

ОЦЕНКА ДЕЙСТВИЯ ФИТАЗ В ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОМ ТРАКТЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРЕПАРАТОВ ФИТАЗЫ В ПИТАНИИ ЖИВОТНЫХ (обзор)

¹Крюков В.С., ²Глебова И.В., ³Антипов А.А.

¹ООО «Ветфармстандарт», Москва; ²Курская ГСХА, Курск,
³ВНИТИП, Сергиев Посад Московской обл., Российская Федерация

С начала 90-х гг. на рынке кормовых добавок получили широкое распространение препараты фитазы – фермента из группы фосфатаз, с преимущественным сродством к фитатам растений. Цель данной работы – систематизация данных о действии фитаз *in vitro* и в организме животных и о влиянии состава рациона на доступность фосфора фитатов. Описаны «экстрафосфорный» эффект фитаз и новое объяснение угнетения доступности аминокислот фитатами. Приведены примеры использования коммерческих кормовых препаратов, содержащих фитазу. Селекция высокоактивных продуцентов фитаз среди грибов и бактерий и методы генной инженерии позволили создать кормовые фитазы, которые позволяют на 30-40% повысить использование фосфора из растительного сырья. Экстрафосфорное действие, проявляемое при скармливании фитаз, выражается в повышении доступности аминокислот протеина и обменной энергии корма. Этот факт многократно подтверждён в экспериментах, однако распространённое объяснение этого феномена ошибочно, так как фитазы не обладают протеолитическим действием. Авторы обзора приходят к выводу, что расщепление фитатов ведёт к потере ими способности блокировать уже переваренные аминокислоты, обуславливая повышение их доступности. Увеличение количества доступных аминокислот дало повод для ошибочного вывода о повышении переваримости протеина. При выборе кормовых препаратов фитаз необходимо учитывать их устойчивость к протеазам ЖКТ и стабильность к термическому воздействию при гранулировании кормов. Необходимо критически относиться к заявляемым характеристикам действия ферментных препаратов, поскольку в них не всегда учитываются особенности состава комбикормов. Требуется дальнейшие исследования по изучению молекулярных механизмов экстрафосфатного действия фитаз, обуславливающих повышение доступности аминокислот и обменной энергии.

Ключевые слова: питание птицы, кормовые ферментные препараты, фитаза, фитаты, доступность питательных веществ для всасывания

Проблемы биологии продуктивных животных, 2019, 2: 19-43

Введение

При описании растительных соединений фосфора используют названия содержащихся в них химических веществ – фитаты, фитин и фитиновая кислота (ФК). ФК является сложным эфиром циклического спирта мио-инозитола. Название «фитин» относится к смеси веществ, которые отлагаются в растениях в виде магниевых, кальциевых и калиевых солей ФК; в России фитином также называют лекарственный препарат, состоящий из смеси кальциевых и магниевых солей фитиновой кислоты, то есть фитатов. В широком смысле к фитатам относятся все соединения, включающие анион фитиновой кислоты. Эфирные связи между инозитолом и фосфатными группами ФК слабо подвергаются гидролизу в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) в связи с низкой активностью эндогенной фосфатазы, поэтому доступность фосфора, входящего в состав фитатов, ограничена. Фитаты, попадая в желудок, растворяются и ионизируются, образуя анионы фитиновой кислоты, которые связывают минералы, протонированные аминокислоты и белки. В результате доступность питательных веществ снижается – этот феномен обуславливает антипитательное действие фитатов.

О низкой доступности фосфора фитатов стало известно в 1939 г. (Lowe et al., 1939); почти через 20 лет нашли способ повышения его доступности из растительных кормов путём использования фитазы (Warden, Schaible, 1962) и только через 3 десятилетия появился первый коммерческий препарат фитазы (Selle, Ravindran, 2006). В то время рынок оказался не готовым принять новый продукт, так как он не выдерживал конкуренции с дешёвыми минеральными источниками фосфора, а об антипитательном действии фитатов в то время знали мало (Bedford, 2003). В дальнейшем, введение в западной Европе запрета на использование в кормлении животных мясной и мясокостной муки и подорожание минеральных источников фосфора явились стимулом для развития рынка фитазы. Способствовали этому принятые в некоторых странах ограничения по загрязнению окружающей среды фосфатами, которые выделяют животные с калом. Кормовые препараты фитазы получают распространение на рынке кормовых ферментов на 20 лет позднее карбогидраз, но они быстро получили признание и в связи с выявленным полезным «экстрафосфорным» действием и за быстрое широкое распространение фитаза получила название: «чудодейственный фермент 1990-х гг.» (Kornegay 2000).

Цель данной работы – систематизация данных о действии фитаз *in vitro* и в организме животных и о влиянии состава рациона на доступность фосфора фитатов.

Фитаты

Преобладающая доля органических соединений фосфора в растительных кормах приходится на фитаты, которые относятся к резервной форме фосфора в семенах растений. Считают, что только третья его часть доступна для животных. Это упрощённое представление, так как одни исследователи определили, что доступность фосфора фитатов для цыплят из комбикорма, приготовленного с преобладанием пшеницы, составляет 8% (кукурузы – 0%), другие называют 60%. Результаты установлены экспериментально и не вызывают сомнения. Большой разброс величин доступности фосфора зависит от многих факторов, среди которых главными являются общее содержание фосфора в рационе, доля добавленного минерального источника фосфора, а также концентрация кальция и его отношение к фосфору (Ravindran et al., 1995). Независимо от величин, отражающих абсолютную концентрацию, относительная доля фитатов в зерне злаков находится в узком диапазоне, составляя 61-72%; в продуктах переработки масличных культур диапазон шире – от 60 до 85% (табл. 1).

*Таблица 1. Содержание общего и фитатного фосфора в кормовых ингредиентах**

Ингредиенты	Концентрация фосфора, г/кг			Р от	Активность растительной фитазы, FTU/кг
	Общий фосфор	Фосфор фитатов	Фитатный Р общего, %		
Пшеница	3,07	2,19	71,6		471
Кукуруза	2,62	1,88	71,6		15
Ячмень	3,21	1,96	61,0		582
Овёс	4,33	2,90	67		40
Сорго	3,01	2,18	72,6		24
Горох	3,6	1,70	47,2		н.д.
Соевый шрот	6,49	3,88	59,9		8
Соевый жмых	6,36	3,82	60,1		н.д.
Подсолнечн. шрот	10,84	9,21	85,0		60
Рапсовый шрот	9,72	6,45	66,4		16
Пшеничные отруби	10,96	8,36	76,3		2957

* Адаптировано по: Kornegay (2000); Godoy et al. (2005); Selle, Ravindran (2007).

Количество фитатов в кормах зависит от вида сырья и подвержено значительным колебаниям внутри каждого вида. Фитаты представлены широким кругом соединений с различными свойствами; объединяет их то, что их основой является ФК, которая представляет собой сложный эфир циклического шестиатомного спирта мио-инозитола,

этерифицированного шестью фосфатными группами. Фосфатные группы ФК обладают 12-ю атомами водорода, из которых шесть атомов проявляют сильные кислотные свойства – рК 1,5, три атома проявляют умеренно кислые свойства – рК 5,6- 7,6 и три оставшихся низко активны – рК более 10 (Cosotello et al., 1976). Исходя из реакционных способностей отдельных фосфатных групп ФК, в ЖКТ могут образовываться разнообразные химические соединения, в том числе новые фитаты, ранее отсутствовавшие в корме. Распространено мнение, что антипитательное действие фитатов связано с низкой доступностью из них фосфора. Другие специалисты тоже разделяют антипитательное действие фитатов и свойства, связанные с низкой доступностью из них фосфора (Джоунс, 2014). Фитаты, попадая в желудок, переходят в ионизированное состояние и становятся доступными для фитаз, часть ионов ФК связывается с белками и крахмалом, тормозя их переваривание, то есть проявляют антипитательные свойства. По мере перемещения химуса в двенадцатиперстную кишку и повышения рН, анионы ФК без затраты энергии вступают в химические реакции, образуя нерастворимые соли цинка, железа, кальция, магния и других металлов.

ФК обладает высоким потенциалом к образованию хелатов с двухвалентными катионами. По стабильности в порядке убывания хелаты располагаются следующим образом: Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} (Cheryan, 1980). Согласно другим данным, в зависимости от состава среды этот ряд может выглядеть иначе: Zn^{2+} , $Fe^{2+/3+}$, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} и Cu^{2+} (Lönnerdal, 2002). На положение в этом ряду в первую очередь влияет рН среды. В кишечнике один моль ФК может связывать от 3 до 6 атомов кальция, образуя нерастворимые соединения, в составе которых кальций и фосфор недоступны для всасывания. Более прочные и недоступные комплексы образуются с участием Zn и Cu (Pallauf, Rimbach, 1995). Несмотря на то, что Mg, Zn и Ca являются двухвалентными металлами, они по-разному реагируют с ФК. Металлы с большим ионным радиусом, такие как Ca^{2+} – 0,099 нм и стронций – 0,112 нм проявляют бидентантные свойства, вступая в реакцию с атомами кислорода рядом расположенных фосфатных групп (Champagne et al., 1990). Ионы магния, цинка и железа имеют меньший радиус: 0,065 – 0,074 нм, поэтому они могут связываться с двумя атомами кислорода одной и той же фосфатной группы (Oh et al., 2004). В нейтральной среде один ион Zn^{2+} может связывать два аниона ФК, образуя мостик между фосфатными группами двух молекул (Cheryan, 1980). В кишечнике и частично в желудке образуются фитаты, вызывающие снижение доступности фосфора, кальция, цинка, меди и других микроэлементов. В ЖКТ при рН ниже изоэлектрической точки белка, фосфатные группы растворённых фитатов вступают во взаимодействие с α -NH₂-терминальными группами белков, ϵ -NH₂ группой лизина с образованием комплексов, которые растворяются только при рН ниже 3,5. В кислой среде желудка ионы фитиновой кислоты связывают белки по остаткам имидазола гистидина, гуанидила аргинина, образуя не растворимые фитаты. Молекулы белка в среде выше изоэлектрической точки приобретают отрицательный заряд и поэтому непосредственно не вступают во взаимодействие с анионом ФК, однако они могут образовывать связь через положительно заряженные двухвалентные ионы металлов (Nissar et al., 2017).

В кишечнике при рН выше 5,5 могут формироваться тройные соединения белок-катион металла - ФК (Anderson, 1985). Связывание имидазольной группы гистидина или ионизированных карбоксильных групп белков через катион Ca в кишечнике описано рядом исследователей (Honig et al., 1984; Champagne et al., 1990; Adeola, Cowieson, 2011). Образовавшиеся соединения в дальнейшем трудно поддаются протеолизу, что подтверждено в опыте на бройлерах, которым добавляли в корм растворимый фитат натрия, и при этом наблюдали увеличение потерь белка (Conwieson et al., 2004). Считают, что кроме прямого действия, ФК угнетает переваривание белка и крахмала в связи со снижением в химусе концентрации свободного кальция, необходимого для проявления активности трипсина и α -амилазы. Динамичность процессов пищеварения и происходящих химических изменений веществ, трудность выделения этих веществ в чистом виде создают сложности для их

количественной оценки. Подтверждения возможности образования некоторых фитатов получены только *in vitro* при попытках моделирования условий в различных отделах ЖКТ.

Предположение о присутствии различных фитатов в ЖКТ основано на знании химических свойств исходных веществ или на результатах исследований *in vitro*. Полное воспроизведение реальных условий среды ЖКТ не достижимо *in vitro*. Не известна динамика концентрации веществ; часть из них не получена в чистом виде, поэтому недоступна для дальнейшего изучения. Иногда исследователи опираются на факты, полученные в экспериментах, результаты которых не всегда можно повторить, что приводит к противоречивым выводам. Антипитательное действие фитатов подтверждено многочисленными фактами, которые исключают сомнения в его существовании, однако механизмы его проявления в ЖКТ изучены слабо. Вероятно, это связано с распространённым ошибочным мнением об антипитательном действии фитатов, так как его проявляют не фитаты, а образующиеся из них анионы фитиновой кислоты. Необходимы дальнейшие исследования для определения и количественной оценки факторов, влияющих на получаемые результаты.

На 1-м международном саммите, посвящённом изучению фитазы, в 2010 г. было заявлено: «В 1965 году доктор Тейлор на собрании общества питания в Великобритании сказал: «... в действительности, всё еще большая путаница окружает роль фитата в питании». В 2010 г., это выражение не только по-прежнему верно, но и приобрело даже большую актуальность (Anonim. Proceedings of the 1st International Phytase Summit 2010. Washington. D.C. 28.9.10-30.9.10. 2010. P. 3.). Фитатам приписывают положительную или отрицательную роль в зависимости от целей исследований. Положительная роль заключается в том, что они могут оказывать антиоксидантное действие в кишечнике, обеспечивая защиту от рака толстой кишки. Существует лекарственное средство фитин, которое рекомендуют применять при нарушении функций печени, диабетических болях, нервных панических расстройствах, депрессии и многих других. В животноводстве фитаты не нашли лечебного применения; их присутствие в кормах связывают в первую очередь с уменьшением доступности фосфора, а также с антипитательным действием.

Трудности изучения действия фитатов обусловлены методическими проблемами, связанными с необходимостью анализа множества соединений, образуемых в ЖКТ, с разной реакционной способностью в различных отделах ЖКТ, взаимодействием с белками, углеводами и минералами в кишечнике, а также с технологией приготовления кормов*.

*Существует путаница в терминах, подразделяющих различные формы фосфора в рационах для животных. Последнее обусловлено тем, что формы фосфора в кормах, определяемые в лаборатории, не совпадают с физиологически значимыми. **Усвояемый фосфор** не определяется химическим методом, а рассчитывается по разнице между **общим фосфором**, потреблённым с кормом, и фосфором, выделенным с калом и мочой, то есть рассчитывается на основе результатов балансовых опытов. **Усвояемый фосфор** является той частью доступного для всасывания, которая присутствует в содержимом ЖКТ в форме, способной к всасыванию, но не обязательно всасывается. Специалисты по кормлению животных в большинстве случаев отождествляют доступный фосфор и усвояемый. **Доступный фосфор**, в отличие от фитатного, невозможно определить химическим методом. После вычитания из общего фосфора фосфор фитатов получают **нефитатный фосфор**. Разница между доступным фосфором и нефитатным заключается в том, что термин «**доступный фосфор**» включает все формы фосфора, вносящие вклад во всосавшийся фосфор. Последний включает большую часть неорганического фосфора, которая поступает из органических соединений (например, из животных кормов) и часть фосфора из фитатов, перевариваемых фитазами животного. С практической точки зрения, согласно рекомендациям НИС США (NRC. 1994. Committee on Nutrient Requirements of Poultry, National Research Council. Nutrient requirements of poultry. 9th ed. Washington, DC: National Academy Press. 176 P.), доступный и нефитатный фосфор рассматривают как взаимозаменяемые, но при этом указывают, что это не согласуется с вышеприведенными определениями.

Фитазы

Фитаза относится к классу фосфатаз – фосфогидролаза мио-инозитол-1,2,3,5-цис-4,6-гексаксидигидрогенфосфата – она катализирует отщепление фосфата от аниона фитиновой кислоты (мио-инозитол-1,2,3,5-цис-4,6-гексаксидигидрофосфат, IP6). Гидролиз приводит к образованию низших эфиров мио-инозитолфосфата в результате последовательных реакций дефосфорилирования ($IP6 \rightarrow IP5 \rightarrow IP4 \rightarrow IP3 \rightarrow IP2 \rightarrow IP1 \rightarrow I$). Теоретически в результате полного дефосфорилирования одного моля ФК освобождается 6 ионов фосфата, однако в организме этот процесс редко протекает полностью. Связь фосфат-иона с углеродным атомом во втором положении инозитола трудно доступна для действия фитазы, поэтому при расщеплении 1 моля ФК в большинстве случаев конечными продуктами являются моно-2-фосфоинозитол и 5 ионов ортофосфата. Учитывая, что в среде могут присутствовать эфиры инозитола, образующиеся на отдельных стадиях дефосфорилирования, количество освободившихся ионов фосфора в несколько раз выше, чем молекул оставшихся фитатов. Не исключена возможность полного гидролиза эфирных связей с инозитолом (Wodzinski, Ullah, 1996). С увеличением количества отщепленных фосфатных групп, образующиеся вещества теряют способность к образованию комплексов и не проявляют антипитательного действия. Фитат-ионы (IP6) активно вступают во взаимодействие с положительно заряженными ионами, образующимися в процессе пищеварения. Они обуславливают антипитательные свойства, потому что приводят к снижению доступности питательных веществ. 6-фитаза разрывает связь между фосфатной группой и инозитолом, и на первых этапах действия фитазы вначале образуются эфиры инозитола с 5 – 3 фосфатными группами (IP5; IP4; IP3), обладающие меньшей реакционной способностью. Отщепившаяся фосфатная группа может быть связана с аминокислотой, которая затем диссоциирует на аминоксил и ион фосфата, которые всасываются.

Фитазы имеют молекулярную массу от 42 до 490 кДа, и на основании свойств и механизмов действия их подразделяют на 4 класса – гистидин-кислые фосфатазы (HAPs), β -пропеллерные фитазы (BPPs), фиолетовые кислые фосфатазы (PAPs), и белковые тирозинфосфатазные фитазы (PTPs). Большинство известных коммерческих препаратов фитаз относятся к гистидин-кислым фосфатазам (Mullane, Ullah, 2003; Ushasree et al., 2011). В зависимости от положения углерода в кольце мио-инозитолфосфата, с которого начинается дефосфорилирование, фитазы подразделяют на 3-фитазы и 6-фитазы, редко называют 5-фитазы и 4/6-фитазы, то есть это деление не строгое. Механизм действия каждого типа фитаз и проявление максимальной активности различаются и в зависимости от pH среды. По этому признаку их относят к кислым или щелочным. Кислые фосфатазы обладают широкой субстратной специфичностью к фитатам, не содержащим металлов, тогда как щелочные проявляют субстратную специфичность по отношению к фитатам, связанным с металлами. Подробно классификация фитаз и их продуценты описаны в обзорах (Jorquera et al., 2008; Oh et al., 2004). Классификация фитаз и включение их в ту или иную группу основаны на наблюдениях *in vitro*, в которых выбирали доступные для изучения фитаты. Знания о действии фитаз *in vivo* остаются ограниченными (Konietzny, Greiner, 2002).

Определение активности фитаз

Активность фитаз в России определяют согласно национальному стандарту ГОСТ Р ИСО 30024-2012. Аналогичный стандарт ранее был утверждён в Европейском Союзе ISO 30024:2009 (en). В описании области применения стандарта указано, что метод определения активности фитазы в кормах не позволяет идентифицировать фитазу, используемую в качестве кормовой добавки. Метод не применим для оценки или сравнения эффективности различных фитаз в кормлении животных. За одну единицу активности принимают 1 микромоль неорганического фосфата, освобождённого за 1 минуту из 5 мМ раствора фитата натрия при pH 5,5 и температуре 37°C при инкубации в течение 30 минут. Следует обратить внимание, что фитат кальция, который является преобладающим соединением, в ЖКТ

подвергается гидролизу слабее, чем фитат натрия (Maddaiah et al., 1963). Относительность метода определения активности подтверждается изучением действия фитаз различного происхождения на гидролиз фитатов *in vitro* (Tran et al., 2011) (табл. 3).

Таблица 3. Относительная активность фитаз* в зависимости от используемых субстратов

Источники фитаз	Фитат натрия	Фитат соевого протеина	Фитат лизоцима
<i>E. coli 1 (S. pombe)</i>	100	164	229
<i>E. coli 2 (P. pastoris)</i>	103	138	152
<i>A. niger</i>	37	32	23
<i>P. lycii</i>	10	25	13

Примечания: *фитазы были взяты в дозе 0,1 FTU/мл; активность *E. coli 1* – 0,096 мкмоль P/мл/мин.

Активность фитазы *E. coli 1 (S. pombe)*, которая была принята за 100% по отношению к фитату натрия, оказалась в 1,6 раза выше при расщеплении фитатов соевого протеина и в 2,3 раза – при гидролизе фитата лизоцима. Фитазы, продуцируемые *E. coli*, примерно с одинаковой интенсивностью дефосфорилировали фитат натрия, но отличались по активности расщепления фитатов соевого протеина и лизоцима. В несколько раз была ниже активность фитазы, продуцируемой *A. niger* и ещё ниже – Теоретическая и эволюционная биология фитазы, образуемой *P. lycii*. Ранее была выявлена значительная вариабельность активности кислых и щелочных фитаз в зависимости от используемых субстратов (Oh et al., 2004).

Обращают внимание на то, что активность фермента и его действие – это разные понятия. Единицы, характеризующие активность, предусмотрены для целей маркировки, но не имеют «абсолютно никакой» ценности для сравнения разных продуктов (Vasquez, Glitsoe, 2012). Активность фермента относится к способности производить определённое действие в конкретных стандартных условиях анализа. Последние отличаются от условий в организме, поэтому активность, установленная при анализе стандартным методом, не совпадает с действием, проявляемым в ЖКТ, и не является надёжным способом для определения сравнительной эффективности кормовых фитаз (Vasquez, Glitsoe, 2012). Активность ферментов характеризуется количеством продукта, образовавшегося в результате действия фермента, которое зависит от условий измерения, включая pH среды, её состав, температуру, используемый субстрат, время инкубации, интенсивность перемешивания среды и другие параметры. Стандартизированные условия измерений *in vitro* не совпадают с таковыми *in vivo*, поскольку pH и состав среды, концентрация доступного субстрата, меняются на протяжении ЖКТ и к ним следует добавить действие протеаз ЖКТ, которые могут переваривать экзогенные ферменты (Волчок и др., 2018), снижая их действие. Величины активности кормовых ферментов, приводимые в научных публикациях, следует рассматривать как возможные в неких конкретных условиях, но не обязательно количественно повторяемые в других. Активность коммерческих фитаз, измеряемая в модельном растворе *in vitro* не может использоваться для ранжирования фитаз по эффективности их действия в ЖКТ (Menezes-Blackburn et al., 2015).

Фитазы, относясь к группе фосфатаз, могут отщеплять фосфор не только от фитиновой кислоты, но и от других органических соединений, содержащих фосфор. Согласно методу ISO, для определения активности фитазы в качестве субстрата используют фитат натрия, который в естественном сырье присутствует в минимальном количестве. Получены доказательства того, что широко распространённый метод определения активности фитаз, основанный на измерении высвобожденного неорганического фосфата, завышает активность, в связи с этим предлагается определять концентрацию непосредственного конечного продукта – мио-инозитола или его низших фосфорсодержащих эфиров (Qvirist et al., 2015).

Для определения активности ферментных препаратов, расщепляющих фитаты, был испытан способ, который предусматривал повышение доступности фосфора фитатов на определённую величину (Gonçalves et al., 2016). Для этого в опыте на свиньях определяли активность фитаз, повышающих уровень доступного фосфора на 0,10; 0,12; 0,14 и 0,16%. Изучение действия коммерческих препаратов – Axtra РНУ, Natuphos E, Optiphos, Quantum blue, Ronozyme Hiphos показало, что для высвобождения 0,088 и 0,106% доступного фосфора требовалось меньше стандартной активности препарата Optiphos; более высокие дозы фитатов эффективнее переваривал Natuphos E. Максимальная активность для переваривания равного количества фитатов требовалась при использовании Ronozyme Hiphos (табл. 4).

Таблица 4. Влияние фитаз на доступность фитатного фосфора у свиней

Планируемая доступность фосфора, %	Фактическая доступность фосфора, %	Коммерческие препараты фитазы, активность*, FTU/кг				
		Axtra РНУ	Natuphos E	Optiphos	Quantum blue	Ronozyme Hiphos
0,100	0,088	270	250	200	250	400
0,120	0,106	360	325	250	315	600
0,140	0,124	500	400	500	430	1000
0,160	0,141	750	475	565	585	1500

Примечания: адаптировано по: Gonçalves et al. (2016); активность была определена стандартным методом.

Приведенные результаты подтверждают, что активность ферментных препаратов, определённая стандартным методом *in vitro* не может отражать их действие на животных (Vasquez, Glitsoe, 2012). Определение *in vitro* не может использоваться для ранжирования фитаз по их эффективности для животных, оно рассматривается как полезный инструмент в лабораторных исследованиях для оценки перспективной пригодности фитазы (Menezes-Blackburn et al., 2015). Поиски всё новых способов оценки активности фитаз, отражающих их действие, свидетельствуют о недостатках существующих способов и неудовлетворённости ими специалистов.

Действие фитаз *in vivo*

Фитазы широко распространены в природе (Nayini, Markakis, 1986; Nys et al., 1996), при этом признано, что их активность в ЖКТ недостаточна для полного высвобождения фосфора из фитатов, поэтому он только частично используется моногастричными животными (Taylor, 1965; Nelson, 1967; Fandrejewski et al., 1997). Действие эндогенных фитаз зависит от их содержания в компонентах кормов, сохранения их активности в результате технологических воздействий на корма в процессе их производства, устойчивости к действию протеаз в ЖКТ, активности собственных ферментов кишечника и состава рациона. Высокая природная активность фермента обнаружена в зерне злаковых, тогда как у бобовых культур она определялась в следовых количествах (табл. 1). Установлено заметное влияние фитазы пшеницы, ржи, тритикале и ячменя на доступность фосфора из фитатов корма. При скормливании бройлерам комбикорма, не подвергнутого термообработке, активность фитазы химуса была достаточно высокой, и добавление её в рацион не влияло на рост птицы (Zeller et al., 2015). Особенностью фитаз растительного происхождения является термолабильность, обуславливающая потерю активности при гранулировании (Jongbloed, Kemme, 1990). Данные о фитазах, секретиромых слизистой оболочкой кишечника, а также кишечной микрофлорой (Griener et al., 1993), немногочисленны и не позволяют прийти к однозначным выводам о их роли.

В производственных условиях наибольшее распространение получили ферменты, продуцентами которых являются *A niger* (3-фитаза), *E. coli* (6-фитаза) и *Peniophora lycii* (6-фитаза). У птиц фитаза начинает действовать в зобе, где активны фитазы с оптимумом pH 5,5-6,0 (Takemasa et al., 1996; Kerr et al., 2000; Zeller et al., 2015), хотя проявление их активности ограничено низкой растворимостью фитатов при pH выше 5,0. Считают, что наибольшая часть фитатов расщепляется в кислой среде желудка, однако фитазы, продуцируемые *E. coli*,

активнее в среде кишечника (Zeller et al., 2015; Onyango et al., 2005; Igbasan et al., 2005). В двенадцатиперстной кишке среда остаётся слабо кислой, и можно ожидать продолжения действия кислых фитаз. Их большую активность в кислой среде можно объяснить лучшей растворимостью фитатов при pH ниже 5,5, что создаёт их доступность для действия ферментов. Растворимость мио-инозитолгексафосфата (IP6) в тонком кишечнике при pH 6,6 составляет 2%, тогда как при уменьшении количества фосфатных групп до IP5, IP4, IP3 и IP2 растворимость возрастает, составляя 7; 8; 31 и 75% соответственно (Schlemmer et al., 2001), что повышает их доступность для действия ферментов. На этом основании можно сделать вывод, что первые стадии дефосфорилирования фитатов *in vivo* играют ведущую роль в создании условий для полного гидролиза фитатов. Считают, что в кишечнике фитаты корма малорастворимы, поэтому механизм действия фитаз в его условиях не имеет достаточных объяснений. Совсем недавно проведенные исследования показали, что при включении в рацион бойлеров 500 FTU/kg в тощей кишке бройлеров повышалась активность эндогенной щелочной фосфатазы, которая расщепляет трудно растворимые фитаты двухвалентных металлов (Akter et al., 2017). Этот факт ещё требует углублённого изучения, чтобы прояснить механизм активного расщепления фитатов в кишечнике.

Фитазы в составе ферментных препаратов, поступая в желудок с кормом, могут перевариваться, теряя активность. Они имеют различную устойчивость к протеолитическим ферментам, и, следовательно, их активность, определённая в стандартных условиях и указанная производителем, будет отличаться от их действия в ЖКТ. Изучена активность фитаз при инкубации в присутствии пепсина, трипсина или в химусе, взятом из разных отделов ЖКТ бройлеров (табл. 5).

Таблица 5. Изменение активности фитаз под действием протеаз свиньи и химуса из различных отделов ЖКТ птицы, *in vitro*. %

Источник протеазы	Продуценты фитазы*			
	<i>Bacillus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Aspergillus</i>
Пепсин	32,4	89,7	86,7	40,8
Панкреатин	98,2	95,5	94,8	34,2
Супернатант химуса				
Зоб	94,0	96,6	91,3	96,7
Желудок	68,4	93,6	96,8	70,2
12-ти перстная кишка	96,4	98,5	96,3	90,6
Тощая кишка	91,0	87,2	87,7	90,0
Подвздошная кишка	96,8	97,0	90,0	81,3

Примечания: адаптировано по: Elkhilil (2007); *инкубация в течение 60 мин при 40°C.

Фитаза, продуцируемая грибом *Aspergillus*, в большей степени теряла активность в результате инкубации с пепсином и панкреатином; фитаза, продуцируемая *Bacillus*, была неустойчива к кислой протеазе, но сохраняла активность после инкубации с панкреатином. Ферменты, продуцируемые *E. coli* и *Klebsiella*, лишь немного снижали активность под действием пепсина, но они были устойчивы в среде с панкреатином. Все фитазы хорошо сохраняли активность после инкубации в содержимом ЖКТ цыплят-бройлеров, хотя фитазы *Bacillus* и *Aspergillus* заметно снижали активность в химусе желудка, но затем она восстанавливалась в 12-ти перстной кишке и далее (Elkhilil, 2007). В другом исследовании было изучено проявление активности фитаз продуцируемых *E. coli* и *P. lycii* и в химусе ЖКТ 22-дневных бройлеров кросса Росс (Onyango et al., 2005). Оптимум активности обеих фитаз находился в диапазоне pH 4-4,5. В корма опытных групп включили одинаковое по активности количество фитаз, однако активность фитазы *E. coli*, определённой стандартным методом на фоне комбикорма, была ниже, тогда как активность фитазы *P. lycii* оказалась несколько выше заявленной (табл. 6).

Разница по активности между фитазами составила 327 FTU/кг, т.е. ферменты подвергались разнонаправленному действию веществами, входящими в состав корма. Авторы констатируют наблюдаемые различия без объяснений. Кислотность среды в зобе может

изменяться в диапазоне 4,5-6,0 рН, т.е. была в диапазоне, близком к оптимуму для действия ферментов, тем не менее, их активность в химусе зоба снизилась по сравнению с исходной в корме в 2,5-5,2 раз. В суммарном содержимом железистого и мышечного желудков активность фитаз продолжала снижаться, более активно – активность фитазы, продуцируемой *P. luscii*. Интересно заметить, что активность фитазы *E. coli* в тощей кишке резко возростала, тогда как *P. luscii* продолжала оставаться на минимальном уровне. Из этого следует, что фитаза *E. coli* не подвергалась в желудке необратимой денатурации, и её активность восстанавливалась в нейтральной среде тощей кишки. В целом, фитаза *E. coli* была более устойчива к действию ферментов в условиях среды ЖКТ. Причины проявления различной активности 6-фитаз в данном опыте не были объяснены.

Таблица 6. Активность фитаз в химусе в расчете на 1 кг потреблённого корма

Показатели	ОР (1,0% Са; 0,39;% общего Р)	ОР + 1000 FTU фитазы <i>E. coli</i> /кг	ОР + 1000 FTU фитазы <i>P. luscii</i> /кг
Корм	14	825	1152
Зоб	41	328	218
Желудок (железистый +мышечный)	10	119	25
Тощая кишка	24	707	36
Подвздошная кишка	49	328	22

Примечание: адаптировано по: Onyango et al. (2005).

Количество публикаций, посвящённых изучению фитаз, начиная с 1962 г., достигает нескольких тысяч. Интерес к их изучению ещё больше возрос после выявления эффекта повышения доступности аминокислот и энергии корма в результате их применения. Фосфатазы и фитазы, в частности, не способны к протеолизу; увеличение доступности аминокислот при включении фитаз в рацион обусловлено их опосредованным влиянием. Довод подтверждён в опыте на цыплятах, которым скармливали корма, не содержащие фитатов, с единственным источником белка в виде казеина. Включение в корм 1000 FTU/кг фитазы незначительно понизило переваримость казеина (с 85 до 76%). Добавление к корму фитиновой кислоты снижало доступность протеина до 21%. Включение фитазы в корм на этом фоне повышало переваримость протеина до 70% (Cowieson et al., 2006). Из результатов опыта следует, что фитаза в отсутствие фитатов не повышает переваримость протеина, так как не обладает протеолитическим действием, но преодолевает угнетающее действие фитиновой кислоты. Называют три предполагаемых пути, по которым фитаты могут вызывать антипитательное действие в отношении протеина корма: 1) Угнетение активности протеаз ЖКТ (Singh, Krikorian, 1982; Knuckles et al., 1989; Caldwell, 1992; Katayama, 1997), хотя не все исследователи разделяют это мнение (Selle et al., 2000). Поводом для этого предположения явились результаты, полученные в опытах *in vitro*, которые методически не могут быть повторены на животных. 2) Связывание белков в желудке ионизированной ФК, где они в кислой среде имеют большее сродство к ФК, чем минералы (Jongbloed et al., 1997). Образующиеся комплексы труднодоступны для действия эндогенных протеаз (Selle et al., 2000). 3) Повышение эндогенных потерь белка под влиянием фитатов (Cowieson, Ravindran, 2007; Selle, Ravindran, 2008; Woyengo, 2009). Относительная доля и уровень значимости каждого из перечисленных эффектов на уровне организма не определены.

О снижении использования протеина под влиянием фитатов известно с 70-х гг. прошлого столетия, когда установили, что у фитатов корма, попавших в кислую среду желудка, катионы металлов заменяются ионами H^+ , и фитаты растворяются, превращаясь в протонированные фитат-ионы, часть фосфатных групп которых сохраняет отрицательный заряд в желудке при рН от 2 до 3 (Costello et al., 1976), однако другая часть групп обладает отрицательным зарядом и в верхних отделах кишечника. Взаимодействие между анионами фитата и аминокислотами белка в химусе приводит к образованию трудно растворимых соединений, недоступных для всасывания. Интенсивность процесса зависит от природы белка

и концентрации фитата в корме. Сообщается, что для угнетения растворимости белка критическое отношение фитат/белок составляет около 0,05: 1, то есть 10 г фитиновой кислоты на 200 г протеина (Mothes et al., 1990). Установленное соотношение совпадает с таковым в комбикорме, приготовленном на основе кукурузы и соевого шрота. Потребление корма с содержанием 0,25-0,35% фитатов ведёт к снижению растворимости протеина и всасывания переваренных аминокислот. Предполагают, что фитаты связывают глицин, серин, треонин, пролин и в ряде случаев – гистидин (Cowieson, Ravindran, 2007; Peter et al., 2009). Показано, что включение в рацион фитазы приводит к значительным колебаниям прироста воссавшихся аминокислот – от отсутствия изменений до увеличения на 7%. Обычно отмечали прирост доступности цистеина, треонина, серина, пролина и глицина, тогда как изменение доступности метионина, аргинина и глутаминовой кислоты проявлялось слабо (Adeola. Cowieson, 2011).

Сравнение переваримости бройлерами протеина из пшеницы и кукурузы показало, что истинная кишечная переваримость протеина пшеницы по 9 аминокислотам составила 80% и при добавлении фитазы возросла на 13,4%. Наибольший прирост отмечен по лизину – 17,6%, треонину – 16,9 %, изолейцину – 15,2% и гистидину – 15%; ниже средней величины наблюдалось увеличение фенилаланина – 9,4 % и лейцина – 9,5%. Переваримость протеина кукурузы была выше (87%), но средний прирост по анализируемым аминокислотам составил всего 3,9%. Наибольшее увеличение переваримости протеина кукурузы установлен по треонину – 7,3% и гистидину – 6,0%; по лизину прирост был ниже среднего (Rutherford et al., 2002). Интересно отметить, что в результате применения фитазы доступность аминокислот из пшеницы и кукурузы практически сравнялась, составив 93,4 и 90,9% соответственно. Увеличение доли доступных аминокислот в двух последних исследованиях не совпало по направленности изменений; в обоих случаях изменение концентрации доступных аминокислот не отражало состава протеина корма. На этом основании можно сделать вывод, что при использовании фитазы скармливание сбалансированного по аминокислотам корма приводило к изменению соотношения аминокислот, по сравнению с рассчитанным по инструкции производителя.

В другом исследовании эти же авторы на фоне рациона с пониженным уровнем фосфора установили, что общая переваримость протеина у бройлеров составила 85,6% и не изменялась под влиянием фитазы. В то же время доступность треонина возросла на 12,4, тирозина – на 6,7, изолейцина – на 6,5, гистидина – на 3,1%, при этом снизилась доступность цистеина на 2,8% (Rutherford et al., 2012). Если бы переваримость снижалась или возрастала под влиянием фитатов в результате ингибирования протеаз ЖКТ, то изменения концентрации аминокислот происходили бы пропорционально их содержанию в протеине. Так же не подходит для объяснения наблюдаемых изменений связывание фитатами (фитат-ионом) целых молекул белков корма, поскольку это также приводило бы к пропорциональным изменениям концентрации всех аминокислот. По нашему мнению, механизм действия фитатов, включающий в себя избирательное угнетение доступности отдельных аминокислот, может быть иным. Фитазы не участвуют в переваривании белка; наблюдаемые изменения обусловлены снижением доступности уже переваренных аминокислот, причём происходит это в соответствии с химическими особенностями аминокислот, вступающих в реакции с фитат-ионами и рН среды ЖКТ. При этом важную роль должен играть фактор времени, на протяжении которого может происходить взаимодействие реагирующих веществ. Вышеприведенные результаты свидетельствуют о значительной изменчивости доступности аминокислот при включении в корма фитаз. Ведущими специалистами в области изучения действия фитаз был проведен мета-анализ результатов исследований, опубликованных за период с 1996 по 2015 гг. по изучению влияния фитазы на переваримость протеина и доступность аминокислот у поросят (Cowieson et al., 2017a) и бройлеров (Cowieson et al., 2017b). Средняя переваримость протеина поросятами по 12-ти аминокислотам составила 77%, и она возросла на 2,6% при включении в рацион фитазы. Наибольший прирост доступных

аминокислот установлен по треонину – 3,8%, триптофану – 3,4%, фенилаланину – 3,0% и минимальный – по метионину – 2,0 (табл. 7)

Доступность изучаемых аминокислот у бройлеров, была выше – 81%, и под влиянием фитаз она возросла на 4,1%, то есть больше, чем у свиней. Более выражено увеличилась доступность цистеина – на 7,2 %, против +2% у свиней. Выше средней величины у бройлеров возросла доступность треонина – на 6%, изолейцина – на 4,6% и фенилаланина – на 4,6%. У свиней из перечисленных аминокислот только доступность треонина под действием фитаз выросла выше средней величины. У обоих видов животных совпало минимальное увеличение переваримого метионина. Авторы обращают внимание на значительные различия величин, приводимых многими исследователями, и предполагают, что это могло быть связано с различным содержанием фитатов в корме, возрастом животных, свойствами и дозами применяемых фитаз.

Таблица 7. Влияние фитазы на кажущуюся перевариваемость аминокислот у свиней и бройлеров

Аминокислоты	Свиньи (925 наблюдений)			Бройлеры (745 наблюдений)		
	Контроль	+Фитаза	Действие фитазы, %	Контроль	+Фитаза	Действие фитазы, %
Аргинин	84 (1,3)*	86 (1,2)	2.0 (0.75)	86 (1,2)	89 (0,9)	2,6 (0,77)
Лизин	78 (1,3)	80 (1,2)	2.6 (0.73)	83 (1,2)	86 (0,9)	3,4 (0,77)
Гистидин	77 (1,3)	78 (1,2)	2.4 (0.74)	80 (1,2)	84 (0,9)	3,9 (0,77)
Лейцин	79 (1,3)	81 (1,2)	2.6 (0.75)	82 (1,2)	85 (0,9)	3,9 (0,77)
Изолейцин	78 (1,3)	80 (1,2)	2.8 (0.75)	79 (1,2)	85 (0,9)	4,6 (0,77)
Метионин	81 (1,3)	81 (1,2)	0.9 (0.81)	89 (1,3)	90 (1,1)	1,3 (0,85)
Треонин	69 (1,2)	72 (1,2)	3.8 (0.73)	73 (1,2)	77 (1,0)	6,0 (0,78)
Триптофан	74 (1,5)	76 (1,4)	3.4 (1.02)	79 (1,6)	82 (1,5)	3,4 (1,09)
Фенилаланин	77 (1,3)	81 (1,2)	3.0 (0.75)	82 (1,2)	85 (0,9)	3,6 (0,77)
Валин	75 (1,3)	77 (1,2)	2.8 (0.75)	78 (1,2)	082 (0,9)	4,6 (0,77)
Тирозин	77 (1,3)	79 (1,2)	2.7 (0.79)	80 (1,2)	83 (1,0)	3,8 (0,80)
Цистеин	70 (1,4)	71 (1,3)	2.0 (0.86)	68 (1,4)	72 (1,3)	7,2 (0,96)
В среднем	77 (1,3)	79(1,2)	2.6 (0.78)	81 (1,2)	84 (1,0)	4,1 (0,78)

Примечание: адаптировано по: Cowieson et al. (2017a,б); *цифры в скобках обозначают величину стандартной ошибки.

Важно учесть вывод авторов о том, что повышение доступности аминокислот под действием фитаз будет проявляться при расщеплении не менее 30-40 % фитатов (Cowieson et al., 2017a), т.е. обращается внимание на количество расщеплённых фитатов, а не на активность фитазы. Это косвенно подтверждает выдвинутое нами предположение о том, что фитаты влияют не на переваримость протеина, а на уже переваренные аминокислоты, блокируя их доступность. Исходя из этого предположения, доступность аминокислот будет возрастать при увеличении в ЖКТ количества расщеплённых фитатов. Значения, приведенные в табл. 7, получены большей частью в исследованиях, проведённых на бройлерах до 2005 г., тогда как для свиней – после 2005 г., когда уже использовали более современные коммерческие препараты фитаз. Исходя из этого, они должны были активнее влиять на доступность аминокислот у свиней, однако в действительности, в связи с особенностями пищеварения у свиней, переваривание протеина у них ниже и действие фитаз слабее.

Различия по характеристикам фитаз, предлагаемых разными производителями, обусловлены такими свойствами препаратов, как устойчивость фитаз к действию протеаз в ЖКТ и скорость действия фитаз, однако эти параметры крайне редко учитывают. В публикуемых обзорах принято указывать на противоречивость публикуемых результатов, однако на сложившуюся ситуацию можно посмотреть с другой стороны – существуют не противоречивые результаты, а противоречивая их оценка. Получаемые в экспериментах результаты отражают действие на животных испытуемых веществ в конкретных условиях, которые могут отличаться, в том числе и по каким-то неизвестным (и не учитываемым)

факторам. Авторы настоящего обзора, цитируя публикации, используют выражение «переваримость протеина под влиянием фитаз», однако это повтор выражений, использованных в цитируемых работах. Считаем, что это ошибочное выражение, о чём было указано выше.

Дополнительно всосавшиеся аминокислоты являются источником энергии, т.е. они могут повышать ОЭ корма. Первые публикации о негативном влиянии фитатов на использование энергии появились в 1969 г. (Rojas, Scott, 1969), и только к началу текущего столетия начали систематически изучать влияние фитаз на использование энергии корма у птиц. Установлено, что при включении в рацион несущек 300 FTU/кг кормовой фитазы обменная энергия кукурузы увеличилась с 13,34 до 13,84, пшеницы – с 14,04 до 14,57 МДж/кг. Большинство работ проводили на цыплятах-бройлерах, которые, как и при изучении использования протеина, в одних случаях завершались положительными результатами, а в других – отсутствием эффекта. Обобщение исследований позволило прийти к выводу, что под влиянием различных дозировок фитаз и их использования на фоне кормов различного состава, средний прирост обменной энергии составляет 0,36 МДж/кг или 2,8% (Selle, Ravindran, 2007). Предполагают, что повышение использования энергии корма обусловлено увеличением переваримости жира, протеина и крахмала (Backer, 1998; Ravindran et al., 2000). Фитаты могут влиять на доступность крахмала, связываясь с белками, ассоциированными с крахмальными зёрнами, что будет снижать их переваримость (Thompson, 1988). В связи с методическими трудностями, эти предположения пока не нашли подтверждений *in vivo*. Фитаты являются ингибитором α -амилазы, поэтому не исключено положительное влияние фитазы в результате расщепления фитатов. Подтверждение этому приведено в критическом обзоре (Selle et al., 2000). Значительную вариабельность в улучшении использования энергии под влиянием фитазы связывают с источниками ферментов, различиями в составе рационов и возрастом животных (Onyango et al., 2005), однако ни в одном случае не раскрываются механизмы, сопровождающие проявление действия фитаз.

В заключение повторим, что единственной прямой функцией фитазы является расщепление фитатов, сопровождающееся повышением доступности фосфора в ЖКТ. Изучение механизма дефосфорилирования фитиновой кислоты позволило достичь прогресса в создании эффективных продуцентов фитаз с различными свойствами. Применение экзогенных фитаз сопровождается «экстрафосфорным» эффектом, который опосредован через их влияние на метаболизм фитатов. Механизмы влияния фитатов на обмен аминокислот в кишечнике изучены слабо, факты образования или расщепления фитатов в большинстве случаев установлены *in vitro*, указывая на возможность некоторых химических взаимодействий, но эти эффекты не всегда могут быть подтверждены на животных. Измерение активности фитаз стандартным методом отражает расщепление фитата натрия *in vitro*, но не характеризует эффективность их действия, которая зависит от состава фитатов, образующихся в ЖКТ, присутствующих минеральных соединений фосфора, а также от содержания других веществ в рационе.

Фитазы в кормлении животных

Первые попытки применения фитазы в качестве кормовой добавки были предприняты в Северной Америке в 1962 г. (Wodzinski, Ullah, 1996; Nelson, 1967). Обосновывая необходимость применения фитаз для кормовых целей, обычно указывают на слабую переваримость фитатов в ЖКТ у птицы и в связи с этим – на низкую доступность фосфора из растительных кормов. Для подтверждения этого довода ссылаются на работы, которые повторяются из одного обзора в другой (Maenz et al., 1999; Maenz, Classen, 1998; Abd El-Hack et al., 2018; Труфанов, 2011). Анализ имеющихся оригинальных работ и обзоров (Abd El-Hack et al., 2018) не всегда позволяет согласиться с этим утверждением. Так, доступность фосфора из пшеницы составляет 30,7%, и под влиянием кормовой фитазы она возросла на 16,1%, а из кукурузы (исходная доступность 33,2%) повысилась на 25,8% (Leske, Coon, 1999).

Добавленные фитазы обеспечивали прирост доступного фосфора из пшеницы и кукурузы на величину менее половины от исходного, т.е. не настолько много, по сравнению с влиянием эндогенных фитаз, чтобы считать их роль незначительной. Аналогичные данные были получены в разное время другими исследователями (Leske, Coon, 1999; Tamim et al., 2004; Zeller et al., 2015; She et al., 2017). В обзорах по использованию ферментов в кормлении целесообразность применения экзогенных фитаз считается не вызывающей сомнения (Maenz, 2001; Augspurger et al., 2007; Selle, Ravindran, 2007; Труфанов, 2011), однако следует учитывать активность фитаз, содержащихся в зерне, продуцируемых слизистой оболочкой кишечника и микрофлорой кишечника (Nys et al., 1996).

Для оценки значения фитаз в кормлении птицы проводили исследование на цыплятах кросса Росс 308, получавших сбалансированный по питательности комбикорм, приготовленный на основе кукурузы и соевого шрота, содержащий 1,1% кальция и 0,55% общего фосфора (Zeller et al., 2015). Бройлерам опытных групп в корм включали 3 различных препарата фитазы из расчёта 500 FTU/кг, активность которых была определена стандартным методом. В зобе корм находится ограниченное время, и на него не действуют пищеварительные ферменты, поэтому у птицы контрольной группы расщепление фитатов в зобе могло происходить только за счёт фитаз корма; оно составило 9% (табл. 8).

Таблица 8. Гидролиз мио-инозитол 1,2,3,4,5,6-гексакисдигидрогенфосфата в различных отделах ЖКТ у бройлеров, %

№ п.п.	Отделы ЖКТ	Подопытные группы ^а			
		ОР	Phy A	Phy E1	Phy E2
1	Зоб	9	64	31	44
2	12-ти перстная + тощая кишки	59	63	65	88
	Уменьшение фитатов: п. 2 к п. 1 ^б	50	+1	34	44
3	Подвздошная кишка	74	74	79	82
	Уменьшение фитатов: п. 3 к п. 2 ^б	15	11	14	+6
4	Слепые кишки	91	93	98	96
	Уменьшение фитатов: п. 4 к п. 3 ^б	17	19	19	14

Примечания: адаптировано по: Zeller et al. (2015). ^а Группы: ОР основной рацион; Phy A: ОР + 3-фитаза, *Aspergillus niger*, Finase P; Phy E1: ОР + 6-фитаза, Quantum, *E. coli*; Phy E2: ОР + 6-фитаза, Quantum Blue *E. coli*. ^б Расчёт авторов настоящего обзора.

У цыплят контрольной группы (ОР) от зоба до конца тощей кишки под действием эндогенных фосфатаз, секретируемых слизистой оболочкой кишечника, расщеплялась подавляющая часть фитатов – 59%. Количество переваренных фитатов определяли по концентрации высвобожденных ионов фосфора. В подвздошной кишке и слепых отростках гидролиз оставшейся части ФК распределялся поровну. В зобе гидролиз фитатов активно протекал под действием фитазы PhyA, составив 64%, в 2 раза слабее действовала PhyE1, PhyE2 расщепляла 44% фитатов. В двенадцатиперстной кишке фитаза Phy A не проявляла активности, в подвздошной кишке распалось ещё 11% фитатов и почти в 2 раза больше – в слепых отростках. Фитазы Phy E1 и Phy E2 продолжали гидролиз фитатов в тонком кишечнике. До начала подвздошной кишки под действием Phy E1 переварилось 65% фитатов, под влиянием Phy E2 количество переваренных фитатов составило 88%. В слепых кишках количество фитатов уменьшалось примерно одинаково и, вероятно, было обусловлено действием фитаз кишечной микрофлоры. Общая доля гидролизованных фитатов в слепых отростках достигла максимума – 91-98%, при этом различия между действием ферментов были несущественными, однако этого недостаточно для признания равноценности их действия.

Если учесть, что в контрольной группе переваривалось 91% фитатов, то можно ставить под сомнение целесообразность применения экзогенных фитаз или предполагать возможность методических погрешностей в опыте. Следует напомнить, что расщепление фитатов в нижних отделах ЖКТ, хотя и ведёт к освобождению фосфатов, но всасывание их ограничено, так как они могут вступать в реакцию с двухвалентными металлами, образуя соли с низкой

растворимостью. У бройлеров, не получавших фитазы (OP), концентрация исходного IP6 в содержимом зоба составляла 14,49 мкмоль/г сухого вещества, под влиянием фитаз PhyA, PhyE1, PhyE2 она снизилась на 60, 25 и 40% соответственно. Анализ объединённого содержимого железистого и мышечного желудков, показал, что уровень исходного IP6 в результате действия PhyA, PhyE1 и PhyE2 снизился до 34,2, 15,3 и 5,1%, т.е. под влиянием PhyE2 фитаты практически полностью подверглась первой стадии дефосфорилирования в желудке. Концентрация следующих по антипитательному действию эфиров – IP5, образующихся в результате действия фитаз, была незначительной, составляя 0,76, 0,82 и 0,38 мкмоль/г СВ (Zeller et al., 2015). Полученные данные по общему перевариванию фитатов в целом согласуются с данными, ранее опубликованными другими авторами (Tamim, Angel 2003; Tamim et al., 2004; Leytem, 2008).

Высокая скорость расщепления фитатов в зобе имеет принципиальное значение, поскольку протеин и крахмал в нём практически не перевариваются, а фитаты в результате расщепления теряют способность проявлять антипитательные свойства, которые проявляются в кишечнике. Фитаты корма при pH зоба слаборастворимы, поэтому не все фитазы могут их расщеплять. Оставшаяся часть фитатов имеет меньшую возможность для связывания с белками или кальцием из известняковой муки. Изучение проявления активности фитаз в ЖКТ имеет важное научное значение для обоснования создания новых препаратов фитаз, но не позволяет судить о потенциальном влиянии фитаз на доступность фосфора в целом. Однако если вернуться к антипитательному действию фитатов, то приобретает важность не количество освобождённого фосфора, а скорость отщепления фосфора и локализация этого процесса. Считают, что между 6-фитазами и 3-фитазами существует значительная разница (Wyss et al., 1999; Greiner et al. 2000, 2001). 3-фитаза не полностью дефосфорилирует молекулу фитата, тогда как 6-фитаза может гидролизовать IP6 до мио-инозитола (Wodzinski, Ullah, 1996). Позднее пришли к заключению, что фосфатная группа в положении С-2 устойчива к дефосфорилированию фитазами. Независимо от их бактериального, грибкового или растительного происхождения, большинство кислых гистидиновых фитаз высвобождают пять фосфатных групп фитата, при этом конечным фосфатным эфиром мио-инозитола остаётся мио-инозитол(2)монофосфат (Greiner, Konietzny, 2010).

При одинаковой активности фитаз, которая определяется по освобождённому фосфору, количество расщеплённых IP6 и IP5 с участием 3-фитазы и 6-фитазы будет различаться. Оставшиеся после первых этапов дефосфорилирования низшие фосфорные эфиры инозитола (IP4 - IP1) обладают слабым хелатирующим действием (Luttrell, 1993) и не образуют связей с аминокислотами или белками, что исключает антипитательное действие. В кале обнаруживаются преимущественно исходный IP6 и совсем незначительное количество эфиров инозитола с меньшим числом фосфатных групп (Rapp et al., 2001). На этом основании считают, что узким местом в расщеплении фитатов является инициация отщепления первой фосфатной группы (Blaabjerg et al., 2011), поскольку метаболиты ФК с меньшим содержанием фосфора не накапливаются, т.е. легко подвергаются расщеплению. С точки зрения физиологии пищеварения, с этим выводом можно согласиться, однако с учётом кинетики дефосфорилирования IP6 *in vitro* при использовании в качестве субстрата фитата натрия и в отсутствие продуктов пищеварения, вызывающих вторичное образование фитатов (Qvirist et al., 2015), пришли к выводу, что узким местом в цепи дефосфорилирования инозитолгексафосфата было отщепление фосфатной группы от инозитолтетрафосфата. К этому же заключению можно прийти на основании анализа результатов, полученных на цыплятах, получавших корма с разным уровнем фитазы (Besson et al., 2017).

Изучение действия кормового ферментного препарата на бройлеров кросса Росс в количестве 600 FTU/кг показало, что активность проявлялась в разной степени в отношении ингредиентов рациона (Leske, Coon, 1999). В сопоставимых условиях эксперимента эндогенные фитазы переваривали примерно одинаковую долю фитатов из разных видов зерна – 30,7-32,2% и немного больше из соевого и рапсового шротов (табл. 9). Не исключено, что

лучшее расщепление фитатов из шротов обусловлено денатурацией протеина в результате их термической обработки в процессе производства. На фоне близких значений активности эндогенных фитаз, проявление действия экзогенной фитазы отчётливо зависело от вида зерна и шрота. Отложение фосфора в организме из изучаемых видов зерна без применения экзогенной фитазы различалось в 1,2-2,5 раза, несмотря на одинаковую долю переваренных фитатов.

Таблица 9. Переваримость фитатов и использование фосфора корма бройлерами кросса Росс 25 -27-дневного возраста из различных кормовых ингредиентов*

Ингредиенты ^a	В испытуемом рационе, %		Переваримость фитатов, % (ОР/ОР+фитаза)	Использование Р корма, % (ОР/ОР+фитаза)	
	Доля компонента	фосфора общего фитатного			
Пшеница ^a	59,99	0,222	0,198	30,7/46,8 ^b	16,0/33,8
Кукуруза ^a	60,0	0,177	0,143	30,8/59,0 ^b	34,8/40,9
Ячмень ^a	59,99	0,222	0,168	32,2/71,3 ^b	40,3/55,5
Соевый шрот ^a	29,995	0,215	0,112	34,9/72,4 ^b	27,0/58,0
Рапсовый шрот ^a	29,995	0,341	0,241	36,7/55,8 ^b	39,4/45,7
Отруби пшеничные. ^a	29,995	0,396	0,350	29,1/52,2 ^b	31,9/43,4

Примечания: ^aадаптировано по: Leske, Coon (1999). ^bДругие ингредиенты рациона не содержали фитатов (казеин, крахмал) ^bОР/ОР + фитаза: 1-я цифра – ОР рацион без фитазы; 2-я – рацион с включением 600 FTU фитазы /кг.

Сравнивая усвоение фосфора из пшеницы, ячменя и соевого шрота, можно видеть, что оно не зависело от содержания общего и фитатного фосфора в рационе. Включение в рацион фитазы в количестве 600 FTU/кг повысило переваримость фитатов пшеницы на 16,1%, кукурузы – на 28,2% и ячменя на 39,1% и уменьшило различия по использованию фосфора. Различия в расщеплении фитатов могли быть вызваны их составом или разным пространственным расположением молекул фитатов в корме и наличием других веществ, ограничивающих доступность фитазы к субстрату. Однако при этом возникает вопрос о причинах одинаковой относительной активности эндогенных фитаз, с учётом данных о высокой активности фитазы в пшенице и низкой – в кукурузе (табл. 1). Наши расчёты показали, что под влиянием эндогенных фитаз из кукурузы высвобождалось 440 мг/кг Р. Включение в рацион фитазы дополнительно освободило 403 мг/кг фосфора. В пшенице, содержащей больше фитатов, эндогенные фитазы освобождали 608 мг/кг фосфора. Добавление в рацион фитазы увеличило отщепление фосфора от фитатов на 319 мг/кг. На кукурузу активнее действовала экзогенная фитаза, так как при меньшем содержании фитатов она освободила 320 мг/кг Р – такое же количество, как из пшеницы. В соевом шроте содержание общего фосфора было таким же, как в пшенице и ячмене, но концентрация фитатного фосфора была существенно ниже, при этом под действием экзогенной фитазы дополнительно высвобождалось 420 мг/кг Р, почти как и из кукурузы. Проведенные расчёты позволяют заключить: 1) Действие экзогенной фитазы не зависело от количества фитатов в корме. 2). На активность добавленной фитазы не влияли фитазы, продуцируемые организмом. 3). Нефитатный фосфор в зерне в пределах величин, сложившихся в опыте, не угнетал действия фитаз.

При выборе препаратов фитазы в практических условиях её действие целесообразно оценивать по величине переваримости, которая определяется в обычных балансовых опытах и отражает количество фосфора, отложенного в теле. В величинах, полученные при использовании этого метода, не входят эндогенные поступления фосфора в ЖКТ, поэтому с физиологической точки зрения они не отражают полную переваримость (стандартизованную). В отношении наиболее изученных компонентов корма – кукурузы и соевого шрота, можно отметить, что крайние значения доступности фосфора из кукурузы различаются в 1,8 раза (табл. 10).

Добавление к кукурузе фитазы не только существенно повысило переваримость фитатов, но и сократило относительные различия между крайними значениями, что свидетельствует об уменьшении различий по качеству между зерном с разными исходными характеристиками. Применение фитазы при использовании соевого и рапсового шротов сократило различие между ними по доступности фосфора до 10%. Выше показано (табл. 9), что действие фитаз *in vivo* существенно различалась как по влиянию на долю переваренных фитатов, так и на количество усвоенного фосфора.

Таблица 10. Влияние фитазы на доступность фосфора из различных кормов для свиней*

Ингредиенты	Кажущаяся переваримость в ЖКТ (ATTD)		Стандартизированная переваримость в ЖКТ (STTD)	
	Без фитазы	+ фитаза	Без фитазы	+ фитаза
Кукуруза	19.9–36.4	42.5–57.8	26.4–42.5	50.2–64.4
Кукурузный глютен	80.7	83.1	84.6	87.1
Кукурузный зародыш	49.0	64.4	53.2	68.3
Пшеница	30,7** - 51.5	46,8**	56.9	н. д
Ячмень	32,2**	71,3**		
Пшеничные отруби	57.4	н. д	62.8	н. д
Рапсовый шрот (канола)	41.52–47.32	64.08–68.05	45.3–51.2	63.6–72.1
Соевый шрот	41.6–56.3	66.2–72.5	46.1–62.0	71.4–78.0
Подсолнечный шрот	33.0	55.4	37.4	59.8
Мясо-костная мука	52.1–80.1	н. д	54.8–84.4	н. д
Сухая молочная сыворотка	84.3	н. д	91.2	н. д
Монокальцийфосфат	88.0	н. д	94.9	н. д
Дикальцийфосфат	81.5	н. д	88.4	н. д

Примечания: *адаптировано по: She et al. (2017); ** Leske, Coon (1999); н.д – нет данных.

Таким образом, активность, указанная производителем препарата фермента, не совпадает с действием его на натуральные компоненты и, к тому же, значительно различается при использовании различных видов зерна.

На действие фитаз оказывают влияние металлы, которые присутствуют в корме, среди них наибольшую роль играют кальций и цинк, которые являются обязательными компонентами кормов. Комплекс ФК и кальция обладает меньшей стабильностью, по сравнению с другими соединениями ФК с металлами (Cheryan 1980); тем не менее, кальций, потребляемый с кормом, играет ведущую роль в снижении действия как экзогенных, так и эндогенных фитаз. Как отмечено выше, количество кальция, добавляемого в рацион птицы, в 10-40 раз больше, чем цинка, образующего наиболее прочные комплексы с ФК, поэтому его действие в результате высокой концентрации оказывается преобладающим, несмотря на меньшее сродство к ФК. При одновременном присутствии в среде двух катионов, например Ca + Mg (или Zn, Fe, Cu и другие), увеличивается образование нерастворимых комплексов инозитол-6фосфат-металл (Simpson, Wise, 1990). Показано, что фитаза, продуцируемая *A. niger* ингибируется ионами меди и цинка (Dvořáková et al., 1997). В другом исследовании не было отмечено влияния ионов кальция, магния, марганца и цинка на действие фитазы, полученной из *A. ficum* (Zhang et al., 2010). Изучая влияние разной концентрации фитата натрия – от 1 до 7 мМ и кальция – от 1 до 15 мМ на проявление активности фитазы, установили, что при концентрации 1-2 мМ кальция в среде активность не обнаруживалась. Увеличение концентрации кальция до 5 и 7 мМ привело к небольшому росту активности при содержании в среде 1 мМ фитата натрия; при увеличении его концентрации активность падала. Увеличение концентрации кальция до 10, 12 и 15 мМ последовательно повышало активность, причём максимум активности сдвигался в сторону увеличения уровня фитата натрия до 2 и затем 4 мМ. Дальнейший рост концентрации субстрата приводил к снижению активности фермента (Trah, 2010). Таким образом, активность фитазы зависела от концентрации в среде кальция и фитатов. Этим экспериментом показано существование

зависимости активности фитазы от концентрации кальция, которая в условиях организма будет проявляться с разными количественными характеристиками.

На цыплятах-бройлерах, получавших комбикорм, приготовленный на основе кукурузы и соевого шрота, не содержащий минеральных источников кальция и фосфора, установлена высокая переваримость фитатов эндогенными фитазами (табл. 11). Увеличение содержания кальция в корме с 0,18 до 0,68% привело к падению гидролиза фитатов с 69,2 до 25,4%, однако добавление в корм 500 FTU/кг 3-фитазы (А) или 6-фитазы (В) отчетливо и, практически, одинаково повысило долю переваримых фитатов и отложенного в организме фосфора и кальция (Tamim et al., 2004). Приведенные данные позволяют сделать вывод, что 3- и 6- фитазы слабо повышали переваримость фитатов (3-й и 4-й группы против 1-й), однако этот вывод относится к ситуации с низким содержанием кальция в корме. На фоне рациона, дефицитного по кальцию (0,18%), степень увеличения его использования под влиянием фитазы была выше, чем фосфора.

Таблица 11. Влияние фитазы и кальция на усвоение фосфора 24-дневных бройлеров*

№ П.п	Добавлено в рацион		Переварено фитатов ^а , %	Отложилось в организме, %	
	кальция, %	фитазы, FTU/кг		фосфора	кальция
1	0	0	69,2	67,9	33,6
2	0,5	0	25,4	29,4	46,3
3	0	500 А ^б	79,5	75,1	48,9
4	0	500 В ^с	76,2	71,0	41,5
5	0,5	500 А	58,9	50,4	58,9
6	0,5	500 В	44,9	46,5	58,1

Примечание: *адаптировано по: Tamim et al. (2004). По результатам анализов в основном рационе содержалось: ^а 2950 мг/кг фосфора из фитатов; 3812 мг/кг общего фосфора; 0,18% кальция. ^б А-3- фитаза (Натуфос 10000 G); ^с В-6-фитаза (Ронозим Р) (СТ).

В описанном исследовании в рационах без добавки минеральных кормов отношение кальция к общему фосфору составляло 0,5 и после включения в корм углекислого кальция оно повысилось до 1,8. Действие добавленных фитаз было более выражено на фоне повышенного уровня кальция к общему фосфору (группы 5, 6 против 2-й).

В другом опыте при увеличении содержания кальция в корме бройлеров с 5,2 до 9,7 г/кг, включавшего 1000 FTU фитазы/кг, максимальный рост птицы наблюдали при скармливании корма с содержанием кальция 6,6 г/кг и фосфора 5,0 г/кг. Наибольшая концентрация золы, кальция и фосфора установлена в костях у цыплят, потреблявших корма с максимальными количествами кальция (Kim et al., 2017). Из результатов наблюдения следует, что для максимального отложения фосфора в костях и максимального роста требуются корма с различным отношением Са/Р. Снижение отношения Са/Р до 1,3:1 не оказало отрицательного влияния на рост цыплят. Учитывая достижения генетики птицы и применение более активных и стабильных препаратов фитазы, пришли к выводу, что отношение Са/Р, равное 1,4 можно считать хозяйственно приемлемым (Qian et al., 1997).

Для изучения влияния фитазы и уровня минеральных фосфатов в корме на переваримость фитатов и усвоение фосфора было проведено 3 опыта (Manangi, Coon, 2008). В 1-ом опыте увеличение в корме дозы фитазы до 750 и 1000 FTU/кг повышало переваривание фитатов с 43 до 85% и почти полностью они расщеплялись при добавке 2000-5000 FTU фитазы /кг (табл. 12).

В пределах испытанных доз фитазы, переваривание фитатов в расчёте на 100 FTU снижалась с ростом дозы фитазы, включённой в корм. Максимальное отложение фосфора в теле наблюдалось при включении в корм фитазы в дозе 1000 FTU/кг.

Во 2-м опыте добавление в корм 0,05% фосфора за счёт неорганического источника (дикальцийфосфат, ДКФ) привело к активации эндогенных фитаз. Дальнейшее повышение в корме концентрации неорганического фосфора не улучшило переваримости фитатов, но

снижало относительную долю ретенции общего фосфора. На этом же фоне включение в корм фитазы в количестве 1000 FTU/кг в несколько раз повышало гидролиз фитатов, причём с увеличением дозы добавленного ДКФ действие фитазы снижалось.

В 3-м опыте скормливание корма без добавки ДКФ в отсутствие экзогенной фитазы наблюдали максимальную переваримость фитатов и долю удержанного в теле фосфора. Минимальная добавка фосфора за счёт ДКФ сопровождалась 2,5-кратным снижением переваримости фитатов. Дальнейшее увеличение дозы ДКФ в корме продолжало угнетать гидролиз фитатов эндогенными фитазами, хотя это мало влияло на долю фосфора, отложенного в теле, кроме максимальной дозы.

*Таблица 12. Влияние фитазы, фитатного и неорганических источников фосфора на его использование**

Опыт 1. Содержание в рационе Са – 0,7%; общего Р – 0,4%; в т.ч. фитатного – 0,28%									
Добавлено фитазы, ед./кг	0,0	250	500	750	1000	1500	2000	5000	
Переварено фосфора из фитатов, %	43,1	68,1	74,7	85,0	85,3	92,8	96,9	99,5	
Дополнительно переварено фосфора из фитатов, %	-	25,0	31,6	41,9	42,1	49,7	53,8	56,3	
фосфора из фитатов, мг/кг	-	700	885	1173	1179	1392	1506	1576	
Переварено фосфора, на 100 ед, мг/кг	-	280	177	156	118	93	75	32	
Отложено фосфора в теле, %	38,81	46,20	52,24	48,58	67,30	55,96	62,21	55,45	
Опыт 2. Содержание в основном рационе кальция – 0,5%, общего Р – 0,25%, в т.ч. фитатного – 0,17%									
Добавлено минерального фосфора, %	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	
Содержится общего фосфора, %	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50	0,55	0,60	
Переварено фитатов и отложено фосфора в теле, %									
Переварено фитатов без фитазы, %	8,5	27,6	26,4	28,9	26,3	17,1	21,0	27,7	
Отложено фосфора в теле, %	35,0	51,7	51,7	59,3	51,3	50,9	43,5	41,1	
Переварено фитатов с фитазой, %	80,9	75,9	73,5	72,2	68,4	71,6	58,3	62,5	
Дополнительно переварено фитатов, %	-	48,3	47,1	43,3	42,1	54	37,3	34,8	
мг/кг	-	821	801	736	715	-	634	592	
Отложено фосфора в теле, %	71,9	65,8	69,5	61,2	57,6	42,9	41,1	39,8	
Опыт 3. Содержание в основном рационе кальция – 0,9%, общего Р – 0,25%, в т.ч. фитатного – 0,17%									
Добавлено минерального фосфора, %	-	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	
Переварено фитатов без фитазы, %	49,2	19,6	16,0	8,0	9,4	2,1	4,0	4,2	
мг/кг	840	330	300	140	160	40	70	70	
Отложено фосфора в теле, %	51,8	45,0	53,8	48,4	49,9	54,0	51,1	41,0	
мг/кг	2100	1400	1900	1900	2200	2700	2800	2500	
Переварено фитатов с добавкой фитазы, %	85,3	76,1	70,0	76,1	62,6	68,6	67,4	63,7	
г/кг	1500	1300	1200	1300	1100	1200	1200	1100	
Дополнительно переварено фитатов, %	36,1	56,5	54,0	68,1	53,2	66,5	63,4	59,5	
мг/кг	614	961	918	1158	904	1130	1146	1083	
Отложено фосфора в теле, %	67,5	59,1	67,9	64,0	63,9	55,0	51,9	49,3	
г/кг	1700	1800	2400	2600	2900	2800	2800	3000	

Примечание: *рассчитано по данным Manangi, Coon (2008).

Наибольшее абсолютное отложение фосфора в теле было достигнуто при включении в корм 0,25-0,30% фосфора за счёт ДКФ. Включение в корм, содержащий 0,9% кальция, 1000 FTU фитазы /кг на фоне всех добавок ДКФ в несколько раз повышало расщепление фитатов. В условиях опыта 1000 FTU/кг эквивалентны 0,09-0,10% дополнительного доступного фосфора. Результаты 3-го опыта позволяют объяснить низкую переваримость фитатов, о которой сообщают в некоторых публикациях. Так, включение в корм характерного для практики количества фосфора в составе минеральных источников в количестве 0,25-0,35% на фоне добавленной фитазы, приводило к снижению переваримости фитатов с 49,2% до 2,1-4,1%. Наш анализ представленных данных позволяет заключить, что при содержании в корме бройлеров, рекомендуемого уровня кальция, с увеличением доли добавленного минерального источника фосфора (ДКФ) выше 0,25% приводит к угнетению эндогенных фитаз вплоть до незначительного уровня их активности. В связи с этим для обеспечения организма фосфором

в рационы необходимо включать кормовые препараты фитазы или повышать количество минерального фосфора, добавляемого в корм, до уровня 0,40-0,45%. Сравнение групп цыплят с совпадающим соотношением Ca/P, равным 1,5 и 2,0 выявило угнетение действия фитаз, особенно эндогенных при повышении содержания кальция в корме, тогда как доля отложенного в теле фосфора изменялась мало.

Принимая во внимание результаты вышеописанных опытов (табл. 12), можно предположить, что результаты, представленные в табл. 9, имеют ограниченное значение, так как они отражают результаты, связанные с конкретными условиями опыта и будут изменяться в зависимости от содержания в рационе минеральных веществ и свойств применяемых фитаз (табл. 11). Реакция на добавленную фитазу будет выше у птицы, получающей корма с субдефицитным или дефицитным содержанием фосфора (Driver et al. 2005). Разработана вычислительная модель, учитывающая интенсивность роста при различных концентрациях кальция и фосфора в зависимости от дозы используемой фитазы (Le'tourneau-Montminy et al., 2010). В практических условиях максимальная интенсивность роста цыплят и степень минерализации костей не всегда совпадают, поэтому необходимо принимать во внимание соотношение этих показателей, чтобы достижение оптимальной минерализации костей не наносило ущерба продуктивности.

Изучение влияния уровня кальция в корме на использование фосфора из фитатов проводится уже на протяжении полувека (Taylor, 1965; Abd El-Hack et al., 2018). Проблема рассматривается в ряде научных обзоров (Abd El-Hack et al., 2018; Le'tourneau-Montminy et al., 2010; Selle, Ravindranan, 2007; Ravindranan et al., 1995; Труфанов, 2011). Это свидетельствует о существовании нерешённых задач, число которых, несмотря на достижения, возросло в связи с широким распространением фитазы и появлением новых коммерческих продуктов (Zhang et al., 2010).

Заключение

Начиная с 1960-х гг., всё большее внимание привлекает использование фитазы в качестве кормовой добавки, особенно в 90-х гг., когда в западноевропейских странах был наложен запрет на использование в кормлении животных мясной и мясокостной муки; одновременно произошло подорожание минеральных источников фосфора, что создало условия для востребованности кормовых препаратов фитазы. Обнаружение «экстрафосфорного» влияния фитазы и широкое распространение препаратов фермента привело к тому, что её назвали «чудодейственный фермент 1990-х годов». Выявление экстрафосфорного эффекта не является неожиданным, поскольку фосфор является антиподом антипитательного действия фитатов. Гидролитическое расщепление части фитатов ведёт к уменьшению количества соединений, обладающих антипитательным действием. К настоящему времени количество публикаций, посвящённых изучению действия фитаз, в англоязычной литературе превышает число публикаций по изучению всех остальных кормовых ферментов и достигает нескольких тысяч.

Во всех оригинальных работах и обзорных статьях авторы констатируют, что применение фитазы ведёт к повышению доступности аминокислот и энергии корма. Это вытекает из результатов балансовых опытов, которые рассчитываются по разнице между потреблённым и выделенным количеством вещества. Увеличение разницы обычно объясняют повышением доступности аминокислот в результате увеличения количества переваренного протеина. Однако разница может повыситься при прежней переваримости в результате снижения выделенного. Результаты анализа публикаций ставят под сомнение первое объяснение и позволяют склониться ко второму, если принять, что фитаза не обладает протеолитическим действием. На основании работ, в которых изучали прирост доступных аминокислот, нельзя заключить о повышении переваримости протеина. Если бы фитаза каким-либо образом повышала переваримость протеина, то прирост доступных аминокислот

отражал бы состав общего протеина или, в крайнем случае, его дополнительно переваренной части, но ни в одной из опубликованных работ это не находит подтверждения.

Авторы настоящего обзора выдвигают предположение о том, что фитаты вступают в химическое взаимодействие с аминокислотами или пептидами, образуясь после переваривания белка, и превращают их в недоступные для всасывания соединения, что подтверждается исследованиями *in vitro*. Предлагаемое объяснение не влияет на результаты балансового опыта, но позволяет интерпретировать наблюдения с точки зрения взаимодействия переваренных аминокислот с фитатами. Исходя из этого, просматривается другой вывод – разрушение фитатов должно происходить в организме как можно раньше до начала переваривания и растворения белка, то есть до образования веществ, способных вступать в реакцию с фитатами. У птицы органом, в котором протекает этот процесс, является зоб и желудки, у свиней – только желудок. Для гидролиза вновь образовавшихся фитатов (ФК-аминокислота) необходимы фитазы, которые активны в среде тонкого кишечника при pH 6-7. В результате связанные аминокислоты будут повторно высвобождены и доступны для всасывания. Вероятно, этот процесс не играет существенной роли при гидролизе фитатов в слепых отростках птицы, где всасывание аминокислот и фосфатов уже ограничено. Предполагаемый авторами обзора механизм антипитательного действия фитатов косвенно подтверждается множеством фактов. Разработка новых препаратов фитаз с учётом предлагаемого объяснения, позволит создать более эффективные кормовые препараты.

REFERENCES

1. Abd El-Hack M.E., Alagawany M., Arif M., Emam M., Saeed M., Arain M.A., Siyal F.A., Patra A., Elnesr S.S., Khan R.U. The uses of microbial phytase as feed additive in poultry nutrition: A review. *Ann. Anim. Sci.* 2018, 18: 639-658.
2. Akter M., Iji P.A., Graham H. Increasing zinc levels in phytase-supplemented diets improves the performance and nutrient utilization of broiler chickens. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 2017, 47: 648- 660.
3. Anderson P.A. Interactions between proteins and constituents that affect protein quality. In: *Digestibility and Amino Acid Availability in Cereals and Oilseeds* (J.W. Finley and DT Hopkins, eds). St Paul, MN: Am. Ass. Cer. Chem., Inc., 1985, P. 31-45.
4. Augspurger N.R., Webel D.M., Baker D.H. An *Escherichia coli* phytase expressed in yeast effectively replaces inorganic P for finishing pigs and laying hens. *J. Anim. Sci.* 2000, 85: 1192-1198.
5. Baker D.H. Beyond phosphorus: phytase effects on protein, energy and trace-mineral utilization of swine and poultry. In: *BASF Technical Symposium*. NJ, BASF Corporation, Mount Olive, 1998: 48-62.
6. Bedford M.R. New enzyme technologies for poultry feeds. *Br. Poult. Sci.* 2003, 44 (Suppl. 1): S14-S16.
7. Beeson L.A., Walk C.L., Bedford M.R., Olukosi O.A. Hydrolysis of phytate to its lower esters can influence the growth performance and nutrient utilization of broilers with regular or super doses of phytase. *Poultry Science*. 2017, 96: 2243-2253.
8. Caldwell R.A. Effect of calcium and phytic acid on the activation of trypsinogen and the stability of trypsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1992, 40: 43-46.
9. Champagne E.T., Fisher M.S., Hinojosa O.N. MR and ESR studies of interactions among divalent cations, phytic acid, and N-acetyl-amino acids. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 1990, 38: 199-215.
10. Cheryan M. Phytic acid interactions in food systems. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1980, 13: 297-335.
11. Chu H.-M., Guo R.-T., Lin T.-W., Chou C.-C., Shr H.L. Structures of *Selenomonas ruminantium* phytase in complex with persulfated phytate: DSP phytase fold and mechanism for sequential substrate hydrolysis. *Structure*. 2004, 12: 2015-2024.
12. Costello A.J.R., Glonek, T., Myers, T.C. ³¹P-nuclear magnetic resonance-pH titrations of myo-inositol hexaphosphate. *Carbohydrate Resource*. 1976, 46: 159-171.
13. Cowieson A.J., Acamovic T., Bedford M.R. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 2004, 45: 101-108.
14. Cowieson A.J., Acamovic T., Bedford M.R. Phytic acid and phytase: implications for protein utilization by poultry. *Poultry Science*. 2006, 85: 878-885.

15. Cowieson J., Ravindran V. Effect of phytic acid and microbial phytase on the flow and amino acid composition of endogenous protein at the terminal ileum of growing broiler chickens. *Br. J. Nutr.* 2007, 98: 745-752.
16. Cowieson A., Ruckebusch J. P., Sorbara J.O.B., Wilson J.W., Guggenbuhl P., Tanadini L., Roos F. A systematic view on the effect of microbial phytase on ileal amino acid digestibility in pigs. *Animal feed science and technology.* 2017a, 231: 138-149.
17. Cowieson A.J., Ruckebusch J.P., Sorbara. J.O.B., Wilson J.W., Guggenbuhl P., Roos F.F. A systematic view on the effect of microbial phytase on ileal amino acid digestibility in broiler. *Animal Feed Science and Technology.* 2017b, 225: 182-194.
18. Dersjant-Li Y., Awati A., Schulze H., Partridge G. Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *J. Sci. Food Agricult.* 2015, 95: 878-896.
19. Driver J.P., Pesti G.M., Bakalli R.I. Edwards J.H.M. Effects of calcium and nonphytate phosphorus concentrations on phytase efficacy in broiler chicks. *Poultry Sci.* 2005, 84: 1406–1417.
20. Dvorakova J., Volfova O., Kopecky L. Characterization of phytase produced by *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol.* 1997, 42: 349-352.
21. Dzhouns G. [How to choose the best phytase in the diet]. *Tsenovik. Sel'skokhozyaistvennoe obozrenie - Price tag. Agricultural Review.* 2014, 10: 102-103. (In Russian)
22. Elkhail E.A.I., Männer K., Borriss R., Simon O. In vitro and in vivo characteristics of bacterial phytases and their efficacy in broiler chickens. *British Poultry Science.* 2007, 48: 64-70.
23. Fandrejewski H., Raj S., Weremko D., Zebrowska T. Apparent digestibility in experimental feeds and the effect of commercial phytase. *Asian-Australasian Journal of Animal Science.* 1997, 10: 665-670.
24. Godoy S., Chicco C., Meschy F., Requena F. Phytic phosphorus and phytase activity of animal feed ingredients. *Interciencia.* 2005, 30: 24-28.
25. Gonçaves M.A.D., Dritz S.S., Tokach M.D., Tokach M.D., DeRouchey J.M., Woodworh J.C., Goodband R.D. Fact sheets – comparing phytase sources for pigs and effects of superdosing phytase on growth performance of nursery and finishing pigs. *Journal of swine health and production.* 2016, 24: 97-101.
26. Greiner R., Carlsson N.G. Alminger M.L. Stereospecificity of myo-inositolhexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of *Escherichia coli*. *J. Biotechnology.* 2000, 84: 53-62.
27. Greiner R., Alminger M.L., Carlsson N.G. Stereospecificity of myo-inositolhexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of baker's yeast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2001, 49: 2228-2233.
28. Greiner R., Konietzny U., Jany Kl-D. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1993, 303:107-113.
29. Grynspan F., Cheryan M. Calcium phytate: effect of pH and molar ratio on in vitro solubility. *Journal of the American Oil Chemists Society.* 1983, 60: 1761-1764.
30. Ha N.-C., Kim Y.-O., Oh T.-K., Oh B.-H. Preliminary X-ray crystallographic analysis of a novel phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* strain. *Acta Crystallogr. Biol. Crystallogr.* 1999, 55: 691-693.
31. Hegeman C.E., Grabau E.A. A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings. *Plant Physiol.* 2001, 126: 1598-1608.
32. Honig D.H., Wolf W.J., Rackis J.J. Phytic acid and phosphorus content of various soyabean protein fractions. *Cereal Chemistry.* 1984, 61: 523-526.
33. Hu H.L., Wise A., Henderson C. Hydrolysis of phytate and inositol tri-, tetra-, and penta-phosphates by the intestinal mucosa of the pig. *Nutrition Research.* 1996, 16: 781-787.
34. Jongbloed A.W., Kemme P.A. Effect of pelleting mixed feeds on phytase activity and the apparent absorbability of phosphorus and calcium in pigs. *Animal Feed Science and Technology.* 1990, 28: 233-242.
35. Jongbloed A.W., de Jonge L., Kemme P.A., Mroz Z., Keis A.K. Non-mineral related effects of phytase in pig diets. *6th Forum on Animal Nutrition.* Ludwigshafen: BASF Publ., 1997, P. 92-106.
36. Jorquera M., Martinez O., Varuyama F., Marschner P., Mora M. Current and future biotechnological applications of bacterial phytases and phytase-producing bacteria. *Microbes Environ.* 2008, 23: 182-191.
37. Kasim A.B., Edwards H.M. The analysis for inositol phosphate forms in feed ingredients. *J. Sci. Food Agric.* 1998, 76: 1-9.
38. Kerr M.J., Classen H.L., Newkirk R.W. The effects of gastrointestinal tract microflora and dietary phytase on inositol hexaphosphate hydrolysis in the chicken. *Poultry. Sci.* 2000, 79(Suppl. 1), P. 11 (Abstract).

39. Kim J.H., Jung H., Pitargue F.M., Han G.P., Choi H.S., Kil D.Y. Effect of dietary calcium concentrations in low non-phytate phosphorus diets containing phytase on growth performance, bone mineralization, litter quality, and footpad dermatitis incidence in growing broiler chickens. *Asian-Australas J. Anim Sci.* 2017, 30: 979-983.
40. Knuckles B.E., Kuzmicky D.D., Gumbmann M.R., Betschart A.A. Effect of myo-inositol phosphate esters on in vitro and in vivo digestion of protein. *J. Food Sci.* 1989, 54: 1348-1350.
41. Konietzny U., Greiner R. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *International Journal of Food Science and Technology.* 2002, 37: 791-812.
42. Kornegay E.T. Digestion of phosphorus and other nutrients: the role of phytases and factors influencing their activity. In: *Enzymes in animal nutrition* (M.R. Bedford, G.G. Partridge, eds). Finnfeds Marlborough Wiltshire UK, CABI Publ., 2000. P. 237-272.
43. Kumar V., Sinha A.K., Makkar H.P.S., Becker K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chemistry.* 2010, 120: 945-959.
44. Lee S.H., Park H.J., Chun H.K., Cho S.Y., Cho S.M., Lillehoj H.S. Dietary phytic acid lowers the blood glucose level in diabetic KK mice. *Nutrition Research.* 2006, 26: 474-479.
45. Leske K.L., Coon C.N. Bioassay to determine the effect of phytase on phytate phosphorus hydrolysis and total phosphorus retention of feed ingredients as determined with broilers and laying hens. *Poultry Sci.* 1999, 78: 1151-1157.
46. Le'tourneau-Montminy M. P., Narcy A., Lescoat P., Bernier J. F., Magnin M., Pomar C., Nys Y., Sauvant D., Jondreville C. Meta-analysis of phosphorus utilisation by broilers receiving corn-soyabean meal diets: influence of dietary calcium and microbial phytase. *Animal.* 2010, 4: 1844-1853.
47. Leytem A.B., Willing B.P., Thacker P.A. Phytate utilization and phosphorus excretion by broiler chickens fed diets containing cereal grains varying in phytate and phytase content. *Anim. Feed Sci. Tech.* 2008, 146: 160-168.
48. Lönnerdal B. Phytic acid-trace element (Zn, Cu, Mn) interactions. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2002, 37: 749-758.
49. Lopez H.W., Leenhardt F., Coudray C., Remesy C. Minerals and phytic acid interactions: Is it a real problem for human nutrition. *Int. J. Food Sci. Techn.* 2002, 37: 727-739.
50. Lowe J.T., Steenbock H., Keiger C.H. Cereals and rickets. IX. The availability of phytin-P to the chick. *Poult. Sci.* 1939, 18: 40-44.
51. Luttrell B.M. The biological relevance of the binding of calcium ions by inositol phosphates. *J. Biol. Chem.* 1993, 268: 1521-1524.
52. Nelson T.S. The utilization of phytate phosphorus by the chick: a review. *Poult. Sci.* 1967, 46: 862-871.
53. Maddaiah V.T., Hulett B.J., Kurnick A.A., Reid B.L. Availability of calcium phytate, sodium phytate and dicalcium phosphate in chicks, hens, and rats. *Poult. Sci.* 1963, 42: 1286 (Abst.).
54. Maenz D.D., Classen H.L. Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. *Poult. Sci.* 1998, 77: 557-563.
55. Maenz D.D., Engle-Schaan C.M., Newkirk R.W., Classen H L. The effect of minerals and mineral chelators on the formation of phytase-resistant and phytase susceptible forms of phytic acid in solution and in a slurry of canola meal. *Anim. Feed Sci. Technol.* 1999, 81: 177-192.
56. Maenz D.D. Enzymatic characteristics of phytases as they relate to their use in animal feeds. In: *Enzymes in farm animal nutrition* (M.R. Bedford, G.G. Partridge, eds.). New York: CABI Publ., 2001, P. 61-84.
57. Manangi M.K., Coon C.N. Phytate phosphorus hydrolysis in broilers in response to dietary phytase, calcium, and phosphorus concentrations. *Poult. Sci.* 2008, 87: 1577-1586.
58. Markley J.L., Anderson M.E., Cui Q., Eghbalnia H., Lewis I.A., Hegeman A.D., Li J., Schulte C.F., Sussman M.R., Westler W.M., Ulrich E.L., Matyka S., Korol W., Bogusz G. The retention of phytin phosphorus from diets with fat supplements in broiler chickens. *Anim. Feed Sci. Techn.* 1990, 31: 223-230.
59. Menezes-Blackburn D., Gabler S., Greiner R. Performance of seven commercial phytases in an in vitro simulation of poultry digestive tract. *J. Agric. Food Chem.* 2015, 63: 6142-6149.
60. Mothes R., Schwenke K. D., Zirwer D., Gast K. Rapeseed protein – polyanion interactions. Soluble complexes between the 2S protein fraction (napin) and phytic acid. *Die Nahrung.* 1990, 34: 375-385.
61. Mullaney E.J., Ullah A.H. The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, 312: 179-184.
62. Nayini N.R., Markakis P. Phytases. In: *Phytic Acid: Chemistry and Applications* (E. Graf, ed.). Minneapolis Pilatus Press, 1986, P. 101- 118.

63. Nelson T.S. The utilization of phytate phosphorus by the chick—a review. *Poult. Sci.* 1967, 46: 862-871.
64. Nissar J., Ahad T., Naik H.R., Hussain S.Z. A review phytic acid: As antinutrient or nutraceutical. *J. Pharmac. Phytochem.* 2017, 6: 1554-1560.
65. Nys Y., Frapin D., Pointillart P. Occurrence of phytase in plants, animals and microorganisms. In: *Phytase in Animal Nutrition and Waste Management* (M.B. Coelho, E.T. Kornegay, eds). Mount Olive, New Jersey: BASF Corporation Publ., 1996, P. 213-240.
66. 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, 63: 362-372.
67. Onyango E.M., Bedford M.R., Adeola O. Phytase activity along the digestive tract of the broiler chick: a comparative study of an *Escherichia coli*-derived and *Peniophora lycii* phytase. *Can. J. Anim. Sci.* 2005, 85: 61-68.
68. Onyango E.M., Bedford M.R., Adeola O. Efficacy of an evolved *Escherichia coli* phytase in diets of broiler chicks. *Poultry Sci.* 2005, 84: 248-255.
69. Pallauf J., Rimbach G. Recent results on phytic acid and phytase. In: Proceedings of 5th Forum Animal Nutrition, May 4-5, BASF Publ., 1995, P. 43.
70. Peter C.M., Parr T.M., Weibel D.M., Baker D.H. The effects on phytase on growth performance, carcass characteristics, and bone mineralization of late-finishing pigs fed maize-soyabean meal diets containing no supplemental phosphorus, zinc, copper and manganese. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2009, 94: 199-205.
71. Qian H., Kornegay E.T., Denbow D.M. Utilization of phytate phosphorus and calcium as influenced by microbial phytase, cholecalciferol, and the calcium: total phosphorus ratio in broiler diets. *Poultry Sci.* 1997, 76: 37-46.
72. Qvirist L., Carlsson N-G., Andlid T. Assessing phytase activity—methods, definitions and pitfalls. *J. Biol. Meth.* 2015, 2(1) e16. <http://publications.lib.chalmers.se/records/fulltext/218033/local_218033.pdf>
73. Rapp C., Lantzsich H.-J., Drochner W., Hydrolysis of phytic acid by intrinsic plant or supplemented microbial phytase (*Aspergillus niger*) in the stomach and small intestine of minipigs fitted with re-entrant cannulas. 3. Hydrolysis of phytic acid (IP6) and occurrence of hydrolysis products (IP5, IP4, IP3 and IP2). *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 2001, 85: 420-430.
74. Ravindran V., Bryden W.L., Kornegay E.T. Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poult. Avian Biol. Rev.* 1995, 6: 125-143.
75. Ravindran V., Cabahug S., Ravindran G., Selle P.H., Bryden W.L. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus levels. II. Effects on apparent metabolizable energy, nutrient digestibility and nutrient retention. *Br. Poult. Sci.* 2000, 41: 193-200.
76. Rojas S.W., Scott M.L. Factors affecting the nutritive value of cottonseed meal as a protein source in chick diets. *Poult. Sci.* 1969, 48: 819-835.
77. Rutherford S.M., Chung T.K., Moughan P.J. The effect of microbial phytase on ileal phosphorus and amino acid digestibility in broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 2002, 44: 598-606.
78. Rutherford S.M., Chung T.K., Thomas D.V., Zou M.L., Moughan P.J. Effect of a novel phytase on growth performance, apparent metabolizable energy, and the availability of minerals and amino acids in a low-phosphorus corn-soybean meal diet for broilers. *Poult. Sci.* 2012, 91: 1118-1127.
79. Schlemmer U.K., Jany D., Berk A., Schulz E., Rechkemmer G. Degradation of phytate in the gut of swine - pathway of gastro-intestinal inositol phosphate hydrolysis and enzymes involved. *Arch. Anim. Nutr.* 2001, 55: 255-280.
80. Scott T.A., Kampen R., Silversides F.G. The effect of adding exogenous phytase to nutrient-reduced corn- and wheat-based diets on performance and egg quality of two strains of laying hens. *Can. J. Anim. Sci.* 2001, 81: 393-401.
81. Selle P. H., Cowieson A. J., Cowieson N. P., Ravindran V. Protein – phytate interactions in pig and poultry nutrition: a reappraisal. *Nutrit. Res. Rev.* 2012, 25: 1-17.
82. Selle P.H., Ravindran V. Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. *Livest. Sci.* 2008, 113: 99-122.
83. Selle P.H., Ravindran V. Microbial phytase in poultry nutrition. *Anim. Feed Sci. Techn.* 2007, 135: 1-41.
84. Selle P.H., Ravindran V., Caldwell R.A., Bryden W.L. Phytate and phytase: Consequences for protein utilization. *Nutrit. Res. Rev.* 2000, 13: 255-278.
85. She Y., Li D., Zhang Sh. Methodological aspects of determining phosphorus digestibility in swine: A review. *Anim. Nutr.* 2017, 3: 97-102.
86. Simpson C.J., Wise A. Binding of zinc and calcium to inositol phosphates (phytate) *in vitro*. *Br. J. Nutr.* 1990, 64: 225-232.

87. Singh M., Krikorian A.D. Inhibition of trypsin activity by phytate. *J. Agr. Food Chem.* 1982, 30: 799-800.
88. Takemasa M., Murakami H., Yamazaki M. Reduction of phosphorus excretion in chicks by addition of yeast phytase. *Jpn. Poult. Sci.* 1996, 33: 104-111.
89. Tamim N.M., Angel R. Phytate phosphorus hydrolysis as influenced by dietary calcium and micro-mineral source in broiler diets. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51: 4687-4693.
90. Tamim N.M., Angel R., Christman M. Influence of dietary calcium and phytase on phytate phosphorus hydrolysis in broiler chickens. *Poult. Sci.* 2004, 83: 1358-1367.
91. Taylor T.G. The availability of the calcium and phosphorus of plant materials for animals. *Proc. Nutr. Soc.* 1965, 24: 105-111.
92. Thompson L.U. Antinutrients and blood glucose. *Food Technol.* 1988, 42: 123-131.
93. Thompson L.U., Button C.L., Jenkins D.J.A. Phytic acid and calcium affect the in vitro rate of navy bean starch digestion and blood glucose response in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 1987, 46: 467-473.
94. Trah T.T. *Thermostable phytase from a Bacillus sp.* Doct. thes., Department of Biotechnology, Lund University, Sweden, 2010, 124 p.
95. Tran T.T., Hatti-Kaul R., Dalsgaard S., Yu S. A simple and fast kinetic assay for phytases using phytic acid-protein complex as substrate. *Anal. Biochem.* 2011, 410: 177-184.
96. Trufanov O.V. *Fitazy v kormlenii sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh i ptitsy* (Phytase in feeding farm animals and poultry). Kiev: Poligrfinko Publ., 2011, 112 p. (In Russian)
97. Ushasree M.V., Sumayya H.B.S., Pandy A. Adopting structural element from intrinsically stable phytase A promising strategy towards thermostable phytases. *Ind. J. Biotechn.* 2011, 10: 458-467.
98. 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, 266: 2313-2319.
99. Vasquez M.V., Glitsoe V. *Phytase Unit Myth!* 2012.
<https://www.dsm.com/content/dam/dsm/anh/en_US/documents/2012_Phytase_unit_myths.pdf>
100. Volchok A.A., Korotkova O.G., Kondrat'eva E.G., Kryukov V.S., Sinitsyna O.A, Sinitsyn A.P., Shashkov I.A. [The activity of glucanase and xylanase feed enzyme preparations in the digestive tract of poultry]. *Ptitsevodstvo - Poultry Science.* 2018, 4: 39-45. (In Russian)
101. Wodzinski, R.J., Ullah, A.H.J. Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.* 1996. 42: 263-303.
102. Yoshida M and Hoshii H 1977. Improvement of biological assay to determine available phosphorus with growing chicks. *Jap. Poultry Sci.* 14: 33-43.
103. Warden W.K., Schaible P.J. Preliminary investigations concerning utilization of phytin phosphorus by the chick. *Poult. Sci.* 1962, 41: 1692 (Abstract.)
104. Wise A. Dietary factors determining the biological activities of phytase. *Nutr. Abstr. Rev.* 1983, 53: 791-806.
105. Woyengo T.A., Cowieson A.J., Adeola O., Nyachoti C.M. Ileal digestibility and endogenous flow of minerals and amino acids: responses to dietary phytic acid in piglets. *Br. J. Nutr.* 2009, 102: 428-433.
106. Wyss M., Brugger R., Kronenberger A., Rémy R., Fimbel R., Oesterhelt G., Lehmann M., van Loon A.P.G.M. Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase): Catalytic properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65: 367-373.
107. Zhang G., Dong X., Wang Z., Zhang Q., Wang H., Tong J. Purification, characterization, and cloning of a novel phytase with low pH optimum and strong proteolysis resistance from *Aspergillus ficuum* NTG-23. *Biores. Technol.* 2010, 101: 4125-4131.
108. Zeller E., Schollenberger M., Kühn I., Rodehutscord M. Hydrolysis of phytate and formation of inositol phosphate isomers without or with supplemented phytases in different segments of the digestive tract of broilers. *J. Nutr. Sci.* 2015. 4: 1-12.

**Evaluation of fitases action in gastrointestinal tract
and the use of fitase preparations in animal feeding: a review**

¹Kryukov V.S., ²Glebova I.V., ³Antipov A.A.

¹LLC Vetpharmstandart, Moscow; ²Kursk State Agricultural Academy,
Kursk; ³Poultry Institute, Sergiev Posad, Moscow oblast, Russian Federation

ABSTRACT. Since the beginning of the 60s, phytase preparations, an enzyme from the group of phosphatases, with a predominant affinity for plant phytates, are widely used in the market of feed additives. The aim of this work is to systematize data of the phytase action *in vitro* and in animals and the effects of diet composition on the availability of phytate phosphorus. The “extraphosphate” effect of phytases and a new explanation of the inhibition of the availability of amino acids by phytates are described. Examples of the use of commercial feed preparations containing phytase are given. Selection of highly active phytase producers among fungi and bacteria and methods of genetic engineering made it possible to create feed phytases, which allows for 30–40% increase in the use of phosphorus from vegetable raw materials. The extraphosphate effect exerted by feeding phytases is expressed by an increase in the available amino acids of the protein and the metabolizable energy of the feed. This fact is widespread and repeatedly confirmed in experiments, however, the explanation of this phenomenon is erroneous, since phytases do not have a proteolytic effect. Authors of the review conclude that the splitting of phytates leads to loss of their ability to block already digested amino acids, causing an increase in their availability. The increase in the amount of available amino acids has led to the erroneous conclusion about the increase in protein digestibility. When choosing phytase feed preparations, it is necessary to take into account their resistance to the proteases of gastrointestinal tract and the stability to thermal effects during the granulation of feed. It is necessary to critically treat the claimed characteristics of the action of enzyme preparations, since they do not always take into account the particular composition of feed. Further studies are needed to study the molecular mechanisms of the extraphosphate action of phytases, causing an increase in the availability of amino acids and metabolizable energy.

Keywords: poultry nutrition, enzyme feed preparations, phytase, phytates, nutrients availability

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2019, 2: 19-43

Поступило в редакцию: 25.02.2019

Получено после доработки: 01.04.2019

Крюков Валерий Сергеевич, д.б.н., тел.: +7(926)-532-40-70; kryukov.v.s@mail.ru;

Глебова Илона Вячеславовна, д.с.-х.н., зав. кафедрой кормления с.-х. животных,

тел.: +7(910) 277-10-70; snow1968@inbox.ru

Антипов Александр Александрович – соиск., тел.: +7(910)227-27-27;

antipov.alexander@mail.ru