в исследовании специалистов Grand View Research, Inc. Основными драйверами роста станут Азия и Латинская Америка, где спрос будет увеличиваться ежегодно. Крупнейшим сегментом рынка останутся аминокислоты с общей долей 31,4%, в то время как наиболее быстрорастущей частью индустрии будет производство кормовых подкислителей.

По мнению специалистов, темпы роста здесь составят 6,4% до 2020 г. На долю кормовых добавок для птицы сегодня приходится 38,6% всего объема рынка, что делает птицеводство основным потребителем кормовых добавок. При этом эксперты отмечают, что в Европе крупным потребителем является Германия — на ее долю приходится 10% рынка ЕС-28.

**Европейское агентство** по контролю за безопасностью продуктов питания (EFSA) провела оценку сульфата L-лизина для потенциального использования в качестве компонента комбикорма и пришла к выводу, что хотя прямых рисков производителям такая практика не несет, но все же рекомендуемый уровень добавления вещества в комбикорма не должен превышать 1%. Добавка, которая в последние недели вызвала много обсуждений в европейском бизнес-сообществе, содержит генетически модифицированный штамм бактерий *Escherichia coli* (CGMC 3705). Интересно, что при анализе продукта специалистам EFSA не удалось найти ДНК этих бактерий в кормовой добавке. Причины этого факта не разъясняются. Сам по себе L-лизин является важной аминокислотой, способствующей росту и развитию сельскохозяйственных животных. Вместе с тем, добавка с содержанием сульфата

L-лизина и генетически модифицированных бактерий по идее должна быть значительно эффективнее, однако при этом она также несет здоровью животных дополнительные риски.

**Ассоциация производителей** комбикормов Таиланда ожидает, что совокупный спрос на комбикормовую продукцию в стране в этом году составит 18 млн т, что на 7% больше, чем в 2014 г. Основной рост будет обеспечиваться за счет птицеводства, спрос со стороны которого увеличился на 10%. Этот тренд объясняется возросшими объемами поставок мяса птицы за рубеж — в Южную Корею, которая в начале года отменила 12-летний запрет на импорт курятины из Таиланда.

Согласно официальной статистике бройлеры потребляют 40% всего комбикорма в стране, куры-несушки — 20%, на долю свиноводства приходится 30%.

*allaboutfeed.net*