

« М.А. Гендельманнның 110 жылдығына арналған «Сейфуллин окулары – 19» халықаралық ғылыми-практикалық конференциясының материалдары = Материалы международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения – 19», посвященной 110 - летию М.А. Гендельмана» - 2023.- Т.І, Ч.ІІ.- С.298-301.

УДК 636.087.7/.8

НОВЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОРМОВЫХ ФЕРМЕНТОВ

*Соницев Б.Е. соискатель к.б.н.
ООО «Биохем Рус», исп. Директор, г. Москва*

На сегодняшний день не существует единого общепризнанного и стандартного метода определения активности ферментов, разрушающих некрахмалистые полисахариды (НПС). Каждый производитель НПС-ферментов использует собственный подход, а также свои аналитические условия (рН, температура, субстрат и т.д.). На практике определение активности фермента показывает активность конкретного фермента, входящего в состав коммерческого продукта. Это создает трудности для потребителей в ориентировании и сравнении этого разнообразия доступных продуктов на рынке. В данной работе НИЦ «Черкизово» предложил использовать понятие «эффективность фермента» и разработал новый метод его анализа. Было продемонстрировано, что конечный продукт ферментативной реакции может выступать в качестве рабочего индикатора эффективности фермента. В результате было показано, что различные ферментные комплексы способствуют различному выделению свободных простых сахаров в водном коллоидном растворе измельченного зерна, инкубированном при температуре 39°C с эффективностью от 6 до 160% к контролю. Например, в пшенице увеличение высвобождения сахаров (т.е. эффективность работы мультиэнзимных смесей) колеблется от 22 до 76%, в ячмене – от 11 до 160%, в кукурузе - от 6 до 74%, в зерносмеси – от 18 до 60%. Авторы демонстрируют простой способ оценки эффективности ферментов и предлагают использовать его в качестве предварительного результата при оценке возможности подбора эффективной мультиэнзимной композиции для конкретного рациона и конкретного кормового сырья, в т.ч. нетрадиционного. Это позволит проводить предварительную оценку эффективности работы кормовых ферментов для конкретного сырья и рационов.

В настоящее время добавление кормовых ферментов при составлении рационов стало обыденным делом. Ферменты, направленные на разрушение некрахмалистых полисахаридов (НПС): ксиланаза, глюканаза и целлюлаза. Они по частоте использования занимают второе место в мире и первое место

в России после фитазы. В то же время применяются ферменты: протеаза, маннаназа, пектиназа, амилаза, галактозидаза и др.

В связи с широким применением ферментов, рынок производства кормов требует доступные, информативные и валидированные методы оценки ферментов, как в товарном продукте, так в премиксах и комбикормах. Такое рутинное исследование по определению активности ферментов должно было стать существенным шагом в контроле использования ферментов, качества их производства и применения [1].

Сегодня не существует единого стандартного метода для определения активности ферментов, разрушающих НПС. Каждый производитель НПС-ферментов использует свой собственный подход, а также свои собственные условия анализа (рН, температуру, субстрат и т.д.). Поэтому каждый производитель дает свое собственное понятие единицы активности НПС-ферментов [2].

Уровень активности ферментных препаратов является наиболее важным критерием, определяющим их жизнеспособность. Исходя из величины ферментативной активности (или соотношения разных активностей), осуществляется подбор препарата и его дозировка. Методики определения активности в разных исследовательских лабораториях, компаниях, странах существенно отличаются друг от друга [3].

Наличие большого разнообразия единиц активности ферментов, которые применяют разные производители, обусловлен, прежде всего, тем, что каждому производителю удобно применять «свою» единицу активности для стандартизации своих ферментов при производстве.

Проблемы для потребителя заключаются в сложности ориентирования в этом многообразии предлагаемых рынком препаратов и часто в невозможности их сравнения. Производители указывают специфические активности ферментов, как правило, руководствуясь своими понятиями о единицах активности и методах их определения. В результате предлагаемый достаточно дорогостоящий анализ активности не обеспечивает сравнимости результатов.

В результате, потребителю остается ориентироваться на рекомендуемые в инструкциях по применению нормы ввода, которые предлагается принимать на веру [3,4,5, 7].

На практике мы видим, что определение активности ферментов показывает нам активность того или иного энзима, входящего в коммерческий продукт. Эта активность говорит о «живучести» фермента [8]. Надо обратиться к возможности определить количество конечного продукта, который накапливается в результате реакции «фермент-субстрат»?

Продукт реакции, т.е. моносахарид, который, как правило, является редуцирующим (восстанавливающим), можно определить несколькими способами. Одним из общепринятых способов является метод с ДНС-реактивом (3,5-динитросалициловая кислота) [6,9,11].

В результате, конечные потребители – производители мяса птицы и яйца, вынуждены проводить производственные испытания для подбора

наиболее эффективного продукта на рынке, который бы удовлетворял их требования по цене и окупаемости затрат на него. Эти производственные испытания связаны с финансовыми и трудовыми затратами, отвлекая ресурсы предприятия на побочную деятельность, которая не связана с производством.

Сегодня специалисты не могут полагаться на определение активности ферментов и эта ситуация предполагает проведение предварительных производственных испытаний любого ферментного продукта, ранее не применяемого на данном предприятии, либо полагаться на рекомендации коллег и применять, полагаясь на веру. Это утверждение не касается кормовых фитаз в силу ряда причин, которые в этой работе мы не рассматриваем.

Мы в этой работе предлагаем выделить понятие «активность» и «эффективность». Активность - это работа фермента в «рафинированных» условиях при определенной температуре, рН, в установленном интервале времени и с химически чистым субстратом (зачастую условия которых далеки от условий в ЖКТ), которая показывает качество или, так сказать, его жизнеспособность с учетом срока годности, термостабильности и стабильности при хранении. Эффективность – это результат работы фермента по высвобождению свободных сахаров (энергии) в «полевых» условиях из субстрата, которым являются любое кормовое сырье или комбикорм.

В результате проведенной работы нами сделаны следующие выводы:

1. Указан способ изменения рН буферных растворов в виде имитации перемещения химуса в разные отделы желудочно-кишечного тракта.

2. В работе использован известный классический метод с использованием ДНС-реактива (восстановление 3,5-динитросалициловой кислоты до 3-амино-5-нитросалициловой кислоты под действием восстанавливающих сахаров, имеющей красно-оранжевую окраску, интенсивность окраски мы определяли спектрофотометрически при длине волны 540 нм.

3. Используются единицы оптической плотности окраски реагента в надосадочной жидкости. ДНС-реактив рассчитывали по градуировочному графику, построенному для глюкозы [6,11].

4. Анализ имитирует пищеварение, т.к. рН 4 является более распространенным рН в зобе и железистом желудке, учитывая буферную способность корма повышать рН (ощелачивание), а рН 6,9 является более распространенным рН в тонком кишечнике. Подробнее об обзоре данных рН в различных отделах кишечника птицы, приведены у М. Bedford, G. Partridge [8]. Мы взяли средние цифры рН приведенных значений.

5. Основная цель - получить в испытаниях *in vitro* все редуцирующие сахара, полученные в результате разрушения различных зерновых субстратов НПС. По нашему мнению, максимальной водоудерживающей способностью могут обладать арабиноксилан и ксилан. Сама ксилоза, находящаяся вне полимерных комплексов, обладает меньшей водоудерживающей

способностью, что вызывает уменьшение вязкости химуса под действием ксиланаз. Полученный состав восстанавливающих сахаров под действием ферментов и определяет их эффективность. Чем выше количество моносахаридов, тем больше доступной энергии можно получить, и это снижает вязкость химуса. Количество высвобожденной ксилозы также указывает на эффективность ферментной композиции.

6. Результаты показали нам интересными, поскольку эффективность, т.е. количество выделенных сахаров, варьировала в зависимости от мультиферментного состава, вида зернового сырья или их смеси, а также от изменения pH.

7. Полученные результаты свидетельствуют о возможности подбора эффективной мультиферментной композиции для конкретного сырья, конкретной структуры рациона еще до производственных испытаний, а также с высокой долей вероятности подтвердить матричные значения ферментов по энергии, поскольку доля дополнительно выделенных сахара есть не что иное, как дополнительная доступная энергия.

8. Сегодня лабораториям требуются простые и доступные способы сравнения коммерческих ферментных препаратов. Прикладная, рутинная кормовая энзимология сегодня нуждается в простых и дешевых методах скрининга, которые могут быть доступны не только крупным агрохолдингам, но и небольшим лабораториям на комбикормовом заводе или птицефабрике.

Список литературы

1 Активность ферментных препаратов – важнейший критерий их свойств [Текст]/ А.П. Сеницын, О.А. Сеницына, Е.Г. Кондратьева, А.Ю. Плохов // Птицеводство. – 2014. - № 12. - С. 36-40.

2 Будаева В.В. Исследование ферментативного гидролиза отходов переработки злаков [Текст]/ В.В. Будаева, Р.Ю. Митрофанов, В.Н. Золотухин // Ползуновский Вестник. – 2008. - № 3. - С. 322-327.

3 Кормовые ферменты и проблемы, связанные с их использованием / А.А. Комаров, Л.Я. Телишевская и др. // Ветеринария и кормление. – 2012. - № 3. – С. 8-10.

4 Молоскин С.А. Кормовые ферменты от активности к эффективности / С.А. Молоскин // Аналитическая экспертиза и квалиметрия. – 2016. - № 2(2). - С. 73-74.

5 Ромеро Л. Влияние кормовых ферментов на здоровье кишечника птицы / Л. Ромеро // Ценовик. - 2015. - № 4. – С. 78-83.

6 Шастак Ю. Некрахмалистые полисахариды и методы определения их активности в кормлении животных / Ю. Шастак // Аналитическая экспертиза и квалиметрия. - 2016. - № 2(2). – С. 69-72.

7 Aehle W. Enzymes in Industry: Production and Application, 3rded. [Текст] / W. Aehle. - Wiley, New York, 2007. - P. 211-216.

8 Bedford M. Enzymes in farm animal nutrition [Текст] / M. Bedford, G. Partridge. - CAB International, MPG Print Group, Oxfordshire, UK, 2013. - P. 12-33, 136, 260-262.

9 Bros J. The role of vitamins and feed enzymes in combating metabolic challenges and disorders.[Текст] / J. Bros, N.E. Ward // J. Appl. Poultry Res. - 2007. – Vol. 16. – P. 150.

10 Enzyme Nomenclature of IUB, 2009 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://iubmb.qmul.ac.uk/iubmb.html>.

11 Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.[Текст] / G.L. Miller // Analytical Chemistry. – 1959. - Vol. 31. - P. 426-428.