

МЕРЗЛОВ С.В., канд. с.-г. наук;
БІТЮЦЬКИЙ В.С., д-р с.-г. наук;
МЕЛЬНИЧЕНКО О.М., д-р с.-г. наук
МОРОЗ Л.В., здобувач

Білоцерківський національний аграрний університет

ВИВЧЕННЯ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ТА БІОХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ФІТАЗИ ЛАДОЗИМ ПРОКСІ З МЕТОЮ ЇЇ МОДИФІКАЦІЇ ТА ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ВИКОРИСТАННЯ ЯК КОРМОВОЇ ДОБАВКИ

Досліджено, що активність фітази Ладозим проксі не змінюється за умов культивування її у середовищі з цистеїном та глутатионом. За участі диетилпірокарбонату доведено, що у складі ферменту є наявний гістидин, який відповідає за його каталітичну функцію. Експериментально встановлено, що в молекулі ензиму є катіон Ca^{2+} , який бере участь у структурній стабілізації фітази.

Вивчено рН оптимум активності, дію інгібіторів та активаторів гідролітичної активності кормової добавки Ладозим проксі.

Ключові слова: фітаза, фосфор, каталітична активність, кормова добавка, катіони.

Постановка проблеми. Біокаталіз – одна з найбільш інвестиційно-привабливих сфер біотехнології. Світової ринок біокаталізаторів, включаючи ферменти, субстрати, а також їх комбінації, постійно зростає. Масштабність сфери використання ферментів і каталізаторів на їх основі визначається наростаючим внеском біокаталітичних технологій в економіку розвинутих країн. Проблема використання ферментів в сільському господарстві, промисловості дуже важлива, тому що біокаталітичні процеси є ефективними, проходять у м'яких умовах, без утворення токсичних продуктів і в ряді випадків не можуть бути замінені на традиційні каталізатори. Так, технічні ферменти незамінні як кормові добавки для сільськогосподарських тварин та птиці.

Сучасні високопродуктивні кроси птиці потребують для реалізації генетичного потенціалу продуктивності використання висококалорійних раціонів, збалансованих за обмінною енергією, комплексом поживних і мінеральних речовин, включаючи не тільки загальний, але і доступний фосфор. Фосфор у рослинах міститься у формі фітину (міо-інозитгексакисфосфornoї кислоти) – складної органічної сполуки, яка практично не використовується птицею. У зв'язку з цим, нині використовують фітазовмісні ферментні препарати.

Фітаза (міо-інозитгексакисфосфат-3(6) фосфогідролаза, КФ 3.1.3.8 і 3.1.3.26) ступенево гідролізує солі міо-інозитгексакисфосфornoї кислоти (фітати) до міо-інозиту і неорганічного фосфату. Фітати є запасною сполукою фосфору у вищих рослин. Вміст фітину (Са-Mg-сіль міо-інозитолгексакисфосфornoї кислоти) в зерні складає 0,4-3,2% сухої ваги насіння, а фосфору фітину – 60–80% загального вмісту фосфору зерна [1, 6]. Через дуже низьку фітазну активність у секретах шлунково-кишкового тракту ця форма фосфору є недоступною для моногастричних тварин (таких як свині і домашня птиця). В результаті основна частина (50–70%) фосфору, яка входить до складу кормів рослинного походження, не засвоюється організмом тварин. Для правильного формування скелета тваринам потрібен фосфор. Тому в раціон тварин додають неорганічний фосфат, який помітно підвищує вартість кормового продукту. Альтернативний спосіб підвищення харчової цінності кормів – використання кормової добавки фітази [1, 9].

Під час практичного використання біокаталізаторів треба враховувати, що такі ферменти, як фітаза, досить чутливі до жорстких умов обробки під час гранулювання та збереження, що призводить до втрати активності ферменту, а це значно впливає на його здатність задовольняти потребу тварин та птиці у фосфорі. Імобілізація ферменту на мінеральному носії підвищує стабільність екзогенного ферменту [2, 3].

Метою досліджень було вивчення фізико-хімічних властивостей фітази, впливу ефекторів для подальшої розробки методів її імобілізації.

Матеріали та методи досліджень. Об'єктом досліджень була фітаза Ладозим проксі, одержана із фугату культуральної рідини бактерій та грибів (м. Ладижин). Визначення стабільності фітази проводили у відсутності активаторів та інгібіторів. Інкубацію ферменту проводили протягом 2 год за рН 3–6. Для підтримки рН використовували буферні системи: 0,2 М гліцин- HCl (рН 2,6 3,6), 0,1 М Na-фталат (рН 4,5), 0,1 М Na-ацетат (рН 5,0,- 5,8), Трис- HCl 0,2 М (рН 7,1). Через кожні 15–60 хв відбирали аліквоти інкубованих розчинів і визначали активність фітази.

Проводили інкубацію фітази із цистеїном та відновленим глутатіоном (концентрація 0,02 М), з диетилпірокарбонатом у мольному співвідношенні 1:1 [4], в присутності поліаніону (пектину) та катіонів Ca^{2+} (0,01М). Діаліз проводили з використанням мембран фірми SIGMA (Німеччина). Вплив іонів металів визначали за допомогою попередньої інкубації з кожним із катіонів (концентрації 0,03 М для Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}). Вплив ЕДТА на активність фітази визначали за концентрацією ефектора 0,02 М. Активність фітази визначали за стандартизованою методикою [5]. Спектрофотометричні дослідження проводили на спектрофотометрі Specol (Німеччина).

Результати досліджень та їх обговорення. Імобілізація ферментів, як відомо, призводить до змін його конформаційної рухливості, що знижує його активність. З іншого боку, зниження конформаційної рухливості перешкоджає процесам денатурації і дозволяє іммобілізованому ферменту зберігати працездатність в екстремальних (для нативного ферменту) умовах. Тому повинна існувати певна оптимальна жорсткість зв'язування, яка регулюється характером приєднання ферменту до носія, природою, розміром та жорсткістю лінкера, зв'язуючого фермент із полімерним носієм і природою носія. Зміни об'єма носія під час багатоцентрового зв'язування можуть викликати денатурацію ферменту. Ці фактори, а також об'ємну структуру біокатализатора, положення та функціональні групи активного центру треба враховувати під час проведення іммобілізації ферменту.

Важливою характеристикою фітази є її стабільність в умовах практичного використання, тобто за температури 37–39 °С протягом 2 год (термін проходження корму через шлунково-кишковий канал). За t° 37 °С досліджувана фітаза зберігала до 84,0% активності за рН 3–6 через 2 год інкубації. За нейтральних та слаболужних значень рН фітаза втрачала активність на 70–95%. З літературних джерел відомо, що фітаза А (*A. Niger*) в цих умовах практично повністю втрачає активність [1, 8].

Під час виявлення функціональних груп, положення та особливостей функціонування активного центру фітази було проведено і встановлено:

- інкубація фітази з цистеїном та глутатіоном не призвела до змін активності ферменту, тому досліджувана фітаза або не має вільних та доступних сульфгідрильних груп, або ці вільні сульфгідрильні групи відіграють незначну роль в активності та структурі ферменту. Це твердження підкріплено тим, що більшість зрілих фітаз мають парну кількість цистеїнових залишків, що можуть бути задіяними у дисульфідних містках, як у випадку з фітазою *A. niger* [9]. Функція дисульфідних зв'язків фітази *A. ficum* пояснюється розгорнутими дослідженнями Ullah та Mullaney [9]. Ці автори зробили висновок, що дисульфідні зв'язки відіграють важливу роль у згортанні протеїну. Таким чином, досліджувана фітаза не потребує модифікації носія цистеїном, який використовується для захисту активного центру сульфгідрильних ферментів під час їх іммобілізації [8];

- інкубація ферменту з диетилпірокарбонатом в мольному співвідношенні 1:1. Модифікація гістидинових залишків в білкових молекулах ферментів під дією диетилпірокарбонату використовується для визначення функціональної ролі цієї амінокислоти в різних ферментах. В наших дослідженнях встановлено, що фітаза інактивується під час інкубації з диетилпірокарбонатом, що свідчить про наявність залишків гістидину, який відповідає за каталітичні функції ферменту. В реакції гістидину з диетилпірокарбонатом (рН = 6) утворюється N-карбетоксипохідне, яке має спектр з максимумом поглинання 240 нм [10]. Відомо, що реакційна здатність залишків гістидину у ферментах залежить як від просторової доступності гістидину, так і від внутрішньомолекулярних взаємодій, які відображаються на величині константи іонізації (pK) азоту імідазольного кільця. В окремих ферментах залишки гістидину в активному центрі знаходяться поблизу залишків Asp, які також беруть участь у каталітичній реакції [14].

Із літературних даних [1] відомі ключові та абсолютно консервативні амінокислотні залишки, які відповідають за каталіз і зв'язування субстрату в активному центрі фітаз, які належать до родини кислих гістидинфосфогідролаз: Arg 81, His 82, Gly 83, Arg 85, Pro 87 пептиду RH GxRxP, а також Arg 165, His 361, Asp362, які належать до α/β -домену. З літературних джерел [1,11] відомо, що шляхом порівняного аналізу послідовностей амінокислот білків і просторового накладання трьохмірної моделі на відомі структури фітаз із *A.ficum* та *A.fumigatus* виявилось можливим ідентифікувати відповідні залишки в молекулі фітази *AP. canescens* – це His 57, здійснюючий нуклеофільну атаку по атому фосфору, і Asp336, який здійснює протонування від'єднувальної спиртової групи.

Встановлені факти дозволяють віднести досліджувану нами фітазу до групи гістидинових кислих фосфогідролаз;

- під час інкубації фітази в присутності ЕДТА (0,05 мМ) не відбувається змін активності ферменту, що свідчить про відсутність в молекулі ферменту катіона металу, який відіграє каталітичну функцію.

Під час інкубації фітази в присутності ЕДТА спостерігаються зміни стабільності ферменту, що свідчить про наявність в молекулі ферменту катіона металу, що бере участь у структурній стабілізації ферменту. Інкубація фітази в присутності катіонів Ca^{2+} та наступний діаліз призводять до підвищення стабільності ферменту, що свідчить про наявність в молекулі ферменту катіона Ca^{2+} , що бере участь у структурній стабілізації ферменту.

Наші дослідження підтверджуються даними, які вказують, що кальцій відіграє важливу роль в PhuC ензими [7]. По-перше, ензим повністю пригнічується хелатуючими агентами (такими як EDTA) в молярних концентраціях, що перевищують концентрацію кальцію. Пригнічення найбільш ймовірно зумовлюється виведенням іонів Ca^{2+} з ензиму. Апоензим може бути значно реактивований лише за участі кальцію (відновлюється 42% природної активності), показуючи, що інші метали не можуть, або можуть лише частково замінити кальцій для формування активного ензиму. Концентрації кальцію, що перевищують концентрацію фітинової кислоти, пригнічують ензим, тому фітат, який складається з аніонів фосфату, насичений Ca^{2+} , не є субстратом для ензиму.

По-друге, спектроскопія кругового дихроїзму (CD) холоензиму, апоензиму та реактивованого ензиму за допомогою кальцію виконує роль кальцію в конформації протеїну. Виведення Ca^{2+} спричиняє зміну в спектрі CD. Спектр апоензиму схожий в загальній формі на спектр холоензиму. Однак, існує чітка відмінність в області 210–200 нанометра, що може вказувати на місцеві конформаційні зміни. Спектри CD холоензиму та ензиму, активованого кальцієм, практично збігаються під час накладання; різниця в інтенсивності між цими двома спектрами не встановлена. Однак, невелика різниця порядку 210–200 нанометрів спостерігається. Згідно з цими результатами, виведення кальцію спричиняє конформаційну зміну в протеїні. Також встановлено, що інактивований ензим може лише частково знову повернутися в активну конформацію через інкубацію за наявності кальцію.

Залежність активності фітази від pH реакційного середовища представлена на рисунку 1. pH – оптимум активності за фітатом дорівнює 5,8, що корелює з літературними даними. Відомо, що кислий pH-оптимум характерний для більшості відомих грибних фітаз [12]. Для фітази *A. Niger* існує два pH-оптимуми – 2,5 та 5,0; під час інкубації в присутності поліаніону (пектину) фітаза повністю втрачає активність. Це свідчить, що в молекулі ферменту знаходиться позитивно заряджена група, яка або відповідає за каталіз, або знаходиться поблизу реакційного центру. Відомо, що за високих концентрацій субстрату, заряд, спричинений фосфатними групами, може впливати на місцеве середовище каталітичної області ферменту [9]. Це може загальмувати перетворення комплексу фермент-субстрат на фермент та продукти гідролізу, хоча пригнічення внаслідок утворення погано розчинного протеїнофітатного комплексу виключати не можна. Проведені нами дослідження, аналіз даних літературних джерел дозволяють припустити, що іммобілізацію ферменту треба проводити на носії, який має позитивний заряд, що буде перешкоджати адсорбції ферменту за участі частини, яка знаходиться біля реакційного центру молекули фітази.

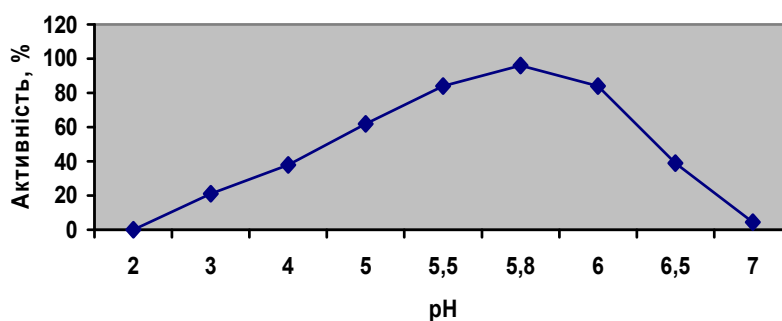


Рис. 1. Залежність активності фітази від pH за $t^{\circ} 38^{\circ}\text{C}$.

Проведені експерименти з вивчення впливу іонів металів на активність досліджуваної фітази показали, що катіони Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} в концентрації 30 мМ повністю інактивували каталітичну дію ферменту. З літературних джерел відомо, що крім інгібуючої дії іонами металів, відмічена активація фітази А іонами Mn^{2+} , Mg^{2+} та Ca^{2+} [1, 9].

Виявлено, що іони металів модулюють активність фітаз. Однак, важко визначити, чи інгібуюча дія різних металів зумовлена прямим зв'язком із ферментом, або іони металів утворюють погано розчинні комплекси з фітиновою кислотою, тим самим зменшуючи концентрацію активного субстрату. Фітаза з *Enterobacter* сильно пригнічується катіонами Zn^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} [9]. Подіб-

ним чином фітаза з *B. Subtilis* (natto) N-77 була значно пригнічена іонами таких металів: Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Fe^{2+} , Al^{3+} [9]. Обидва з цих ферментів, а також дві інші фітази *Baccillus* були значною мірою пригнічені EDTA. Це означає що для їх активності необхідний іон металу (Ca). Фториди та іони перехідних металів також пригнічують фітазу з *K. terrigena*. Відомо, що перехідні метали інактивують ферменти фосфатази. Передбачається, що оксоаніони перехідних металів зменшують активність фосфомоноестераз через утворення комплексів, схожих на тригональну біпірамідальну геометрію перехідного стану [9, 13].

Висновки. Встановлено, що досліджувана фітаза належить до групи гістидинових кислих фосфогідролаз. На основі структури біокатализатора, ефекторів, що сприяють стабілізації його структури, вивчено дії інгібіторів та активаторів визначені оптимальні умови його функціонування.

Перспективи подальших досліджень. За рахунок цілеспрямованого підбору умов проведення іммобілізації ферменту досягнути максимальної ефективності функціонування модифікованого біокатализатора в організмі птиці.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Выделение и свойства внеклеточной фитазы / О.А. Синецкая, Е.А. Федорова, А.В. Гусаков [и др.] // Биохимия. – 2006. – Т. 71, вып. 9. – С. 1260–1268.
2. Omaka N. Omaka; Miranda Keith-Roach; Ian D. McKelvie; Paul J. Worsfold Enzymatic flow-injection determination of phytase-hydrolysable phosphorus (PHP) in natural waters using immobilized 3-phytase / I. J. Environ. Analytical Chemistry, Vol. 88, 2008, – P. 91–101.
3. Çelem E. B., Seçil O. Immobilization of phytase on epoxy-activated Sepabead EC-EP for the hydrolysis of soymilk phytate // Journal of Molecular Catalysis. – 2009. – Vol. 61, I. 3–4. – P. 150–156.
4. Аваева С.М. Реакция диэтилпирикарбоната с имидазолом и производными гистидина / С.М. Аваева, В.И. Краснова // Биоорганическая химия. – 1975. – Т. 1, № 11. – С. 160–165.
5. Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности фитазы: ГОСТ 53360-2009. – М.: Нац. стандарт Российской Федерации, 2009. – 10 с.
6. Man-Jin I. Fermentative production and application of acid phytase by *Saccharomyces cerevisiae* CY strain / I. Man-Jin, S. Sung-Seo, O. Nam-Soon // Afric. J. Biotechnology. – 2008. – Vol. 7, № 17. – P. 315–320.
7. Singh B. Applications of phytase of thermophilic mould, *Sporotrichum thermophile*: A review / B. Singh, T. Satyanarayana // Journal of Scientific & Industrial Research. – 2010. – Vol. 69. – P. 411–414.
8. Greiner R. Purification and characterisation of an extracellular phytase from *Aspergillus niger* 11T53A9 / R. Greiner, L. Gomes da Silva, S. Couri // Braz. J. Microbiology. – 2009. – Vol. 40, № 4. – P. 212–218.
9. Kerovuo J. A Novel Phytase from *Bacillus*. Characterization and Production of the Enzyme / J. Kerovuo. – Helsinki, 2000. – 69 p.
10. Omaka N. Omaka; Miranda Keith-Roach; Ian D. McKelvie; Paul J. Worsfold Enzymatic flow-injection determination of phytase-hydrolysable phosphorus (PHP) in natural waters using immobilized 3-phytase // I. J. Environ. Analytical Chemistry. – 2008. – Vol. 88, I. 2. – P. 91–101.
11. Wanming Zhang, Edward J. Mullaney, X. G. Lei Adopting Selected Hydrogen Bonding and Ionic Interactions from *Aspergillus fumigatus* Phytase Structure Improves the Thermostability of *Aspergillus niger* PhyA Phytase // Applied and Environmental Microbiology. – 2007. – Vol. 73, № 9. – P. 3069–3076.
12. Bing-Lan Liu, Chen-Hwa Jong, Yew-Min Tzeng. Effect of immobilization on pH and thermal stability of *Aspergillus ficuum* phytase // Enzyme and Microbial Technology. – 2009. – Vol. 25, I. 6. – P. 517–521.
13. Quiquampoix H., Mousain, D. Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus // Turner, B.L., Frossard, E., Baldwin, D.S. (eds) *Organic Phosphorus in the Environment*. CABI Publishing, Wallingford, 2005. – P. 89–112.
14. Xiang T., Liu Q., Deacon A.M., Koshy M. Crystal structure of a heat-resilient phytase from *Aspergillus fumigatus*, carrying a phosphorylated histidine // J. Mol. Biol. – 2004. – Vol. 339. – P. 437–445.

Изучение физико-химических и биохимических свойств фитазы Ладозим прокси с целью её модификации и повышения эффективности использования в качестве кормовой добавки

С.В. Мерзлов, В.С. Битюцкий, Л.В. Мороз

Установлено, что активность фитазы Ладозим прокси не изменяется при культивировании её в среде с цистеином и глутатионом. С помощью диэтилпирикарбоната доказано, что в составе фермента есть гистидин, отвечающий за его каталитическую функцию. Экспериментально установлено, что в молекуле энзима есть катион Ca^{2+} , который принимает участие в структурной стабилизации фитазы.

Изучены pH оптимум активности, действие ингибиторов и активаторов гидролитической активности кормовой добавки Ладозим прокси.

Ключевые слова: фитаза, фосфор, каталитическая активность, кормовая добавка, катионы.

Investigating physical, chemical and biochemical properties of phytase in order to modify it and to increase the efficiency of its use as a food additive

S. Merzlov, V. Bityutskiy, L. Moroz

It has been proven that ladowym proxy phytase does not change in its cultivating in cysteine and glutathione environment. It has been proven with the diethylpyrocarbonate that there is histidine in the ferment, which returns for its catalytic function. It has been proven experimentally that enzyme molecule contains Ca^{2+} cation participating in phytase structure stabilization.

Optimum pH activity, inhibitors and activators of hydrolytic activity of ladowym proxy food additive has been studied.

Key words: phytase, phosphorus, catalytic activity, food additive, cation.