

УДК 579.22:579.6:579.64

МИКРОБНЫЕ ФИТАЗЫ КАК ОСНОВА НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В КОРМЛЕНИИ ЖИВОТНЫХ

А.И. Ахметова, А.Д. Мухаметзянова, М.Р. Шарипова

Аннотация

С развитием постгеномных технологий в научных исследованиях становится доступной информация о многих микробных белках и ферментах, которые обладают высоким потенциалом практического использования. К ним относят микробные фитазы, способные расщеплять неусвояемые фитатсодержащие комплексы, накопление которых в биосфере связано со значительной потерей ресурсов неорганического фосфата. Работа посвящена описанию биотехнологического потенциала микробных фитаз. Эти ферменты могут быть основой для разработки новых прогрессивных и экологически безопасных биотехнологий в сельском хозяйстве и кормовой индустрии, направленных на сокращение загрязнений в виде нерастворимых форм фосфора в биосфере и увеличение доступности фитатсодержащих соединений в кормах.

Ключевые слова: фитазы, фитатсодержащие комплексы, микроорганизмы, кормовые добавки, микробные биотехнологии.

Введение

Кормление животных как наука – это относительно новая область знаний с историей немногим более 100 лет. Инновации в этой области направлены на повышение продуктивности животноводства, поиск экономической выгоды и улучшения экологической ситуации. Революционно-прикладным открытием в кормовой индустрии животных за последние десятилетия стало повышение эффективности кормления за счет использования ферментов. Особый интерес представляют разработки на основе бактериальных ферментов, поскольку микроорганизмы выращивают на доступных средах, бактериальные белки легче подвергаются процедуре очистки, биохимия и генетика многих из них детально изучена, секвенированы геномы многих бактерий. С другой стороны, геномы бактерий обладают мощными механизмами адаптации, определяющими их широкий метаболический потенциал и способность жизнедеятельности в различных экологических условиях, включая экстремальные. Они способны расщеплять многие недоступные другим организмам соединения. В настоящей работе на примере микробных ферментов – фитаз – рассматривается возможность использования микробных ферментов для увеличения биодоступности кормов.

Роль микробных фитаз в повышении биодоступности кормов

Кормовые добавки являются незаменимым звеном в цепочке, связывающей кормление и получение высокой продуктивности и качества продукции. В России,

по данным статистики¹, в рационах моногастричных животных продолжается рост удельной доли такого сырья, как пшеница, ячмень, рожь и других зерновых культур. Наряду с питательными веществами, зерновые, бобовые и семена масличных растений содержат значительное количество фитиновой кислоты [1]. Фитиновая кислота – это органическое соединение, состоящее из шестиатомного спирта инозитола, гидроксильные группы которого связаны с шестью остатками фосфорной кислоты (рис. 1).

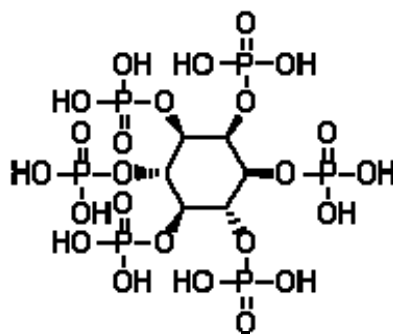


Рис. 1. Структура фитиновой кислоты

Фитиновая кислота накапливается в семенах растений при их созревании в виде солей одно- и двухвалентных катионов вместе с другими запасными веществами (крахмал, липиды и др.). У зерновых растений большая часть фитиновой кислоты содержится в алейроновом слое зерна и в шелухе, а у масличных и зернобобовых культур распространена по всему зерну.

В табл. 1 приведены данные, позволяющие оценить долю фосфатов, связанных фитиновой кислотой в составе кормов для домашних животных. Это количество в среднем превышает 60%. Содержание связанного фосфора в семенах варьирует в зависимости от вида семян. Эти результаты свидетельствуют о необходимости поиска и разработки новых биотехнологических подходов для высвобождения фосфатов из нерастворимых фитатсодержащих комплексов.

Наряду с остатками фосфорной кислоты фитиновая кислота благодаря своим структурным особенностям способна активно связывать катионы металлов (медь, марганец, цинк, железо, кальций), а также остатки аминокислот, белков, углеводов с образованием нерастворимых комплексных соединений, неспособных к усвоению в организме животных.

Фитазы микроорганизмов – это особая группа ферментов фосфатаз, обладающих способностью катализировать последовательный гидролиз фитатов на менее фосфорилированные производные инозитола с высвобождением неорганического фосфата [2] (рис. 2). Эти ферменты могут быть внутри- и внеклеточными. В результате действия микробных фитаз от молекул фитата отщепляются последовательно неорганические фосфаты и образуется молекула инозитола. В процессе микробной деструкции фитата остатки фосфорной кислоты высвобождаются в разной последовательности и с различной скоростью.

¹ См. Центральную базу статистических данных: <http://www.gks.ru/dbscripts/Cbsd/DBInet.cgi?pl=1416003>.

Табл. 1

Общее количество фосфора и фосфора, связанного фитиновой кислотой, в составе кормов для домашней птицы*

Корма	Общее количество фосфора, %	Фосфор в составе нерастворимых фитатов, %	% от общего фосфора
Пшено	3.07	2.19	71.6
Овес	3.60	2.10	59.0
Кукуруза	2.62	1.88	71.6
Ячмень	3.21	1.96	61.0
Сорго	3.01	2.18	72.6
Рожь	3.05	1.95	63.9
Канола	9.72	6.45	66.4
Хлопок	10.02	7.72	77.1
Рапс	9.60	6.34	66.0
Соя	6.49	3.88	59.9
Рисовые отруби	17.82	14.17	79.5
Пшеничные отруби	10.96	8.36	76.3

*Для составления таблицы использованы данные, изложенные в работе [1].

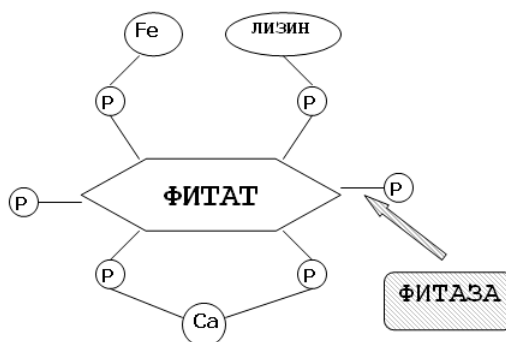


Рис. 2. Схема действия микрообной фитазы на фитат

На разных стадиях гидролиза образуются наборы интермедиатов в зависимости от молекулярной активности и специфичности бактериальных ферментов. Микрообные фитазы играют стратегическую роль в процессе освобождения неорганических фосфатов из нерастворимых комплексов и являются критическими белками для выживания многих организмов.

Все известные фитазы подразделяют на две большие группы белков: фитазы микроорганизмов (3-фитазы), которые высвобождают фосфор в С3-положении, и фитазы растений (6-фитазы), которые высвобождают фосфор в С6-положении [1].

На основании изучения биохимических свойств белков и выравнивания последовательностей аминокислотных остатков фитазы подразделены на два больших класса: кислые и щелочные [3]. Многие фитазы бактерий, грибов и растений относятся к кислым фосфатазам [4]. Все ферменты этого класса имеют консервативный мотив активного центра – R_HGXRXP, являющийся уникальным для данного класса белков [4]. По присутствию консервативного гистидина в этой последовательности ферменты относят к гистидиновым кислым фосфатазам. Представители этой группы ферментов обладают широкой субстратной специфичностью

и расщепляют фитат, несвязанный с металлами, продуцируя инозитол монофосфаты в качестве конечного продукта при $\text{pH} < 6.0$ [3]. В отличие от них, щелочные фитазы проявляют строгую субстратную специфичность к кальцийсодержащим фитатным комплексам и в качестве конечного продукта производят инозитол трифосфаты [3]. Щелочные фитазы также широко распространены в природе [5].

Среди всех известных фитаз микробные фитазы являются наиболее перспективными ферментами для биотехнологии, они могут применяться для расщепления нерастворимых фитатсодержащих соединений как в составе культуральной жидкости, так и в очищенном состоянии. В настоящее время фитазы выделены из разных видов бактерий, дрожжей и грибов [6]. Эти белки обнаружены у различных бактерий, таких как *Pseudomonas*, *Bacillus* sp., *Raoultella* sp., *Esherichia coli*, *Citrobacter braakii*, *Enterobacter* и у анаэробных бактерий из рубца животных, особенно в клеточных гомогенатах *Selenomonas ruminantium*, *Megasphaera elsdenii*, *Prevotella* sp., *Mitsuokella multiacidus* и *Mitsuokella jalaludinii*, а также у молочнокислых бактерий и некоторых дрожжей и грибов (*Aspergillus* sp. и др.) [7]. Большинство микроорганизмов синтезируют внутриклеточную фитазу, и только бактерии рода *Enterobacter*, *Bacillus* и грибы секретируют эти ферменты в периплазму и окружающую среду.

Оптимальные значения pH и температуры для проявления каталитической активности фитаз зависят от свойств белков, которые секретируются различными видами микроорганизмов. Оптимальные значения pH фитаз варьируют у различных микроорганизмов в интервале от 4 до 8 (табл. 2). Как видно из таблицы, бактериальные фитазы представителей родов *Bacillus* и *Enterobacter* имеют оптимальные значения pH в диапазоне от 6.0–8.0, а их оптимальные температурные значения варьируют в пределах от 40 °C до 70 °C. Молочнокислые бактерии *Lactobacillus sanfranciscensis*, адаптированные к условиям кислой среды обитания, являются продуцентами фитазы с pH 4.0 при 50 °C. Грибные фитазы являются стабильно кислыми белками и их оптимальные значения pH расположены в интервале от 5.0 до 5.5.

Все фитазы являются мономерными белками, кроме фитазы *Asp. niger*, которая является тетрамером. Молекулярная масса ферментов переменна и находится в пределах 38–100 кДа. Высокая молекулярная масса фитаз грибов и дрожжей связана с гликозилированием ферментов в организме хозяина [8]. Установлено, что гликозилирование белков не влияло на специфичность и термостабильность фитаз. В основном фитазы имеют оптимум температур от 44 °C до 60 °C. В отличие от них, фитазы *Asp. fumigatus* и *B. amyloliquefaciens* имеют оптимальное значение температуры, равное 70 °C (табл. 1) [1, 9].

Для разработки микробных технологий на основе использования фитаз в качестве кормовых добавок термостабильность ферментов является наиболее важной характеристикой в процессе технологии приготовления кормовых гранул для животных (80–100 °C) [3]. Щелочные фитазы бацилл стабильны при температурах от 80 °C до 95 °C [10], в то время как остальные фитазы быстро инактивируются при 60 °C [5, 8, 11]. Бактериальная фитаза *B. amyloliquefaciens* является экстремально термостабильным белком. Температура денатурации этого белка равна 80 °C, это значение было установлено путем дифференциальной сканирующей калориметрии [12].

Табл. 2

Свойства микробных фитаз (по данным [1, 9])

Продуцент фитазы	Оптимальное значение pH	Оптимальное значение температуры, °С	Активность, U/мг, 37 °С	Молекулярная масса, кДа
<i>Aspergillus niger</i>	5.0–5.5	55–58	50–103	85
<i>Aspergillus. fumigatus</i>	5.0	58	–	85–100
<i>Esherichia coli</i>	4.5	55–60	811–1800	42
<i>Pseudomonas syringae</i>	5.5	40	769	–
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	7.0–8.0	70	20	–
<i>Bacillus subtilis</i>	6.5–7.5	55–60	9.0–15	36–38
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	4.0	50	–	–
<i>Pantoea agglomerans</i>	4.5	60	23	–

Микробные фитазы как основа новых биотехнологий

В настоящее время фитазы используют в сельском хозяйстве в качестве кормовых добавок для домашних животных, свиней, птицы, поскольку эти ферменты не только увеличивают доступность фосфора, но и улучшают усвоение кальция, микроэлементов, белков, аминокислот, а также повышают энергетическую ценность кормов [13]. При использовании фитаз необходимость внесения фосфорных добавок снижается в 5–8 раз. Фитаза используется за рубежом в свиноводстве, птицеводстве и молочном животноводстве для обогащения комбикормов, при этом часто в комплексе с другими микробными белками – целлюлозолитическими и глюкеназными ферментами. Согласно опубликованным данным [13], при использовании в кормах фитазы существенно снижается количество связанного фосфора в фекалиях животных, а это, в свою очередь, способствует улучшению экологической ситуации. Известны и другие преимущества использования кормовых ферментов: они приводят к снижению вязкости помета и загрязнению яиц птицы, повышению перевариваемости кормов. В целом применение этих микробных ферментов способствует повышению продуктивности и в конечном итоге компенсации дефицита пищеварительных ферментов на ранних стадиях развития молодняка сельскохозяйственных животных, а также в условиях стресса, когда выработка их собственных ферментов ограничена.

Жвачные животные разрушают фитат с помощью фитазы, продуцируемой микрофлорой рубца. Неорганический фосфор, который высвобождается при гидролизе фитата, используется как микрофлорой, так и организмом хозяина. В отличие от жвачных, такие животные, как свиньи, куры и рыбы, не способны метаболизировать фитиновую кислоту в связи с отсутствием фитазы в желудочно-кишечном тракте. Чтобы удовлетворить пищевые потребности этих животных в фосфоре, в корма добавляют неорганические фосфаты. Это значительно увеличивает стоимость кормов и способствует фосфатному загрязнению окружающей среды нерастворимыми соединениями фосфора. Ученые подсчитали, что при добавлении фитазы в корма животных, не имеющих рубца, фермент препятствует выходу в окружающую среду $8.23 \cdot 10^4$ т фосфатов ежегодно, что приводит к экономии 168 млн. долларов [14]. В отдельных странах добавление фитазы в корма птиц осуществляют на уровне производственных стан-

дартов. Это приводит к существенной экономии неорганических источников фосфора. В Индии в опытах с бройлерными курицами было обнаружено, что использование фитазы в качестве кормовой добавки вызывало прирост биомассы кур на 12% и увеличение утилизации фосфора в тушке курицы на 44.6%, а выход фосфора в среду в виде помета уменьшался в 2.5 раза [6]. Полученные результаты позволили исключить необходимость добавления дополнительного фосфора в корма и показали, что в условиях добавления в корма бактериальных ферментов происходило сокращение загрязнений среды обитания в виде нерастворимых форм фосфора [6].

В Южной Корее учеными-биотехнологами клонирован ген *appA*, кодирующий фитазу *Escherichia coli*. Бактериальный ген был трансформирован в геном хлоропластов микроводорослей *Chlamydomonas reinhardtii*, из клеток которого были выделены пластиды. В лизатах пластид была обнаружена каталитическая активность рекомбинантного белка AppA [15]. Фитаза *E. coli* AppA в лизатах водорослей была активна при pH 4.5 и температуре 60 °C. При использовании трансгенного лизата в качестве кормовой добавки (500 ед./кг) в корме бройлерных цыплят наличие фитата в фекалиях птицы было снижено, а доля свободного фосфора увеличена на 41–43% по сравнению с этими показателями для цыплят, выращенных на базовом корме [15]. Эффективность таких лизатов соответствовала уровню эффективности при применении в кормлении коммерческого препарата «Натуфос», в котором используется фитаза микромицетов. Эта работа продемонстрировала возможность использования трансгенных водорослей в качестве кормовых добавок без дополнительной очистки белка [15].

Мировая популяция домашнего скота насчитывает предположительно 4 блн. животных, производящих около 500 млн. т навоза ежегодно [16]. Такое количество животных считается востребованным для удовлетворения потребностей всего человечества. В настоящее время 50–80% азота и фосфора в кормах животных остается не утилизированным и выделяется в окружающую среду с экскрементами. Ожидается, что именно микробная биотехнология станет основным способом решения этой проблемы в рамках борьбы с загрязнением окружающей среды и в целях экономии природных ресурсов [16].

Исследования, направленные на изучение фитаз микроорганизмов в качестве кормовых добавок для животных, активно проводятся в США, Швейцарии, Бельгии, Китае, Болгарии, Великобритании. В России это направление не развивается, хотя животноводческая отрасль является одним из приоритетных направлений для экономического развития нашей страны. Большое количество птицефабрик и скотоводческих предприятий диктует необходимость поиска новых инновационных путей улучшения показателей, повышения энергоемкости и качества кормов растительного происхождения. Создание кормовых добавок на основе фитаз микроорганизмов является экономически выгодным и экологически обоснованным решением данной задачи.

Инновации в агrobiотехнологии должны иметь не только экономическую выгоду, потенциальную общественно-полезную ценность, но и быть направлены на сохранение биосферы. В сложившейся экологической обстановке общество нуждается в объективной модернизации и разработке новых актуальных и наукоемких технологий, соответствующих современному направлению развития

хозяйствования. Целевое использование микробных ферментов, которые катализируют освобождение для последующего усвоения целого ряда элементов и соединений, необходимо для эффективной жизнедеятельности животных и сохранения окружающей среды. Применение фитаз для получения экологически безопасных кормовых добавок полностью соответствует этой цели. Таким образом, исследование функциональной роли микробных фитаз, выделение и характеристика этих ферментов представляют особый научный и практический интерес для сельского хозяйства и будут служить основой для создания новых прогрессивных и безопасных агробιοтехнологий.

Работа поддержана РФФИ (проект № 12-08-00942а), грантом Федеральной целевой программой «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг.

Summary

A.I. Akhmetova, A.D. Mukhametzyanova, M.R. Sharipova. Microbial Phytases as a Basis for New Technologies in Animal Feeding.

The development of new post-genomic technologies and methods has made available information about many microbial proteins and enzymes possessing a high potential for practical use. These include microbial phytases used to break up indigestible phytate-containing complexes, which accumulate in the biosphere due to a significant loss of inorganic phosphate. This paper describes the biotechnological potential of microbial phytases. These enzymes can become a basis for the development of new advanced and environmentally safe biotechnologies in agriculture and feeding industry, aimed to reduce pollution by insoluble forms of phosphorus in the biosphere and to increase availability of phytate-containing compounds in feed.

Key words: phytases, phytate-containing complexes, microorganisms, feed additives, microbial technologies.

Литература

1. *Ravindran V., Ravindran G., Sivalogan S.* Total and phytate phosphorus contents of various foods and feedstuffs of plant origin // *Food Chemistry*. – 1994. – V. 50, No 2. – P. 133–136.
2. *Wyss M., Brugger R., Kronenberger A., Rémy R., Fimbel R., Oesterheld G., Lehmann M., van Loon A.P.* Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – V. 65, No 2. – P. 367–373.
3. *Oh B.-C., Choi W.-C., Park S., Kim Y.-O., Oh T.-K.* Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2004. – V. 63, No 2. – P. 362–372.
4. *Van Etten R.L., Davidson R., Stevis P.E., MacArthur H., Moore D.L.* Covalent structure, disulfide bonding, and identification of reactive surface and active site residues of human prostatic acid phosphatase // *J. Biol. Chem.* – 1991. – V. 266, No 4. – P. 2313–2319.
5. *Liu B.-L., Rafiq A., Tzeng Y.-M., Rob A.* The induction and characterization of phytase and beyond // *Enzyme Microb. Technol.* – 1998. – V. 22, No 5. – P. 415–424.
6. *Vohra A., Satyanarayana T.* Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications // *Crit. Rev. Biotechnol.* – 2003. – V. 23, No 1. – P. 29–60.

7. *Simon O., Igbasan F.* In vitro properties of phytases from various microbial origins // Int. J. Food Sci. Technol. – 2002. – V. 37, No 7. – P. 813–822.
8. *Wyss M., Pasamontes L., Friedlein A., Rémy R., Tessier M., Kronenberger A., Middelndorf A., Lehmann M., Schnoebelen L., Röthlisberger U., Kuszniir E., Wahl G., Müller F., Lahm H.W., Vogel K., van Loon A.P.* Biophysical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – V. 65, No 2. – P. 359–366.
9. *Ullah A.H., Sethumadhavan K., Lei X.G., Mullaney E.J.* Biochemical characterization of cloned *Aspergillus fumigatus* phytase (phyA) // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2000. – V. 275, No 2. – P. 279–285.
10. *Kim Y.-O., Kim H.-K., Bae K.-S., Yu J.-H., Oh T.-K.* Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11 // Enzyme Microb. Technol. – 1998. – V. 22, No 1. – P. 2–7.
11. *Tomschy A.* Engineering of phytase for improved activity at low pH // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – V. 68, No 4. – P. 1907–1913.
12. *Ha N.C., Oh B.C., Shin S., Kim H.J., Oh T.K., Kim Y.O., Choi K.Y., Oh B.H.* Crystal structures of a novel, thermostable phytase in partially and fully calcium-loaded states // Nat. Struct. Biol. – 2000. – V. 7, No 2. – P. 147–153.
13. *Leesen S., Namkung H., Cottrill M., Forsberg C.W.* Efficacy of new bacterial phytase in poultry diets // Can. J. Anim. Sci. – 2000. – V. 80, No 3. – P. 527–528.
14. *Kerovuo J., Rouvinen J., Hatzack F.* Analysis of myo-inositol hexakisphosphate hydrolysis by *Bacillus* phytase: indication of a novel reaction mechanism // Biochem J. – 2000. – V. 352, Pt. 3. – P. 623–628.
15. *Yoon S.-M., Kim S.Y., Li K.F., Yoon B.H., Choe S., Kuo M.M.* Transgenic microalgae expressing *Escherichia coli* AppA phytase as feed additive to reduce phytate excretion in the manure of young broiler chicks // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – V. 91, No 3. – P. 553–563.
16. *Graham H., Simmins P.H., Sands J.* Reducing environmental pollution using animal feed enzymes // Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. – 2003. – V. 68, No 2, Pt. A. – P. 285–289.

Поступила в редакцию
23.03.12

Ахметова Алина Ильдусовна – аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: akhmetova.alina@gmail.com

Мухаметзянова Алия Дамировна – аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: aliya.kzn@gmail.com

Шарипова Маргарита Рашидовна – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: marsharipova@gmail.com